



Facultad de Química y PEDECIBA Química
Universidad de la República

Tesis de Doctorado para acceder al título de
Doctora en Química

Caracterización de partículas inorgánicas y evaluación de su potencial como adyuvante de inmunización.

Lic. en Bioq. Geraldine Rinsky

Orientador
Dr. José Alejandro Chabalgoity

Co-orientadoras
Dra. María Moreno
Dra. Iris Miraballes

Departamento de Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina-UdelaR
Laboratorio de Biotecnología, IPTP, Facultad de Química- UdelaR
Uruguay
Noviembre 2019

*Dedicada a mi mamá, Susana Cáceres y María Moreno, pilares,
que hicieron que la presente tesis llegase a concluir.*

Agradecimientos

Primero a mis tutores, el Dr. José Alejandro Chabalgoity, la Dra. María Moreno y la Dra. Iris Miraballes, por su guía durante todo el proceso de esta tesis. Quiero realizar una mención especial para María, que sin su ayuda, guía y consejos esta tesis no hubiese llegado a su fin.

Al Dr. Alberto Nieto que comenzó tutorando la presente tesis e hizo posible que la misma fuera financiada por la empresa que sintetizó las suspensiones.

También a los integrantes del LBT, del IPTP, en especial a Susana Cáceres, por su apoyo, ayuda incondicional y consejos, y a Silvina Rossi por sugerirme el uso de protein friendly buffers para poder continuar.

Además, a absolutamente todos los integrantes del Departamento de Desarrollo Biotecnológico, por el compañerismo, ayuda y consejos recibido que permitieron la fácil adaptación a un nuevo laboratorio para poder concluir la tesis. En especial a Marichu, por enseñarme dónde encontrar cada cosa que necesitaba y ayudarme durante el proceso de adaptación.

Asimismo, a los integrantes de NanoMat, del IPTP, en especial a Helena Pardo, Álvaro Mombrú y Mariano Romero por su colaboración y ayuda en el uso de sus equipos.

A Macarena Pérez por su amistad, apoyo y por facilitarme el vector de la estreptavidina, y ayudarme durante su producción y purificación.

A varios integrantes de la empresa por enseñarme cada uno su especialidad durante mi estancia en la empresa.

A Martin Rossotti, por facilitarme el GMCSF.

A mis amigas, Xime, María Angélica, Ana y Gretel por estar siempre.

Y por último, pero no menos importante, a José Manuel y mi familia, por el apoyo y la fuerza recibida durante todo el trayecto.

Financiación

El presente estudio estuvo enmarcado en un proyecto financiado por la empresa extranjera que sintetizó las partículas.

Como estudiante de Doctorado y Maestría de PEDECIBA Química conté con apoyo económico por parte de dicho programa de posgrado.

Además conté con la beca de Maestría otorgada por la ANII.

Comunicación autorizada por la empresa y derivada de la presente tesis.

“Functionalized calcium carbonate (FCC) microparticles as a novel immunization adjuvant”

Geraldine Rinsky, Susana Caceres, Iris Miraballes, Daniel E. Gerard, Macarena Pirez, Cathy j. Ridgway, Nicola di Maiuta, Alberto Nieto, Joachim Schoelkopf, José A. Chabalgoity, Maria Moreno.

Scientific Meeting- Update on Immunology: from mechanisms to immunotherapy and viceversa, - SUI (sociedad uruguaya de inmunologia), Intitut Pasteur, Montevideo, 19 al 21 octubre 2016.

Tabla de contenidos

TABLA DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	8
CAPÍTULO I:	10
INTRODUCCIÓN.....	10
1 <i>Introducción</i>	11
1.1 Historia de la vacunación y definición de adyuvante.....	11
1.2 Adyuvantes: historia y su uso en la actualidad.....	14
1.3 El adyuvante ideal, elección, seguridad y efectos adversos.....	18
1.4 Clasificación de adyuvantes.....	20
1.5 Compuestos inorgánicos como adyuvantes.....	22
1.6 Relación entre la inmunidad innata y la adquirida.....	29
1.7 Protección inmunológica durante la vacunación.....	43
1.8 Mecanismo de acción de los adyuvantes.....	44
1.9 Mecanismo de acción de los adyuvantes de aluminio.....	46
1.10 Antecedentes e introducción al material a ser evaluado en la presente tesis.....	53
OBJETIVO GENERAL.....	55
CAPÍTULO II:.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
2 <i>Materiales y métodos</i>	58
2.1 Suspensiones de partículas FCC-S06 y HAP-S08.....	58
2.2 Caracterización de las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08.....	58
2.3 Antígenos.....	60
2.4 Estudios de adsorción con la proteína modelo OVA.....	63
2.5 Isotermas de adsorción con OVA.....	63
2.6 Líneas celulares.....	64
2.7 Animales de experimentación.....	66
2.8 Estudios de toxicidad.....	67
2.9 Evaluación de la actividad inmunoestimulante en ensayos <i>in vitro</i>	70
2.10 Evaluación de la actividad inmunoestimulante en ensayos <i>in vivo</i>	77
2.11 Análisis estadístico.....	80
CAPÍTULO III:	82
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y OBTENCIÓN DE UNA FORMULACIÓN CON UN ANTÍGENO MODELO.....	82
3 <i>Resultados y discusión de la caracterización fisicoquímica y obtención de la formulación con un antígeno modelo</i>	83
3.1 Objetivo específico.....	83
3.2 Caracterización fisicoquímica.....	83
3.3 Caracterización del antígeno recombinante.....	90
3.4 Obtención de una formulación con el antígeno "modelo" OVA.....	93
3.5 Isotermas de adsorción con el antígeno modelo OVA.....	97
3.6 Conclusiones.....	101
CAPÍTULO IV:.....	103

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD.....	103
4 <i>Resultados y discusión de la evaluación de la toxicidad.....</i>	104
4.1 Objetivo específico.....	104
4.2 Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de la suspensión FCC-S06.....	104
4.3 Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de la suspensión HAP-S08	106
4.4 Evaluación de la actividad hemolítica de la suspensión FCC-S06.....	107
4.5 Evaluación de la actividad hemolítica de la suspensión HAP-S08.....	108
4.6 Evaluación de la toxicidad <i>in vivo</i>	108
4.7 Conclusiones.....	113
CAPÍTULO V:	114
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE EN ENSAYOS <i>IN VITRO</i>.....	114
5 <i>Resultados y discusión de la evaluación de la actividad inmunoestimulante en ensayos in vitro</i>	115
5.1 Objetivo específico.....	115
5.2 Efecto de las formulaciones con FCC-S06 sobre la activación de monocitos/macrófagos murinos	116
5.3 Efecto de las formulaciones con HAP-S08 sobre la activación de monocitos/macrófagos murinos	122
5.4 Efecto de las formulaciones con FCC-S06 en la activación y maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea.....	126
5.5 Efecto de las formulaciones con HAP-S08 en la activación y maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea.....	135
5.6 Efecto de la suspensión FCC-S06 en la captación, procesamiento y acumulación del antígeno DQ-OVA por células presentadoras.....	142
5.7 Evaluación de la capacidad de BMDCs pre-estimuladas con la formulación de <i>cross-presentar</i> el antígeno a esplenocitos de ratones inmunizados con la misma	147
5.8 Conclusiones.....	149
CAPÍTULO VI:.....	153
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE EN ENSAYOS <i>IN VIVO</i>.....	153
6 <i>Resultados y discusión de la evaluación de la actividad inmunoestimulante de FCC-S06 en ensayos in vivo</i>	154
6.1 Objetivo específico.....	154
6.2 Efecto de la administración intraperitoneal de la suspensión FCC-S06 sobre el reclutamiento celular.....	155
6.4 Efecto de la formulación FCC-S06+STP en la inducción de una respuesta inmune citotóxica de memoria	159
6.5 Efecto de la formulación FCC-S06+STP en la inducción de una respuesta inmune humoral.....	162
6.6 Conclusiones.....	164
CAPÍTULO VII:	166
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	166
7 <i>Conclusiones finales y perspectivas.....</i>	167
BIBLIOGRAFÍA.....	171

Índice de abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ADN copia
- Ag:** Antígeno
- AH:** Hidróxido de aluminio (del inglés, *Aluminum hydroxide*)
- AHR:** del inglés, *Aryl hydrocarbon receptor*
- AIM:** del inglés, *Absent in melanoma*
- ANOVA:** Análisis de varianza
- AP:** Fosfato de aluminio (del inglés, *Aluminum phosphate*)
- AP-1:** del inglés, *Activation protein 1*
- APC:** Célula presentadora de antígeno (del inglés, *Antigen presenting cell*)
- APC:** Aloficocianina (del inglés, *AlloPhycocyanin*)
- APC-Cy7:** Conjugado en tándem de APC y cianina Cy7
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- AS:** Sistema de adyuvantes (del inglés, *adjuvant system*)
- ASC:** del inglés, *Apoptosis-associated speck-like protein*
- Asp:** Ácido aspártico
- ATP:** Adenosin trifosfato
- ATT:** Test de toxicidad anormal (del inglés, *Abnormal toxicity test*)
- B.E.T:** Brunauer–Emmett–Teller
- Bcl:** del inglés, *B cell lymphoma*
- BCR:** Receptor de la célula B (del inglés, *B cell receptor*)
- BMDC:** Célula dendrítica derivada de médula ósea (del inglés, *Bone marrow dendritic cell*)
- CaP-NPs:** Nanopartículas de fosfato de calcio
- casp:** Caspasa
- CF:** Citometría de flujo
- CFSE:** del inglés, *5(6)-Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester*
- CHEA:** Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR

CHMP: del inglés, *Committee for Medicinal Products for Human Use*

CK: Citoquina

CLR: del inglés, *C-type lectins*

ConA: Concavalina A

CTL: Linfocito T citotóxico (del inglés, *Cytotoxic T lymphocytes*)

DAMP: Patrón molecular asociado a daño tisular (del inglés, *Damage associated molecular pattern*)

DC: Célula dendrítica (del inglés, *Dendritic cell*)

DILAVE: División de Laboratorios Veterinarios, Montevideo, Uruguay

dm: Diámetro promedio

DMEM: del inglés, *Dulbecco modified Eagles minimal essential medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DQ-OVA: Ovoalbúmina marcada con un fluoróforo

DTH: Hipersensibilidad de tipo retardada (del inglés, *Delayed-type Hypersensitivity*)

EDTA: Ácido etilendiamino tetraácetico

ELISA: Enzimoinmunoensayo (del inglés, *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMEA: del inglés, *European Medicinal Evaluation Agency*

FACS: del inglés, *Fluorescence-activated cell sorting*

FCA: Adyuvante completo de Freund (del inglés, *Freund's complete adjuvant*)

FCC: del inglés, *Functionalised Calcium Carbonate*

FDA: del inglés, *Food and Drug Administration*

FIA: Adyuvante incompleto de Freund (del inglés, *Freund's Incomplete adjuvant*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, *Fluorescein IsoThioCyanate*)

FSC: del inglés, *Forward scatter*

Gln: Glutamina

GMCSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, *Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GR: Glóbulo rojo

HA: Hemaglutinina de influenza virus

HAP: Hidroxiapatita

HBV: del inglés, *Hepatitis B virus*

HEV: del inglés, *Hepatitis E virus*

hiSFB: Suero fetal bovino inactivado por calor

HIV: del inglés, *Human immunodeficiency virus*

HKLM: del inglés, *Heat-killed Listeria monocytogenes*

HPV: del inglés, *Human papillomavirus*

HSV: del inglés, *Herpes simplex virus*

i.d.: Intradérmica

i.p.: Intraperitoneal

iDC: DC inmadura

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IKK: del inglés, *I κ B kinase complex*

IL: Interleuquina

ILC: del inglés, *Innate lymphoid cells*

ILL: del inglés, *Innate-like lymphocytes*

IPTG: Isopropil β -D-thiogalactopiranosido

IPV: del inglés, *Inactivated Polio Vaccine*

IRAK: del inglés, *IL-1 receptor-associated kinase 4*

IRF3: del inglés, *Interferon response factor 3*

ISCOM: Complejo inmuno-estimulador

I κ B: inhibidor de NF- κ B

KDa: kilodalton

LD: Límite de detección

LPS: Lipopolisacárido

LRR: del inglés, *Leucin Rich Repeats*

MALDI-TOF: del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, time-of-flight*

MAPK: del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*

mDC: DC madura

MDP: Muramyldipéptido

MFI: Intensidad media de fluorescencia (del inglés, *Mean Fluorescence Intensity*)

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés, *Major histocompatibility complex*)

MMR: Sarampión, Paperas, Rubeola (del inglés, *Measles, Mumps, Rubella*)

MPL: Monofosforil lípido A (del inglés, *monophosphoryl lipid A*)

MTT: del inglés, *(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

MWGT: del inglés, *Mouse Weight Gain Test*

MyD88: del inglés, *Myeloid Differentiation primary response 88*

NDV: del inglés, *Newcastle disease virus*

NEMO: del inglés, *NF- κ B essential modulator*

NET: del inglés, *Neutrophil extracellular traps*

NF- κ B: del inglés, *Nuclear factor κ B*

NK: del inglés, *Natural killer (cells)*

NLR: del inglés, *NOD-like receptors*

NLRP: del inglés, *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein*

NO: óxido nítrico (del inglés, *nitric oxide*)

NOD: del inglés, *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NOS: NO sintetasa

OPV: del inglés, *Oral Polio Vaccine*

OVA: Ovoalbúmina

PAD4: del inglés, *peptidylarginine deiminase 4*

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos (del inglés, *Pathogen-associated molecular pattern*)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *phosphate-buffered saline*)

PBST: PBS con 0,05% Tween 20

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase chain reaction*)

PE: Ficoeritrin (del inglés, *Phycoerythrin*)

PE-Cy7: conjugado en tándem de PE y cianina Cy7

PerCP-Cy5: conjugado en tándem de *Peridinin Chlorophyll Protein* y cianina Cy5

PMSF: Floruro de fenilmetilsulfonilo

PRR: Receptores de reconocimiento de patrón (del inglés, *Pattern recognition receptors*)

qPCR: PCR cuantitativa

RIG: del inglés, *Retinoic acid-inducible gene 1*

RLR: del inglés, *RIG-1 like receptors*

RORyt: del inglés, *Retinoic acid receptor related orphan receptor yt*

ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés, *Reactive oxygen species*)

RT-PCR: del inglés, *Reverse transcription PCR*

s.c.: subcutánea

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEAP: Enzima fosfatasa alcalina embrionaria secretada (del inglés, *Secreted embryonic alkaline phosphatase*)

SFB: Suero fetal bovino

SI: Sistema Inmune

SSA: Superficie específica (del inglés, *Specific surface area*)

SSC: del inglés, *Side scatter*

STAT: del inglés, *Signal transducer and activator of transcription*

STP: Estreptavidina

Syk-PI3: del inglés, *phosphoinositide 3-kinase*

TAB: del inglés, *Poly-ubiquitin-binding adaptor protein*

TAK: del inglés, *Serine-threonine kinase*

Tamb: Temperatura ambiente

T_{CM}: Célula T de memoria central

TCR: Receptor de la célula T (del inglés, *T cell receptor*)

T_{EM}: Célula T efectora de memoria

T_{fh}: Linfocito T colaborador folicular (del inglés, *T-helper follicular lymphocyte*)

TGF: del inglés, *Transforming growth factor*

Th: Linfocito T colaborador (del inglés, *T-helper lymphocyte*)

TIR: del inglés, *Toll-like/IL-1 receptor*

TIRAP: del inglés, *MyD88 adaptor like molecule, MAL*

TLR: del inglés, *Toll-like receptor*

TMB: 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina

TNF: del inglés, *Tumor necrotic factor*

TRAF: del inglés, *TNF receptor associated factor*

TRAM: del inglés, *TRIF-related adaptor molecule*

Treg: Linfocito T regulador

TRIF: del inglés, *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*

T_{RM}: Célula T residente de tejido de memoria

β 2m: β -2 microglobulina

β ME: β -mercaptoetanol

Resumen

Actualmente la mayoría de las vacunas son diseñadas con subunidades las cuales poseen una inmunogenicidad limitada, por lo que es necesario el uso de adyuvantes en su formulación. A pesar de los avances en inmunología, el empleo de compuestos de aluminio como adyuvantes sigue siendo la opción más aceptada. Éstos presentan desventajas, lo que ha impulsado el desarrollo de nuevos adyuvantes, que es en la actualidad un campo de gran actividad científica. En esta área se enmarca el presente proyecto de tesis. Las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08, sintetizadas a partir de calcita (carbonato de calcio), suministradas por una empresa extranjera fueron evaluadas como posible adyuvante. La FCC-S06 es una suspensión de micropartículas funcionalizadas con grupos fosfato. Obteniéndose, según la empresa, micropartículas donde se incorpora hidroxiapatita en la superficie, resultando en un incremento considerable en la superficie específica. La HAP-S08 fue sintetizada utilizando otro proceso de síntesis con el objetivo de obtener una suspensión de partículas con un diámetro promedio inferior al mínimo obtenido utilizando la síntesis estándar de FCCs. La empresa informó que la suspensión resultante teóricamente está compuesta por partículas que son 100% hidroxiapatita. Como está demostrada la eficacia de la hidroxiapatita en la adsorción de una gran variedad de proteínas, es biocompatible y se ha utilizado como adyuvante de inmunización se eligieron ambas suspensiones como candidatas para su evaluación como adyuvantes.

En el presente trabajo se confirmó la hipótesis de que la suspensión FCC-S06 es biocompatible ya que no se observó toxicidad en los estudios *in vitro* ni *in vivo*, siendo menos tóxica que el adyuvante de referencia. Está formada por un *core* de carbonato de calcio con una sal de la familia de los fosfatos de calcio precipitada en su superficie, cristalina, de morfología esferoide con estructuras en forma de placas laminares que sobresalen de la superficie formando poros intrapartículas, lo que aumenta considerablemente la superficie específica. Las formulaciones con FCC-S06 tienen la capacidad de activar al sistema inmune

innato, estimulando la activación y maduración de células presentadoras de antígenos, la presentación antigénica, el reclutamiento de componentes del sistema inmune al sitio de inoculación y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Por lo anterior, se podría considerar como un posible candidato adyuvante. Lo antes mencionado modula la respuesta adaptativa hacia un perfil Th17 y Th1.

En cuanto a la suspensión HAP-S08 no se pudo identificar la sal de la familia de los fosfatos de calcio que la compone. Se determinó que está formada por partículas amorfas sin poros intrapartículas. Los resultados permiten asegurar que no es tóxica ni *in vitro* ni *in vivo*, y sugieren que las formulaciones con HAP-S08 inducen *in vitro* la activación y maduración de células presentadoras de antígenos, y en concordancia con el perfil de citoquinas secretado por estas células, estimulan la activación de una respuesta inmune adaptativa polarizada hacia un perfil Th17.

Sin embargo, poseen una gran limitante, son muy inestables y sedimentan en periodos cortos de tiempo siendo difícil su re-dispersión. Lo anterior hace que su aplicación en el diseño de vacunas no sea recomendable. Por lo cual para seguir avanzando en el proceso de desarrollo de un nuevo adyuvante es necesario realizar un nuevo proceso de síntesis que no se base en la precipitación. Por ejemplo, los compuestos basados en forma de gel son más estables y aseguran una mejor reproducibilidad y homogeneidad en la adsorción antigénica.

Capítulo I:

Introducción

1 Introducción

1.1 Historia de la vacunación y definición de adyuvante

La historia de la vacunación se remonta a los años 900 en China, donde existen registros comprobando el uso de la técnica de variolización, basada en la observación de que aquellos individuos que sobrevivían a la viruela, quedaban protegidos contra la misma de por vida. La variolización consistía en la inoculación en individuos sanos; de material proveniente de pústulas causadas por la viruela. Técnica que resultó ser eficiente en la inducción de protección, pero en ocasiones causaba enfermedad severa e incluso la muerte^{1,2}.

Es a Edward Jenner que, a fines del siglo XVIII, se le atribuye la primera demostración a través de la experimentación, que la vacunación confiere protección sin transmitir la enfermedad (viruela). Sus experimentos se basaron en los efectos de protección cruzada obtenidos al inocular material infeccioso de vacas infectadas con viruela bovina¹.

La vacunación es un proceso de inmunización deliberada que utiliza la capacidad de especificidad y memoria de la inmunidad adaptativa. Tiene como objetivo inducir una respuesta inmune específica contra antígenos, y como consecuencia, que se desencadene en el individuo inmunizado una respuesta inmune protectora contra la infección y/o enfermedad causada por un patógeno¹. La vacunación ha probado ser una de las estrategias más eficientes en la prevención de enfermedades infecciosas, siendo el logro de mayor costo-efectividad de las ciencias biomédicas. Claros ejemplos de lo anterior son la erradicación de la viruela en 1980, y la disminución de la prevalencia de polio y rubeola². La vacunación salva 5 vidas por minuto y se estima salvará entre el 2011 y el 2020 más de 25 millones³.

El enfoque tradicional para la elaboración de vacunas, involucró el uso de microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos o inactivados y toxoides purificados. Existen varios ejemplos exitosos de protección gracias a vacunas con microorganismos vivos atenuados, éstos incluyen vacunas contra la

viruela, polio (en su versión, OPV), fiebre amarilla o tifoidea, tuberculosis, MMR (sarampión, paperas, rubeola), varicela y también con microorganismos muertos o inactivados como ser vacunas contra fiebre tifoidea, cólera, hepatitis A, polio (en su versión, IPV) y rabia (**figura 1.1**)¹. Algunas de estas vacunas pueden provocar reacciones adversas debido a su gran reactividad (efectos tóxicos asociados a la presencia de LPS y ácidos nucleicos, principalmente) y/o tienen la desventaja de que el microorganismo puede revertir a su forma virulenta y causar enfermedad y/o infección, tal es el caso de las vacunas a microorganismos atenuados. Además, puede existir la posibilidad de que el microorganismo en cuestión no pueda ser cultivado *in vitro*⁴.

Por lo anterior, un enfoque posterior, involucró el diseño con subunidades, con el fin de utilizar antígenos definidos, ya sean productos naturales, recombinantes o péptidos sintéticos. Esta estrategia confiere mayor seguridad, minimizando reacciones adversas, pero poseen generalmente una inmunogenicidad limitada, siendo menos efectivas que las anteriores³. Por estos motivos, requieren ser co-administradas con un adyuvante y desde hace un siglo se utilizan en la elaboración de vacunas, habiendo en la actualidad varias formuladas con adyuvantes, administradas a humanos (**figura 1.1**)¹.

Los **adyuvantes** se definen como un conjunto heterogéneo de sustancias (moléculas, compuestos o complejos macromoleculares), que potencian la inmunogenicidad de antígenos y modulan la respuesta inmune (celular y/o humoral) inducida por la inmunización. Actúan acelerando, prolongando, aumentando o modulando/direccionando la respuesta inmune protectora antígeno-específica cuando se administran en combinación con dicho antígeno^{5,6,7}. Inducen la producción de anticuerpos con aumentada avidéz y capacidad neutralizante, promueven la activación de linfocitos T citotóxicos, mejoran la respuesta inmune en individuos inmunológicamente inmaduros, inmunodeprimidos o senescentes y reducen la cantidad de antígeno por dosis, disminuyendo el costo de la vacunación⁷.

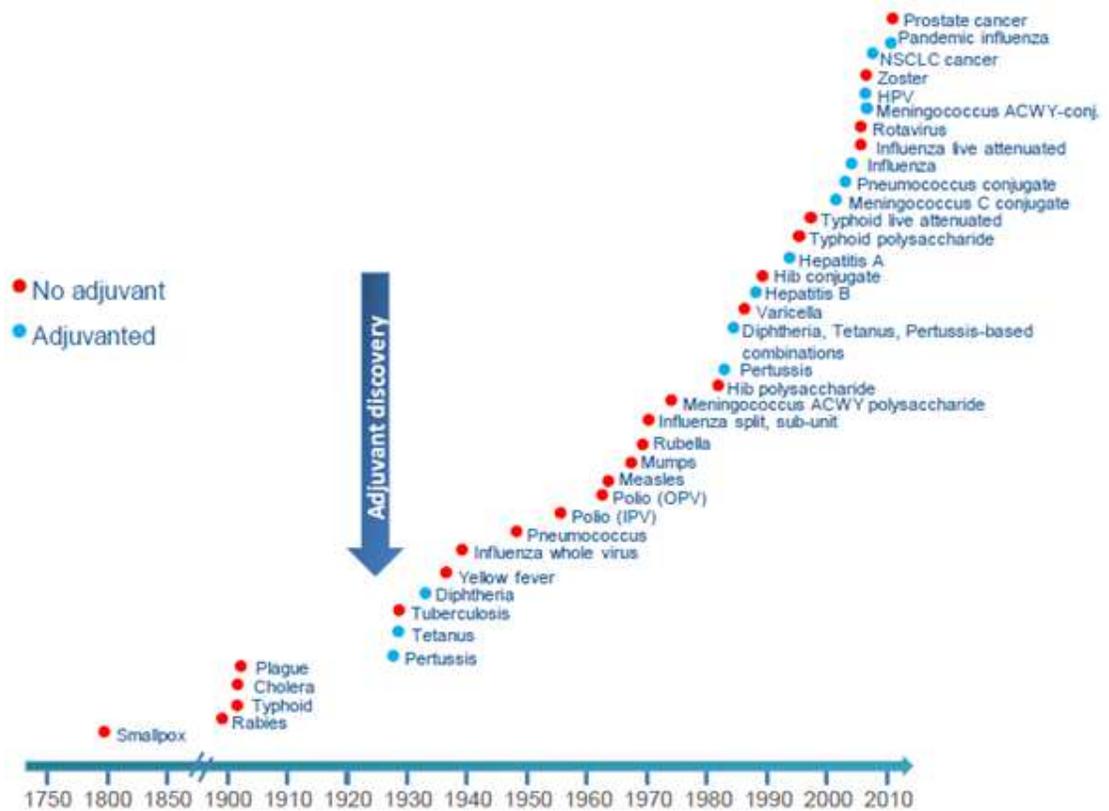


Figura 1.1: Vacunas profilácticas aprobadas para su uso en humanos sin (círculo celeste) o con adyuvante (círculo rojo). Extraído de Pasquale, A. *et al*.

Los avances biotecnológicos, así como en el entendimiento de los mecanismos de protección y prevención de patologías a través de la vacunación, de las interacciones patógeno-huésped y los roles de los antígenos y adyuvantes para inducir y modular la respuesta inmune protectora deseada, han permitido que el diseño de vacunas sea desde hace algunos años más racional que empírico^{2,8}. Lo anterior desencadenó el surgimiento de un nuevo campo científico denominado “vacunología” revisado por Barrett, A. *et al*⁹. Algunos ejemplos de esta nueva era son la vacuna contra la hepatitis B, desarrollada expresando el antígeno de superficie de dicho virus en levaduras, la vacuna contra el meningococo tipo B desarrollada mediante vacunología inversa¹⁰ y la vacuna viva-atenuada tetravalente contra el dengue utilizando genética inversa⁹.

1.2 Adyuvantes: historia y su uso en la actualidad

Para contrarrestar las infecciones con *Clostridium tetani* y con *Corynebacterium diphtheriae* a principios de los 1900s se inmunizaba con mezclas de toxinas y anticuerpos, lo que causaba graves efectos secundarios. Posteriormente, se obtuvieron grandes avances con la producción de toxoides inactivados por calor o formolados¹¹, donde se mantiene intacta la propiedad inmunogénica de la toxina pero no sus efectos tóxicos. Gaston Ramon, un veterinario francés, en 1925^{12,13}, publicó en sus estudios que la administración de los toxoides tetánico y diftérico junto con sustancias como agar, tapioca, lecitina, almidón, aceite o saponinas, incrementaban la inmunidad protectora más que la inoculación de los antígenos solos. Y fue en esos estudios que se acuñó el término **adyuvante**, proveniente del latín “*adjuvare*” que significa ayuda.

En la misma época, Glenny demostró que la administración de toxoides precipitados por la adición de sulfato de potasio y aluminio, conocido como “*potash alum*”, inducía un incremento significativo en la respuesta inmune contra el toxoide. Con este descubrimiento las sales de aluminio se usaron para la preparación de vacunas contra *C. tetani* y *C. diphtheriae*¹⁴. El fosfato de aluminio fue introducido posteriormente por Ericsson en 1947, utilizando un método en el cual el toxoide diftérico era co-precipitado en una matriz de fosfato de aluminio¹⁵. En el mismo año, Holt demostró que el fosfato de aluminio preformado, presentaba propiedades adsorptivas y de adyuvante¹⁶ (**Tabla 1.1**). En la década del 60, Relyveld del Instituto Pasteur, introdujo el fosfato de calcio¹⁷, el cual fue utilizado en Francia para vacunación rutinaria contra tétanos, difteria y pertusis^{18,19} (**Tabla 1.1**). A pesar de que a finales de los 80, el fosfato de calcio fue sustituido por las sales de aluminio, sigue aprobado como adyuvante en vacunas para humanos²⁰. Y desde los ensayos de Glenny y colaboradores a la actualidad, billones de dosis de vacunas formuladas con compuestos de aluminio se han aplicado a humanos, con demostrada eficacia y con un perfil de seguridad aceptable en diversas poblaciones, incluidos niños pequeños, embarazadas y adultos mayores²¹.

En 1936, Freund desarrolló una emulsión de aceite mineral en agua conteniendo micobacterias muertas, creando uno de los adyuvantes más potentes hasta el día de hoy, el adyuvante completo de Freund (*del inglés*, FCA)^{22,23}. A pesar de su excelente efectividad, el FCA causa reacciones locales severas, por lo que es considerado tóxico para su uso en humanos. En los años 50, se introdujo el adyuvante incompleto de Freund (*del inglés*, FIA), preparado que contiene solamente la emulsión de aceite en agua del FCA, y fue usado en humanos en una vacuna contra influenza²⁴, pero debido a sus considerables efectos secundarios esta vacuna se discontinuó a mediados de los años 60²⁵. Décadas después, su utilización se limitó pero no fue totalmente excluida y se completaron varios ensayos clínicos en grupos de alto riesgo para vacunas contra HIV, melanoma y carcinoma renal, y esclerosis múltiple³.

Se continuó el estudio de la capacidad inmunoestimuladora de este tipo de emulsiones, lo que desencadenó el desarrollo por Novartis del MF59^{26,27}, nano-emulsión de agua en aceite a base de escualeno (aceite biocompatible y biodegradable) estabilizada con surfactantes no iónicos. El escualeno es un intermediario esencial en la biosíntesis de hormonas esteroideas, colesterol y la vitamina D²⁸. Desde fines los 90 el MF59 está aprobado para su uso en humanos en una vacuna contra la influenza estacional y la influenza pandémica³ (**Tabla 1.1**).

En la década de los 50, Johnson y colaboradores descubrieron que el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas poseía actividad adyuvante²⁹. Lederer y colaboradores en 1974, identificaron el componente de las mycobacterias del FCA con actividad adyuvante, el muramyldipéptido (MDP)³⁰ (**Tabla 1.1**). En los años subsiguientes se continuaron identificando numerosos componentes bacterianos que son potentes activadores del sistema inmune (SI)³¹, por ejemplo el monofosforil lípido A (MPL) (**Tabla 1.1**), descubierto en los años 80, derivado del LPS de la bacteria gram negativa *Salmonella Minnesota*, agonista del receptor tipo Toll 4³¹ (*del inglés*, TLR4), inmunoestimulador que ha sido evaluado extensamente en varios ensayos clínicos³². Incluso, en la actualidad está aprobado su uso en Europa en vacunas

contra alergias (**Tabla 1.1**). Otro ejemplo, es el ADN bacteriano debido a los motivos CpG descubierto en la década de los 90^{33,34}.

Hace más de 50 años, se reconoció que una nueva generación de adyuvantes sería la clave para el diseño de vacunas contra patógenos intracelulares “difíciles” que impactan la salud humana global (ej. malaria, HIV, tuberculosis), ya que los compuestos de aluminio (enfoque clásico), tienen la limitación de inducir una polarización a respuestas tipo Th2². La infección natural con estos patógenos difíciles como la malaria o el virus respiratorio sincitial no induce una protección completa contra una reinfección, además patógenos que poseen una alta tasa de mutación (HIV), aquellos que poseen múltiples tipos (virus dengue) o aquellos que causan una infección persistente o latente (virus hepatitis C y HIV) comprenden grandes desafíos para el diseño de vacunas. Una de las razones es que la estrategia de vacunación mencionada anteriormente con microorganismos vivos atenuados o muertos que mimetiza el tipo de protección inmunológica que se induciría en individuos que sobreviven a la infección no es efectiva³⁵.

Conjuntamente, se adquirió experiencia en el campo de la tecnología recombinante, en herramientas para la identificación, producción y purificación de antígenos y nuevas moléculas o compuestos con potencial adyuvante, junto con un entendimiento más profundo de la respuesta inmune durante una infección³⁶. Asimismo, se ha reconocido el rol fundamental que desempeña la inmunidad innata en la generación de la respuesta inmune adaptativa. Según Dowling, los receptores TLRs son los “*Swiss army knife*” (cuchillos militares suizos, introducidos en el apartado 1.6) de la inmunidad y del desarrollo de vacunas, ya que la activación de dichos receptores, tiene un rol “informativo” en direccionar la respuesta inmune adquirida³⁷.

Lo anterior originó la construcción de un nuevo paradigma, el del poder potencial que tendría la combinación de inmunoestimulantes, acuñándose el término AS del inglés “*adjuvant system*”^{36,38} (sistema de adyuvantes). Un ejemplo lo desarrolló GlaxoSmithKline, la nano-emulsión AS03, similar a la MF59 (**Tabla 1.1**), con el agregado de α -tocoferol, un aceite biodegradable y con propiedades

inmunoestimuladoras, derivado de la vitamina E. El AS03 induce una importante respuesta humoral y su uso se aprobó en el 2008 como adyuvante para una vacuna contra la gripe pandémica³⁹.

Posteriormente se desarrolló el AS04, formulación donde el MPL se encuentra adsorbido a compuestos de aluminio, el cual induce una respuesta inmune Th1 y ha sido evaluado en la protección contra algunos virus. La formulación está aprobada para su uso en humanos en vacunas contra HBV y HPV^{36,38} (**Tabla 1.1**). Además, estudios basados en la relación entre la estructura y función del MPL, permitieron la identificación de varios derivados sintéticos, uno de los cuales, formulado en combinación con compuestos de aluminio, el RC-529, fue aprobado en Argentina en una vacuna contra HBV (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1: Lista de adyuvantes en vacunas profilácticas aprobados para su uso en humanos o en desarrollo clínico⁴⁰.

Adjuvant	Description	Vaccine
Licensed		
Aluminum salts (Alum)	Insoluble particulates of hydroxide, phosphate or hydroxyphosphate sulfate salts	Included in licensed products for routine childhood vaccines and many others
Oil-in-water emulsions (MF59, AS03)	Oil dispersed nanoemulsions (mainly squalene) stabilized with non-ionic surfactants	Included in licensed products for seasonal influenza vaccine (MF59) or pandemic influenza vaccines (MF59, AS03)
Virosomes	Dispersed lipid vesicles including viral membrane (influenza) proteins	In licensed products for influenza vaccine (<i>Inflexal</i>) and HAV vaccine (<i>Epaxal</i>)
AS04	Natural product TLR4 ligand (MPL) adsorbed on to alum	Licensed products for HBV vaccine (<i>Fendrix</i>) and HPV vaccine (<i>Cervarix</i>)
MPL	Natural product TLR4 ligand	Approved products for tree pollen and grass pollen allergies on a <i>named patient</i> basis in Europe (<i>Pollinex</i>)
RC-529	Synthetic TLR4 ligand adsorbed to aluminum hydroxide	Was a licensed product in Argentina for HBV (<i>Supervax</i>)
Phase III		
Liposomes (AS01)	Dispersed lipid vesicles containing TLR4 ligand (MPL) and saponin QS-21	Phase III, submitted for licensure for malaria vaccine (RTS,S) and for approval for herpes zoster vaccine (HZ/su)
CpG ODN (1018 ISS)	Soluble TLR9 ligand (oligonucleotide) co-administered with HBV vaccine	Submitted for licensure for HBV vaccine
Topical cream with TLR7 ligand	Topical ointment of TLR7 ligand (imiquimod) applied in conjunction with intradermal vaccination	Influenza vaccine
Phase II		
EGVac system	Bacterial polysaccharide/bacterial DNA	Therapeutic HPV vaccine
Saponin complexes (ISCOM, Matrix-M)	Lipid, purified saponins and cholesterol cage-like nanocomplexes	Influenza vaccine
GLA-SE	Oil-in-water nanoemulsion with synthetic TLR4 ligand (GLA)	Tuberculosis vaccine, RSV vaccine, and Leishmania vaccine
IC31	Cationic peptide complexed with TLR9 ligand (oligonucleotide)	Tuberculosis vaccine
Oil-in-water emulsion (ISA51)	Oil dispersed nanoemulsion (mainly squalene) stabilized with non-ionic surfactant	Included in licensed seasonal influenza vaccine
AS02	Oil-in-water nanoemulsion with TLR4 ligand (MPL) and saponin, QS-21	Malaria and HIV vaccines (withdrawn after Phase II)
VAX2012Q, VAX125	TLR5 ligand protein (flagellin) linked to antigen	Influenza vaccine
Poly I:C (Ampligen, rintatolimod)	Double-stranded RNA polymer analogue and	Influenza vaccine
PIKA	TLR3 ligand	Rabies vaccine
VCL-HB01 (Vaxfectin)	Cationic liposome	Genital herpes vaccine (prophylactic and therapeutic, and DNA based)
HAV, hepatitis A virus; HBV, hepatitis B virus; HIV, human immunodeficiency virus; HPV, human papillomavirus, and MPL, 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A.		

La historia del estudio, desarrollo e identificación de moléculas, compuestos y complejos macromoleculares con potencial adyuvante tiene más de un siglo y ha sido y es aún en la actualidad un campo en extensa proliferación.

Lamentablemente la inmensa mayoría de los adyuvantes evaluados en ensayos clínicos han demostrado inducir efectos secundarios incompatibles con la administración rutinaria en humanos y a pesar de la extensa lista de candidatos, un pequeño número de ellos han sido aprobados para su uso en humanos por organismos regulatorios como la U.S. FDA (Food and Drug Administration) y la EMEA (European Medicinal Evaluation Agency)^{40,41}. La **Tabla 1.1** muestra una lista actualizada de los adyuvantes aprobados, junto con los candidatos en desarrollo clínico.

1.3 El adyuvante ideal, elección, seguridad y efectos adversos

El “adyuvante ideal”, tanto para uso humano como veterinario, debería cumplir con las siguientes características: debe ser seguro, sin causar efectos secundarios inmediatos ni a largo plazo y ser fácilmente eliminado luego de que finalizó su función para evitar posibles efectos adversos tardíos. Debe generar una respuesta inmune protectora o terapéutica robusta superior a la inducida por el antígeno solo y su eficacia debe garantizarse utilizando pocas dosis y/o bajas concentraciones de antígeno. Debe ser compatible con varios antígenos vacunales y poder ser co-administrado con antígenos e inmunoestimulantes. Tiene que estar química y biológicamente definido para que no existan variaciones de un lote a otro durante el proceso de producción, asegurando respuestas consistentes en el tiempo. Debe ser de bajo costo y estable durante el almacenamiento para ser clínica y comercialmente útil. Hasta el momento ningún adyuvante o sistema de adyuvantes cumple con todas las características anteriores^{6,42,43}.

Según O’Hagan y HogenEsch *et al.*, la posible necesidad de un adyuvante más potente solo debería considerarse luego que el diseño de una vacuna optimizada y formulada con compuestos de aluminio no lograra inducir la magnitud y el perfil de respuesta inmune buscado^{40,44}.

El atributo más importante de una vacuna con adyuvante es su mayor efectividad frente a su correspondiente acuoso, pero sus efectos beneficiosos deben sobrepasar el riesgo de posibles efectos adversos. Se sostiene que, es más importante favorecer la seguridad sobre la eficacia, cuando una vacuna es administrada a una población sana (vacuna profiláctica)^{45,46}. En cambio, en grupos de alto riesgo, un nivel extra de toxicidad es aceptado si el beneficio de la vacuna es significativo^{6,42,46}.

En cuanto a los efectos adversos, las reacciones inmunotóxicas inducidas por adyuvantes se pueden agrupar en reacciones locales o sistémicas, además de los posibles riesgos teóricos. La reacción local más frecuente relacionada con el uso de adyuvantes en vacunas es la inflamación local que libera señales de daño, con signos de hinchazón, eritema y dolor^{46,47}, además se han reportado menos frecuentemente la inducción de hipersensibilidad retardada⁴⁸ o la reacción de Arthus⁴². Las reacciones sistémicas generalmente “descalificarían” a un adyuvante para su uso en humanos, por lo que existen pocos registros de estas reacciones y son consideradas “raras” y muy poco frecuentes^{1,46}. Son debidas a una hiper-activación de los mecanismos inmunológicos inducidos por la formulación con adyuvantes, frecuentemente mediadas por citoquinas (como IL-1 β , TNF- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6)⁴⁹. Incluyen reacciones de fase aguda como el síndrome pseudogripal, el síndrome de escape vascular, fenómenos autoinmunes, modificación del metabolismo hepático⁴⁹, alergia⁵⁰ y trastornos en la morfogénesis fetal⁴⁹. Dentro de los posibles riesgos teóricos existen, por ejemplo, la liberación de vectores al ambiente y carcinogénesis⁴².

Por lo mencionado anteriormente, los adyuvantes en desarrollo deben acumular numerosos ensayos que evidencien su inocuidad³⁶ y aunque existen varias guías reguladoras para vacunas⁵¹, sólo una ha sido elaborada para adyuvantes vacunales en específico: la Guía sobre “Adyuvantes en vacunas de uso humano” del Comité de Productos Medicinales para uso humano (CHMP) de la EMEA (EMEA/CHMP/VEG/134716/2004), operativa desde julio del 2005. Esta guía sólo confiere indicaciones generales y no profundiza en los métodos de evaluación. Esto es debido a que la evaluación de seguridad e inocuidad de las

vacunas en desarrollo es producto y población específicos. Además, los entes regulatorios sostienen que un adyuvante no debe de ser “licenciado” para su uso solo, por el contrario, es la formulación antígeno-adyuvante específica la que se licencia^{46,48}. Por esta razón, varios expertos ofrecen otras recomendaciones más detalladas que no están incluidas completamente en las guías regulatorias vigentes ^{51,52,53,54,55}.

Consecuentemente, uno de los mayores retos que tiene el campo de la investigación en adyuvantes es ganar potencia con la “mezcla perfecta” minimizando los efectos tóxicos y adversos⁵⁶.

1.4 Clasificación de adyuvantes

Como se mencionó antes, los adyuvantes se definen como moléculas y/o sustancias que incrementan específicamente la respuesta inmune a un antígeno, siendo una definición sumamente imprecisa, basada en la acción ejercen, lo que dificulta su agrupación en distintas categorías⁴³. Además, son un grupo de sustancias heterogéneo, sin características estructurales o químicas comunes, provenientes de orígenes disímiles y con la capacidad de aumentar y/o modular la respuesta inmune a través de una variedad de mecanismos moleculares y celulares⁵⁷. A pesar de lo anterior, varios autores hicieron intentos fútiles para agrupar estos compuestos.

Cox y Coulter⁵⁸ propusieron dividir a los adyuvantes en *particulados* y *no particulados*. Dentro de cada grupo un adyuvante actúa en uno o más de cinco mecanismos de acción: inmunomodulación, presentación, inducción de respuesta de células T CD8⁺ citotóxicas (CTL), generación de depósitos y *targeting*⁴².

Posteriormente, debido a una mayor comprensión de los mecanismos de inducción de la respuesta inmune que incluye la conexión entre la inmunidad innata y la adquirida se propuso clasificarlos según su mecanismo dominante de acción en inmunoestimuladores y sistemas de entrega (adyuvantes particulados) ^{3,6,32,58}.

Los inmunoestimuladores actúan directamente sobre el SI para incrementar la respuesta a un antígeno o a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *del inglés* Pattern Recognition Receptors, una descripción detallada se presenta en el apartado 1.6). Esta categoría incluye patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *del inglés* Pathogen Associated Molecular Patterns, revisado en el apartado 1.6) o sus derivados sintéticos o pequeñas moléculas agonistas de PRRs que mimetizan su actividad, como ser ligandos de receptores TLRs, tipo NOD, tipo RIG-I, tipo C-lectinas, citoquinas, saponinas y exotoxinas bacterianas^{3,6}.

Los sistemas de entrega tienen como función principal promover la entrega de antígenos vacunales, moléculas inmunoestimuladoras o ambas de manera eficiente. Pueden concentrar y exponer los antígenos en patrones repetitivos, protegerlos de una rápida degradación y favorecer la estabilidad de dichas proteínas, “marcar” antígenos a las células presentadoras de antígenos (*del inglés*, APCs, Antigen presenting cells) y favorecer la co-localización de antígenos y moléculas inmunoestimuladoras. Esta categoría incluye: sales o compuestos minerales, emulsiones, liposomas, virosomas, microesferas poliméricas biodegradables y los ISCOMs (complejos inmuno-estimuladores formulados con saponinas, colesterol y fosfolípidos)^{3,6}.

Como se mencionó en el párrafo anterior, los sistemas de entrega se pueden combinar con inmunoestimuladores, con la finalidad de potenciar o (re)-dirigir la respuesta inmune, no sólo aumentando la intensidad de la respuesta adaptativa sino también la calidad y el tipo Th1 vs Th2^{38,57,59} (revisado en el apartado 1.6). Por la tendencia creciente al diseño racional, la mayoría de los adyuvantes en estado avanzado de desarrollo fueron formulados de esta forma^{6,60}, siendo un claro ejemplo el AS04^{36,38}.

Por lo anterior, los adyuvantes comúnmente encontrados en la formulación de vacunas modernas se podrían clasificar en tres categorías: inmunoestimuladores, sistemas de entrega y la combinación de ambos, sistemas de adyuvantes. Cabe destacar que esta separación ha generado conflictos ya que algunos sistemas de entrega (Ej: compuestos de aluminio y emulsiones) tienen

la capacidad de iniciar o potenciar respuestas inmunes, siendo además inmunoestimuladores⁶.

La siguiente y más reciente clasificación propuesta por O'Hagan y De gregorio⁴³, plantea dividirlos según el número de adyuvantes utilizados en la formulación, distinguiendo entre, adyuvantes de primera (un sólo adyuvante) y de segunda generación (más de un adyuvante). Los adyuvantes de primera generación incluyen los compuestos de aluminio y las emulsiones de tipo agua en aceite (los más exitosos de la generación), las partículas poliméricas y los liposomas. Este grupo tiene como característica fisicoquímica común ser dispersiones de partículas, a las que se asocian o adsorben los antígenos. La formulación de adyuvantes de segunda generación (también conocidos como sistemas de adyuvantes), comenzó luego del descubrimiento de moléculas con capacidad inmunoestimuladora (MDP, ARN doble hebra, MPL, etc) y de la observación que dichas moléculas no serían efectivas solas, por lo que se probaron combinándolas en formulaciones con adyuvantes de primera generación. Ejemplos de este grupo, incluyen los AS (sistema de adyuvantes), el RC-529 e ISCOMs.

1.5 Compuestos inorgánicos como adyuvantes

En esta sección se profundizará en los compuestos inorgánicos como adyuvantes de inmunización, ejemplificados en los compuestos de aluminio y el fosfato de calcio. Esto es debido a que los materiales que se evalúan en la presente tesis son de origen inorgánico.

1.5.1 Compuestos de aluminio

Los compuestos de aluminio incluyen el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio y las formulaciones precipitadas según Glenny, y en la bibliografía comúnmente son denominados "alum" (alumbre). Lo anterior confunde debido a que: (a) el alumbre es químicamente sulfato de potasio y aluminio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) y no ha sido usado como adyuvante, (b) el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio tienen propiedades fisicoquímicas diferentes, y (c) difieren en sus propiedades como adyuvante^{61,62}.

Las formulaciones precipitadas (suspensiones) pueden ser altamente heterogéneas dependiendo de qué aniones se encuentren presentes durante la precipitación. Los geles de hidróxido o fosfato de aluminio preformados son preparados de manera estandarizada y químicamente definida y tienen la capacidad de adsorber proteínas antigénicas en solución acuosa. Por lo anterior, las vacunas formuladas adsorbiendo el antígeno sobre geles (vacunas adsorbidas) han reemplazado a las vacunas precipitadas⁵⁰. Para minimizar las variaciones y evitar problemas de reproducibilidad en la evaluación de nuevos adyuvantes, una preparación específica fue elegida como estándar científico: Alhydrogel® - hidróxido de aluminio de Superfos Biosector, Vedbaek⁶³.

1.5.1.1 Propiedades fisicoquímicas y adsorción de antígenos

Los métodos para la preparación de formulaciones con compuestos de aluminio han sido descritos en detalle^{50,62,61,63}. Además, sus propiedades fisicoquímicas fueron extensamente estudiadas; el hidróxido de aluminio (AH), identificado como $AlO(OH)$ (oxihidróxido de aluminio), es un compuesto cristalino formado por nanopartículas (4,5x2,2x10nm) en forma de agujas que forman agregados con morfología irregular y porosa con diámetros promedio entre 1 a 20 μ m, con una superficie específica (*del inglés*, SSA, specific surface area) de 500m²/g. Su punto isoeléctrico es 11,4, está cargado positivamente a pH 7,4 (pH del líquido intersticial), lo que favorece la adsorción de proteínas ácidas a pH neutro^{62,64}. El fosfato de aluminio (AP), identificado como $Al(OH)_x(PO_4)_y$ (hidroxifosfato de aluminio), es un compuesto amorfo formado por nanopartículas en forma de disco, de 50nm de diámetro promedio, que también forman agregados con morfología, tamaño y SSA similar al AH. El punto isoeléctrico de AP depende del grado de sustitución de hidroxilos por fosfatos, llegando a 4 cuando la sustitución por fosfatos es máxima, con lo que se favorece la adsorción de proteínas básicas a pH fisiológico^{62,64}.

Los estudios Hem y colaboradores, se han destacado por la profunda evaluación de la adsorción y desorción de antígenos sobre la superficie de estos adyuvantes, de los mecanismos involucrados en dicho proceso y como el tipo de adsorción y el microambiente luego de la inoculación influyen la respuesta

inmune obtenida. Algunos conceptos clave de estos trabajos se mencionan a continuación:

- El punto isoeléctrico de los adyuvantes de aluminio depende de la relación que existe entre la cantidad de grupos hidroxilo y fosfato en la superficie^{64,65,66}.
- El pH cercano a la superficie de las partículas del adyuvante es diferente al del resto de la suspensión. Los antígenos adsorbidos pueden sufrir degradaciones químicas que están asociadas con el pH próximo a la superficie.^{64,67}
- Estos adyuvantes adsorben antígenos principalmente por interacción electrostática y por intercambio aniónico de ligandos (interacción covalente que ocurre cuando los grupos fosfato presentes en los antígenos se sustituyen con los hidroxilos presentes en la superficie de las partículas de AH), siendo la fuerza adsorptiva más fuerte, ocurriendo inclusive cuando fuerzas electrostáticas repulsivas están presentes^{68,69,70,71,72}.
- La adsorción por este último mecanismo puede ser controlada ajustando la relación entre la cantidad de grupos hidroxilo y fosfato en la superficie del adyuvante o modificando el número de grupos fosfato en el antígeno^{68,69,72}.
- El grado de adsorción del antígeno a la superficie del adyuvante puede variar cuando la formulación es administrada y expuesta al líquido intersticial^{72,73,74,75,76,77,78}.
- Los antígenos que no están adsorbidos o que son eluidos luego de la administración pueden quedar atrapados en los espacios entre los agregados de partículas del adyuvante y permanecer en el sitio de inoculación para su presentación a los componentes del SI, obteniéndose respuestas inmunes comparables a las obtenidas con formulaciones donde el antígeno está adsorbido^{74,77,79,80}.
- Una adsorción fuerte entre el antígeno y el adyuvante puede interferir en su presentación y la producción de una respuesta inmune humoral^{76,81,82}.

1.5.1.2 Usos y limitaciones

Como ya se mencionó, se ha mantenido el uso continuado de compuestos de aluminio en vacunación rutinaria por su largo registro de seguridad, bajo costo, y por su capacidad de inducir respuestas inmunes protectoras tempranas, duraderas y con un título alto en anticuerpos específicos^{21,40,83,84}. A pesar de esto, se han reportado efectos secundarios asociados con el uso de estos compuestos, como ser eritema, nódulos subcutáneos, hipersensibilidad y granulomas^{47,85,86}. También, han sido asociados con el desarrollo ocasional de miofascitis macrofágica, síndrome de fatiga crónica, enfermedades neurológicas y autoinmunes^{87,88,89,90}.

Una desventaja de los compuestos de aluminio es que las formulaciones son sensibles a la congelación y por lo tanto no pueden ser liofilizadas. Además, inducen una respuesta inmune tipo Th2, representada por la producción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 y altos títulos de IgG1 e IgE. Lamentablemente, estos niveles de IgE, pueden provocar reacciones de hipersensibilidad. Esta es una de las limitaciones más importantes ya que la polarización a respuestas tipo Th2 inhabilita la inducción de respuestas inmunes mediadas por células (Th1 citotóxicas, ni aquella que esté restringida a moléculas MHC clase I) y hace que los compuestos de aluminio sean ineficientes para proteger contra patógenos intracelulares como tuberculosis, malaria, leishmaniasis y HIV^{3,50,61,91,92}. Sin embargo, como ya se mencionó, lo anterior ha empezado a solucionarse parcialmente combinando los compuestos de aluminio con estimuladores como el MPL (AS04).

1.5.2 Fosfato de calcio

El interés por el fosfato de calcio como adyuvante, decayó luego que se discontinuara su uso para vacunación rutinaria en los 80. Debido a demandas sociales por vacunas más seguras, recientemente se ha retomado y algunos autores plantean que, podría llegar a sustituir a los compuestos de aluminio^{20,93}, principalmente por tener la ventaja de ser biocompatible y biodegradable⁹⁴, y por ende ser menos tóxico^{20,95,96}. Además, también ha sido usado en vacunas terapéuticas para alergias, siendo efectivas y seguras^{97,98}.

El fosfato de calcio comercial, químicamente hidroxiapatita no estequiométrica $(Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x})^{19,20,99}$, está formado por nanopartículas en forma de agujas (10x150nm) y en forma de disco (con diámetros entre 20 y 30nm) que forman agregados microparticulados. La carga superficial es dependiente del pH, con un punto isoeléctrico de 5,5, teniendo la capacidad de adsorber antígenos cargados positivamente por interacción electrostática e intercambio de ligando. Al igual que con los compuestos de aluminio, las propiedades fisicoquímicas, capacidad adsorptiva y antigénica son dependientes del proceso de síntesis^{19,20,47,99}.

Masson²⁰ concluye que, a pesar de las divergencias encontradas en los modelos animales que dependen de las concentraciones de antígeno y adyuvante usadas, y de la presentación (gel o suspensión), los datos recolectados en humanos, indican que el fosfato de calcio es un adyuvante efectivo e incluso aún más que los compuestos de aluminio luego de un *booster* o refuerzo. Posee una capacidad adsorptiva razonable, induce altos niveles de IgGs y no aumenta los niveles de IgE ni causa reacciones alérgicas, aunque sostiene que estudios adicionales son necesarios para reintroducirlo en vacunación rutinaria. También, ocasiona irritación local, pero que permanece menos tiempo que la generada por los compuestos de aluminio⁴⁷.

1.5.2.1 Perspectivas de uso

Las perspectivas según Lin, Y. *et al.*; se están centrando en el uso de nanopartículas de fosfato de calcio (*del inglés*, CaP-NPs)⁹³, ya utilizadas en varias aplicaciones biomédicas^{100,101,102}. Son biocompatibles, no se acumulan (porque son fácilmente degradadas), limitando posibles efectos tóxicos a largo plazo, tienen la ventaja potencial de reducir la cantidad de antígeno necesaria y son fácilmente captadas por APCs⁹³.

La producción de vacunas con CaP-NPs como adyuvante, puede realizarse adsorbiendo el antígeno sobre las CaP-NPs preformadas o incluso encapsularlo durante el proceso de síntesis, en particular cuando una respuesta inmune mediada por células es requerida⁹³. Los procesos de síntesis son

variados^{103,104,105,106,107,108,109,110,111}, algunos son simples, de bajo costo y fácilmente controlables y reproducibles, posibilitando la producción de CaP-NPs con diferentes propiedades fisicoquímicas en condiciones estériles y cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura (*del inglés*, GMP)⁹³.

Varias vacunas a base de CaP-NPs han sido evaluadas en ensayos preclínicos, con resultados promisorios. He *et al.*¹¹² compararon la administración intraperitoneal de CaP-NPs y AP (fosfato de aluminio) formulados con glicoproteínas de HSV-2 (herpes simple) en un modelo murino. Los resultados mostraron que la formulación con CaP-NPs induce mayores títulos de IgG2a, anticuerpos con capacidad neutralizantes similar e inferiores títulos de IgE que AP, además de proteger contra un desafío^{112,113}. En estudios posteriores se demuestra la capacidad de CaP-NPs como adyuvante de mucosas y en pollos desafiando con NDV (*del inglés*, Newcastle disease virus)^{113,114}. Saeed *et al.*¹¹⁵ demostraron que la inoculación intradérmica en conejos de CaP-NPs con el enterovirus HEV-71 inactivado adsorbido potencia la respuesta inmune protectora más que la misma vacuna formulada con CaP (micropartículas) o que la vacuna sin adyuvante. Además, demostraron que la inoculación intradérmica con una dosis 10 veces menor presenta títulos similares de anticuerpos neutralizantes que la vía intramuscular.

El grupo de Epple trabaja con CaP-NPs funcionalizadas, evaluando el potencial de *targeting* celular^{116,117} y utilizando el mismo concepto que los sistemas de adyuvantes. Por ejemplo, demostraron que la co-encapsulación de CaP-NPs y HA (hemaglutinina de influenza virus) con agonistas de TLRs como CpG y poly(I:C) inducen la activación de células dendríticas, junto con la inducción de respuestas TCD4+ antígeno específicas *in vitro*^{118,119} y TCD8+ específicas *in vivo*¹²⁰. También, demostraron que la funcionalización de CaP-NPs con flagelina (ligando de TLR5) estimula la producción de IL-1 β por células dendríticas (*del inglés*, DCs) *in vitro* y la producción de IL-6 luego de la administración intraperitoneal¹²¹.

En conclusión, las CaP-NPs poseen varias ventajas sobre los compuestos de aluminio, son biocompatibles y biodegradables, e inducen respuestas inmunes

humorales y celulares, con efectos secundarios mínimos. Tienen el potencial de funcionalizarse para modular la respuesta inmune, siendo la síntesis controlable y reproducible. A pesar de que existe la necesidad de evaluar exhaustivamente estas nanopartículas en ensayos clínicos, son un adyuvante con gran potencial^{93,118,119}.

1.6 Relación entre la inmunidad innata y la adquirida

1.6.1 Inicio de la respuesta inmune: señal 0, inmunidad innata

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa frente al ataque de patógenos o lesiones, y también media los procesos que desencadenan la inducción de protección inmunológica generadas por la vacunación. Las células de la inmunidad innata detectan patrones moleculares conservados de estos patógenos (*PAMPs*) y patrones asociados al daño celular o *DAMPs* (*del inglés*, damage-associated molecular patterns), a través de un set limitado de receptores codificados en la línea germinal, los *PRRs* (*del inglés*, pattern recognition receptors). Los **PRRs** se agrupan en familias: receptores tipo Toll o *TLRs* (*del inglés*, Toll-like receptors), receptores tipo NOD o *NLRs* (*del inglés*, nucleotide oligomerization domain based-I-like receptors), receptores de lectinas tipo C o *CLRs* (*del inglés*, C-type lectins), receptores inducibles por ácido retinoico o *RLRs* (*del inglés*, retinoic acid inducible protein 1-like receptors) y receptores citoplasmáticos de ácidos nucleicos¹²².

Los **PAMPs** incluyen motivos moleculares conservados que se encuentran formando parte de estructuras esenciales para los microorganismos como por ejemplo, componentes bacterianos o sus derivados sintéticos y de virus o levaduras, como: lipopolisacáridos (LPS), dinucleótidos no metilados (CpG), RNA doble hebra, lipoproteínas, glicoproteínas, peptidoglicanos, flagelina, ácido micólico, etc. Los **DAMPs** incluyen señales de peligro endógenas como fracciones nucleares y mitocondriales, cristales de ácido úrico, proteínas de shock térmico, etc., que son liberadas durante los procesos de necrosis o inflamación¹²².

Las células del SI, como las dendríticas inmaduras (iDCs) y macrófagos, células presentadoras de antígenos (APCs) que se encuentran en los tejidos periféricos como centinelas, son capaces de reconocer PAMPs y DAMPs a través de sus **PRRs**, permitiendo la captura, internalización, procesamiento y presentación de antígenos. El reconocimiento de estos ligandos por sus **PRRs** (*señal 0*) desencadena una respuesta innata que puede promover un proceso inflamatorio, generar la activación transcripcional de genes de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias (*del inglés*, CKs), la regulación positiva de

moléculas co-estimuladoras, como moléculas de membrana CD40, CD80, CD86 y la expresión de moléculas MHC de clase II y de adhesión de superficie. Estos cambios fenotípicos marcan la maduración de las DCs (mDCs) y migración a los nódulos linfáticos, donde ocurre la presentación del antígeno a través del complejo MHC a los linfocitos T *naive*¹²³. Lo anterior se esquematiza en la **figura 1.2**¹²⁴.

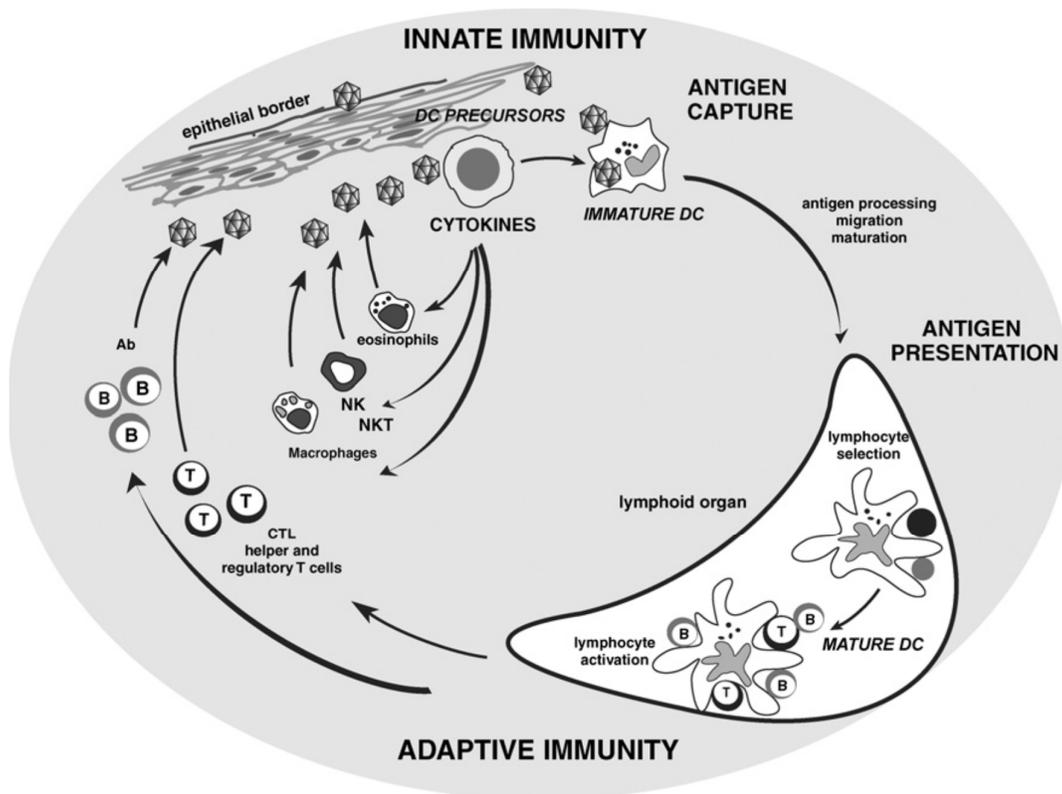


Figura 1.2: Ciclo de vida de las células dendríticas. Los precursores circulantes de DCs entran en los tejidos como DCs inmaduras. Pueden encontrarse con patógenos directamente (por ej. virus), que inducen la secreción de CKs (por ej. IFN- γ); o de manera indirecta a través del efecto de patógenos en las células estromales. Las CKs secretadas por las DCs activan células efectoras del SI como eosinófilos, macrófagos y células NK. La activación de las DCs por patógenos induce su migración a los nódulos linfáticos y su maduración. Las mDCs aumentan la expresión de moléculas MHC que permite la selección de linfocitos T antígeno específicos. Estos linfocitos T activados ayudan a las DCs en su maduración final, que permite la expansión y diferenciación de los linfocitos. Los linfocitos T activados trasvasan el epitelio inflamado alcanzando la zona de daño, donde eliminan el patógeno y/o las células infectadas. Las células B, también activadas por las DCs, y los linfocitos T específicos migran a varias zonas donde maduran a células plasmáticas productoras de anticuerpos que neutralizan al patógeno. Extraído de Dubskey, P *et al.* ¹²⁴

Las **DCs** son una población celular heterogénea de acuerdo a su localización, fenotipo y función, y se clasifican según su linaje en células dendríticas mieloides, que se encuentran presentes en casi todos los tejidos y plasmocitoides, localizadas en nódulos linfáticos, timo, bazo, medula ósea, y sangre periférica^{125,126}.

Dependiendo de las moléculas co-estimuladoras y del perfil secretorio de CKs y quimioquinas que expresen, las DCs tienen un rol central en orquestar el tipo de respuesta inmune adaptativa inducida por los antígenos detectados en el patógeno, así como por la vacunación. Inducirán la diferenciación de las células *T helper* (Th) a fenotipos efectores: Th1 (productoras de IFN- γ y eficaces en la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (productoras de IL-4 y eficaces en la eliminación de patógenos extracelulares), Th17 (productoras de IL-17 y eficaces en la destrucción de hongos y bacterias extracelulares) o T reguladoras (Treg) (implicadas en la tolerancia periférica y procesos inmunosupresores)¹²⁷, etc.

En la vacunación esta polarización depende de factores como la naturaleza del antígeno, la vía de inoculación y especialmente el adyuvante empleado¹²³.

Los **macrófagos** están presentes en todos los tejidos manteniendo la homeostasis e integridad de los mismos, mediante la limpieza de células apoptóticas y desechos celulares debido a su alto potencial fagocítico y degradativo. Como ya se mencionó, actúan como centinelas y también tienen la capacidad de presentar antígenos a las células T, pero de manera menos eficiente que las DCs¹²⁸. Expresan una gran variedad de PRRs y también tienen la capacidad de secretar CKs, quimioquinas, enzimas proteolíticas y bactericidas. Además, tienen un metabolismo muy activo siendo capaces de generar especies reactivas del oxígeno (*del inglés*, ROS), del nitrógeno y metabolitos derivados del ácido araquidónico¹²⁹.

Los macrófagos han sido recientemente clasificados según su perfil de activación como: M1, de activación clásica, estimulados por IFN- γ y LPS, que promueven respuestas Th1 dependientes de IL-12 y poseen propiedades

microbicidas; y M2. Estos últimos se subdividen de acuerdo a la diversidad de estímulos para su activación en: M2a (estimulados por IL-4 o IL-13), M2b (inmuno-complejos en combinación con IL-1 β o LPS) y M2c (IL-10, TGF- β o glucocorticoides), los que están asociados a respuestas Th2 con un rol en la resolución de la inflamación debido a su gran capacidad fagocítica, acompañados por la reducción en la secreción de CKs pro-inflamatorias^{130,131}.

1.6.2 Receptores de reconocimiento de patrón y vías de señalización

Como ya se mencionó, la activación de la inmunidad innata ocurre a través del reconocimiento de un ligando específico por un diverso conjunto de receptores, codificados en la línea germinal, los PRRs. En este apartado se discutirán los receptores TLRs y NODs usados en la presente tesis.

Los **TLRs** son glicoproteínas transmembrana de tipo I, compuestas por tres dominios: el ectodominio LRR rico en leucinas (*del inglés*, Leucin Rich Repeats) que interviene en el reconocimiento de PAMPs y DAMPs (cada re-arreglo de estas repeticiones le confiere una especificidad única), un dominio transmembrana y un dominio intracelular homólogo al del receptor de IL-1, denominado dominio Toll/IL-1R o TIR, el cual media la señalización intracelular. Los TLRs están expresados en una gran variedad de células incluidas la mayoría de las células del sistema inmune y se distinguen por su localización en la célula, especificidad por un ligando y el tipo de señalización que desencadenan^{37,122}.

Esta familia de receptores se expresa de forma predominante en APCs y se localizan en la membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 y TLR11) o en compartimientos endosomales (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9). Los humanos expresan los TLRs del 1 al 10, mientras que en el ratón están descritos los TLRs del 1 al 9 y 11 al 13. Su localización está relacionada con el tipo de ligando que reconocen; los TLR en la superficie están involucrados en el reconocimiento de estructuras bacterianas en el espacio extracelular, como lipoproteínas, lipopéptidos y mananos (heterodímeros TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6), LPS (TLR4), flagelina (TLR5) y profilina (TLR11), mientras que los endosomales detectan ácidos nucleicos de origen bacteriano o viral; RNA simple

hebra (TLR7 y TLR8), RNA doble hebra (TLR3) y DNA rico en CpG (TLR9)
37,122,132.

La respuesta mediada por los TLRs está caracterizada por una compleja cascada de fosforilación intracelular que finaliza en la transcripción de genes pro-inflamatorios, por ejemplo, los de las CKs IL-6, IL-12, TNF- α , quimioquinas, genes implicados en la regulación del ciclo celular y la expresión de moléculas co-estimuladoras¹²².

Las vías de señalización empleadas por los TLRs son vías dependientes de la molécula adaptadora MyD88 (*del inglés*, Myeloid differentiation primary response 88) a excepción del TLR3. La activación de la vía de MyD88 conduce al reclutamiento de adaptadores que conllevan a la activación de quinasas capaces de fosforilar las MAPK quinasas (*del inglés*, Mitogen-Activated Protein Kinase 1) y el I κ B, inhibidor de NF- κ B (*del inglés*, Nuclear Factor κ B). Cuando NF- κ B es liberado, abandona su localización citoplasmática para translocarse al núcleo y promueve la transcripción de los genes previamente mencionados. De la misma forma la quinasa MAPK activa la vía del factor de transcripción AP-1 (*del inglés*, Activation protein 1)^{133,134}.

Para la activación de la vía independiente de MyD88, es necesario el adaptador TRIF que también activa NF- κ B y IRF3 lo que resulta en la inducción de genes de citoquinas pro-inflamatorias y de IFN de tipo 1^{133,134}. Estas vías de señalización se esquematizan en la **figura 1.3**¹²².

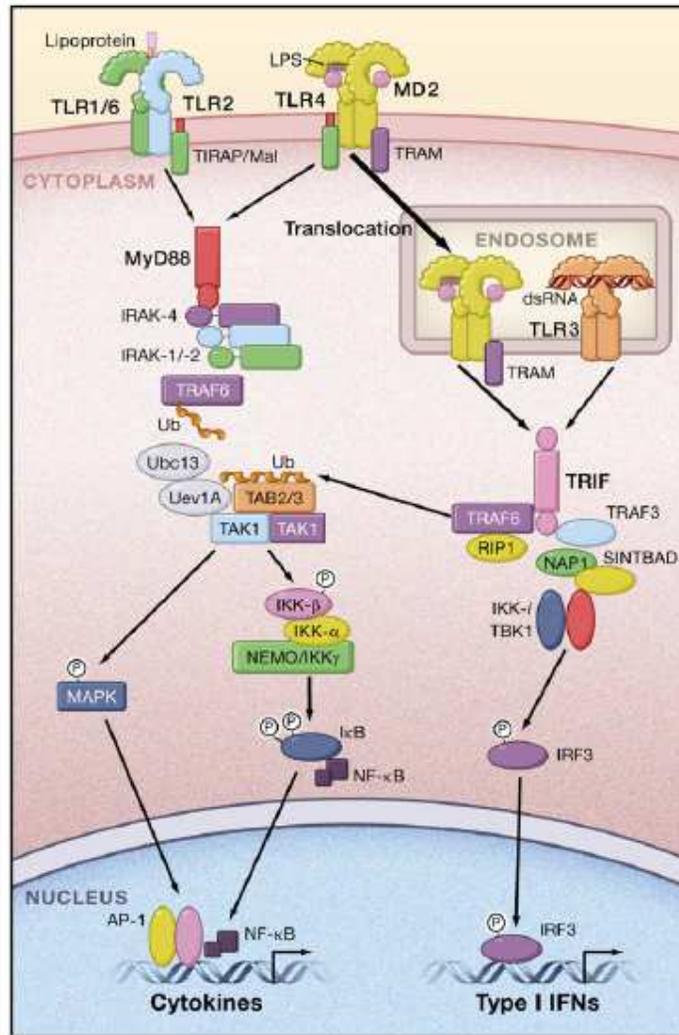


Figura 1.3.: Vías de señalización de TLR2, TLR3 y TLR4, como ejemplo. El LPS y las lipoproteínas son reconocidas en la superficie celular por los heterodímeros TLR1/6 y TLR2, y por dos sets del complejo TLR4/MD2 respectivamente. La unión de estos ligandos estimula el reclutamiento de MyD88 y TIRAP a los TLRs y en consecuencia se forma el complejo IRAKs y TRAF6. Este último cataliza la ubiquitinización que activa los complejos TAK1, TAB1, y TAB2/3 lo que resulta en la fosforilación de NEMO y la activación del complejo IKK. IκB es degradado y NF-κB es liberado y translocado al núcleo donde conduce la expresión de varios genes de citoquinas. Simultáneamente, TAK1 activa una cascada de MAPK quinasas que termina en la activación de AP-1, que también es crítica para la inducción de genes de citoquinas. El LPS induce la translocación de TLR4 y TRAM al endosoma. TLR3 está presente en el endosoma y reconoce dsRNA. TLR3 y TLR4 activan la vía de señalización dependiente de TRIF, que también activa NF-κB e IRF3 lo que resulta en la inducción de genes de citoquinas pro-inflamatorias y de IFN de tipo 1. Extraído de Takeuchi *et al.*¹²²

Los receptores tipo **NOD** son un complejo multiproteico citoplasmático heterogéneo y constituyen otra familia capaz de mediar la activación de la inmunidad innata en respuesta al reconocimiento de variados PAMPs y DAMPs, por medio del ensamblaje del inflamasoma. Poseen una estructura que presenta 3 dominios bien definidos: un dominio C-terminal que presenta repetidos ricos en leucina LRR, esenciales para el reconocimiento, el dominio central constituye un dominio de auto-oligomerización que permite el reclutamiento de otros componentes tras la activación, y un dominio N-terminal variable^{132,135}. La estructura de los diferentes receptores tipo NOD con sus respectivos ligandos se esquematiza en la **figura 1.4**¹³⁶.

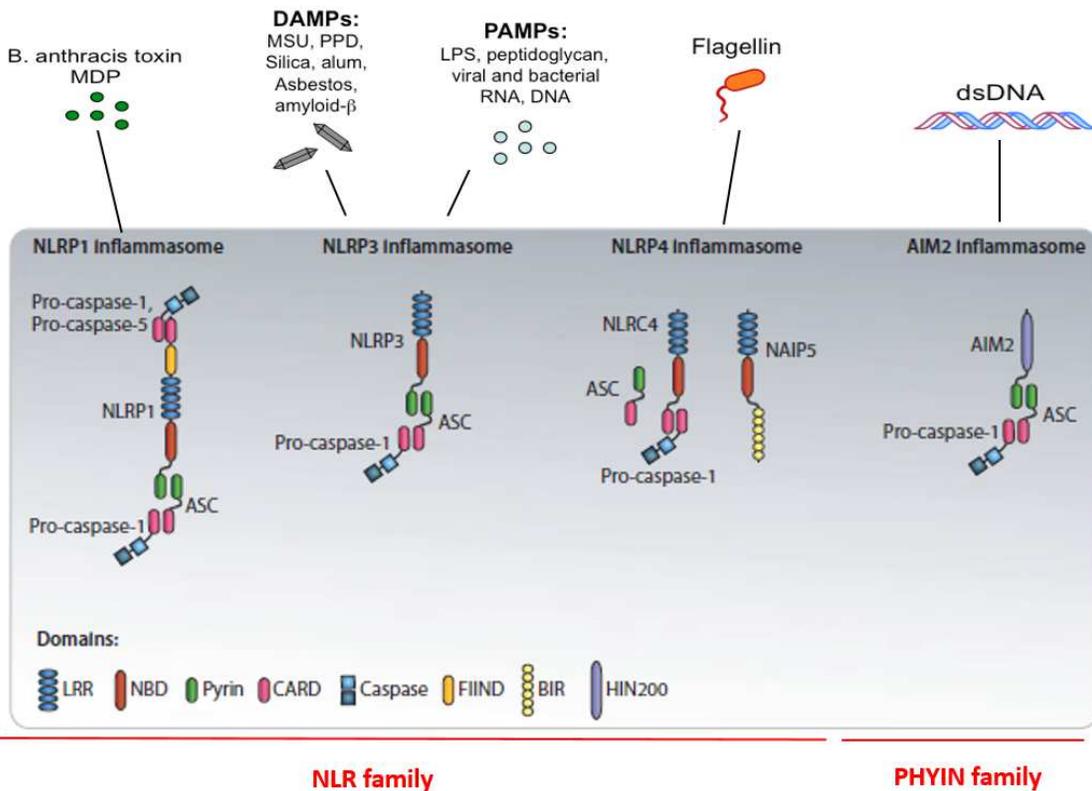


Figura 1.4: Estructura de los complejos inflamasomas iniciados por los receptores tipo NOD. Un receptor con un dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NLR) o AIM2, la proteína adaptadora ASC (*del inglés*, apoptosis-associated speck-like protein) y la procaspasa-1. Extraído con modificaciones de Hovarth *et al.*¹³⁶.

Los NODs tienen la función de actuar como una plataforma de activación para el inflamasoma, un complejo multiproteico que permite la auto-activación mediada por proximidad de la caspasa 1. La activación de caspasa 1 mediada por

el inflamasoma ocurre en diversos tipos celulares, pero ha sido principalmente observada en macrófagos, DCs y células epiteliales. Como se observa en la **figura 1.4** la composición del inflamasoma es dependiente del estímulo inicial y de acuerdo al ligando reconocido, será ensamblado sobre los diferentes NLRs. Esta plataforma de activación de la caspasa 1, que conlleva al clivado de las pro-IL-1 β y pro-IL-18, característica de la inmunidad innata, implica una respuesta dirigida a suprimir microorganismos patógenos y a evitar el daño tisular estéril¹³⁷. Un ejemplo de activación del inflamasoma vía el ensamblaje del NLRP3 se esquematiza en el apartado 1.9.2.

1.6.3 Señales 1 y 2 – Inicio de la respuesta inmune adaptativa

De acuerdo con el “concepto geográfico” de inducción de inmunidad, el inicio de la respuesta inmune adaptativa ocurre en los órganos linfoides, principalmente nódulos linfáticos, lugar hacia donde los antígenos son drenados e involucra la activación de linfocitos T *naive* circulantes antígeno-específicos. Las mDCs tienen un rol central en la generación de una respuesta inmune apropiada porque proveen a los linfocitos T de las 4 señales “obligatorias” para su activación y educación, promoviendo la transformación de los linfocitos T *naive* en linfocitos T efectores y de memoria¹²³.

La *señal 1* involucra el reconocimiento específico por parte del receptor de la célula T (TCR) del complejo formado por péptidos antigénicos presentados por las APCs en el contexto de moléculas del MHC. Las iDC procesan antígenos adquiridos tanto endógenamente como exógenamente. Los antígenos proteicos intracelulares, son degradados a péptidos por el proteosoma en el citosol y cargados en el MHC-I. Los complejos MHC-I-péptido son transportados a la membrana para su presentación a los linfocitos TCD8+. Los antígenos extracelulares son procesados en endosomas que se fusionan con lisosomas portadores de proteasas, responsables de su degradación. Los complejos MHC-II-péptido, resultado de la degradación anterior, son transportados a la superficie celular donde se presentarán a linfocitos TCD4+

Estas proteínas exógenas también pueden ser procesadas por las iDC a través del MHC-I, proceso denominado “presentación cruzada o *cross-*

presentación”, que permite la activación de una respuesta inmune tanto de linfocitos TCD4+ como de linfocitos TCD8+ ante antígenos exógenos¹²³.

La *señal 2* involucra la interacción entre moléculas co-estimuladoras de membrana en las APCs (como CD80, CD86, OX-40L, CD70) y sus ligandos expresados en la célula T (como CD28, OX-40, CD27). Esta señal informa a la célula T que debe “reaccionar” al antígeno que presenta la APC. En ausencia de esta co-estimulación, los linfocitos T se tornan tolerogénicos.

La combinación de las señales 1 y 2, induce la activación y proliferación de linfocitos *naive* TCD4+ y TCD8+ (Th0), determinando la especificidad (señal 1) y magnitud (señal 2) de la respuesta inmune que se está generando. Estas señales son insuficientes para determinar la polarización funcional de las células Th0, requerida para inducir un mecanismo inmune de defensa específico¹²³.

1.6.4 Señal 3 y 4 – Regulación del fenotipo efector de la respuesta adaptativa

La *señal 3* resulta de los eventos ocurridos en el microambiente durante el reconocimiento del antígeno por las APCs, a través de un set distintivo de factores solubles secretados (CKs y quimioquinas) producidos por las APCs u otras células reclutadas presentes en el sitio de activación, que colectivamente, permiten la regulación del tipo de respuesta inmune inducida, determinando el subset de linfocitos T efectores a diferenciarse¹²³.

Finalmente, la *señal 4* instruye a las células T efectoras recientemente activadas y diferenciadas, luego de la expansión clonal, con información de “navegación” (*homing*), dirigiéndolas al sitio de infección o donde se originó la señal de alerta. Esta señalización ocurre gracias a la información brindada por la combinación de selectinas, integrinas y quimioquinas, regulando la salida de los linfocitos de los órganos linfoides secundarios hacia el sitio blanco. Por ejemplo, la expresión en la superficie de CCR10 y/o CCR4 por las mDCs, indica a las células T que migren preferentemente a la piel^{123,138}.

1.6.5 Fenotipos linfocitos efectores

Como se mencionó, las DCs cumplen un rol fundamental en la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4+ *naive* hacia linfocitos colaboradores Th1, Th2, Th17, T *helper* "folicular" (Tfh) o T regulador (Treg), además pueden activar directamente los TCD8+ *naive* en efectores citotóxicos (CTLs), determinando el tipo de respuesta inmune.

El **fenotipo Th1** es inducido por antígenos intracelulares y es responsable de la respuesta inmune mediada por células. El factor de transcripción maestro es T-bet, cuya activación vía STAT4/STAT1 (*del inglés*, signaling transducer and activator of transcription) (dependiente de IL-12, señal 3), determina la diferenciación. Este fenotipo está caracterizado por la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-2¹³⁹. Las DCs, mediante liberación de IL-12 y las células NK y T, mediante secreción de IFN- γ (señal 3), contribuyen a polarizar la diferenciación de linfocitos TCD4+ *naive* hacia Th1, inhibiendo el linaje Th2. Este fenotipo, se especializa en activar macrófagos infectados o que fagocitaron un patógeno y la coordinación de este evento desarrolla la reacción inmunológica conocida como granuloma. Además, las CKs producidas promueven la activación de CTLs y NKs, y el cambio de clase a anticuerpos opsonizantes, predominantemente IgGs. La respuesta inmune se esquematiza en la **figura 1.5**¹⁴⁰.

Los linfocitos **TCD8 citotóxicos** (CTL), generalmente se activan mediante la asistencia de TCD4+ efectoras (antígeno-específicas), aunque en algunas infecciones virales ocurre que las DCs están lo suficientemente activadas y son capaces de inducir la producción de IL-2 requerida para la diferenciación de los TCD8+ sin la colaboración TCD4+. Los CTLs juegan un rol central en el reconocimiento y la eliminación antígeno-específica de células infectadas por virus, mediante la liberación de gránulos citotóxicos (perforinas y granzimas) o la inducción de apoptosis de la célula blanco, por la vía clásica de las caspasas (mediante la interacción de Fas-FasL). También los CTLs se caracterizan por la secreción de IFN- γ que inhibe a las células B y la replicación viral, induce la expresión de MHC-I y recluta y activa macrófagos. Además secretan TNF- α , y LT- α (TNF- β) que en sinergismo con IFN- γ , estimulan a los macrófagos activados a inducir apoptosis de la célula blanco a través del receptor TNFR- I¹⁴¹.

El **fenotipo Th2** es inducido por antígenos extracelulares y es responsable de la respuesta inmune humoral. GATA3 es el factor de transcripción maestro que determina la diferenciación, esto sucede luego que la IL-4 (señal 3) se une a su receptor y activa STAT5/STAT6. Las Th2 se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13¹³⁹. La secreción de IL-10 inhibe la polarización a Th1 y la liberación de CKs por macrófagos. La IL-4 reprime las señalizaciones vía IL-12 mediante inhibición de la expresión de IL-12R2. De esta manera IL-4 antagoniza con la diferenciación a Th1. Las CKs secretadas por este fenotipo promueven una respuesta humoral, activando células B y su sobrevivencia, con producción de anticuerpos de las clases IgG1, IgM, IgA e IgE. Esta respuesta de mediadores solubles es crítica en la inmunidad contra helmintos y otros patógenos extracelulares, a través de la activación de células efectoras como eosinófilos y mastocitos. Las CKs del perfil Th2 están además, involucradas en fenómenos de tipo alérgico, como asma y dermatitis atópica. La respuesta inmune se esquematiza en la **figura 1.5**¹⁴⁰.

El **fenotipo Th17** también está involucrado en la eliminación de patógenos extracelulares, con un perfil pro-inflamatorio. El desarrollo de este linaje involucra la producción inicial de IL-21 por los linfocitos T, que actuando de manera autocrina, activa STAT3, lo que induce la activación del factor de transcripción maestro ROR γ t, requerido para la diferenciación. Este es inducido por TGF- β e IL-6 (y en ausencia de IL-4 e IL-12) (señal 3). Las células Th17 se caracterizan por la expresión de IL-17A, IL-17F, TNF- α , IL-21 e IL-22, CXCL1 y el receptor para IL-23, CK que amplifica este fenotipo^{139,142}. Este perfil, junto a otros tipos celulares presentes en el sitio de infección que secretan quimioquinas y metaloproteasas, inducen el reclutamiento de neutrófilos a la zona en las etapas tempranas de una infección y favorece la destrucción de hongos y bacterias extracelulares¹⁴³.

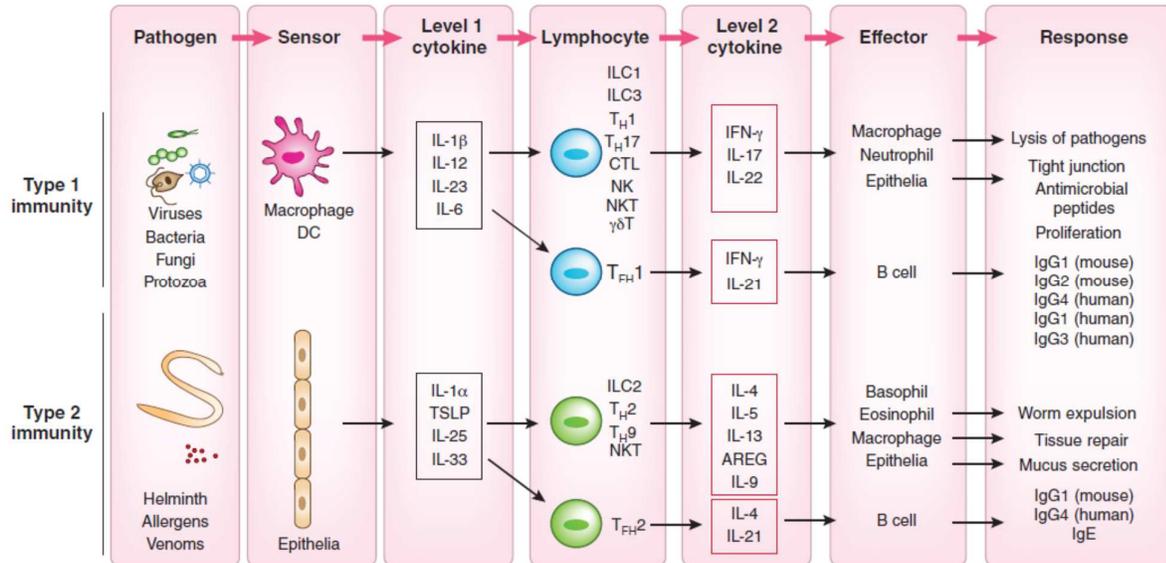


Figura 1.5: Respuestas Th1 y Th2. Las respuestas inmunes están orquestadas por tres categorías celulares que funcionan como “sensores” que detectan patógenos y secretan CKs del “nivel 1”, linfocitos residentes en los tejidos que responden a las CKs del nivel 1 y secretan CKs de “nivel 2” y células efectoras que responden a CKs del nivel 2, lo que conlleva a ejercer su función efectora con el fin de eliminar patógenos. Las DCs y macrófagos funcionan como sensores para el tipo Th1 de respuestas inmunes, mientras que los mastocitos y células epiteliales para el tipo Th2. Las CKs del nivel 1 actúan sobre linfocitos diferenciados, incluyendo ILCs (*del inglés*, Innate lymphoid cells), ILLs (*del inglés*, Innate-like lymphocytes) y T_{RM} (*del inglés*, Tissue-resident memory T cells), que producen CKs de nivel 2 que actúan sobre las células efectoras. Dentro de este grupo se encuentran los macrófagos, neutrófilos, células epiteliales, eosinófilos y basófilos, células B, neuronas sensoriales, endotelio y células de músculo liso. Estas células efectoras actúan de manera diversa, incluyendo como barrera de defensa, matando y expulsando patógenos, produciendo anticuerpos y reparando tejidos. Extraído de Iwasaki, A. *et al*¹⁴⁰

En ausencia de estímulos patogénicos hay abundancia de TGF- β y ausencia de IL-6, IFN- γ e IL-12, lo que favorece la inducción de la expresión del factor de transcripción Foxp3, que determina el fenotipo inmunoregulador **Treg**. Las Tregs (tanto las de origen tímico, naturales (nTregs) o “inducible” en periferia (iTregs)) mantienen la tolerancia periférica y evitan que la actividad de los fenotipos Th1, Th2 y Th17 persista y provoque fenómenos auto-reactivos. Las células Treg se caracterizan por la expresión de TGF- β e IL-10¹³⁹.

En el **fenotipo Tfh** (*helper* foliculares), Bcl-6 es el factor de transcripción que determina la diferenciación, ya que es requerido para la expresión de CXCR5, receptor de CXCL13, quimioquina producida por células estromales del folículo linfoide. La IL-21 desempeña un rol crítico en la adquisición de este fenotipo.

Además expresan ICOS, cuyos ligandos están presentes en las células B. Los linfocitos Tfh son esenciales para asistir a las células B en el folículo linfoides a producir anticuerpos T-dependientes y para la inducción y control del cambio de clase e hipermutación somática^{139,144}.

Recientemente, se han descrito dos nuevos fenotipos de linfocitos T: **Th9** y **Th22**¹⁴⁵. Los linfocitos Th9 producen IL-9, primero relacionados con promover la producción de mucus y activación de mastocitos y eosinófilos, y subsiguientemente, se ha identificado su rol en patologías alérgicas¹⁴⁶ y autoinmunes^{147,148}. Los factores de diferenciación de los Th9, involucran a IL-4 y TGF- β , que activan al factor de transcripción Spi.B o Pu.1¹⁴⁹. Los linfocitos Th22 producen IL-22, inicialmente asociada a la inmunopatología de enfermedades de la piel^{150,151}, y posteriormente vinculada a la patogénesis de enfermedades autoinmunes y alérgicas¹⁵². Los factores de diferenciación de los Th22, involucran a IL-6 y TNF- α , que activan al factor de transcripción AHR¹⁵³.

Luego de la activación a través del TCR, la diferenciación y especialización funcional de los linfocitos T *naive* está coordinada por un programa genético que utiliza factores de transcripción y las proteínas STAT que transducen las señales y activan los factores de transcripción, distintivos en cada subclase, para expresar directamente los mediadores solubles y moléculas de superficie características de cada fenotipo^{139,154,155}. Y aunque se habla de un factor de transcripción “maestro” para cada linaje, expresado generalmente de forma excluyente, esto es una simplificación, que no explica la heterogeneidad funcional y plasticidad de los Ths^{155,156}. Estas vías de señalización están multifactorialmente reguladas y no se discutirán en detalle.

Como ya se mencionó, luego que una APC presenta un antígeno a una célula T *naive*, ésta es activada, ocurren los procesos de expansión clonal y su diferenciación a células efectoras, las cuales migran al sitio de infección para eliminar el patógeno. Estas células efectoras son de vida corta, pero además existe un subconjunto de células de memoria con potencial de larga vida. Las células de memoria se localizan en los órganos linfoides secundarios (T_{CM}, memoria central) o en los tejidos recientemente infectados (T_{EM}, efectoras de memoria).

Durante una re-exposición al antígeno, en una segunda respuesta inmune, las células T de memoria poseen la capacidad de una expansión clonal más rápida y efectiva en comparación con la primera exposición. También se demostró la existencia de células efectoras y de memoria para las células Treg. Las características principales de las células de memoria son: que fueron previamente activadas y ocurrió el proceso de expansión clonal, persisten en ausencia del antígeno y tienen una aumentada actividad en un reencuentro con el antígeno¹⁵⁷.

También cabe destacar, que los procesos de diferenciación, expansión clonal, inducción de células efectoras y de memoria, están altamente regulados y existe una plasticidad celular con varios estadios de transición intermedios¹⁵⁴ que no se detallarán.

1.6.6 Linfocitos B

Este tipo celular es parte esencial en la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de anticuerpos específicos o inmunoglobulinas que pueden neutralizar virus o toxinas y marcar células infectadas o malignas para su destrucción (anticuerpos opsonizantes). Cada célula B posee un receptor (BCR, *del inglés*, B cell receptor), inmunoglobulina con una especificidad única. El reconocimiento de un antígeno específico activa el BCR y promueve múltiples cascadas de señalizaciones que conllevan a la diferenciación celular en células secretoras de anticuerpos o células de memoria. Lo anterior permite una rápida respuesta humoral en un segundo encuentro con el antígeno específico. Aunque las células B pueden responder a antígenos solubles, la forma predominante de activación *in vivo* es mediante el reconocimiento de un antígeno específico unido a la superficie de APCs en los órganos linfoides secundarios, ya que esto promueve la formación de un contacto intercelular especializado denominado sinapsis inmunológica. Este contacto desencadena una cascada de señalización altamente regulada, plataforma para la internalización del antígeno que precede el procesamiento intracelular en péptidos cargados en el contexto del complejo MHC-II y presentado a células Th, con el fin de que la célula B obtenga la licencia final para su activación y diferenciación en una célula efectora¹⁵⁸.

Lo anterior permite la proliferación y supervivencia, aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras y CKs que promueven la interacción con células TCD4+ *helper*, y aumento de la expresión de moléculas que le permite la migración a la zona extrafolicular donde se encuentran con las células T. La re-estimulación de las células B con las células T provoca el cambio de isotipo de inmunoglobulina y la diferenciación a células plasmáticas de corta vida. A continuación, en los centros germinales se produce la mutación somática y la maduración de la afinidad, cambio adicional de isotipo de inmunoglobulina, generación de memoria y diferenciación a células plasmáticas de larga vida. Estas células B de memoria expresan altos niveles de BCL-2, proteína antiapoptótica que favorece la larga vida de estas células. Algunas de estas células pueden permanecer en los centros germinales o recirculan en sangre y órganos linfoides¹⁵⁹.

1.7 Protección inmunológica durante la vacunación

Como ya se mencionó la mayoría de las vacunas han sido desarrolladas de forma empírica con poco o nulo conocimiento del mecanismo inmune por el cual inducen protección inmunológica. Las vacunas elaboradas con microorganismos vivos atenuados generan fuertes respuestas protectoras mixtas (tanto celulares como humorales) y frecuentemente confieren inmunidad por varias décadas incluso con una sola inoculación. En cambio las vacunas elaboradas con subunidades y adyuvantes inducen protección de mucha más corta duración y es necesaria la administración de *boosters* para mantener la inmunidad protectora¹⁶⁰.

Como las vacunas atenuadas consisten de virus o bacterias, se sostiene que señalizan mediante varios PRRs, sin embargo a pesar de existir varios estudios que examinan como los PRRs reconocen patógenos, hay muy pocos estudios que evalúen como los PRRs en las vacunas vivas atenuadas influyen las respuestas inmunes adaptativas. Estas vacunas sirven de *gold standards* y entender los mecanismos por los cuales inducen protección será invaluable para el diseño racional de nuevas vacunas contra patógenos difíciles para los cuales aún no existen¹⁶⁰.

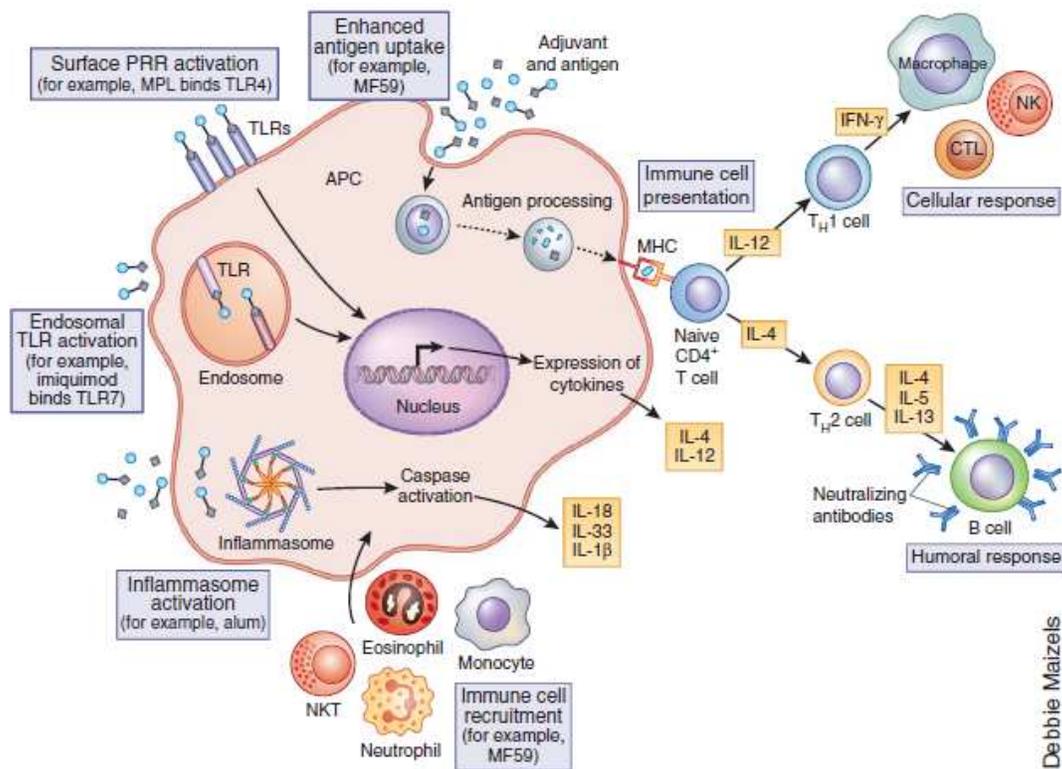
Un problema central radica en como diseñar adyuvantes para las vacunas que estimulen el tipo de respuesta inmune requerida para generar protección, como ser un set específico de linfocitos Th, CTLs, células B o T de memoria, o adyuvantes que induzcan un *homing* hacia las mucosas y la persistencia de linfocitos antígeno específicos. Lo anterior requiere un conocimiento del mecanismo por el cual los adyuvantes exitosos median su inmunogenicidad, o sea, los PRRs involucrados, así como la naturaleza de los subsets de DCs y otros tipos celulares que son *targets* para los adyuvantes¹⁶⁰.

1.8 Mecanismo de acción de los adyuvantes

1.8.1 Revelando “The Immunologist’s Dirty Little Secret”

Janeway, sostenía que los adyuvantes eran el pequeño sucio secreto de los inmunólogos, debido a que por décadas fueron usados de forma empírica mientras que su mecanismo de acción no era conocido¹⁶¹. Los mecanismos inmunológicos utilizados por muchos adyuvantes están aún bajo investigación, pero grandes avances se han hecho y la evidencia sugiere que los adyuvantes actúan utilizando uno o más de los siguientes mecanismos para inducir una respuesta inmune (esquemáticos en la **figura1.6**)⁶.

- 1.- Reclutamiento inmune celular al sitio de inoculación.
- 2.- *Up-regulación* de citoquinas y quimioquinas.
- 3.- Activación de PRRs de superficie celular y endosomales.
- 4.- Activación del inflammasoma.
- 5.- Aumento de la captura e internalización y presentación del antígeno.
- 6.- Inmunomodulación - activación y diferenciación de células T o B.



Debbie Maizels

Figura 1.6: Mecanismos putativos de acción de adyuvantes de inmunización. Se han postulado diferentes mecanismos por los cuales los adyuvantes pueden ejercer su mecanismo de acción. Algunos adyuvantes pueden actuar como ligandos de PRRs activando las respuestas inmunes innatas. La señalización mediada por estos receptores puede posteriormente activar factores de transcripción que inducen la producción de CKs y quimioquinas, las cuales ayudan en el direccionamiento de un tipo particular de respuesta inmune, como son las Th1 o Th2 e influyen en el tipo de células inmunes reclutadas al sitio de inoculación. La activación del inflamasoma también se ha implicado como un posible mecanismo de acción de algunos adyuvantes. Esta activación conlleva a la producción de CKs pro-inflamatorias (IL-1β e IL-18). Algunos adyuvantes influyen en la presentación antigénica en los MHCs. Cabe destacar que algunos adyuvantes pueden ejercer su acción a través de varios de estos mecanismos. Extraído de Reed, S. G. *et al*⁶.

En la **tabla 1.2** se listan diferentes adyuvantes según su clasificación, mecanismos putativos de acción, tipo de respuesta generada y cuál es su etapa de desarrollo o si ya es un producto comercial licenciado.

Tabla 1.2: Clase de adyuvantes, mecanismos putativos de acción, tipo de respuesta generada y etapa de desarrollo o producto comercial. Extraído de Reed, S. G. *et al*⁶.

Adjuvant name	Class	Mechanism or receptor	Type of immune response	Clinical phase or licensed product name
dsRNA analogues (for example, poly(I:C))	IM	TLR3	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 1
Lipid A analogues (for example, MPL, RC529, GLA, E6020)	IM	TLR4	Ab, T _H 1	Cervarix, Supravax, Pollinex Quattro, Melacine
Flagellin	IM	TLR5	Ab, T _H 1, T _H 2	Phase 1
Imidazoquinolines (for example, Imiquimod, R848)	IM	TLR7 and TLR8	Ab, T _H 1	Aldara
CpG ODN	IM	TLR9	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
Saponins (for example, QS21)	IM	Unknown	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
C-type lectin ligands (for example, TDB)	IM	Mincle, Nalp3	Ab, T _H 1, T _H 17	Phase 1
CD1d ligands (for example, α - galactosylceramide)	IM	CD1d	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ NKT cells	Phase 1
Aluminum salts (for example, aluminum oxyhydroxide, aluminum phosphate)	PF	Nalp3, ITAM, Ag delivery	Ab, T _H 2	Numerous licensed products
Emulsions (for example, MF59, AS03, AF03, SE)	PF	Immune cell recruitment, ASC, Ag uptake	Ab, T _H 1, T _H 2	Fluad, Pandemrix
Virosomes	PF	Ag delivery	Ab, T _H 1, T _H 2	Epaxal, Inflexal V
AS01 (MPL, QS21, liposomes)	C	TLR4	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
AS02 (MPL, QS21, emulsion)	C	TLR4	Ab, T _H 1	Phase 3
AS04 (MPL, aluminum salt)	C	TLR4	Ab, T _H 1	Cervarix
AS15 (MPL, QS21, CpG, liposomes)	C	TLR4 and TLR9	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 3
GLA-SE (GLA, emulsion)	C	TLR4	Ab, T _H 1	Phase 1
IC31 (CpG, cationic peptide)	C	TLR9	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ T cells	Phase 1
CAF01 (TDB, cationic liposomes)	C	Mincle, Ag delivery	Ab, T _H 1, CD8 ⁺ T cells	Phase 1
ISCOMs (saponin, phospholipid)	C	Unknown	Ab, T _H 1, T _H 2, CD8 ⁺ T cells	Phase 2

Ab, antibody; Ag, antigen; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain; C, combination of immunomodulatory molecule and particulate formulation; dsRNA, double-stranded RNA; IM, immunomodulatory molecule; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; PF, particulate formulation; TDB, trehalose dibehenate. Some particulate formulations (such as aluminum salts and emulsions) also generate immunomodulatory activity.

1.9 Mecanismo de acción de los adyuvantes de aluminio

En la actualidad hay un gran interés en elucidar el o los mecanismos de acción de los compuestos de aluminio (AH) ya que aún no se conoce con claridad como los mismos proveen protección y porque son relativamente inefectivos en el desarrollo de inmunidad celular. Recientemente se describió que la inoculación con estos compuestos promueve la producción de IL-10 (CK anti-inflamatoria crucial en el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia y homeostasis inmune), lo que bloquea las respuestas Th1 y explicaría la ineficacia en la inducción de una respuesta Th1 inmune protectora¹⁶².

1.9.1 Retención del antígeno en el sitio de inoculación (formación de depósitos)

Este mecanismo surgió de las investigaciones de Glenny¹⁴, en las que postuló que la inoculación del toxoide precipitado por la adición de compuestos de aluminio ocasionaba una exposición prolongada del antígeno en el lugar de la administración, el cual era lentamente liberado, lo que aseguraba una estimulación del SI prolongada y efectiva, comparada con la inoculación del toxoide solo^{92,163}. Esta explicación fue dogmáticamente aceptada hasta hace dos décadas^{3,57,92,164}.

Este mecanismo fue desafiado por experimentos en los que la escisión quirúrgica del sitio de inoculación dentro de las primeras dos horas de la inoculación claramente no interfería en el desarrollo de una respuesta inmune humoral inducida por la formulación con estos compuestos. La inoculación de proteína adsorbida a AH se realizó de manera intradérmica en la oreja de ratones. A pesar de que este estudio fue un intento sincero en sugerir que el depósito de corto tiempo no es necesario para el efecto de los compuestos de aluminio, el autor no pudo excluir la posibilidad de que el daño celular de la remoción quirúrgica de la oreja ocasionara suficientes señales inflamatorias para potenciar la respuesta inmune¹⁶⁵. También, se comprobó que la formación de nódulos en el sitio de inoculación ocurre en las primeras 4hs post inoculación mediante la interacción con el fibrinógeno¹⁶⁶. Pero los títulos de IgG1 específicos a los 35 días post inoculación no se veían afectados en ratones deficientes en fibrinógeno, los cuales no forman nódulos en el sitio de inoculación¹⁶². Por lo que aún no hay evidencia definitiva que el efecto depósito contribuya de manera significativa a la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio^{92,167}. Puede que sea necesario un periodo de tiempo corto de depósito para la inducción de una respuesta inmune.

1.9.2 Reconocimiento por el inflamasoma NLRP3

Un descubrimiento crucial relativo a los compuestos de aluminio^{168,169,170,171} y otros adyuvantes particulados^{172,173} fue la habilidad de activar el inflamasoma NLRP3. El modo de activación se ejemplifica en la **figura**

1.7¹⁷⁴. Se reportó en el 2008 que las respuestas inmunes innatas y adaptativas en ratones deficientes en NLRP3 se suprimían. Específicamente estos ratones tenían limitado el reclutamiento celular al sitio de inoculación y una secreción local reducida de IL-1 β , lo que permitió proponer la explicación del bajo número de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y DCs infiltrantes. También se propuso que el inflamasoma NLRP3 es requerido para la inducción de una respuesta inmune adaptativa ya que se observó una reducción en la producción de IgG1 específicas en ratones deficientes en NLRP3^{168,170}.

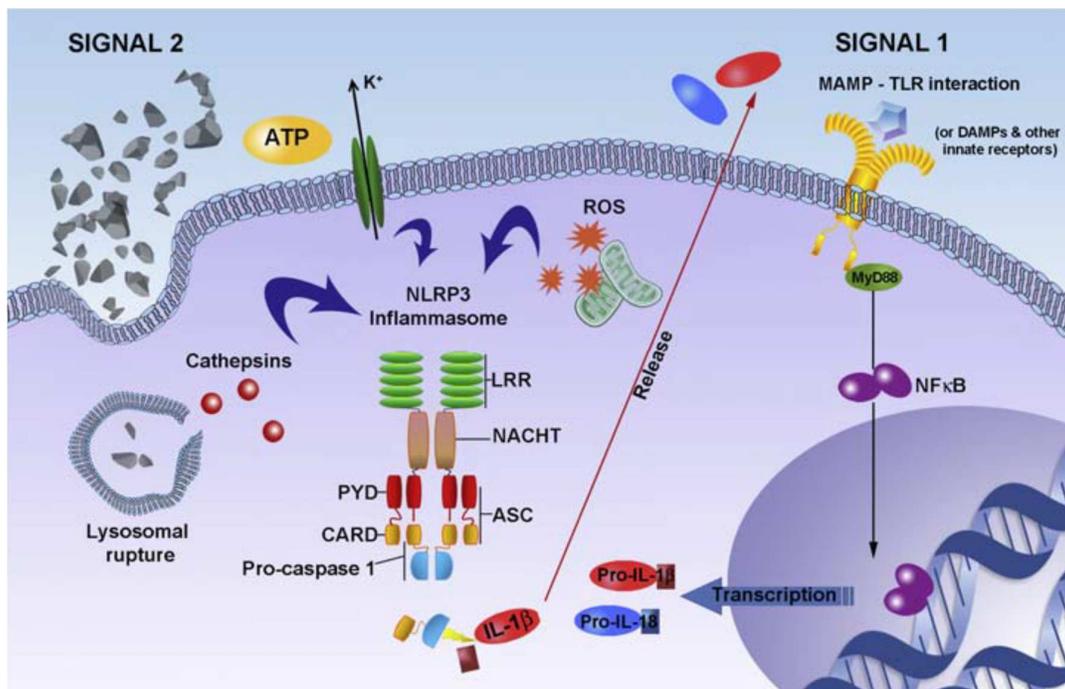


Figura 1.7: Mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3 por adyuvantes. Una variedad de sucesos celulares pueden inducir la activación del inflamasoma NLRP3. Se requiere primeramente una señal de “*priming*”, señal 1, (Nota: diferente a la señal 1 inmunológica descrita previamente), la cual es inducida luego del reconocimiento de un ligando TLR, lo que activa la señalización vía MyD88 y la translocación de NF- κ B iniciando la transcripción de pro-IL-1 β , pro-IL-18 y el NLRP3. Luego, una serie de eventos celulares como por ej. eflujo de potasio, generación de ROS (*del inglés*, reactive oxygen species), desestabilización lisosomal, liberación de ADN por adyuvantes particulados o señales de peligro (señal 2) inducen el ensamblaje del complejo multiproteico, lo que permite el reclutamiento de la pro-caspasa 1. El “*clustering*” de pro-caspasa 1 resulta en el autoclivado y activación, que permite a su vez el clivado de pro-IL-1 β y pro-IL-18. Ambas CKs en su forma activa son liberadas para ejercer sus efectos pleiotrópicos. Aunque el TLR *priming* es necesario para la activación *in vitro*, se sostiene que la liberación de DAMPs durante el estrés celular puede contribuir *in vivo*. Extraído de Muñoz-Wolf, N. *et al*¹⁷⁴

Estudios posteriores contradicen lo antes mencionado. Por ejemplo, las alteraciones en la respuesta innata observadas en ratones NLRP3^{-/-}, no fueron reproducidas en ratones deficientes en caspasa 1. Además, varios estudios desafían el rol del inflamasoma NLRP3 en la inducción de la respuesta inmune humoral por los compuestos de aluminio^{169,172,175,176}. Las razones en estas discrepancias pueden deberse a varios factores, como ser el uso de diferentes vías de inoculación, dosis, protocolos de inmunización, etc¹⁶⁷.

En contraposición, existe una carencia relacionada al rol del inflamasoma NLRP3 en la inducción de respuestas inmunes de memoria por los compuestos de aluminio. Estos pueden generar similares respuestas inmunes humorales en ratones *wild type* y NLRP3^{-/-}, en periodos cortos posteriores a la inmunización, pero no puede descartarse el posible rol de NLRP3 en promover una respuesta inmune de memoria¹⁶⁷.

1.9.3 Señalización vía Syk-PI3 quinasa (*del inglés, phosphoinositide 3-kinase*)

También, se ha postulado que los compuestos de aluminio no son reconocidos por un receptor específico, en cambio promueven la formación de “lipid rafts” (reordenamiento de los lípidos de membrana) y la activación celular independiente de receptores proteicos. Se ha sugerido que estos adyuvantes pueden interactuar con las células luego del tratamiento de DCs con pronasa, enzima que cliva las proteínas de la membrana celular. Además, se demostró que la interacción de los compuestos de aluminio con los lípidos de la membrana de DCs inducen la activación celular independiente de receptor y que esta activación es dependiente de la vía de señalización Syk-PI3 quinasa¹⁷⁷. La activación de esta vía de señalización inhibe la secreción de IL-12p70 por DCs, lo que también explicaría la pobre inducción de respuesta inmune celular por los compuestos de aluminio, ya que esta CK está involucrada en la polarización de células T *naive* hacia un fenotipo Th1. Específicamente se observó que los compuestos de aluminio inhiben selectivamente la expresión en DCs de la subunidad IL-12p35 de la IL-12p70 bioactiva¹⁷⁸. Se demostró el rol crítico que poseen las DCs en la

inducción de respuestas inmunes por los AH, ya que la depleción de estas células limita las respuestas inmunes¹⁷⁹.

1.9.4 Liberación de señales de peligro endógenas

Los adyuvantes de aluminio también pueden ejercer sus efectos modulando la inmunidad por medio de efectos citotóxicos. Como ya se mencionó, la teoría de peligro postula que el SI responde a señales de peligro como stress, daño y muerte celular, eventos asociados con peligro endógeno (DAMPs).

Los compuestos de aluminio promueven necrosis local en el músculo inoculado⁴⁷ y en el peritoneo de ratones¹⁸⁰. La naturaleza de la muerte celular por estos compuestos no está totalmente caracterizada. Se ha reportado el rol de liberación de señales endógenas de peligro durante la muerte celular inducida por estos adyuvantes en el desarrollo de una respuesta inmune. Particularmente en la liberación de ADN del huésped^{180,181}, ácido úrico¹⁷⁹, ATP¹⁸², proteína de shock térmico 70¹⁸³, IL-1 α ¹⁸⁴ e IL-33¹⁸⁵ luego de la inoculación, moléculas que reclutan y activan células inflamatorias.

Se ha reportado que el ácido úrico es liberado en la cavidad peritoneal murina dentro de las dos primeras horas post inoculación y se sostiene que tiene un rol importante en la inducción de las respuestas inmunes generadas por los compuestos de aluminio. También, se comprobó que el pre-tratamiento con uricasa en ratones decrece la cantidad de células T específicas y las respuestas inmunes humorales¹⁷⁹.

También el ADN del huésped es liberado dentro de las tres primeras horas post-inoculación, y se ha reportado que los depósitos de adyuvantes de aluminio contienen ADN. El pre-tratamiento con ADNasa en ratones inmunizados con estos compuestos decrece la cantidad de IgG1 e IgE antígeno específicas¹⁸⁰. Asimismo, se demostró que la liberación de DNA dependiente de la inmunización con AH es crítica para la interacción entre las células DC y T, la cual es suprimida con ADNasa, lo que conlleva a una disminución en la expansión de las células TCD4+ antígeno específicas y a una reducción parcial en la producción de IgG1 específicas¹⁸¹.

Los estudios anteriores sugieren que la liberación del ADN del huésped tiene un rol importante en el mecanismo de acción de los adyuvantes de aluminio¹⁶⁷.

Un estudio reciente demostró que los neutrófilos son en primera instancia las principales células reclutadas al sitio de inoculación con ovoalbúmina adsorbida a AH, dentro de las dos primeras horas post-inoculación. Además, la imagenología intravital mostró un “enjambre” de neutrófilos, muerte celular rodeando las partículas del adyuvante de aluminio y la presencia de hebras de ADN dentro del tejido. También comprobaron que estas hebras de ADN son trampas extracelulares de neutrófilos (*del inglés*, NETs, neutrophil extracellular traps) sensibles al tratamiento con ADNasa. Asimismo demostraron que en ratones deficientes en PAD4 (*del inglés*, peptidylarginine deiminase 4, necesaria para la formación de NETS vía la citrulinización de histonas, lo que facilita la descondensación del ADN y expulsión del mismo), las NETs estaban ausentes y que los mismos presentaron una marcada disminución en las respuestas inmunes posteriores a la inoculación con compuestos de aluminio. Lo que demuestra que el mecanismo de muerte de los neutrófilos juega un papel importante en el mecanismo de acción de los AH y explicaría como las reacciones celulares en el sitio de inoculación conllevan a la liberación del ADN del huésped lo que impacta en la actividad adyuvante. Este estudio evidencia la fuente de ADN (por el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inoculación con estos adyuvantes), el cual es detectado por el SI, proveyendo la unión entre la inoculación y la activación de sensores de ADN que amplían la actividad adyuvante¹⁸⁶.

Sin embargo, otro estudio demostró que la depleción de neutrófilos no afectó la producción de IgG1 o IgG2a inoculando con ovoalbúmina adsorbida a AH¹⁸⁷ y una aumentada respuesta en anticuerpos cuando la inoculación fue realizada con lisozima mezclada con AH¹⁸⁸.

En suma, la interpretación de los reportes mencionados es complicada debido a la carencia en la uniformidad de los reactivos clasificados como compuestos de aluminio, es posible que diferentes reactivos generen efectos

diferentes¹⁸⁹. Sin embargo, algunos postulados son comunes: los compuestos de aluminio influyen sobre la captación antigénica, inducen señales de daño, reclutan varios tipos de células inmunes y generan respuestas Th2⁶.

1.10 Antecedentes e introducción al material a ser evaluado en la presente tesis

Actualmente la mayoría de las vacunas son diseñadas con subunidades, ya sean recombinantes o péptidos sintéticos, que poseen una inmunogenicidad limitada, por lo que es necesario el uso de adyuvantes en su formulación. A pesar de los avances en inmunología, el empleo de compuestos de aluminio como adyuvante sigue siendo la opción más aceptada. Éstos presentan desventajas como ya se mencionó, lo que ha impulsado el desarrollo de nuevos adyuvantes, por lo que es en la actualidad un campo de gran actividad científica. En esta área se enmarca el presente proyecto de tesis.

Las suspensiones a ser evaluadas como adyuvante-candidato fueron suministradas por una empresa extranjera, la cual sintetizó dos suspensiones a partir de calcita (carbonato de calcio): FCC-S06 y HAP-S08, procurando condiciones de asepsia durante el proceso de síntesis y su posterior autoclavado.

Las FCC-S06 son micropartículas funcionalizadas con grupos fosfato (FCC - Functionalised Calcium Carbonate) cuya síntesis se encuentra patentada y son producidas por dicha empresa para otros variados fines, por ejemplo, como excipiente o ingrediente farmacéutico¹⁹⁰. La síntesis se produce por el “*etching*” (recubrimiento superficial) de partículas de carbonato de calcio (de grado farmacéutico) re-precipitando y modificando la superficie con CO₂, proceso facilitado con el agregado de ácido fosfórico. Obteniéndose micropartículas donde se incorpora hidroxiapatita (HAP) en la superficie, resultando en un incremento considerable en la superficie específica¹⁹⁰. Como se mencionó en la introducción, está demostrada la eficacia de HAP en la adsorción de una gran variedad de proteínas, es biocompatible y se ha utilizado como adyuvante de inmunización.

Por lo anterior, se eligieron las FCC-S06 como candidatas para esta evaluación ya que exponen HAP en su superficie, lo que debería facilitar la adsorción de proteínas, y al ser biomiméticas, no deberían causar efectos locales y/o sistémicos severos. Además, podrían ser fácilmente eliminadas o

reabsorbidas tras cumplir su función, evitando así posibles efectos adversos tardíos. Tienen una relación área superficial/masa elevada lo que podría maximizar la cantidad de antígeno adsorbible por unidad de masa, minimizando la cantidad de micropartículas y de antígeno a emplear. Son de bajo costo y su producción puede ser estandarizada, asegurando un nivel de calidad uniforme de un lote de producción a otro según lo informado por la empresa.

La HAP-S08 fue producida por la empresa utilizando otro proceso de síntesis con el objetivo de obtener una suspensión de partículas con un diámetro promedio inferior al mínimo obtenido utilizando la síntesis estándar de FCCs. Dicho proceso de síntesis no está patentado y lo desconocemos. La empresa informó que dicha síntesis también comenzó utilizando calcita, y la suspensión resultante teóricamente está compuesta por partículas que son 100% HAP.

Objetivo general

El **objetivo general** del presente trabajo es evaluar si los materiales inorgánicos particulados suministrados por la empresa (FCC-S06 y HAP-S08) tienen potencial como adyuvante de inmunización, usando como referencia el adyuvante Alhydrogel® (Brenntag Biosector, Denmark).

A continuación se enumeran los **objetivos específicos** realizados durante la tesis para llevar a cabo dicho objetivo:

1.- Realizar una caracterización morfológica y de composición química de la suspensión y búsqueda de condiciones de resuspensión para obtener una formulación (suspensión partículas + buffer de resuspensión + proteína antigénica (Ag)) que permita evaluar el potencial adyuvante (*Capítulo III*).

2.- Determinar si la suspensión de partículas genera efectos tóxicos en ensayos *in vitro* e *in vivo* (*Capítulo IV*).

3.- Evaluar la actividad inmunoestimulante de la formulación en sistemas biológicos *in vitro* (*Capítulo V*). Para cumplir con este objetivo se procedió a:

- determinar si la formulación induce la activación de monocitos/macrófagos murinos.

- determinar si la formulación induce la activación y maduración de células dendríticas.

- determinar si la formulación estimula la captación, procesamiento y acumulación de antígeno.

- determinar si la formulación estimula la *cross-presentación* antigénica.

4.- Evaluar la actividad inmunoestimulante de la formulación con FCC-S06 *in vivo* usando como referencia el adyuvante Alhydrogel (*Capítulo VI*). Para cumplir con este objetivo se procedió a:

- caracterizar las poblaciones celulares reclutadas a nivel peritoneal inducidas por la suspensión.

-determinar si la formulación FCC-S06+Ag induce una respuesta de hipersensibilidad retardada.

- determinar si la formulación estimula una respuesta inmune citotóxica de memoria.

- determinar el potencial de la formulación FCC-S06+Ag de inducir una respuesta inmune humoral.

Capítulo II:

Materiales y Métodos

2 Materiales y métodos

2.1 Suspensiones de partículas FCC-S06 y HAP-S08

Posterior a la síntesis, las suspensiones fueron autoclavadas en la empresa. Ambas suspensiones fueron suministradas en formato “slurry”. En la **tabla 2.1** se detallan los porcentajes teóricos de composición de ambas suspensiones según lo informado por la empresa.

Tabla 2.1. Porcentajes teóricos de componentes de las suspensiones suministrados por la empresa.

Suspensión	% teórico CaCO ₃ total	% teórico HAP total	% de Ion citrato total	% teórico HAP expuesto en la superficie
<i>FCC-S06</i>	66	34	2	100
<i>HAP-S08</i>	0	100	0	100

2.2 Caracterización de las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08

2.2.1 Determinación del porcentaje de sólido seco

La determinación del porcentaje de sólido seco en las suspensiones madre se realizó calculando la diferencia en el peso de 2ml de las suspensiones pre y post secado hasta peso constante en estufa a 45°C. Esta determinación se realizó por triplicado.

2.2.2 Determinación de la superficie específica (*del inglés, SSA*)

Las suspensiones se filtraron en büchner y se lavaron con agua desionizada. Luego, las partículas se secaron en estufa a 130°C durante toda la noche y desgasearon a 100°C por 1h. Las SSAs se determinaron en un analizador de área superficial (Micromeretics Gemini V) por el método B.E.T (Brunauer–Emmett–Teller), siguiendo la norma ISO 9277 en los laboratorios de la empresa.

2.2.3 Determinación de tamaño de poros

Esta determinación se realizó luego de compactar las suspensiones de partículas utilizando la técnica de porosimetría de mercurio en un Autopore V

mercury porosimeter (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA) en la empresa. Los datos obtenidos fueron procesados y corregidos según Gane *et al*⁹¹.

2.2.4 Patrones de difracción de Rayos X

Los diagramas de difracción de rayos X se realizaron con el material sólido. Para ello, las suspensiones de partículas se secaron en estufa a 75°C durante toda la noche y fueron determinados utilizando un difractómetro (Rigaku Ultima IV) del Centro CADifRaX del DETEMA de la Facultad de Química, empleando radiación de CuK α en el rango de 10° a 80° en 2 θ con pasos de 0,02° y un tiempo de conteo de 1s por paso.

2.2.5 Espectroscopía y microscopía RAMAN confocal

La espectroscopía y microscopía Raman Confocal se realizó en un WITec Alpha 300-R espectrómetro Raman confocal (DETEMA de la Facultad de Química), con un láser de excitación de 532nm y una potencia ~30mW, también utilizando el material sólido tratado como se mencionó anteriormente. Los espectros de Raman confocal se obtuvieron promediando un set de 5 espectros de 0,05seg de tiempo de integración, mientras que las imágenes de microscopía Raman confocal se obtuvieron para una zona de 15x15 μ m² con una resolución de ~ 265nm pixeles.

2.2.6 Resuspensión y determinación del diámetro promedio – Estabilidad

Las determinaciones del dm se realizaron por dispersión dinámica de luz (*del inglés*, DLS) utilizando un Malvern Z sizer NS, y los procedimientos operativos estándares de medida de tamaño del equipo. Las muestras se prepararon agregando la alícuota de las suspensiones madres a la solución de buffer de resuspensión para obtener suspensiones al 0,2% w/v, homogenizando por 30seg en vortex y realizando la medida a 25°C. Las medidas de pH de la fase líquida se realizaron en dichas alícuotas, posterior a ser centrifugadas a 14000rpm por 10min.

2.3 Antígenos

Para la evaluación del potencial como adyuvante de inmunización de las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08 se utilizó un antígeno modelo, la proteína Ovoalbúmina, de ~45KDa naturalmente glicosilada y fosforilada (OVA, Sigma, A5503) y una proteína recombinante, estreptavidina (STP), producida según el siguiente apartado.

2.3.1 Producción y purificación de estreptavidina recombinante

La producción de estreptavidina recombinante se realizó según Galliazi *et al.*¹⁹² con modificaciones. Para expresar la proteína recombinante se transformaron por electroporación células de *E. coli* cepa BL21 (DE3) con el vector de expresión pET11b (T7-ST), proporcionado por la Dra. Macarena Pérez (Catedra de Inmunología, Instituto de Higiene, Facultad de Química). El plásmido utilizado para su producción, codifica para la proteína completa, con un tag amino terminal del péptido T7 de 12 residuos seguidos por Asp y Gln y los aminoácidos desde el 15 al 159 de la secuencia proteica.

Para la selección de las células transformantes se utilizó el antibiótico ampicilina (Sigma), resistencia que porta el vector pET11b (T7-ST), en placas de agar con ampicilina. Las células transformadas se cultivaron en 500mL de medio LB con ampicilina a 25°C hasta alcanzar una OD de 0,6. Luego de la inducción con 0,5mM de ipv (IPTG, Sigma), las células se cultivaron durante 4 horas a 25°C con agitación leve.

Para la purificación de la proteína recombinante, se centrifugaron las células a 3500g, 15min a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer Tris-HCl 20mM pH 7,4, con 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma), el cual fue sonicado (Omni-ruptor 4000) por 15min (potencia de 80 e intervalos de 30%) en baño de hielo. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 18000g durante 15min a 4°C. La fracción soluble se calentó durante 10min a 75°C, inmediatamente después se enfrió en hielo y luego se centrifugó a 10000g durante 30min. La estreptavidina soluble se purificó usando una columna de Iminobiotina agarosa (Pierce) según las indicaciones del

fabricante. El eluido fue dializado contra PBS toda la noche. La solución proteica obtenida fue cuantificada por espectrofotometría a 280nm en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

2.3.2 Caracterización del antígeno

2.3.2.1 Electroforesis

La electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 10% se realizó bajo condiciones reductoras (β -Mercaptoetanol) y sin reducir, utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Se sembró un gel de 1,5cm de espesor con 40 μ g STP, previamente diluidas y calentadas por 3min en buffer de siembra 2X (Tris-HCl 0,2M, urea 8M, SDS 0,2% (w/V), pH 8, conteniendo azul de bromofenol). En paralelo se sembró un marcador de peso molecular preteñido (Thermofischer) de rango entre 27 y 180 kDa. Se utilizó Tris-HCl 1M pH 6,8 como buffer del gel de concentración y Tris-HCl 0,75M pH 8,8 como buffer del gel de separación. La electroforesis se realizó a 80V en el gel concentrador y a 120V en el gel separador, utilizando el tampón Tris base 25mM, Glicina 10mM, 0,1% SDS (w/V) pH 8,3.

2.3.2.2 Caracterización estreptavidina recombinante por MALDI-Tof

Para esta caracterización se utilizó una matriz para MALDI para proteínas, la misma se preparó como una solución saturada de ácido sinapínico (~20 mg/ml) en 50% V/V de acetonitrilo y 50% V/V de una solución al 0,1% de ácido trifluoroacético en agua MilliQ. Partes iguales de matriz y la solución de STP o el mix de estándar de calibración (Bruker Daltonics) se sembraron en una placa de 96 pocillos (MicroScout Target Bruker), incubándose a Tamb hasta su completo secado. La determinación se realizó en un MALDI-TOF Microflex LRF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) equipado con un láser de N₂ a 337nm operado en modo positivo lineal. El espectro de la proteína se adquirió como la suma de 250 disparos en 4 zonas del pocillo con 40% de intensidad del láser. El procesamiento de los espectros se realizó en el software FlexAnalysis versión 3.4 (Bruker Daltonics).

2.3.3 Preparación de formulaciones

Las formulaciones fueron preparadas bajo condiciones asépticas, mezclando los volúmenes necesarios de ambas suspensiones madres (FCC-S06 y HAP-S08) con el buffer glicina 10mM, pH 8,5, (de ahora en más “glicina”), homogeneizando por pipeteo. Posteriormente se agregó cuando fue necesario, los volúmenes de las soluciones madre de STP u OVA, nuevamente homogeneizando por pipeteo y utilizando dichas formulaciones en los 15min posteriores a la preparación. Cada formulación fue preparada fresca para cada ensayo realizado.

El buffer glicina se preparó utilizando glicina (Sigma) y agua apirógena, preparando una solución madre de 100mM, pH8,5, filtrándola a través de una membrana 0,22 μ m (Millipore). Seguidamente, se eliminaron trazas de endotoxinas a través de una columna de polimixina (Pierce) según indicaciones del fabricante, y fue conservada a 4°C hasta su utilización. Se realizó el procedimiento anterior para las soluciones madre de STP u OVA utilizadas.

2.3.4 Determinación indirecta de endotoxinas

La determinación indirecta de endotoxinas como el LPS en las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08, soluciones de antígenos y el buffer glicina, se realizó utilizando la línea celular HEK blue mTLR4 siguiendo las indicaciones del fabricante del HEK-Blue™ LPS Detection Kit (Invivogen), con modificaciones.

Ésta línea celular reportera (Invivogen) es utilizada para evaluar la estimulación del TLR4 murino (mTLR4), receptor para LPS y el lípido A bacterianos. Se obtuvieron co-transfectando la línea celular HEK293 (derivadas de preparaciones de riñón embriónico humano) con los genes mTLR4, de los co-receptores MD-2/CD14 y SEAP. La estimulación con ligandos para mTLR4 activa los factores de transcripción NF-kB y AP-1 (ídem apartado 2.6.1). Las línea celular se cultivó en DMEM 4.5g/l glucosa, suplementado con 10% de SFB, 2mM L-glutamina, 100 μ g/ml Normocin™, 50U/ml-50 μ g/ml Penicilina-Streptomina y HEK-Blue Selection™ (Invivogen), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Brevemente, se sembraron en placas Greiner de 96 pocillos 180µl/pocillo de una suspensión de $1,4 \times 10^5$ céls/ml en medio de testeo HEK-Blue™. Luego se agregaron en un volumen de 20µl por triplicado, 1,0mg/ml de la FCC-S06 y HAP-S08, 50µg/ml de STP en glicina. Como control positivo del experimento se utilizó 20µl de una solución de 1,25ng/ml de LPS (Sigma), y como control basal y negativo 20µl de medio de testeo y agua apirógena. Las placas se incubaron en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂ por 16h. Posteriormente, 50µl de cada sobrenadante de cultivo se sembraron por duplicado en una placa Nunc de 96 pocillos. A cada muestra se le añadió 150µl del reactivo QUANTI-Blue™ (Invivogen), y se incubaron a 37°C por 3h. Finalmente, se midió la DO a 638nm en un lector de placas (TECAN, Sunrise).

2.4 Estudios de adsorción con la proteína modelo OVA

Para los estudios de adsorción se realizaron resuspensiones al 0,2%w/V de FCC-S06 y HAP-S08 en una solución 0,5mg/ml de OVA en glicina 10mM, pH 8,5, se incubaron a temperatura ambiente (Tamb, aproximadamente 24°C) en agitación vaivén suave, y se tomaron alícuotas a los 30, 60 y 180min. Las alícuotas fueron centrifugadas a 14000rpm por 10min y se cuantificó la proteína en el sobrenadante por absorbancia a 280nm. El porcentaje de proteína adsorbida se calculó por diferencia con la cantidad de proteína agregada.

2.5 Isotermas de adsorción con OVA

Las isotermas a 25°C se realizaron en un baño de agua mezclando el volumen apropiado de suspensiones madre de las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08 con diferentes diluciones de OVA en glicina 10mM, pH 8,5, obteniendo 10ml de una suspensión final al 0,6% w/V. Se analizaron concentraciones de OVA desde 0,2 a 1mg/ml, cada concentración se realizó por triplicado. Los estudios de adsorción indicaron que a las 3hs de incubación ya se había alcanzado el equilibrio. Las suspensiones se incubaron durante 3hs, bajo constante agitación y se extrajeron alícuotas de 500µl, las cuales fueron centrifugadas a 14000rpm por 15min. La concentración de OVA en el sobrenadante obtenido, así como la añadida al inicio de la incubación, se determinaron por duplicado utilizando el

método del ácido bicinconínico aumentando la sensibilidad realizando la incubación según indicación del fabricante a 60°C.

2.6 Líneas celulares

2.6.1 RAW- Blue™

Esta línea celular reportera (Invivogen) deriva de la línea de macrófagos murinos RAW 264.7. La línea celular se cultivó en DMEM 4,5g/l glucosa (Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Capricorn), 2mM L-glutamina (AppliChem), 100µg/ml Normocin™ (Invivogen), 50U/ml-50µg/ml Penicilina-Streptomicina (Capricorn), y 200µg/ml Zeocin™ (Invivogen), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. Estas células expresan RIG-I, MDA-5, NOD1, NOD2, Dectin-1 y todos los TLRs menos TLR5; aunque la expresión de TLR3 y NOD1 es muy baja. La presencia de agonistas de los PRRs en el sobrenadante del cultivo, induce en estas células la activación de NF-κB y AP-1. Estos factores de transcripción activan la transcripción y traducción de la enzima fosfatasa alcalina embrionaria secretada (*del inglés*, SEAP), liberada al medio de cultivo. Los niveles de expresión de esa enzima pueden ser monitoreados utilizando el sustrato denominado QUANTI-Blue™ (Invivogen), cuantificando la densidad óptica (DO) obtenida en el sobrenadante celular.

2.6.2 J774A.1

La línea celular de macrófagos/monocitos murino J77A.1 (ATCC® TIB67™) se cultivó en DMEM 4,5g/l glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado (inactivado por calor) (hiSFB) y solución antibiótico/antimicótico (50U/ml-50µg/ml Penicilina-Streptomicina y 0,25µg/ml de anfotericina B, (Capricorn)), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

2.6.3 Renca

La línea celular epitelial de riñón murina (ATCC® CRL2947™) se cultivó en RPMI-1640 (Capricorn) suplementado con 10% de SFB, 2mM L-glutamina, 0,1mM aminoácidos no esenciales (Capricorn), 1mM piruvato de sodio (AppliChem), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

2.6.4 Células dendríticas derivadas de médula ósea (*del inglés*, BMDC)

La obtención de BMDCs se realizó según Lutz *et al.*¹⁹³ con modificaciones. Ratones hembras de la cepa C57BL/6J wt o casp1y11-/- de entre 7 a 9 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron las tibias y fémures de forma aséptica y se removió el tejido muscular que rodea al hueso. Luego los huesos intactos fueron primero, sumergidos en etanol al 70% por 10seg para su desinfección y posteriormente lavados en medio de cultivo (RPMI-1640 suplementado con 10% de hiSFB y 50U/ml-50µg/ml Penicilina-Streptomocina). Ambos extremos de los huesos fueron cortados con material quirúrgico y la médula ósea fue extraída por bombeo con medio de cultivo con jeringa y aguja 25G. El material celular obtenido fue resuspendido en medio de cultivo y disgregado por pipeteo con aguja 21G. Posteriormente las células fueron centrifugadas (400g por 5min), y luego de descartar el sobrenadante, el pellet fue disgregado con una solución estéril al 0,88% de cloruro de amonio, incubándose por 2min para lisar los eritrocitos. Finalmente las células fueron lavadas con medio de cultivo y centrifugadas (400g por 5min), y su viabilidad y cantidad se determinó por microscopía con el colorante azul de tripán (Life Technologies, CA) en una cámara Neubauer.

Para diferenciar los precursores de médula ósea en BMDCs, se cultivaron en una densidad de 1×10^6 células/ml en medio de cultivo suplementado con 20ng/ml de GMCSF (suministrado por Dr. Martin Rossotti, Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene, Facultad de Química) por 10 días, cambiando dicho medio de cultivo cada 3 días, en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

El monitoreo del rendimiento de BMDCs obtenido se realizó fenotipificando las células por citometría de flujo (CF). Para ello, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas (1200rpm por 5min), resuspendidas en PBS-2%hiSFB-25mMEDTA y marcadas por 30min en oscuridad a 4°C con anticuerpos anti-CD11c conjugado a APC y anti-CD11b conjugado a FITC (Biolegend). Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II con un mínimo de 10.000 eventos. El procesamiento de los mismos se realizó utilizando el software FACSDiva versión 6.1.3. Para los posteriores ensayos se

utilizaron suspensiones de BMDCs con más un 90% de células CD11c+CD11b+. En la **figura 2.1** a continuación se muestra un ejemplo de caracterización de BMDCs por CF.

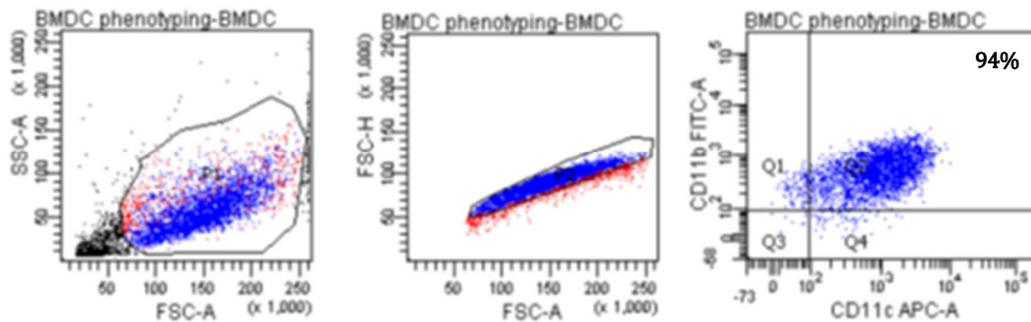


Figura 2.1: Caracterización fenotípica de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) por CF. Las BMDCs se obtuvieron a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6J cultivados en presencia de GMCSF. Del total de células obtenidas el 90% fueron positivas para CD11c y CD11b (Q2). Resultado representativo de varios experimentos independientes.

2.7 Animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales utilizados en este trabajo fueron previamente aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR (CHEA). Los procedimientos experimentales que involucraron animales se realizaron siguiendo las normas éticas recomendadas para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Para el manejo de los animales se utilizó vestimenta completa (guantes, tapabocas, túnicas, gorros y zapatos).

2.7.1 Ratones CD1

Los ratones CD1 hembras fueron adquiridos al DILAVE (División de Laboratorios Veterinarios, Montevideo, Uruguay). Se alojaron en cajas de plástico con viruta en el laboratorio de experimentación animal del Instituto Polo Tecnológico. Se mantuvieron en un ambiente controlado, con una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos de luz/oscuridad de 12/12hs y recibieron agua y ración estándar *ad libitum*.

2.7.2 Cobayos albinos

Los cobayos albinos hembras fueron adquiridos al Campo de Experimentación, Instituto de Higiene, UdelaR. Se alojaron en cajas de plástico con viruta como cama en el laboratorio de experimentación animal del Instituto Polo Tecnológico. Se mantuvieron en un ambiente controlado, con una temperatura de 20-22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12/12hs y recibieron agua (suplementada con 1g/l de ácido ascórbico) y ración estándar *ad libitum*.

2.7.3 Ratones C57BL/6J y C57BL/6J deficientes en caspasa 1 y 11

Los ratones hembras C57BL/6J de 8-10 semanas de edad fueron adquiridos al DILAVE y/o al Instituto Pasteur de Montevideo, y fueron alojados en la hotelería del laboratorio de experimentación animal del Dpto. de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 20-22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12/12hs, humedad entre 40-70%, en jaulas de plástico con tapa con filtro y viruta autoclavada. Los animales recibieron agua y ración balanceada estéril *ad libitum*.

2.8 Estudios de toxicidad

2.8.1 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La viabilidad celular se evaluó según Mosmann *et al.*¹⁹⁴ por el método del MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma) con algunas modificaciones, utilizando las líneas celulares RAW-Blue, J774A.1 y RENCA y la línea primaria BMDC. Se sembraron $2,2 \times 10^5$ células/ml por pocillo en placas Greiner de 96 pocillos en un volumen de 180µl de medio de cultivo. Se incubaron en estufa húmeda por 24hs a 37°C y 5% CO₂. Luego se agregaron en un volumen de 20µl, 1, 0,5, 0,25 y 0,10mg/ml de FCC-S06 o HAP-S08 o Alhydrogel (2,0% EP, Brenntag Biosector, Denmark) en glicina y se incubaron por 48hs.

El MTT es un tetrazolio, colorante amarillo soluble en agua, que es reducido por las células viables a una sal de formazan, producto insoluble en solución acuosa. La cantidad de formazan producida por las células es directamente

proporcional al número de células viables y es evidenciada por colorimetría luego de solubilizar el formazan.

Luego de la incubación, se agregaron 50µl de una solución 5mg/ml de MTT en PBS y 50µl de medio por duplicado por pocillo e incubaron por 3hs a 37^aC. Luego, se agregaron 200µl de SDS 20% en H₂O para disolver los cristales de formazan formados y a las 24hs se cuantificó el desarrollo de color por densidad óptica (DO) a 570nm utilizando un lector automático de placas (TECAN, Sunrise). Los controles utilizados fueron, el DMSO (Sigma) (sembrado en una dilución 1:50 en glicina) y el medio de cultivo. El porcentaje de viabilidad celular se calculó como: % viabilidad celular= promedio D.O. pocillos/promedio D.O. pocillos en medio celular. Los experimentos se realizaron por duplicado con cinco o seis replicas por muestra.

2.8.2 Ensayo de actividad hemolítica

Una alícuota de 10ml de sangre citratada de conejo New Zealand (obtenida en el laboratorio de experimentación animal del Instituto de Higiene) se centrifugó a 2000rpm por 5min, el pellet obtenido fue lavado tres veces con solución salina estéril (0,89%, w/V NaCl) y fue resuspendido para obtener una suspensión al 1% de glóbulos rojos (GR). En placas de 96 pocillos de fondo en U, se colocaron 180µl de la suspensión de GR y 20µl de 1, 0,5, 0,25 y 0,10mg/ml de FCC-S06, HAP-S08 y Alhydrogel, en glicina. Como controles negativo y positivo se incluyeron, solución salina y saponina Quil A (Brenntag, Denmark) en solución salina (250µg/ml), respectivamente. Las placas se incubaron durante 30min a 37^oC y posteriormente fueron centrifugadas (2500rpm, 5min). Se transfirieron alícuotas de los sobrenadantes (150µl) a placas Greiner de 96 pocillos de fondo plano y se cuantificó la hemoglobina libre midiendo la DO a una longitud de onda de 540nm en un lector automático de placas. Se calculó el porcentaje de hemólisis de cada muestra, tomando como 0% y 100% los valores de DO a 540nm de la solución salina y saponina respectivamente. Cada determinación fue realizada por quintuplicado.

2.8.3 Ensayo de toxicidad *in vivo*

La evaluación de la toxicidad de las formulaciones *in vivo* se realizó siguiendo el test de toxicidad anormal para dosis única (ATT) que se detalla en la monografía 2.6.9 de la Farmacopea Europea. El protocolo exige el uso de dos modelos animales (ratones entre 17-22g y cobayos entre 250-350g), los cuales deben ser inyectados intraperitonealmente con una dosis equivalente a la dosis humana. Debido a que la monografía no detalla el tipo de animal a usar, se decidió usar ratones hembras CD1 y cobayos albinos hembras, ambas son cepas exogámicas y libre de patógenos específicos.

Se permitió a los animales aclimatarse en el laboratorio de experimentación animal por un lapso de 10 días previo a la inoculación, y solo se usaron aquellos animales que no evidenciaban ningún signo de anormalidad.

La dosis usada se obtuvo calculando la dosis máxima permitida en humanos para el aluminio (1,25 mg por dosis única humana para vacunas donde el absorbente es el aluminio (Ph Eur 5.0, monografía 2.5.13.)) y el calcio (1,3mg por dosis única humana para vacunas donde el absorbente es el calcio (Ph Eur 5.0, monografía 2.5.14)).

Los ratones CD1 se separaron al azar en 3 grupos (FCC-S06, HAP-S08 y Alhydrogel) de cinco animales. Se inocularon por la vía intraperitoneal 0,5ml de una suspensión conteniendo 3,3mg de FCC-S06 y HAP-S08 en glicina o 3,6 mg de Alhydrogel 2,0% en glicina. Los animales se monitorearon y pesaron diariamente por el período de una semana. Al octavo día los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó una necropsia macroscópica de la zona intraperitoneal.

Los cobayos albinos se separaron al azar en 3 grupos (FCC-S06, HAP-S08 y Alhydrogel) de dos animales. Se inocularon por la vía intraperitoneal 2,5ml de una suspensión conteniendo 3,3mg de FCC-S06 y HAP-S08 en glicina o 3,6 mg de Alhydrogel en glicina. Los animales se monitorearon y pesaron diariamente por el período de una semana. Al octavo día los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con una solución de 15mg/kg de xilacina (Portinco S.A.,

Uruguay) y 120mg/kg de ketamina (PharmaService, Uruguay), para luego sacrificarlos con una dosis letal i.p. de 150mg/kg de tiopental sódico (Crusur Vet., Uruguay) y realizar una necropsia macroscópica de la zona intraperitoneal.

2.9 Evaluación de la actividad inmunoestimulante en ensayos *in vitro*

2.9.1 Activación de NF- κ B y AP-1

Esta determinación se realizó utilizando la línea reportera RAW-Blue (apartado 2.6.1) según las indicaciones del proveedor. Brevemente, se sembraron en placas Greiner de 96 pocillos 180 μ l/pocillo de una suspensión de 5,5x10⁵céls/ml en medio de testeo (medio cultivo pero suplementado con 10% de hiSFB). Luego se agregaron en un volumen de 20 μ l por triplicado, 1,0mg/ml de FCC-S06, HAP-S08 y Alhydrogel, adsorbidas con 50 μ g/ml de STP u OVA en glicina. Como control positivo del experimento las células se estimularon con 20 μ l de una suspensión conteniendo por ml 1x10⁷ de *L. monocitogenes* inactivada por calor (HKLM, *del inglés*, heat-killed *L. monocitogenes*) (Invivogen), y como control basal con 20 μ l de medio de cultivo. Las placas se incubaron en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂ por 24hs. Posteriormente, 50 μ l de cada sobrenadante de cultivo se sembraron por duplicado en una placa Nunc de 96 pocillos. A cada muestra se le añadió 150 μ l del reactivo QUANTI-Blue™ (Invivogen), y se incubaron a 37°C por 3hs. Finalmente, se midió la DO a 638nm en un lector de placas, y los resultados se refirieron relativos al incremento del promedio de los pocillos control (medio de cultivo). Los experimentos se realizaron por duplicado.

2.9.2 Producción de óxido nítrico por macrófagos J774A.1

La producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774A.1 inducida por las formulaciones se determinó utilizando la reacción de Griess^{195,196}. Esta reacción permite cuantificar de forma indirecta el NO en el sobrenadante de cultivo. Es una técnica espectrofotométrica en la que el NO reacciona con el oxígeno originando dos productos estables y no volátiles: nitrito (NO₂-) y nitrato (NO₃-). Durante la reacción, el nitrito en el medio ácido reacciona con la sulfanilamida y forma la sal de diazonio. A continuación, esta sal se une a N-(1-

naftil)-etilendiamina formando un compuesto de color púrpura que presenta un máximo de absorción a 548nm, pudiéndose cuantificar por espectrofotometría.

Para esta determinación, en placas Greiner de 96 pocillos, 200µl de suspensiones de macrófagos J774A.1 de $5,5 \times 10^5$ células/ml de medio de cultivo se incubaron toda la noche en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se extrajo el medio de la placa y se agregó 135µl/pocillo de medio suplementado con 5% de hiSFB y 2,5mM L-arginina (Sigma). Luego se agregaron en un volumen de 15µl por triplicado, 1,0mg/ml de FCC-S06, HAP-S08 y Alhydrogel, adsorbidas con 50µg/ml de STP u OVA en glicina. Como control positivo del experimento las células se estimularon con 50µl de una solución conteniendo 1µg/ml de LPS (Sigma) y 100U/ml de IFN-γ (Sigma). Las placas se incubaron en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂ por 24hs. Luego se centrifugaron (1200rpm, 5min) y una alícuota de 120µl/pocillo de sobrenadante de cultivo se guardó a -80°C para su posterior procesamiento.

Para la cuantificación indirecta de NO en los sobrenadantes de cultivo, 50µl de cada sobrenadante se sembraron por duplicado en una placa Nunc de 96 pocillos. A cada muestra se le añadió un volumen igual de reactivo de Griess (50µl de 1% sulfanilamida (Sigma) en 5% de ácido fosfórico y 50µl de 0,1% N-(1-naftil)-etilendiamidihidrocloruro (ICN)) y se incubó durante 20min a Tamb en oscuridad. La concentración de nitrito se determinó midiendo la DO a 540nm en un lector de placas, refiriendo los resultados de DO a una curva de calibración realizada con nitrito sódico (Sigma) en un rango de concentraciones entre 1,6 y 100µM. Los experimentos se realizaron por duplicado.

2.9.3 Evaluación de la activación de BMDCs y J774A.1 por citometría de flujo

La activación de BMDCs y J774A.1 por las formulaciones se evaluó determinando la inducción de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86 y MHC-II) por CF. Se sembraron 4×10^5 células/ml por pocillo en placas Greiner de 24 pocillos en un volumen de 450µl de medio de cultivo y se incubaron 1h en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se agregaron en un volumen de 50µl por duplicado, las suspensiones FCC-S06, HAP-S08 y Alhydrogel, adsorbidas

con STP u OVA en las mismas concentraciones que en el apartado anterior, y utilizando nuevamente LPS e IFN- γ como control positivo. Las placas se incubaron en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂ por 24hs.

Posteriormente las células se lavaron con PBS, se centrifugaron (1200rpm por 5min), y se resuspendieron en PBS-2%hiSFB-25mMEDTA y se incubaron con Fc-Block (BD Pharmingen) según las recomendaciones del fabricante. Luego las células se lavaron nuevamente con PBS y se dividieron en dos paneles que fueron marcados con anticuerpos monoclonales anti-CD80 conjugado con PE y anti-CD86 conjugado con FITC y el segundo panel con anti-CD40 conjugado con FITC y anti-MHC-II conjugado con PE (BD Biosciences), en oscuridad a 4°C por 30min.

Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II. Para el procesamiento de datos se utilizó el software FACSDiva. Los valores de intensidad media de fluorescencia (*del inglés*, MFI) para cada marcador se calcularon como la razón de los promedios de intensidad de fluorescencia de cada muestra sobre los promedios de las sin marcar. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.9.4 Producción de IL-1 β e IL-12p70 en BMDC y J774A.1

Para determinar los niveles de expresión de IL-1 β e IL-12p70 producida por J774A.1s y BMDCs inducidos por las formulaciones, se sembraron 4x10⁵ células/ml por pocillo en placas Greiner de 48 pocillos en un volumen de 225 μ l de medio de cultivo. Luego en un volumen de 25 μ l por triplicado, se procedió agregando las suspensiones FCC-S06 o HAP-S08 o Alhydrogel solas o adsorbidas con STP en las mismas condiciones que en el apartado 2.9.2. Como control de expresión basal se utilizó 25 μ l de 50 μ g/ml de STP en glicina, como control negativo se agregaron 25 μ l de glicina y como control positivo las células se estimularon con 25 μ l de la solución de LPS e IFN- γ , según apartado 2.9.2. Se incubaron en estufa húmeda por 24hs a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las placas fueron centrifugadas (1200rpm, 5min) y los sobrenadantes se extrajeron y guardaron a -80°C.

Además, para confirmar la necesidad de una primera señal TLR dependiente para la activación del inflamasoma, se realizó el mismo ensayo pre-incubando las BMDCs y BMDC casp 1 y 11-/- con una solución de 10ng/ml de LPS durante 2hs, previo a la estimulación con las formulaciones.

La cuantificación de IL-1 β e IL-12p70 en los sobrenadantes de cultivo se realizó utilizando los kits ELISA MAX™ Deluxe (Biolegend) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.9.5 Evaluación de niveles de ARNm en BMDCs inducidos por las formulaciones

Para determinar los niveles de expresión de ARNm de varias citoquinas y quimioquinas en BMDCs inducidos por las formulaciones, se sembraron 4×10^5 células/ml por pocillo en placas Greiner de 24 pocillos en un volumen de 450 μ l de medio de cultivo suplementado con GMCSF. Seguidamente se procedió a la estimulación con las formulaciones agregando volúmenes de 50 μ l por duplicado, de FCC-S06 o HAP-S08, ambas adsorbidas con 50 μ g/ml de STP en las mismas condiciones previamente mencionadas, 50 μ g/ml de STP en glicina, como grupo control de expresión basal se agregaron 50 μ l de glicina y como control positivo las células se estimularon con 25 μ l de la solución de LPS e IFN- γ , según apartado 2.9.2. Se incubaron en estufa húmeda por 24hs a 37°C y 5% CO₂.

La determinación de los niveles de expresión de ARNm en BMDCs se realizó por PCR cuantitativa (RT-qPCR). Para ello el sobrenadante de cultivo fue descartado y se agregaron 500 μ l/pocillo de Trizol (Life Technologies), y las placas se guardaron a -80°C hasta su procesamiento. Para la extracción de ARN se procedió según las instrucciones del fabricante, utilizando material libre de nucleasas. Se monitoreó la cantidad y calidad del ARN mediante la relación de absorbancia 260/280 en el equipo NanoDrop 2000. Previo a la síntesis del ADN copia (ADNc), 1 μ g de ARN se trató con DNasa I (Thermo Fisher Scientific) por 15 min. La retrotranscripción se realizó con la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Thermo Fisher Scientific) y “random primers” (Thermo Fisher Scientific), utilizando el siguiente ciclado: 10min a 25°C, 50min a 37°C y 15min a 70°C, y se realizaron en el termociclador

programable Palm cycle Corbett. El ADNc se diluyó $\frac{1}{4}$ en agua bidestilada (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20°C . Finalmente, se realizaron las qPCR en el termociclador 7900HT RT-PCR System (Applied Bio-systems, Foster City), utilizando el kit comercial QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) y los cebadores listados en la **Tabla 2.2** a una concentración final $0,9\mu\text{M}$.

Tabla 2.2. Secuencia de cebadores utilizados en la RT-qPCR .

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador anti-sentido (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
B2m	CCTGCAGAGTTAAGCATGCCAG	TGCTTGATCACATGTCTCGATCC	72
Il6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTCATACA	78
Il10	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	101
Il12p35	CAGGCAACTCTGGTTCTTGTGTAGT	ATCACACGGGACCAAACCA	92
proIl18	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	TCTGACATGGCAGCCATTGT	105
Il23	GCCCCGTATCCAGTGTGAAG	CGGATCCTTTGCAAGCAGAA	78
proIl1b	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	152
Tnfa	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	63
Ccl3	AACATCATGAAGGTCTCCAC	CCAAGACTCTCAGGCATTCA	294
Ccl4	GCCCTCTCTCCTCTTGCT	GTCTGCCTCTTTTGGTCAGG	196
Ccl5	GGTACCATGAAGATCTCTGCA	AAACCCTCTATCCTAGTCAT	294
Ccl20	TTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	69
Cxcl10	GCCGTCATTTCTGCCTCAT	GCTTCCCTATGGCCCTCATT	127
Cxcl12	GAAGTGGAGCCATAGTAATGCC	TCCAAGTGGAAAAATACACCG	133
Nlrp3	TCCACAATTCTGACCCACAA	ACCTCACAGAGGGTCACCAC	294
proCasp1	CGCCCTGTTGAAAGGAACT	CCCTCAGGATCTTGTGAGCC	92

El ciclado utilizado fue: 15min a 95°C , 40 ciclos de 15seg a 95°C y 1min a 60°C , con una curva de desnaturalización al final del mismo. Los niveles de expresión de los genes de interés fueron normalizados usando el gen β -2 microglobulina (β 2m).

Una vez finalizada la reacción, se determinó el valor de Ct para cada muestra, y los niveles de ARNm se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ¹⁹⁷ ,

donde $\Delta Ct = Ct_{gen \text{ de interés}} - Ct_{\beta 2m}$, y se expresaron como incrementos relativos al promedio de los niveles de ARNm de BMDCs de los pocillos control con glicina.

2.9.6 Fagocitosis y procesamiento antigénico

La evaluación de la fagocitosis y del procesamiento del antígeno internalizado se realizó utilizando DQ-OVA (Life Technologies) en dos tipos de células presentadoras de antígeno, macrófagos J77A.1 (apartado 2.6.2) y BMDCs (apartado 2.6.4). El antígeno DQ-OVA, es un ligando del receptor de manosa, consiste en OVA naturalmente glicosilada (con residuos de manosa) y se encuentra altamente conjugado con un fluoróforo BODIPY "*self-quenched*". Al entrar en la vía fagocítica, este fluoróforo emitirá una señal en el canal verde (FITC) luego de que la proteína sea degradada en condiciones ácidas por enzimas lisosomales.

Además, cuando los fragmentos de la proteólisis se acumulan en grandes cantidades en los compartimientos endosomales, este fluoróforo forma excímeros que exhiben fluorescencia en el rojo (PE)^{198,199}.

Para esta evaluación, se sembraron 2×10^5 células/ml por pocillo en placas Greiner de 24 pocillos en un volumen de 450 μ l de medio de cultivo y se incubaron 1h en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. Luego, se agregaron en un volumen de 50 μ l por duplicado, 1,0mg/ml de la FCC-S06 con 50 μ g/ml de DQ-OVA en glicina y como grupo control se agregaron 50 μ l de una solución de 50 μ g/ml de DQ-OVA en glicina.

Posteriormente, las placas se incubaron en 3 condiciones, 15min a 37°C y 5% CO₂ para evaluar internalización y procesamiento temprano, 24hs en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂ para evaluar internalización y procesamiento tardío y como control de endocitosis basal o pasiva y de interacción no específica de la proteína marcada con las células, se incubó una placa a 4°C por 24hs. Luego de la incubación los pocillos fueron lavados con PBS frío para eliminar la DQ-OVA que no fue fagocitada. La fagocitosis y el procesamiento de DQ-OVA se

evidenciaron por CF en los canales previamente mencionados. (Ídem apartado 2.9.3)

2.9.7 Evaluación de la presentación antigénica *in vitro*

Para evaluar la capacidad de la formulación FCC-S06+STP de estimular la presentación antigénica, se sacrificaron por dislocación cervical 6 ratones C57BL6/J vacunados con dicha formulación según el protocolo de inmunización detallado en el apartado 2.10.2, se extrajeron los bazos en forma estéril y se disgregaron de forma mecánica. Se lisaron los GR de la suspensión celular obtenida con 1,5ml de buffer de lisis ACK (NH₄Cl 1,5M (Sigma), KHCO₃ 0,1M (Sigma), 0,5M EDTA (Sigma), pH 7,4), incubando por 3min a Tamb. Posteriormente, la suspensión fue lavada con PBS-5%SFB frío y centrifugada (1500rpm, 5min). El pellet celular se resuspendió en medio completo (RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 1mM glutamina, 1mM piruvato, 50μM β-Mercaptoetanol y Penicilina/Streptomocina) y la viabilidad y cantidad se determinó por microscopía con el colorante azul de tripán en una cámara Neubauer.

Los esplenocitos obtenidos fueron marcados con 3μM de 5(6)-Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE, Sigma-Aldrich) incubando a 37°C y 5% CO₂ por 10min. Luego de lavar el exceso de CFSE, se dispensaron 500μl/pocillo de 2x10⁶ céls/ml en placa de 24 pocillos con las siguientes condiciones: en una relación 10:1 (esplenocito:BMDC), 500μl de BMDCs pre-estimuladas por 24hs con FCC-S06+STP, 500μl de BMDCs pre-estimuladas con STP y 500μl de BMDCs sin estimular incubadas con medio todas ellas según condiciones apartado 2.9.3, 500μl de una solución de 5μg/ml de Concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich) como control de estimulación y 500μl de medio de cultivo como control sin estimular. La placa se incubó por 96hs en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

Luego de la incubación las células fueron lavadas con PBS y marcadas para linfocitos TCD8⁺ con el anticuerpo anti-CD8 conjugado a PE (Biolengend) por 30min a 4°C y previamente a la adquisición de los datos, con 7-AAD según indicación del fabricante (Biolengend) en oscuridad a Tamb por 10min. La

adquisición de datos se realizó en el citómetro FACS Canto II y para el procesamiento de los mismos se utilizaron los software FACSDiva, y ModFit (Verity Software House, Inc.) según describe Lui *et al.*²⁰⁰. El análisis se realizó sobre la población de esplenocitos viables utilizando el *dot plot* SSC-A vs 7-AAD.

2.10 Evaluación de la actividad inmunoestimulante en ensayos *in vivo*

2.10.1 Evaluación del reclutamiento celular en el peritoneo por citometría de flujo

Para evaluar el reclutamiento celular inducido por la administración intraperitoneal de las suspensiones, ratones hembras C57BL/6J se dividieron al azar en dos grupos (n=5) y se inocularon 200µl conteniendo 500µg de FCC-S06 o Alhydrogel en glicina, y un grupo control (n=3), inoculado i.p. con 200µl de glicina.

A las 24hs, luego de la dislocación cervical, se expuso el peritoneo de los animales el cual se lavó con 500µl de PBS-EDTA frío. Las suspensiones celulares obtenidas se incubaron con Fc-block (BD Pharmingen) según indicación del fabricante y posteriormente se dividieron en tres tubos para su marcado con tres paneles de anticuerpos que se detallan a continuación.

El panel 1 fue marcado con anti: F4/80-APC, CD206-FITC, CD80-PE, y MHC-II-PE-Cy7. El panel 2 con anti: CD3-PerCP-Cy5, CD19-APC, CD49b-FITC. El panel 3 con anti: CD11c-APC, CD11b-APC-Cy7, MHC-II-PE-Cy7. Las distintas poblaciones celulares se evidenciaron posteriormente por CF como se mencionó anteriormente y el procesamiento de los datos se realizó en el software FACSDiva.

2.10.2 Protocolo inmunización

Ratones hembras C57BL/6J de entre 7 a 9 semanas de edad, fueron divididos al azar en 3 grupos de 6 animales y recibieron tres inmunizaciones por vía s.c., la primera en el día 0 y los *boosters* en los días 14 y 28. Los animales fueron inmunizados con 100µl de la formulación FCC-S06+STP, conteniendo 200µg de FCC-S06 y 50µg de STP en glicina o con 100µl de una solución conteniendo 50µg de STP en glicina. El grupo control no fue inmunizado.

En el día 40 se realizó la extracción de sangre por punción intracardiaca luego de que los animales fueran anestesiados con una solución de 15mg/kg de xilacina y 120mg/kg de ketamina. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5000rpm por 10min y el suero obtenido se guardó a -20°C hasta su procesamiento.

2.10.3 Evaluación de respuesta de hipersensibilidad retardada – DTH

Ratones hembras C57BL/6J de entre 7 a 9 semanas de edad, fueron divididos al azar en 3 grupos de 3 animales y recibieron dos inmunizaciones por vía s.c., la primera en el día 1 y un *booster* en el día 14. Los animales fueron inmunizados con 100µl de la formulación FCC-S06+STP, conteniendo 200µg de FCC-S06 y 50µg de STP o con 100µl de una solución conteniendo 50µg de STP. El grupo control fue inmunizado con 100µl de glicina.

En el día 28, los ratones inmunizados con la formulación o el antígeno, fueron inoculados por vía i.d. en la almohadilla plantar posterior derecha con 10µl de una solución conteniendo 5µg de STP en glicina. Luego, utilizando un calibre se midió la hinchazón del plantar a las 24hs y 48hs. El grupo control fue inoculado i.d. con 10µl de glicina y la inflamación obtenida fue considerada como control del procedimiento de punción (hinchazón basal). La respuesta de DTH de cada animal contra STP se consideró como la hinchazón de la almohadilla plantar posterior menos la media de la hinchazón basal obtenida.

2.10.4 Evaluación respuesta específica de memoria

Para evaluar la respuesta específica de memoria se utilizaron animales inmunizados según el protocolo de inmunización detallado en el apartado 2.10.2. Los 6 animales de los 3 grupos (inmunizados con la formulación FCC-S06-STP, el antígeno o el grupo naïve), fueron sacrificados por dislocación cervical en el día 40 y se extrajeron los bazo en condiciones asépticas.

Posteriormente, se procedió de la misma manera que en el apartado 2.9.7 para la obtención de cada suspensión de esplenocitos marcados con CFSE y suspensiones de 2×10^6 céls/ml se dispensaron en un volumen de 500µl/pocillo en placas de 24 pocillos. Se utilizaron las siguientes condiciones de estimulación:

en una relación 10:1 (esplenocito:BMDC), 500µl de BMDCs pre-estimuladas por 24hs con FCC-S06+STP (según condiciones apartado 2.9.3) y 500µl de BMDCs sin estimular incubadas con medio y 500µl de una solución de 5µg/ml de ConA (Sigma-Aldrich) como control de estimulación y 500µl de medio de cultivo como control sin estimular. La placa se incubó por 96hs en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

Luego de la incubación las células fueron tratadas de la misma forma que en el apartado 2.9.7 y la misma forma de adquisición de datos por CF que dicho apartado.

2.10.5 Detección de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos estimulados mediante ELISA

Se evaluó la producción de IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-17A, e IFN-γ en sobrenadantes de esplenocitos estimulados según en el apartado 2.10.4 por ELISA. La cuantificación de IL-12p70 se realizó utilizando el kit ELISA MAX™ Deluxe (Biolegend), la de IL-10 con el kit OptiEIA (BD Bioscience) y la de IL-17A utilizando el kit ELISA Ready set go (BD Bioscience) siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

La cuantificación de IL-4 e IFN-γ se realizó utilizando el par de anticuerpos de captura y detección respectivos (BD Pharmigen) y estándares (BD Bioscience) como se detalla a continuación. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Nunc) con 50µl/pocillo de una solución de anticuerpo de captura (8µg/ml) en buffer carbonato-bicarbonato 0,2M, pH 9,4 (Sigma) y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de lavadas con PBS-0,05%Tween 20 (Sigma) (PBST), las placas fueron bloqueadas con 100µl/pocillo de PBS-7%hiSFB por 2hs a Tamb. A continuación las placas se lavaron con PBST, se sembraron 50µl de sobrenadante de cultivo por duplicado y diluciones en PBST-7%hiSFB de los estándares por duplicado para la confección de una curva de titulación comenzando en la dilución 40ng/ml y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego del lavado con PBST, se agregaron 50µl/pocillo de una solución de anticuerpo de detección biotinilado (8µg/ml) en PBS-5%hiSFB y las placas se incubaron por 2hs a 37°C. Luego, se realizó otro lavado y se agregó

50µl/pocillo de una dilución 1:2000 de Extravidina-PO (Sigma) en PBS-5%hiSFB y se incubaron las placas por 1h a 37°C. A continuación, las placas se lavaron y se agregó 50µl/pocillo del sustrato TMB líquido (Sigma). Finalmente a los 15min se frenó la reacción agregando 25µl/pocillo de H₂SO₄ 2,0 N. Se midió la DO a 450 nm y 570nm como referencia, utilizando un lector automático de placas.

2.10.6 Estudio de la respuesta humoral por ELISA

Para la titulación de IgG totales anti-STP en los sueros murinos extraídos según apartado 2.10.2, se realizó un ensayo de ELISA. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Nunc) con 100 µl/pocillo de una solución de STP (3µg/ml) en buffer carbonato-bicarbonato 0,2M, pH 9,4 y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las placas fueron luego bloqueadas con 200µl/pocillo de PBS-1%BSA (Sigma) por 2hs a 37°C. Luego de lavadas con PBST, se sembraron 100µl de diluciones 1:1000 en PBST-1%BSA de los sueros de cada ratón por duplicado y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego del lavado con PBST, se agregaron en cada pocillo 100µl de una dilución 1:1000 en PBST del conjugado a peroxidasa anti-IgG de ratón hecho en cabra (Sigma), las placas se incubaron por 1h a 37°C. Finalmente, se realizó otro lavado y se agregó 100µl/pocillo de solución de sustrato TMB. A los 20min se frenó la reacción agregando 50µl/pocillo de H₂SO₄ 2,0 N. Se midió la DO a 450 nm y 570nm como referencia utilizando un lector automático de placas.

2.11 Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza, *one-way* ANOVA, para comparar la mayoría de las variables evaluadas. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas con un 95% de intervalo de confianza. Para hacer comparaciones múltiples entre los grupos evaluados, posteriormente se utilizó el test de Tukey.

Los resultados de RT-qPCR se compararon utilizando el “Test de Student” (t test, no pareado).

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad 7.0. Los resultados estadísticamente significativos se señalan con el valor de p e indican

la ocurrencia de un valor de probabilidad p inferior a 0,05 ($p < 0,05$) o igual al valor de p , lo cual señala que la probabilidad de que el resultado haya sido producto del azar es inferior a 0,05 o inferior al valor de p , respectivamente.

Capítulo III:

**Caracterización fisicoquímica
y obtención de una
formulación con un antígeno
modelo**

3 Resultados y discusión de la caracterización fisicoquímica y obtención de la formulación con un antígeno modelo

3.1 Objetivo específico

Realizar una caracterización morfológica y de composición química de las suspensiones suministradas por la empresa. Al mismo tiempo, búsqueda de condiciones de resuspensión para la obtención de una formulación, que se definirá para la presente tesis como una suspensión de las partículas + el buffer de resuspensión + la proteína (antígeno), con el fin de evaluar su potencial como adyuvante de inmunización.

3.2 Caracterización fisicoquímica

Las suspensiones madre FCC-S06 y HAP-S08 fueron suministradas por la empresa en forma de slurry concentrado, ambas de color blanco papel. En la **tabla 3.1** se resumen los resultados del diámetro promedio (dm), de la superficie específica (*del inglés, SSA*) por el método B.E.T informados por la empresa y del porcentaje de sólido seco calculado de las suspensiones proporcionadas.

Tabla 3.1 Características fisicoquímicas de las suspensiones madre

	dm* (μm)	% Sólido seco (w/v)	SSA** m^2/g sólido seco
FCC-S06	2,4	17	79.3
HAP-S08	0,5	19	84.3

*dm: diámetro promedio; **SSA: superficie específica

De estos resultados cabe resaltar que, por gramo de sólido seco, la SSA de FCC-S06 es similar a la de HAP-S08, a pesar de tener un dm casi 5 veces mayor en las condiciones medidas por la empresa.

3.2.1 Microscopías de barrido

En la **figura 3.1** se muestran las microscopías electrónicas de barrido de las suspensiones madre, donde se muestra la existencia de diferencias morfológicas entre ambas. Las partículas de FCC-S06 presentan una morfología esferoide con

estructuras en forma de placas laminares que sobresalen de la superficie, formando poros intrapartículas.

Se observa también, que las partículas de HAP-S08 tienen una morfología amorfa con una gran compactación luego del secado.

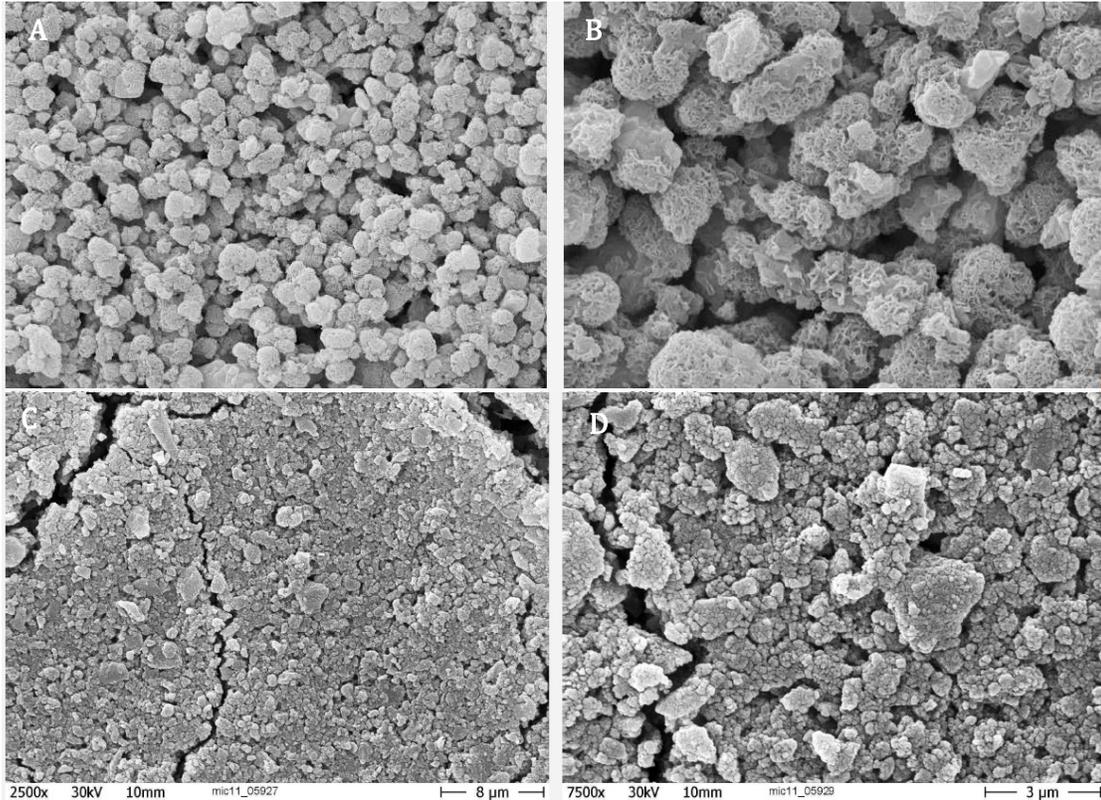


Figura 3.1: Microscopías electrónicas de barrido: (A) 2500X y (B) 7500X para la suspensión madre FCC-S06; (C) 2500X y (D) 7500X para para la suspensión madre HAP-S08.

3.2.2 Porosimetría

Los resultados de porosimetría de mercurio se muestran en la **figura 3.2**, ensayo llevado a cabo con las muestras madres secadas y compactadas en forma de pastilla. Estos resultados continúan confirmando la existencia de diferencias entre ambas suspensiones. Como se puede observar en el gráfico, FCC-S06 tiene una distribución de tamaño de poro bimodal, con un primer pico de mayor volumen cercano a 1 micra, correspondiente con poros interpartículas y otro pico de menor volumen que evidencia la presencia de poros intrapartículas cercanos a los 10nm, corroborando lo observado en las microscopías de barrido

y el alto valor de SSA. En cambio, HAP-S08 tiene una distribución de tamaño de poro monomodal, con un pico a 60nm que se corresponde con poros interpartículas, lo que demuestra la importante compactación obtenida con esta muestra.

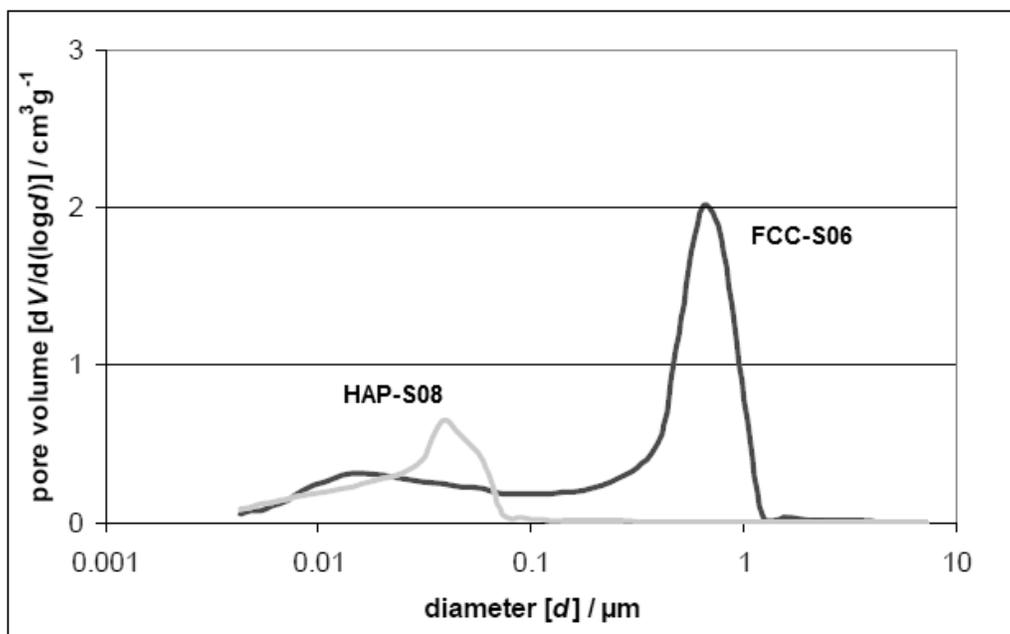


Figura 3.2: Distribución de tamaño de poro por porosimetría de Hg de las suspensiones madre FCC-S06 y HAP-S08 compactadas en forma de pastilla.

3.2.3 Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X obtenidos para las suspensiones madre FCC-S06 y HAP-S08, se muestran en la **figura 3.3**. Se confirman las diferencias que existen entre ambas suspensiones, FCC-S06 es notoriamente más cristalina que HAP-S08. Esto se infiere por los picos definidos y de mayor intensidad en el patrón de rayos X obtenido para FCC-S06. Además se observó que ésta presenta un patrón bifásico, tiene una fase cristalina y otra, posiblemente similar a la muestra HAP-S08, que coexiste en menor proporción, lo que se refleja por el solapamiento de algunos picos de ambas muestras.

Lo anterior es consistente con el diseño de síntesis, el cual buscó exponer en la superficie de FCC-S06 una sal similar a HAP.

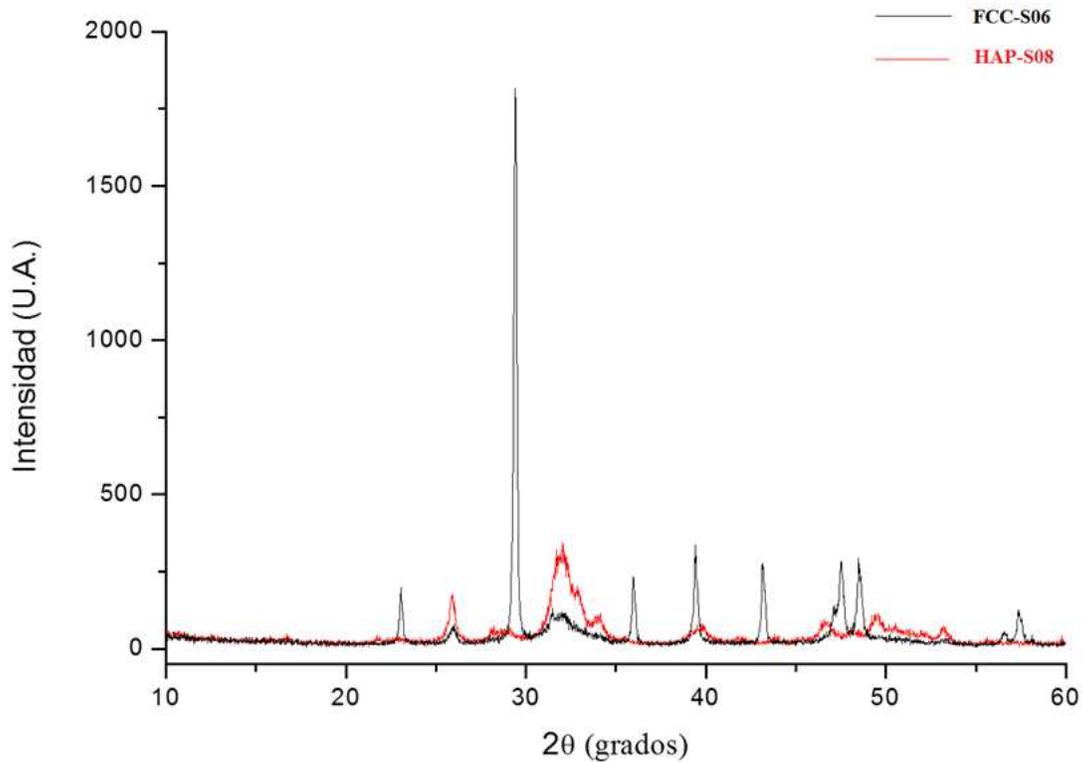


Figura 3.3: Patrón de difracción de rayos X de las suspensiones madre FCC-S06 y HAP-S08.

Asimismo, se realizó una comparación de estos patrones con diagramas de difracción compilados en las bases de datos disponibles como se observa en la **figura 3.4** para FCC-S06 y la **figura 3.5** para HAP-S08. Del análisis realizado para el patrón de rayos X de FCC-S06, se observa en la **figura 3.4** que la fase mayoritaria es consistente con el patrón de la calcita o carbonato de calcio por la posición y las intensidades de los picos (marcados por las flechas verdes). En cambio, la fase minoritaria de dicho patrón no pudo ser ajustada a ningún patrón de la base de datos.

Del ajuste con estos patrones se puede evidenciar que algunos picos, señalados por las flechas verdes, en el patrón de HAP-S08 de la **figura 3.5**, pueden ser ajustados al patrón correspondiente a la hidroxiapatita, pero no es suficiente para confirmar que dicha suspensión esté formada por esta sal.

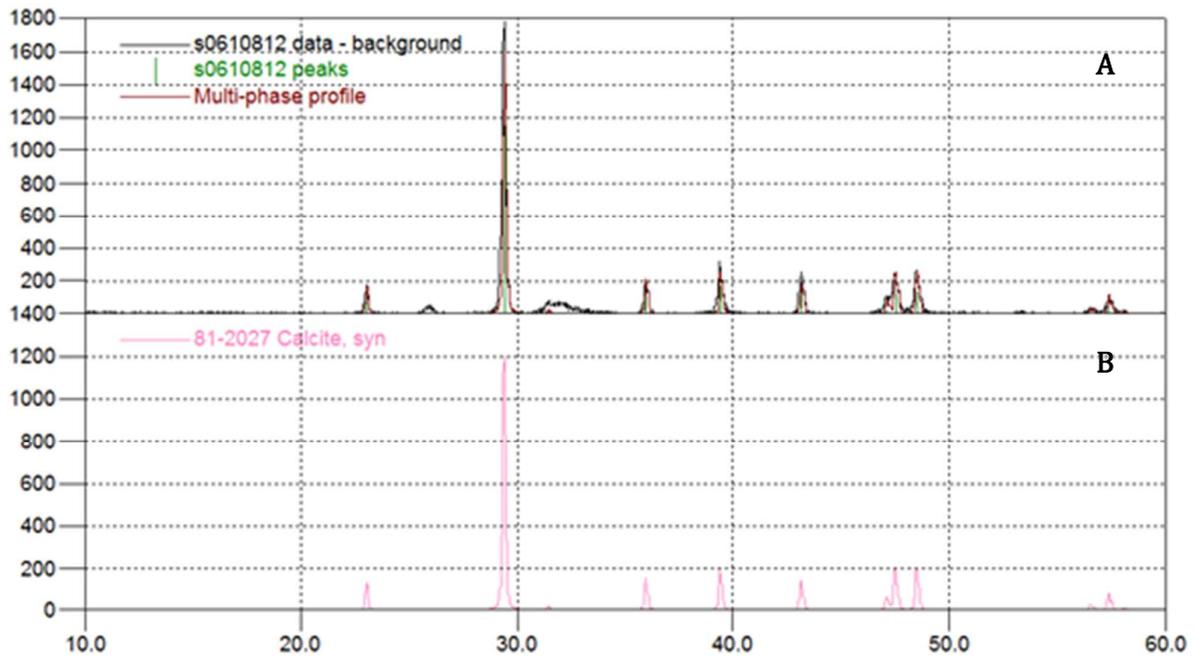


Figura 3.4: Comparación de los patrones de difracción de rayos X (A) obtenidos para la suspensión madre FCC-S06 (B) patrón estándar de calcita (carbonato de calcio). Se identifican en verde los picos de ajuste.

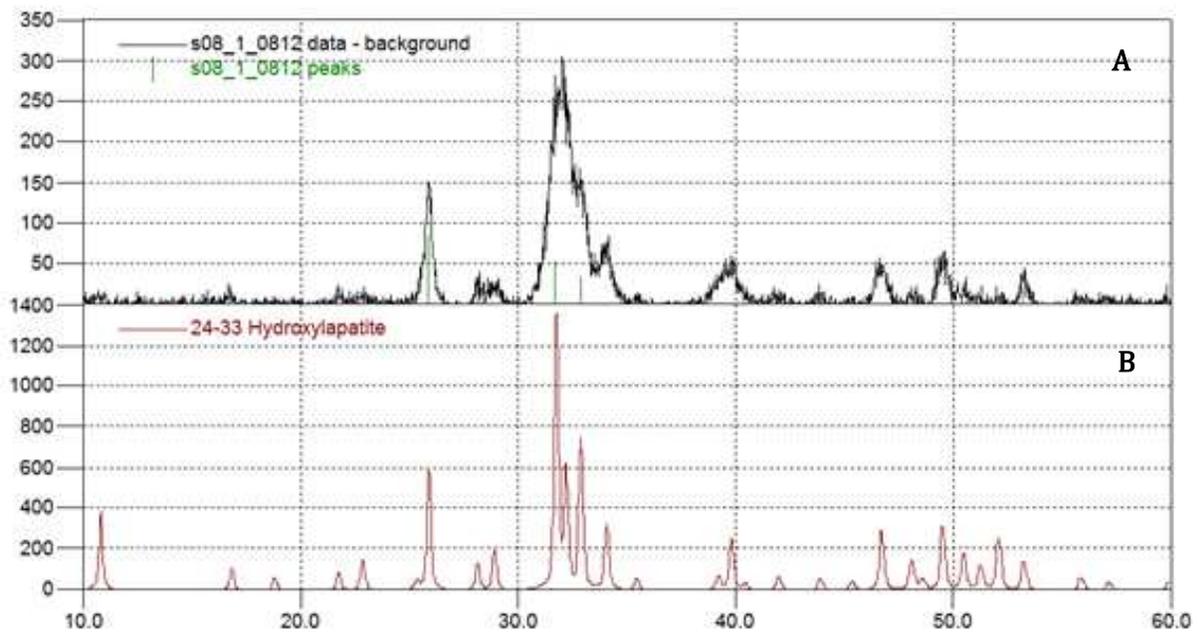


Figura 3.5: Comparación de los patrones de difracción de rayos X (A) obtenidos para la suspensión madre HAP-S08 (B) patrón estándar de hidroxiapatita. Se identifican en verde los picos de ajuste.

3.2.4 Espectroscopia RAMAN confocal

Con el fin de obtener más información acerca de la composición química de las suspensiones, se decidió realizar una espectroscopia RAMAN. En la **figura 3.6** se muestra la imagen confocal de dicha espectroscopia de la superficie de las partículas de ambas suspensiones madre y en la **figura 3.7**, el espectro RAMAN de las diferentes zonas de la imagen confocal. En la imagen confocal de la superficie de FCC-S06 se observan “parches” con una distribución heterogénea de dos fases claramente definidas. De los espectros realizados en cada zona, se demuestra que la de color azul es donde se encuentra resaltada la presencia del modo de estiramiento simétrico del carbonato de calcio y en amarillo-naranja se encuentra resaltada la presencia del modo de estiramiento simétrico del fosfato de calcio. También, se evidencia que HAP-S08 tiene una superficie homogénea, con una única fase, donde se encuentra resaltada la presencia del modo de estiramiento simétrico del fosfato de calcio.

En suma, de la caracterización realizada se puede sugerir que ambas suspensiones son morfológica y químicamente diferentes. La suspensión FCC-S06 está compuesta por micropartículas esferoides porosas que presentan dos fases: una donde se mantiene el *core* de carbonato de calcio y otra de la familia de los fosfatos de calcio. En cambio la suspensión HAP-S08 está compuesta por partículas amorfas de una sal integrante de la familia del fosfato de calcio, como puede ser la hidroxiapatita. En este caso se puede concluir que durante el proceso de síntesis se produjo una conversión total de la calcita.

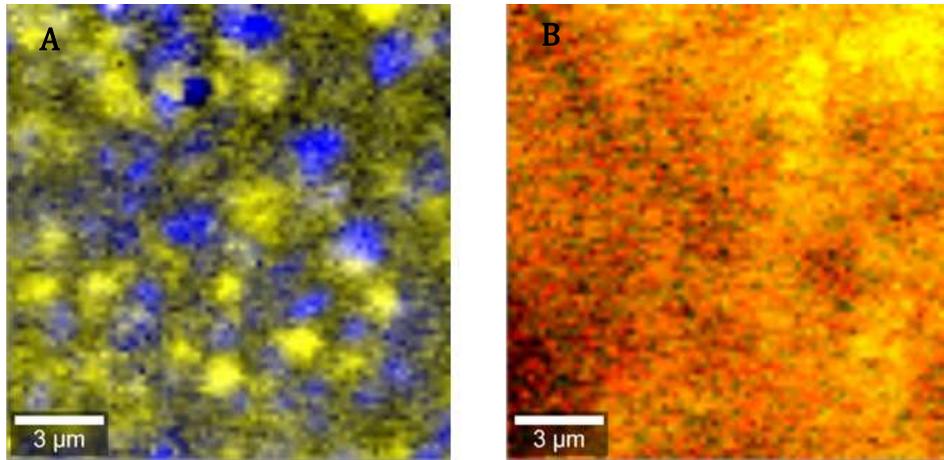


Figura 3.6: Imagen confocal por espectroscopia RAMAN de (A) FCC-S06 y (B) HAP-S08. En azul se encuentra resaltada la presencia del modo de estiramiento simétrico del carbonato de calcio (CaCO_3) y en amarillo-naranja se encuentra resaltada la presencia del modo de estiramiento simétrico del fosfato de calcio (Ca_3PO_4).

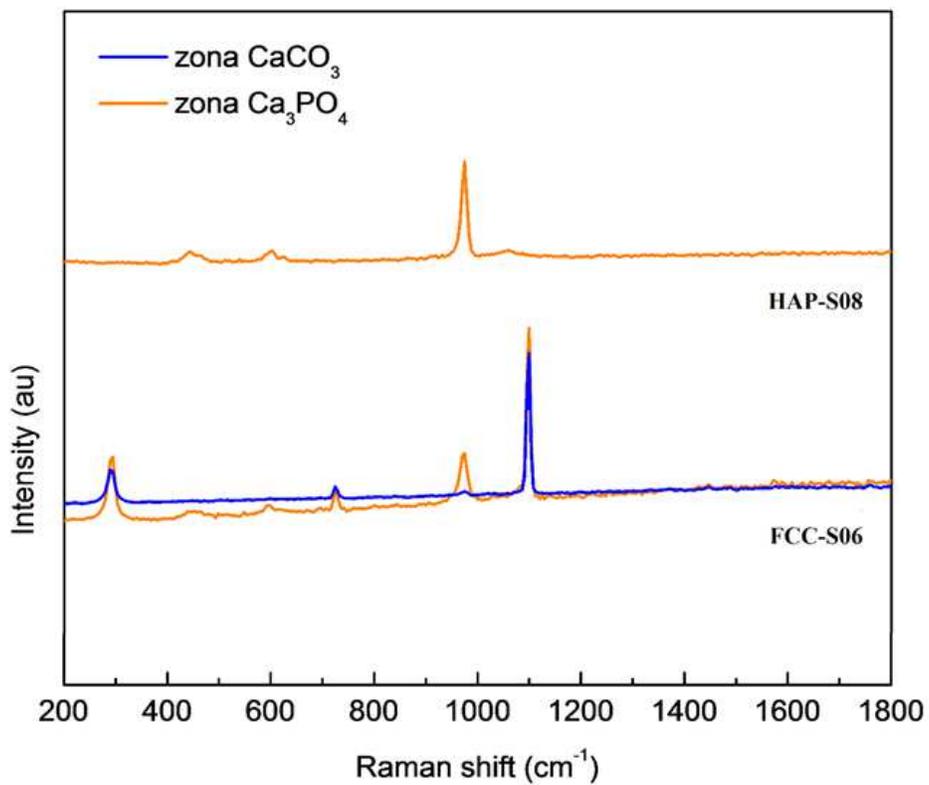


Figura 3.7: Espectro RAMAN de las zonas azul y amarillo-naranja de la imagen confocal de las suspensiones madre FCC-S06 y HAP-S08 (figura 3.6).

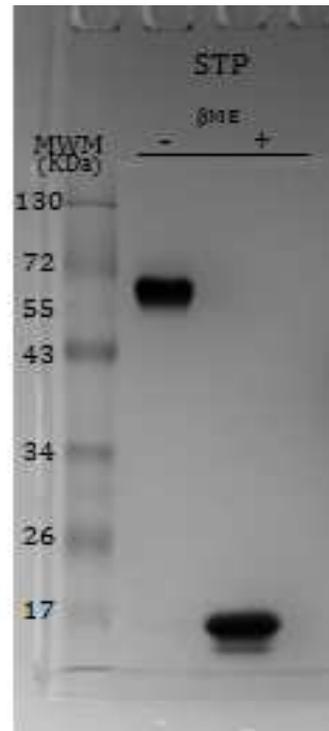
3.3 Caracterización del antígeno recombinante

En el comienzo este trabajo se utilizó como antígeno modelo la proteína ovoalbúmina (OVA) comercial de mayor pureza, proteína de 45KDa glicosilada, con un contenido heterogéneo de fosfatos, ya que dicha fosforilación varía de 0 a 2 mol PO_4 /mol OVA⁷².

Posteriormente por razones que se expondrán en el capítulo V, también fue usada como antígeno, estreptavidina recombinante (STP), producida y purificada según materiales y métodos (apartado 2.3.1). STP es una proteína tetramérica de ~60KDa, primeramente identificada en el medio de cultivo de *Streptomyces avidinii*. Es una proteína de unión a biotina lo que facilita su purificación por afinidad¹⁹².

Con el objetivo de verificar la síntesis y purificación de STP, se realizó un SDS-PAGE y un espectro MALDI-TOF. En el gel de la **figura 3.8**, se observa una banda de ~65KDa, concordante con el peso molecular esperado para STP nativa y no se observan otros subproductos proteicos de la purificación. También, en condiciones reducidas, se observa una banda de ~16KDa, correspondiente al peso molecular de los monómeros.

Figura 3.8: Análisis electroforético (SDS-PAGE) de STP recombinante, luego de la purificación, en condiciones nativas y reducidas. (β ME: β -mercaptoetanol).



En la **figura 3.9** se muestran los espectros de masa por MALDI-TOF (*del inglés*, matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight) de STP recombinante, donde se confirma la pureza de la solución proteica obtenida.

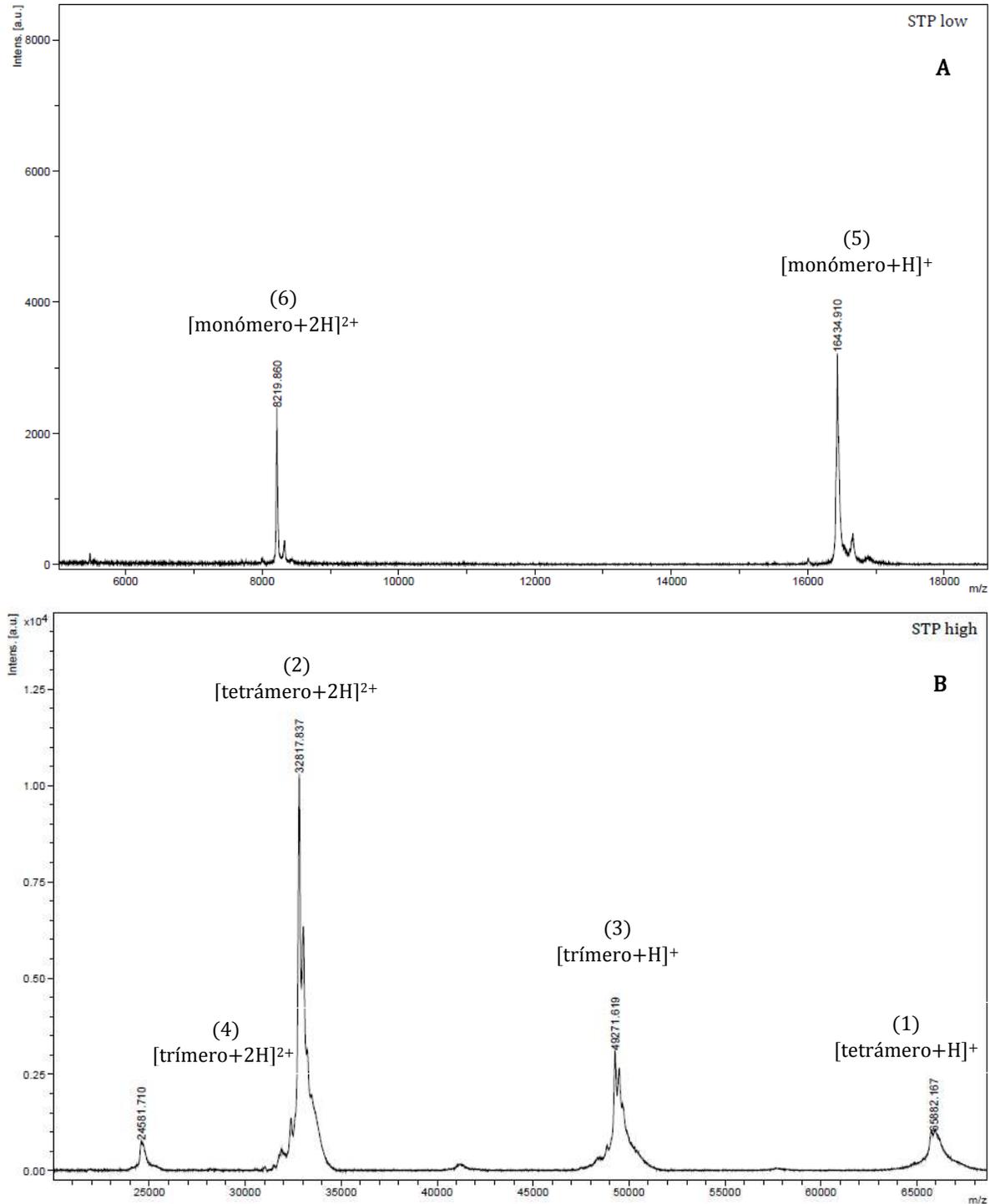


Figura 3.9: Espectro de masa por MALDI-TOF de STP recombinante (A) espectro en el rango de bajo peso molecular (B) espectro en el rango de alto peso molecular.

En el espectro (B) de la **figura 3.9**, se observa una señal m/z correspondiente a la molécula de la proteína intacta ([tetramero+H]⁺ (pico 1)), con una masa molecular de ~65KDa y un pico de mayor intensidad, de la especie [tetramero+2H]²⁺ (pico 2), implicando que casi toda la proteína se ionizó con doble carga. Lo mismo se observó para el trímero (picos 3 y 4). También, para el monómero (picos 5 y 6) en el espectro (A) de la **figura 3.9**.

3.3.1 Estimación de los niveles de LPS de las soluciones antigénicas

Con el fin de estimar los niveles de LPS en las soluciones antigénicas, se utilizó el Kit de detección de LPS con la línea celular reportera HEK-Blue como ya ha sido reportado por Temme *et al*²⁰¹. En el gráfico de la **figura 3.10** se muestran las DO obtenidas luego de estimular la línea celular por 16hs con las soluciones antigénicas en glicina. No se observan diferencias entre el agua apirógena y la solución de OVA así como tampoco se observan diferencias entre la solución de STP y el medio de cultivo.

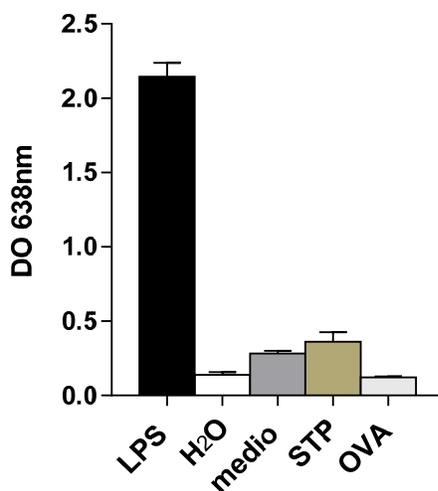


Figura 3.10: Detección de niveles de LPS de las soluciones antigénicas. Se sembraron 5µg/ml de OVA o STP en glicina en cada pocillo conteniendo las células HEK-Blue mTLR4. Como controles negativos se utilizó medio de cultivo y H₂O apirógena, y como control positivo 1,25ng/ml de LPS. Los datos corresponden a la media ±DS (n=3) de dos experimentos independientes. ANOVA, post test Tukey, $p < 0,05$.

3.4 Obtención de una formulación con el antígeno “modelo” OVA

El objetivo planteado en esta etapa fue encontrar una condición de resuspensión que permita diseñar una formulación vacunal con un antígeno modelo (OVA).

Los estudios de resuspensión comenzaron con la búsqueda de condiciones de estabilidad (evitando agregación y/o sedimentación u obteniendo una rápida redispersión luego de la sedimentación), bajo la premisa de reproducir los ensayos de estabilidad y de adsorción de proteínas encontrados en la bibliografía utilizando el adyuvante de referencia Alhydrogel.

Se evaluaron 25 condiciones al 0,2% w/V, variando la especie química del buffer, su concentración, pH y fuerza iónica, evaluando agregación macroscópica y/o sedimentación y determinando el dm de la suspensión resultante a diferentes tiempos posterior a la resuspensión. Las condiciones evaluadas se enumeran a continuación:

- H₂O ultrapura
- PBS
- Fosfato de Na 10mM y 100mM, pH 6 (Sorensen)
- Fosfato de Na 10mM y 100mM, pH 7.4 (Sorensen)
- Carbonato de Na 10mM y 100mM, pH 9
- Succinato de Na 10mM, pH 5,5
- Acetato de Na 10mM, 20mM, 30mM y 100mM, pH 4
- Citrato de Na 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 30mM y 100mM, pH 5,5
- NaCl 62.5 mM, 125mM, 250mM y 500mM
- CaCl₂ 2mM y 10mM

3.4.1 Resuspensión de la suspensión FCC-S06

En las 25 condiciones ensayadas se observó sedimentación inmediata o casi inmediata (dentro de los 5min posteriores a la resuspensión) y también agregación macroscópica, ya que la homogenización posterior a la

sedimentación no re-dispersaba la suspensión en su totalidad. Los dm de las resuspensiones en ningún caso fueron inferiores a $5\mu\text{m}$ a excepción de la resuspensión en citrato y acetato de sodio. Con estos últimos se confirmó que el aumento en la concentración de dichos buffers disuelve las partículas de FCC-S06 obteniéndose un dm cercano a $0,5\mu\text{m}$ en citrato pH 5,5, 100mM y un dm de $1,7\mu\text{m}$ en acetato pH 5,5, 100mM. Los resultados demostraron que la resuspensión en agua ultrapura, buffers a base de fosfato (PBS, Sorensens 10-100mM, pH 6 y pH 7,4), carbonato (10-100mM, pH 9) y succinato (10mM, pH 5,5) no estabilizan la FCC-S06, debido a que se observa sedimentación y agregación macroscópica. Además, el aumento de la fuerza iónica con el agregado de NaCl o CaCl_2 tuvo un efecto similar. Asimismo, el pH de la fase líquida es diferente al del buffer de resuspensión, y al medido luego de 24hs de la resuspensión por lo que se puede inferir que podría continuar cambiando con el tiempo.

De lo anterior se puede deducir que en ninguna condición de resuspensión el dm es similar al informado por la empresa y que en las condiciones ensayadas la resuspensión de FCC-S06 no es estable. Cabe aclarar que, el dm informado por la empresa se determinó por difracción laser en un Malvern Mastersizer 2000S, el cual posee una unidad de dispersión previo a la medición y es específico para micropartículas. En cambio el equipo utilizado en esta evaluación (Malvern Nanosizer ZS) no posee dicha unidad y realiza la medida de dm por dispersión dinámica de luz.

Varios factores contribuyen a la estabilidad de la fase dispersa en una suspensión, que pueden ser termodinámicos o cinéticos en origen. Los primeros incluyen la estabilización electrostática y estérica, inducida a través de la repulsión entre partículas, mientras que la estabilidad cinética puede ser promovida aumentando la viscosidad de la fase líquida, retrasando y limitando la agregación y sedimentación de las partículas²⁰².

Las partículas esferoides de $1\mu\text{m}$ de diámetro o superior tienden a sedimentar por efectos de la gravedad, salvo que la densidad de la partícula sea similar a la de la fase líquida o esta fase sea muy viscosa, mientras que las

partículas con diámetros inferiores se mantienen dispersas gracias al movimiento browniano²⁰³. Para evitar la sedimentación, la siguiente relación entre las fuerzas gravitacionales (numerador) y las fuerzas brownianas (denominador) debe ser inferior a la unidad^{202,203}:

$$\frac{r^4 \cdot \Delta\rho \cdot g}{k_B \cdot T}$$

Siendo: **r** – radio de la partícula (m)

$\Delta\rho$ – diferencia de densidad entre las partículas y la fase líquida (Kg/m³)

g – aceleración de la gravedad (m²/s)

k_B – constante de Boltzmann (1,3807x10⁻²³ Kg.m².s⁻²/K)

T – temperatura (K)

Para la suspensión FCC-S06, esta relación da un valor estimado cercano a 10, utilizando el valor de dm informado por la empresa (r=1,2µm), la densidad del agua (1000kg/m³), la densidad del carbonato de calcio (2930kg/m³) (CAS 1317-65-3 o 471-34-1) y a temperatura ambiente (298K).

Por lo que resulta evidente que en la suspensión FCC-S06, las fuerzas gravitacionales dominan considerablemente y se concluye que el enfoque utilizado buscando condiciones de estabilidad mediante estabilización electrostática, como se mencionó anteriormente, no es el adecuado. Teniendo esto presente, hubiese sido recomendable aumentar la viscosidad de la fase líquida o gelificarla utilizando aditivos adecuados²⁰² o disminuir el diámetro durante la síntesis de la FCC-S06.

Dado los hallazgos encontrados durante la resuspensión que evidencian un sistema inestable en las condiciones evaluadas, se decidió probar condiciones de resuspensión que sean “*protein friendly*”, biocompatibles y que se utilizan para estabilizar proteínas o evitar su agregación, como buffers de glicina^{204,205} o HEPES, determinando además si hay adsorción de la proteína modelo, OVA.

Como se muestra en la **tabla 3.2**, de la resuspensión al 0,2%w/V de FCC-S06 en una solución 0,5mg/ml de OVA en HEPES 10mM, pH 7,0, se obtiene un dm de 3,9µm y 0,06mg de OVA adsorbida por mg de FCC-S06. En esta condición también

se observa sedimentación. Mientras que de la resuspensión al 0,2%w/V de FCC-S06 en una solución 0,5mg/ml de OVA en glicina 10mM, pH 8,5, se obtiene un dm de 3,1 μ m y 0,1mg de OVA adsorbida por mg de FCC-S06. En esta condición también se observa sedimentación, pero luego de 15min de resuspensión aproximadamente.

Tabla 3.2: Resultados de adsorción de OVA, dm, sedimentación y pH de la fase líquida, posteriores a la resuspensión.

		Glicina 10mM pH 8,5	HEPES 10mM pH 7,0
FCC-S06 pH slurry 6,5	mg OVA adsorbida/mg part	0,1	0,06
	dm (μ m) \pm DS	3,1\pm1,1	3,9\pm1,7
	sedimentación	media	alta
	pH inicial/pH 24hs	6.5/6	7.5/7.5

Comparando con los resultados obtenidos con el buffer HEPES, en las mismas condiciones, se decide utilizar el buffer glicina 10mM, pH 8,5 para preparar las formulaciones con FCC-S06, y se resuelve utilizar la formulación recién preparada en todas las evaluaciones posteriores.

3.4.2 Resuspensión de la suspensión HAP-S08

Se evaluaron las mismas condiciones de resuspensión que para FCC-S06. Al igual que con esta última, el agua ultrapura y los buffers en base a fosfato inducen sedimentación y agregación (dm superiores a 4 μ m). Con la resuspensión en citrato 10mM, pH5,5, se determinó un dm de 0,5 μ m y el aumento en la concentración de este buffer a 100mm, no disuelve las partículas HAP-S08. Este efecto está reportado en la bibliografía, los iones citrato se adsorben a la superficie de las partículas de HAP formando complejos que estimulan la estabilidad^{206,207,208}. Lamentablemente, en ensayos posteriores, se confirmó que esta condición no permite la adsorción de OVA.

Por lo anterior, para los estudios de adsorción, se decidió proceder de la misma forma que con FCC-S06. Como se muestra en la **tabla 3.3**, de la

resuspensión al 0,2%w/V de HAP-S08 en una solución 0,5mg/ml de OVA en HEPES 10mM, pH 7,0, se obtiene un dm de 5,8 μ m y 0,1mg de OVA adsorbida por mg de HAP-S08. En esta condición también se observa sedimentación. Mientras que luego de la resuspensión al 0,2%w/V de HAP-S08 en una solución 0,5mg/ml de OVA en glicina, se observa baja sedimentación, 0,1mg de OVA adsorbida por mg de partículas y un dm dos veces mayor al informado por la empresa. En este caso, a pesar de utilizar el mismo equipo de medida, las diferencias encontradas en el dm seguramente se deban a que la determinación en la empresa se realizó sobre la HAP-S08 previamente sonicada por 15min y resuspendida en hexametáfosfato de sodio (desfloculante y dispersante).

Tabla 3.3: Resultados de adsorción de OVA, dm, sedimentación y pH de la fase líquida, posteriores a la resuspensión.

		Glicina 10mM pH 8,5	HEPES 10mM pH 7,0
HAP-S08 pH slurry 5,5	mg OVA adsorbida/mg part	0,1	0,1
	dm (μ m) \pm DS	1,1 \pm 0,5	5,8\pm1,5
	sedimentación	baja	alta
	pH inicial/pH 24hs	6/5.5	6/6

Al igual que con FCC-S06, se decide utilizar el buffer glicina para preparar las formulaciones con HAP-S08, y se resuelve utilizar la formulación recién preparada en todas las evaluaciones posteriores.

3.5 Isotermas de adsorción con el antígeno modelo OVA

A pesar de lo mencionado anteriormente concerniente a la estabilidad obtenida, se decidió usar la condición hallada (glicina 10mM, pH 8,5), con el fin de tener una aproximación matemática de la capacidad adsorptiva de las partículas y de su coeficiente de adsorción al antígeno modelo OVA. Para dicha finalidad, se realizaron isotermas de adsorción a 25°C con concentraciones crecientes del antígeno a una concentración fija de partículas, durante 3hs. Se

realizaron al 0,6% w/v de las suspensiones en el buffer glicina, en baño de agua y en constante agitación para evitar la sedimentación.

La Isoterma de Adsorción es la relación matemática entre la masa de soluto adsorbido (en este caso mg de OVA adsorbida por mg de FCC-S06 u HAP-S08) y la concentración del soluto en la solución una vez que se ha alcanzado el equilibrio a una temperatura constante. Esta representación gráfica da información acerca del tipo de adsorción. Existen diferentes modelos matemáticos para describir las isotermas que se obtienen experimentalmente, uno de los más usados es la Isoterma de Langmuir²⁰⁹, que describe la adsorción de un soluto en forma de monocapa, sobre esferas. Se decidió aplicar la linearización del modelo de Langmuir como método matemático (ya que ninguna de las dos suspensiones cumple con todas las premisas de dicho modelo, con el único fin de tener una forma de comparar resultados) y se calculó la capacidad adsorptiva (que representa la masa de soluto adsorbida como monocapa por masa de adsorbente) y el coeficiente de adsorción (constante de afinidad, que representa la fuerza con la cual ocurre la adsorción) de cada sistema.

Ecuación de Langmuir linearizada por el recíproco ⁸²:

$$\frac{c}{y} = \frac{1}{b \cdot ym} + \frac{c}{ym}$$

Siendo: **c** –concentración de soluto en solución en el equilibrio
y –masa de soluto adsorbida por masa de adsorbente
b –coeficiente de adsorptividad
ym –capacidad adsorptiva

Los resultados confirman que la funcionalización con grupos fosfato aumenta considerablemente la SSA de las partículas FCC-S06 (poseen un dm entre 4 y 5 veces mayor al de HAP-S08), lo que le confiere una capacidad adsorptiva similar a HAP-S08 por metro cuadrado en las condiciones ensayadas de 0,06mg de OVA por mg de partículas (**figura 3.12** y **tabla 3.4**). Ambas suspensiones se comportan de manera similar en cuanto a la saturación del antígeno a bajas concentraciones del mismo.

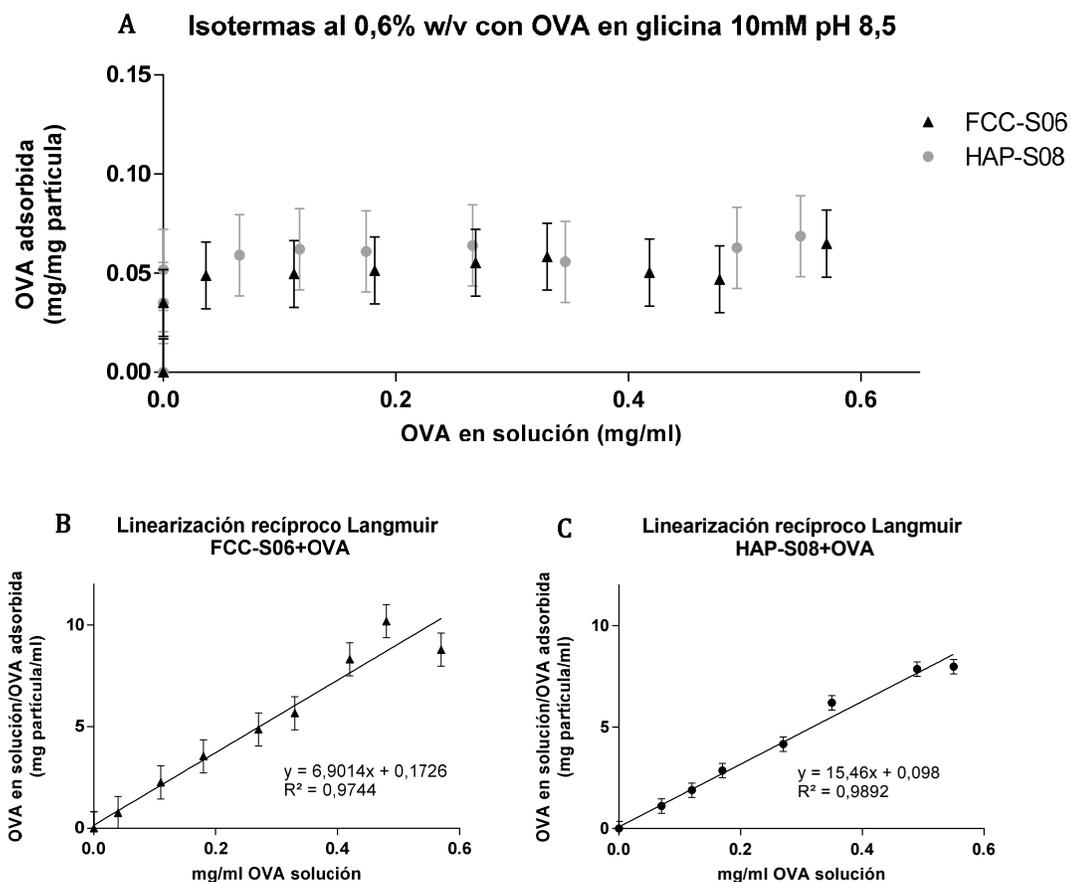


Figura 3.12: (A) Isotermas de adsorción con el antígeno modelo OVA. Se incubaron por 3hs suspensiones al 0,6% de FCC-S06 o HAP-S08 en glicina con concentraciones crecientes de OVA, en baño de agua a 25°C y agitación. **Linearización por el recíproco de la isoterma de Langmuir** de (B) FCC-S06+OVA y (C) HAP-S08+OVA, como modelo matemático para el cálculo de la capacidad adsorptiva. Los datos corresponden a la media \pm el error específico (n=3).

Tabla 3.4: Resultados de la capacidad adsorptiva y del coeficiente de adsorción calculados por el recíproco de la linearización de Langmuir

	Capacidad adsorptiva mg prot/mg partículas	Coefficiente de adsorción ml/mg	SSA agregada m ² /g sólido	Capacidad adsorptiva mg prot/m ²	r2
FCC S06	0,06	110	4,8	0,8	0,97
HAP S08	0,06	158	5,1	0,7	0,99

Cabe destacar que en estas condiciones de glicina, 10mM, pH 8,5, ambas suspensiones tienen una baja capacidad adsorptiva. Por lo que de antemano

sabemos que se utilizará un exceso de antígeno el cual no será adsorbido en su totalidad en los ensayos a continuación.

Según literatura la capacidad de adsorción de 1mg Alhydrogel en solución salina es de 1,8mg de OVA según July *et al*¹⁰. Esto es debido a que OVA (con un punto isoeléctrico de 4,6) tiene el potencial de adsorberse a AH el cual tiene un punto de cero carga de 11,4 a pH fisiológico, tanto por fuerzas electroestáticas como por intercambio de ligando con los grupos fosfato de la proteína⁶⁸.

3.5.1 Estimación de los niveles de LPS de las suspensiones

Para evaluar los niveles de LPS de las resuspensiones de FCC-S06 y HAP-S08 en glicina, se procedió igual que en el apartado 3.3.1. En el gráfico de la **figura 3.11**, se confirma que no hay trazas detectables de LPS en las resuspensiones de FCC-S06 y HAP-S08 en glicina.

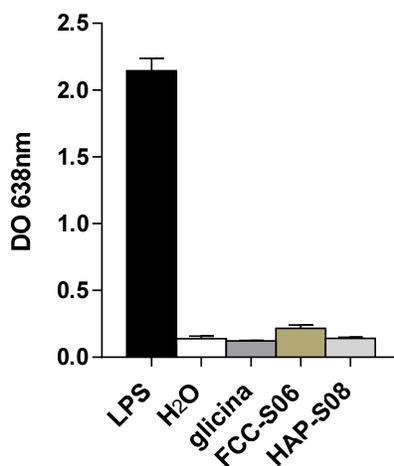


Figura 3.11: Detección de niveles de LPS de las suspensiones resuspendidas en glicina utilizando el kit de HEK-Blue. Se sembraron 100µg/ml de **FCC-S06** o **HAP-S08** en cada pocillo conteniendo las células HEK-Blue mTLR4. Como controles negativos se utilizó glicina y H₂O apirógena, y como control positivo 1,25ng/ml de LPS. Los datos corresponden a la media \pm DS (n=3) de dos experimentos independientes. ANOVA, post test Tukey, $p < 0,05$.

3.6 Conclusiones

Como primera etapa para la evaluación de las suspensiones como posibles candidatos a adyuvantes de inmunización, se realizó una caracterización fisicoquímica de las mismas. De los resultados se puede concluir que existen diferencias morfológicas y de composición química entre ambas suspensiones, a pesar que se utilizó calcita como material base para sus síntesis.

FCC-S06 es una suspensión microparticulada que presenta una morfología esferoide y cristalina, con estructuras en forma de placas laminares estableciendo poros intrapartículas, aumentando considerablemente su SSA. Tiene una composición química bifásica, compuesta principalmente por un *core* de carbonato de calcio y una fase minoritaria conformada por una sal del tipo de fosfato de calcio, no caracterizada completamente. Asimismo, no encontrada en bibliografía ninguna referencia de uso/evaluación como adyuvante de inmunización.

A pesar de no obtener condiciones de estabilidad, lo que va en detrimento para la obtención de una formulación homogénea en cuanto a la adsorción del antígeno y a la capacidad de administrar dosis equivalentes, se decidió continuar con los siguientes objetivos, teniendo la precaución de preparar fresca la formulación, homogenizarla y usarla dentro de los primeros 15 minutos de formulada con glicina 10mM pH 8,5. Además, se realizaron isotermas de adsorción en la condición anterior con el objetivo de tener una aproximación de la capacidad adsorptiva de la suspensión utilizando el antígeno OVA. Se estimó que 1mg de suspensión adsorbe 60µg de proteína. De lo anterior se puede concluir que la capacidad adsorptiva de la suspensión es limitada, dado que como ya se mencionó, según la literatura revisada 1mg de Alhydrogel en solución salina adsorbe 1,8mg de OVA²¹⁰, lo que resulta en una capacidad adsorptiva 30 veces mayor. En los ensayos que se plantean a continuación para evaluar la capacidad immunoestimulante de la suspensión cabe destacar que en algunas condiciones habrá un exceso de antígeno que no estará adsorbido a las suspensiones. Lo anterior no va en detrimento de la posibilidad de inducir una respuesta inmune ya que como se mencionó en la introducción varios estudios

sostienen que la completa adsorción del antígeno no es necesaria para la obtención de la misma^{74,77,79,80}.

A pesar de lo informado por la empresa y con los datos obtenidos, no se puede concluir que HAP-S08 esté compuesta por hidroxiapatita. Se necesitan llevar a cabo más estudios para determinar cuál es la sal de la familia de los fosfatos de calcio que la conforma. HAP-S08 tiene una morfología amorfa, con baja cristalinidad, no presenta poros intrapartículas y posee una alta tasa de compactación. En este caso se puede concluir que durante el proceso de síntesis se produjo una conversión total de la calcita.

Asimismo, en la condición de resuspensión encontrada, HAP-S08 se presenta microparticulada y también se observó sedimentación. Además, se constató que esta suspensión tiene una capacidad adsorptiva similar a la suspensión FCC-S06 pero con una SSA inferior, por lo que se puede concluir que la capacidad adsorptiva de esta suspensión en la condición analizada es superior, pero de igual manera es muy inferior a la del adyuvante de referencia.

La suspensión HAP-S08 no pudo ser completamente caracterizada químicamente, asumiendo que es un material de la familia de los fosfatos de calcio. Como se mencionó en la introducción, para la hidroxiapatita no estequiométrica microparticulada ya existen pruebas de su eficacia como adyuvante. Por lo anterior y en vista de los antecedentes que demuestran la eficacia de ésta como adyuvante, se resolvió: (1) realizar sólo las evaluaciones de toxicidad y la mayoría de los estudios *in vitro*; y (2) no llevar a cabo los ensayos *in vivo* a fin de reducir el número de animales utilizados en la presente tesis adhiriendo al principio de las 3 Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) en el uso de animales de experimentación.

Finalmente, se confirmó que tanto las suspensiones como las soluciones antigénicas presentan niveles de LPS indetectables, lo que permite continuar con los siguientes objetivos planteados.

Capítulo IV:

Evaluación de la

toxicidad

4 Resultados y discusión de la evaluación de la toxicidad

4.1 Objetivo específico

Determinar si las suspensiones generan efectos tóxicos en ensayos *in vitro*, evaluando la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de las sales de tetrazolio (MTT) y la actividad hemolítica, e *in vivo* mediante un ensayo de toxicidad aguda.

4.2 Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la suspensión FCC-S06

Con el fin de determinar la actividad citotóxica de la suspensión FCC-S06, se evaluó su efecto en la viabilidad en las líneas celulares murinas RAW-Blue (macrófago) y J774A.1 (monocito-macrófago) y en células dendríticas derivadas de medula ósea (BMDC) de ratones C57BL/J, las cuales se usarán posteriormente para determinar la existencia de posibles efectos inmunoestimulatorios generados por las formulaciones. También se utilizó la línea celular murina RENCA (epitelial), con el objetivo de determinar los posibles efectos tóxicos en una línea que no posee capacidad fagocítica, para excluir que la actividad fagocítica de las líneas celulares anteriores enmascare una posible citotoxicidad. En todos los ensayos se utilizó el adyuvante de referencia Alhydrogel, comparando la citotoxicidad obtenida por dicho adyuvante en las mismas condiciones.

En la **figura 4.1**, se muestra el efecto de la suspensión FCC-S06 sobre la viabilidad celular en las células mencionadas evaluado mediante el ensayo colorimétrico de las sales de tetrazolio (MTT) en **(A)** RAW-Blue, **(B)** J774A.1, **(C)** BMDC y **(D)** RENCA. No se observó efecto citotóxico de FCC-S06, el cual es independiente de la concentración de la suspensión utilizada, en las líneas murinas RAW-Blue, J774A.1 y RENCA, luego de 48hs de exposición, en las condiciones ensayadas. Se observó un descenso en la viabilidad de las BMDCs del 30% (**figura 4.1C**) a concentraciones de 50 y 100µg/ml, tanto con la suspensión FCC-S06 como con Alhydrogel. Por lo que se puede sugerir que a la concentración máxima evaluada para las BMDCs, la FCC-S06 no genera citotoxicidad. También

este efecto fue observado para las mismas concentraciones con el adyuvante de referencia en las células J774A.1 pero no con la suspensión FCC-S06 ($p < 0,0001$).

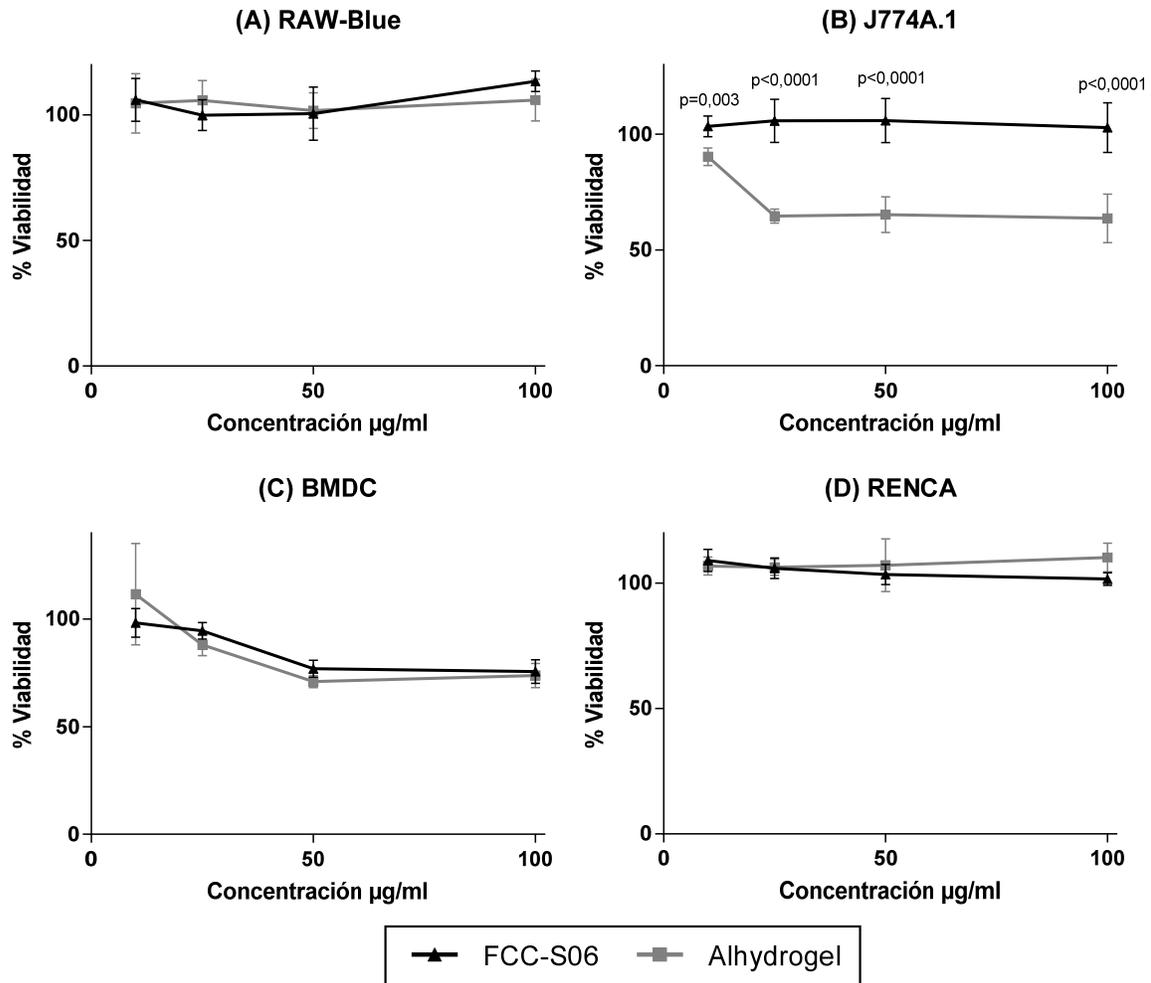


Figura 4.1: Efecto en la viabilidad celular de la suspensión **FCC-S06** en glicina. Se sembraron en placas de 96 pocillos con 4×10^4 células/pocillo de **(A)** RAW Blue, **(B)** J774A.1, **(C)** BMDC y **(D)** RENCA en presencia de distintas concentraciones de la suspensión. Se cuantificó la viabilidad celular luego de 48hs de incubación por el método colorimétrico MTT, comparándolo con el causado incubando con Alhydrogel en las mismas condiciones. El control de 100% de citotoxicidad utilizado fue 10% de DMSO. Los resultados se expresaron como % de células viables. Cada punto representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, $n=5$ o 6 . ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

4.3 Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la suspensión HAP-S08

De la misma forma, se evaluó el efecto en la viabilidad celular de la suspensión HAP-S08. Como se muestra en la **figura 4.2**, no se observó citotoxicidad de HAP-S08, en las líneas murinas RAW-Blue, ni RENCA, luego de 48hs de exposición, en las condiciones ensayadas. Se observó un descenso en la viabilidad de las J774A.1 y BMDCs del 30% (**figura 4.2ByC**) a concentraciones de 50 y 100µg/ml, tanto con la suspensión HAP-S08 como con Alhydrogel.

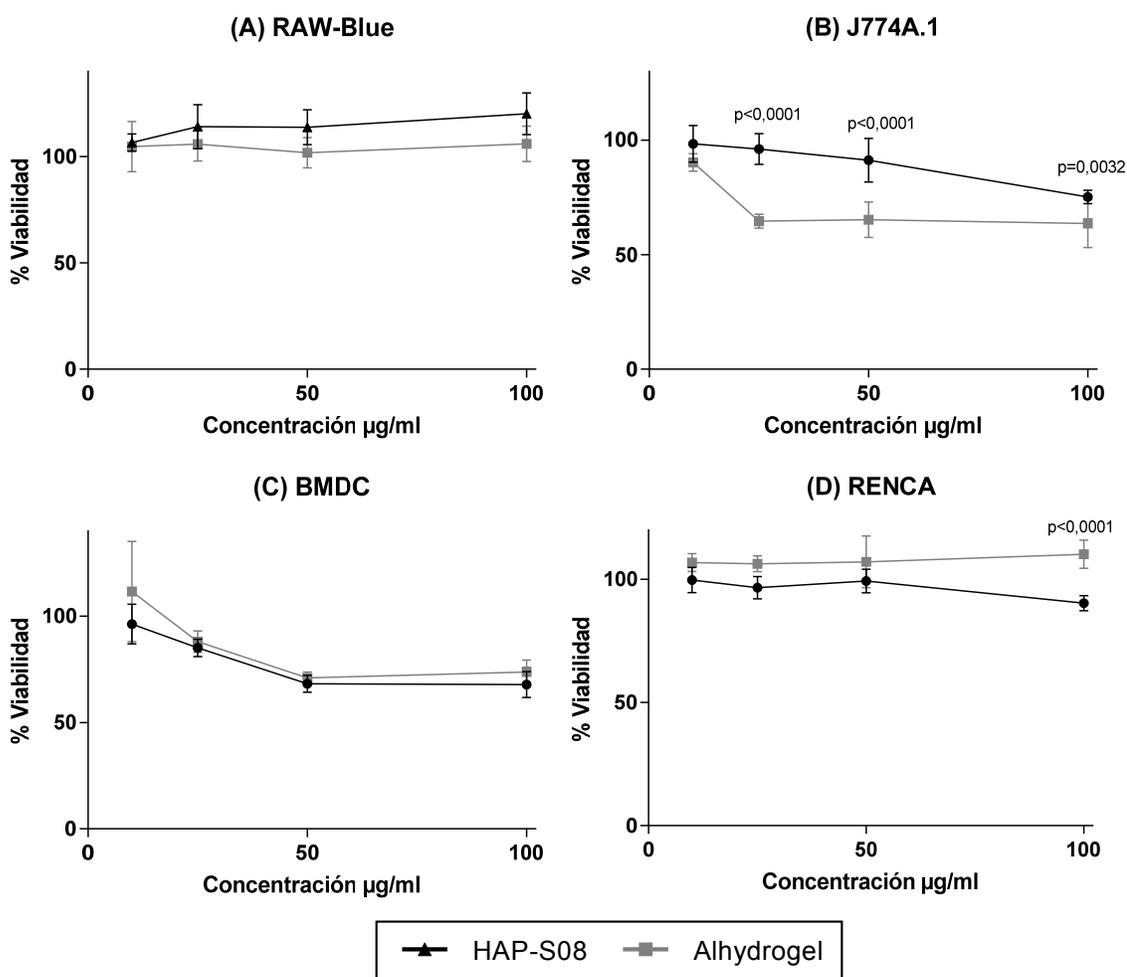


Figura 4.2: Efecto en la viabilidad celular de la suspensión **HAP-S08** en glicina. Se sembraron en placas de 96 pocillos con 4×10^4 células/pocillo de **(A)** RAW Blue, **(B)** J774A.1, **(C)** BMDC y **(D)** RENCA en presencia de distintas concentraciones de la suspensión. Se cuantificó la viabilidad celular luego de 48hs de incubación por el método colorimétrico MTT, comparándolo con el causado incubando con Alhydrogel en las mismas condiciones. El control de 100% de citotoxicidad utilizado fue 10% de DMSO. Los resultados se expresaron como % de células viables. Cada punto representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, n=5 o 6. ANOVA, post test tukey, p<0,05.

4.4 Evaluación de la actividad hemolítica de la suspensión FCC-S06

En la **figura 4.3** se muestran los resultados del porcentaje de hemólisis observado luego de incubar una suspensión al 1% de glóbulos rojos con distintas concentraciones de la suspensión FCC-S06. Dicha suspensión no mostró actividad hemolítica detectable en el rango de concentraciones analizado, y en dicho rango mantiene una diferencia con respecto a Alhydrogel ($p < 0,0001$). Este último presentó porcentajes de hemólisis que alcanzaron valores de hasta el 100% a concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$, iguales al control positivo utilizando la saponina Quil A a 250 $\mu\text{g/ml}$.

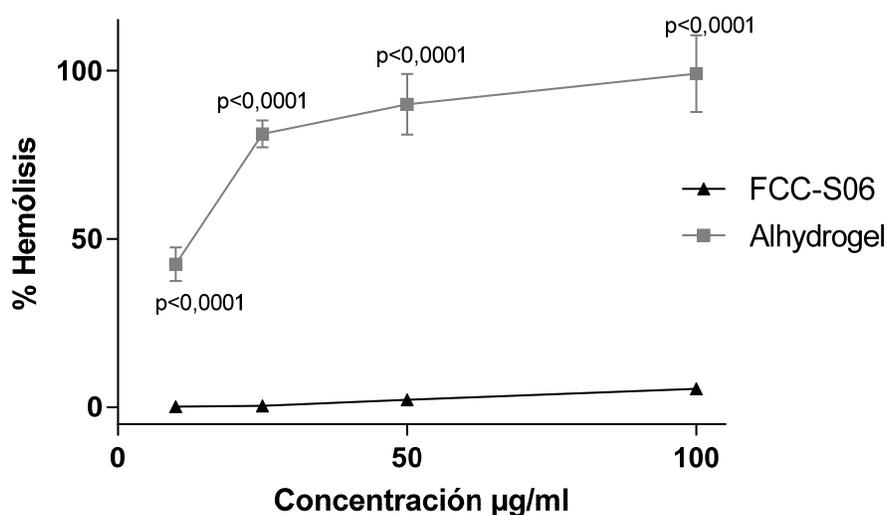


Figura 4.3: Actividad hemolítica de la suspensión FCC-S06 y Alhydrogel comparándolo sobre una suspensión al 1% de GR. Los resultados se expresan como el % de hemólisis referido a la saponina Quil A, control positivo de 100% de hemólisis. Cada punto representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, $n=5$ o 6 . ANOVA one way, post test tukey, $p < 0,05$.

4.5 Evaluación de la actividad hemolítica de la suspensión HAP-S08

Los porcentajes de hemólisis observados para la suspensión HAP-S08, se muestran en la **figura 4.4**. Dichos resultados evidencian que no presenta actividad hemolítica. En el rango de concentraciones analizado se mantiene una diferencia con respecto a Alhydrogel ($p < 0,0001$).

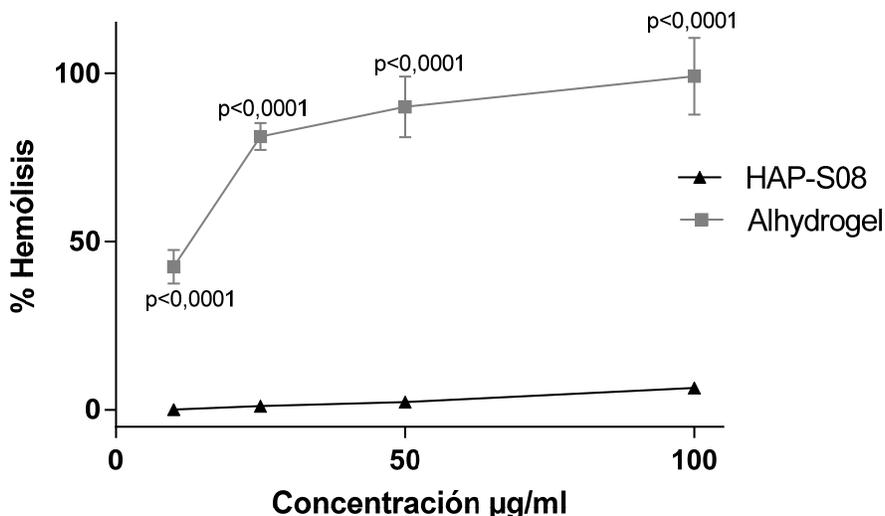


Figura 4.4: Actividad hemolítica de la suspensión HAP-S08 y Alhydrogel comparándolo sobre una suspensión al 1% de GR. Los resultados se expresan como el % de hemólisis referido a la saponina Quil A, control positivo de 100% de hemólisis. Cada punto representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, $n=5$ o 6 . ANOVA one way, post test tukey, $p < 0,05$.

4.6 Evaluación de la toxicidad *in vivo*

La evaluación de la toxicidad de las suspensiones *in vivo* se realizó siguiendo el test de toxicidad anormal para dosis única (ATT) que se detalla en la monografía 2.6.9 de la Farmacopea Europea. El ATT indica que luego de la inoculación de las suspensiones, los animales (ratones y cobayos) se monitoreen por una semana, y si no se observan signos de enfermedad o muerte en ninguno de los animales, se concluye que el lote de vacunas evaluado pasa el test. Este test evalúa la toxicidad de lotes vacunales previa a su liberación, por lo que se recomienda la administración intraperitoneal de una dosis humana en dichos animales. En cuanto a la dosis usada, se obtuvo calculando la dosis máxima permitida en humanos para el aluminio (1,25 mg por dosis única humana para

vacunas donde el adsorbente es el aluminio (Ph Eur 5.0, monografía 2.5.13.) y el calcio (1,3mg por dosis única humana para vacunas donde el adsorbente es el calcio (Ph Eur 5.0, monografía 2.5.14)). La dosis administrada de Alhydrogel se calculó según la información del contenido de aluminio informada por el fabricante. Para el cálculo de las dosis de las suspensiones, se estimó el % en masa del Ca suponiendo que la FCC-S06 es en su mayoría carbonato de calcio, y que HAP-S08 es hidroxapatita.

4.6.1 Test de toxicidad anormal para la suspensión FCC-S06

En ambos experimentos del ATT (ratones y cobayos) la FCC- S06 pasó el test, así como el grupo control inoculado con Alhydrogel. Cabe aclarar que para este test se decidió omitir el grupo control con glicina siguiendo las guías de reducción en el uso de animales de experimentación.

No se observaron signos de enfermedad, ni murió ningún animal al cabo de una semana. En el grupo de ratones en los que se administró FCC-S06 se constató un incremento del peso a lo largo del experimento, indicador de no toxicidad según el test de ganancia de peso^{211,42} (*del inglés*, MWGT mouse weight gain test) (Figura 4.5).

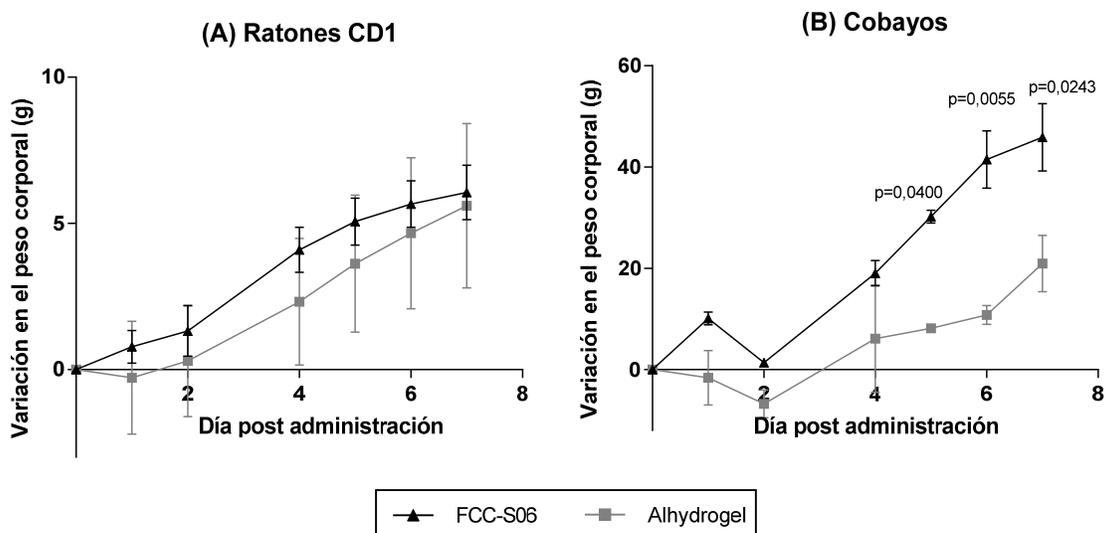


Figura 4.5: Efecto en el peso corporal por la administración intraperitoneal del equivalente a una dosis humana de la suspensión FCC-S06 en glicina en (A) ratones CD1 (n=5), (B) cobayos (n=2), durante una semana, comparándolo con el causado utilizando Alhydrogel en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron como la diferencia en gramos de peso corporal expresado con respecto al día 1. Cada punto representa la media \pm DS. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

En cambio se constató una disminución en el peso de los cobayos tanto para la suspensión como para el control de referencia al segundo día del experimento. En los últimos días el aumento en el de peso fue mayor para la suspensión FCC-S06 comparándolo con el grupo de cobayos inoculados con Alhydrogel, ($p=0,0400$ para el día 5, $p=0,0055$ para el día seis y $p=0,0243$ para el día siete) (**Figura 4.5**).

Se realizó necropsia a dichos animales y en la cavidad peritoneal de los ratones CD1 se observaron agregados de las partículas FCC-S06 y no se observaron signos de inflamación en los órganos. En los ratones inoculados con Alhydrogel, se observó ascitis hemorrágica y agregados de partículas.

En las cavidades peritoneales de los cobayos tampoco se observaron signos de inflamación en los órganos y se encontró que las partículas estaban dispersas en comparación con lo observado en los ratones, con muy pocos agregados y pequeños, tanto para la suspensión FCC-S06 como para el adyuvante de referencia. Esto puede deberse a que se inoculó la misma cantidad de partículas en un volumen 5 veces superior y en una cavidad de mayor tamaño.

En el grupo control de cobayos inoculado con el adyuvante de referencia, también se evidenció la presencia de una ascitis hemorrágica, como fue informado por otros²¹².

En la **figura 4.6** se muestran las fotografías de la cavidad peritoneal de un animal representativo de cada grupo experimental.

Los resultados de los estudios de toxicidad permiten afirmar que las FCC-S06 no tienen un efecto tóxico en las condiciones ensayadas, observándose un comportamiento similar o incluso mejor al obtenido en las mismas condiciones con el adyuvante de referencia.

Como se menciona en la introducción, las guías para la evaluación de la toxicidad de nuevos adyuvantes sostienen que se evalúe la formulación vacunal y no el adyuvante solo. En el presente trabajo, como aún no se tiene información acerca del potencial inmunoestimulador de las suspensiones en estudio y se usarán diferentes antígenos, se decidió realizar los estudios de toxicidad con las

suspensiones solas para encontrar una concentración de trabajo no tóxica para llevar a cabo los posteriores estudios, ya sea *in vitro* como *in vivo*.

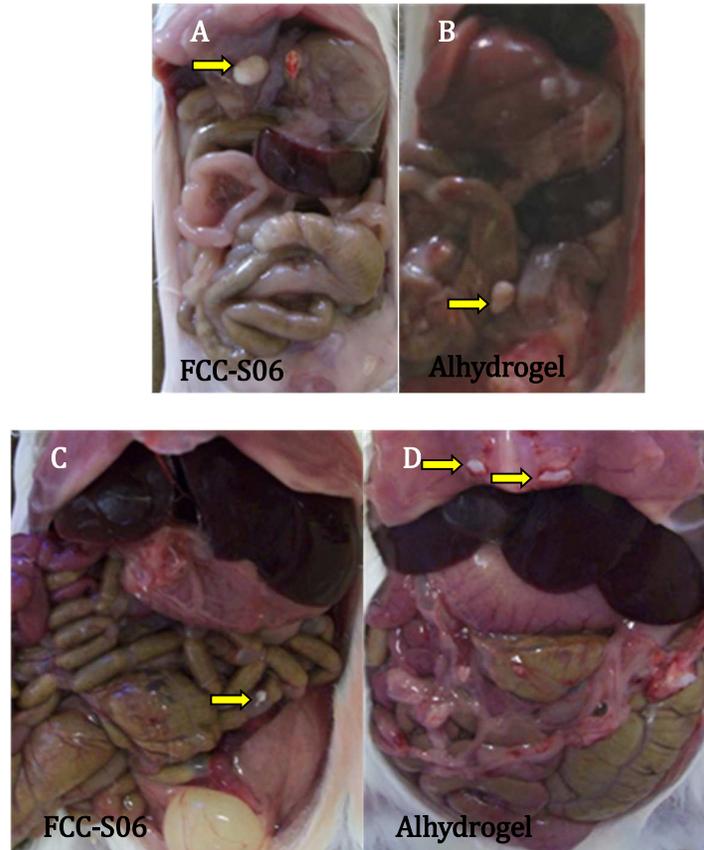


Figura 4.6: Test de toxicidad anormal (ATT). Foto de la cavidad peritoneal de un individuo representativo de cada grupo (A) y (B) ratones CD1, (C) y (D) cobayos. FCC-S06 en glicina (A y C) y (B y D) Alhydrogel en glicina. Las flechas amarillas indican los agregados de las partículas encontrados.

4.6.2 Test de toxicidad anormal para la suspensión HAP-S08

La inoculación intraperitoneal de HAP-S08 no generó signos de enfermedad, ningún animal murió al cabo de una semana. Se constató un incremento del peso a lo largo del experimento en los ratones CD1, en cambio se observó una disminución similar en el peso de los cobayos tanto para la suspensión como para el obtenido con Alhydrogel.

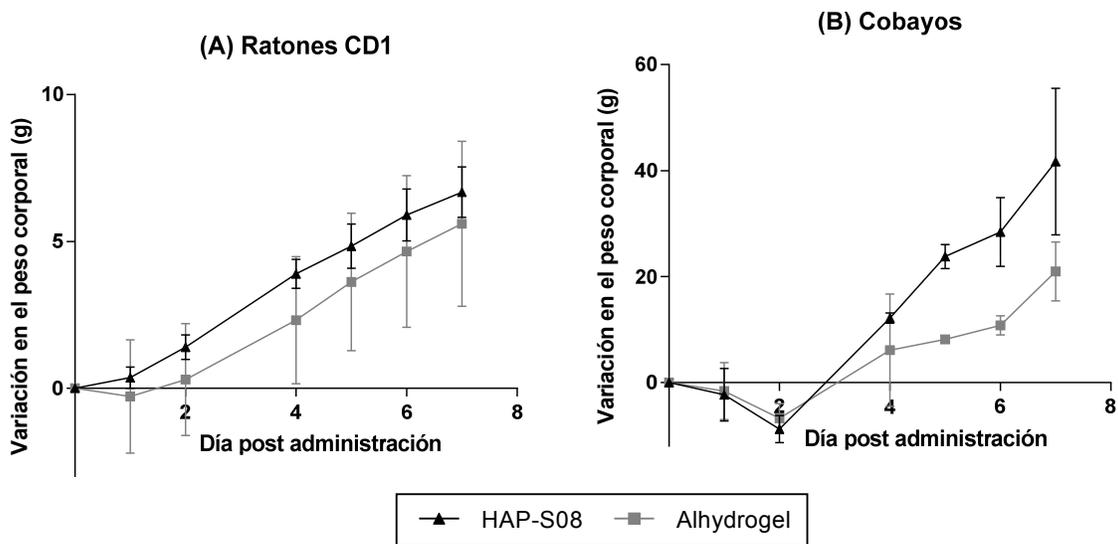


Figura 4.7: Efecto en el peso corporal por la administración intraperitoneal del equivalente a una dosis humana de la suspensión **HAP-S08** en glicina en **(A)** ratones CD1 (n=5), **(B)** cobayos (n=2), durante una semana, comparándolo con el causado utilizando Alhydrogel en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron como la diferencia en gramos de peso corporal expresado con respecto al día 1. Cada punto representa la media \pm DS. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

La observación de la cavidad peritoneal de los animales inoculados con HAP-S08 evidenció un comportamiento similar al mencionado para la suspensión FCC-S06. Los resultados de los estudios de toxicidad demuestran que la HAP-S08 no tiene un efecto tóxico en las condiciones ensayadas y que es similar al Alhydrogel.

4.7 Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo permiten afirmar que las suspensiones FCC-S06 y HAP-S08 no son tóxicas, debido a que la incubación de varias líneas celulares con las suspensiones no induce muerte celular, no poseen actividad hemolítica ni generaron efectos tóxicos en el test de toxicidad aguda, sugiriendo que son biocompatibles. Además, ocasionaron menos efectos tóxicos que el adyuvante de referencia en las mismas condiciones ensayadas.

Asimismo se determinó una dosis de trabajo para los ensayos *in vitro* de 100µg/ml para la evaluación del potencial inmunoestimulador, que no afecta la viabilidad celular. Por otro lado, las dosis que se usarán para los ensayos *in vivo* serán menores a las usadas en el ATT.

Capítulo V:

Evaluación de la actividad

inmunoestimulante en

ensayos *in vitro*

5 Resultados y discusión de la evaluación de la actividad inmunoestimulante en ensayos *in vitro*

5.1 Objetivo específico

Evaluar la actividad inmunoestimulante de la formulación (suspensión partículas + buffer de resuspensión + proteínas antigénicas) en sistemas biológicos *in vitro* usando como referencia el adyuvante Alhydrogel. Para cumplir con este objetivo se procedió a evaluar los siguientes items:

- determinar si la formulación induce la activación de monocitos/macrófagos murinos evaluando: (a) la translocación de NF- κ B y AP-1, (b) la inducción de la producción de óxido nítrico, (c) la secreción de IL-1 β e IL-12p70 y (d) la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86 y MHC-II) por citometría de flujo (CF).

- determinar si la formulación induce la activación y maduración de la línea celular primaria de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) evaluando: (a) la expresión de moléculas co-estimuladoras, (b) el perfil transcripcional de citoquinas y quimioquinas expresadas por las BMDCs por RT-qPCR y (c) la secreción de IL-12p70, e IL-1 β y si esta secreción es dependiente de caspasa 1 y 11.

- determinar si la formulación estimula la captación, procesamiento y acumulación del antígeno modelo DQ-OVA por células presentadoras (BMDCs y macrófagos murinos (J774A.1)).

- evaluar la capacidad de BMDCs pre-estimuladas con la formulación de *cross-presentar* el antígeno a esplenocitos de ratones inmunizados con la misma.

5.2 Efecto de las formulaciones con FCC-S06 sobre la activación de monocitos/macrófagos murinos

Como se mencionó en la introducción el reconocimiento de determinados PAMPs o DAMPs por los PRRs desencadena una cascada de señalización que finaliza con la translocación al núcleo celular de factores de transcripción como son NF- κ B y AP-1. Lo anterior activa la transcripción de genes de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias.

Con el objetivo de comenzar la evaluación de las propiedades inmunoestimuladoras de la formulación FCC-S06+antígeno (OVA y STP) se estudió la capacidad de estimular el sistema inmune innato evaluando si favorecen su activación a través de la determinación de la translocación de los factores de transcripción mencionados anteriormente en la línea reportera RAW-Blue murina de macrófagos, como ya fue reportado por otros^{213,214}.

Todos los ensayos que se presentan a continuación fueron llevados a cabo utilizando formulaciones con 100 μ g/ml de FCC-S06+STP o FCC-S06+OVA en glicina (relación 1:20 con el antígeno), de ahora en más formulación FCC-S06+antígeno, salvo se aclare específicamente, comparando con formulaciones con Alhydrogel en las mismas condiciones.

Como se observa en la **figura 5.1** no hubo estimulación de la translocación con las suspensiones FCC-S06 y Alhydrogel a la misma concentración que con las formulaciones.

En cambio, se observa que ambas formulaciones, FCC-S06+OVA o FCC-S06+STP, inducen la translocación de los factores de transcripción con respecto a los antígenos solos, OVA ($p < 0,0001$) y STP ($p = 0,0010$) así como con respecto a las formulaciones con Alhydrogel ($p < 0,0001$ para la formulación con OVA y $p = 0,0012$ para la formulación con STP respectivamente), luego de 24hs de estimulación.

También se observa que la formulación Alhydrogel+OVA induce la translocación de los factores de transcripción mencionados con respecto a OVA

($p < 0,0001$), mientras que no se observa diferencia entre la formulación con STP y el antígeno solo.

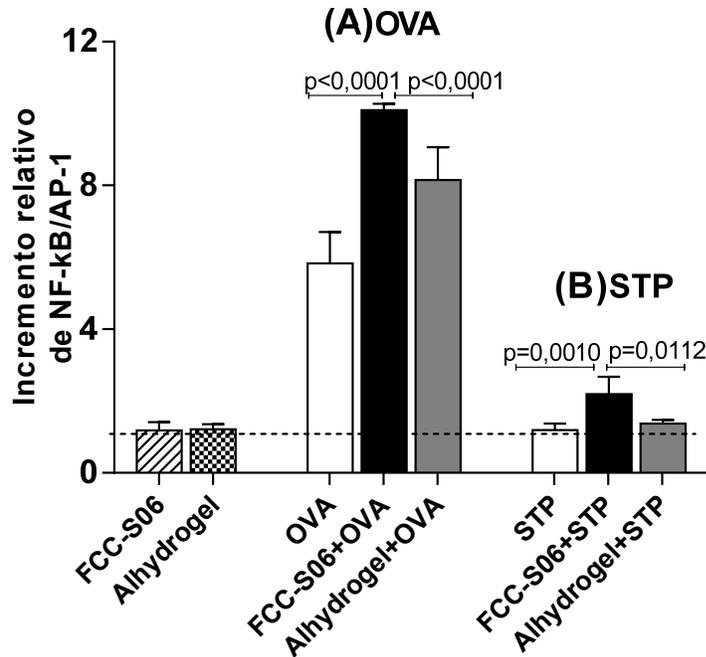


Figura 5.1: Activación de la translocación de NF-κB y AP-1. La línea reportera RAW-Blue fue estimulada con la suspensión FCC-S06 en glicina, preadsorbida con (A) OVA o (B) STP o con Alhydrogel en las mismas condiciones por 24hs. Los resultados se expresaron como la media \pm DS del incremento relativo comparándolo contra el control sin estimular de dos experimentos independientes, $n=3$. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

Asimismo se observa una mayor translocación de los factores de transcripción usando OVA en la formulación con FCC-S06 con respecto a la misma formulada con STP ($p < 0,0001$). Constatándose el mismo resultado cuando en las formulaciones se usó el adyuvante de referencia ($p < 0,0001$).

De este resultado también se deduce la capacidad de OVA de inducir dicha translocación, la cual es mayor a la inducida por la formulación FCC-S06+STP ($p < 0,0001$) y Alhydrogel+STP ($p < 0,0001$). Revisando bibliografía se constató que debido a las glicosilaciones, OVA tiene la capacidad de unirse al receptor de manosa (CD206), encontrado en monocitos, macrófagos y DCs, y que la unión de este ligando desencadena su endocitosis y *cross-presentación* en el contexto de MHC-I²¹⁵.

Por la razón anterior es que se decidió utilizar además STP recombinante en los ensayos. Debido a que, por su forma de expresión nos aseguramos que carezca de glicosilaciones. Asimismo, la producción de STP de forma soluble en elevadas concentraciones y su purificación ya está descrita¹⁹².

Seguidamente se evaluó la capacidad de FCC-S06+STP y FCC-S06+OVA de inducir la producción de óxido nítrico (*del inglés*, NO) en la línea de monocitos/macrófagos murinos j774A.1, utilizando el reactivo de Griess como ya ha sido reportado^{196,216,217,218}.

El NO es sintetizado mediante la oxidación secuencial del nitrógeno del guanidino terminal de la L-arginina, reacción catalizada por la NO sintetasa (*del inglés*, NOS). La NOS inducible es sintetizada en respuesta a mediadores pro-inflamatorios en una gran variedad de células inmunes, incluyendo macrófagos. La producción de NO por estas células inhibe el crecimiento de varios patógenos, y es una molécula que se encuentra involucrada además en la destrucción de varios microorganismos y células tumorales por macrófagos activados durante la respuesta inmune no específica²¹⁹.

Como se observa en la **figura 5.2**, la suspensión de partículas FCC-S06 o Alhydrogel o los antígenos solos no inducen la producción de óxido nítrico.

En cambio las formulaciones de FCC-S06+STP y FCC-S06+OVA inducen la producción de NO comparándolas con el antígeno, STP ($p < 0,0001$) y OVA ($p < 0,0001$) luego de 24hs de estimulación.

FCC-S06+STP induce una producción mayor respecto a Alhydrogel+STP ($p = 0,0075$); mientras que no se observa esta diferencia entre FCC-S06+OVA y Alhydrogel+OVA.

También se observa que ambas formulaciones con Alhydrogel inducen la producción de NO comparándolas con el antígeno, STP ($p = 0,0045$) y OVA ($p = 0,0050$).

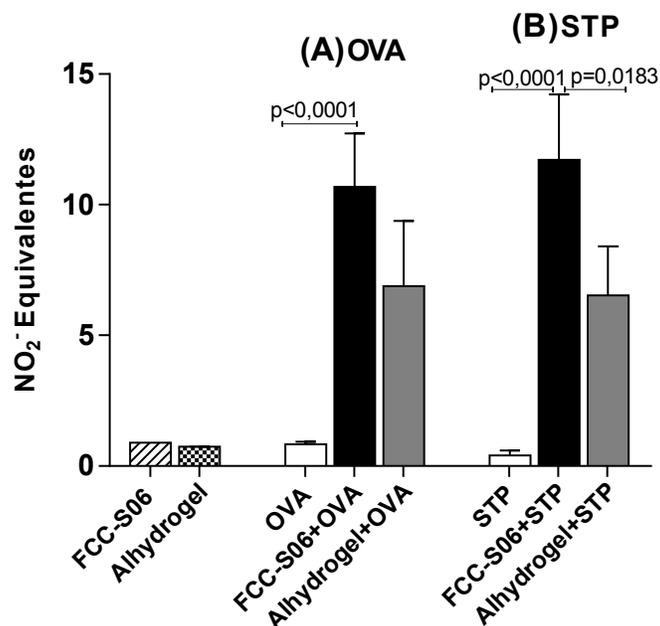


Figura 5.2: Producción de óxido nítrico. La línea murina de macrófagos J774A.1 fue estimulada con la suspensión FCC-S06 en glicina, preadsorbida con (A) OVA o (B) STP o con Alhydrogel en las mismas condiciones por 24hs. Los resultados se expresaron como equivalentes de NO₂⁻ determinado por el reactivo de Griess como la media ± DS de dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, p<0,05.

Asimismo se constató que no hubo diferencia en la producción de NO usando OVA en la formulación con FCC-S06 con respecto a la misma formulada con STP. Observándose el mismo resultado cuando en las formulaciones se usó el adyuvante de referencia.

A continuación se evaluó la capacidad de la formulación FCC-S06+STP, en las mismas condiciones anteriores, de inducir la producción de las CKs pro-inflamatorias IL-12p70 e IL-1β por los macrófagos J774A.1. Luego 24hs de estimulación, estas CKs fueron cuantificadas en el sobrenadante por ELISA.

No se detectó IL-12p70 en el sobrenadante de las células J774A.1 estimuladas con FCC-S06+STP ni con la formulación usando el adyuvante de referencia con un límite de detección (LD) de 8pg/ml. Tampoco con las suspensiones o antígenos solos.

Asimismo, como se observa en la **figura 5.3A**, se constató que la suspensión o el antígeno solo no estimulan la producción de la CK pro-inflamatoria IL-1 β en macrófagos J774A.1 luego de una incubación por 24hs.

En cambio, la formulación FCC-S06+STP estimula dicha secreción con respecto al antígeno ($p=0,0002$) y de forma similar que la formulación Alhydrogel+STP. Esta última aumenta la producción de IL-1 β con respecto a STP ($p=0,0011$).

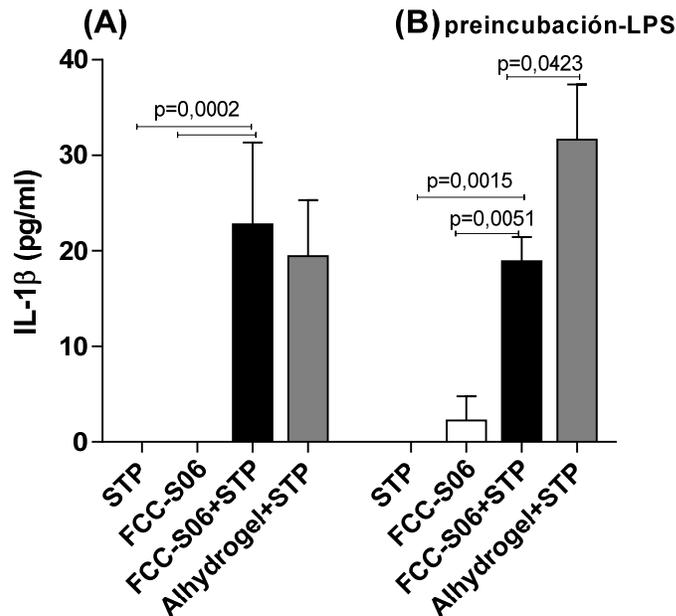


Figura 5.3: Producción de IL-1 β por macrófagos J774A.1 cuantificada en el sobrenadante por ELISA luego de 24hs de estimulación con **(A)** la suspensión **FCC-S06** preadsorbida con STP en glicina o con Alhydrogel en las mismas condiciones. En paralelo se realizó el mismo experimento **(B)** Pre-incubando con 10 μ l/ml de LPS durante 2hs. Cada barra representa la media \pm DS de tres o dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, $p<0,05$.

Con el objetivo de evaluar si es requerida una primera señal vía la activación de TLRs para la producción de IL-1 β , se realizó en paralelo el mismo ensayo pre-incubando los macrófagos J774A.1 con 10 μ g/ml de LPS (agonista de TLR4).

No se encontró una diferencia en la producción de esta CK luego de la pre-incubación estimulando con la suspensión, el antígeno solo ni con las

formulaciones FCC-S06+STP o Alhydrogel+STP (**figura 5.3B**), comparándolas con los resultados encontrados sin dicha pre-incubación.

En esta condición, se constató un aumento en la producción de IL-1 β cuando los macrófagos J774A.1 fueron estimulados con la formulación FCC-S06+STP con respecto a STP sola ($p=0,0015$). También se observó un aumento en la producción al ser estimulados con Alhydrogel+STP con respecto a la obtenida con FCC-S06+STP ($p=0,0423$).

Además, se estudió por CF la inducción de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86 y MHC-II) en la línea celular de monocitos/macrófagos murinos J774A.1. Lamentablemente una expresión basal muy alta de dichas moléculas en estas células impidió observar diferencias en la media de intensidad de fluorescencia y en el porcentaje de células positivas para cada molécula. Se compararon el control positivo con LPS+IFN- γ , el negativo con glicina y las formulaciones con FCC-S06+STP y Alhydrogel (no mostrado).

5.3 Efecto de las formulaciones con HAP-S08 sobre la activación de monocitos/macrófagos murinos

Se repitieron los mismos ensayos que en el apartado anterior para evaluar la activación de monocitos/macrófagos con formulaciones de 100µg/ml de HAP-S08+antígeno en glicina (relación 1:20).

Como se observa en la **figura 5.4**, la suspensión HAP-S08 no induce la translocación de NF-κB y AP-1. En cambio se observó que la formulación HAP-S08+STP induce dicha translocación con respecto al antígeno solo y a la formulación con el adyuvante de referencia ($p<0,0001$). Con la formulación HAP-S08+OVA no se constató una diferencia con respecto al antígeno solo, pero si se observó una menor inducción con respecto a Alhydrogel+OVA ($p<0,0001$), en las mismas condiciones.

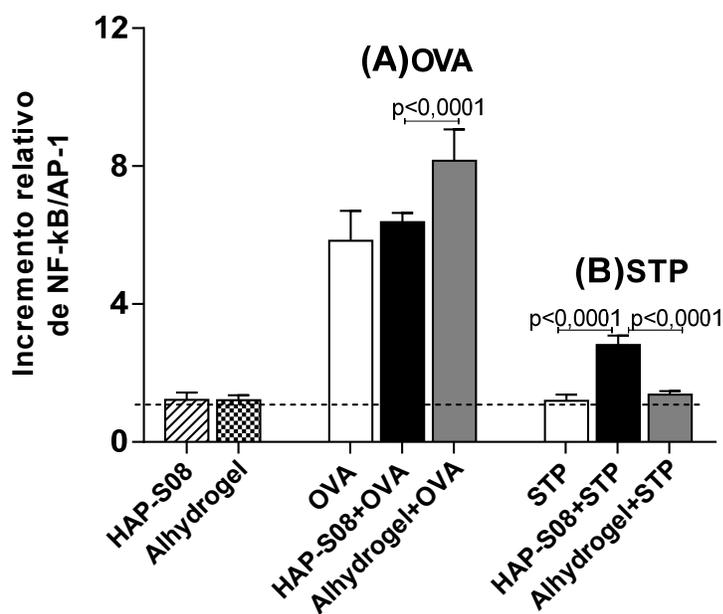


Figura 5.4: Activación de la translocación de NF-κB y AP-1. . La línea reportera RAW-Blue fue estimulada con la suspensión HAP-S08 en glicina, preadsorbida con (A) OVA o (B) STP o con Alhydrogel en las mismas condiciones por 24hs. Los resultados se expresaron como la media \pm DS del incremento relativo comparándolo contra el control sin estimular de dos experimentos independientes, $n=3$. ANOVA, post test tukey, $p<0,05$

Asimismo se observa una mayor translocación de los factores de transcripción usando OVA en la formulación con HAP-S08 con respecto a la misma formulada con STP ($p < 0,0001$), constatándose el mismo resultado cuando en las formulaciones se usó el adyuvante de referencia ($p < 0,0001$).

En la **figura 5.5** se muestra la inducción de la producción de NO por las formulaciones con HAP-S08 luego de la incubación de las células J774A.1 por 24hs. Se constató que la suspensión de partículas HAP-S08 no induce la producción de NO en las condiciones ensayadas.

En cambio, ambas formulaciones con HAP-S08 estimulan dicha producción con respecto a los antígenos solos (OVA ($p < 0,0001$) y STP ($p < 0,0001$)). También se observó una mayor producción de NO inducida por HAP-S08+OVA y HAP-S08+STP con respecto a la misma formulación con el adyuvante de referencia ($p = 0,0179$ y $p = 0,0051$, respectivamente).

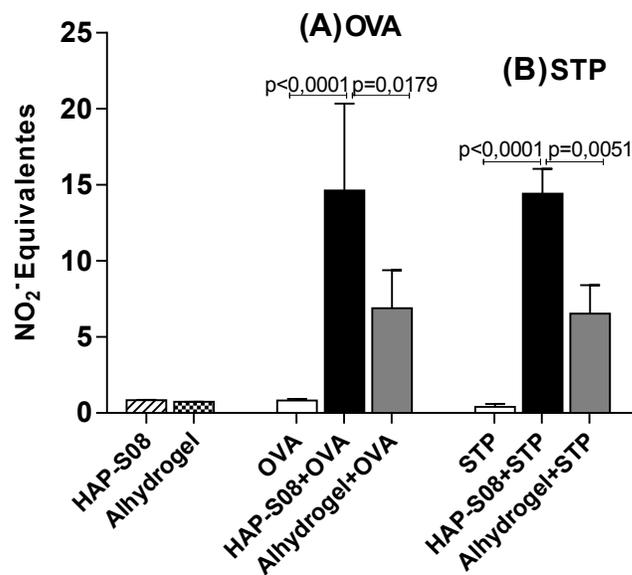


Figura 5.5 Producción de óxido nítrico. La línea murina de macrófagos J774A.1 fue estimulada con la suspensión HAP-S08 en glicina, preadsorbida con (A) OVA o (B) STP o con Alhydrogel en las mismas condiciones por 24hs. Los resultados se expresaron como equivalentes de NO₂⁻ determinado por el reactivo de Griess como la media \pm DS de dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

Asimismo se constató que no hubo diferencia en la producción de NO usando OVA en la formulación con HAP-S08 con respecto a la misma formulada con STP.

También se evaluó la capacidad de la formulación HAP-S08+STP de inducir la producción de las CKs pro-inflamatorias IL-12p70 e IL-1 β , luego de 24hs de estimulación, cuantificadas en el sobrenadante de monocitos/macrófagos J774A.1.

No se detectó IL-12p70 en el sobrenadante de las células J774A.1 estimuladas con HAP-S08 ni HAP-S08+STP con un LD de 8pg/ml.

En la **figura 5.6A** se muestra la producción de la CK pro-inflamatoria IL-1 β por monocitos/macrófagos J774A.1. Se observa que la suspensión sola no estimula la producción de dicha CK.

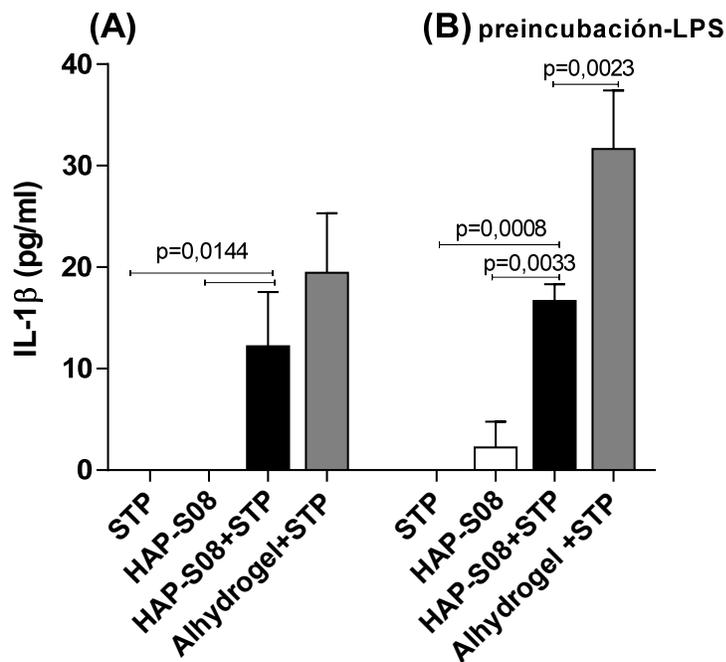


Figura 5.6 Producción de IL-1 β por macrófagos J774A.1 cuantificada en el sobrenadante por ELISA luego de 24hs de estimulación con (A) la suspensión **HAP-S08** preadsorbida con STP en glicina o con Alhydrogel en las mismas condiciones. En paralelo se realizó el mismo experimento (B) Pre-incubando con 10 μ l/ml de LPS durante 2hs. Cada barra representa la media \pm DS de tres o dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, p<0,05.

En cambio, la secreción de esta CK es mayor cuando las células son estimuladas con la formulación HAP-S08+STP con respecto al antígeno solo ($p=0,0144$) y es similar a la obtenida con el adyuvante de referencia.

Asimismo se observó que la producción de IL-1 β inducida por la formulación HAP-S08+STP no aumenta ante un pre-estímulo inicial con LPS. Sí se observa un incremento en dicha producción con la formulación Alydrogel+STP luego del pre-estimulo ($p=0,0144$) (**figura 5.6B**).

Además, se estudió la inducción de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86 y MHC-II) en la línea celular de monocitos/macrófagos murinos J774A.1 por CF. Debido a la alta expresión basal de estas moléculas en dichas células, no se observaron diferencias en la media de intensidad de fluorescencia ni en el porcentaje de células positivas para cada molécula entre el control positivo con LPS+IFN- γ , el negativo con glicina y la formulación HAP-S08+STP (no mostrado).

5.4 Efecto de las formulaciones con FCC-S06 en la activación y maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea

Posteriormente se evaluó la capacidad de las formulaciones con FCC-S06 de estimular el sistema inmune innato evaluando el efecto de las mismas en la activación y maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC).

Inicialmente se evaluó si las formulaciones inducen la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86 y MHC-II), marcadores de activación y maduración de BMDCs, producidas a partir de precursores de medula ósea de ratones C57BL/6J *wild type*, por CF.

En la **figura 5.7** y **5.8** se muestra la media de intensidad de fluorescencia (*del inglés*, MFI) y el porcentaje de células positivas en BMDCs de la expresión de moléculas co-estimuladoras luego de la incubación por 24hs con las formulaciones FCC-S06+OVA y FCC-S06+STP respectivamente, comparándola con la inducida por el adyuvante de referencia en las mismas condiciones.

Como se muestra en la **figura 5.7A** para la molécula CD40 no se observa diferencia en el MFI inducido por la formulación FCC-S06+OVA con respecto a OVA, mientras que se observa un aumento con respecto a Alhydrogel+OVA ($p=0,0026$). Se observa un resultado similar para el marcador MHC-II (**figura 5.7D**) con un $p=0,0273$.

En cuanto al porcentaje de células positivas para el marcador CD40 se observa en la **figura 5.7E** un aumento con respecto a la formulación con el adyuvante de referencia ($p=0,0083$) y una disminución con respecto al antígeno ($p=0,0335$) cuando las células fueron incubadas con la formulación FCC-S06+OVA. Mientras que no se observa diferencia en dicho porcentaje para la molécula MHC-II (**figura 5.7H**).

En cambio, se observa un aumento en la expresión de CD80 (**figura 5.7B**) y CD86 (**figura 5.7C**) luego de la estimulación de las BMDCs con FCC-S06+OVA con respecto al antígeno solo con un $p=0,0016$ y $p=0,0257$, respectivamente. Además, se observa un aumento en el porcentaje de células positivas para los

marcadores anteriores inducido por la formulación con respecto al antígeno ($p=0,0041$ para CD80 (figura 5.7F) y $p=0,0083$ para CD86 (figura 5.7G)).

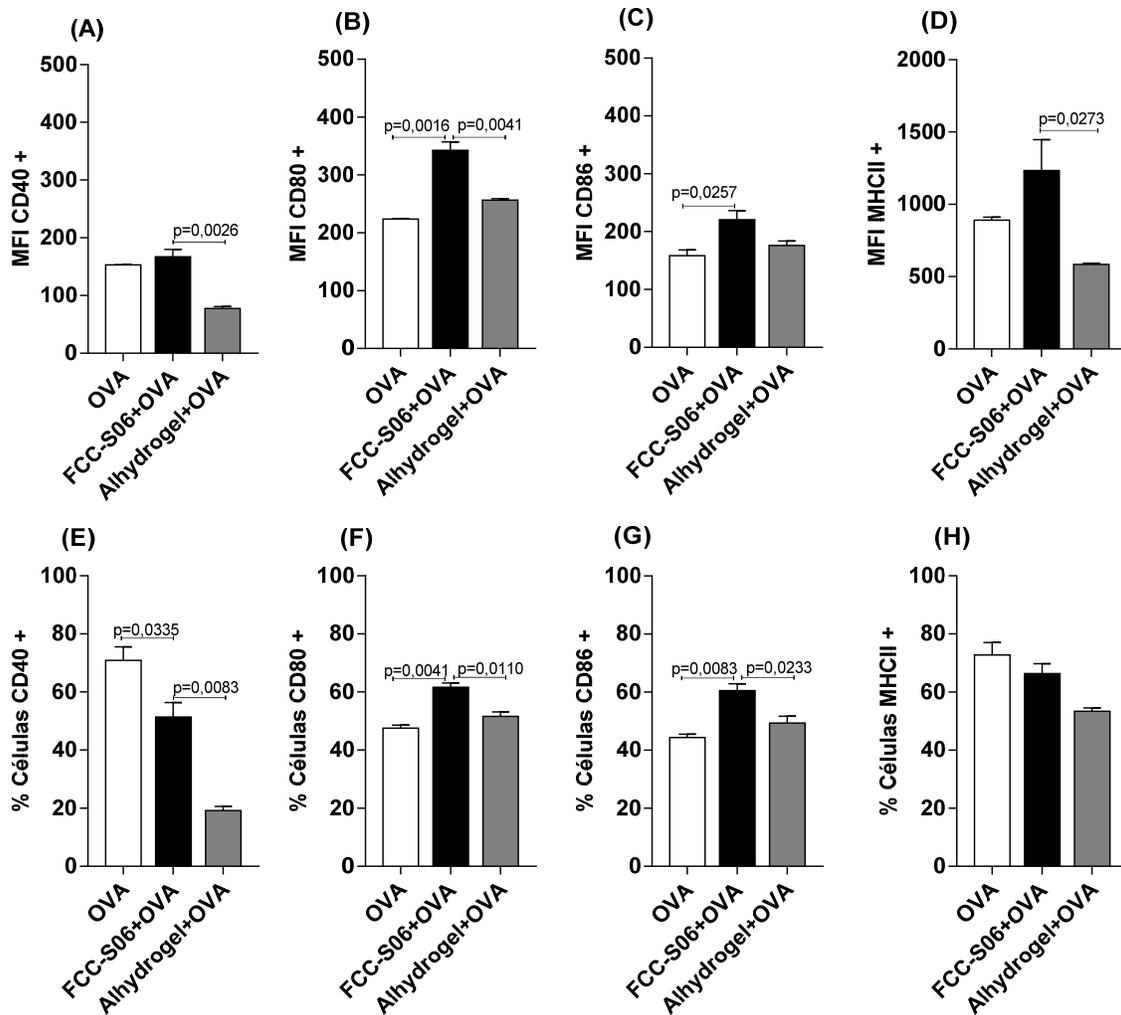


Figura 5.7: Inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs. Estas células fueron incubadas durante 24hs en presencia de la suspensión FCC-S06 preadsorbida con OVA en glicina o con Alhydrogel en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se marcaron empleando anticuerpos conjugados específicos para CD40, CD80, CD86 y MHC-II. Cada barra representa la media de intensidad de fluorescencia (MFI) \pm DS (A-D) y la media del porcentaje de células positivas \pm DS (E-H) de $n=2$, de un experimento representativo ($n=3$). ANOVA, post test tukey, $p<0,05$.

También, se constató que la expresión de CD80 fue superior con la formulación FCC-S06+OVA observando tanto el MFI ($p=0,0041$) como el porcentaje de células positivas ($p=0,0110$) a la generada por el adyuvante de referencia en las mismas condiciones. Mientras que el MFI de la expresión de

CD86 fue similar entre ambas formulaciones, observándose un aumento de células positivas para este marcador con FCC-S06+OVA con respecto a Alhydrogel+OVA ($p=0,0233$)

Como se muestra en la **figura 5.8A-D** no se observa diferencia en el MFI de la expresión de las cuatro moléculas co-estimuladoras cuando las BMDCs fueron estimuladas con la formulación FCC-S06+STP con respecto al antígeno solo.

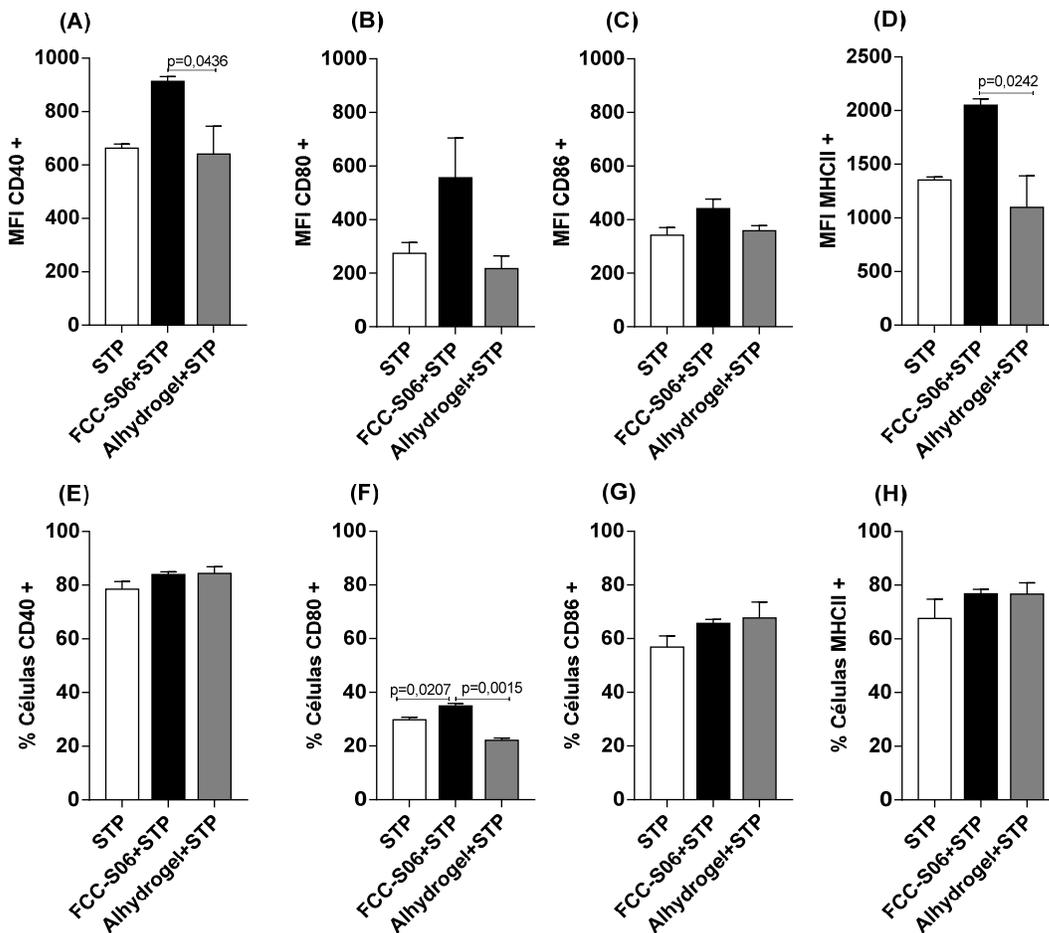


Figura 5.8: Inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs. Estas células fueron incubadas durante 24hs en presencia de la suspensión FCC-S06 preadsorbida con STP en glicina o con Alhydrogel en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se marcaron empleando anticuerpos conjugados específicos para CD40, CD80, CD86 y MHC-II. Cada barra representa la media de intensidad de fluorescencia (MFI) \pm DS (A-D) y la media del porcentaje de células positivas \pm DS (E-H) de $n=2$, de un experimento representativo ($n=3$). ANOVA, post test tukey, $p<0,05$.

En cambio se encontró un aumento en el porcentaje de células positivas inducido por FCC-S06+STP con respecto al antígeno solo para el marcador CD80, $p=0,0207$ (**figura 5.8F**).

También se observa un aumento en el MFI inducido por la formulación con respecto a Alhydrogel+STP para los marcadores CD40 ($p=0,0436$) y MHC-II ($p=0,0242$), no observándose diferencia en el porcentaje de células positivas.

Además, a menores concentraciones de ambas formulaciones con FCC-S06 (diluciones 1:10 y 1:100), no se observa un aumento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras evaluadas (no mostrado).

Seguidamente se determinó la cantidad de ARN mensajero en BMDCs de genes involucrados en la respuesta inmune cuantificados por RT-qPCR luego de la incubación con FCC-S06+STP por 24hs. La media del incremento relativo al grupo control (glicina) de los ARNm normalizados con respecto al mensajero de β -microglobulina se muestran en la **figura 5.9**.

Como se observa en la **figura 5.9** se constató que la formulación FCC-S06+STP induce la transcripción de los genes para IL-6 ($p=0,0013$) (involucrada en la diferenciación de linfocitos T al perfil Th17, síntesis de proteínas de fase aguda e inducción de la proliferación de células B productoras de anticuerpos), TNF- α ($p=0,0004$) (involucrado en la activación de células endoteliales generando inflamación, apoptosis celular y activación de neutrófilos), IL-23 ($p=0,005$) (involucrada en el mantenimiento de células T productoras de IL-17), pro-IL-1 β ($p=0,007$) (involucrada en la activación de células endoteliales generando inflamación y diferenciación de células T al perfil Th17 y síntesis de proteínas de fase aguda) y pro-caspasa 1 ($p=0,0092$) (involucrada en el clivado de pro-IL-18 y pro-IL-1 β)²²⁰ con respecto al antígeno solo.

En cambio no se observó inducción de la expresión de genes que codifican para IL-12p35 (involucrada en la diferenciación de linfocitos T al perfil Th1 y el aumento de la actividad citotóxica induciendo a células T y NK a sintetizar IFN- γ), IL-10 (induce la inhibición de la producción de IL-12, moléculas co-

estimuladoras y MHC-II en DCs y macrófagos), pro-IL-18 (induce la síntesis de IFN- γ en células T y NK, en monocitos la expresión de GM-CSF, TNF- α , IL-1 β y la activación y secreción de CK en neutrófilos)²²⁰ y NLRP3, comparándola con la inducida por el antígeno solo.

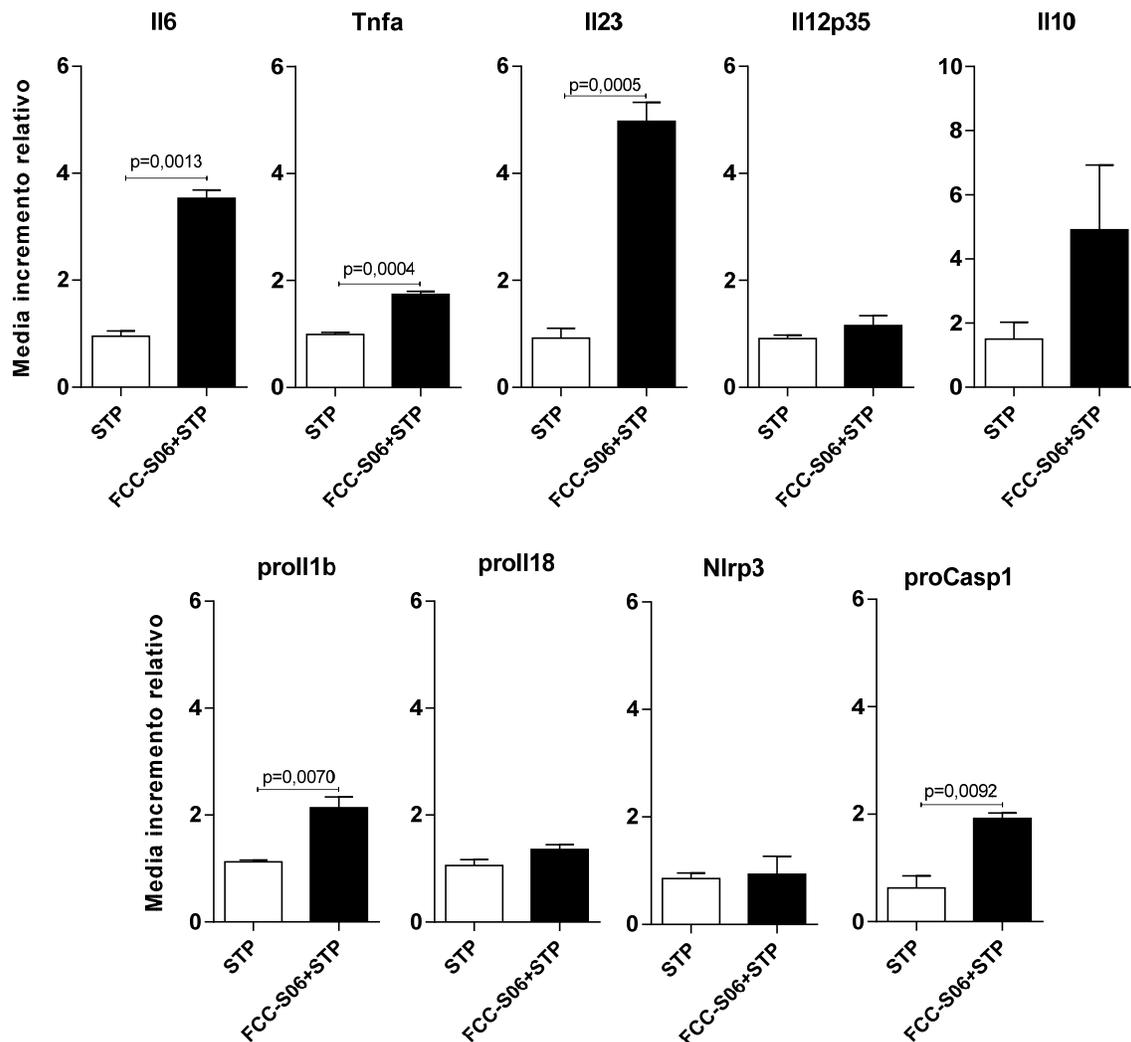


Figura 5.9: Perfil transcripcional de genes de citoquinas pro-inflamatorias y del inflamasoma en BMDCs inducidos luego de la incubación con la formulación FCC-S06+STP en glicina o el antígeno solo en las mismas condiciones. A las 24hs se realizó la extracción de los mensajeros totales y síntesis de ADNc. El nivel relativo de ARNm para cada gen fue normalizado empleando como gen de referencia la β -microglobulina. Las barras (n=3) representa la media \pm DS del incremento relativo de los ARNm normalizados, respecto al grupo control (glicina) de dos o tres experimentos independientes. t de student no pareado $p < 0,05$.

Cabe mencionar que en este ensayo y el que sigue a continuación no se muestran los resultados observados para la formulación con el adyuvante de referencia debido a que se observaron artefactos (léase, no se observaron curvas Ct exponenciales de amplificación de los genes, tanto de interés como el de referencia) y suponemos pueden deberse a la concentración de aluminio en las muestras.

En la **figura 5.10** se observa el perfil transcripcional de genes de quimioquinas en BMDCs inducidos luego de la incubación con la formulación FCC-S06+STP.

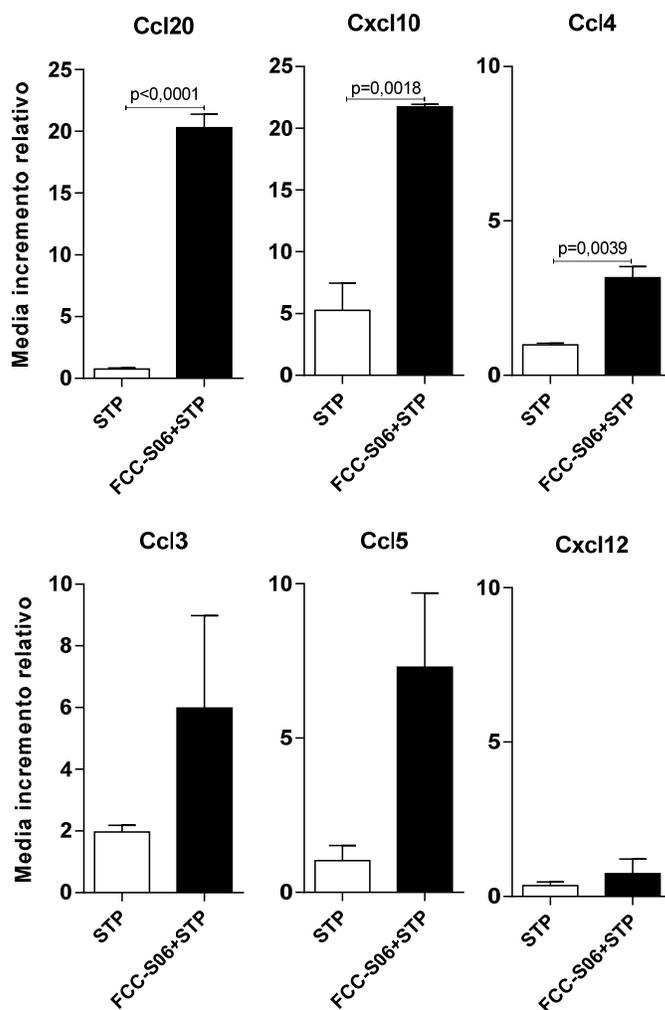


Figura 5.10: Perfil transcripcional de genes C-c y C-X-c de quimioquinas en BMDCs inducidos luego de la incubación con la formulación FCC-S06+STP en glicina o el antígeno solo en las mismas condiciones. A las 24hs se realizó la extracción de los mensajeros totales y síntesis de ADNc. El nivel relativo de ARNm para cada gen fue normalizado empleando como gen de referencia la β -microglobulina. Las barras (n=3) representa la media \pm DS del incremento relativo de los ARNm normalizados, respecto al grupo control (glicina) de dos o tres experimentos independientes. t de student no pareado $p < 0,05$.

Se determinó un aumento inducido por la formulación con FCC-S06+STP con respecto al antígeno solo para los genes que codifican para CCL20

(involucrada en el reclutamiento de células Th17 y posicionamiento de DCs en los tejidos) ($p=0,001$), CXCL10 (involucrada en el reclutamiento de células T efectoras) ($p=0,0018$) y CCL4 (involucrada en el reclutamiento de células T, DC, monocitos y células NK) ($p=0,0039$)²²⁰.

En cambio, no se observó inducción de la expresión de genes que codifican para CCL3, CCL5 y CXCL12 (involucradas en el reclutamiento leucocitario)²²⁰, comparándola con la inducida por el antígeno solo.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de la formulación FCC-S06+STP en las mismas condiciones anteriores de inducir la secreción de las CKs pro-inflamatorias IL-12p70 e IL-1 β , luego de 24hs de estimulación. Dichas CKs fueron cuantificadas por ELISA en el sobrenadante de BMCDs.

Como se observa en el **figura 5.11** no se detectó secreción de IL-12p70 en las condiciones ensayadas con Alhydrogel+STP, ni con el antígeno solo, con un límite de detección de 8pg/ml.

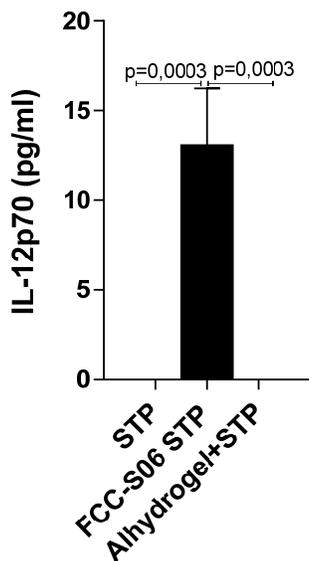


Figura 5.11: Producción de IL-12p70 por BMDCs cuantificada en sobrenadantes por ELISA luego de 24hs de estimulación con la formulación **FCC-S06** preadsorbida con STP en glicina o la formulación con el adyuvante de referencia o el antígeno solo en las mismas condiciones. Cada barra representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, $n=3$. ANOVA, post test tukey, $p<0,05$.

En cambio, la formulación FCC-S06+STP induce la secreción por BMDCs de IL-12p70 con respecto al antígeno solo ($p=0,003$) y a la formulación con el adyuvante de referencia ($p=0,003$) (**figura 5.11**).

Cabe destacar que este resultado no es necesariamente contradictorio con el encontrado en la inducción de la expresión de genes mencionado previamente, ya que se cuantificó el ARN mensajero del gen que codifica para la subunidad p35 del heterodímero de la proteína IL-12p70.

En la **figura 5.12**, panel **A**, se muestra la secreción de IL-1 β por BMDCs *wild type*. No se observó una inducción en la secreción de dicha CK por el antígeno solo, la cual fue comparable a la inducida por la suspensión FCC-S06. Mientras que se observa una producción 10 veces superior con la formulación FCC-S06+STP con respecto a la suspensión sola ($p < 0,0001$).

Asimismo se repitió el ensayo pre-incubando las BMDCs con 10 μ g/ml de LPS durante 2hs, con el objetivo de evaluar si la secreción de IL-1 β requiere de una señal inicial TLR dependiente que activa la transcripción del gen de la pro-IL-1 β (como se menciona en la introducción).

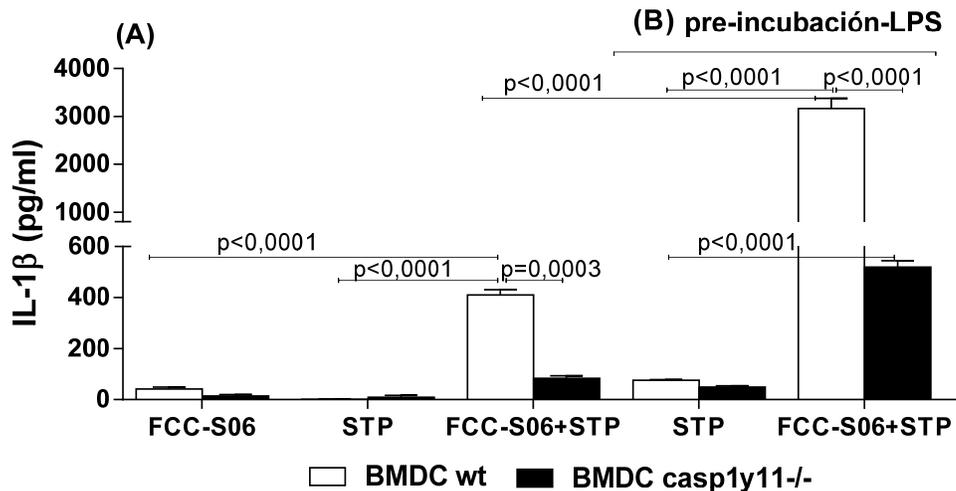


Figura 5.12: Producción de IL-1 β por BMDCs wt y BMDCs casp1y11-/- cuantificada por ELISA luego de 24hs de estimulación con (A) la formulación FCC-S06 preadsorbida con STP en glicina o con la suspensión sola o el antígeno solo en las mismas condiciones. En paralelo se repitió el mismo experimento (B) Pre-incubando con 10 μ g/ml de LPS durante 2hs, incubando con la formulación FCC-S06+STP o STP sola. Cada barra representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

Como se muestra en el panel **B** de la **figura 5.12** se observó un incremento casi 8 veces superior en la cuantificación de esta CK luego de la estimulación con la formulación en estas condiciones con respecto a la observada sin una

incubación previa con LPS ($p < 0,0001$). Comportamiento no observado con el antígeno solo, ya que no se encuentra una diferencia en dicha secreción en las dos condiciones ensayadas.

Cabe aclarar que luego de la pre-incubación con LPS, las células no fueron lavadas, por lo que no se puede descartar una co-incubación con el agonista de TLR4. Observándose un efecto sinérgico entre el agonista y la formulación en la inducción aumentada de la producción de IL-1 β , como fue reportado por otros²²¹.

Conjuntamente se evaluó si la secreción de IL-1 β es dependiente de caspasa 1 y 11, repitiendo en paralelo el mismo ensayo con BMDCs derivadas de precursores de ratones C57BL/6J deficientes en caspasa 1 y 11.

En la **figura 5.12** se muestra la inducción por la formulación FCC-S06+STP en la secreción por BMDCs *casp1y11-/-* de esta CK luego de 24hs de incubación. Se observa una marcada disminución luego de la incubación con la formulación FCC-S06+STP en la secreción de IL-1 β por BMDCs deficientes en caspasa 1 y 11 que por la producida por BMDCs *wild type*, tanto con ($p < 0,0001$) o sin ($p = 0,0003$) previa pre-incubación con LPS.

A pesar de lo anterior, se observa una secreción (reducida) de IL-1 β en las BMDCs *casp1y11-/-* inducida por la formulación con respecto al antígeno solo, tanto con ($p < 0,0001$) o sin ($p < 0,0001$) previa pre-incubación con LPS. El clivado de esta CK puede deberse a la presencia de otras proteasas como por ejemplo, la catepsina G.

En este ensayo no se incluyó el adyuvante de referencia debido a que, como ya fue descrito en la introducción, la inducción en la secreción de IL-1 β por compuestos de aluminio está reportado por varios autores.

Los resultados del presente ensayo sugieren que la formulación con FCC-S06+STP tendría la capacidad de activar el inflammasoma NLRP3 en BMDCs, lo que induciría la activación y maduración de estas células.

5.5 Efecto de las formulaciones con HAP-S08 en la activación y maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea

Se repitieron los mismos ensayos que en el apartado anterior para evaluar la activación y maduración de BMDCs inducida por formulaciones con HAP-S08. Inicialmente se también evaluó la capacidad por estas formulaciones de inducir la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs.

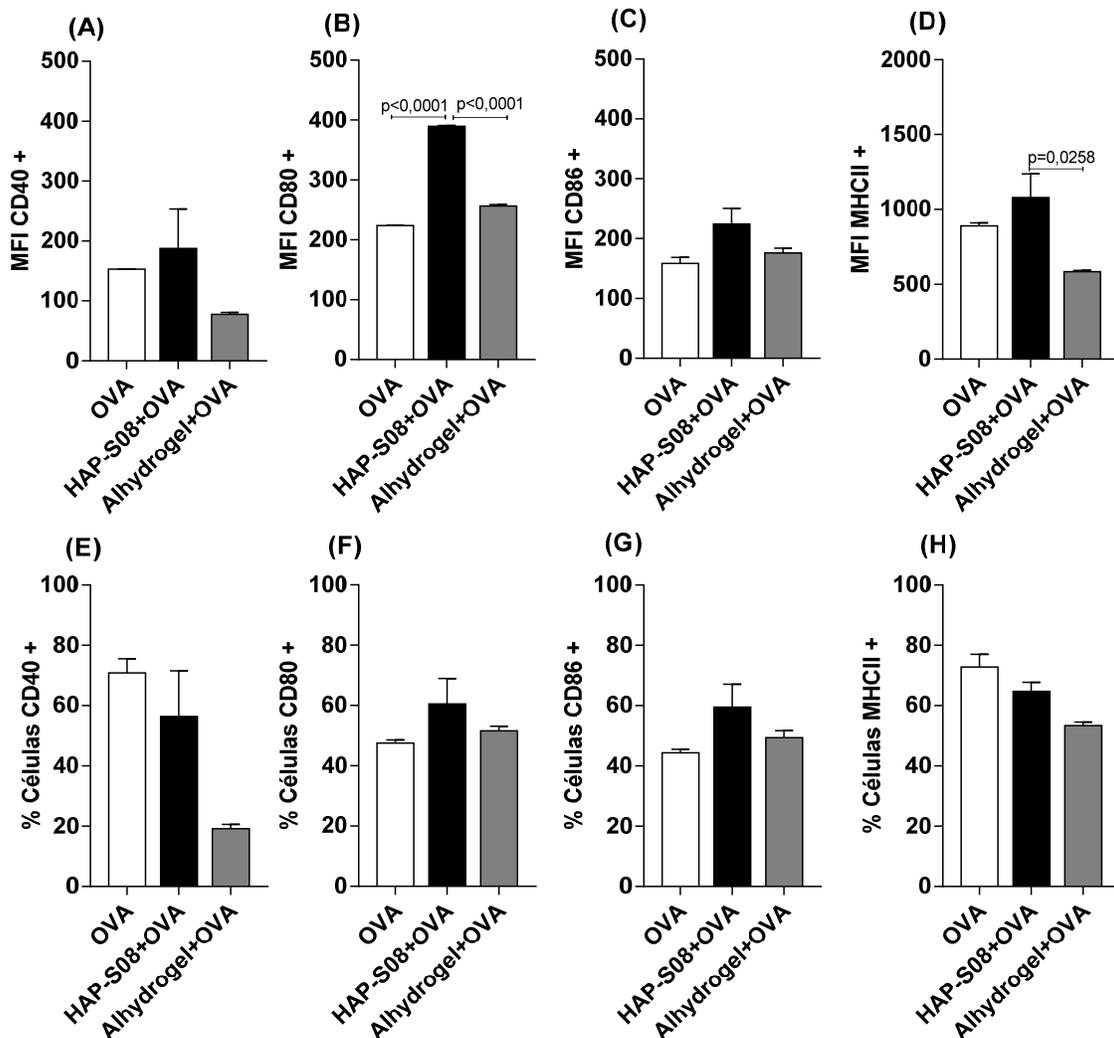


Figura 5.13: Inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs. Estas células fueron incubadas durante 24hs en presencia de la suspensión **HAP-S08** preadsorbida con **OVA** en glicina o con Alhydrogel en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se marcaron empleando anticuerpos conjugados específicos para CD40, CD80, CD86 y MHC-II. Cada barra representa la media de intensidad de fluorescencia (MFI) \pm DS (A-D) y la media del porcentaje de células positivas \pm DS (E-H) de $n=2$, de un experimento representativo ($n=3$). ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

En la **figura 5.13A-D** se muestra la MFI de la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs luego de la incubación por 24hs con formulaciones de HAP-S08+OVA, comparándola con la inducida por el antígeno y la formulación con el adyuvante de referencia en las mismas condiciones.

Como se observa en la **figura 5.13B**, HAP-S08+OVA aumenta la expresión de CD80 con respecto al antígeno solo y a Alhydrogel+OVA ($p < 0,0001$).

También la formulación con HAP-S08+OVA aumenta la expresión de MHC-II con respecto a Alhydrogel+OVA ($p = 0,0258$).

Además, no se encontraron diferencias entre la formulación HAP-S08+OVA, OVA y Alhydrogel+OVA en el porcentaje de células positivas para cada marcador.

Mientras que como se observa en la **figura 5.14C** HAP-S08+STP aumenta la expresión de CD86 con respecto al antígeno solo ($p = 0,0175$) y a la formulación con Alhydrogel+STP ($p = 0,0263$).

Para el resto de las moléculas evaluadas la expresión es similar con HAP-S08+STP, la formulación con el adyuvante de referencia y STP.

Además, no se encontraron diferencias en el porcentaje de células positivas para cada marcador, a excepción de CD80, donde HAP-S08+STP induce un porcentaje mayor de células positivas que la misma formulación con Alhydrogel ($p = 0,0070$).

Tampoco, se observó un aumento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras evaluadas a menores concentraciones de las formulaciones (diluciones 1:10 y 1:100) (no mostrado).

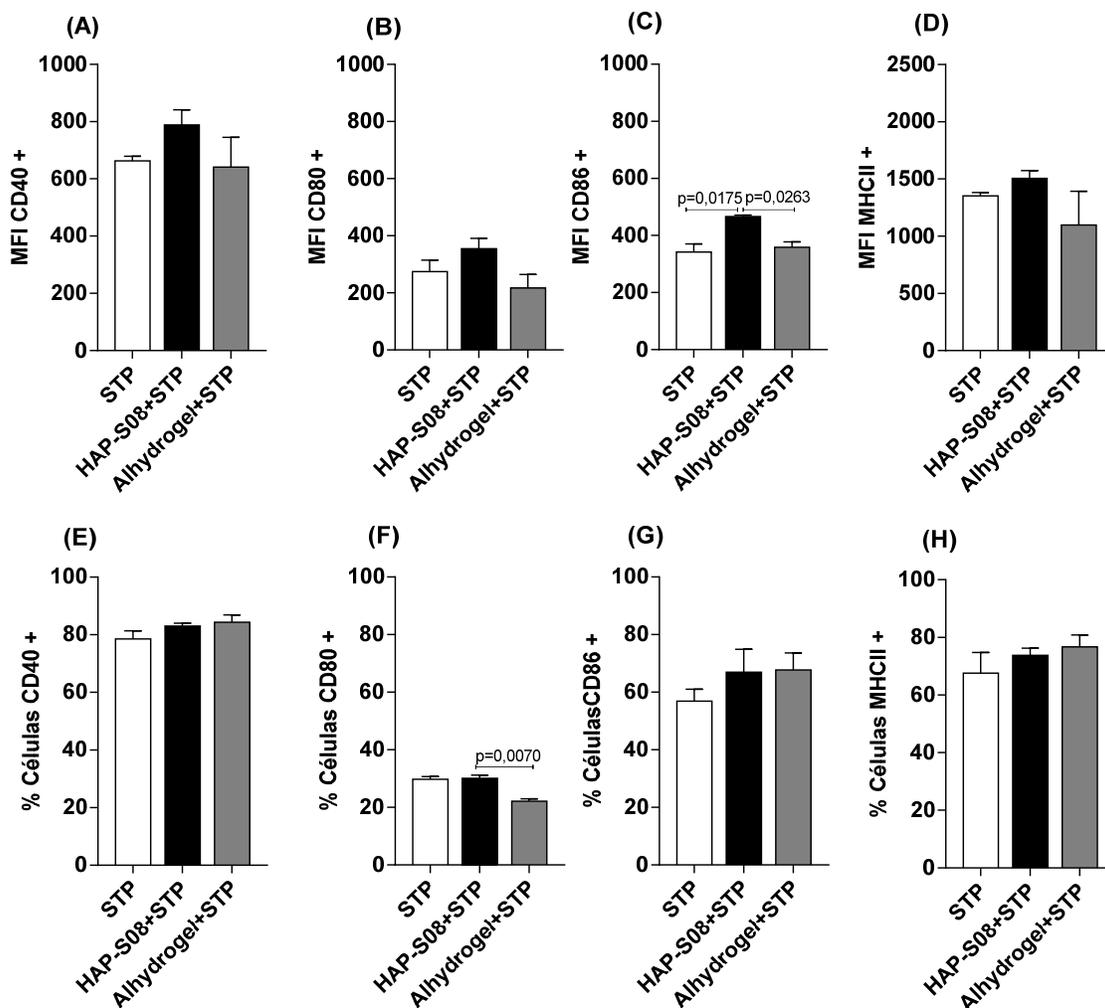


Figura 5.14: Inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs. Estas células fueron incubadas durante 24hs en presencia de la suspensión HAP-S08 preadsorbida con STP en glicina o con Alhydrogel en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se marcaron empleando anticuerpos conjugados específicos para CD40, CD80, CD86 y MHC-II. Cada barra representa la media de intensidad de fluorescencia (MFI) \pm DS (A-D) y la media del porcentaje de células positivas \pm DS (E-H) de n=2, de un experimento representativo (n=3). ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

A continuación se evaluó el perfil transcripcional de genes involucrados en la respuesta inmune en BMDCs por RT-qPCR. Como se observa en la **figura 5.15** se constató que la formulación HAP-S08+STP induce la transcripción de los genes para IL-6, TNF- α , IL-23, IL-12p35, IL-10, pro-IL-1 β , NLRP3 y pro-caspasa

1, con respecto al antígeno solo ($p=0,0345$, $p=0,0001$, $p=0,005$, $p=0,009$, $p=0,005$, $p=0,041$, $p=0,088$ y $p=0,0025$ respectivamente).

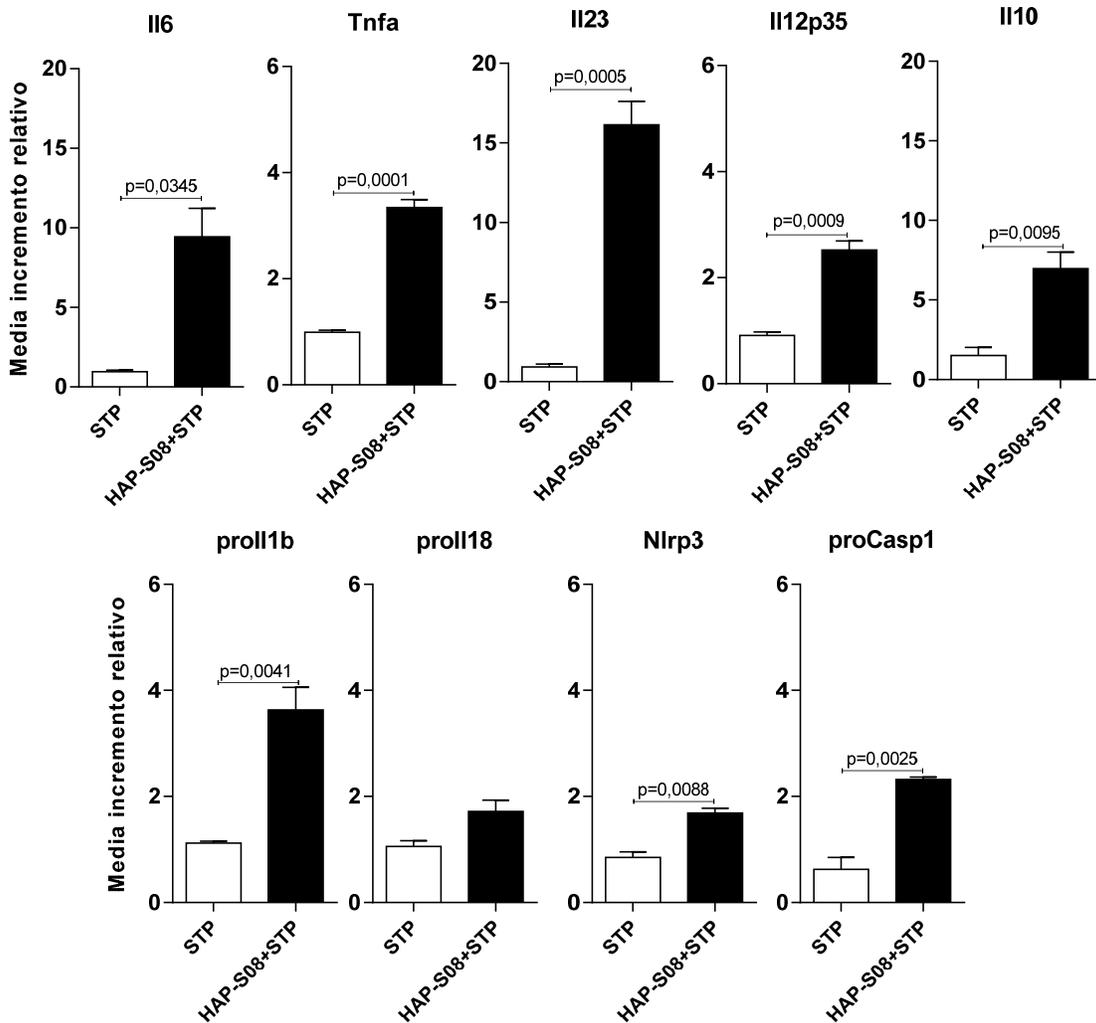


Figura 5.15: Perfil transcripcional de genes de citoquinas pro-inflamatorias y del inflammasoma en BMDC inducidos luego de la incubación con la formulación HAP-S08+STP en glicina o el antígeno solo en las mismas condiciones. A las 24hs se realizó la extracción de los mensajeros totales y síntesis de ADNc. El nivel relativo de ARNm para cada gen fue normalizado empleando como gen de referencia la β -microglobulina. Las barras ($n=3$) representa la media \pm DS del incremento relativo de los ARNm normalizados, respecto al grupo control (glicina) de dos o tres experimentos independientes. t de student no pareado $p<0,05$.

En cambio no se observó inducción de la expresión del gen que codifica para pro-IL-18, comparándola con la generada por el antígeno solo.

Además se evaluó el perfil transcripcional de genes de quimioquinas en BMDCs inducidos por formulación HAP-S08+STP luego de una incubación por 24hs.

Como se observa en la **figura 5.16** se determinó un aumento inducido por la formulación con HAP-S08+STP con respecto al antígeno solo para los genes que codifican para CCL20 ($p=0,004$), CCL4 ($p=0,0362$), CCL3 ($p=0,0001$) y CCL5 ($p=0,0027$).

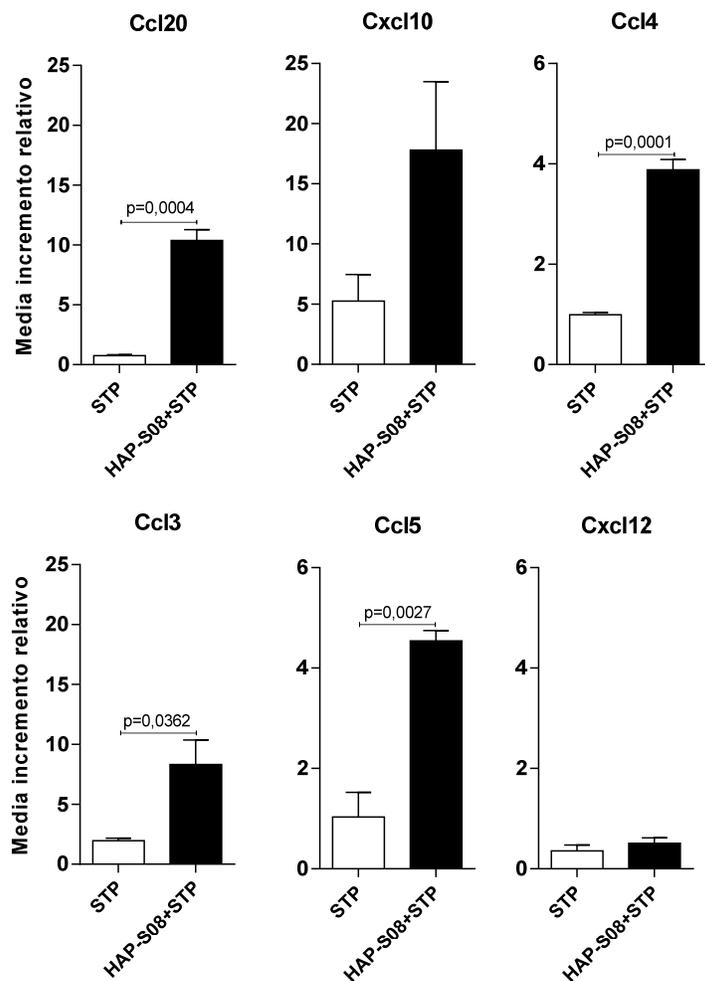


Figura 5.16 Perfil transcripcional de genes C-c y C-X-c de quimioquinas en BMDCs inducidos luego de la incubación con la formulación HAP-S08+STP en glicina o el antígeno solo en las mismas condiciones. A las 24hs se realizó la extracción de los mensajeros totales y síntesis de ADNc. El nivel relativo de ARNm para cada gen fue normalizado empleando como gen de referencia la β -microglobulina. Las barras (n=3) representa la media \pm DS del incremento relativo de los ARNm normalizados, respecto al grupo control (glicina) de tres experimentos independientes. T de student no pareado $p < 0,05$

En cambio no se observó inducción en la expresión de genes que codifican para CXCL10 y CXCL12, comparándola con la generada por el antígeno solo.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de la formulación HAP-S08+STP en las mismas condiciones anteriores de inducir la secreción de las CKs pro-inflamatorias IL-12p70 e IL-1 β , luego de 24hs de estimulación, cuantificadas en el sobrenadante de BMCDs, tituladas por ELISA.

Como se observa en la **figura 5.17** la formulación HAP-S08+STP induce la secreción de IL-12p70 con respecto al antígeno solo ($p < 0,0001$) y a la formulación con Alhydrogel ($p < 0,0001$). Mientras que la secreción por el antígeno fue inferior al LD de 8pg/ml.

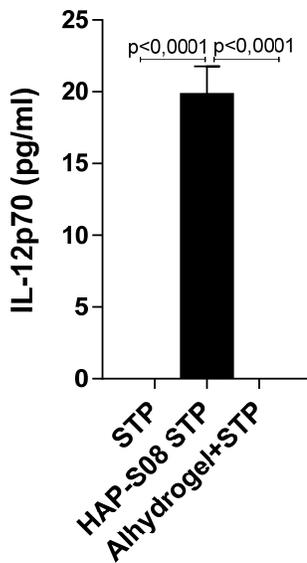


Figura 5.17: Producción de IL-12p70 por BMDCs cuantificada en sobrenadantes por ELISA luego de 24hs de estimulación con la formulación **HAP-S08** preadsorbida con STP en glicina o la formulación con el adyuvante de referencia o el antígeno solo en las mismas condiciones. Cada barra representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, $n=3$. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

En la **figura 5.18**, panel A, se muestra la secreción de IL-1 β por BMDCs producidas a partir de precursores de medula ósea de ratones C57BL/6J *wild type*. Se observa que la secreción de dicha CK inducida por la suspensión sola o el antígeno solo es inferior al LD del ensayo. Mientras que se constató un aumento inducido por la formulación HAP-S08+STP en las mismas condiciones anteriores con respecto al antígeno ($p < 0,0001$) y a la suspensión sola ($p < 0,0001$).

En paralelo, se repitió el ensayo pre-incubando las BMDCs con 10 μ g/ml de LPS durante 2hs. Como se observa en el panel B de la **figura 5.18** se obtuvo un incremento considerable en la cuantificación de esta CK luego de la estimulación

con la formulación en estas condiciones con respecto a la observada sin una incubación previa con LPS ($p < 0,0001$).

Asimismo se evaluó si la secreción de IL-1 β por la formulación HAP-S08+STP es dependiente de caspasa 1 y 11, realizando el mismo ensayo anterior con BMDCs derivadas de precursores de ratones C57BL/6J deficientes en caspasa 1. En la **figura 5.18** se muestra la secreción de esta CK por la formulación HAP-S08+STP en las mismas condiciones anteriores por BMDCs *casp1y11*^{-/-}. Se observa que la secreción de IL-1 β inducida por la formulación HAP-S08+STP es inferior en las BMDCs deficientes en caspasa 1 y 11, que por la producida por BMDCs *wild type*, tanto en el ensayo sin una pre-incubación con LPS previa ($p < 0,0001$) como con dicha pre-incubación ($p < 0,0001$).

Lo anterior sugiere que la formulación con HAP-S08 tendría la capacidad de activar el inflamasoma NLRP3 en BMDCs, lo que induce la activación y maduración de este tipo celular.

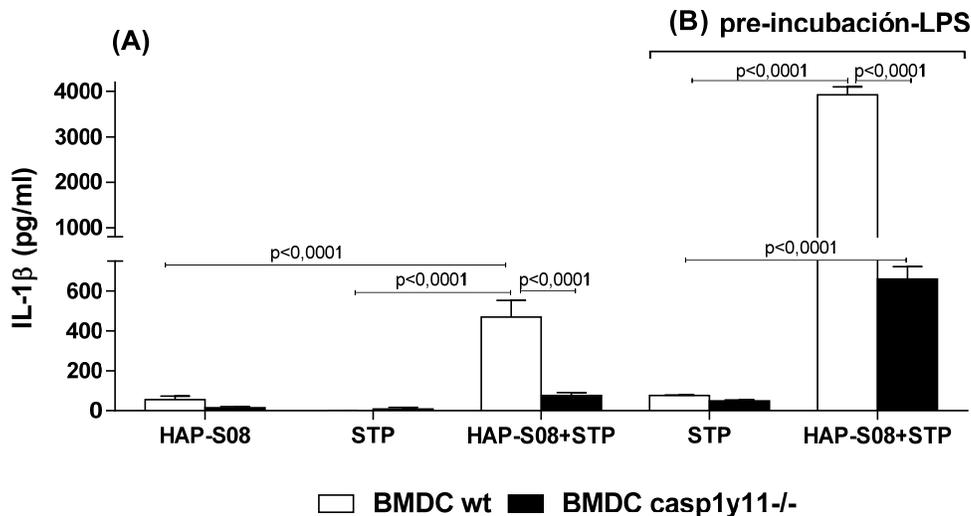


Figura 5.18: Producción de IL-1 β por BMDCs wt y BMDCs *casp1y11*^{-/-} cuantificada por ELISA luego de 24hs de estimulación con (A) la formulación HAP-S08 preadsorbida con STP en glicina o con la suspensión sola o el antígeno solo en las mismas condiciones. En paralelo se repitió el mismo experimento (B) pre-incubando con 10 μ g/ml de LPS durante 2hs, incubando con la formulación HAP-S08+STP o STP sola. Cada barra representa la media \pm DS de dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

5.6 Efecto de la suspensión FCC-S06 en la captación, procesamiento y acumulación del antígeno DQ-OVA por células presentadoras

Con el objetivo de determinar si la formulación con FCC-S06 induce la captación, procesamiento por la vía endosomal, (requerimiento para la presentación en el contexto de MHC-II) y acumulación antigénica en células presentadoras (BMDC y J774A.1) se utilizó el antígeno DQ-OVA.

El antígeno DQ-OVA, se encuentra altamente conjugado con un fluoróforo BODIPY “self-quenched”. Al entrar en la vía fagocítica, este fluoróforo emite una señal en el canal verde (FITC) que puede ser visualizado por CF y evidencia el procesamiento antigénico, cuando la proteína es degradada en condiciones ácidas por enzimas lisosomales. Además, cuando los fragmentos de la proteólisis se acumulan en grandes cantidades en los compartimientos endosomales, este fluoróforo forma excímeros que exhiben fluorescencia en el canal rojo (PE)^{179,192,198,199}, lo que evidencia la acumulación de dichos fragmentos en las células presentadoras de antígenos.

Para este ensayo ambos tipos celulares fueron incubados en 3 condiciones: (1) 15min a 37°C para evaluar internalización y procesamiento temprano, (2) 24hs a 37°C, para evaluar internalización y procesamiento tardío, y (3) 4°C por 24hs, como control de endocitosis basal o pasiva y de interacción no específica de la proteína marcada con las células.

En la **figura 5.19** panel superior, se muestra el MFI cuando las células (J774A.1 y BMDC) fueron estimuladas por las formulaciones (FCC-S06+DQ-OVA y Ahhydrogel+DQ-OVA) o el antígeno solo en las tres condiciones mencionadas.

Como se observa en la **figura 5.19**, en la incubación a 4°C no se constató diferencia en el procesamiento ni en la acumulación de DQ-OVA, cuando las células fueron estimuladas por las formulaciones o el antígeno solo, comportamiento observado tanto en BMDCs como en macrófagos murinos J774A.1. Lo anterior demuestra que no se evidencia una interacción inespecífica ni endocitosis basal del antígeno importante en las condiciones ensayadas.

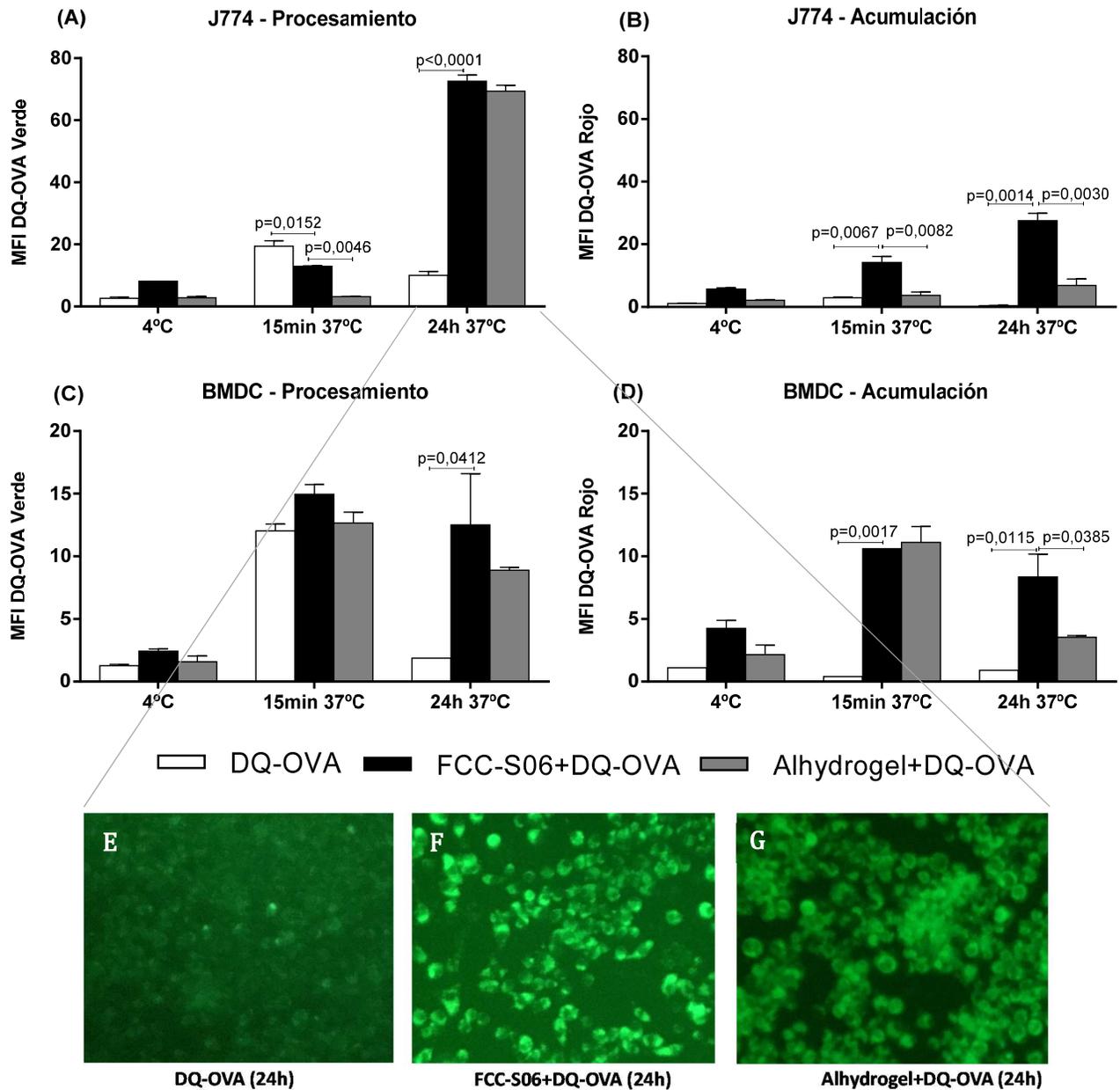


Figura 5.19 Panel superior: Efecto en la captación, procesamiento y acumulación del antígeno DQ-OVA en (A-B) macrófagos J774A.1 y (C-D) BMDCs luego de la estimulación con 100µg/ml la formulación FCC-S06+DQ-OVA (relación 1:20) en glicina, comparándolo con el causado incubando con Alhydrogel o DQ-OVA sola en las mismas condiciones. Este experimento se llevó a cabo en dos tiempos: 15min y 24hs incubando a 37°C. El control de captación basal se realizó incubando a 4°C. La cantidad de OVA internalizada y procesada se midió como fluorescencia en el canal verde, mientras que la acumulada se midió en el canal rojo. Cada barra representa la intensidad media de fluorescencia \pm DS de tres o dos experimentos independientes, n=3. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

Panel inferior: Microscopía de fluorescencia 50X de macrófagos J774A.1 luego de 24hs de incubación con (E) DQ-OVA (F) FCC-S06+DQ-OVA (G) Alhydrogel+DQ-OVA y posterior al lavado de las células para eliminar el exceso de DQ-OVA.

Con respecto a la captación antigénica a tiempos tempranos (incubación a 37°C por 15 minutos), en la **figura 5.19A** se observa la MFI en los J774A.1 donde se evidencia que el procesamiento en los compartimientos endosomales para el antígeno DQ-OVA es mayor con respecto a la formulación con FCC-S06 ($p=0,0152$) y a la formulación con Alhydrogel ($p=0,0011$). Asimismo se observa que la formulación con FCC-S06 induce el procesamiento antigénico de manera más efectiva que la formulación con Alhydrogel ($p=0,0046$). En cambio, este resultado se revierte y se observa que la formulación con FCC-S06 induce una acumulación de los fragmentos antigénicos mayor con respecto DQ-OVA y a la formulación con Alhydrogel ($p=0,0067$ y $0,0082$, respectivamente) (**Figura 5.19B**).

En cuanto al procesamiento antigénico a tiempos tardíos (incubación a 37°C por 24 horas), en la **figura 5.19A** se observa en los J774A.1 que también se revierte la situación con respecto al procesamiento temprano y se observa un aumento en el procesamiento de DQ-OVA inducido por las dos formulaciones con respecto al antígeno solo ($p<0,0001$).

En el panel inferior de la **figura 5.19** se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia para el resultado anterior donde se evidencia la diferencia en la intensidad de fluorescencia en las células estimuladas con DQ-OVA y las formulaciones.

Además, en la **figura 5.19B** para la incubación por 24hs a 37°C, se observa un comportamiento similar al encontrado en la incubación por 15min a 37°C, donde la formulación con FCC-S06 induce una acumulación de los fragmentos antigénicos mayor con respecto DQ-OVA y a la formulación con Alhydrogel ($p=0,0014$ y $0,0030$, respectivamente).

Observando la **figura 5.19C**, centrándonos en la MFI observada para las BMDCs en el procesamiento antigénico a tiempos tempranos, se evidencia que no hay diferencia entre DQ-OVA y las formulaciones con FCC-S06 y Alhydrogel. En cambio como se observa en la **figura 5.19D**, se constató una MFI superior para la acumulación de los fragmentos antigénicos inducido por la formulación FCC-

S06 con respecto a DQ-OVA ($p=0,0017$). También, se observó un comportamiento similar inducido por la formulación con Alhydrogel ($p=0,0015$).

En cuanto a los resultados obtenidos para el procesamiento antigénico tardío y la acumulación antigénica durante la incubación de BMDCs por 24hs con las formulaciones y el antígeno solo. Se observó un comportamiento similar al encontrado con los macrófagos murinos J774A.1 (**Figura 5.19 C y D**).

De los resultados anteriores se puede resaltar que la incubación con la formulación FCC-S06+DQ-OVA induce la captación, procesamiento y acumulación del antígeno en ambas APC.

De manera interesante no se observa acumulación de DQ-OVA en ambos tipos celulares ni en ninguna de las tres condiciones ensayadas. Ha sido demostrado en APCs que la endocitosis de OVA es mediada predominantemente vía el receptor de manosa, de forma rápida y efectiva. Luego es transportada a endosomas tempranos, lo que conduce a su *cross-presentación* en el contexto de moléculas MHC de clase I y subsecuentemente a la activación de linfocitos TCD8+. Por el contrario, la captación de OVA vía macropinocitosis, conduce a la presentación clásica de los péptidos de OVA cargados en el contexto de MHC-II y la posterior activación de linfocitos TCD4+^{215,222}. Los fragmentos de proteínas degradadas en los compartimientos endosomales endocitadas vía el receptor de manosa también pueden ser liberados al medio por exocitosis²²³. Lo anterior sugiere que el antígeno DQ-OVA es degradado en fragmentos que carecen del fluoróforo y están siendo presentados o que luego de la degradación dichos fragmentos son liberados al medio.

En cambio cuando DQ-OVA es administrada en presencia de la suspensión FCC-S06, se observa en ambos tipos de APCs un elevado procesamiento y acumulación con respecto al inducido por el antígeno solo. Podemos suponer que en este caso debido al tamaño de las partículas FCC-S06 el proceso de endocitosis es del tipo de macropinocitosis. Además, teniendo en cuenta el resultado del apartado anterior, donde sugerimos que la formulación con FCC-S06, induce la

activación del inflamasoma y el modelo de “fagocitosis frustrada” para explicar la activación del inflamasoma NLRP3 inducido por adyuvantes particulados. Teoría que sostiene que los macrófagos y las DCs fagocitan de manera más o menos efectiva las partículas del adyuvante dependiendo de la naturaleza de las mismas, tamaño y propiedades fisicoquímicas, y lo anterior puede llevar a la ruptura del fagolisosoma, formado por la fusión entre el fagosoma y los lisosomas. De esta forma las proteasas lisosomales, como la catepsina B, entran en el citosol, y directa o indirectamente activan el inflamasoma NLRP3²²⁴. Podemos sugerir que la acumulación del antígeno DQ-OVA inducida por la formulación con FCC-S06 puede deberse a una disrupción del fagolisosoma luego de la endocitosis. Lo anterior no permite hipotetizar acerca de si esta acumulación favorece la presentación de DQ-OVA en el contexto de MHC tanto de clase I como de clase II.

Además, como se mencionó en la introducción, Alhydrogel es un potente inductor de respuestas inmunes tipo Th2, representada por altos títulos de IgG1, por lo que claramente induce la presentación antigénica. Como se observa en la **figura 5.19** no hay una diferencia en la acumulación de los fragmentos de DQ-OVA cuando las J774A.1 fueron estimuladas con la formulación con Alhydrogel y DQ-OVA sola (en los dos tiempos de incubación), ni cuando las BMDCs fueron estimuladas por 24hs. Solo se observa un incremento en la acumulación en BMDCs con respecto al antígeno solo, a tiempos tempranos ($p= 0,0015$) con la formulación con Alhydrogel. Lo anterior podría sugerir, que la baja acumulación evidenciada cuando ambas APCs son estimuladas con la formulación Alhydrogel+DQ-OVA es debida a que el antígeno, luego de su degradación, está siendo presentado.

Cabe destacar que no se encontraron diferencias entre los tres grupos en el porcentaje de células positivas para el marcador DQ-OVA en la condición (1) 15min a 37°C y la (2) 24hs a 37°C, tanto para el procesamiento como para la acumulación del antígeno; como se observa en el panel inferior de la **figura 5.19 (E-G)**.

5.7 Evaluación de la capacidad de BMDCs pre-estimuladas con la formulación de *cross-presentar* el antígeno a esplenocitos de ratones inmunizados con la misma

El objetivo del presente apartado fue determinar si la formulación FCC-S06+STP induce la proliferación de células TCD8+. Para ello se estimularon esplenocitos de ratones inmunizados previamente con la formulación (según el apartado 2.10.2), con BMDCs pre-estimuladas con la misma formulación.

Como se muestra en la **figura 5.20** no se observó proliferación de linfocitos TCD8+ cuando los esplenocitos fueron estimulados con BMDCs solas o pre-pulsadas con el antígeno.

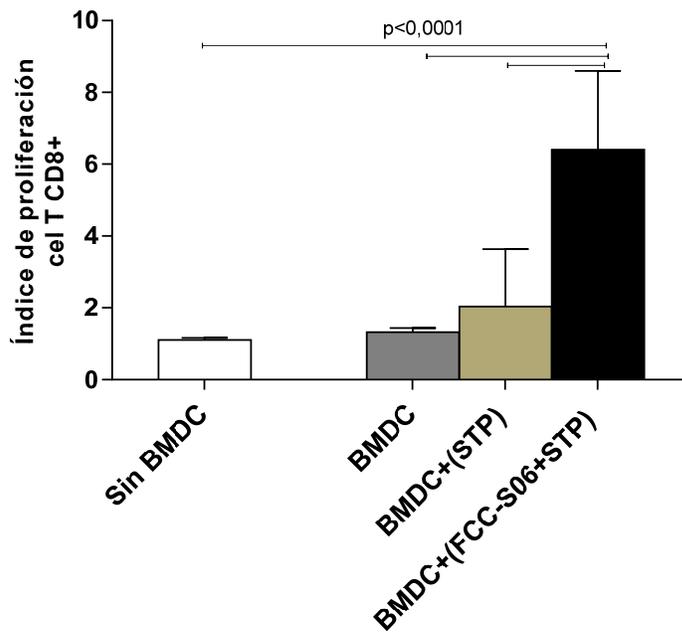


Figura 5.20: Porcentaje del índice de proliferación de esplenocitos de animales vacunados con FCC-S06+STP. Ratones hembras C57BL/6J fueron inmunizados con la formulación FCC-S06+STP según el protocolo del apartado 2.10.2 y sacrificados en el día 40. Luego de la extracción del bazo y posterior purificación de los esplenocitos, los mismos fueron estimulados por 96hs con BMDCs pre-estimuladas con la formulación FCC-S06+STP, con BMDCs pre-estimuladas con el antígeno solo y con BMDCs sin estimular. La visualización de las células TCD8+ se realizó marcando con el anticuerpo anti-CD8 por CF. Cada punto representa la media \pm DS del índice de proliferación, n=6. ANOVA, post test tukey, $p < 0,05$.

En cambio, en la misma figura se observa una proliferación de células TCD8+ cuando los esplenocitos fueron estimulados con BMDC pre-pulsadas por 24hs con FCC-S06+STP ($p < 0,0001$); comparándola con la proliferación observada en todas las otras condiciones ensayadas.

Este resultado sugiere que la formulación FCC-S06+STP induce a las BMDCs a *cross-presentar* el antígeno, lo que implica presentar el antígeno en el contexto de MHC-I y de esta forma activar a los linfocitos TCD8+ antígeno específicos y así favorecer su proliferación. Como se mencionó en la introducción, lo anterior representa una respuesta inmune celular que es buscada en la evaluación de nuevos adyuvantes.

5.8 Conclusiones

Los ensayos *in vitro* del presente apartado permiten concluir que las formulaciones con FCC-S06 estimulan células presentadoras de antígeno del sistema innato. Particularmente, la activación de macrófagos y/o monocitos murinos, induciendo la translocación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, la producción de óxido nítrico y la secreción de la CK pro-inflamatoria IL-1 β . Esta producción no depende de una primera señal TLR-dependiente lo cual puede deberse a que las células J774A.1 tienen una activación basal elevada. Esta misma condición limitó la posibilidad de determinar si las formulaciones inducen la *up-regulación* de moléculas co-estimuladoras como son CD40, CD80, CD86 y MHC-II en estas células. Este comportamiento es similar al inducido por el adyuvante de referencia. Además, no se observó activación de monocitos/macrófagos con la suspensión sola.

También, las formulaciones con FCC-S06 estimularon la activación de células dendríticas derivadas de médula ósea. Se constató una inducción en la expresión de CD80 y CD86 luego de la estimulación de las BMDCs con FCC-S06+OVA, pero no con la formulación FCC-S06+STP. En todos los casos se empleó como control positivo una solución conteniendo LPS e IFN- γ , verificándose la capacidad de respuesta de las células. Por tanto, se puede concluir que las formulaciones no generan una inducción de todas las moléculas co-estimuladoras estudiadas, y que la inducción observada depende del antígeno, pudiendo ser debida a OVA y no a la suspensión FCC-S06. Además, se observó una *up-regulación* a nivel transcripcional, de genes involucrados en la respuesta inmune como son los genes pro-inflamatorios que codifican para IL-6, TNF- α , IL-23, pro-IL-1 β , pro-caspasa 1, y genes involucrados en el reclutamiento celular de varios componentes del SI, como son los genes que codifican para las quimioquinas CCL20, CXCL10 y CCL4. También, se detectó en el sobrenadante de estas células la producción de IL-12p70 e IL-1 β luego de la estimulación con FCC-S06+STP.

Se constató que la secreción de IL-1 β depende mayoritariamente de una primera señal TLR-dependiente, ya que aumenta frente a una pre-incubación con

un agonista de TLR, y es caspasa 1 y 11 dependiente. Lo anterior sugiere que la formulación con FCC-S06 tendría la capacidad de activar el inflamasoma en BMDCs, lo que induce su activación y maduración. Se puede suponer de los resultados anteriores y los antecedentes mencionados en la introducción, que la formulación con FCC-S06 tiene la capacidad de activar el inflamasoma NLRP3, al igual que otros adyuvantes particulados, incluidos los compuestos de aluminio, a pesar de no haber encontrado el ARNm de *Nlrp3* aumentado, ya que este complejo puede encontrarse preformado en las células. Esta hipótesis debe ser confirmada por ejemplo, utilizando BMDCs derivadas de ratones deficientes en NLRP3.

Las DCs son cruciales para la inducción de una respuesta inmune adaptativa productiva lo cual es buscado luego de la vacunación. Para ello es crucial que sean capaces de presentar antígenos. Se evaluó el potencial de la formulación FCC-S06+DQ-OVA de inducir la captación, procesamiento y acumulación de este antígeno. Se evidenció que la formulación estimula la captación, procesamiento y acumulación de DQ-OVA en las condiciones ensayadas. Lamentablemente no se posee suficiente información con este ensayo como para afirmar que se induzca la presentación de DQ-OVA en el contexto de MHC tanto de clase I como de clase II.

Se puede sugerir teniendo en cuenta la teoría de la fagocitosis frustrada²²⁴, que la acumulación del antígeno puede ser debida a una disrupción del fagolisosoma, lo que liberaría proteasas lisosomales al citosol, como la catepsina B y que lo anterior sea el responsable de la activación del inflamasoma NLRP3, sustentando la hipótesis anterior. Una forma de demostrar si este es el mecanismo de activación del NLRP3 es pre-incubando con un potente inhibidor de la catepsina B, el CA-074 metil ester.

Aun así, se pudo determinar que la formulación FCC-S06+STP estimula la presentación antigénica específica *in vitro*, observándose proliferación antígeno-específica de células TCD8+. Estos resultados sugieren que la formulación induce la activación y maduración de las BMDCs y estas pueden estar *cross-presentando* el antígeno, lo que implica presentar el antígeno en el contexto de

MHC-I, activar a los linfocitos TCD8+ antígeno específicos y favorecer su proliferación. Asimismo, el ambiente pro-inflamatorio inducido por las formulaciones favorecería dicha proliferación, debido a la inducción de una respuesta adaptativa mixta polarizada tanto hacia un perfil Th1 y Th17 determinado por el perfil de CKs observado (particularmente IL-1 β , IL-12p70, *Il6* e *Il23*).

Los resultados en su conjunto permiten sugerir que *in vitro* las formulaciones con la suspensión FCC-S06 tienen la capacidad de activar y estimular la maduración y la presentación antigénica de APCs del sistema innato, resultando en la activación y proliferación de linfocitos TCD8+ antígeno específicos.

También los resultados de este apartado permiten sugerir que la suspensión de partículas FCC-S06 por sí sola no activa las BMDCs *in vitro*.

En cuanto a las formulaciones con HAP-S08 los estudios *in vitro* permiten concluir que estimulan al sistema innato, evidenciado por la inducción en la translocación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, la producción de óxido nítrico y la secreción de la CK pro-inflamatoria IL-1 β y que esta secreción no depende de una primera señal TLR-dependiente en macrófagos y/o monocitos murinos. Cabe destacar que este comportamiento es similar al observado con Alhydrogel y que también el mismo no fue observado con la suspensión sola.

Además, se observó que las formulaciones con HAP-S08 inducen un discreto aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs. La formulación HAP-S08+STP induce la transcripción de los genes que codifican para IL-6, TNF- α , IL-23, IL-12p35, IL-10, pro IL-1 β , NLRP3 y pro-caspasa 1 y genes involucrados en el reclutamiento celular que codifican para las quimioquinas CCL20, CCL4, CCL3 y CCL5 y la secreción de IL-12p70 e IL-1 β por BMDCs. La producción de IL-1 β depende mayoritariamente de una señal previa TLR-dependiente y es dependiente de caspasa 1 y 11. Lo anterior sugiere que la

formulación con HAP-S08 induce la activación de BMDCs y tendría la capacidad de activar el inflamasoma NLRP3.

Al igual que con la suspensión FCC-S06, la suspensión HAP-S08 no estimula la activación de macrófagos o BMDCs *in vitro*.

Conjuntamente los resultados permiten sugerir que *in vitro* las formulaciones con HAP-S08 inducen la activación y maduración de APCs, y en concordancia con el perfil de CKs observado en estas células, estimulan la activación de una respuesta inmune adaptativa polarizada hacia un perfil Th17.

Capítulo VI:

Evaluación de la actividad

inmunoestimulante en

ensayos *in vivo*

6 Resultados y discusión de la evaluación de la actividad inmunoestimulante de FCC-S06 en ensayos *in vivo*

6.1 Objetivo específico

Evaluar la actividad inmunoestimulante de la formulación *in vivo* usando como referencia el adyuvante Alhydrogel. Para cumplir con este objetivo se procedió a evaluar los siguientes items:

- caracterizar por inmunofenotipificación utilizando CF las poblaciones celulares reclutadas a nivel peritoneal inducidas por la inoculación i.p con la suspensión.

- determinar si la formulación induce una respuesta de hipersensibilidad retardada.

- determinar si la formulación estimula una respuesta inmune citotóxica de memoria en esplenocitos de ratones inmunizados con la misma. Para ello se evaluará (a) la proliferación de células TCD8+ y (b) el perfil de citoquinas producido cuando los esplenocitos de dichos ratones son estimulados con BMDCs pre-pulsadas con la formulación.

- determinar el potencial de la formulación FCC-S06+STP de inducir una respuesta inmune humoral cuantificando la producción de IgGs específicas.

6.2 Efecto de la administración intraperitoneal de la suspensión FCC-S06 sobre el reclutamiento celular

El objetivo del presente ensayo fue determinar si la suspensión FCC-S06 induce una respuesta inmune evaluando el reclutamiento celular a nivel peritoneal a las 24hs post-inoculación, caracterizando las poblaciones celulares reclutadas por CF.

Detectamos grandes cambios en el perfil FSC vs SSC de las poblaciones celulares reclutadas en los ratones inoculados con FCC-S06 y Alhydrogel, comparado con el grupo control de glicina para el estudio del reclutamiento sin antígeno en este modelo (**figura 6.1**). Asimismo, en dicha figura se observa un perfil similar entre FCC-S06 y Alhydrogel.

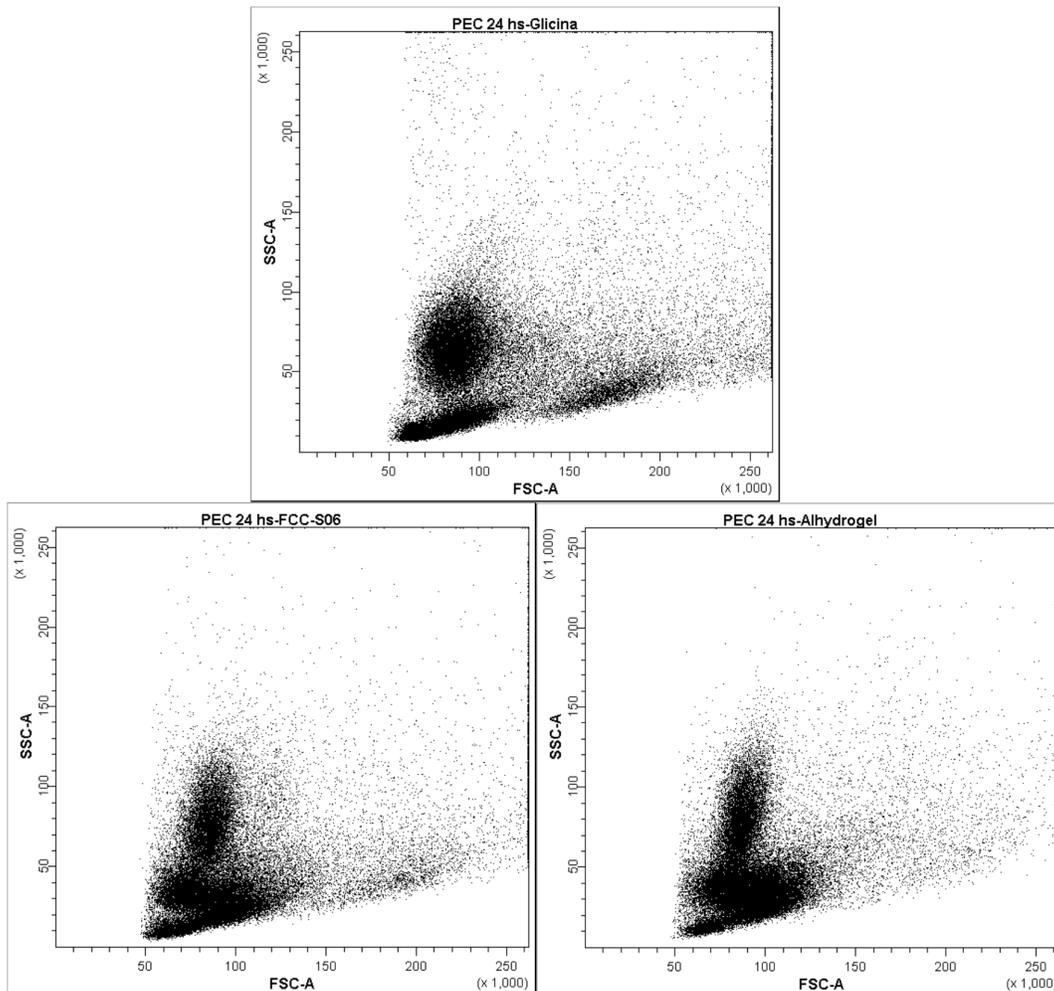


Figura 6.1: Gráficos FSC vs SSC del reclutamiento celular obtenido luego de 24hs de la inoculación i.p. con FCC-S06, Alhydrogel y el grupo control con glicina. Se muestra un gráfico de un individuo representativo de cada grupo

En la **figura 6.2** se observa el porcentaje de células obtenido del lavado peritoneal a las 24hs de la inoculación i.p. de 500µg de FCC-S06 o 500µg de Alhydrogel en ratones C57BL/6J.

La inoculación con FCC-S06 induce un mayor reclutamiento de macrófagos ($p=0,0046$) y otras células de bajo FSC y SSC, por ejemplo monocitos, con respecto al grupo control inoculado con glicina ($p<0,0001$).

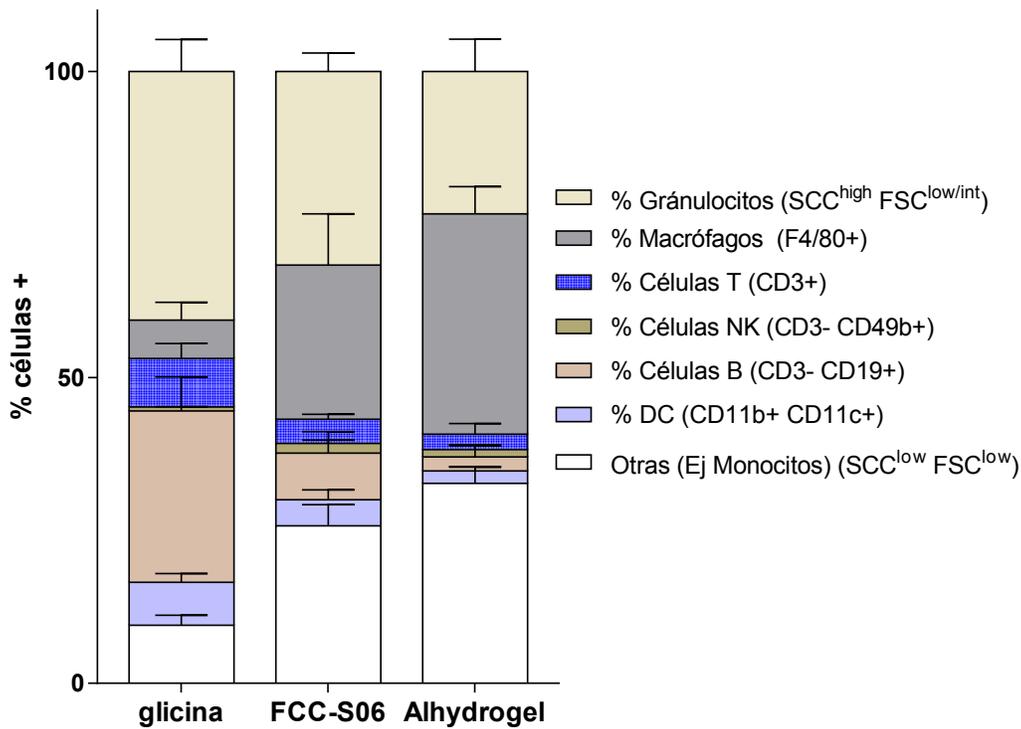


Figura 6.2: Reclutamiento celular en el peritoneo de ratones C57BL/6J. Los ratones fueron inoculados i.p. con la suspensión FCC-S06 o Alhydrogel en glicina y un grupo control inoculado con glicina. A las 24hs, se lavaron los peritoneos. Las suspensiones celulares obtenidas se marcaron con 3 paneles: El panel 1 fue marcado con anti: F4/80-APC, CD206-FITC, CD80-PE, y MHC-II-PE-Cy7. El panel 2 con anti: CD3-PerCP-Cy5, CD19-APC, CD49b-FITC. El panel 3 con anti: CD11c-APC, CD11b-APC-Cy7, MHC-II-PE-Cy7. Las distintas poblaciones celulares se evidenciaron por CF. Los resultados se expresaron como % de células positivas para cada marcador. Cada punto representa la media \pm DS. ANOVA ($n=5$ o 3), post test tukey $p<0,05$.

Este reclutamiento de macrófagos y monocitos al sitio de inoculación también fue observado luego de la administración con el adyuvante de

referencia, en las mismas condiciones, resultado que ya fue reportado por otros²²⁵.

Además se observó en el grupo inoculado con FCC-S06, una disminución en el porcentaje de células T ($p=0,0193$), células B ($p<0,0001$) y DCs ($p=0,0307$), mientras que no se observó diferencia en el reclutamiento de granulocitos ni células NK, con respecto al grupo control.

Entre ambas suspensiones, se observó que FCC-S06 indujo un mayor aumento de granulocitos ($p=0,0373$), un menor reclutamiento de macrófagos ($p=0,0464$), mientras que no se observó diferencia en el reclutamiento de linfocitos.

Seguidamente se evaluó el fenotipo con los marcadores CD206, MHC-II y CD80, de los macrófagos F4/80+ reclutados luego de la inoculación i.p. en los tres grupos evaluados.

Como se muestra en la **figura 6.3**, se observa un aumento en el porcentaje de células para los marcadores CD80 ($p<0,0001$) y MHC-II ($p=0,0009$), y una disminución en el porcentaje de células para el receptor de manosa CD206 ($p<0,0001$) en los ratones inoculados con FCC-S06, en comparación con el control con glicina.

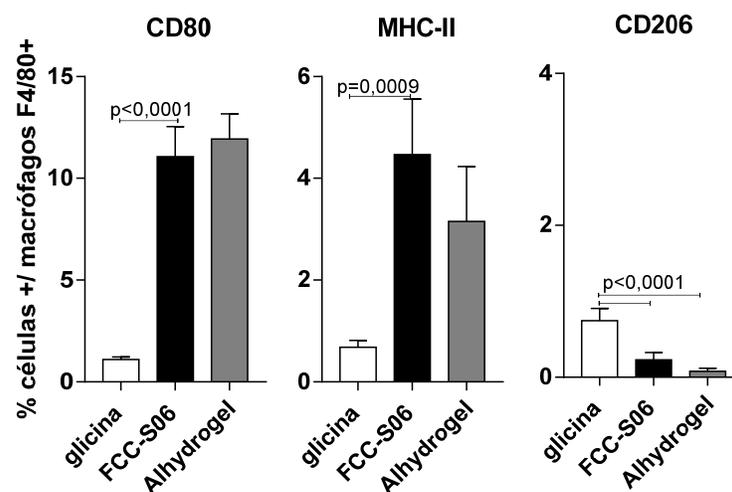


Figura 6.3: Fenotipificación de los macrófagos reclutados luego de la inoculación i.p con FCC-S06 o Alhydrogel en glicina y un grupo control inoculado con glicina. Los resultados se expresaron como % de células positivas para cada marcador CD80, MHC-II y CD206 sobre el total de macrófagos F4/80+. Cada punto representa la media \pm DS, (n=5 o 3). ANOVA, post test tukey. $p<0,05$.

Asimismo se observa un porcentaje similar de dichos marcadores (CD80, MHC-II y CD206) entre los grupos inoculados con la suspensión FCC-S06 y con Alhydrogel.

De este resultado se desprende que en los macrófagos peritoneales reclutados, observado tanto por la inoculación de la suspensión FCC-S06 como por Alhydrogel, se induce la rápida maduración de los mismos, evidenciado por la *up-regulación* de moléculas co-estimuladoras con respecto al grupo control con glicina. Lo anterior se encuentra en concordancia con la hipótesis de Von Moltke *et al.*²²⁶ que estipula que los macrófagos peritoneales se encuentran en un estado pre-activado permitiendo una reacción casi instantánea luego de la entrada de un patógeno en la cavidad peritoneal.

Asimismo los monocitos inflamatorios reclutados pueden diferenciarse a DCs en su migración hacia los nódulos linfáticos²²⁵.

Cabe aclarar que este resultado es una fotografía a las 24hs post-inoculación y que dependiendo del tiempo posterior a la misma en que se observa el reclutamiento celular generado, los grupos celulares encontrados cambian. También, que en este modelo no fue observada la rápida desaparición de macrófagos peritoneales, como fue reportado por otros, a tiempos más tempranos²²⁷.

6.3 Evaluación de respuesta de hipersensibilidad retardada

Con el objetivo de continuar evaluando si la formulación FCC-S06+STP induce una respuesta inmune a nivel celular, se evaluó *in vivo* la inducción de una respuesta de hipersensibilidad retardada (*del inglés*, DTH, delayed-type hypersensitivity). Para esto ratones hembras C57BL/6J fueron inmunizados según el protocolo descrito en el apartado 2.10.3, en el día 28, posterior al *priming*, los ratones inmunizados con la FCC-S06+STP o el antígeno, fueron inoculados por la vía i.d. en la almohadilla plantar posterior derecha con 10µl de una solución conteniendo 5µg de STP en glicina. A continuación, se midió la hinchazón del plantar a las 24h y 48h. No se observó una diferencia entre el

grupo control inoculado con 10 μ l de glicina (hinchazón basal) y los inoculados con el antígeno.

Este resultado sugiere que el protocolo de inmunización utilizado no fue suficiente para inducir en un segundo encuentro con el antígeno, una reacción de hipersensibilidad retardada, inflamación, caracterizada principalmente por reclutamiento temprano de neutrófilos y posteriormente de células T y su activación.

6.4 Efecto de la formulación FCC-S06+STP en la inducción de una respuesta inmune citotóxica de memoria

El objetivo del presente apartado fue determinar si la vacunación con la formulación FCC-S06+STP estimula una respuesta inmune citotóxica de memoria. Para ello, se evaluó la capacidad de proliferación de células TCD8+ de esplenocitos de ratones inmunizados con la formulación (según el apartado 2.10.2) mediante la estimulación con BMDCs pre-pulsadas con la formulación FCC-S06+STP, comparándolo con el inducido luego de la inmunización con el antígeno solo o en ratones naïve.

En la **figura 6.4** se observa el índice de proliferación de linfocitos TCD8+ para los grupos *naïve*, inmunizados con el antígeno solo y con la formulación FCC-S06+STP.

La inmunización con FCC-S06+STP induce una respuesta TCD8+ de memoria ya que los esplenocitos de dichos ratones estimulados con BMDCs pre-pulsadas con la formulación inducen un aumento en la proliferación con respecto a los grupos *naïve* y a el grupo inmunizado con STP ($p < 0,0001$).

Además, dicha proliferación es antígeno específica debido a que sólo se observa proliferación luego de la estimulación con BMDCs pre-pulsadas con la formulación y no proliferaron en ausencia de antígeno (BMDCs sin pulsar). Cabe mencionar que las muestras proliferaron frente a la estimulación mitogénica con concavalina A (no mostrado).

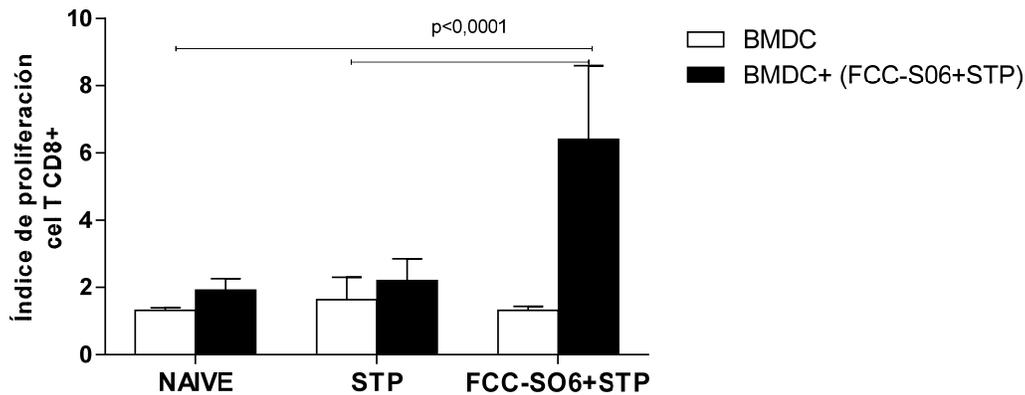


Figura 6.4: Respuesta inmune citotóxica de memoria. Ratones C57BL/6J fueron inmunizados con la formulación FCC-S06+STP o STP según el protocolo del apartado 2.10.2 y sacrificados en el día 40. Como grupo control se utilizaron ratones *naive*. Luego de la extracción del bazo y posterior purificación de los esplenocitos, los mismos fueron estimulados por 96hs con BMDCs pre-pulsadas con la formulación FCC-S06+STP y con BMDCs sin estimular. La visualización de las células TCD8+ se realizó por CF marcando con el anticuerpo anti-CD8. Los resultados se expresan como el índice de proliferación de linfocitos TCD8+. Cada punto representa la media \pm DS del índice de proliferación n=6. ANOVA, post test tukey, p<0,05.

Seguidamente, se estudió por ELISA el perfil de citoquinas secretado en el sobrenadante de los esplenocitos de los tres grupos estimulados con las BMDCs pre-pulsadas con la formulación FCC-S06+STP o BMDCs sin estimular.

No fueron detectadas en el sobrenadante de los tres grupos: IL-4, IL-10, IL-12p70 ni IFN- γ . Una limitante importante de este ensayo, fue los límites de detección elevados encontrados: IL-4 (LD igual a 625pg/ml), IL-10 (LD igual a 285pg/ml) y IFN- γ (LD igual a 625pg/ml). Por tanto no se puede descartar la presencia de dichas CKs en bajas concentraciones.

Es importante resaltar que el resultado obtenido respecto a la CK IL-12p70 (LD igual a 8pg/ml), no es contradictorio con el observado en el apartado 5.4 donde la estimulación de BMDCs con la formulación induce la producción de dicha CK. Esto es debido a que se descarta el sobrenadante de las BMDCs previo a co-cultivarlas con los esplenocitos. Sumado a ello, la determinación de CKs se llevó a cabo a tiempo final de proliferación (96hs), pudiendo las mismas haber

sido consumidas por los linfocitos proliferantes o haberse degradado en el transcurso del experimento.

A pesar de lo antes mencionado en la **figura 6.5** se muestra la cuantificación de IL-17A (LD igual a 125pg/ml) en el sobrenadante de los esplenocitos para los tres grupos estimulados con BMDCs pre-pulsadas con la formulación FCC-S06+STP o BMDCs sin estimular.

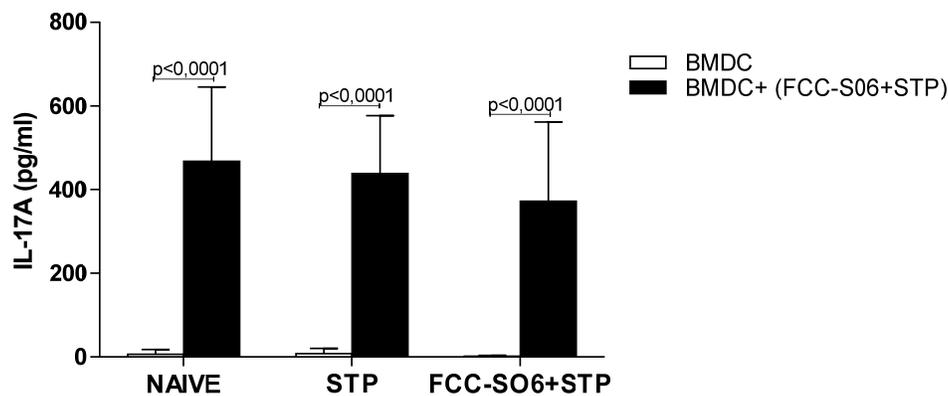


Figura 6.5: Cuantificación de IL-17A en el sobrenadante de esplenocitos de animales inmunizados con FCC-S06-STP, STP o *naive* estimulados con BMDC pre-pulsadas con la formulación o BMDCS sin estimular. Ratones C57BL/6J fueron inmunizados con la formulación FCC-S06+STP o STP según el protocolo del apartado 2.10.2 y sacrificados en el día 40. Como grupo control se utilizaron ratones *naive*. Luego de la extracción del bazo y posterior purificación de los esplenocitos, los mismos fueron estimulados por 96hs con BMDC pre-pulsadas con la formulación FCC-S06+STP o BMDCs sin estimular. Cada punto representa la media \pm DS (n=6). ANOVA post test tukey, $p < 0,05$.

Como se puede observar no se detectó dicha CK en el sobrenadante de esplenocitos de los tres grupos (*naive*, inmunizados con el antígeno y con la formulación FCC-STP) cuando los mismos fueron estimulados con BMDCs sin estimular. En cambio se detectó la producción de IL-17A en niveles equivalentes en el sobrenadante de los tres grupos luego de que los esplenocitos fueran estimulados con BMDCs previamente pulsadas con FCC-S06+STP ($p < 0,0001$ con respecto a estimulados con BMDCs solas).

Este resultado sugiere que las BMDCs pre-pulsadas con la formulación FCC-S06+STP promueven la secreción de IL-17A independientemente de si los esplenocitos fueron previamente expuestos al antígeno. Esta CK es un

importante conector entre la inmunidad adaptativa mediada por células T y la inflamación aguda, induciendo una inflamación rica en neutrófilos y estimulando la secreción en varios tipos celulares de sustancias anti-microbianas como son la defensinas²²⁰.

6.5 Efecto de la formulación FCC-S06+STP en la inducción de una respuesta inmune humoral

Con el objetivo de determinar el potencial de la formulación FCC-S06+STP de inducir una respuesta inmune humoral se cuantificó por ELISA la producción de IgGs específicas en el suero de ratones inmunizados según el protocolo del apartado 2.10.2.

En la **figura 6.6** se observa la cuantificación de IgGs anti-STP en una dilución del suero 1:1000, la inmunización con la formulación FCC-S06+STP indujo niveles de IgGs anti-STP mayores que la inmunización con el antígeno ($p=0,0006$) y en el grupo *naive* ($p<0,0001$).

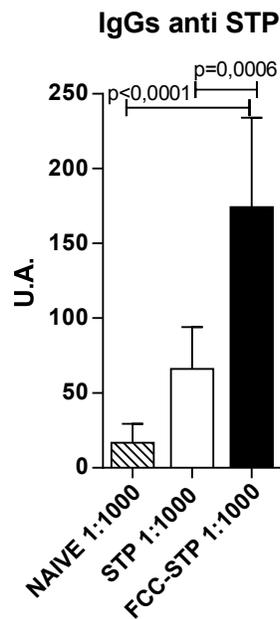


Figura 6.6: Respuesta inmune humoral. Ratones C57BL/6J recibieron tres inmunizaciones por vía s.c., la primera en el día 0 y los *boosters* en los días 14 y 28. Los animales fueron inmunizados la formulación FCC-S06+STP o con STP en glicina. El grupo control no fue inmunizado. En el día 40 se realizó la extracción de sangre y en el suero obtenido se cuantificó por ELISA las IgGs anti-STP. Los resultados se expresaron en unidades de absorbancia. Cada punto representa la media \pm DS, n=6. ANOVA, post test tukey $p<0,05$.

Este resultado permite sugerir que con el protocolo de inmunización utilizado la formulación con FCC-S06 induce una leve respuesta humoral, esto es debido a que a diluciones mayores del suero evaluado no se detectaron IgGs específicas.

Cabe aclarar que como se describió en la introducción los compuestos de aluminio inducen potentes respuestas humorales muy superiores a los resultados hallados, por lo que se puede sugerir que la formulación con FCC-S06+STP no es un potente modulador ni activador de células B.

6.6 Conclusiones

En el presente capítulo se evaluó la actividad inmunoestimulante de la formulación con FCC-S06 *in vivo*.

En una primera instancia se estudió como prueba de concepto, el potencial de la suspensión FCC-S06 en el reclutamiento celular a nivel peritoneal donde se observó un aumento en el porcentaje de macrófagos y monocitos. Asimismo se observó una up-regulación de las moléculas co-estimuladoras MHC-II y CD80 en los macrófagos reclutados. Comportamiento similar al obtenido luego de la inoculación con Alhydrogel. Teniendo en cuenta estos resultados, sería interesante realizar el mismo ensayo inoculando con la formulación, lo que podría tener el potencial de reclutar más componentes del SI.

Se constató que la formulación FCC-S06+STP no generó la inducción de una respuesta de hipersensibilidad retardada. Es posible que esta formulación vacunal necesite ser administrada en un esquema que contemple un segundo *booster* para la generación de una potente respuesta inmune celular que pueda ser detectada por este tipo de ensayo.

En este sentido, cabe destacar que utilizando un esquema de vacunación de 3 dosis (*priming* más dos *boosters*), la inmunización con FCC-S06+STP indujo una respuesta inmune celular, determinada por una respuesta TCD8+ de memoria. Se observó proliferación de células T citotóxicas en los animales inmunizados con dicho esquema cuando los esplenocitos fueron estimulados con BMDCs pre-pulsadas con la formulación. En el sobrenadante de estos esplenocitos no se detectaron IL-4, IL-10, IL-12p70 ni IFN- γ en las condiciones ensayadas. En cambio se detectó IL-17A así como en los esplenocitos del grupo *naïve* o de ratones inmunizados con el antígeno solo. Este resultado sugiere que pueden ser las BMDCs pre-estimuladas con la formulación FCC-S06+STP las que promueven la secreción de IL-17A por los esplenocitos, en las condiciones ensayadas. Lo que se encuentra en concordancia con los resultados encontrados en el capítulo anterior en ensayos *in vitro*, sugiriendo que la formulación FCC-

S06+STP induce una respuesta inmune adaptativa polarizada hacia un perfil Th17.

Finalmente, se determinó que la formulación FCC-S06+STP induce una leve respuesta inmune humoral, cuantificándose IgGs anti-STP en una dilución del suero 1:1000. Este resultado tiene relevancia debido a que ya existe un potente inductor de respuestas Th2 como son los compuestos de aluminio, por lo que no es un resultado buscado y se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo anterior donde las formulaciones con FCC-S06 inducen una polarización hacia respuestas inmunes Th17 y Th1.

Capítulo VII:

Conclusiones finales y perspectivas

7 Conclusiones finales y perspectivas

En el presente trabajo se confirmó la hipótesis de que la suspensión FCC-S06 es biocompatible ya que no se observó toxicidad en los estudios *in vitro* ni *in vivo*, siendo menos tóxica que el adyuvante de referencia. Si bien los estudios realizados en el marco de esta tesis consistieron en pruebas de concepto, y se evaluó el efecto tóxico únicamente de la suspensión, los resultados obtenidos hacen suponer que el adyuvante candidato no presentará efectos tóxicos una vez formulado en una vacuna. En este caso, se deberán llevar a cabo los ensayos de toxicidad correspondientes con la nueva formulación vacunal, tal como lo recomiendan los entes reguladores mencionados en la introducción.

La FCC-S06 está formada por un *core* de carbonato de calcio con una sal de la familia de los fosfatos de calcio precipitada en su superficie, cristalina, de morfología esferoide con estructuras en forma de placas laminares que sobresalen de la superficie formando poros intrapartículas, lo que aumenta considerablemente su SSA.

Con el objetivo de visualizar la tendencia de algunos de los resultados hallados luego de la estimulación con la formulación tanto en macrófagos como en BMDCs, se confeccionaron gráficos. Los mismos consisten en una normalización del promedio del parámetro obtenido estimulando con la formulación FCC-S06+STP respecto al promedio del parámetro observado estimulando con STP (**figura 7.1**). En la imagen superior, se observa en macrófagos estimulados con la formulación FCC-S06 una clara tendencia al aumento de todos los parámetros analizados en los que se constató una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación con el antígeno solo. En la imagen inferior, también se observa en BMDCs una tendencia al aumento de los parámetros analizados si bien en algunos no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la estimulación con el antígeno solo.

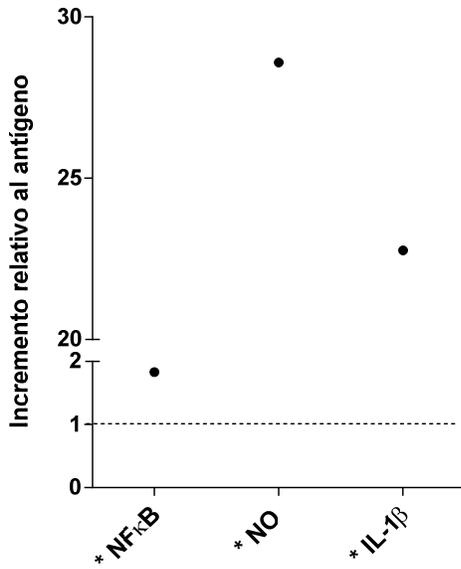
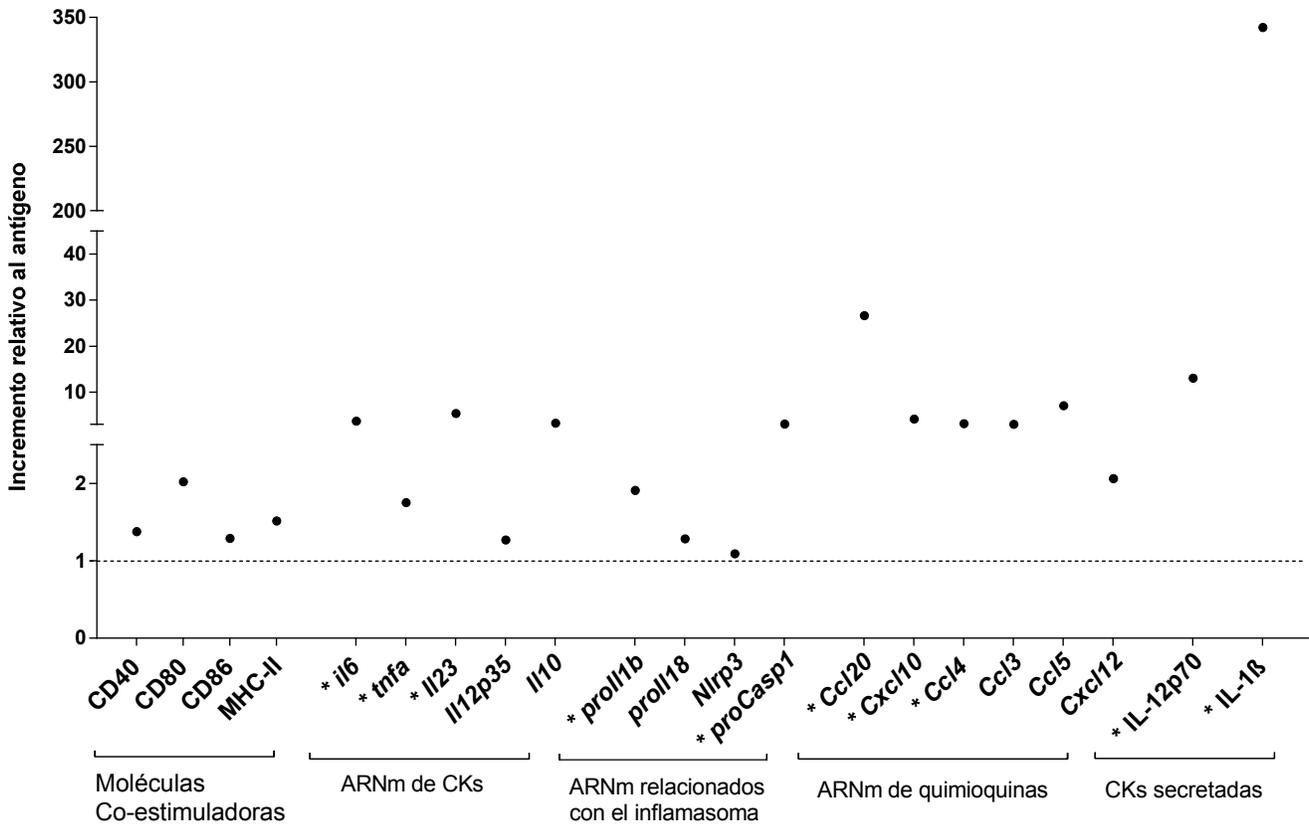


Figura 7.1: Normalización de los parámetros observados en macrófagos (imagen superior) y BMDCs (imagen inferior). Los resultados se expresan como la normalización del promedio del parámetro obtenido estimulando las células con FCC-S06+STP respecto al promedio del hallado estimulando con el Ag. Los parámetros en los que se constató una diferencia estadísticamente significativa entre la formulación y el antígeno están marcados con un asterisco. La normalización de NO se realizó con el valor de equivalentes de NO₂⁻, el de las moléculas co-estimuladoras se realizó con el MFI de cada marcador, mientras que los de NF-κB y ARNm con el incremento relativo respecto al control negativo y las CKs secretadas con la concentración en pg/ml.



Las formulaciones con FCC-S06 tienen la capacidad de activar al sistema innato, estimulando la activación y maduración de APCs (macrófagos y BMDCs) y la presentación antigénica, el reclutamiento de componentes del SI al sitio de inoculación y la secreción de CKs pro-inflamatorias. Por lo anterior, se podrían considerar como posibles candidatos en la búsqueda de nuevos adyuvantes.

Lo antes mencionado modula la respuesta adaptativa hacia un perfil Th17 y Th1. Ambas respuestas son buscadas en la definición de nuevos adyuvantes ya que se cuenta con un excelente adyuvante que potencia la respuesta tipo Th2, con un fuerte componente humoral y aun no se han definido potentes adyuvantes de las respuestas Th1 y Th17. La respuesta Th17 es importante en la inmunidad de mucosas, además de contra la eliminación de hongos y bacterias. La respuesta Th1 es esencial en la eliminación de patógenos intracelulares, particularmente virus, y es responsable de la respuesta inmune mediada por células. Aun así, la formulación con FCC-S06 también estimula una respuesta humoral aunque la misma es poco potente. Su posible mecanismo de acción se esquematiza en la **figura 7.2**.

Sin embargo, poseen una gran limitante, son muy inestables sedimentando en periodos cortos de tiempo siendo difícil su re-dispersión. Además se constató que el pH cambia luego de la re-suspensión pudiendo afectar toda la formulación incluido el antígeno y no asegura un inóculo homogéneo. También, en la condición de re-suspensión hallada posee una limitada adsorción antigénica. Por tanto, su aplicación en el diseño de vacunas no es el más recomendable. Para seguir avanzando en el proceso de desarrollo de un nuevo adyuvante, que ha demostrado tener potencial, sería necesario realizar un nuevo proceso de síntesis que no se base en la precipitación. Por ejemplo, como ya fue mencionado en la introducción, los compuestos basados en forma de gel son más estables y aseguran una mejor reproducibilidad y homogeneidad en la adsorción antigénica que las suspensiones (formulaciones precipitadas).

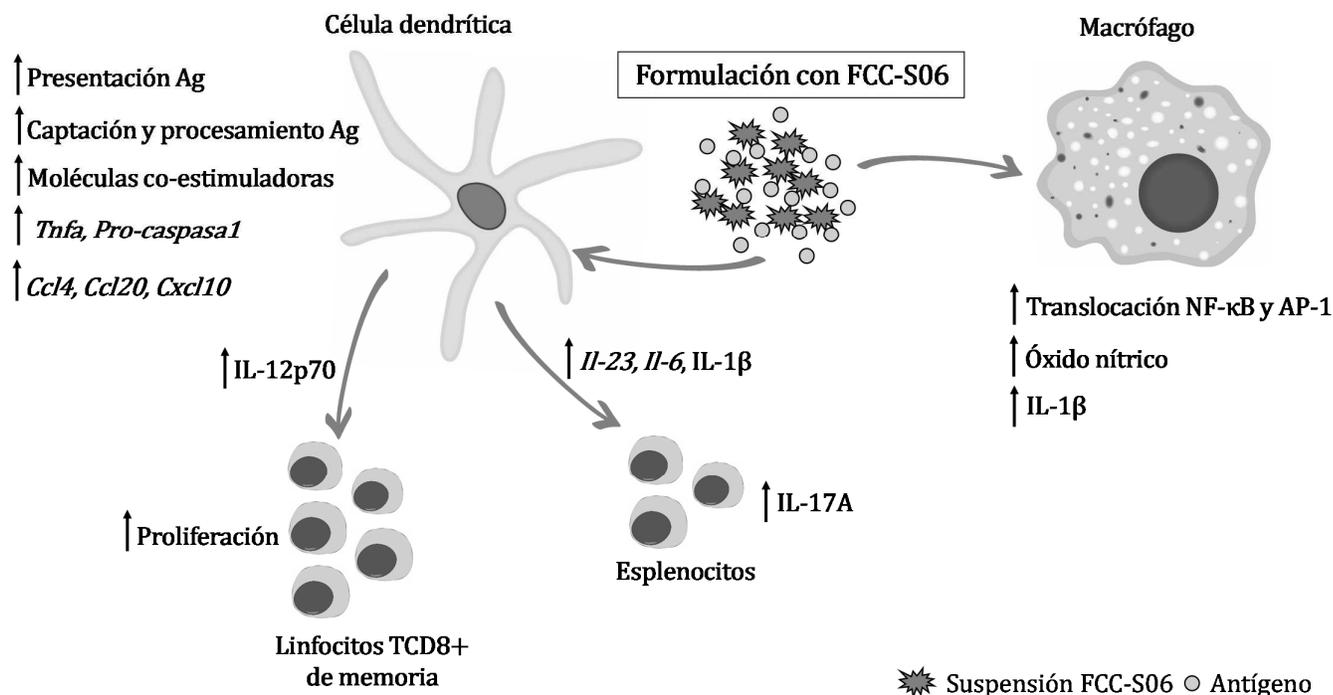


Figura 7.2: Esquema simplificado de los resultados obtenidos. La formulación con FCC-S06 induce la translocación de los factores de transcripción NF-κB y AP-1 y la producción de óxido nítrico e IL-1β en macrófagos/monocitos murinos. En BMDCs induce la *up-regulación* a nivel transcripcional de genes que codifican para IL-6, TNF-α, pro-IL-1β, pro-caspasa 1 y genes de quimioquinas involucrados en el reclutamiento celular de componentes del SI y la secreción de IL-12p70 e IL-β. La secreción de esta última requiere de una señal previa TLR dependiente y es caspasa 1 dependiente. También estimula la captación, procesamiento y presentación antigénica, que sumado al aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras, las convierte en excelentes presentadoras de antígenos. Además, la formulación induce la *cross-presentación* antigénica en el contexto de MHC de clase I, que en presencia de IL-12p70, producida por las propias BMDCs, promueve la proliferación de células TCD8+ antígeno específicas. Asimismo, la inmunización con la formulación induce una respuesta TCD8+ de memoria. Además, las BMDCs pre-estimuladas con la formulación inducen la secreción de IL-17A por esplenocitos.

En cuanto a la suspensión HAP-S08 no se pudo identificar la sal de la familia de los fosfatos de calcio que la componen. Se determinó que está formada por partículas amorfas sin poros intrapartículas. Los resultados permiten asegurar que no es tóxica tanto *in vitro* como *in vivo* y sugieren que las formulaciones con HAP-S08 inducen *in vitro* la activación y maduración de APCs del sistema innato, y en concordancia con el perfil de CKs observado en estas células, estimulan la activación de una respuesta inmune adaptativa polarizada hacia un perfil Th17. Al igual que FCC-S06, presenta problemas durante la resuspensión por lo que también se recomienda su síntesis en formato gel.

Bibliografía

1. Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F. & Garçon, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* **3**, 320–343 (2015).
2. Gregorio, E. De & Rappuoli, R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Publ. Gr.* 1–10 (2014).
3. Apostólico, J. D. S. *et al.* Adjuvants : Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–16 (2016).
4. Chauhan, N., Tiwari, S., Iype, T. & Jain, U. An overview of adjuvants utilized in prophylactic vaccine formulation as immunomodulators. *Expert Rev. Vaccines* **0**, 1–12 (2017).
5. Cox, J.C. and Coulter, A. R. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**, 248–56 (1997).
6. Reed, S. G., Orr, M. T. & Fox, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* **19**, 1597–1608 (2013).
7. Pashine, A., Valiante, N. M. & Ulmer, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat. Med.* **11**, S63–S68 (2005).
8. Rappuoli, R., Bottomley, M. J., D’Oro, U., Finco, O. & De Gregorio, E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J. Exp. Med.* **213**, 469–81 (2016).
9. Barrett, A. D. T. Vaccinology in the twenty-first century. *npj Vaccines* **1609**, 1–3 (2016).
10. Donati, C. & Rappuoli, R. Reverse vaccinology in the 21st century: Improvements over the original design. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1285**, 115–132 (2013).
11. McKee, A. S. & Marrack, P. Old and new adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* **47**, 44–51 (2017).
12. Ramon, G. Sur in production des antitoxines. *C. R. Acad. Sci.* (1925).
13. Ramon, G. Sur l’augmentation anormale de l’antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull. Soc. Cent. Med. Vet.* **101**, 227–234 (1925).
14. Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H. and Wallace, V. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J. Path. Bacteriol* **29**, 38–45 (1926).
15. Ericsson, H. Purification and adsorption of diphtheria toxoid. *Nature* **158**, 350–1 (1947).
16. Holt, L. . Purified precipitated diphtheria toxoid of constant composition. *Lancet* **8**, 282–5
17. Relyveld E.H., Henocq E., R. M. Etude de la vaccination antidiphtherique de sujets allergiques, avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bull World Heal. Organ* **30**, 321 (1964).
18. Maughan, C. N., Preston, S. G. & Williams, G. R. Particulate inorganic adjuvants : recent

- developments and future outlook. *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 1–24 (2014).
19. Paneque-quevedo, A. A. Inorganic compounds as vaccine adjuvants. *Biotechnol. Appl.* **30**, 250–256 (2013).
 20. Masson, J.-D., Thibaudon, M., Bélec, L. & Crépeaux, G. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Rev. Vaccines* **0**, 1–11 (2016).
 21. Clements, C. J. & Griffiths, E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine* **20**, S24–S33 (2002).
 22. Freund, J., Casals, J. and Hosmer, E. P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacili and parafin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **37**, 509–13 (1937).
 23. Opie, E.L, F. J. An experimental study of protective inoculation with heat killed tubercle bacilli. *J Exp Med* **66**, 761–788 (1937).
 24. Salk J.E. and Laurent A.M. The use of adjuvants in studies on influenza immunization. I. Measurements in monkeys of the dimensions of antigenicity of virus-mineral oil emulsions. *J Exp Med* **95**, 429–447 (1956).
 25. Miller, L. H., Saul, A. & Mahanty, S. Revisiting Freund’s incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. *Trends Parasitol.* **21**, 412–414 (2005).
 26. Ott, G., Barchfeld, G.L., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., van Hoogevest, P., Van Nest, G. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm. Biotechnol.* **6**, 277–296 (1995).
 27. Calabro, S. *et al.* The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine* **31**, 3363–3369 (2013).
 28. Do, R., Kiss, R. S., Gaudet, D. & Engert, J. C. Squalene synthase: A critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. *Clinical Genetics* **75**, 19–29 (2009).
 29. Johnson, A.G., Gaines, S. and Landy, M. Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med* **103**, 225–46 (1956).
 30. Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R. and Lederer, E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* **59**, 1317–25 (1974).
 31. Gustafson, G.L., Rhodes, M. J. Bacterial cell wall products as adjuvants: early interferon gamma as a marker for adjuvants that enhance protective immunity. *Res. Immunol* **143**, 483–88 (1992).
 32. Singh, M. & Hagan, D. T. O. Recent Advances in Vaccine Adjuvants. *Pharm. Res.* **19**, 715–728 (2002).
 33. Weiner, G. J., Liu, H. M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E. & Krieg, a M. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10833–10837 (1997).
 34. Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V & Harding, C. V. CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity. *J. Exp. Med.* **186**, 1623–1631 (1997).

35. Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* **12**, 509–17 (2011).
36. Garçon, N. & Di Pasquale, A. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 19–33 (2017).
37. Dowling, J. K. & Mansell, A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, 1–10 (2016).
38. Levast, B. *et al.* Vaccine Potentiation by Combination Adjuvants. *Vaccines* **2**, 297–322 (2014).
39. Garçon, N., Vaughn, D. W. & Didierlaurent, A. M. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 349–366 (2012).
40. O’Hagan, D. T., Friedland, L. R., Hanon, E. & Didierlaurent, A. M. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **47**, 93–102 (2017).
41. Slifka, M. K. & Amanna, I. How advances in immunology provide insight into improving vaccine efficacy. *Vaccine* **32**, 2948–2957 (2014).
42. Duncan E. S. Stewart-Tull. *Vaccine Adjuvants. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Humana Press Inc., 2000).
43. O’Hagan, D. T. & De Gregorio, E. The path to a successful vaccine adjuvant - ‘The long and winding road’. *Drug Discov. Today* **14**, 541–551 (2009).
44. HogenEsch, H, Hagan, D. T. O. & Fox, C. B. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines : you might just get what you want. *npj Vaccines* 1–11 (2018).
45. Gupta, R. K. *et al.* Adjuvants - A balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **11**, 293–306 (1993).
46. Sesardic, D., Rijpkema, S. & Patel, B. P. New adjuvants: EU regulatory developments. *Expert Rev. Vaccines* *6*(5), **6**, 849–861 (2007).
47. Goto, N. & Kate, H. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* **15**, 1364–1371 (1997).
48. da Silva, F. T., Di Pasquale, A., Yarzabal, J. P. & Garçon, N. Safety assessment of adjuvanted vaccines: Methodological considerations. *Hum. Vaccines Immunother.* **11**, 1814–1824 (2015).
49. Batista-duharte, A., Lindblad, E. B. & Oviedo-orta, E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol. Lett.* **203**, 97–105 (2011).
50. Lindblad, E. B. Aluminium adjuvants - In retrospect and prospect. *Vaccine* **22**, 3658–3668 (2004).
51. Brennan, F. R. & Dougan, G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants : new products , new strategies. *Vaccine* **23**, 3210–3222 (2005).
52. Sesardic, D. & Dobbelaer, R. European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. *Vaccine* **22**, 2452–2456 (2004).
53. Forster, R. Study designs for the nonclinical safety testing of new vaccine products. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **66**, 1–7 (2012).

54. Garçon, N., Segal, L., Tavares, F. & Van Mechelen, M. The safety evaluation of adjuvants during vaccine development: The AS04 experience. *Vaccine* **29**, 4453–4459 (2011).
55. Walker, J. M. *Immunotoxicity testing Methods and Protocols*. (2010).
56. Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 505–517 (2007).
57. Bergmann-Leitner, E. & Leitner, W. Adjuvants in the Driver's Seat: How Magnitude, Type, Fine Specificity and Longevity of Immune Responses Are Driven by Distinct Classes of Immune Potentiators. *Vaccines* **2**, 252–296 (2014).
58. Cox, J. C. & Coulter, A. R. Adjuvants - A classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**, 248–256 (1997).
59. Maisonneuve, C., Bertholet, S., Philpott, D. J. & De Gregorio, E. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12294–12299 (2014).
60. Mount, A., Silva, A. & Drane, D. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 733–746 (2013).
61. Gupta, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **32**, 155–172 (1998).
62. Hem, S. L. & Johnston, C. T. in *Vaccine Development and Manufacturing* 319–346 (2015).
63. Gupta, K.G, Braford, E. . in *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols* (ed. O'Hagan, D. .) 65–90 (Humana Press, Totowa, N.J., 2000).
64. Hem, S. L. & Hogenesch, H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotential. *Expert Rev. Vaccines* **5**, 685–698 (2007).
65. Seeber, S. J., Pharmacy, P. & Lafayette, W. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* **9**, 201–203 (1991).
66. al-Shakhshir, R., Regnier, F., White, J. L. & Hem, S. L. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* **12**, 472–4 (1994).
67. Wittayanukuluk, A., Jiang, D., Regnier, F. E. & Hem, S. L. Effect of microenvironment pH of aluminum hydroxide adjuvant on the chemical stability of adsorbed antigen. *Vaccine* **22**, 1172–1176 (2004).
68. Morefield, G. L. *et al.* Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. *Vaccine* **23**, 1502–1506 (2005).
69. Iyer, S., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Effect of the degree of phosphate substitution in aluminum hydroxide adjuvant on the adsorption of phosphorylated proteins. *Pharm. Dev. Technol.* **8**, 81–86 (2003).
70. Iyer, S., Robinett, R. S. R., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine* **22**, 1475–1479 (2004).
71. Al-Shakhshir, R. H., Regnier, F. E., White, J. L. & Hem, S. L. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing

- adjuvants. *Vaccine* **13**, 41–44 (1995).
72. Morefield, G. L. *et al.* Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. *Vaccine* **23**, 1502–1506 (2005).
 73. Heimlich, J. M., Regnier, F. E., White, J. L. & Hem, S. L. The in vitro displacement of adsorbed model antigens from aluminium-containing adjuvants by interstitial proteins. *Vaccine* **17**, (1999).
 74. Chang, M. *et al.* Degree of antigen adsorption in the vaccine or interstitial fluid and its effect on the antibody response in rabbits. *Vaccine* **19**, 2884–2889 (2001).
 75. Shi, Y., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Change in the degree of adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants following exposure to interstitial fluid: freshly prepared and aged model vaccines. *Vaccine* **20**, 80–85 (2002).
 76. Hansen, B., Sokolovska, A., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine* **25**, 6618–6624 (2007).
 77. Iyer, S., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine* **21**, 1219–1223 (2003).
 78. Jiang, D., Morefield, G. L., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Relationship of adsorption mechanism of antigens by aluminum-containing adjuvants to in vitro elution in interstitial fluid. *Vaccine* **24**, 1665–1669 (2006).
 79. Noe, S. M., Green, M. A., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Mechanism of immunopotentiality by aluminum-containing adjuvants elucidated by the relationship between antigen retention at the inoculation site and the immune response. *Vaccine* **28**, 3588–3594 (2010).
 80. Romero Méndez, I. Z., Shi, Y., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* **25**, 825–833 (2007).
 81. Hansen, B., Sokolovska, A., Hogenesch, H. & Hem, S. L. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine* **25**, 6618–6624 (2007).
 82. Hansen, B. *et al.* Effect of the strength of adsorption of hepatitis B surface antigen to aluminum hydroxide adjuvant on the immune response. *Vaccine* **27**, 888–892 (2009).
 83. Gupta, R. K. & Siber, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**, 1263–1276 (1995).
 84. Goldenthal, K.L., Cavagnaro, J.A., Alving, C., Vogel, F. R. Safety evaluation of vaccine adjuvants. NCVDPG. Working Groups. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* Suppl 1:S47-51 (1993).
 85. Pittman, P. R. Aluminum-containing vaccine associated adverse events: role of route of administration and gender. *Vaccine* Suppl 3:S48-50 (2002).
 86. Baylor, N.W., Egan, W., Richman, P. Aluminum salts in vaccines--US perspective. *Vaccine* Suppl 3:S18-23. (2002).
 87. Petrovsky, N. & Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends.

- Immunol. Cell Biol.* **82**, 488–496 (2004).
88. Exley, C., Swarbrick, L., Gherardi, R. K. & Authier, F. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Med. Hypotheses* **72**, 135–139 (2009).
 89. Tomljenovic, L. & Shaw, C. A. Aluminum Vaccine Adjuvants: Are they Safe? *Curr. Med. Chem.* **18**, 2630–2637 (2011).
 90. Exley, C. Human exposure to aluminium. *Environ. Sci. Process. Impacts* **15**, 1807–1816 (2013).
 91. He, P., Zou, Y. & Hu, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum. Vaccines Immunother.* **11**, 477–488 (2015).
 92. Marrack, P., McKee, A. S. & Munks, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–93 (2009).
 93. Lin, Y. *et al.* Calcium phosphate nanoparticles as a new generation vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* **0**, 1–12 (2017).
 94. Hayashi, M. *et al.* Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as a vaccine adjuvant. *Vaccine* **34**, 306–312 (2016).
 95. Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M. & Bohner, M. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? *Mater. Today* **19**, 69–87 (2016).
 96. Goto, N., Kato, H., Maeyama, J. & Eto, K. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine* **11**, 914–918 (1993).
 97. Donat, N., Thibaudon, M., Peltre, G. & David, B. Desensitization for 4 successive years using calcium phosphate-adsorbed pollen extracts: study of sera with RAST and PRIST immunoimprints. *Allerg. Immunol. (Paris)*. **18**, 24–31 (1986).
 98. Lecadet A, Ickovic M.R., T. M. Specific desensitization with allergen extracts absorbed on calcium phosphate (Pasteur Institute). Clinical and biological study apropos of 107 cases. *Allerg Immunol (Leipz)* **20**, 153–155 (1988).
 99. Jiang, D., Premachandra, G. S., Johnston, C. & Hem, S. L. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine* **23**, 693–698 (2004).
 100. Sharma, S. *et al.* An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **133**, 120–139 (2015).
 101. Epple, M. *et al.* Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *J. Mater. Chem.* **20**, 18–23 (2010).
 102. Uskoković, V. & Wu, V. M. Calcium phosphate as a key material for socially responsible tissue engineering. *Materials (Basel)*. **9**, 1–9 (2016).
 103. Shu, C. *et al.* Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by gelatin-based precipitation method. *Ceram. Int.* **33**, 193–196 (2007).
 104. Wang, Z., Tang, Z., Qing, F., Hong, Y. & Zhang, X. Applications of calcium phosphate nanoparticles in porous hard tissue engineering scaffolds. *Nano* **7**, 221–226 (2012).
 105. Mi, P. *et al.* Hydrothermally synthesized PEGylated calcium phosphate nanoparticles incorporating Gd-DTPA for contrast enhanced MRI diagnosis of solid tumors. *J. Control. Release* **174**, 63–71 (2014).

106. Bose, S. & Saha, S. K. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Emulsion Technique. *Chem. Mater.* **15**, 4464–4469 (2003).
107. Mohn, D. *et al.* Reactivity of calcium phosphate nanoparticles prepared by flame spray synthesis as precursors for calcium phosphate cements. *J. Mater. Chem.* **21**, 13963–13972 (2011).
108. Shu, C., Yanwei, W., Hong, L., Zhengzheng, P. & Kangde, Y. Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanofibers by mechanochemical methods. *Ceram. Int.* **31**, 135–138 (2005).
109. Xu, J. L. *et al.* Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma. *Mater. Sci. Eng. A* **374**, 101–108 (2004).
110. Li, B. *et al.* Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure. *Acta Biomater.* **5**, 134–143 (2009).
111. Castro, F. *et al.* Continuous-flow precipitation as a route to prepare highly controlled nanohydroxyapatite. *MicroBiotec'15 - Congr. Microbiol. Biotechnol. 2015* **3**, 9821 (2015).
112. He, Q. *et al.* Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**, 899–903 (2000).
113. Koppad, S. *et al.* Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens. *Res. Vet. Sci.* **91**, 384–390 (2011).
114. Volkova, M. A. *et al.* Adjuvant Effects of Chitosan and Calcium Phosphate Particles in an Inactivated Newcastle Disease Vaccine. *Avian Dis.* **58**, 46–52 (2014).
115. Saeed, M. I., Omar, A. R., Hussein, M. Z., Elkhidir, I. M. & Sekawi, Z. Systemic antibody response to nano-size calcium phosphate biocompatible adjuvant adsorbed HEV-71 killed vaccine. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **4**, 88–98 (2015).
116. Kozlova, D. *et al.* Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphatenanoparticles. *J. Mater. Chem.* **22**, 396–404 (2012).
117. Temchura, V. V., Kozlova, D., Sokolova, V., Überla, K. & Epple, M. Biomaterials Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. *Biomaterials* **35**, 6098–6105 (2014).
118. Sokolova, V. *et al.* The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials* **31**, 5627–5633 (2010).
119. Sokolova, V., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A. M. & Epple, M. Quantitative determination of the composition of multi-shell calcium phosphate-oligonucleotide nanoparticles and their application for the activation of dendritic cells. *Acta Biomater.* **7**, 4029–4036 (2011).
120. Knuschke, T. *et al.* Combination of nanoparticle-based therapeutic vaccination and transient ablation of regulatory T cells enhances anti-viral immunity during chronic retroviral infection. *Retrovirology* **13**, 24 (2016).
121. Kozlova, D. *et al.* Calcium phosphate nanoparticles show an effective activation of the innate immune response in vitro and in vivo after functionalization with. *Viol. Sin.*

- 29, 33–39 (2014).
122. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
 123. Schijns VE. in *Immunopotentiators in moder vaccines* 1–22 (Academic Press, 2017).
 124. Dubsky, P. *et al.* Human Dendritic Cell Subsets for Vaccination. *J. Clin. Immunol.* **25**, 551–572 (2005).
 125. Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V. & Banchereau, J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 41–52 (2008).
 126. Geissmann, F. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science (80-.).* **327**, 656–661 (2010).
 127. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
 128. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
 129. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages : Mechanism and Functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
 130. Martínez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**, **13**, 453–461 (2008).
 131. Varin, A., Gordon, S. Alternative activation of macrophages : Immune function and cellular biology. *Immunobiology* **214**, 630–641 (2009).
 132. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs , RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337 (2009).
 133. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
 134. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).
 135. Henao-mejia, J., Elinav, E., Strowig, T. & Flavell, R. A. Inflammasomes : far beyond inflammation. *Nat Immunol* **13**, 321–324 (2012).
 136. Hovarth, G.L., Schrum, J. E. & Nardo, C. M. De. Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes. *Immunol. Rev.* **243**, 119–135 (2011).
 137. Broz, P. & Monack, D. M. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol. Rev.* **243**, 174–190 (2011).
 138. Masopust, D. & Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 309–320 (2013).
 139. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
 140. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
 141. Moser, M. & Leo, O. Key concepts in immunology. *Vaccine* **28**, 2–13 (2010).
 142. Stockinger, B. & Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin.*

- Immunol.* **6**, 281–288 (2007).
143. Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Th17 : the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 652–657 (2007).
 144. Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R. & Deenick, E. K. The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 412–426 (2013).
 145. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. & Forsthuber, T. G. Cytokine T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **10**, 1–13 (2014).
 146. Temann, U. A., Ray, P. & Flavell, R. A. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J. Clin. Invest.* **109**, 29–39 (2002).
 147. Li, H., Nourbakhsh, B., Cullimore, M., Zhang, G. X. & Rostami, A. IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2197–2206 (2011).
 148. Leng, R. X., Pan, H. F., Ye, D. Q. & Xu, Y. Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **1**, 28–32 (2012).
 149. Zhao, P., Xiao, X., Ghobrial, R. M. & Li, X. C. IL-9 and Th9 cells: Progress and challenges. *Int. Immunol.* **25**, 547–551 (2013).
 150. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 857–863 (2009).
 151. Nogralas, K. E. *et al.* IL-22-producing ‘T22’ T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, (2009).
 152. Tian, T., Yu, S. & Ma, D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 113–25 (2013).
 153. Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat. Immunol.* **10**, 864–871 (2009).
 154. Murphy, K. M. & Stockinger, B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat. Immunol.* **11**, 674–680 (2010).
 155. Wang, C., Collins, M. & Kuchroo, V. K. Effector T cell differentiation: Are master regulators of effector T cells still the masters? *Curr. Opin. Immunol.* **37**, 6–10 (2015).
 156. Fang, D. & Zhu, J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *J. Exp. Med.* **214**, 1861–1876 (2017).
 157. Rosenblum, M. D., Way, S. S. & Abbas, A. K. Regulatory T cell memory. *Nat. Publ. Gr.* **16**, 90–101 (2015).
 158. Kuokkanen, E. & Mattila, P. K. Molecular control of B cell activation and immunological synapse formation. *Traffic* **4**, 311–326 (2015).
 159. Abbas, A. K. in *Cellular and Molecular Immunology* 239–263 (2015).
 160. Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* **13**, 509–517 (2011).

161. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **54**, 1–13 (1989).
162. Oleszycka, E. *et al.* The vaccine adjuvant alum promotes IL-10 production that suppresses Th1 responses. *Eur. J. Immunol.* 1–40 (2018).
163. Hogenesch, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* **20**, 34–39 (2002).
164. Wen, Y. & Shi, Y. Alum: an old dog with new tricks. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, e25 (2016).
165. Hutchison, S. *et al.* Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J.* **26**, 1272–1279 (2012).
166. Munks, M. W. *et al.* Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps in vivo. *Blood* **116**, 5191–5200 (2010).
167. Oleszycka, E. & Lavelle, E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr. Opin. Immunol.* **28**, 1–5 (2014).
168. Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., Jr, W. O. C., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1222–1227 (2008).
169. Kool, M. *et al.* Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. *J Immunol* **181**, 3755–3759 (2008).
170. Li, H., Willingham, S. B. & Ting, J. P. Cutting Edge: Inflammasome Activation by Alum and Alum's Adjuvant Effect Are Mediated by NLRP3. *J. Immunol.* **181**, 17–21 (2008).
171. Gregorio, E. De, Tritto, E. & Rappuoli, R. Alum adjuvanticity : Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2068–2071 (2008).
172. Sharp, F. A. *et al.* Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *PNAS* **106**, 870–875 (2009).
173. Harris, J., Sharp, F. A. & Lavelle, E. C. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* **40**, 634–638 (2010).
174. Muñoz-Wolf, N., McCluskey, S., Lavelle, E. C. in *Immunopotentiators in modern vaccines* 23–42 (2017).
175. Franchi, L. & Nflæez, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 b secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2085–2089 (2008).
176. Mckee, A. S. *et al.* Alum Induces Innate Immune Responses through Macrophage and Mast Cell Sensors, But These Sensors Are Not Required for Alum to Act As an Adjuvant for Specific Immunity. *J. Immunol.* **183**, 4403–4414 (2009).
177. Flach, T. L. *et al.* Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.* **17**, 479–487 (2011).
178. Mori, A. *et al.* The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1–11 (2012).
179. Kool, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869–882 (2008).

180. Marichal, T. *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.* **17**, 996–1002 (2011).
181. Mckee, A. S. *et al.* Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *PNASE* E1122–E1131 (2013).
182. Riteau, N. *et al.* ATP release and purinergic signaling : a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* **3**, e403-10 (2012).
183. Wang, Y., Rahman, D. & Lehner, T. A Comparative Study of Stress-mediated Immunological Functions with the Adjuvanticity of Alum. *J. Biol. chemistry* **287**, 17152–17160 (2012).
184. Oleszycka, E. *et al.* IL-1 a and inflammasome-independent IL-1 b promote neutrophil infiltration following alum vaccination. *FEBS J.* **283**, 9–24 (2016).
185. William A Rose, Okragly, A. J., Patel, C. N. & Benschop, R. J. IL-33 released by alum is responsible for early cytokine production and has adjuvant properties. *Nat. Publ. Gr.* **5**, 1–13 (2015).
186. Stephen, J. *et al.* Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity. *npj Vaccines* **2**, 1–9 (2017).
187. Lu, F. & Hogenesch, H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine* **31**, 3979–3986 (2013).
188. Chiao-Wen Yang, Beverly S.I. Strong, Mark J. Miller, and E. R. U. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol* **185**, 2927–2934 (2010).
189. HogenEsch, H. Imject® Alum is not aluminum hydroxide adjuvant or aluminum phosphate adjuvant. *Vaccine* **25**, 4985–4986 (2007).
190. Levy, C. L. *et al.* Diffusion and Tortuosity in Porous Functionalized Calcium Carbonate. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 9938–9947 (2015).
191. Gane, P. A., Kettle, J. P., Matthews, G. P. & Ridgway, C. J. Void space structure of compressible polymer spheres and consolidated calcium carbonate paper-coating formulations. *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**, 1753–1764 (1996).
192. Gallizia, A. *et al.* Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **14**, 192–196 (1998).
193. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77–92 (1999).
194. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
195. Vitral, D. A. C. *et al.* In-vitro study of cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages stimulated by interferon gamma with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **137**, 665–670 (2008).
196. Iuvone, T., Esposito, G., Capasso, F. & Izzo, A. A. Induction of nitric oxide synthase expression by *Withania somnifera* in macrophages. *Life Sci.* **72**, 1617–1625 (2003).
197. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-

- time quantitative PCR and. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
198. Mansour, M. K., Latz, E. & Levitz, S. M. Cryptococcus neoformans glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. *J. Immunol.* **176**, 3053–61 (2006).
 199. Blaauboer, S. M. *et al.* The mucosal adjuvant cyclic di-GMP enhances antigen uptake and selectively activates pinocytosis-efficient cells in vivo. *Elife* **2015**, 1–25 (2015).
 200. Liu, D. *et al.* Statistical determination of threshold for cellular division in the CFSE-labeling assay. *J. Immunol. Methods* **312**, 126–136 (2006).
 201. Temme, S., Jacoby, C., Ding, Z., Bönner, F. & Borg, N. Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 689–697 (2017).
 202. Duffy, J. & Hill, A. Suspension stability : Why particle size , zeta potential and rheology are important. *Annu. Trans. Nord. Rheol. Soc.* **20**, 209–214 (2012).
 203. R. G. Larson. Particulate suspensions. in *The structure and rheology of complex fluids* 263–264 (Oxford University Press, Inc., 1999).
 204. Platts, L. & Falconer, R. J. Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins. *Int. J. Pharm.* **486**, 131–135 (2015).
 205. Pikal-Cleland, K. A., Cleland, J. L., Anchordoquy, T. J. & Carpenter, J. F. Effect of Glycine on pH Changes and Protein Stability during Freeze – Thawing in Phosphate Buffer Systems. *J. Pharm. Sci.* **91**, 1969–1979 (2002).
 206. Vega, E. D., Narda, G. E. & Ferretti, F. H. Adsorption of citric acid from dilute aqueous solutions by hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.* **268**, 37–42 (2003).
 207. Misra, D. N. Interaction of Citric Acid with Hydroxyapatite : Surface Exchange of Ions and Precipitation of Calcium Citrate. *J. Dent. Res* **75**, 1418–25 (1996).
 208. Hu, Y. & Rawal, A. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *PNAS* **107**, 22425–29 (2010).
 209. Kinniburgh, D. G. General purpose adsorption isotherms. *Environ. Sci. Technol.* **20**, 895–904 (1986).
 210. Jully, V. & Lemoine, D. Mechanisms of Antigen Adsorption Onto an Aluminum-Hydroxide Adjuvant Evaluated by High-Throughput Screening. *J. Pharm. Sci.* **105**, 1829–1836 (2016).
 211. Dias, W. O. *et al.* An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 339–348 (2013).
 212. Mizukami, T. *et al.* An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals* **37**, 8–17 (2009).
 213. Lonez, C. *et al.* Cationic lipid nanocarriers activate Toll-like receptor 2 and NLRP3 inflammasome pathways. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 775–782 (2014).
 214. Patil, H. P. *et al.* Evaluation of monophosphoryl lipid A as adjuvant for pulmonary delivered in fl uenza vaccine. *J. Control. Release* **174**, 51–62 (2014).
 215. Autenrieth, S. E. & Autenrieth, I. B. Variable antigen uptake due to different

- expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* **127**, 523–9 (2009).
216. Bimal, S. *et al.* Experimental Parasitology Leishmania donovani : CD2 biased immune response skews the SAG mediated therapy for a predominant Th1 response in experimental infection. *Exp. Parasitol.* **131**, 274–282 (2012).
 217. Chakraborty, B. & Sengupta, M. Boosting of nonspecific host response by aromatic spices turmeric and ginger in immunocompromised mice. *Cell. Immunol.* **280**, 92–100 (2012).
 218. León-rodríguez, L., Luzardo-álvarez, A., Blanco-méndez, J., Lamas, J. & Leiro, J. Fish & Shell fish Immunology Biodegradable microparticles covalently linked to surface antigens of the scuticociliate parasite *P. dicentrarchi* promote innate immune responses in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 236–243 (2013).
 219. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907–916 (2001).
 220. Abbas, A. K. *Cellular and Molecular Immunology.* (2015).
 221. Wilmar, A., Loney, C., Vermeersch, M., Andrianne, M., Perez-Morga, D., Ruyschaert, J.-M. The cationic lipid, diC14 amidine, extends the adjuvant properties of aluminum salts through a TLR-4 and caspase-1-independent mechanism. *Vaccine* **30**, 414–424 (2012).
 222. Singh, S. K. *et al.* Design of neo-glycoconjugates that target the mannose receptor and enhance TLR-independent cross-presentation and Th1 polarization. *Eur. J. Immunol.* **41**, 916–925 (2011).
 223. Vigerust, D. J., Vick, S. & Shepherd, V. L. Characterization of functional mannose receptor in a continuous hybridoma cell line. *BMC Immunol.* **13**, 51 (2012).
 224. Neumann, S. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome is not a feature of all particulate vaccine adjuvants. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 1–8 (2014).
 225. Korsholm, K. S., Rune, V. & Agger, E. M. T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. *Immunology* **129**, 75–86 (2009).
 226. von Moltke, J. Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van R. N. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature* **490**, 107–111 (2012).
 227. Meza-perez, S. & Randall, T. D. Immunological functions of the omentum. *Trends Immunol.* **38**, 526–536 (2017).