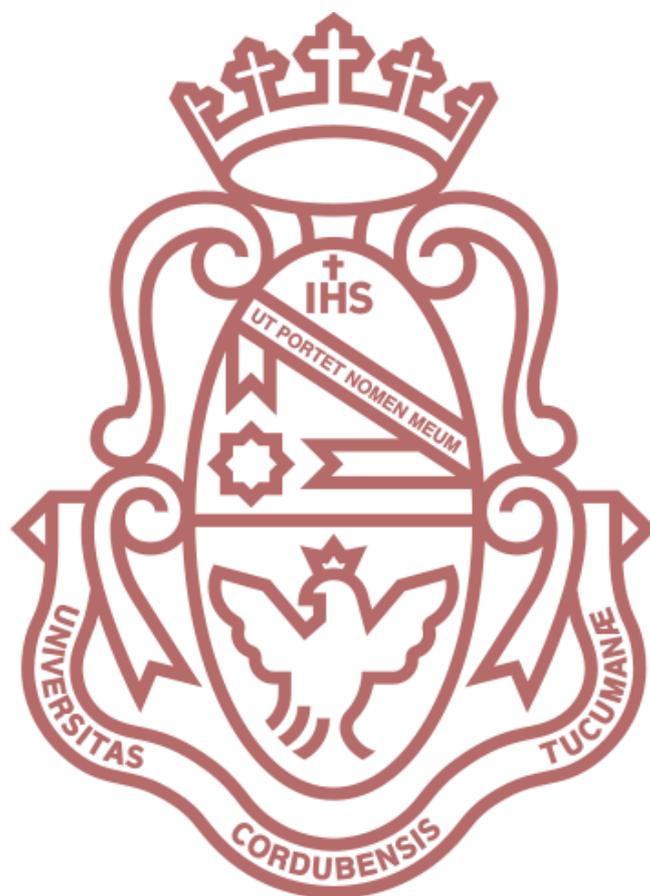






**ESTUDIOS DE PREFORMULACION Y  
FORMULACION DE SISTEMAS  
NANOMETRICOS PARA LA  
ADMINISTRACION DE FARMACOS**



***Gabriela Verónica Ullio Gamboa***

**2014**





# ESTUDIOS DE PREFORMULACION Y FORMULACION DE SISTEMAS NANOMETRICOS PARA LA ADMINISTRACION DE FARMACOS

---

*Trabajo de tesis para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Químicas de*

*Gabriela Verónica Ullio Gamboa*

Director

***Prof. Dr. Daniel A. Allemandi***

Comisión Asesora

***Prof. Dra. Carla Giacomelli***

***Prof. Dr. Santiago D. Palma***

***Prof. Dra. María C. Pistoressi- Palencia***

Evaluador externo

***Prof. Dr. Modesto Rubio***



*Dedicado a mis abuelos*



Quisiera expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que me han acompañado durante este trabajo de tesis:

A Daniel el “profe” director de esta tesis, por su infinita paciencia, sus observaciones y por darme la posibilidad de trabajar libremente.

Al Dr. Rubén Manzo, por recibirme en su grupo de trabajo y estar siempre dispuesto y entusiasta ante cualquier consulta o carta de recomendación..!

A Santiago Palma miembro sugerido de esta tesis por las eternas discusiones, su amistad y las valiosas horas de laboratorio.

A la comisión evaluadora, Dra. Carla Giacomelli y Dra. Cristina Pistoressi por sus aportes y dedicación durante el desarrollo de mi tesis. Asimismo quiero agradecer al Dr. Modesto Rubio por haber aceptado ser el evaluador externo.

A los Dres. Carlos Lanusse y Adrian Lifschitz por haberme permitido trabajar con ellos en Tandil y al Dr. Lucho Benedini por el trabajo compartido en Bahía Blanca.

De forma especial mi más sincero agradecimiento a M. Jean-Pierre Benoit por la posibilidad de trabajar en su laboratorio, sus consejos académicos y nuestras charlas en español.

Al departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba por brindarme el lugar físico donde se desarrollaron los trabajos de esta tesis y a las diferentes instituciones y programas que me brindaron el soporte económico todos estos años: CONICET, FONCYT, SECyT-UNC.

A Nana, Ale, Lina, Juan, Dani, Marina, Caro, Franco y Nacho porque además de “doctorear” también compartimos muchos buenos momentos y a toda la banda del 210 especialmente a Laura, Andrea y Eliseo con los que tuve la suerte de compartir esta aventura.

Las “chicas de la punta” Sole, Moni, Lichi, Julia, Noe y Flavia por su amistad, tiempo y los buenos momentos compartidos.

Mis amigas de la carrera Magui, Cintia, Fer y las Melli por todo el camino recorrido...

A las *doctoras de la vida*: Romi, Elena, Vero y Nati porque sin ellas el camino no hubiera sido divertido.

En forma especial a mis hermanos y amigos del corazón Agustín, Santiago y Victoria por su apoyo, compañía y miles de bromas.

Y por último quiero agradecer a mis dos espónsos oficiales, pilares y grandes personas, mi mamá y mi papá, que me han dado lo más hermoso que tengo: la vida y una gran familia.



## RESUMEN

*Los recientes avances en el área de la nanotecnología han evidenciado la potencial utilidad de los sistemas nanométricos en la farmacoterapia, más específicamente en el direccionamiento y la liberación controlada de fármacos.*

*En el presente trabajo de Tesis hemos llevado a cabo, en primer lugar, estudios tendientes a evaluar la potencial utilización de agregados supramoleculares (coageles) formados a partir del palmitato de ascorbilo como sistemas portadores para oligodeoxinucleótidos (CpG-ODN) con actividad adyuvante. El estado del agua en los coageles es vital en su estructura, y es posible modular la liberación del adyuvante aumentando su estabilidad frente a la degradación enzimática en condiciones in vitro. Por otro lado, CpG-ODN formulado en coageles aumenta la magnitud tanto de la respuesta humoral como la celular específica para un antígeno proteico modelo comparado a la administración de CpG-ODN en solución y este efecto se mantiene en el tiempo.*

*En la segunda parte, nos avocamos al estudio y desarrollo de nanocápsulas lipídicas (NCLs) obtenidas a partir de la técnica de inversión de fases de una emulsión. Las propiedades más relevantes de estas partículas son su baja toxicidad, su tamaño nanométrico, y su estabilidad física. Se describe la obtención y caracterización de los sistemas para la vehiculización de ivermectina (IVM) y albendazol (ABZ), agentes antiparasitarios de amplio espectro que presentan una biodisponibilidad errática atribuible en gran medida a las formas farmacéuticas convencionales de administración.*

*La versatilidad de la composición química de las NCLs permite también la funcionalización de su superficie por la unión de ligandos específicos. En este contexto, la adición en superficie de un polímero catiónico (lipochitosan) demuestra la viabilidad del proceso propuesto para la inserción, y la posterior interacción electrostática de esta nueva partícula con el CpG-ODN de carga opuesta. Contrariamente a lo obtenido para los coageles, la respuesta inmune se anula. Esto permitiría una nueva aplicación de las NCLs por ejemplo en el tratamiento de patologías que requieran una disminución de la respuesta inmune, como es el caso de las enfermedades autoinmunes.*



# ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ABREVIATURA O ACRONIMO	SIGNIFICADO
ABC	Área bajo la curva
ABZ	Albendazol
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AO	Ácido oleico
ASC16	6-O-ascorbil hexadecanoato (palmitato de ascorbilo)
CD	Células dendríticas
CD	Coefficiente de difusión
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
C <sub>max</sub>	Concentración máxima
CMC	Concentración micelar crítica
Coa-ASC16	Coageles de palmitato de ascorbilo (2% p/p)
CPA	Células presentadoras de antígenos
CpG-ODN	Oligodeoxinucleótidos sintéticos conteniendo motivos CpG sin metilar
CpG-ODN (PO)	Oligodeoxinucleótidos sintéticos conteniendo motivos CpG sin metilar con un esqueleto fosfodiéster
CpG-ODN (PS)	Oligodeoxinucleótidos sintéticos conteniendo motivos CpG-ODN sin metilar con un esqueleto fosforotioato
DDL	Dispersión dinámica de luz (su sigla en inglés, DLS)
d <sub>H</sub>	Diámetro hidrodinámico
DL 50	Dosis letal 50
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido
EA	Equinococosis alveolar
EDL	Electroforesis dinámica de luz

---

**ABREVIATURA O ACRONIMO    SIGNIFICADO**

---

<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
<b>EQ</b>	Equinococosis quística
<b>F</b>	Fármaco
<b>FA</b>	Farmacopea Argentina
<b>FACS</b>	Clasificador de células activadas por fluorescencia
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y fármacos (en inglés: Food and Drug Administration)
<b>FF</b>	Forma farmacéutica
<b>FT-IR</b>	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocido como seguro
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta performance
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IP</b>	Índice de polidispersidad
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>IVM</b>	Ivermectina
<b>K<sub>p</sub></b>	Punto de Krafft
<b>Lag time</b>	Tiempo de retraso
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MALT</b>	Tejido linfoide asociado a las mucosas
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>MFA</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>MIF</b>	Método de inversión de fases
<b>NCLs</b>	Nanocápsulas lipídicas
<b>NK</b>	Células asesinas naturales (en inglés: natural killer)
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud

---

**ABREVIATURA O ACRONIMO    SIGNIFICADO**

---

<b>O/W</b>	Emulsión de tipo aceite en agua
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PA</b>	Principio activo
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>P-gp</b>	Glicoproteína-p
<b>PID</b>	Pared intestino delgado
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PO</b>	Vía peroral
<b>PZ</b>	Potencial z
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SC</b>	Sistema del complemento
<b>SC</b>	Vía subcutánea
<b>SFM</b>	Sistema fagocítico mononuclear
<b>SPF</b>	Sistema portador de fármaco
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>TIF</b>	Temperatura de inversión de fases
<b>TLR-9</b>	Receptor tipo Toll-like 9
<b>TMC</b>	Temperatura micelar crítica
<b>USP</b>	Farmacopea de los Estados Unidos
<b>W/O</b>	Emulsión de tipo agua en aceite
<b>ZIF</b>	Zona de inversión de fases

---



# INDICE GENERAL

Resumen ..... i

Abreviaturas y Acrónimos..... ii-iv

## Capítulo 1. *Introducción y Objetivos*

1.1. Introducción general..... 1

1.2. PRIMERA PARTE. Agregados supramoleculares como sistemas portadores de fármacos ..... 7

1.2.1. Tensioactivo biocompatible derivado de vitamina C: Palmitato de Ascorbilo..... 8

1.3. SEGUNDA PARTE. Nanopartículas como plataformas farmacéuticas ..... 10

1.3.1. Nanocápsulas lipídicas ..... 11

1.4. Objetivos y organización general de la Tesis ..... 13

## **PRIMERA PARTE**

### Capítulo 2. *Desarrollo y validación de una técnica analítica para la cuantificación de CpG-ODN en una formulación de cristales líquidos*

2.1. Introducción ..... 15

2.2. Materiales y Métodos..... 17

2.2.1. Materiales ..... 17

2.2.2. Equipamiento..... 18

2.2.3. Condiciones cromatográficas..... 18

2.2.4. Preparación de las soluciones madres, soluciones estándares y fase móvil..... 18

2.2.5. Preparación de los coageles cargados con CpG-ODN ..... 19

2.3. Resultados y Discusión..... 19

2.3.1. Selectividad ..... 20

2.3.2. Linealidad ..... 22

2.3.3. Sensibilidad .....	24
2.3.4. Precisión y exactitud .....	25
2.3.5. Robustez.....	28
2.3.6. Estabilidad .....	29
2.4. Conclusiones del capítulo .....	31

**Capítulo 3. Caracterización de cristales líquidos de palmitato de ascorbilo para la vehiculización de fármacos con actividad adyuvante: CpG-ODN**

3.1. Introducción .....	32
3.2. Materiales y Métodos .....	35
3.3. Resultados y Discusión.....	36
3.3.1. Comportamiento de fases del sistema ASC16- dextrosa con el cargado de OVA y CpG-ODN .....	36
3.3.2. Liberación <i>in vitro</i> de CpG-ODN y de OVA desde Coa-ASC16.....	46
3.3.3. Estabilidad de CpG-ODN vehiculizado en Coa-ASC16 frente a la degradación por exonucleasas.....	49
3.4. Conclusiones del capítulo .....	51

**Capítulo 4. Evaluación de la aplicación de cristales líquidos de palmitato de ascorbilo para la potencial formulación de vacunas**

4.1. Introducción.....	53
4.2. Materiales y Métodos.....	56
4.2.1. Materiales .....	56
4.2.2. Esquema de inmunización .....	56
4.3. Resultados y Discusión.....	58
4.3.1. Evaluación de la eficacia adyuvante de CpG-ODN vehiculizado en coageles de ASC16 .....	58

4.3.2. Persistencia de la respuesta inmune en el tiempo: respuesta inmune de memoria .....	<b>63</b>
4.3.3. Evaluación de la respuesta inmune empleando diferentes esquemas de inmunización .....	<b>66</b>
4.3.4. Evaluación de la respuesta inflamatoria en el sitio de inyección .....	<b>69</b>
4.3.5. Comparación: co-formulación/co-inyección.....	<b>73</b>
4.3.6. Aplicación del sistema a un antígeno vacunal: Toxoide Tetánico .....	<b>75</b>
4.4. Conclusiones del capítulo .....	<b>78</b>

## **SEGUNDA PARTE**

### **Capítulo 5. *Nanocápsulas Lipídicas para la vehiculización de fármacos antiparasitarios: Ivermectina***

5.1. Introducción .....	<b>79</b>
5.2. Materiales y Métodos.....	<b>81</b>
5.3. Resultados y Discusión.....	<b>82</b>
5.3.1. Obtención de las nanocápsulas lipídicas cargadas con ivermectina (IVM-NCLs) y determinación de la conductividad .....	<b>82</b>
5.3.2. Caracterización fisicoquímica de IVM-NCLs.....	<b>83</b>
5.3.3. Eficiencia de encapsulación de IVM-NCLs.....	<b>86</b>
5.3.4. Estudios de estabilidad de IVM-NCLs.....	<b>87</b>
5.3.5. Activación del sistema del complemento y captura macrofagocítica .....	<b>88</b>
5.3.6. Estudios farmacocinéticos .....	<b>91</b>
5.3.7. Estudios de biodistribución a los principales órganos/tejidos de localización parasitaria .....	<b>94</b>
5.4. Conclusiones del capítulo .....	<b>98</b>

**Capítulo 6. Nanocápsulas Lipídicas para la vehiculización de fármacos antiparasitarios:  
Albendazol**

6.1. Introducción .....	99
6.2. Materiales y Métodos.....	103
6.3. Resultados y Discusión.....	104
6.3.1. Estudios de preformulación y formulación.....	104
6.3.2. Caracterización fisicoquímica de ABZ-NCLs .....	108
6.3.3. Ensayos de liberación <i>in vitro</i> .....	109
6.3.4. Estabilidad de ABZ-NCLs .....	110
6.3.5. Estudio de eficacia quimioprolifáctica .....	111
6.4. Conclusiones del capítulo .....	116

**Capítulo 7. Funcionalización de la superficie de nanocápsulas lipídicas mediante la  
técnica de post-inserción**

7.1. Introducción .....	117
7.2. Materiales y Métodos.....	120
7.2.1. Obtención de las NCLs con superficie modificada .....	120
7.2.2. Incorporación de oligodeoxinucleótidos con motivos CpG .....	121
7.2.3. Estudios de estabilidad y caracterización fisicoquímica de los sistemas.....	121
7.2.4. Evaluación de la respuesta inmune en línea celular de macrófagos.....	122
7.3. Resultados y Discusión.....	123
7.3.1. Obtención, caracterización fisicoquímica y evaluación de la estabilidad de NCLs modificadas .....	123
7.3.2. Obtención, estabilidad y capacidad máxima de acomplejamiento de NCLs/LCh con CpG-ODN .....	126

7.3.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la respuesta inmune inducida por CpG-ODN vehiculizado en NCLs/LCh.....	130
7.4. Conclusiones del capítulo .....	134
<b>Capítulo 8. Conclusiones Generales.....</b>	<b>135</b>
 <b>Anexo I. Materiales y métodos específicos parte I</b>	
 <b>1. Materiales</b>	
M.1.- Ovoalbúmina (OVA).....	137
M.2.- Oligodeoxinucleótidos con motivos CpG (CpG-ODN) .....	138
M.3. -Palmitato de ascorbilo (ASC16).....	139
 <b>2. Métodos <i>in vitro</i></b>	
M.4.-Obtención de los coageles de palmitato de ascorbilo (Coa-ASC16).....	140
M.5.-Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) .....	142
M.5.1.Procedimiento realizado para cada análisis por CDB.....	143
M.6.-Microscopía Óptica de luz Polarizada (MOP) con platina de calentamiento .....	143
M.7. -Espectroscopía Infrarroja (FT-IR).....	144
M.8.- Estudios de liberación .....	144
M.9. -Ensayo de degradación por nucleasas .....	146
 <b>3. Métodos <i>in vivo</i></b>	
M.10.-Cultivo de células de bazo.....	147
M.11. -Ensayo de detección de anticuerpos .....	147
M.12.-Ensayo de detección de citoquinas.....	148
M.13.- Histología.....	149
M.14. -Análisis estadístico .....	149

## **Anexo II. Materiales y métodos específicos parte II**

### **1. Materiales**

M.1.-Ivermectina (IVM) .....	150
M.2.- Albendazol (ABZ) .....	151
M.3.- Lipochitosan (LCh) .....	152

### **2. Métodos *in vitro* e *in vivo***

M.4.-Obtención de las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs).....	153
M.4.1.Composición y estructura general de las NCLs.....	155
M.5.-Conductividad .....	156
M.6.- Dispersión dinámica de la luz y potencial electrocinético .....	156
M.7. -Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) .....	157
M.8.- Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	158
M.9.-Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y Termogravimetría (TGA) .....	158
M.10.-Cargado de fármaco y Eficiencia de Encapsulación (EE%).....	158
M.11.-Estudio de activación del sistema del complemento: técnica de CH50 .....	159
M.12.-Evaluación de la captura macrofagocítica .....	161
M.13. -Estudios farmacocinéticos .....	162
M.13.1.Animales de experimentación, tratamiento y muestreo .....	162
M.13.2.Procedimiento analítico.....	162
M.14.- Estudios de solubilidad.....	164
M.15.- Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	165
M.16.-Ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	165
M.17.-Quimioterapia experimental de la hidatidosis.....	165
M.17.1.Infección de los ratones.....	165

M.17.2.Necropsia y obtención de los quistes.....	166
M.17.3.Eficacia quimioproláctica en ratones .....	167
M.17.4.Análisis estadístico.....	168
M.17.5. Estudio ultraestructural.....	168
M.18.-Test de citotoxicidad (MTS).....	168
<b>Bibliografía</b> .....	<b>170</b>



# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCION Y OBJETIVOS**





## Capítulo 1

### *Introducción y Objetivos*

#### **1.1. Introducción General**

Para el desarrollo de un medicamento es necesario llevar a cabo varias etapas incluyendo: (i) selección de un principio activo de comprobada seguridad, (ii) búsqueda de excipientes confiables e (iii) implementación de la tecnología necesaria para desarrollar la forma farmacéutica requerida. Todo esto debe funcionar bajo estrictos controles que garanticen una correcta formulación. De este modo, la meta fundamental en el diseño de un medicamento es que el mismo vehicule el/los fármacos (F) hasta el sitio de absorción o de acción con una velocidad adecuada logrando una concentración requerida durante un periodo de tiempo determinado (control espacio-temporal). Su comportamiento puede ser dependiente o no del medio circundante donde se aplique y debe por supuesto combinar una óptima eficacia, con un máximo de seguridad y confiabilidad. Este criterio moderno de calidad farmacéutica da origen a lo que se conoce actualmente como medicamento optimizado, tal como se muestra en la **figura 1.1**. [Banker, 2002].

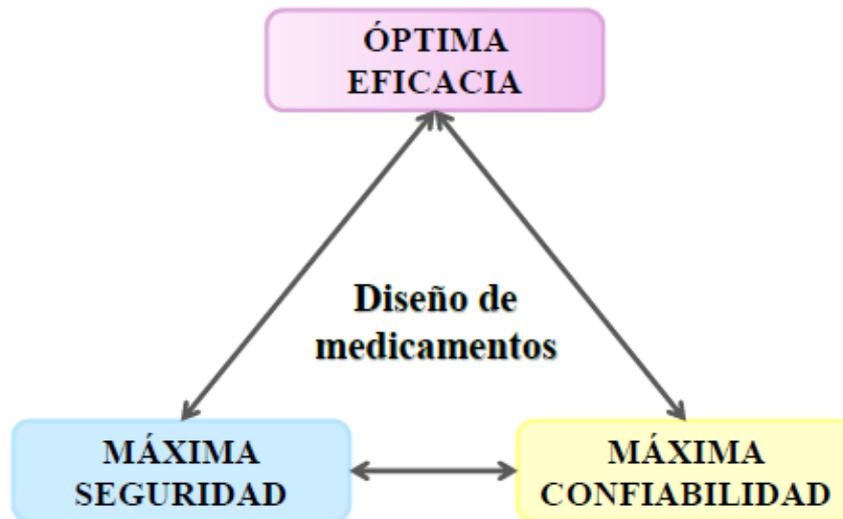


Figura 1.1. Concepto de medicamento optimizado.

La **figura 1.2.** resume los principales factores que influyen en el diseño de un medicamento. Por un lado, se debe considerar la patología a tratar, la forma farmacéutica, y la vía de administración. Por el otro, las propiedades fisicoquímicas de los F a vehicular, entre las que podemos mencionar: solubilidad acuosa, pKa, coeficiente de reparto y permeabilidad efectiva. Desde el punto de vista biológico, se deben tener en cuenta los eventos farmacocinéticos y farmacodinámicos que acontecen luego de la administración de un medicamento como por ejemplo la absorción, distribución y el metabolismo, los cuales están relacionados al tiempo de vida media de eliminación y al margen de seguridad del mismo [Chia y Robinson, 1998; Collet y Moreton, 2002].

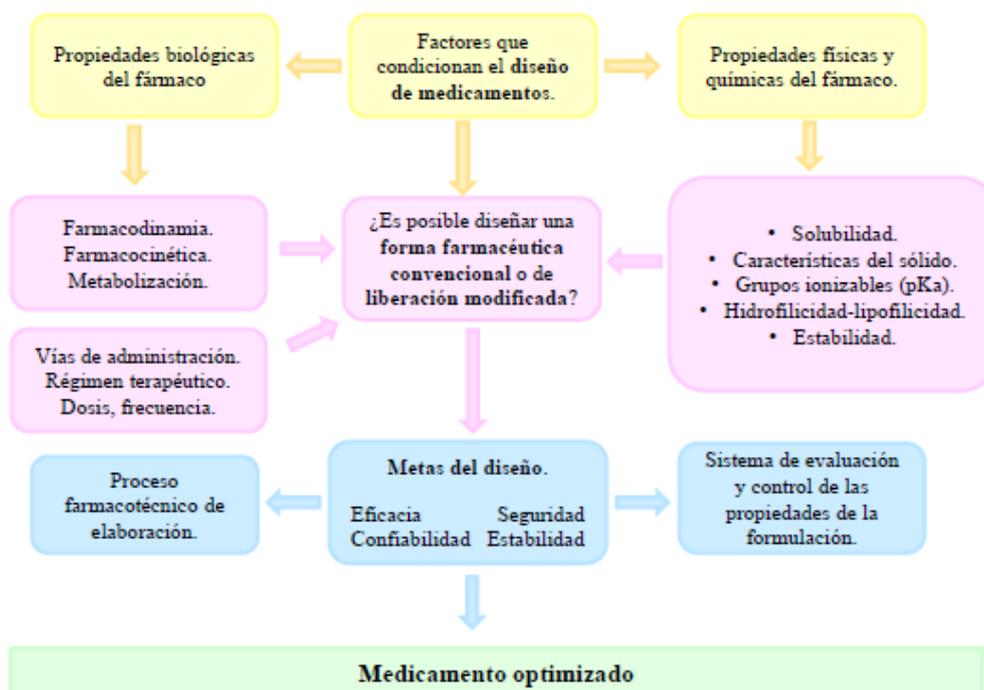


Figura 1.2. Factores que influyen en el desarrollo de un medicamento.

Por otra parte, cuando se habla específicamente de tecnología farmacéutica, se hace referencia al uso y aplicación que se hace de los conocimientos básicos adquiridos en el diseño, preparación, control y almacenamiento de formulaciones farmacéuticas. Hace unas cuatro décadas atrás, el principal objetivo de la investigación farmacéutica era la obtención de nuevos principios activos con actividad terapéutica. Sin embargo, en los últimos años, la evolución que ha experimentado la tecnología farmacéutica, unido a la dificultad y al costo que implica la obtención de nuevos principios activos que representen un avance terapéutico real, ha movilizó a la industria farmacéutica a la búsqueda y desarrollo de nuevos sistemas portadores de fármacos (SPF). Se denomina de esta manera a las formas farmacéuticas, sistemas o dispositivos que liberan el principio activo a velocidades predeterminadas durante un tiempo preestablecido o lo vectorizan hacia una estructura corporal concreta. [Berrozpe y cols., 2008].

Existen numerosos F con atributos terapéuticos relevantes que presentan propiedades fisicoquímicas o biológicas desfavorables, las que comprometen su eficacia o seguridad y en consecuencia requieren nuevas alternativas de formulación

para superar tales deficiencias. El desarrollo de SPF es una de las estrategias frecuentemente utilizadas para solucionar este tipo de problemas. De esta manera, la investigación en esta área de las ciencias farmacéuticas es un campo de marcado interés científico y tecnológico [Huynh y cols., 2009; Barratt, 2000; Wissing y cols., 2004; Laouini y cols., 2014].

Dependiendo del objetivo que se persigue, los sistemas portadores son diseñados para ser administrados por diferentes vías. En algunos casos se pretende direccionar el sistema a un órgano/tejido blanco, mediante la administración sistémica (vía parenteral) o local (vía tópica). En otros casos es necesario que el portador acceda al sitio de absorción y permanezca allí durante un determinado período de tiempo (vía peroral) [Hearnden y cols, 2012; Crommelin y Florence, 2013].

En general, como atributos deseables de un sistema portador se pueden citar:

1. Posibilidad de variar la velocidad de liberación de fármacos para poder adecuar el sistema a la farmacocinética particular (flexibilidad).
2. Posibilidad de mantener un control preciso de la velocidad de liberación para cada fármaco (precisión).
3. Baja sensibilidad del sistema (robustez) ante las variables fisiológicas tales como:
  - Motilidad y vaciado gástrico, pH, volumen de los fluidos del tracto gastrointestinal (TGI)
  - Presencia de enzimas
  - Administración concomitante con alimentos
  - Condición y actividad física del individuo
  - Variabilidad interindividual
  - Variables patológicas
4. Obtención de formulaciones fisicoquímicamente estables
5. Mantener o aumentar la estabilidad del fármaco
6. Aplicable a una amplia variedad de fármacos
7. En la medida de lo posible que el costo sea razonable

En el diseño y producción de medicamentos, el estudio de las propiedades fisicoquímicas es fundamental para el desarrollo de una forma farmacéutica efectiva y segura. Por otra parte, los aspectos biofarmacéuticos son claves en la obtención de SPF

eficaces y seguros y esto incluye fenómenos que van desde la liberación del fármaco de la forma farmacéutica hasta la evaluación de la concentración del principio activo en el sitio blanco.

La nanotecnología se ha convertido en una de las tecnologías centrales en el siglo XXI [Parveen y cols., 2001]. Mucho más que en cualquier otro campo de la ciencia, el desarrollo y el progreso han sido posibles a través de la convergencia de la química, la biología, la física, las matemáticas, la ingeniería, entre otras ciencias naturales [Bawa, 2005; Godin y cols., 2010; Poirot-Mazeres, 2011]. La nanomedicina surge como un nuevo campo emergente creado por la fusión de la nanotecnología y la medicina y es una de las disciplinas más prometedoras para el desarrollo de una terapia efectiva basada en el direccionamiento de fármacos. El creciente interés en la nanomedicina es impulsado en gran parte por el rápido ritmo de la innovación y el éxito de las nanopartículas que se han traducido en la evaluación clínica exitosa de un número importante de especialidades farmacéuticas (**tabla 1.1.**).

**Tabla 1.1. Medicamentos basados en sistemas nanométricos recientemente aprobados para su comercialización.**

Producto	Fármaco	Formulación	V.A. <sup>a</sup>	Aplicación	Compañía
Abraxane	Paclitaxel	Nanopartículas de albumina	Inyección IV	Metastasis de cancer de mama	American Biosciences (Blauvelt, NY <sup>b</sup> )
Amphocil	Anfotericina B	Lipocomplex (complejo lipídico)	Infusión IV	Infecciones fúngicas severas	Sequus Pharmaceuticals (California)
Ambisome	Anfotericina B	Liposoma	Infusión IV	Infecciones fúngicas severas	NeXstar Pharmaceutical (Boulder, Colorado)
Abelcet	Anfotericina B	Lipocomplex (complejo lipídico)	Infusión IV	Infecciones fúngicas severas	The liposome Company (Princeton, NJ <sup>c</sup> )
DaunoXome	Citrato de Daunorubicina	Liposoma	IV	Sarcoma deKaposi (SIDA)	NeXstar Pharmaceutical (Boulder, Colorado)
Doxil	Doxorubicina	Liposoma	Inyección IV	Sarcoma deKaposi (SIDA)	Sequus Pharmaceuticals (California)
Elestrin	Estradiol	Nanopartículas de calcio y fosfato	Transdermal	Sintomas vasomotores (sofocos) moderados a severos en mujeres menopausicas	Biosante (Lincolnshire Illinois)
Emend	Aprepitant MK869	Nanocristales	Oral	Tratamiento de náuseas y vómitos	Merck/Elan (Whitehouse Station, NJ <sup>c</sup> )
Megace ES	Acetato de Megestrol	Nanocristales	Oral	Anorexia o pérdida de peso importante	PAR Pharmaceutical (WoodCliffLake, NJ <sup>c</sup> )
Rapamune	Sirolimus (Rapamicina)	Nanocristales	Oral	Inmunosupresor en personas con trasplante de riñon	Wyeth/Elan (Madison, NJ)
Tricor	Fenofibrato	Nanocristales	Oral	Hipercolesterolemia, Lipidemia, Hipertrigliceridemia	Abbott (Abbott Park Illinois)

<sup>a</sup>V.A.: vía de administración; <sup>b</sup>NY: New York; <sup>c</sup>NJ: New Jersey, <sup>d</sup>IV: intravenoso [Extraído de Semete y cols., 2010].

En este contexto, nos centramos en el desarrollo y la evaluación de dos sistemas portadores a escala nanométrica propuestos para la vehiculización de tres fármacos de interés en farmacoterapia humana y veterinaria.

## **1.2. PRIMERA PARTE. Agregados supramoleculares como sistemas portadores de fármacos**

Los agentes tensioactivos (AT) o surfactantes conforman uno de los grupos más importantes de excipientes auxiliares utilizados en diferentes formas farmacéuticas [Wade y Weller, 1994]. La denominación de tensioactivos, surfactantes o agentes tensioactivos, hace referencia a la característica de una molécula de tener actividad superficial y se debe tener en consideración que no todos los anfífilos la poseen de manera destacada. De todos estos términos la denominación anfífilo o molécula anfipática es la manera más general para nombrar a esta familia de moléculas, dado que describe las características de solubilidad dual que presentan, sin hacer referencia a que posean o no actividad superficial. Sin embargo, los fenómenos de agregación y de reducción de la tensión interfacial son algunas de las características esenciales por las cuales se remonta a la definición de Laughlin donde se define a un tensioactivo (o surfactante) como aquel anfífilo que abate la tensión interfacial y que además forma agregados coloidales, ya sean micelas o cristales líquidos en función a las diferentes proporciones de agua con que cuente el sistema dependiendo de su temperatura [Messina 2003].

De esta última propiedad surge su gran utilidad en tecnología farmacéutica desempeñando diferentes funciones tales como:

- Adsorción de fármacos sobre excipientes sólidos
- Humectación, disgregación y disolución de los fármacos
- Absorción de moléculas a través de membranas biológicas
- Formación y estabilización de emulsiones y suspensiones
- Formación de sistemas autoagregados (micelas, mesofases, vesículas)

Por otra parte, el avance en el desarrollo de sistemas conteniendo AT ha consolidado varias áreas bien definidas [Banker y Rodes, 1990]. De este modo, a los sistemas clásicos formados por sistemas micelares o coloides de asociación (asociaciones supramoleculares de tensioactivos), suspensiones (tensioactivos en interfase sólido-líquido) y emulsiones (tensioactivos en interfase líquido-líquido); se han incorporado nuevos sistemas constituidos por liposomas (vesículas laminares de

fosfolípidos), hexosomas, cubosomas (matrices de cristal líquido) [Boyd y cols., 2006], niosomas (vesículas laminares de tensioactivos no iónicos) y microemulsiones (tensioactivos en interfase líquido-líquido, termodinámicamente estables) [Jurkovic y cols., 2003].

El estudio del comportamiento de los AT en solución provee la información necesaria para poder reconocer los dominios de existencia de las diferentes fases que se pueden formar a medida que se varía la temperatura, la composición del medio y la concentración del compuesto en estudio.

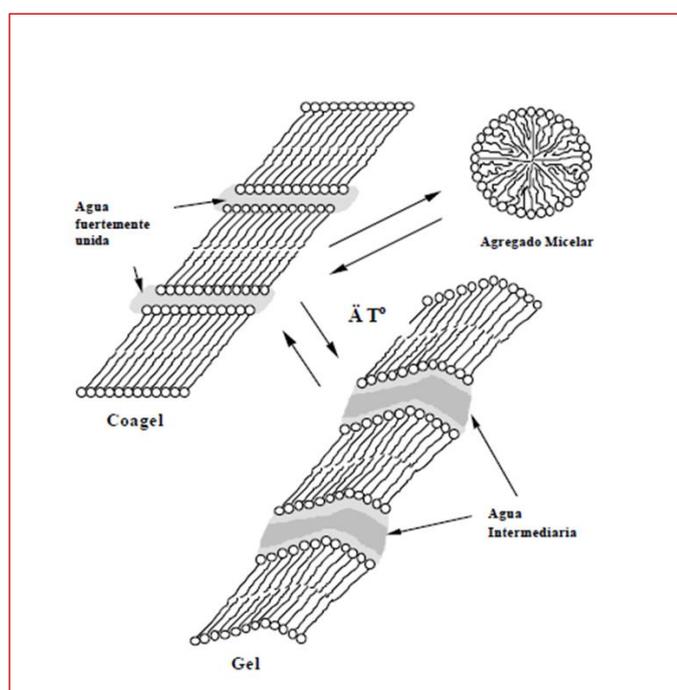
En los últimos años, nuestro grupo de Farmacotecnia y Tecnología Farmacéutica ha desarrollado una nueva estrategia de investigación y desarrollo (I+D) sobre sistemas portadores de F consolidando una **PLATAFORMA TECNOLÓGICA**, basada en nuevos sistemas dispersos coloidales para la vehiculización de principios activos. En este caso, se seleccionó un derivado del ácido ascórbico, el palmitato de ascorbilo (ASC16), como molécula capaz de formar diferentes mesofases potencialmente aplicables a dicho fin.

### **1.2.1. Tensioactivo biocompatible derivado de vitamina C: Palmitato de Ascorbilo**

El ácido ascórbico (vitamina C) se emplea en preparaciones cosméticas dado su elevado poder como agente antioxidante y su biocompatibilidad. Sin embargo, esta característica implica una baja estabilidad relacionada a sus propiedades redox [Spiclin y cols., 2001]. Para mejorar este último aspecto, se sintetizaron varios derivados, entre ellos, el palmitato de ascorbilo (ASC16) o 6-o-hexadecanoato de ascorbilo, que se encuentra disponible comercialmente y presenta muy baja solubilidad en agua [Palma y cols., 2002a]. Este compuesto ha sido de interés farmacéutico principalmente por la posibilidad de ejercer su efecto antioxidante en sistemas lipofílicos. Se utiliza solo o en combinación con la vitamina E como estabilizante (antioxidante) en productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios; y es esencialmente no tóxico y no irritante [Wade y Weller, 1994]. No obstante, más recientemente se ha puesto atención a sus propiedades anfílicas y su capacidad de autoagregarse en estructuras ordenadas. Cuando una dispersión de ASC16 en agua se calienta por encima de una temperatura específica, la solubilidad aumenta hasta alcanzar la concentración de agregación crítica

(CAC). El enfriamiento del sistema no trae aparejado la precipitación de este compuesto sino la formación de las estructuras supramoleculares con características de cristal líquido denominadas *coageles* (Coa) [Köhler y cols., 1988].

El nombre de cristal líquido es altamente descriptivo del estado físico de las fases formadas. El grado de ordenamiento de las moléculas es intermedio entre un líquido y un cristal y, las propiedades de flujo son intermedias entre un líquido viscoso y un sólido cristalino elástico. En el estado Coa las cadenas hidrofóbicas poseen un mínimo grado de libertad pero, un aumento de temperatura resulta en una expansión anisotrópica de las cadenas, lo que trae aparejado una disrupción parcial del empaquetamiento lamelar, con un consecuente ingreso de agua entre los grupos polares, que dan lugar a la fase gel (ver **figura 1.3.**).



**Figura 1.3. Diferentes tipos de agregados presentes para ASC16 [Extraído de Palma y cols., 2003a].**

De acuerdo a lo descrito anteriormente, la temperatura a la cual el Coa se encuentra en equilibrio con la fase micelar (Fm), es conocida como Krafft Point,  $Kp$ .

El estudio de estas estructuras y su potencial aplicación en SPF forma parte de una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio y una de las dos temáticas principales de este trabajo. Específicamente, se aborda su potencial empleo en el

campo de la inmunología y el desarrollo de vacunas para la vehiculización de fármacos hidrofílicos que necesitan amplificar su respuesta, donde los adyuvantes para vacunas, son un clásico ejemplo.

### **1.3. SEGUNDA PARTE. Nanopartículas como plataformas farmacéuticas**

Desde un punto de vista farmacéutico, las nanopartículas se definen como sistemas coloidales de tamaño submicrónico (1-1000 nm de diámetro), diseñados para la administración de fármacos por distintas vías. Están compuestas generalmente por materiales biodegradables y biocompatibles capaces de incorporar tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos [Sahooand y Labhasetwar, 2003; Parveenand y Sahoo, 2008]. Los recientes avances en los sistemas nanoparticulados destinados a mejorar la liberación de fármacos constituyen un gran potencial para la administración de moléculas activas. De este modo, las características fisicoquímicas de los portadores controlan la aplicación final del sistema portador+fármaco. En este sentido, las nanopartículas pueden ser formuladas a partir de diversos materiales con arquitecturas particulares permitiendo: [Couvreurand y Vauthier, 2006]

- Proteger el fármaco de la degradación
- Mejorar su absorción, facilitando la difusión a través de barreras biológicas
- Modificar el perfil farmacocinético y de distribución hacia los tejidos
- Mejorar la penetración y distribución intracelular de los principios activos vehiculizados

Dentro de los numerosos sistemas nanoparticulados, las estructuras lipídicas fueron extensamente desarrolladas para distintas vías de administración [Düzgünes, 2001]. En este contexto, el termino lípido se toma en un sentido amplio e incluye a las ceras (C), los glicéridos, (GL) y los fosfolípidos (FL). Estos materiales pueden constituir la membrana externa, como los FL, que rodean el núcleo acuoso en un liposoma. En el caso de GL, principalmente los triglicéridos, pueden también constituir el núcleo. En las nanoemulsiones se encuentran en estado líquido mientras que en las nanopartículas lipídicas sólidas forman un núcleo sólido. Por otra parte, los FL pueden ser empleados

como agentes estabilizadores en ambos casos. Si los FL están presentes bajo la forma de una membrana rígida rodeando un núcleo constituido de triglicéridos líquidos a temperatura ambiente, entonces hablamos de nanocápsulas lipídicas. Este último sistema portador, recientemente patentado [Heurtault y cols., 2000] ha sido el empleado en el desarrollo de esta tesis doctoral.

### 1.3.1. Nanocápsulas lipídicas

Las nanocápsulas lipídicas (NCLs) pueden definirse como sistemas portadores biomiméticos caracterizados por poseer una estructura híbrida entre las nanocápsulas poliméricas y los liposomas. La técnica de obtención se basa en la inversión de fase de una emulsión que conduce a la formación de nanocápsulas lipídicas monodispersas [Heurtault y cols., 2002a; Heurtault, y cols., 2003a].

La inversión de fase corresponde a la transformación de una emulsión aceite/agua (O/W) en una emulsión agua/aceite (W/O). Esto se produce por una modificación de las propiedades lipofílicas/hidrofílicas de los surfactantes implicados en la estabilización de la emulsión primaria. Esta modificación puede estar inducida por cambios en las variables termodinámicas como la presión, la concentración de cloruro de sodio, la relación de fases acuosa y oleosa y sobre todo por la temperatura.

La estructura general de estos sistemas incluye un núcleo lipídico correspondiente a triglicéridos de cadena media, rodeado por una membrana rígida compuesta por una combinación de lecitinas que se orientan hacia la fase oleosa, y un surfactante hidrofílico con segmentos polietilenglicol (PEG) orientados hacia la fase acuosa (**figura 1.4.**) [Heurtault y cols., 2003a]. Además, el direccionamiento específico de estos portadores hacia su órgano blanco pueden ser mejorado implementando modificaciones en su superficie como la adhesión de moléculas específicas, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos, ácido fólico o polímeros [Vonarbourg y cols., 2006; Morille y cols., 2009, 2010; Biswas y cols., 2012; Perche 2012].

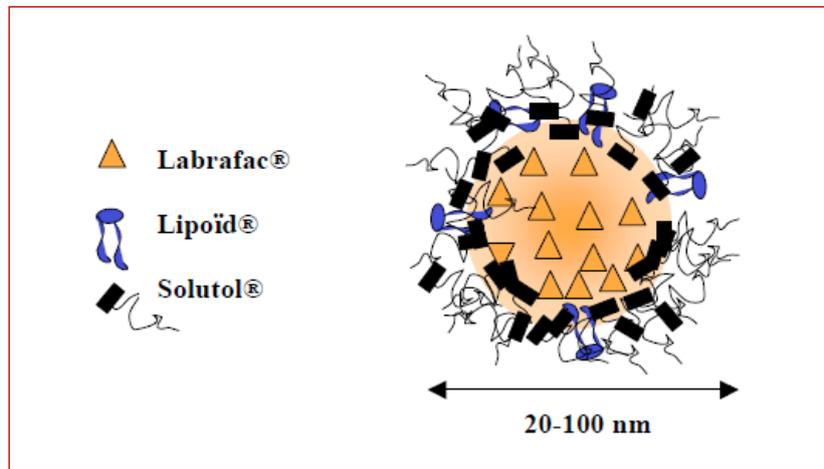


Figura 1.4. Representación esquemática de la estructura de las NCLs [Extraído de Huynh y cols., 2009].

Una ventaja adicional es el elevado rendimiento de encapsulación que se obtiene con estos sistemas. Consecuentemente, muchos fármacos lipofílicos, como así también moléculas anfifílicas han sido vehiculizadas en las NCLs, pudiendo citar por ejemplo ibuprofeno para el tratamiento del dolor por vía intravenosa [Lamprecht y cols., 2004]; varios agentes anticancerígenos: etoposide [Lamprecht y Benoit, 2006], paclitaxel [Hureaux y cols., 2010], tripentone [Malzert-Freon y cols., 2006], derivados del 4-hidroxi tamoxifeno combinado con ferrocen [Allard y cols., 2008b], entre otros.

Considerando lo expuesto anteriormente y teniendo en mente la versatilidad de estos portadores, en el presente trabajo doctoral, se abordó el desarrollo y la evaluación de estos sistemas para su potencial uso en farmacoterapia veterinaria, un campo muy prometedor y hasta la actualidad, poco desarrollado.

## 1.4. Objetivos y organización general de la Tesis

El objetivo general de la presente tesis doctoral es:

- ✓ *Realizar estudios tendientes al diseño, caracterización y evaluación de sistemas nanométricos para la vehiculización de fármacos con actividad adyuvante de interés en inmunología humana y fármacos antiparasitarios de aplicación en el área de la veterinaria.*

Específicamente se plantearon tres objetivos:

1. Evaluación de la utilización de cristales líquidos liotrópicos de palmitato de ascorbilo para la vehiculización de oligodeoxinucleótidos sintéticos con motivos CpG (CpG-ODN) y su potencial aplicación en el desarrollo de vacunas.
2. Formulación y caracterización de nanocápsulas lipídicas para la vehiculización de fármacos antiparasitarios de relevancia veterinaria y evaluación de la performance biofarmacéutica.
3. Desarrollo de nanocápsulas lipídicas con funcionalización de su superficie como estrategia para la vehiculización de CpG-ODN.

En este marco, se ha organizado el presente trabajo de Tesis de la siguiente manera:

La primera parte se centra en el primer sistema portador presentado es decir, los *coageles de palmitato de ascorbilo*. De este modo, en el **capítulo 2** se desarrolló y validó una metodología analítica para la cuantificación de CpG-ODN empleada luego en el **capítulo 3** para el estudio de la liberación de esta molécula desde los coageles. Allí se incluyen también los resultados concernientes a la caracterización físico-química de estos sistemas. Posteriormente, el **capítulo 4** abarca la aplicación y evaluación inmunológica *in vivo* de los coageles cargados.

La segunda parte comprende el segundo sistema portador desarrollado: *las nanocápsulas lipídicas*. De este modo, el **capítulo 5** incluye la caracterización del sistema aplicado a la vehiculización de ivermectina y el estudio de la performance *in vivo* y el **capítulo 6** se centra en la vehiculización de albendazol y la evaluación de su eficacia quimioproláctica en el tratamiento de la hidatidosis. Por último, el **capítulo 7**

combina el desarrollo de las nanocápsulas desarrolladas en la segunda parte pero con modificación de su superficie para la vehiculización del fármaco empleado en la primera parte es decir CpG-ODN y evaluación *in vitro* de su respuesta inmunológica.

La tesis finaliza con las conclusiones en el **capítulo 8** y se incluyen además dos **anexos de materiales y métodos** correspondientes a las dos partes respectivamente.

# **PRIMERA PARTE**



## **CAPITULO 2**

### **DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE CPG-ODN EN UNA FORMULACION DE CRISTALES LIQUIDOS**





## Capítulo 2

# *Desarrollo y validación de una técnica analítica para la cuantificación de CpG-ODN en una formulación de cristales líquidos*

### **2.1. Introducción**

Los oligodeoxinucleótidos (ODNs), principalmente los análogo fosforotionato (PS-ODN), han mostrado una actividad inmunoadyuvante prometedora en el tratamiento de enfermedades malignas, infecciosas y alérgicas [Krieg 2006; Salem y Weiner 2009; Zhao y cols., 2014]. El grado de estimulación inmunológica es variable dependiendo de la secuencia del ácido nucleico, sin embargo, la presencia de dinucleótidos citosina-guanina (CpG-ODN) no metilados flanqueados por dos 5' purinas y dos 3' pirimidinas inducen la respuesta más potente para PS-ODN. Éstas son moléculas estabilizadas mediante la sustitución de uno de los oxígenos no unidos a través de doble enlace covalente por un átomo de azufre para formar una cadena principal fosforotionato [Kandimalla y cols., 2001]. En la **figura 2** del anexo I se presenta la estructura química de CpG-ODN.

El uso de estas modificaciones químicas ha reducido efectivamente la sensibilidad de los ODNs a la degradación por nucleasas, ha prolongado el tiempo de circulación y la vida útil del compuesto, mejorando de este modo sus propiedades

farmacológicas. Sin embargo, el uso de CpG-ODN soluble todavía enfrenta varios desafíos importantes, incluyendo la farmacocinética desfavorable, la falta de especificidad por las células blanco luego de la administración sistémica y la pobre absorción celular [Raney y cols, 2008; Kwong y cols., 2011]. Por esta razón, en las últimas décadas se ha puesto énfasis en el diseño y la caracterización de nuevos portadores para estas moléculas [Mui y cols., 2001; Diwan y cols., 2002; Kwong y cols., 2011; Negash y cols., 2013; Wilson y cols., 2013].

Con este objetivo, en nuestro grupo de investigación se ha estudiado una familia de surfactantes derivados de la vitamina C, puntalmente el palmitato de ascorbilo (ASC16) que presenta la propiedad de autoagregarse y dar lugar a la formación de cristales líquidos por encima de una dada temperatura y concentración [Palma y cols., 2003a]. Estos sistemas son también denominados *coageles* (*Coa-ASC16*). Así, se ha reportado la formación de estructuras complejas capaces de solubilizar fármacos lipofílicos, como por ejemplo acetazolamida, conservándose incluso la actividad antioxidante del ácido ascórbico [Tartara y cols., 2012]. Estas propiedades los convierten en excelentes candidatos para la obtención de nuevas formas farmacéuticas [Torchilin, 2007; Sawant y cols., 2012].

En trabajos previos, hemos investigado estos sistemas como portadores de CpG-ODN [Sanchez Vallecillo y cols., 2014]. Debido a la complejidad del equilibrio de fases observado en estos cristales líquidos liotrópicos [Benedini y cols., 2011], la evaluación de la performance biofarmacéutica de estas nuevas formulaciones requiere el desarrollo de métodos analíticos adecuados. En los últimos años, los métodos de validación se han redefinido, y más aún, estos conceptos continúan evolucionando y están bajo la responsabilidad de las organizaciones internacionales quienes establecen procedimientos para la obtención de productos de calidad, lo que garantiza la eficacia y la seguridad durante la manipulación y el almacenamiento [FDA, 2001; ICH, 2005].

El objetivo principal de los métodos de validación analíticos es asegurar la reproducibilidad, confiabilidad, e idoneidad de la técnica en estudio [Ermer, 2001; Ermer y Ploss, 2005]. En estudios cuantitativos, la cantidad de ODN se determina generalmente por absorbancia UV, ensayos colorimétricos, por radiactividad tras la marcación con un radioisótopo como  $P^{32}$ , mediante hidrólisis enzimática o por medio de una técnica cromatográfica. La exactitud de la medición de la absorbancia puede

ser poco confiable ya que se basa en la suposición de que el ODN se encuentra en forma pura y en una conformación de simple o doble cadena. Los ensayos colorimétricos de fijación de un colorante en general están sujetos a interferencias siendo los tensioactivos una de las más importantes. La técnica de marcación con  $P^{32}$  para la cuantificación de ODNs está limitada tanto por su dependencia de un radioisótopo, como así también por la asunción de que el rendimiento de la reacción radioenzimática es del 100% lo cual es difícil y poco seguro de probar [Shimelis y cols., 2007].

Un problema común en el desarrollo de métodos de HPLC para la cuantificación de ODNs es el complejo proceso de purificación y preparación de las muestras. Recientemente, la extracción en fase sólida en un solo paso (SPE, su sigla en inglés) se emplea de manera conjunta con la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa (LC/MS) [Johnson y cols., 2004; Buyun y cols., 2012]. Sin embargo, la principal limitación de la técnica de SPE es el bajo rendimiento de extracción. Otra técnica que resultó sensible y selectiva para la cuantificación de ODNs en matrices biológicas es la espectrometría de masa (LC/MS) combinada con la ionización por electrospray (ESI). No obstante, la elevada concentración de iones en la fase móvil necesaria para una buena separación del ODN, provoca la disminución en la intensidad de la señal y la contaminación del espectrofotómetro [Beck y cols., 2001].

Tomando en cuenta estas consideraciones, en este capítulo se describe el desarrollo y la validación de un método de HPLC rápido, confiable, selectivo y económico para la cuantificación de CpG-ODN en diferentes sistemas farmacéuticos. También se presentan los resultados relativos a la estabilidad de CpG-ODN en las condiciones de ensayo y almacenamiento.

## **2.2. Materiales y Métodos**

### **2.2.1. Materiales**

Los oligodeoxinucleotidos fosforotioatos con motivos CpG-ODN 1826, sec (5'-3': tccatgacgttctctgacgtt) fueron adquiridos en Operon Technologies Inc. (Alameda, EEUU). Se reconstituyeron en solución fisiológica, NaCl 0,9%, (Alcon, Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) hasta alcanzar una concentración final de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . El palmitato de

ascorbilo (ASC16) y la solución estéril de dextrosa al 5% para la preparación de los coageles, se adquirieron en Fluka Analytical (Milan, Italia) y laboratorios Roux-Ocefa (Buenos Aires, Argentina), respectivamente. La solución de HidroximetilAminometano (tampón Tris-HCl) pH 7 se preparó con reactivos Biopack (Buenos Aires, Argentina) en agua Milli-Q, el mismo día de los ensayos.

Acetonitrilo (ACN), trietilamina (TEA) y ácido acético (AA) fueron todos grado HPLC y adquiridos en Sintorgan, Argentina. El agua utilizada para HPLC y en todos los estudios fue grado Milli-Q (Millipore®, Argentina).

### **2.2.2. Equipamiento**

La cuantificación mediante HPLC se realizó empleando un cromatógrafo Agilent® S1100 (Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria, un inyector automático, compartimento para columna y detector UV-Vis. El pH de las soluciones se determinó con un pHmetro Mettler Toledo DG 115-SC (Columbus, EEUU) equipado con un electrodo de Ag/AgCl(sat), el cual se calibró con soluciones estándar de tampón pH 7,00 ( $\pm 0,01$ ) y 4,01 ( $\pm 0,01$ ) marca Crison (Barcelona, España). Para los ensayos que requirieron temperaturas controladas, se empleó un baño termostatzado Vicking Masson (Buenos Aires, Argentina) con una precisión de  $\pm 0,1$  °C. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron para un intervalo de confianza del 95 %.

### **2.2.3. Condiciones cromatográficas**

Para la cuantificación se empleó una precolumna y columna de fase reversa Phenomenex™ (Torrance, EEUU) octadesil silano (C18) de 250 mm x 4,5 mm (5,0  $\mu$ m de diámetro de partícula). El flujo se fijó en 0,7 ml/min, el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l, y se termostatzó a 25 °C. Todas las determinaciones se realizaron con detección UV a una longitud de onda de 261,0 nm.

### **2.2.4. Preparación de las soluciones madres, soluciones estándares y la fase móvil**

La solución madre de CpG-ODN se preparó en solución fisiológica (0,9 % NaCl) a una concentración final de 1000  $\mu$ g/ml. Esta solución se alicuotó y se conservó a -20 °C. Las soluciones estándares para cada curva de calibrado, se obtuvieron por dilución

de las correspondientes soluciones madre en tampón Tris-HCl pH 7,2. Luego estas muestras se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm e inyectaron en el HPLC.

La fase móvil se preparó mediante la medición de los volúmenes apropiados de AA y TEA para obtener una concentración final de acetato de trietilamina (TAA) igual a 0,1M en agua. Posteriormente, se ajustó el pH a 7 con AA y se completó con agua milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 1000 ml. Finalmente, se filtró a través de un filtro Millipore TM Durapore® (Merck Millipore, Billerica, MA, EEUU) de 0,45 µm de poro y se degasificó al vacío.

### **2.2.5. Preparación de los coageles cargados con CpG-ODN**

Las muestras se prepararon mezclando los componentes (Asc16, dextrosa y CpG-ODN) en las proporciones adecuadas en tubos de vidrio cerrados. Las dispersiones se calentaron hasta 72° C y luego se prosiguió como se describe en la sección M.3. del anexo I. Las muestras se prepararon a una concentración final de 0,02% y 1,00% p/p de ASC16 y CpG-ODN respectivamente.

### **2.3. Resultados y Discusión**

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es el apropiado para el uso propuesto [Farmacopea Argentina, 2011]. Los parámetros fundamentales para esta validación son:

1. Selectividad (Especificidad)
2. Linealidad
3. Sensibilidad
4. Precisión y Exactitud
5. Robustez
6. Estabilidad

Esta metodología fue validada de acuerdo a los lineamientos de la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, sigla en inglés) y de la Food and Drug

administration (FDA, sigla en inglés). Cabe mencionar que los ensayos se realizaron por triplicado en todos los casos.

### 2.3.1. Selectividad

La selectividad de un método analítico es la habilidad del mismo para evaluar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes, por ejemplo impurezas, productos de degradación, matrices, excipientes, etc. Esto puede realizarse agregando a la sustancia o al principio activo cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños. Si no se dispone de los productos de degradación, impurezas o matriz biológica, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con muestras que contienen impurezas o productos de degradación a través de un segundo método independiente.

La determinación de este parámetro requirió preparar tres soluciones del analito disuelto en la fase móvil a tres concentraciones (50; 125 y 250  $\mu\text{g/ml}$ ) correspondiente a tres niveles (bajo, medio y alto, respectivamente), comprendidos dentro del rango de concentraciones de la curva de calibrado. Cabe recordar que el grado de separación de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos de las bandas (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si es inadecuada, la resolución ( $R_s$ ) de picos adyacentes puede mejorarse ya sea aumentando la separación o disminuyendo los anchos de los picos individuales. Esto involucra la selectividad de la columna cuando se alejan más los picos y la eficiencia cuando se intenta disminuir el ancho del pico. Mejorar la selectividad implica alterar la termodinámica del sistema cromatográfico mientras que mejorar la cinética del sistema aumenta la eficiencia de la separación. De este modo, cualquier criterio para la resolución sería de algún modo arbitrario. Para una exactitud cuantitativa razonable los máximos de los picos deben estar separados al menos  $4\sigma$ . Si es así, un valor de  $R_s$  igual a 1.5 (es decir,  $6\sigma$ ) representa esencialmente una resolución completa.

De acuerdo a los tiempos de retención ( $t_R$ ) observados para el analito y los posibles interferentes (ver **tabla 2.1.**), el método propuesto fue selectivo, con una resolución cromatográfica ( $R_s$ )  $> 2$ . Estos criterios son válidos para concentraciones de soluto aproximadamente iguales. Se requerirá una mayor resolución cuando una

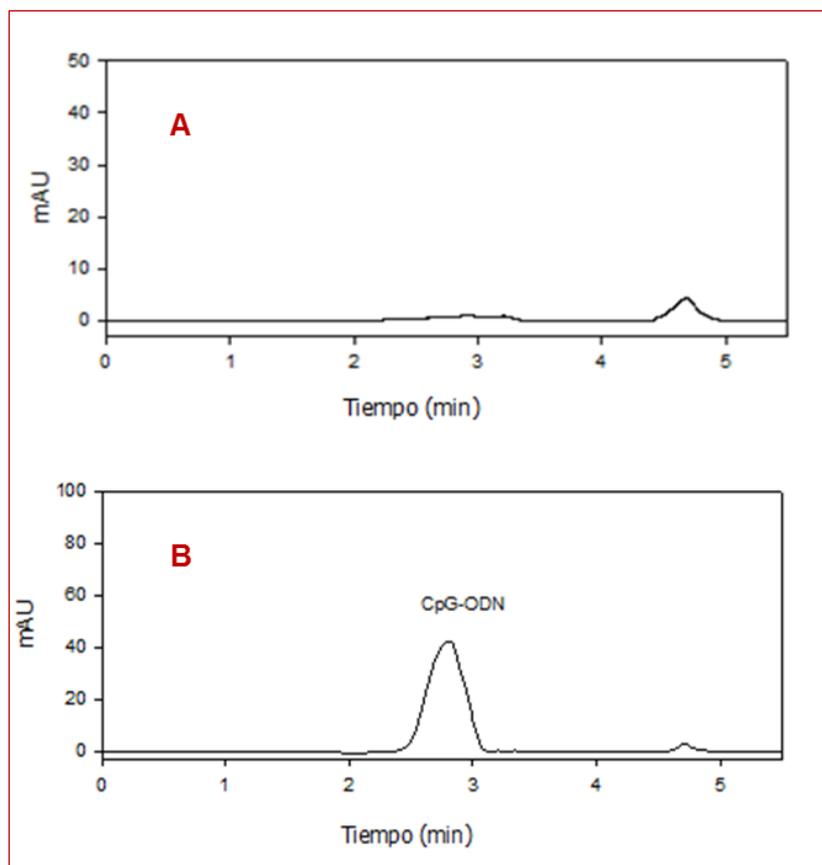
banda de un componente mayor es adyacente a una banda de un constituyente menor.

**Tabla 2.1. Tiempo de retención para CpG-ODN y otros compuestos en HPLC.**

Compuesto	$t_R$ (min) <sup>a</sup>
CpG (PS)-ODN	2,8
CpG (PO)-ODN	2,8
Dextrosa	4,1
Solución fisiológica	5,1
Tampón Tris-HCl	3,8
Palmitato de Ascorbilo	4,0

<sup>a</sup> Fase móvil empleada: tampón TAA: ACN pH 7 (50:50 v/v). Velocidad de flujo: 0,7 ml/min.

La **figura 2.1.** muestra los cromatogramas obtenidos luego de la inyección de la matriz blanco es decir, Coa-ASC16 en el tampón Tris-HCl y de CpG-ODN cargado en los coageles ambos diluidos en la fase móvil antes del análisis. La concentración de CpG-ODN ensayada fue de 99 µg/ml (**fig. 2.1.A. y B.**). Como se observa, a pesar de la complejidad del sistema y de la falta de especificidad de la columna empleada, se obtuvo una buena resolución ( $R_s > 1,5$ ).



**Figura 2.1. Cromatograma representativo obtenido por HPLC-UV.**

*A) Matriz: Coa-ASC16 en el tampón Tris-HCl. B) Muestra conteniendo CpG-ODN en la matriz. El tiempo de retención para CpG-ODN es de  $2,8 \pm 0,2$  min.*

El cromatograma permite evidenciar que no existen interferencias entre los compuestos analizados, por lo que es posible afirmar que esta composición de fase móvil es satisfactoria para la cuantificación de CpG-ODN en el sistema evaluado.

### **2.3.2. Linealidad**

La linealidad de un método analítico es la proporcionalidad directa entre la concentración del analito y la respuesta que genera, siendo el rango lineal, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito, dentro del cual se puede analizar una muestra por extrapolación en la curva estándar. La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico por medio de un método estadístico apropiado como por ejemplo, cálculo de regresión por cuadrados mínimos. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar

matemáticamente el grado de linealidad. Además, resulta conveniente evaluar estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado, tales como:

- Pendiente (a): se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad y permite evaluar la correlación entre diferentes métodos.
- Coeficiente de regresión lineal (r): se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto ( $y=ax+b$ ), el que se encuentra entre 0,98 y 1,00; con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0,99.
- Ordenada al origen (b): para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.

Las curvas de calibrado se construyeron graficando: Área Analito/Área standard (DS) en función de la Concentración Analito/Concentración DS. Para ello, se utilizaron 8 concentraciones diferentes de CpG-ODN en el rango comprendido entre 6,25 y 375  $\mu\text{g/ml}$ . La **figura 2.2.** y la **ecuación 2.1.** muestran a modo de ejemplo la curva de calibrado obtenida para CpG-ODN en medio Tris-HCl.

Para estudiar la variabilidad en los parámetros de calibración, el procedimiento se repitió a partir de tres soluciones estándares de CpG-ODN preparadas en forma independiente. En todos los casos, la linealidad se evaluó por el método de los cuadrados mínimos. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 2.2.**

**Tabla 2.2. Parámetros de calibración para CpG-ODN.**

Pendiente	Ord. al origen (oao)	$r^2$	LD* ( $\mu\text{g/ml}$ )
55895	-349,7	0,9980	0,85
54260	-203,9	0,9975	0,88
55781	-155,6	0,9994	0,86

\*(LD) Límite de detección

De acuerdo a los datos presentados en esa tabla, se confirmó la linealidad del método analítico empleado. El valor de coeficiente de determinación en todos los casos fue siempre mayor a 0,9970. Se obtuvo una linealidad satisfactoria en el rango de concentraciones evaluado y no se detectaron diferencias significativas entre las pendientes de las curvas obtenidas. (ANOVA  $p>0,05$ ).

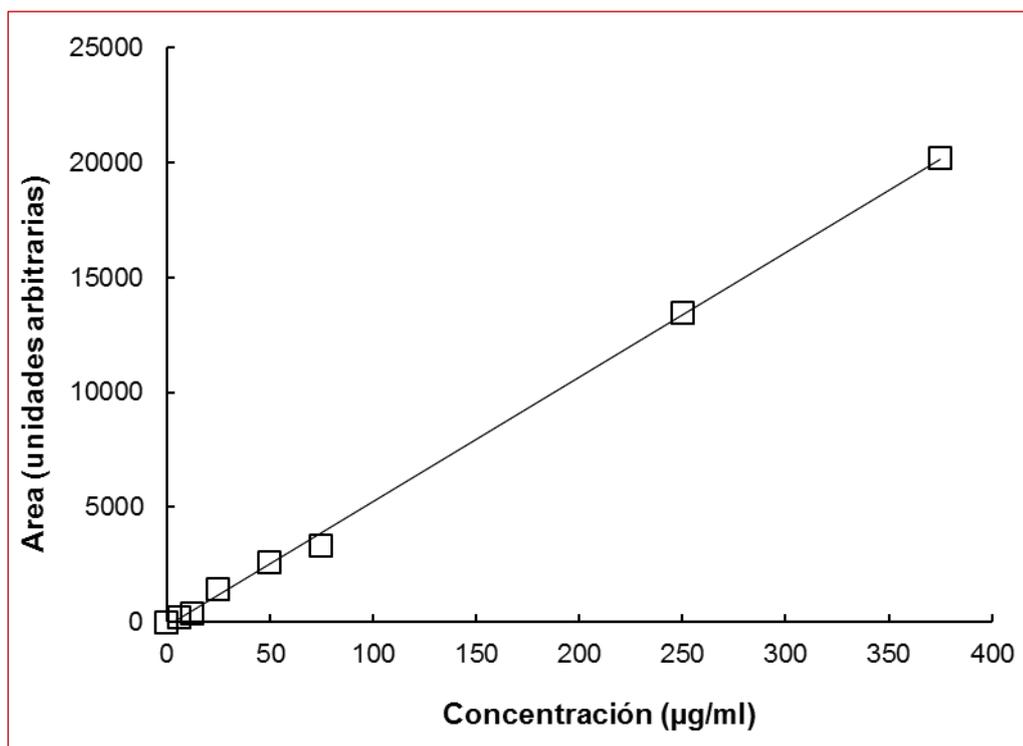


Figura 2.2. Curva de calibración para CpG-ODN en tampón Tris-HCl.

Area analito/area DS= 54233 Conc. Analito/conc.DS (µg/ml)-189,35

n=8  $r^2=0,999$

(Ec. 2.1.)

### 2.3.3. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico es su capacidad para discernir pequeñas variaciones en la concentración de analito. Así, la pendiente de la curva de calibrado es la medida de la sensibilidad y se denomina, sensibilidad de calibrado. Ésta última es constante en todo el intervalo de linealidad. La sensibilidad está dada por el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC).

Límite de detección: corresponde a la menor cantidad de analito que se puede detectar en una muestra con un nivel de confianza determinado. Existen diversas maneras de determinar el límite de detección. Una de ellas consiste en analizar muestras de concentraciones conocidas del analito y establecer el mínimo nivel en el cual el analito puede ser detectado en forma confiable.

En este caso, el LD para este compuesto se calculó con el criterio de las 3s: 3,3 veces la desviación estándar ( $\sigma$ ) de la señal producida por el blanco, dividida por la

pendiente (a) de dicha curva según la **ecuación 2.2.** y empleando las tres curvas de calibrado obtenidas previamente.

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{a}$$

(Ec. 2.2.)

Los valores del LD calculado de esta manera se muestran en la tabla 2.2. y su valor promedio es igual a  $0,86 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ .

El límite de cuantificación es la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra.

Existen diversas maneras de determinar el LC. Una aproximación se basa en la determinación de la pendiente de la recta (a) de calibración y la desviación estándar de la respuesta ( $\sigma$ ), según la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10\sigma}{a}$$

(Ec. 2.3.)

Otro método y el adoptado en este trabajo, se basa en analizar muestras con concentraciones conocidas de analito y establecer el mínimo nivel al cual el mismo puede ser cuantificado con precisión y exactitud. En este caso, el LC seleccionado correspondió a la mínima concentración empleada en la construcción de las curvas de calibrado ( $6,25 \mu\text{g/ml}$ ).

#### 2.3.4. Precisión y Exactitud

La precisión está relacionada con la dispersión de los valores hallados a partir del valor medio, y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a alícuotas múltiples de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar, o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RDS, por sus siglas en inglés), o coeficiente de variación (CV) de una serie de mediciones.

Se determina según la **ecuación 2.4.** y el criterio de aceptación varía según el nivel de precisión considerado:

$$\% \text{ RSD} = \frac{100 \sigma}{x}$$

(Ec. 2.4.)

donde,  $\sigma$  corresponde a la desviación de las medidas y X es la media poblacional.<sup>1</sup>

La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto.
- La precisión intermedia expresa las variaciones intra-laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos).

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. La precisión determinada en cada nivel de concentración no debe exceder el 15% del CV, excepto para el límite de cuantificación, donde no debe exceder el 20% del CV [FDA, 2001].

La exactitud es también conocida como error sistemático o tendencia, y corresponde a la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero obtenido a partir de la concentración de la muestra y la curva de calibrado. La forma más utilizada para su expresión es porcentaje de recuperación (% Rec.), y se calcula según la **ecuación 2.5.:**

$$\% \text{ Rec.} = \frac{\text{Area observada}}{\text{Area esperada}} \times 100$$

(Ec. 2.5.)

---

<sup>1</sup> En estadística la media poblacional (también llamada esperanza, valor esperado, esperanza matemática o media) de una variable aleatoria, es el número que formaliza la idea de valor medio de un fenómeno aleatorio.

El valor medio debe estar dentro del 15 % del valor real, excepto para el LC donde no debe desviarse más de un 20 %. La desviación de la media del valor real sirve como medida de precisión [FDA, 2001].

La precisión y exactitud del método se determinó por análisis en triplicado de tres controles (QC) de concentraciones baja (50 µg/ml), intermedia (125 µg/ml) y alta (250 µg/ml) comprendidas dentro de la curva de calibrado. Los análisis intra-día se realizaron mediante siete inyecciones de cada una de estas soluciones. A fin de estudiar la reproducibilidad del método (repetitividad inter-día), se inyectaron las concentraciones mencionadas anteriormente durante diez días en un período de dos meses. Por otra parte, se determinó el % Rec. intra e inter día utilizando un procedimiento similar al descrito para la precisión, analizando las mismas tres soluciones de concentraciones conocidas. Los valores que confirman la precisión y exactitud de este método se presentan en la **tabla 2.3.** tomando como ejemplo los valores medidos en dos días arbitrariamente seleccionados.

La reproducibilidad del método, como una función de la desviación estándar relativo (RSD%) de los controles en las determinaciones inter e intra día fue menor a 3,75%. La exactitud como una medida del error relativo se encontró dentro del rango comprendido entre el 90-99 % tanto para para los ensayos intra como inter día. Como se observa, CpG-ODN pudo determinarse en los tres niveles de concentraciones evaluados y las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas en todos los casos con valores de RDS menores al 3,75%. Estos resultados prueban que el método propuesto es adecuado para el análisis de este compuesto vehiculizado en coageles de ASC16. De esta manera, el procedimiento desarrollado puede ser usado en control de calidad, análisis de rutina y estudios de estabilidad.

Tabla 2.3. Precisión y exactitud del método de HPLC para la cuantificación de CpG-ODN en Coa-ASC16.

Concentración teórica (µg/ml)	Concentración calculada (promedio ± DS) (µg/ml)	Precisión RSD (%)	Exactitud (%)
<b>Evaluación intra-día</b>			
QC alto (250)	247±4	1,66	98,95
QC intermedio (125)	111±4	3,37	90,66
QC bajo (50)	46,89±0,01	0,19	93,78
<b>Evaluación inter-día</b>			
QC alto (250)	248±6	2,75	99,38
QC intermedio (125)	111±5	3,75	90,36
QC bajo (50)	48,2±0,3	0,63	96,32

RDS: desvío estándar relativo  $n = 7$  (número de replicados)

### 2.3.5. Robustez

La robustez de un método analítico se define como la capacidad del mismo para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones deliberadas en ciertos parámetros, proporcionando información relativa a su fiabilidad o estabilidad durante su empleo. Por lo tanto, es la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la evaluación de la robustez de un método son: diferentes instrumentos, lotes de reactivos, tiempos de valoración, temperaturas de valoración, columnas cromatográficas, etc.

La robustez se expresa normalmente como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo. La determinación se lleva a cabo mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas y ambientales diferentes, pero que están dentro de los parámetros especificados en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo es luego determinado como una función de las variables de la valoración. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión de la valoración bajo condiciones normales, para obtener una medida de la robustez del método analítico.

Aquí, este parámetro se examinó a través de inyecciones repetidas ( $n = 6$ ) de dos soluciones estándares de concentración 100 µg/ml y 50 µg/ml (concentraciones

comprendidas dentro de la curva de calibrado), con ligeras modificaciones en la polaridad de la fase móvil (porcentaje de tampón/ACN), temperatura y velocidad de flujo. Los valores de % RSD obtenidos por cambios en estos parámetros, fueron inferiores a 2,80 %. Dado que tanto ICH como FDA, sugieren que el valor de % RSD deben ser < 2, se puede afirmar que el método es robusto y válido. Esto indica que las variaciones producidas no afectan de forma significativa, los tiempos de retención, las áreas de los picos cromatográficos o la resolución de los mismos. Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 2.4**.

**Tabla 2.4. Evaluación de la robustez del método de HPLC.**

Cambios en las condiciones cromatográficas	CpG-ODN (100 µg/ml)		CpG-ODN (50 µg/ml)	
	t <sub>R</sub> (min)	Area	t <sub>R</sub> (min)	Area
<b>Tampón TAA conc. (M)</b>				
0,1	2,78	5796,36	2,84	2578,00
0,05	2,88	6004,21	2,81	2633,16
Promedio	2,83	5900	2,83	2606
DS	0,07	147	0,02	39
RSD (%)	2,50	2,49	0,71	1,50
<b>Temperatura (°C)</b>				
25	2,80	5629,22	2,80	2595,30
35	2,82	5410,42	2,86	2550,69
Mean	2,81	5520	2,83	2573
DS	0,01	155	0,04	32
RSD (%)	0,36	2,80	1,41	1,24
<b>Velocidad de flujo (ml min<sup>-1</sup>)</b>				
0,6	2,85	5300	2,85	2760,23
0,7	2,80	5500	2,83	2895,27
0,8	2,70	5480	2,73	2785,00
Promedio	2,75	5490	2,78	2840
DS	0,08	110	0,06	72
RSD (%)	2,90	2,00	2,16	2,54

### 2.3.6. Estabilidad

La estabilidad del fármaco en una forma farmacéutica es función de numerosas variables, como por ejemplo sus propiedades físicas y químicas, el vehículo, el envase y las condiciones de almacenamiento. Asimismo, la estabilidad de un analito en una matriz en particular y en un envase, sólo es relevante para esa matriz y recipiente y no

pueden ser extrapoladas a otras situaciones. Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones reales que puedan darse durante la recolección, la manipulación y el análisis de las muestras.

Se debe incluir también una evaluación de la estabilidad del analito en la solución stock, después del almacenamiento a corto (temperatura ambiente) y largo plazo (congelamiento y temperatura de almacenamiento prevista) y lógicamente, durante el proceso analítico. Para todas las determinaciones debe utilizarse un conjunto de muestras obtenidas a partir de una solución madre del analito recién preparada. Asimismo, para éstas debe emplearse disolventes apropiados a concentraciones conocidas [FDA, 2001].

La estabilidad del fármaco se determinó calculando el porcentaje de recuperación. El mismo, no necesita ser del 100 %, pero el grado de recuperación de un analito debe ser consistente, preciso y reproducible. Las experiencias de recuperación deben llevarse a cabo mediante la comparación de los resultados analíticos de las muestras extraídas a tres niveles de concentración (baja, media y alta) con las muestras sin extraer que representan una recuperación del 100 % [FDA, 2001]. En una nueva serie de experimentos, se prepararon dos de los controles (QC) de concentraciones baja (50 µg/ml) y alta (250 µg/ml) y se cargaron en los coageles de ASC16. Las muestras fueron procesadas y analizadas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La recuperación analítica de CpG-ODN desde la matriz fue calculada comparando la concentración obtenida en los QC con la inicialmente adicionada. Los resultados obtenidos muestran una recuperación satisfactoria (primera fila, **tabla 2.5.**). También se evaluó la estabilidad en las condiciones de almacenamiento, para lo cual las muestras anteriores se conservaron a temperatura ambiente por cinco horas (el tiempo correspondiente a una corrida cromatográfica de un lote de muestras) y también se guardaron -20 °C durante 60 días. Las muestras fueron analizadas inmediatamente luego de este periodo. Como se muestra en la tabla 2.5. los resultados de recuperación luego de los ensayos en las condiciones evaluadas fueron satisfactorios ya que ningún valor es inferior al 85 % de la concentración inicial como recomienda la FDA.

Tabla 2.5. Recuperación (%) of CpG-ODN en Coa-ASC16 bajo diferentes condiciones.

Condiciones de almacenamiento	QC-alto (n=7)		QC-bajo (n=7)	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
condiciones normales	98	4	99	2
-20 °C (8 semanas)	90	4	99	6
TA* (5 horas)	96	3	96	2

\*TA= temperatura ambiente

#### 2.4. Conclusiones del capítulo

Los resultados obtenidos permiten concluir que el método de cuantificación de HPLC para CpG-ODN descrito en este capítulo presenta parámetros analíticos adecuados para su aplicación en el laboratorio.

Mediante los análisis realizados, se determinó que la técnica desarrollada resulta ser sensible, exacta y precisa, con un procesamiento de las muestras simple y rápido sin la necesidad del empleo de solventes orgánicos. También, la misma resultó ser selectiva para el fármaco estudiado, ya que no se observaron interferencias con el sistema portador. Los resultados indican que el procedimiento descrito aquí es útil para la cuantificación de este compuesto cargado en Coa-ASC16 y la evaluación de su estabilidad *in vitro*.



## **CAPITULO 3**

**CARACTERIZACION DE CRISTALES  
LIQUIDOS DE PALMITATO DE ASCORBILO  
PARA LA VEHICULIZACION DE FARMACOS  
CON ACTIVIDAD ADYUVANTE:  
CPG-ODN**





### Capítulo 3

## *Caracterización de cristales líquidos de palmitato de ascorbilo para la vehiculización de fármacos con actividad adyuvante: CpG-ODN*

### **3.1. Introducción**

Los tensioactivos producen, en soluciones diluidas, una disminución de la tensión superficial e interfacial debido a la adsorción y orientación de las moléculas en la interfase. También forman micelas por encima de una determinada concentración, conocida como concentración micelar crítica (cmc o CMC) y por encima de una determinada temperatura; la temperatura micelar crítica (tmc o TMC) o temperatura de Krafft ( $T_k$ ). Este fenómeno se produce debido al decrecimiento de la energía libre de Gibbs (entalpía libre) del sistema, aunque no todos los surfactantes forman estructuras de estas características. Uno de los factores que puede influir es por ejemplo, el parámetro de empaquetamiento y la forma y tamaño de los agregados dependen de la estructura de la molécula.

La formación de estas estructuras supramoleculares facilitan la solubilización de sustancias insolubles en agua y esta característica resulta interesante para su desarrollo como potenciales portadores de fármacos o moléculas bioactivas y su aplicación en el campo de la farmacia [Palma y cols., 2002a; 2003b, 2003c]. Conforme

aumenta la concentración, se producen ciertas modificaciones en las propiedades del sistema, con consecuentes cambios en la estructura de los agregados supramoleculares. Estas estructuras supramoleculares pueden ser cilíndricas, laminares o discoideas. A concentraciones superiores pueden ocurrir transiciones y dar lugar a la formación de mesofases con algún tipo de ordenamiento, denominadas genéricamente cristales líquidos. El grado de ordenamiento en este caso es intermedio entre el orden tridimensional característico de las estructuras cristalinas sólidas y el gran desorden correspondiente a sistemas líquidos.

La temperatura y el tipo de solvente involucrados en la dispersión son los principales aspectos que pueden definir y/o perturbar el ordenamiento en este tipo de cristales líquidos (CLs). En función de estos parámetros, se definen dos tipos de CLs:

- **CLs termotrópicos** son los que pueden formarse por efecto de la temperatura sobre una o varias sustancias.

- **CLs liotrópicos** son los que pueden formarse por efecto del solvente y su interacción con el agente tensioactivo.

El estudio del comportamiento de los surfactantes en solución provee la información necesaria para poder reconocer los dominios en los cuales se forman las diferentes fases a medida que se varía la temperatura, la composición del medio y la concentración del compuesto en estudio. De este modo, los diagramas de fases describen las temperaturas de transición a las cuales aparecen las diferentes fases y su importancia farmacéutica principal radica en que son capaces de solubilizar fármacos insolubles en agua.

Los derivados de ácido ascórbico pueden, bajo determinadas condiciones de temperatura y concentración, generar diferentes mesofases. Benedini y cols., caracterizaron las mesofases liotrópicas y termotrópicas formadas por suspensiones de palmitato de ascorbilo (ASC16) en tres soluciones acuosas de polietilenglicol y en agua. Para este último sistema se observaron dos mesofases laminares diferentes: una cuando el agua libre está presente y otra cuando sólo hay agua de hidratación, es decir, capa de hidratación primaria y secundaria.

Teniendo en cuenta nuestro interés de vehiculizar dos moléculas hidrofílicas tales como ovoalbúmina (OVA) y oligodeoxinucleótidos con motivos CpG (CpG-ODN) en coageles de ASC16, se realizaron estudios tendientes a evaluar el efecto de estos

compuestos sobre el comportamiento de fase de los coageles. Además, realizando un análisis fisicoquímico similar al utilizado en los estudios anteriores se evaluó la cantidad y modalidad de interacción del agua con la doble capa lipídica de las lamelas.

Por otra parte, la consistencia semisólida de estos coageles, es una propiedad interesante a considerar en la investigación de nuevas formas farmacéuticas para la vehiculización de fármacos hidrofílicos con potencial aplicación en el desarrollo de vacunas.

El estudio de la dinámica de liberación de un F desde sistemas portadores bajo la forma de semisólidos ha sido objeto de investigación por muchos años. Un método muy simple y reproducible fue desarrollado para medir la liberación de un F *in vitro* desde estos sistemas, utilizando celdas bicompartimentales de difusión, separadas por una membrana sintética [Shah, 1999]. Estos equipos son conocidos como celdas de Franz y son actualmente recomendados por la FDA para el monitoreo de la liberación de principios activos desde cremas, ungüentos e hidrogeles [FDA, 1997].

Además, en la mayoría de las publicaciones científicas se utiliza este tipo de celdas para la evaluación de la liberación de F desde sistemas dispersos nanoparticulados [Budhiana y cols., 2008; Venkateswarlu y Manjunath 2004]. En este contexto, en este capítulo se reportan los resultados obtenidos en los estudios de liberación de CpG-ODN y de OVA en forma separada y combinados desde los coageles de ASC16, comparándolos con las soluciones de referencia correspondientes, a fin de determinar si existe una modulación en la velocidad de liberación del F desde los coageles.

Por otra parte, los efectos estimulantes sobre ciertas células del sistema inmune ejercidos por el ADN bacteriano y los oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen dinucleótidos CpG (CpG-ODN) han sido ampliamente descritos en la literatura [Lipford y cols., 1998]. No obstante, los ODN sin modificar no son estables *in vivo*, por lo que su potencial terapéutico se ve limitado. Con el objetivo de aumentar su biodisponibilidad, varios análogos de ODN han sido propuestos, entre ellos los fosforotioatos [Agrawal y cols. 1991; Cohen y cols., 1997]. Aunque los oligonucleótidos fosforotioato (ODN-PS) son más resistentes a la degradación por nucleasas, la degradación aun ocurre en menor grado en comparación con los oligonucleótidos con un esqueleto fosfodiéster no modificado (ODN-PO). En general,

se ha reportado que la principal vía de degradación ocurre a través del extremo 3' y es llevado a cabo por enzimas del tipo exonucleasas [Temsamani y cols., 1993; 1997; Geary y cols., 1997; Gilar y cols., 1998]. La degradación *in vivo* parece ser rápida en los primeros tiempos, con un alto porcentaje de metabolitos que se detectan en el plasma al cabo de diez minutos, sin embargo, esto parece progresar más lentamente a tiempos mayores [Phillips y cols., 1997]. Las posibles explicaciones de estas observaciones incluyen la inhibición de las nucleasas (Crooke y cols., 1995) y/o la aparición de dos diastereoismeros (Rp y Sp) que tienen significativamente diferente resistencia a las nucleasas [Spitzer y cols., 1988; Krieg y cols., 2003]. Una estrategia muy explotada en los últimos años para mejorar estos aspectos ha sido el desarrollo de nuevos sistemas nanoparticulados para la vehiculización de CpG-ODN, cuyas ventajas respecto a los sistemas convencionales serían principalmente un efecto protector potenciado frente a la degradación enzimática, aumento en el tiempo de permanencia del sistema en el organismo y la vectorización del fármaco hacia el órgano o tejido blanco.

Según lo expuesto anteriormente, en este capítulo, se reportan los resultados de los estudios tendientes a evaluar el efecto que el sistema portador (coagel) podría ejercer sobre la estabilidad de CpG-ODN frente a la actividad de exonucleasas.

### **3.2. Materiales y Métodos**

La obtención de los coageles y el cargado con OVA/CpG-ODN se describe en detalle en la sección M.4. del anexo I. En este capítulo se caracterizaron estos sistemas desde tres puntos de vista radicalmente diferentes: 1) Estudio del comportamiento de fase en solución del sistema ASC16-dextrosa y ASC16-dextrosa cargado con CpG-ODN y OVA; 2) Análisis de los perfiles de liberación *in vitro* de estos dos compuestos desde el sistema 3) Evaluación de la degradación *in vitro* de CpG-ODN en el sistema.

Las técnicas y metodologías implicadas en cada estudio se describen de manera exhaustiva en los apartados M.5. a M.9. del anexo I.

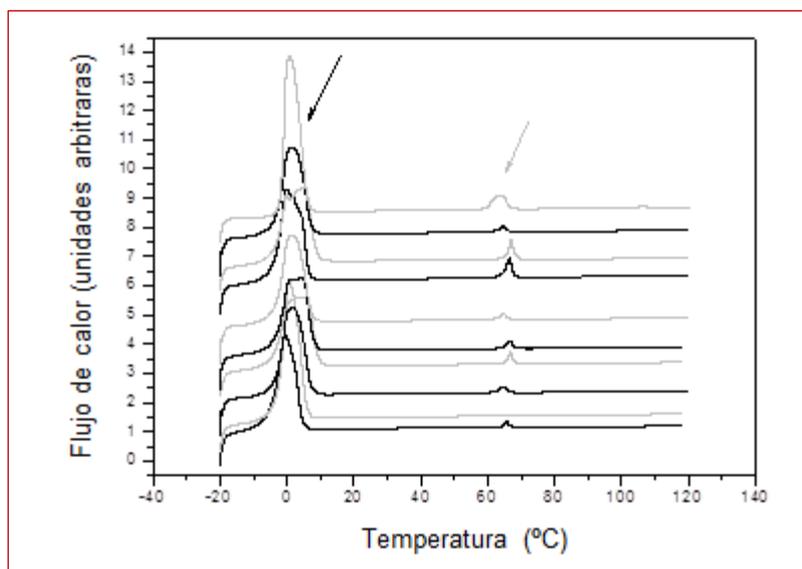
### **3.3. Resultados y Discusión**

#### **3.3.1. Comportamiento de fases del sistema ASC16-dextrosa con el cargado de OVA y CpG-ODN**

El palmitato de ascorbilo puede ser estudiado por sus propiedades antioxidantes, pero aquí nos centramos en sus propiedades anfífilas y su capacidad para formar estructuras ordenadas, tales como cristales líquidos. Para el análisis e interpretación de los resultados tomamos como referencia el diagrama de fases completo del sistema ASC16-agua desarrollado por Luciano Benedini (2012).

Como se presenta en dicho diagrama, cuando la fracción en masa (% p/p) de ASC16 se encuentra aproximadamente entre 0 y 0,5 existe un tipo de comportamiento para el sistema mientras que puede verificarse otro comportamiento a concentraciones mayores. En este capítulo trabajamos con la zona baja del diagrama, es decir las concentraciones por debajo de 0,5, ya que éstas son las que luego empleamos para los ensayos *in vivo*. Con el propósito de simplificar el análisis y la comprensión de los resultados, nos focalizamos en dos regiones principales de los termogramas (**fig. 3.1.**). Se analizó primero la zona entre 60-100 °C y luego la región cercana a 0 °C. En la primera, se compararon los resultados obtenidos a los previamente informados por Benedini y cols. (2011) en relación a las mesofases que se forman al modificar la composición y la temperatura de las muestras. En la segunda, partiendo de la base de los diferentes tipos de agua que pueden ser encontrados en el sistema, se llevó a cabo un estudio comparativo para determinar la modificación en la configuración, en magnitud y tipo del sistema, luego de la incorporación de dos moléculas hidrofílicas: CpG-ODN y OVA.

La determinación de la naturaleza de las diferentes fases así como la caracterización del comportamiento del agua fue realizada por: a) Calorimetría diferencial de barrido (CDB); b) Observación de texturas en el microscopio de polarización a diferentes concentraciones y temperaturas y c) Confirmación de los resultados por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR). La **figura 3.1.** muestra los termogramas obtenidos por CDB para el sistema en estudio.



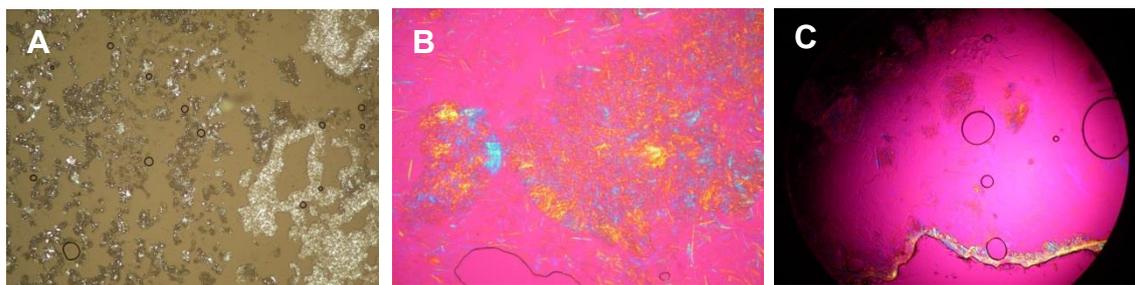
**Figura 3.1.** Termogramas de CDB del sistema ASC16.

*Flujo de calor en función de la temperatura. La ordenada se expresa en unidades arbitrarias para poder superponer las gráficas. La CDB provee las unidades de flujo de calor en Watt /gramo. De abajo hacia arriba las muestras que se presentan son: ASC16 0,02% p/p en dextrosa; ASC16 0,02% p/p en dextrosa/CpG-ODN; ASC16 0,02% p/p en dextrosa/CpG-ODN/OVA; ASC16 0,05% p/p en dextrosa; ASC16 0,05% p/p en dextrosa/CpG-ODN; ASC16 0,05% p/p en dextrosa/CpG-ODN/OVA; ASC16 0,1% p/p en dextrosa; ASC16 0,1% p/p en dextrosa/CpG-ODN; ASC16 0,1% p/p en dextrosa/CpG-ODN/OVA y ASC16 0,1% p/p en agua (control). La flecha negra indica la transición del agua y la flecha gris la transición de ASC16.*

En la región comprendida entre 0 y 60 °C no se observan picos en el termograma de CDB, por lo que no se evidencian transiciones. Sin embargo, una vez que el agua funde, se observan cristales hidratados inmersos en una solución isotrópica. Esto se corrobora por las microfotografías mostradas en la **figura 3.2.A**. [extraída de la Tesis doctoral de Benedini, 2012]. A las mismas concentraciones ensayadas, en la zona cercana a 60 °C se presentan 2 puntos: uno ≈61 °C y otro ≈67 °C. Este es el comienzo y final respectivamente del pico que corresponde a la transición de cristales hidratados a cristal líquido laminar de baja concentración. Esta transición se muestra claramente por microscopía de luz polarizada en la **figura 3.2.B**. [extraída de Tesis Doctoral de Luciano Benedini, 2012].

Estos resultados son idénticos a los obtenidos para el sistema ASC16-dextrosa lo que significa que el reemplazo de agua por una solución de dextrosa al 5% no modifica las fases formadas por ASC16 a pesar del efecto estructurador que ejerce sucrosa sobre la estructura del agua, fortaleciendo los enlaces de puente hidrogeno y de esta

manera desplazando las transiciones de fase hacia mayores valores de temperatura [Lo Nostro y cols., 2002].

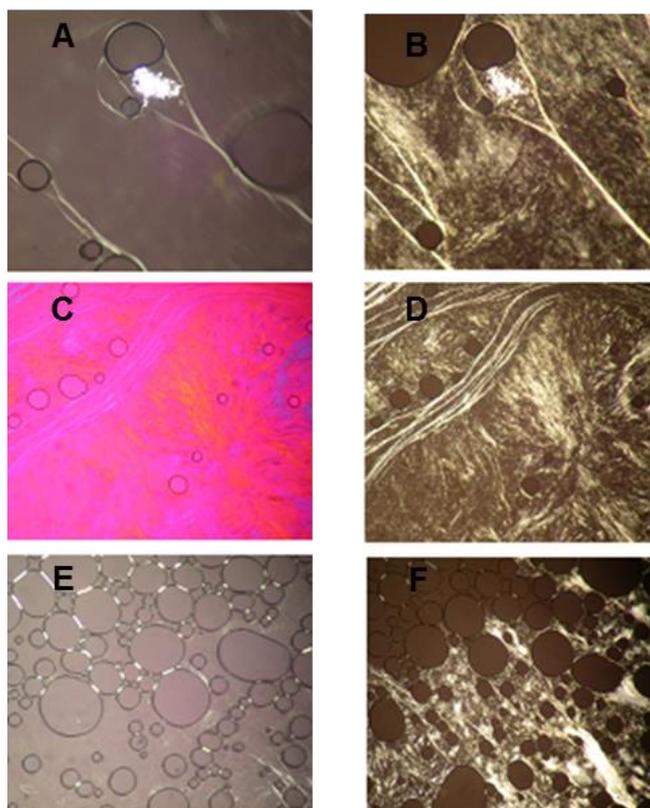


**Figura 3.2. Microfotografías ópticas con luz polarizada.**

*A) ASC16 0,05% p/p a 25 °C; B) ASC16 0,1% p/p a 25°C; C) ASC16 0,1% p/p a 75 °C. Las tres fotografías fueron tomadas con polaroides cruzados y las figuras B y C fueron tomadas con placa de retardación.*

En la **figura 3.2.A.** se observan dos patrones de birrefringencia diferentes para ASC16 0,05% p/p en agua a 25 °C. La falta de homogeneidad en la temperatura de la muestra podría ser la responsable de este efecto. En la parte izquierda de las figuras la temperatura es menor que en la derecha y por ello se observa una birrefringencia.

En la **figura 3.2.B.** se presenta una muestra más concentrada (0,1% p/p) y por lo tanto más cristales birrefringentes en un medio isotrópico (agua). En la **figura 3.2.C.** se observa la misma figura anterior pero calentada a 75 °C. Aquí, se presentan las figuras de mielina en la parte baja de la imagen. Esta textura es propia de los cristales líquidos laminares, de la misma manera que lo describe Benedini y cols. (2011).



**Figura 3.3. Microfotografías ópticas con luz polarizada.**

A) ASC16-dextrosa (0,1% p/p)/CpG-ODN calentado a 70 °C; B) ASC16-dextrosa (0,1% p/p)/CpG-ODN enfriado a 40°C; C) ASC16-Dextrosa (0,02% p/p)/CpG-ODN calentado a 70°C; D) ASC16-dextrosa (0,02 % p/p)/CpG-ODN enfriado a 40 °C; E) ASC16-dextrosa (0,05% p/p)/CpG-ODN/OVA calentado a 70 °C; F) ASC16-dextrosa (0,05 %p/p)/CpG-ODN/OVA enfriado a 50 °C. Todas las fotografías fueron tomadas con polaroides cruzados y la figura C fue tomada con placa de retardación.

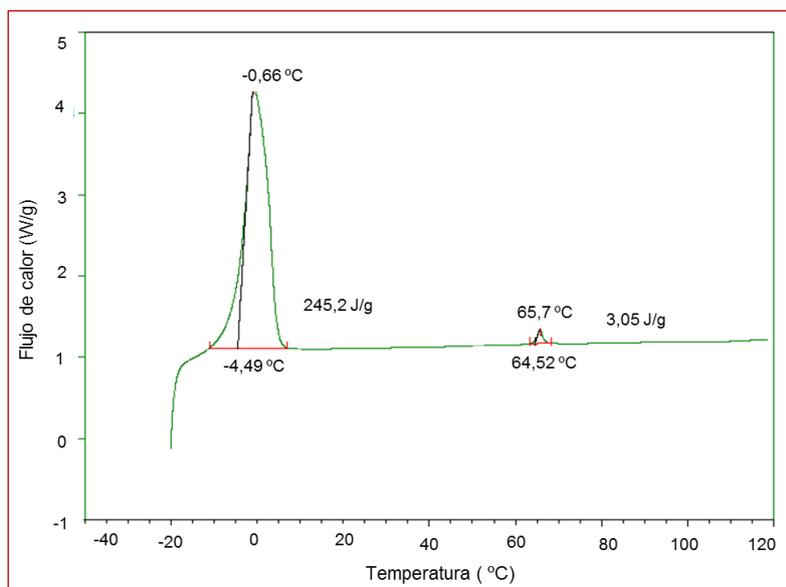
En la **figura 3.3.A.** se observan las texturas tipo “rayo” características de una muestra de ASC16 0,1% p/p calentada a 70 °C. Esas texturas son comparables a las que se presentan en la **figura 3.3.C.** Ambas son indicativas de la presencia de cristales líquidos laminares. La importancia de estas figuras radica en que presentan el mismo comportamiento reportado con anterioridad por Benedini y cols., 2011. En síntesis, cuando las muestras de la región de baja concentración del diagrama de fases están por debajo del punto de transición se observa una solución isotrópica y cristales. Sin embargo, cuando las muestras son calentadas por encima del punto de transición, se observa un comportamiento de cristal líquido laminar. La temperatura de comienzo de transición para el sistema ASC16-agua para las concentraciones inferiores a 0,45% p/p

es de 62,5, °C lo cual es coincidente con el punto de Krafft calculado por conductimetría y CDB en nuestro grupo de trabajo [Lo Nostro y cols., 2002].

En la **figura 3.1.** se presentaron los termogramas de las diferentes muestras evaluadas; ahí se puede apreciar que el punto de transición de ASC16 no se modifica por la presencia de CpG-ODN ni OVA o ambas moléculas juntas.

En la **figura 3.3.B.** se puede observar que cuando la muestra con CpG-ODN se enfría (partiendo de la muestra de la **figura 3.3.A.**) a temperaturas por debajo del punto de transición, aparece un gel correspondiente a la formación del cristal líquido laminar. El mismo fenómeno se observa para las **fotografías 3.3.D.** luego de enfriar a 40 °C la muestra de la **fotografía 3.3.C.** (ASC16-dextrosa 0,02% p/p /CpG-ODN a 70 °C). Por otra parte, la **figura 3.3.F.** se obtiene de la muestras de ASC16-dextrosa 0,05% p/p/CpG-ODN/OVA a 70 °C, luego de ser enfriada a 50 °C. En todos los casos, se forma un gel a partir de los cristales líquidos laminares por enfriamiento de la muestra por debajo del punto de transición. Este comportamiento es el mismo reportado con anterioridad para todas las concentraciones por debajo de 0,45% p/p del sistema ASC16-dextrosa y por ende, se postula que tanto OVA como CpG-ODN o la combinación de ambas no alteran el comportamiento de fase de los sistemas ASC16-dextrosa.

En la **figura 3.1.** se presentaron los termogramas para cada una de las concentraciones de ASC16 de interés, y se analizaron las mesofases que aparecen en función del aumento de la temperatura. Los picos que están cercanos a 0 °C evidencian el proceso de fusión de agua. Al analizar esta transición, se puede notar que cada una de estas señales está a su vez compuestas por dos picos, los cuales fueron separados en sus componentes por un proceso de deconvolución.

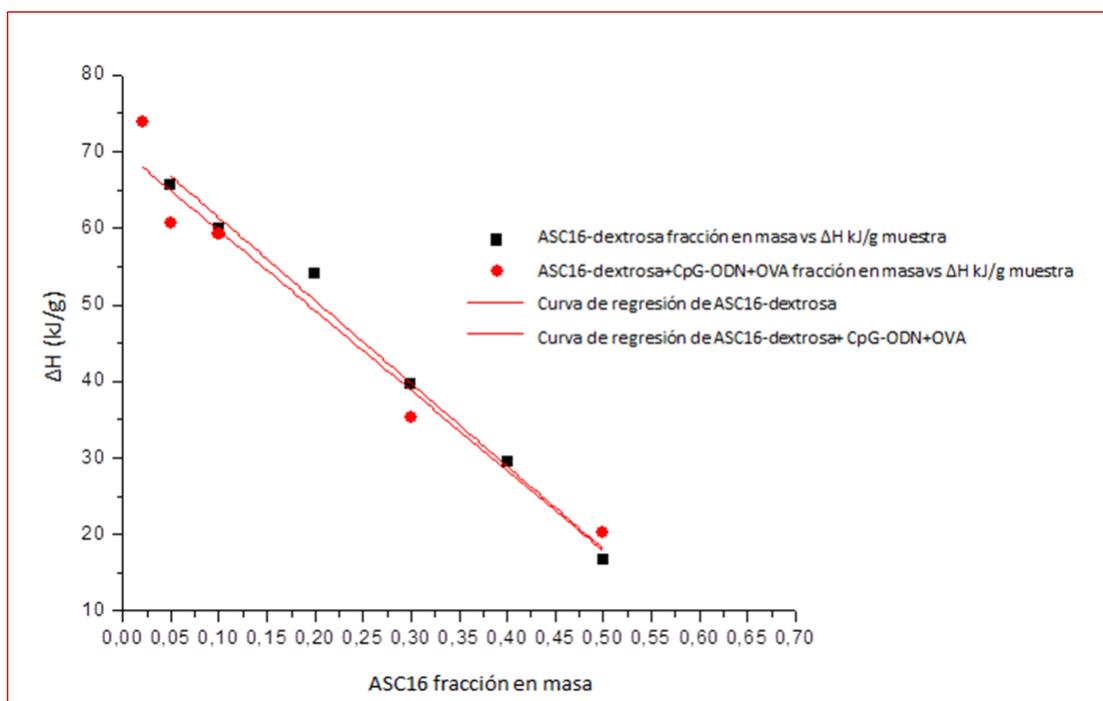


**Figura 3.4. Termograma de una muestra de ASC16 0,2% p/p en una solución de dextrosa al 5%.**

*En la figura se observan los picos del agua y del surfactante integrados (TA Universal Analysis). Se muestra en la porción superior la temperatura a la cual se alcanza el punto más alto del pico. En la porción inferior se muestra el  $\Delta H$  en J/g de muestra. Debe notarse que el pico del agua está compuesto por la superposición de dos picos diferentes.*

Los dos tipos de agua que se encontraron en los termogramas fueron denominados provisionalmente “agua 1” y “agua 2” [Benedini y cols., 2012]. El punto de fusión del agua 1 es menor, y corresponde al agua asociada a la superficie, cuyos enlaces por puentes de hidrógeno son más débiles que en el agua libre. A medida que se aumenta la concentración de surfactante, los picos asignados a la fusión del agua van desapareciendo. Sin embargo, el pico del agua 2 desaparece antes de que lo haga el agua 1. En concordancia con las interpretaciones realizadas por Rupley y Careri 1991; Schulz y cols., 1994, 2006; Puig y cols., 1996, el agua 1 es afectada por la superficie del surfactante ya que está más cerca de ésta que el agua libre. Como consecuencia de ello, el agua 1 fue identificada como el agua asociada a la superficie de los grupos polares del surfactante y el agua 2 como agua libre.

El agua que no se congela y que por lo tanto no se observa por CDB se denomina agua de hidratación primaria y corresponde al agua fuertemente ligada a las cabezas polares del surfactante. Este tipo de agua se calcula cuando la entalpía por gramo de muestra se grafica en función de la concentración [Schulz y cols., 1994].



**Figura 3.5.** Entalpía total de fusión del agua por gramo de muestra en función de la fracción en masa de ASC16.

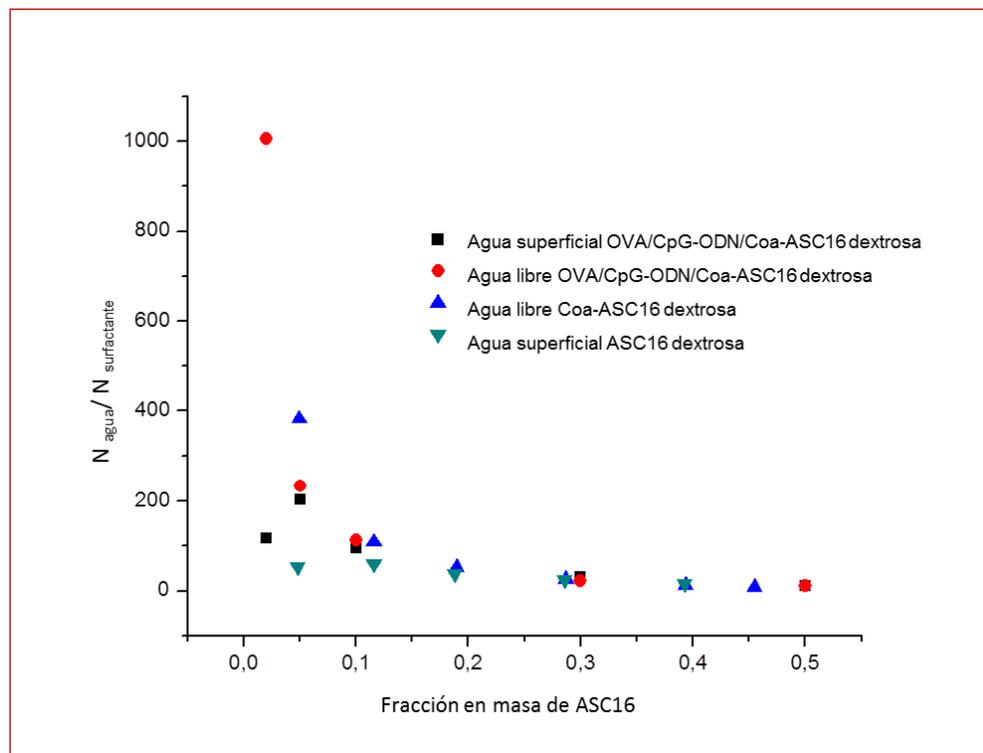
El tipo de agua que no es observado por CDB se determina por la ausencia de picos de fusión, es decir, se detecta por la desaparición de los picos de fusión del agua cuando la entalpía por gramo de muestra se grafica en función de la concentración.

**Tabla 3.1.** Ecuación de la recta obtenida de la gráfica 3.5. Entalpía total de fusión del agua por gramo de muestra en función de la fracción en masa de Asc16.

	Ordenada al origen	Pendiente	Ajuste R <sup>2</sup>
ASC16 –dextrosa	72±2	-108±5	0,9876
OVA/CpG-ODN/ASC16-dextrosa	70±3	-105±12	0,9495

Como se muestra en la **figura 3.5.** y la **tabla 3.1.** la desaparición total de los picos de fusión del agua ocurre a una concentración igual a  $0,575 \pm 0,007$  en fracción en masa (extrapolación a 0 en el eje abscisas), y no se observan cambios significativos en la pendiente de la recta correspondiente a ASC16-dextrosa/CpG-ODN/OVA respecto a la de ASC16-dextrosa. De esta manera, puede inferirse que la presencia de ambas moléculas hidrofílicas no afectan el arreglo laminar de ASC16 en dextrosa. En otras palabras, no se modifican las moléculas de agua de hidratación primaria de los cristales líquidos de ASC16 cuando se le agrega componentes hidrofílicos en las concentraciones evaluadas.

La distribución de las moléculas de agua por moléculas de surfactante ( $N_{\text{agua}}/N_{\text{surf}}$ ) se muestra en la **figura 3.6.** y fue obtenida luego de la deconvolución de los picos de agua. A cada tipo de agua le corresponde un porcentaje determinado del área del pico de agua total.



**Figura 3.6. Número de moléculas de agua por molécula de surfactante.**

*Todas las muestras fueron preparadas a una concentración constante de OVA y CpG-ODN variando sólo las concentraciones de ASC16 y en dextrosa.*

En este gráfico se evidencia la diferencia del número de moléculas de agua libre y superficial entre los sistemas cargados y sin cargar, fundamentalmente en la región de baja concentración de ASC16. Por ejemplo, se obtienen aproximadamente 1000 moléculas de agua libre para el sistema OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para una concentración de 0,02% p/p de ASC16 y solo 200 moléculas a una concentración de 0,05% p/p para la misma muestra. Por otra parte, para esta misma concentración de ASC16 pero en el sistema sin cargar se obtiene alrededor del doble, es decir, aproximadamente 400 moléculas de agua. El mismo fenómeno pero en menor magnitud se observa para el agua superficial. En el caso de las fracciones de masa de alrededor de 0,02% p/p de ASC16, se observan diferencias significativas en el número de moléculas de agua superficial comparando los sistemas cargados y sin cargar.

En resumen, la comparación más importante debe hacerse entre los sistemas cargados y sin cargar para una dada concentración de ASC16 y evaluar de qué manera el cargado afecta el comportamiento del agua del sistema. Así, las diferencias más importantes se observan a bajas concentraciones de surfactante; luego se dificulta notablemente la diferenciación entre los distintos tipos de agua en estos sistemas multicomponente, dado que a las interacciones de puente hidrógeno entre las moléculas de agua se suman las interacciones con los grupos polares del ASC16.

Por otro lado, aunque el agua libre se define generalmente como el agua con propiedades fisicoquímicas idénticas al agua pura, esto no es estrictamente cierto y en sistemas relativamente concentrados sus propiedades pueden variar dado que, la estructura del agua está perturbada por la presencia de otros componentes del sistema [Schulz y cols.,2006].

A fin de confirmar los resultados obtenidos anteriormente, se llevó a cabo un análisis de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR). La **figura 3.7.** muestra los espectros IR obtenidos de los coageles cargados con OVA y CpG-ODN en cuatro concentraciones de ASC16 (0,1; 0,3; 0,5 y 0,7% p/p) con el objetivo de hacer extensivo el análisis a prácticamente todo el rango de concentraciones del diagrama de fases.

De este modo, en la región comprendida entre  $3500$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$  se observan dos bandas correspondientes a la vibración de tensión oxígeno-hidrógeno. La primera de ellas denominada C está centrada en  $3375\text{ cm}^{-1}$  y presenta forma aguda; la segunda, llamada B es ensanchada y aparece dentro del intervalo  $3100\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ . A medida que aumenta la concentración de la muestra, puede verse que ambas bandas incrementan su intensidad, pero en tanto C no varía en su posición, B sufre un corrimiento hacia menores valores de número de onda. El incremento en la intensidad de los picos es debido a la mayor contribución de los modos de tensión del agua, y el corrimiento a la interacción entre los enlaces de agua y los grupos -OH del compuesto, lo que aumenta la asociación. De este modo, B puede ser atribuida a los enlaces intermoleculares, que aumentan con la concentración de ASC16 y por ende, el número de moléculas de agua. C, en cambio, puede ser atribuida a enlaces más cortos y más fuertes, entre los grupos -OH de agua superficial, que quedan más expuestos, fuera de la red cristalina que conforman los agregados de ASC 16, al aumentar la concentración.

En cuanto a la banda situada en  $1625\text{ cm}^{-1}$ , denominada A, ésta se debe a la vibración de deformación del enlace -OH de las moléculas de agua en la muestra, por lo cual su intensidad aumenta con la concentración del compuesto, y por lo tanto, el contenido de agua en el mismo [Herrera-Gómez y cols., 2001; Zhou y cols., 2002].

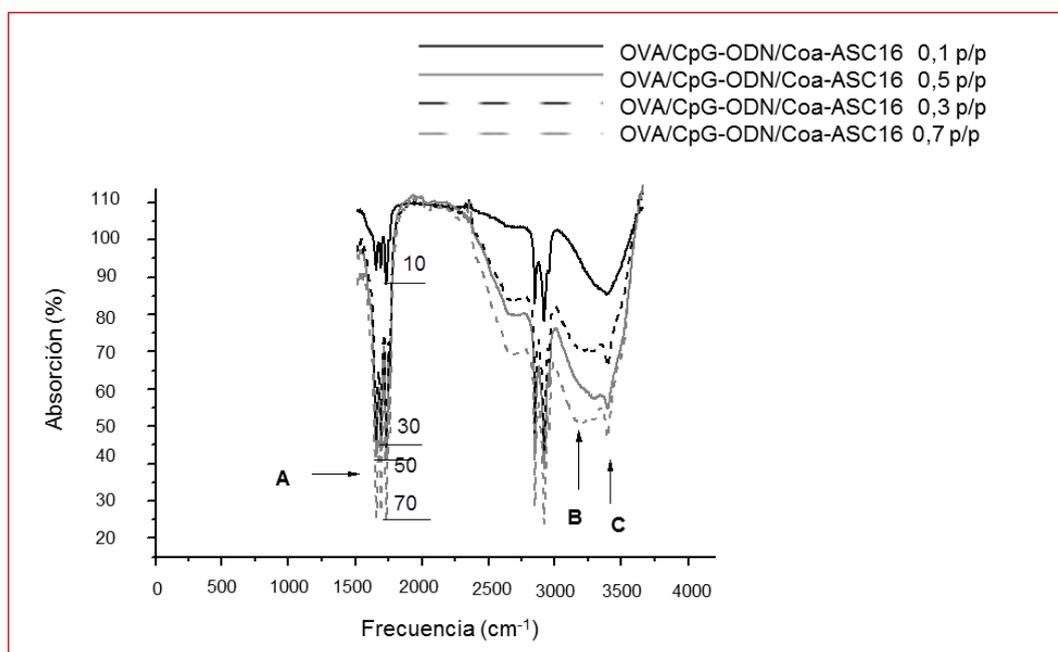


Figura 3.7. Espectros FT-IR de los sistemas OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en dextrosa.

*Para las determinaciones se emplearon cuatro concentraciones crecientes de ASC16: 0,1; 0,3; 0,5 y 0,7 % p/p. Las concentraciones de OVA y CpG-ODN se mantuvieron constantes e iguales a  $96\text{ }\mu\text{g/ml}$  y  $300\text{ }\mu\text{g/ml}$  respectivamente.*

Los resultados obtenidos por FT-IR, nos permitieron confirmar que el comportamiento del agua se modifica con la concentración de ASC16 dado que a mayores concentraciones de ASC16 en el sistema, menor es la proporción de agua libre. Este resultado es consistente con el obtenido anteriormente por CDB, (**figura 3.6**). El aumento en la intensidad de la banda C en la **figura 3.7**. muestra que se tiene más agua unida cuando se tienen más grupos polares, es decir, más cantidad de ASC16. Es importante tener en cuenta que al obtener el patrón de IR puede visualizarse este aumento en el agua superficial que no se observa mediante CDB dado que al hacer el cociente ASC16/agua la relación no varía.

### 3.3.2. Liberación *in vitro* de CpG-ODN y de OVA desde Coa-ASC16

Los estudios de liberación se realizaron utilizando celdas bicompartimentales de tipo Franz. En este punto cabe aclarar que la fuerza que impulsa la liberación depende del espesor de la membrana y de la concentración de F que esta disuelto. Cuando la concentración disuelta es menor al 10% de la concentración de saturación, se dice que el sistema opera en condiciones sumidero (sink, en inglés). La fuerza impulsora para la liberación es mayor cuando el sistema se encuentra bajo estas condiciones; de aquí, la importancia que las mismas se mantenga a lo largo de todo el experimento [Martin y Sinko 2006]. La descripción de la metodología utilizada se encuentra en la sección M.8. del anexo I.

La **figura 3.8.A.** ilustra el porcentaje de CpG-ODN liberado en función del tiempo desde coageles en dextrosa cargado con CpG-ODN sólo o combinado también con OVA. Como referencia, se emplearon soluciones de CpG-ODN y OVA, ambas en dextrosa y a concentraciones equivalentes a las empleadas en los coageles cargados.

Como se esperaba, la liberación de CpG-ODN desde la solución fue completa (más del 90%) antes de cumplidos los 60 minutos de ensayo. Esta liberación rápida es característica de una solución donde el flujo difusivo del F al compartimento receptor es directamente proporcional al gradiente de concentración. La liberación es rápida mientras este gradiente se mantiene y luego cuando se equilibran las concentraciones a ambos lados de la membrana, la velocidad de liberación se vuelve constante. En este punto se observa una meseta en el perfil de liberación (**figura 3.8.A.**). Sin embargo, luego de transcurridas 5 horas de ensayo, se observa una pequeña disminución de la concentración acumulativa de CpG-ODN que podría atribuirse al inicio de la degradación de este compuesto en el medio empleado.

Por otra parte, en el perfil de CpG-ODN/Coa-ASC16, se observa a los 10 minutos una liberación aproximadamente del 15% alcanzando el 44% a los 60 minutos del ensayo. El máximo de la liberación ocurre a las 5 horas (52,67%) y luego el perfil permanece constante el resto del tiempo de estudio. Como se expuso anteriormente, para este sistema, se pudo determinar por medio de CDB y comparado con los modelos citados [Benedini, 2012] que el agua se encuentra en tres estados diferentes y que los diferentes tipos de agua afectan a la naturaleza de las mesofases formadas

cuando el sistema se calienta [Benedini y cols., 2012]. Además, la adición de moléculas hidrofílicas modifica el comportamiento del agua libre y superficial de estos compuestos. De este modo, la liberación inicial instantánea (efecto “burst” en inglés) de CpG-ODN desde Coa-ASC16, podría deberse a las moléculas de CpG-ODN que se encuentran solubles en el agua libre y por lo tanto, disponibles para ser liberadas. Esta liberación inmediata es seguida de una liberación sostenida indicando que las moléculas de CpG-ODN están localizadas en diferentes dominios acuosos de Coa-ASC16, probablemente en la segunda capa de hidratación en contacto directo con la primera capa de hidratación. El resultado es una modulación (disminución) en la tasa de liberación de CpG-ODN.

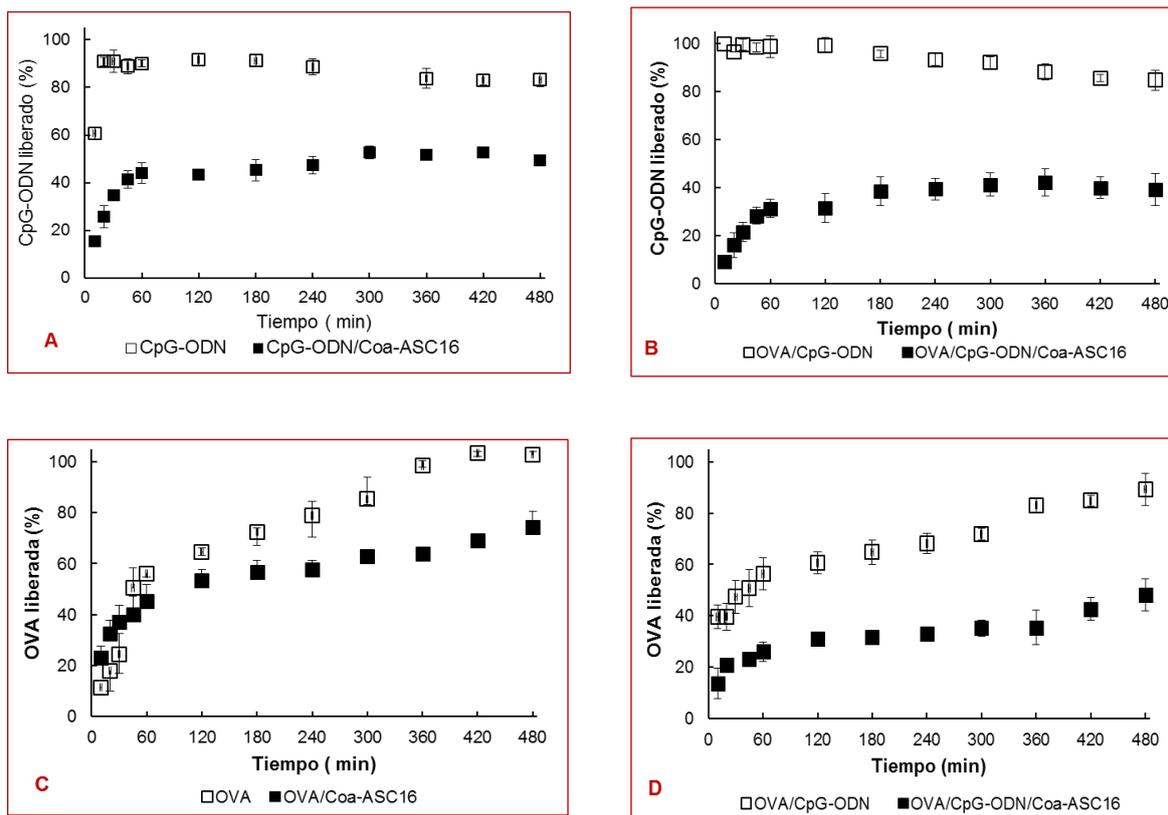
La **figura 3.8.B.** muestra un patrón de liberación similar al obtenido anteriormente para CpG-ODN en su forma soluble, pero ahora combinado con OVA también en su forma soluble. La adición de esta proteína al sistema no formaría unión covalente con CpG-ODN. Por otra parte a pH 7,2 la carga neta de OVA es negativa e igual a la carga neta de CpG-ODN, por lo tanto, tampoco es de esperarse que ocurrieran interacciones electrostáticas. En el perfil de la solución de referencia, el 95% de la liberación de CpG-ODN fue alcanzado antes de los 60 minutos de ensayo y se observa una pequeña disminución en el patrón de liberación luego de 5,5 horas de comenzado el experimento. Esto podría deberse también a la degradación de CpG-ODN como se mencionó anteriormente. El perfil de liberación de CpG-ODN/OVA/Coa-ASC16 no presenta diferencias significativas al obtenido para CpG-ODN/Coa-ASC16. En otras palabras, no se modificó el patrón de liberación de CpG-ODN luego de la incorporación de la proteína. Cabe destacar que si bien OVA es una proteína de un peso molecular considerable (45 KDa), su concentración en el sistema es 8,8 veces menor a la de CpG-ODN.

El mismo estudio se llevó a cabo para la proteína a fin de analizar su comportamiento y compararlo luego con el de CpG-ODN. De esta manera, se obtuvieron los perfiles de liberación de una solución de referencia de OVA a la misma concentración que luego se cargó en los coageles (**figura 3.8.C.**). En ambos gráficos se obtuvieron dos pendientes: un primer efecto burst seguido de una liberación prolongada, no observándose degradación de la proteína en ninguno de los dos casos.

Si bien la liberación fue completa en la solución de referencia, el total de OVA liberada se alcanzó luego de seis horas de ensayo y el perfil varía respecto al obtenido con la solución de CpG-ODN. Esta diferencia encontrada en ambas soluciones podría atribuirse a las propiedades fisicoquímicas tales como peso molecular, pH y pKa; como así también a la estructura química de ambas moléculas. Nuevamente se observa una modulación (disminución) en la tasa de liberación de OVA desde Coa-ASC16 comparada con la solución de referencia pero esta modulación es menor que la obtenida para CpG-ODN. Probablemente estas diferencias se deban una vez más a las distintas propiedades fisicoquímicas y estructurales de estas moléculas.

Por otra parte y sólo como ensayo cualitativo a fin de determinar la integridad de la proteína, se evaluó el espectro de dicroísmo circular (DC) para muestras de OVA obtenidas del compartimento receptor a diferentes tiempos de los dos ensayos (OVA libre y vehiculizada en Coa-ASC16). Los resultados indican que no hay cambios en la conformación de la proteína lo que implica que una vez liberada del sistema no pierde su integridad ni cambia su estructura terciaria. Sin embargo, esto no significa que no ocurran cambios en su conformación cuando está cargada en los coageles antes de ser liberada ya que se trata de sistemas dinámicos que se encuentran en equilibrio, por lo tanto, es posible que la proteína vuelva a su estado original una vez que es liberada del portador.

Finalmente la **figura 3.8.D.** presenta el mismo ensayo de liberación de la **figura 3.8.B.** pero en este caso graficando en el eje de las ordenadas el porcentaje liberado de OVA. Se observa que la liberación de OVA desde la solución de referencia es afectada por la presencia de CpG-ODN llegando al máximo luego de 8 horas de ensayo. Por otra parte, la liberación de OVA es modulada por la presencia del portador ejerciendo una disminución en la tasa de liberación aún más marcada que la observada para CpG-ODN.



**Figura 3.8. (A-D) Liberación *in-vitro* de CpG-ODN y OVA desde Coa-ASC16 utilizando celdas de Franz en condiciones sink a 37 °C en tampón Tris-HCl pH 7,2.**

El oligodeoxinucleótido utilizado fue CpG-ODN (PS) y los coageles se prepararon siempre al 2% p/p de ASC16 en una solución de dextrosa al 5%. (A) Perfil de liberación de una solución de CpG-ODN y CpG-ODN/Coa-ASC16. (B) Perfil de liberación de una solución de OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. (C) Perfil de liberación de una solución de OVA y OVA/Coa-ASC16. (D) Las mismas condiciones que B pero cuantificando la liberación de OVA. Los resultados son el promedio de tres ensayos independientes.

De lo expuesto hasta aquí, puede concluirse que cuando OVA y CpG-ODN se formulan en Coa-ASC16 se logra una liberación sostenida de ambas moléculas. Esta liberación sostenida tanto de antígeno como de adyuvante podría correlacionarse con la formación de un depósito *in vivo* en el sitio de inyección lo que permitiría disminuir la dosis o el número de inmunizaciones del para obtener una respuesta inmune óptima (ver capítulo siguiente).

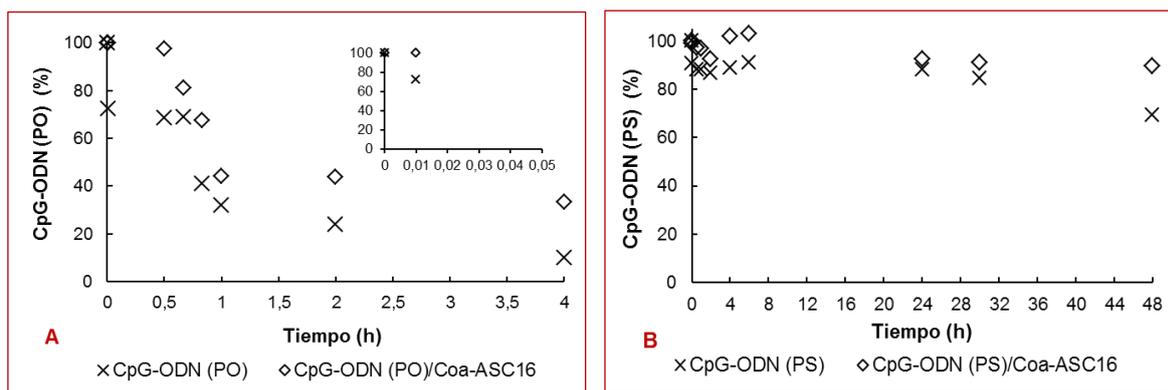
### 3.3.3. Estabilidad de CpG-ODN vehiculado en Coa-ASC16 frente a la degradación por exonucleasas

Uno de los puntos críticos en la aplicación clínica de CpG-ODN es la posible disminución de la actividad debido a la degradación por la acción de enzimas endógenas. En nuestro caso se propuso implementar estrategias tendientes a

minimizar este posible efecto. Con este propósito, se emplearon los análogos fosforotionatos (PS) de CpG-ODN sumado a la vehiculización de este compuesto en este nuevo sistema farmacéutico obtenido a partir de la autoagregación de ASC16.

A fin de evaluar la estabilidad de este sistema, se llevó a cabo el ensayo de digestión por nucleasas. Para ello, se empleó una solución de la enzima 3'-exonucleasa a una concentración que se ajusta a la actividad de la enzima en plasma humano [Gilar y cols., 1998]. Como control positivo, se utilizó CpG-ODN fosforotionato (PO) que es extremadamente susceptible a la degradación por nucleasas. Como se muestra en la **figura 3.9.A.**, luego de 0,01 horas (0,6 minutos) de incubación con la enzima, el porcentaje de ODN intacto encontrado fue significativamente mayor para CpG-ODN (PO)/Coa-ASC16 comparada a CpG-ODN (PO) en solución, ejerciendo de esta manera un efecto protector frente a la degradación enzimática.

El mismo comportamiento no se observa para CpG-ODN (PS), debido a que este compuesto es más resistente a la degradación por exonucleasas, permaneciendo casi completamente intacto incluso luego de 24 horas de comenzado el ensayo (**figura 3.9.B.**). No obstante, luego de las 48 horas, se observa una diferencia significativa entre la concentración de CpG-ODN (PS) libre y el cargado en los coageles. Si bien este es un resultado alentador para nuestro sistema portador, luego de transcurridas las primeras 24 horas de ensayo, no puede hacerse una correlación entre el resultado de este estudio *in vitro* y lo que sucedería en un ensayo de degradación enzimática *in vivo* ya que, luego de este período de tiempo, se estima que todo el CpG-ODN estará totalmente degradado por las enzimas endógenas del animal de experimentación.



**Figura 3.9. Ensayo de digestión por nucleasas.**

Se grafica el porcentaje del oligodeoxinucleótido intacto después del tratamiento con la enzima 3'-exonucleasa. El porcentaje se basa en la medición de la cantidad total de oligodeoxinucleótido en el medio de reacción determinada por la técnica de HPLC validada en el capítulo 2. Los datos son representativos del promedio de dos experimentos independientes. Los oligodeoxinucleótidos utilizados fueron: A) CpG-ODN (PO). En el gráfico pequeña representa el mismo ensayo pero solo a tiempos cortos. B) CpG-ODN (PS).

### 3.4. Conclusiones del capítulo

Para nuestro sistema en estudio, es decir coageles de ASC16 en una solución de dextrosa al 5%, se determinó que el agua se encuentra en tres estados diferentes y que la naturaleza de las mesofases formadas se ve afectada por la temperatura. Estos resultados son consistentes con los descritos para el sistema ASC16-agua no observándose cambios debido a la presencia de dextrosa. Luego de la incorporación de CpG-ODN y OVA en los coageles no se observaron cambios en el diagrama de fases en términos de formación de mesofases. Por otra parte, las diferencias encontradas en el agua libre y principalmente en la capa de hidratación secundaria, permiten confirmar que estos compuestos se encuentran en el dominio acuoso, en contacto directo con la primera capa de hidratación.

Los resultados de las liberaciones *in vitro* indican que el portador modula la velocidad de liberación tanto de CpG-ODN como de OVA desde el sistema. La importancia de esto radica por un lado, en la posibilidad de la formación de un depósito (efecto depot en inglés) del adyuvante en el sitio de inyección una vez administrado este sistema *in vivo*, lo que promovería la captación celular por parte de las células presentadoras de antígenos (CPA) y consiguiente inicio de una respuesta inmunológica (ver próximo capítulo). Por otra parte al lograrse una liberación

prolongada del adyuvante también se evitaría la rápida degradación por las enzimas principalmente de tipo esterasas presentes en el medio biológico.

Si bien los resultados obtenidos luego de la digestión con exonucleasas, no nos permiten inferir que el efecto potenciador de Coa-ASC16 sobre la actividad adyuvante de CpG-ODN (ver próximo capítulo) pueda atribuirse exclusivamente al efecto protector contra la degradación enzimática, ya que CpG-ODN(PS) es más resistente a las nucleasas, se pudo verificar un efecto de protección de Coa-ASC16 sobre CpG-ODN (PO) que podría aportar cuantitativamente al efecto biológico observado. Este hallazgo, nos permite pensar en la posibilidad de reemplazar CpG-ODN (PS) por su análogo menos tóxico, CpG-ODN (PO) en futuros ensayos de vacunación.

## **CAPITULO 4**

### **EVALUACION DE LA APLICACION DE CRISTALES LIQUIDOS DE PALMITATO DE ASCORBILO PARA LA POTENCIAL FORMULACION DE VACUNAS**





## Capítulo 4

# *Evaluación de la aplicación de cristales líquidos de palmitato de ascorbilo para la potencial formulación de vacunas*

### **4.1. Introducción**

La tendencia actual en la formulación de vacunas es el empleo de subunidades de patógenos altamente purificados o moléculas recombinantes que poseen la ventaja de ser más seguras que los microorganismos atenuados empleados con anterioridad. No obstante, presentan una baja inmunogenicidad debido a la falta de propiedades inmuno estimulatorias inherentes, y por lo tanto requieren un adyuvante para desarrollar una respuesta inmune efectiva [Malyala y cols., 2009].

La clave en el desarrollo de una vacuna es el empleo de un adyuvante efectivo que aumente la respuesta inmune específica para un antígeno (Ag) y que al mismo tiempo sea seguro. De este modo, muchos compuestos han sido probados como adyuvantes en modelos experimentales y en la última década, varios ensayos clínicos en humanos incluso algunos en fase III, han sido llevados a cabo empleando CpG-ODN [Krieg 2012].

El efecto adyuvante de CpG-ODN es el resultado de un aumento de la función de las CPA que incrementan la captación del Ag mediado por receptores que reconocen ODN. Luego de la activación de las CPA, CpG-ODN induce una polarización funcional en la respuesta de las células T CD4+ hacia un perfil tipo 1 (Th1) característico por la producción de interleucina (IL) 2, factor de necrosis tumoral beta (TNF-B) e interferón-gamma (INF- $\gamma$ ) por células asesinas naturales (su sigla en inglés, NK, natural killer) y linfocitos T (efecto indirecto), lo cual favorece la secreción de inmunoglobulinas (IgG)2a por los linfocitos B y el desarrollo de linfocitos T citotóxicos Ag-específicos. Todas estas mejoras en la inmunidad humoral y celular han sido observadas cuando distintas combinaciones de vacunas conteniendo CpG-ODN han sido aplicadas por diversas vías en modelos murinos [Klinman y cols., 2004a; 2004b]. Una ventaja adicional de CpG-ODN es su habilidad para cambiar la respuesta de tipo Th2 preexistente en ratones neonatos y viejos hacia un perfil Th1 [Maletto y cols., 2002; 2005; Alignani y cols., 2005] simultáneamente con la reducción del daño tisular asociado con el uso de adyuvantes Th1 convencionales como monofosforil lípido A (MPL), AS04 formado por la combinación de MPL y sales de aluminio o el adyuvante completo de Freud [Ioannou y cols., 2002; Batista-Duarte y cols., 2014].

Además de las propiedades inmunoestimulantes descritas, CpG-ODN posee otras características que lo hacen atractivo para su uso en humanos como por ejemplo, elevada solubilidad en medio acuoso, versatilidad de administración por diferentes vías y estructura química bien definida. Además, su síntesis y purificación son procedimientos relativamente simples que pueden ser realizados a gran escala [Krieg y cols., 2006].

Aunque CpG-ODN ha demostrado ser menos tóxico que otros adyuvantes en estudio, todavía presenta algunas limitaciones como la vida media corta, una farmacocinética y biodistribución desfavorable, alta unión a proteínas plasmáticas, falta de especificidad por las células blanco, baja captación celular. También deben considerarse los efectos secundarios asociados a la similitud de su estructura a la señal de iniciación de la cascada de transducción para endotoxinas sumada a la posibilidad de shock séptico, lo que restringe su aplicación clínica [Mutwiri y cols., 2004; 2009; Hanagata 2012].

La formulación ideal de un potenciador de la respuesta inmune debería superar estas deficiencias y proteger a la molécula de la degradación, direccionarla hacia sus células blanco, principalmente macrófagos y células dendríticas, y permitir la co-presentación del antígeno y el adyuvante a la misma célula. De este modo, además de aumentar la potencia, la formulación de CpG-ODN podría contribuir a obtener un esquema de administración más simple, disminuyendo la dosis administrada y por lo tanto, la toxicidad del adyuvante [Weeratna y cols., 2000; Helkenwalder y cols., 2004].

Los avances recientes en tecnología farmacéutica han permitido el desarrollo de numerosos sistemas nanométricos para la vehiculización de CpG-ODN tales como liposomas [Kwong y Liu 2011] nanopartículas poliméricas y lipídicas [Wilson y cols., 2009, Krishnamachari y Salem 2009] micropartículas [Malyala y cols., 2009], hidrogeles [Nishikawa y cols., 2011] y nanoemulsiones [Shi y cols., 2005] empleando diferentes técnicas y materiales. Aunque algunas de estas formulaciones parecen prometedoras, también presentan algunos problemas relacionados al proceso de manufactura, como el escalado y la toxicidad fundamentalmente de los materiales catiónicos [Garlapati y cols., 2011; Chen y cols., 2013].

Como se describió en el capítulo anterior, los derivados de la vitamina C, puntualmente el palmitato de ASC16 forman en solución, estructuras supramoleculares que proporcionan un ambiente ideal para la solubilización de compuestos hidrofóbicos y fármacos que pudieran degradarse cuando se los expone a la luz, el calor y el oxígeno. Incluso, estos compuestos anfifílicos conservan las propiedades antioxidantes de la vitamina C y su consistencia semisólida y propiedades reológicas permiten aumentar la permeación de fármacos a través de la piel [Palma y cols., 2002a; 2007; Saino y cols., 2009]. Basados en todas estas consideraciones, el objetivo de este capítulo ha sido determinar si Coa-ASC16 mejora la actividad adyuvante de CpG-ODN. Para ello, vehiculizamos en los coageles un antígeno modelo (OVA) con CpG-ODN y evaluamos la respuesta inmune en ratones. Luego se llevaron a cabo ensayos para determinar si existe “memoria inmunológica” y si es posible disminuir tanto el número de inmunizaciones como la dosis aplicada. Finalmente, utilizamos la misma estrategia de vehiculización para

la evaluación de la respuesta inmune cuando se reemplaza el antígeno modelo por un antígeno vacunal.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Materiales**

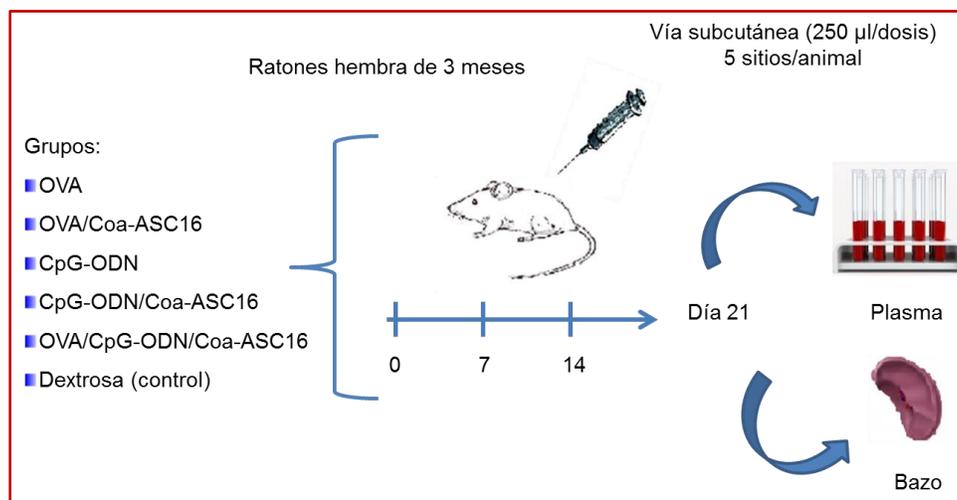
Ovoalbúmina (OVA) fue provista por la empresa Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, Nueva Jersey, EEUU). CpG-ODN 1826 (secuencia 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3'; peso molecular: 6363,08 g/mol) sintetizado con una fosforilación en el extremo 5' (CpG-ODN) (PS) o sin modificación en este extremo (CpG-ODN) (PO) fueron comprados en Operon Technologies Inc. (Alameda, EEUU). Ambos CpG-ODN no contienen lipopolisacárido (LPS) como contaminante. Para confirmarlo, se realizó un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, EEUU) que demostró que el contenido de endotoxina del oligodeoxinucleótido luego de la reconstitución fue menor a 1 unidad de endotoxina/ml. Las soluciones madres de OVA y CpG-ODN se prepararon empleando una solución estéril y apirógena de NaCl 0,9% (B. Braun Medical S.A, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina). El palmitato de ascorbilo se adquirió en Fluka Analytical (Milán, Italia) y la solución de dextrosa estéril y apirógena al 5% fue comprada en Laboratorios Roux-Ocefa (Buenos Aires, Argentina). Los detalles de estos compuestos se encuentran en la sección M.1., M.2., y M.3. respectivamente, del anexo I de materiales y métodos.

Para los ensayos con un antígeno vacunal, se empleó el toxoide tetánico (TT) del Laboratorio Central de Salud Pública, Instituto Biológico Tomas Perón, (La Plata, Argentina) de concentración 4500 LF/ml. La vacuna tetánica usada como control positivo (lote 1553, Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba) tiene una potencia de 32 UIA según el método de NIH.

### **4.2.2. Esquema de inmunización**

Los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN (solución de OVA con CpG-ODN), OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (OVA y CpG-ODN formulado

en Coa-ASC16, co-formulación), OVA/CpG-ODN+Coa-ASC16 (solución de OVA/CpG-ODN y Coa-ASC16 administrado de manera separada en el mismo sitio de inyección, co-inyección), OVA/Coa-ASC16 y CpG-ODN/Coa-ASC16 (OVA y CpG-ODN formulados en Coa-ASC16 respectivamente). Los coageles cargados fueron preparados según se describe en la sección M.4. del anexo I. Dos esquemas de inmunización diferentes fueron llevados a cabo: en el primero, las inmunizaciones se realizaron en los días 0, 7 y 14 días. En otros experimentos, la inmunización fue realizada sólo dos veces (día 0 y 7 respectivamente). Cada ratón se inmunizó por vía subcutánea y la totalidad de la dosis (250  $\mu$ l) fue repartida en 5 sitios de inyección: cola, tres puntos equidistantes distribuidos a lo largo del lomo, y ambas patas traseras (50  $\mu$ l por sitio). Se administraron dos dosis de CpG-ODN: 75  $\mu$ g/dosis/animal o 30  $\mu$ g/dosis/animal según el experimento. La dosis de OVA fue la misma para todos los grupos (60  $\mu$ g/animal/dosis). Luego de 7 días post segunda y/o tercera inmunización, se tomaron muestras por sangrado periorbital. El plasma fue recolectado y mantenido a -20 °C para análisis posterior y en el caso de los bazos, se trabajó según el protocolo descrito en la sección M.10. del anexo I. Para algunos experimentos, se evaluó la morbilidad y mortalidad de los animales por un periodo de seis meses. El mismo protocolo de inmunización se empleó para el antígeno vacunal, reemplazando OVA por el equivalente de TT. La **figura 4.1.** ilustra el esquema de trabajo. Estos ensayos fueron llevados a cabo en estrecha colaboración con la Dra. Belkys Maletto y su grupo de investigación perteneciente al Laboratorio 109 del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC), CIBICI-CONICET (Córdoba, Argentina).



**Figura 4.1.** Esquema de inmunización de CpG-ODN y OVA, ambos en su forma soluble o vehiculizados en Coa-ASC16.

Ratones hembras BALB/c y C57BL/6 de 3 meses fueron inyectados 2 o 3 veces con 250 µl/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena. Los ratones fueron sacrificados 21 días post primera inmunización y se tomaron muestras de sangre y el bazo para posteriores análisis.

### 4.3. Resultados y Discusión

#### 4.3.1. Evaluación de la eficacia adyuvante de CpG-ODN vehiculizado en coageles de ASC16

Con el objetivo de evaluar la actividad adyuvante de CpG-ODN formulado en los coageles, los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea a los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN, OVA/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Se empleó CpG-ODN (PS) a una dosis de 75 µg/animal y en el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvieron muestras de plasma y de bazo.

Según los resultados obtenidos observamos que OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce mayores títulos de anticuerpo anti-OVA de tipo IgG, IgG1 (asociada a una respuesta de tipo Th2) e IgG2a (asociada a una respuesta de tipo Th1) comparada con OVA/CpG-ODN sólo (**figura 4.2.A.**). La **figura 4.2.B.** muestra la relación IgG2a/IgG1. No se encontraron diferencias significativas en este cociente entre los diferentes grupos experimentales, indicando que la vehiculización de CpG-ODN en los coageles no cambia el isotipo de la respuesta de CpG-ODN.

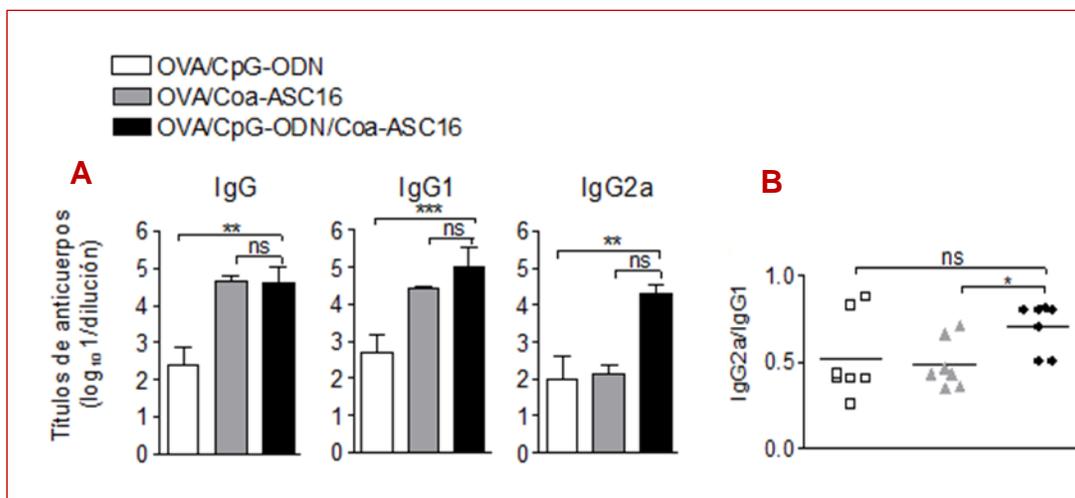


Figura 4.2. Coa-ASC16 mejora la actividad adyuvante de CpG-ODN.

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/ratón. Los ratones fueron sacrificados 21 días post primera inmunización y se tomaron muestras de sangre para posteriores análisis. A) Títulos de IgG, IgG1 e IgG2a en muestras de plasma. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns: no significativo. B) Relación IgG2a/IgG1. Cada punto de datos representa un animal individual y los valores medios se indican mediante una línea horizontal.

Los esplenocitos de los ratones inmunizados fueron re-estimulados *ex vivo* con OVA para medir la producción de citoquinas, un parámetro indicativo del desarrollo de la respuesta inmune celular específica de OVA. Como se observa en la **figura 4.3.**, los esplenocitos de los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y cultivados con OVA producen niveles significativamente mayores de IL-17 e INF- $\gamma$  comparados con los obtenidos en los otros dos grupos tratamiento.

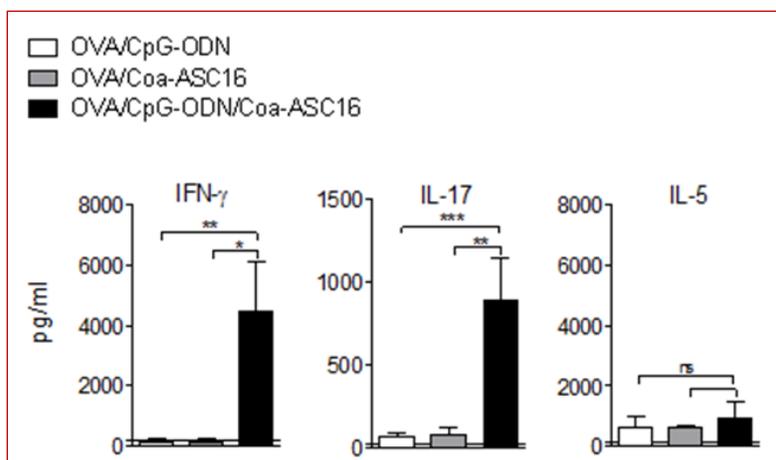


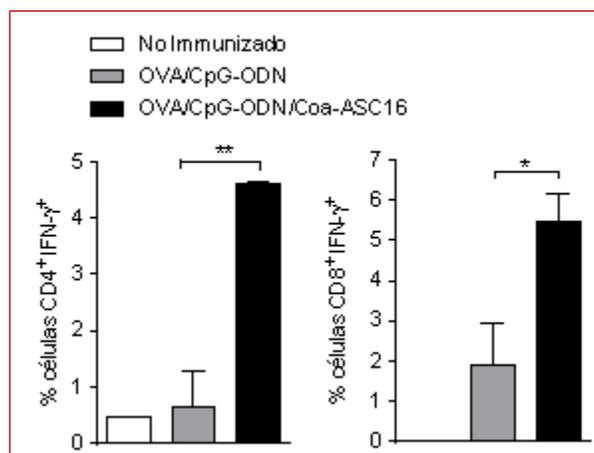
Figura 4.3. Citoquinas secretadas en respuesta a OVA.

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/ratón. Los ratones fueron sacrificados 21 días post primera inmunización y se tomaron los bazo para posteriores análisis. La producción de citoquinas anti OVA se midieron en suspensiones de células de bazo colocadas en cultivo con medio u OVA por 72 horas (100  $\mu$ g/ml,  $1 \times 10^6$  células/pocillo) y se determinaron por la técnica de ELISA. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). La línea continua representa el límite de detección del ensayo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns: no significativo.

Como se mostró previamente en la **figura 4.2.** los animales inmunizados con OVA/Coa-ASC16 y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 generaron similares títulos de anticuerpos IgG e IgG1 ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 promovieron mayores títulos de IgG2a y concentraciones mayores de INF- $\gamma$  e IL-17; todos propios de una respuesta Th1 y Th17. Este tipo de respuesta es crucial para la inducción de una respuesta inmune protectora contra una amplia variedad de patógenos, sin embargo, los adyuvantes de vacunas aprobados en humanos son pobres promotores de estas respuestas [Kumar y cols., 2013]. De esta manera, nuestra formulación en estudio constituye una estrategia interesante en el desarrollo de vacunas para diferentes patógenos y cáncer. Por otra parte, no se encontraron diferencias en la producción de IL-5 entre los distintos grupos (**fig. 4.3.**) mientras que la concentración de IL-4 para todos los grupos fue próxima al límite de detección en este ensayo y por ello no se presentan.

Con el objeto de evaluar el tipo de linfocitos T que produce INF- $\gamma$  en las células del bazo, se realizó una tinción intracelular de INF- $\gamma$  de esplenocitos. Tal como muestra la

**figura 4.4.**, las células de bazo de ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentan un mayor porcentaje de células T CD4 y CD8 INF- $\gamma$ + comparado los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN, lo que comprueba que Coa-ASC16 contribuye a la inducción de la respuesta de las células T.



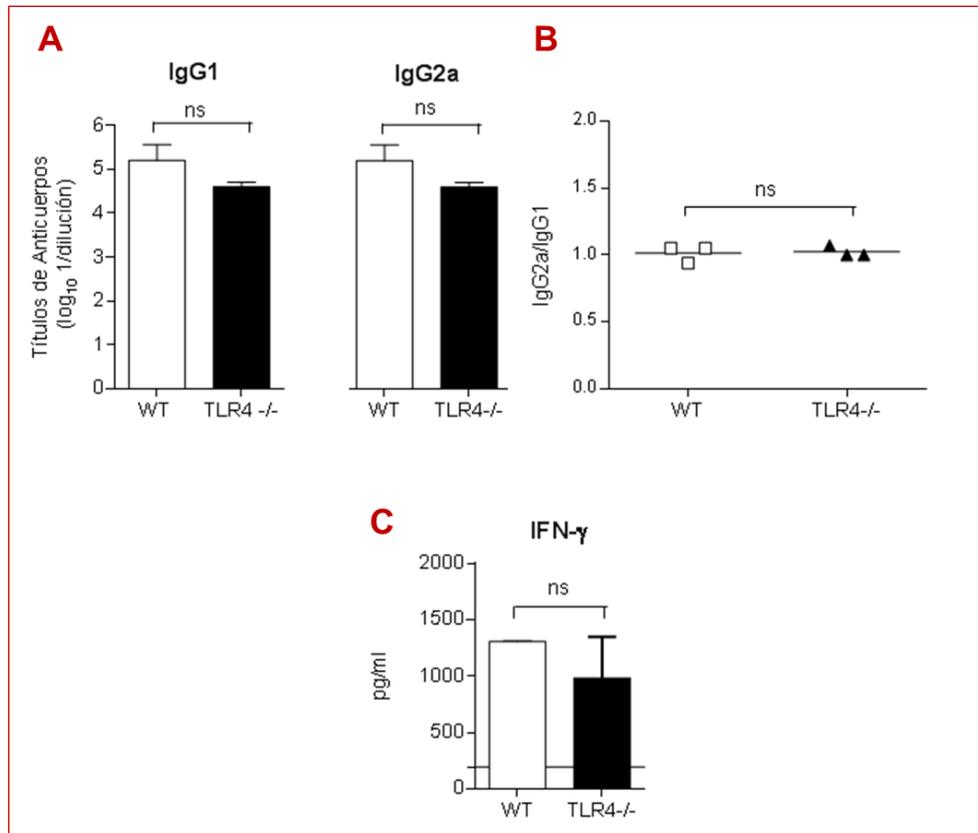
**Figura 4.4. Producción de IFN- $\gamma$ .**

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/animal. Los ratones fueron sacrificados 21 días post primera inmunización y se tomaron los bazos para posteriores análisis. El gráfico representa el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que produjeron IFN- $\gamma$  determinado por la técnica de FACS intracelular. Los datos se calculan basándose en el control de isotipo y restando el porcentaje de células IFN- $\gamma$  positivo de cultivos sin OVA. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01.

Posteriormente, se realizaron los mismos estudios pero empleando ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Estos fueron usados a fin de descartar la posibilidad de que trazas de endotoxinas en OVA, CpG-ODN u Coa-ASC16 puedan ser responsables del efecto potenciador de la respuesta inmune. En este punto cabe recordar que los TLRs (receptores tipo Toll-like) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a partir de allí inician ciertas señales de transducción que activan los genes de la respuesta inmune. Puntualmente, el TLR4 está involucrado en el reconocimiento de LPS de bacterias Gram (-) y ácidos lipoteitoicos presentes en bacterias Gram (+).

Como se observa, la respuesta humoral y celular específica para OVA fue similar en ambos tipos de ratones, lo que permite descartar la posible contaminación con

endotoxinas (**fig. 4.5. A., B. y C.**). Estos resultados indican que esta nueva estrategia de formulación de adyuvantes es lo suficientemente fuerte para generar una respuesta inmune de anticuerpos y de células T específica y trabaja de manera independiente a la activación de TLR4. Asimismo, la formulación de CpG-ODN en Coa-ASC16 aumenta la magnitud pero no cambia el perfil de la respuesta Th1 típico de CpG-ODN.

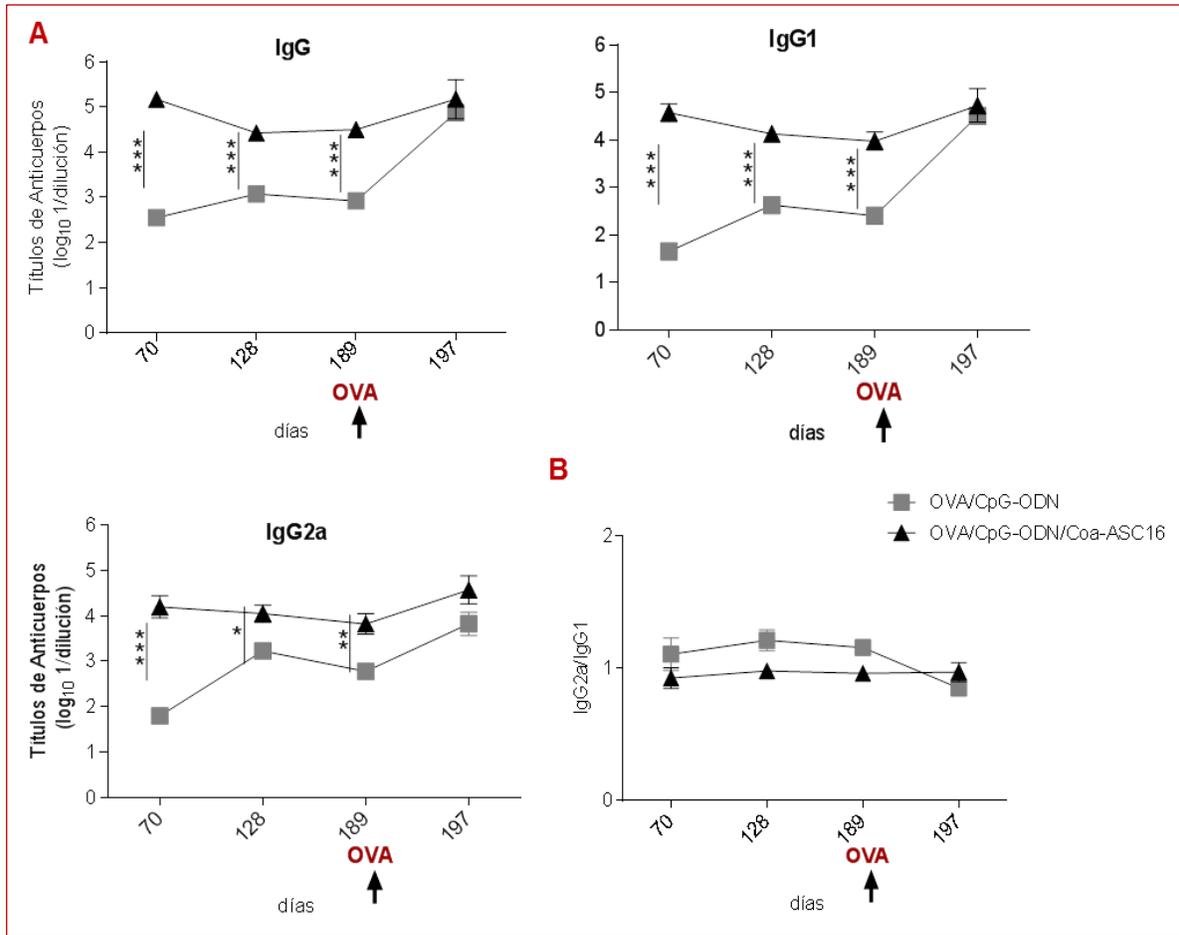


**Figura 4.5.** La formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 tiene la misma actividad adyuvante en ratones TLR4<sup>-/-</sup> y en ratones sin modificación genética.

Ratones hembras BALB/c y TLR4<sup>-/-</sup> de 3 meses fueron inyectados los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/animal. Los ratones fueron sacrificados 21 días post primera inmunización y se tomaron muestras de sangre y el bazo para posteriores análisis. A) Títulos de IgG1 e IgG2a específicos para OVA. B) Relación IgG2a/IgG1. Cada punto representa un animal y los valores promedio se indican con una línea horizontal. C) Producción de INF- $\gamma$  específico para OVA de la suspensión de células de bazo ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) incubadas con medio u OVA por 72 horas (100  $\mu$ g/ml) y medida empleando la técnica de ELISA. La línea continua representa el límite de detección del ensayo. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). ns: no significativo.

#### **4.3.2. Persistencia de la respuesta inmune en el tiempo: respuesta inmune de memoria**

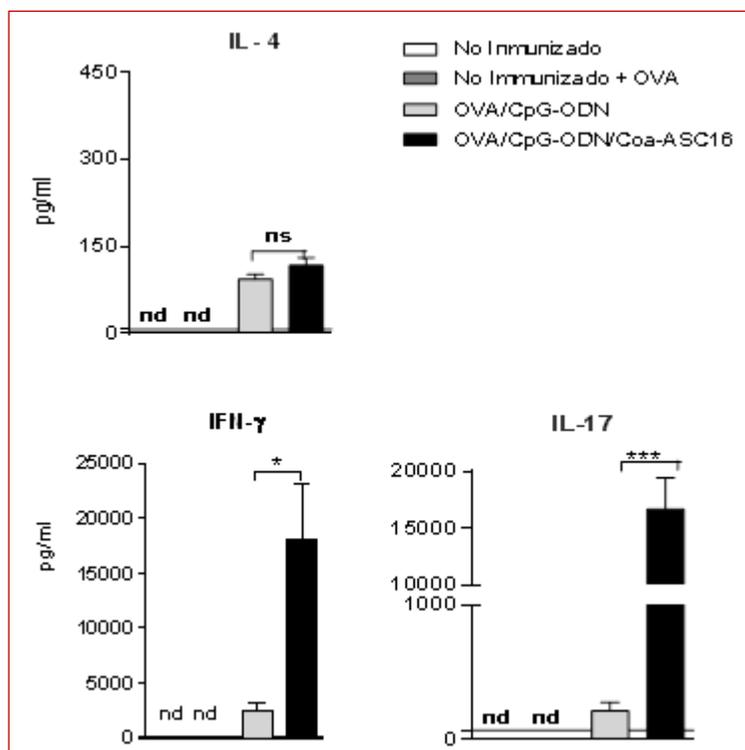
Con la finalidad de evaluar la persistencia de la respuesta inmune específica inducida, los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea a los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y fueron luego re-estimulados con OVA por vía intraperitoneal en el día 190 post la primera inmunización. Las muestras de plasma fueron recolectadas a diferentes tiempos y los bazos fueron obtenidos el día 197. Como se observa en la **fig. 4.6.A.**, ambos grupos mantuvieron la respuesta humoral específica de OVA hasta por lo menos seis meses. No obstante, antes de la re-estimulación, los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 siempre presentaron títulos significativamente mayores de IgG, IgG1, IgG2a anti OVA comparados al grupo OVA/CpG-ODN. Luego, en el día 190, los animales fueron desafiados con una inyección intraperitoneal de OVA para simular un nuevo encuentro con el antígeno y evaluar de esta manera la eficacia de la respuesta inmune desarrollada. Una semana después, en el día 197, la cantidad de IgG, IgG1 e IgG2a anti OVA fueron similares en ambos grupos y no hubo diferencias el cociente IgG2a/IgG1 (**figura 4.6.B.**).



**Figura 4.6.** La potenciación de la respuesta inmune inducida por Coa-ASC16 se mantiene en el tiempo.

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/animal. Los ratones fueron sacrificados al día 197 post primera inmunización y se tomaron muestras de sangre para posteriores análisis. A) La producción de anticuerpos específicos para OVA en función del tiempo. Los títulos de IgG, IgG1, IgG2a se midieron en los días 70, 128, 189 y 197 luego de la primera inmunización. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. B) Relación IgG2a/IgG1.

Por otra parte, los esplenocitos obtenidos el día 197 de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 previamente desafiados con OVA en el 190, produjeron mayor cantidad de IL-17 e INF- $\gamma$  específicos para OVA que el grupo inmunizado con OVA/CpG-ODN y no hubo diferencias en la producción de IL-4 entre ambos grupos (**figura 4.7.**).



**Figura 4.7. La potenciación de la respuesta inmune inducida por Coa-ASC16 se mantiene en el tiempo.**

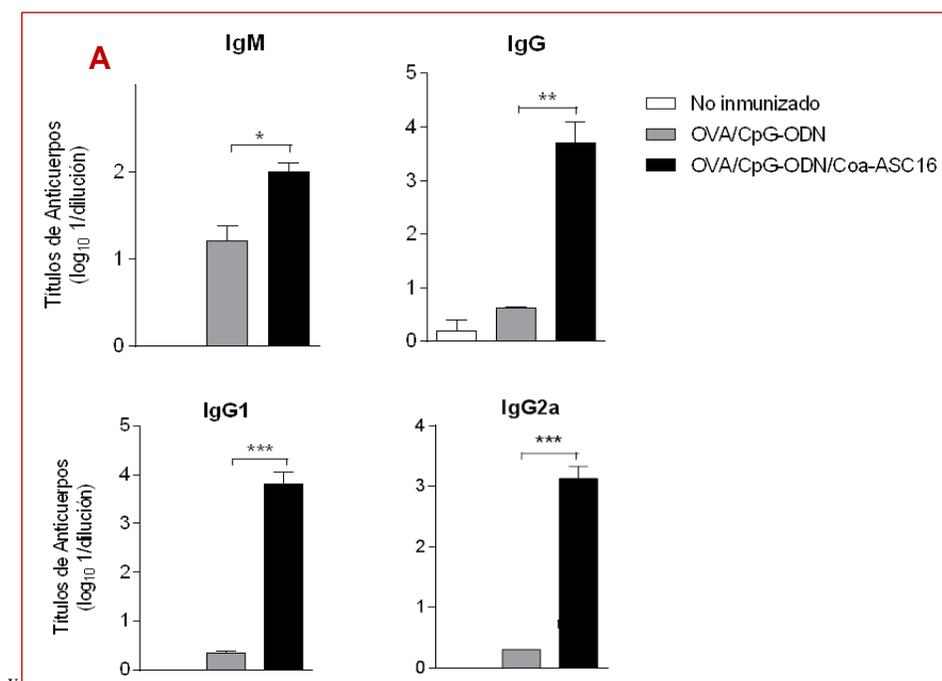
Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados a los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/animal. Los ratones fueron sacrificados al día 197 post primera inmunización y se tomaron los bazo para posteriores análisis. Se determinaron las citoquinas específicas para OVA de la suspensión de células de bazo ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) incubadas con medio u OVA (100  $\mu$ g/ml) por 72 horas y medidas empleando la técnica de ELISA. La línea continua representa el límite de detección del ensayo. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento ( $n=3-4$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; nd: no detectado; ns: no significativo.

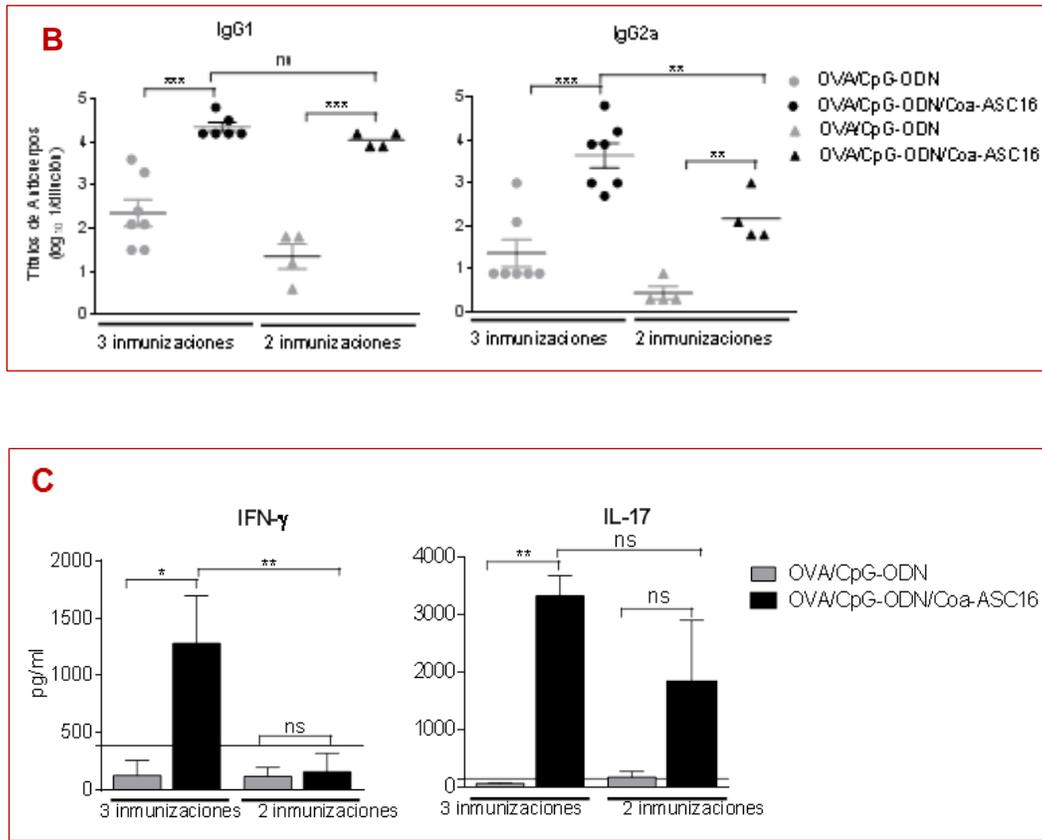
Estos resultados indican que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 facilita la generación de una respuesta inmune de memoria, principalmente inmunidad celular, más robusta que la obtenida para la forma soluble CpG-ODN una característica deseable en el desarrollo de una vacuna. El objetivo de la vacunación es generar una memoria inmunológica de larga duración que medie la protección del huésped frente a la infección [Sallusto y cols., 2010]. Una característica distintiva de la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es la capacidad de potenciar la respuesta Th1 y Th17 y lograr que esta última permanezca por un tiempo considerable incluso después del desafío con el antígeno

específico. Estos parámetros fueron evaluados seis meses y medio luego de la primera inmunización, lo que equivale aproximadamente a una tercera parte de la vida promedio de un ratón. Todos estos resultados permiten considerar a esta formulación como una estrategia interesante para el desarrollo de una nueva vacuna principalmente para el tratamiento de los patógenos intracelulares, cáncer y pacientes específicos, por ejemplo, en la población de edad avanzada.

### 4.3.3. Evaluación de la respuesta inmune empleando diferentes esquemas de inmunización

Para evaluar la potencia de CpG-ODN/Coa-ASC16 como adyuvante se decidió utilizar un esquema de inmunización más corto. Para ello, se inmunizaron ratones de manera subcutánea en los días 0 y 7 con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. En el día 13 post primera inmunización, los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron mayores títulos de IgM, IgG, IgG1, e IgG2a anti OVA que el otro grupo (**figura 4.8.A.**). Estos resultados demuestran que la vehiculización en Coa-ASC16 permite alcanzar títulos de inmunoglobulinas más rápido que OVA/CpG-ODN.





**Figura 4.8. Evaluación de la actividad adyuvante de CpG-ODN formulado en Coa-ASC16 empleando diferentes esquemas de inmunización.**

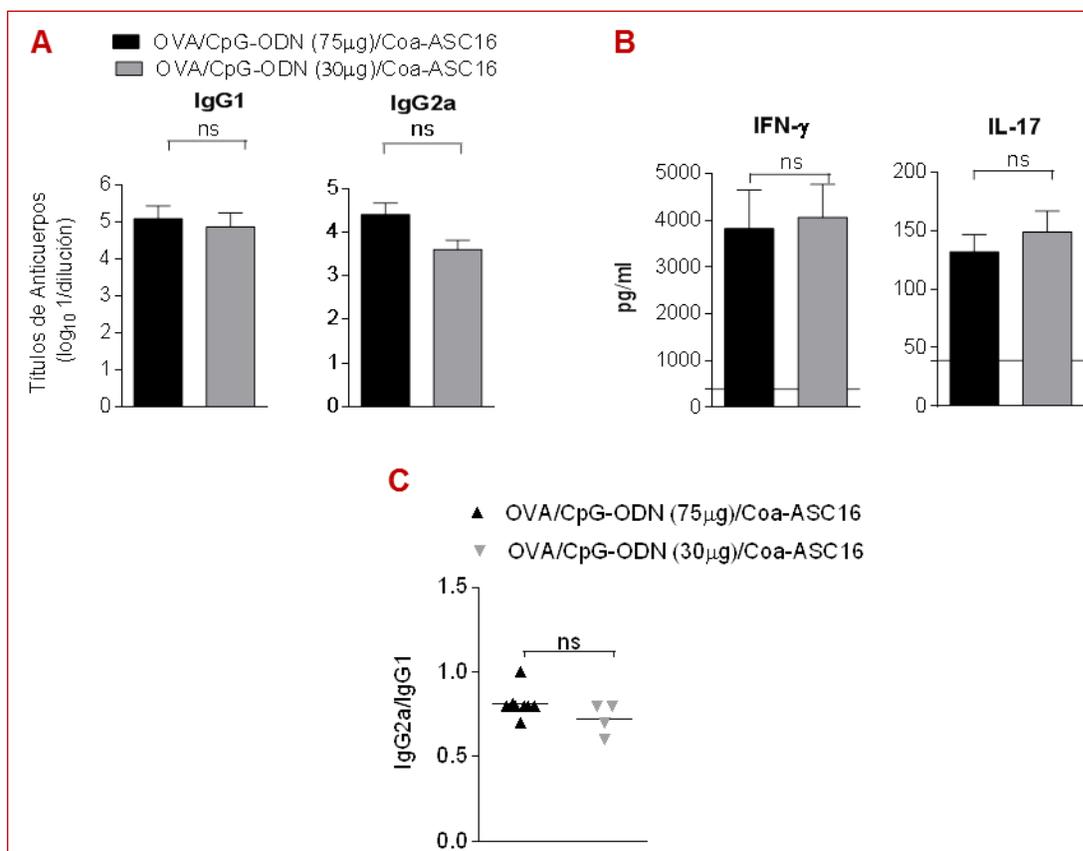
Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados a los días 0 y 7 ó 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue 75  $\mu$ g/animal. Títulos de IgM, IgG, IgG1 e IgG2a medidas al día 13 (A) o 21 (B) post primera inmunización. C) Se determinó la producción de citoquinas específica para OVA los 21 días post primera inmunización en suspensiones de células de bazo cultivadas con medio u OVA (100  $\mu$ g/ml,  $1 \times 10^6$  células/pocillo) durante 72 horas y se midió por técnica de ELISA. La línea continua representa el límite de detección del ensayo. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). La línea continua representa el límite de detección del ensayo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns: no significativo.

A continuación, se comparó la eficacia de la respuesta inmune luego de dos inmunizaciones comparada con tres. Como se muestra en la **figura 4.8.B.**, para ambos esquemas de inmunización la respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti OVA fueron mayores en los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 comparada al otro grupo aunque el título de IgG2a fue menor cuando los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 recibieron dos en lugar de tres inmunizaciones. No obstante la diferencia

con respecto al grupo OVA/CpG-ODN continua siendo significativa repitiéndose el mismo fenómeno observado anteriormente (**fig. 4.2.A.**). En síntesis, el aumento de la respuesta inmune humoral obtenida por Coa-ASC16 permanece aunque se disminuya el número de inmunizaciones. Por otra parte, sólo dos inmunizaciones con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 no fueron suficientes para alcanzar una respuesta celular específica para OVA aceptable. Además, tres inmunizaciones indujeron mayores concentraciones de IFN- $\gamma$  y similares cantidades de IL-17 en respuesta a OVA (**figura 4.8.C.**).

Finalmente, y una vez comprobado que Coa-ASC16 aumenta la actividad adyuvante de CpG-ODN, se evaluó el uso de dosis inferiores de CpG-ODN para la inducción de una respuesta inmune antígeno-específica. Con este objetivo, los ratones recibieron tres inmunizaciones subcutáneas, (en los días 0, 7 y 14) con OVA/CpG-ODN (75  $\mu$ g)/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN (30  $\mu$ g)/Coa-ASC16. Las respuestas inmune específicas para OVA tanto humoral como celular fueron evaluadas en el día 21 post la primera inmunización. Ambas dosis de CpG-ODN (75 $\mu$ g y 30 $\mu$ g) formulado en los coageles indujeron títulos equivalentes de IgG1 e IgG2a y similares cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-17 (**figura 4.9.A y 4.9.B**) Además, la relación IgG2a/IgG1 no muestra diferencias significativas entre las dos dosis de CpG-ODN (**figura 4.9.C.**). Estos resultados permiten confirmar nuevamente que Coa-ASC16 aumenta notoriamente la actividad adyuvante de CpG-ODN. Adicionalmente, la liberación sostenida del adyuvante sumada al posible efecto depósito (depot, en inglés) de esta formulación semisólida descrito en el capítulo anterior, podrían contribuir a que CpG-ODN permanezca por más tiempo en el sitio de inyección, es decir en el tejido subcutáneo, y/o en los tejidos donde se inicia la respuesta inmune (ganglios linfáticos drenantes).

Aunque el costo económico de CpG-ODN no es el factor limitante en el desarrollo de vacunas humanas, sí lo es en el desarrollo a gran escala de vacunas en animales. Por esta razón, la reducción en la dosis de adyuvante es una ventaja adicional. El uso de dosis menores de adyuvante y el aumento en la velocidad de la respuesta inicial podría ser crítica en el tratamiento por ejemplo de enfermedades pandémicas.



**Figura 4.9.** Evaluación de la capacidad adyuvante de CpG-ODN formulado en Coa-ASC16 usando diferentes dosis.

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados a los días 0, 7 y 14 con 250 μl/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue de 30 o 75 μg/animal. A) La respuesta inmune humoral específica para OVA se midió en el día 21 después de la primera inmunización. B) Se determinó la producción de citoquinas específica de OVA, 21 días post primera inmunización en suspensiones de células de bazo cultivadas con medio u OVA (100 μg/ml, 1x10<sup>6</sup> células/pocillo) durante 72 horas y se midió por técnica de ELISA. Los datos se presentan como el promedio ± DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento (n=3-4). La línea continua representa el límite de detección del ensayo. C) Relación IgG2a/IgG1. Los valores medios se indican mediante una línea horizontal. ns: no significativo.

#### 4.3.4. Evaluación de la respuesta inflamatoria en el sitio de inyección

De acuerdo a los resultados previamente informados, la formulación de CpG-ODN/Coa-ASC16 ha evidenciado ser un potente adyuvante considerando la inducción de la respuesta inmune de tipo Th1 y Th17. Con el fin de estudiar el mecanismo de acción que estaría involucrado en la mejora de la respuesta inmune específica, hemos llevado a cabo diversos ensayos orientados a corroborar si Coa-ASC16 interactúa con el sistema

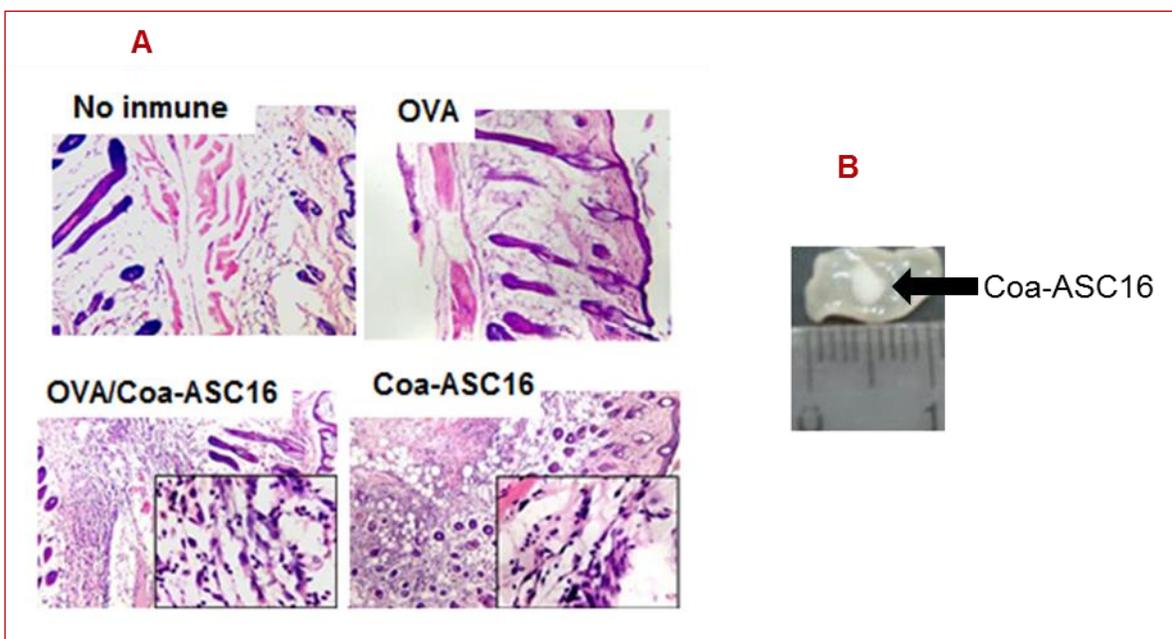
inmune del huésped en el sitio de inyección. En primer lugar, ratones de la cepa BALB/c fueron afeitados 7 días antes del comienzo del experimento. En el día 7, a cada ratón se le inyectó por vía subcutánea OVA, Coa-ASC16, OVA/Coa-ASC16, OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 en los 5 sitios de inyección como indica la sección de materiales y métodos. Cuarenta y tres horas más tarde, se obtuvieron muestras de plasma y del tejido del sitio de inyección. El examen histológico del tejido de los ratones inyectados con OVA mostró escaso infiltrado celular. En contraste, las muestras de tejido obtenidas a partir de ratones inyectados con Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16 presentan un reclutamiento celular abundante. Esta infiltración celular se compone principalmente de leucocitos neutrófilos en la dermis y el tejido subcutáneo (**figura 4.10.A., Tabla 4.1.**).

Tabla 4.1. Coa-ASC16 induce una respuesta inflamatoria en el sitio de inyección.

Grupo Experimental	Reclutamiento celular	Composición celular
No inmunizado	ausencia	
OVA	+	
Coa-ASC16	++++	
OVA/Coa-ASC16	++++	
OVA/CpG-ODN	+	
OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (co-formulación)	+++ /++++	
OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (co-inyección)	++ /+++	



Ratones de la cepa BALB/c fueron afeitados 7 días antes del comienzo del experimento. Cada ratón fue inyectado por vía subcutánea con OVA, Coa-ASC16, OVA/Coa-ASC16, OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN+Coa-ASC16 en los 5 sitios indicados en la sección 4.2.2. (La dosis de CpG-ODN (PS) fue 75µg/animal). Luego de 43 horas se tomaron muestras de la piel del sitio de inyección y procesadas para análisis histológico. Los cortes fueron observados con un microscopio Star Zeiss y los campos representativos fueron fotografiados con una cámara digital (Moticam 2000). La tabla presenta la evaluación cualitativa y conteo diferencial del infiltrado celular en el sitio de inyección de cortes tenidos con hematoxilina y eosina. Definimos como "ausente" al reclutamiento celular observado en los ratones no inmunizados, correspondiente a la población celular normal residente, (+) escaso, (++) moderado, (+++) abundante y (++++) muy abundante.



**Figura 4.10.** Coa-ASC16 induce una respuesta inflamatoria en el sitio de inyección.

Ratones de la cepa BALB/c fueron afeitados 7 días antes del comienzo del experimento. Cada ratón fue inyectado por vía subcutánea con OVA, Coa-ASC16, OVA/Coa-ASC16, OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN+Coa-ASC16 en los 5 sitios indicados en la sección 4.2.2. (la dosis de CpG-ODN (PS) fue 75µg/animal). Luego de 43 horas se tomaron muestras de la piel del sitio de inyección y procesadas para análisis histológico. Los cortes fueron observados con un microscopio Star Zeiss y los campos representativos fueron fotografiados con una cámara digital (Moticam 2000). A) Microfotografía representativa del sitio de inyección. Imágenes en baja magnificación (40x) y alta magnificación (400x). B) Vista macroscópica del sitio de inyección de los ratones inyectados con Coa-ASC16. La punta de la flecha indica la presencia de Coa-ASC16. Los resultados mostrados son de dos experimentos independientes, con 3-4 ratones/grupo de tratamiento en cada experimento.

En la **figura 4.10.B.** se muestra una vista macroscópica del sitio de inyección de ratones inmunizados con Coa-ASC16. A fin de analizar los efectos locales y sistémicos de Coa-ASC16, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de citoquinas pro-inflamatorias luego de 43 horas después de la inyección subcutánea. No se detectó IL-6 ni TNF- $\alpha$  en ninguno de los grupos de estudio, lo que indica que hasta ese momento no hubo inflamación sistémica en respuesta a la inyección local ni se observó ningún efecto distal a la zona de la inyección (datos no presentados). En el grupo OVA/CpG-ODN el infiltrado celular estaba compuesto principalmente por células mononucleares. Esta observación coincide también con otros resultados previamente reportados por Mosca y cols., (2008) y Caproni y cols., (2012). Por otra parte, hubo un aumento en el reclutamiento celular en el

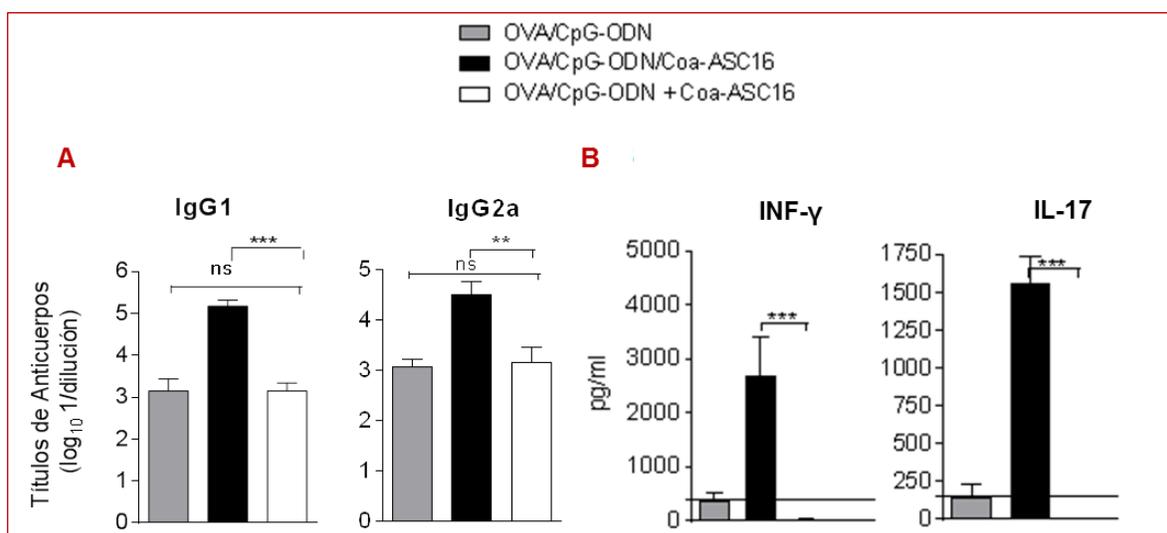
grupo OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en comparación con el grupo OVA/CpG-ODN (**tabla 4.1.**). Además, Coa-ASC16 altera la composición del influjo celular porque induce un aumento del porcentaje de neutrófilos (**tabla 4.1.**, observar OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y OVA/CpG-ODN). Este resultado demuestra que la respuesta en el sitio de inyección es conducida principalmente por Coa-ASC16 y no por CpG-ODN. Cuando Coa-ASC16 fue usado para formular OVA/CpG-ODN, la respuesta inflamatoria inducida por OVA/CpG-ODN se modifica y esto pudo determinarse de manera cualitativa (**tabla 4.1.**). Dado que Coa-ASC16 se administró sin antígeno, la activación de las células del sistema inmune innato es antígeno-independiente y podría estar actuando antes que las células dendríticas. Postulamos que el ambiente inmunocompetente local creado por Coa-ASC16 podría impactar significativamente en la respuesta inmune específica final de OVA.

Esta es una característica destacable de Coa-ASC16 ya que el establecimiento de este ambiente local (y que se mantuvo 43 horas luego de la inyección) permitiría disminuir al mínimo la incidencia de los riesgos asociados a las vacunas [Bourquin y cols., 2008; Didierlaurent y cols., 2009; Morel y cols., 2011]. Sin embargo, nuestros estudios son insuficientes para construir una conexión entre la inflamación y el efecto potenciador de CpG-ODN inducida por Coa-ASC16.

#### **4.3.5. Comparación: co-formulación/co-inyección**

Basados en los resultados obtenidos, nos interesamos en estudiar si el efecto potenciador de Coa-ASC16 en la actividad adyuvante de CpG-ODN podría reflejar la activación de un proceso biológico complementario dado que ambas moléculas han demostrado una cierta actividad inflamatoria independiente o bien si se debía a un efecto sinérgico y/o de protección de CpG-ODN incorporado en el coagel. Para ello, se llevó a cabo un estudio comparativo de la respuesta inmune específica inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (co-formulación) y OVA/CpG-ODN más Coa-ASC16 (co-inyección) luego de las inmunizaciones por vía subcutánea en los días 0,7 y 14. En el día 21 post primera inmunización se obtuvieron los plasmas y los bazos. En los ratones inmunizados con el régimen de la co-inyección, Coa-ASC16 fue administrado en el mismo sitio de inyección que la solución de OVA/CpG-ODN usando la misma aguja sin quitarla del sitio y cambiando

sólo la jeringa entre las dos inyecciones. La administración de OVA/CpG-ODN más Coa-ASC16 (co-inyección) resultó en una respuesta humoral y celular antígeno específica similar a la obtenida con la solución de OVA/CpG-ODN, lo que significa que bajo estas condiciones Coa-ASC16 no incrementa la actividad adyuvante de CpG-ODN (**fig. 4.11. A. y B.**).



**Figura 4.11. Co-formulación vs. Co-inyección.**

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados a los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue de 75  $\mu$ g/animal. A) La respuesta inmune humoral específica para OVA se midió en el día 21 después de la primera inmunización. B) Se determinó la producción de citoquinas específica de OVA, 21 días post primera inmunización en suspensiones de células de bazo cultivadas con medio u OVA (100  $\mu$ g/ml,  $1 \times 10^6$  células/pocillo) durante 72 horas y se midió por técnica de ELISA. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento ( $n=3-4$ ). La línea continua representa el límite de detección del ensayo. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: no significativo.

Por otra parte, el análisis de los tejidos de ratones en el sitio de inyección luego de la co-inyección muestra diferencias en la reacción local respecto a aquellos que recibieron la co-formulación. En el primero, se observa un patrón mixto entre CpG-ODN sólo y Coa-ASC16 sólo (**tabla 4.1.**). Estos resultados indican la necesidad de la formulación completa para obtener un incremento en la actividad adyuvante de CpG-ODN; en otras palabras, Coa-ASC16 parecería no ayudar en la actividad adyuvante de CpG-ODN cuando se administra de manera separada.

#### 4.3.6. Aplicación del sistema a un antígeno vacunal: Toxoide Tetánico

Un aspecto importante en el desarrollo de sistemas portadores y adyuvantes de vacunas es evaluar la respuesta celular y de anticuerpos frente a antígenos de diferente origen como viral (Influenza), proteico (péptidos virales) y bacterial (toxoides tetánicos). Con respecto a este último, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha indicado como prioritario el desarrollo y la mejora de las estrategias de inmunización. Cabe recordar que en la inducción de la inmunidad sistémica, los antígenos particulados son más eficaces que los antígenos solubles, posiblemente a causa de la endocitosis más eficiente de los primeros por el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

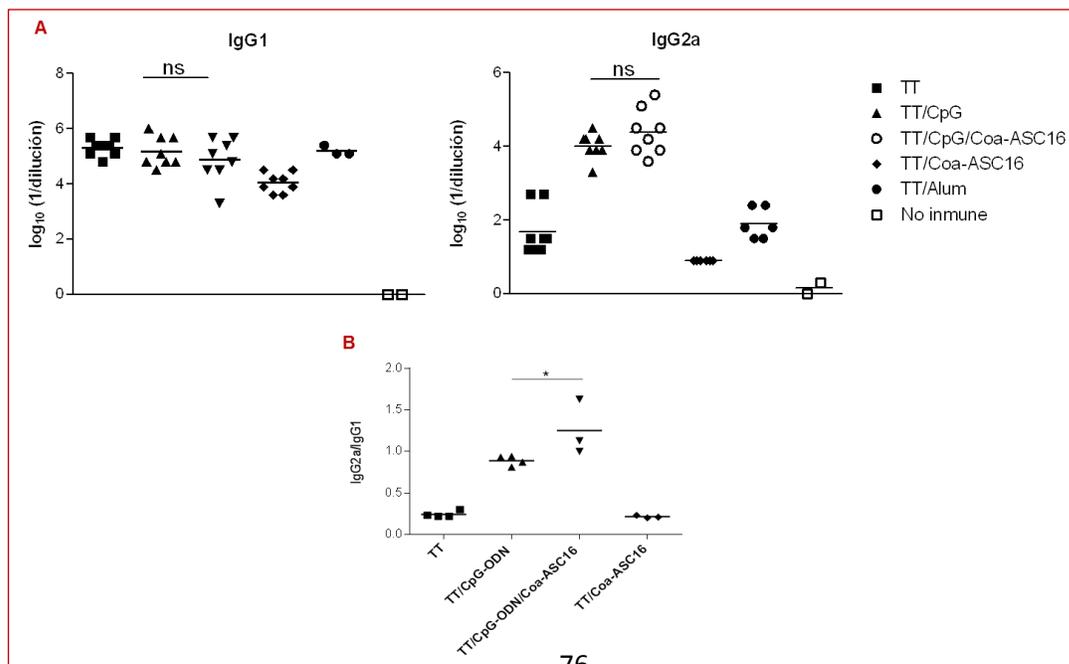
Como se expuso anteriormente, los coageles han permitido el cargado de CpG-ODN, su liberación modulada y extendida en el tiempo como así también una eficaz presentación del antígeno modelo a las CPA. En este contexto, nos abocamos a realizar algunos estudios teniendo en cuenta la hipótesis de que la vehiculización del adyuvante junto al antígeno en Coa-ASC16 podría aumentar la inmunogenicidad del sistema permitiendo obtener una respuesta inmune fuerte incluso con bajas dosis de adyuvante.

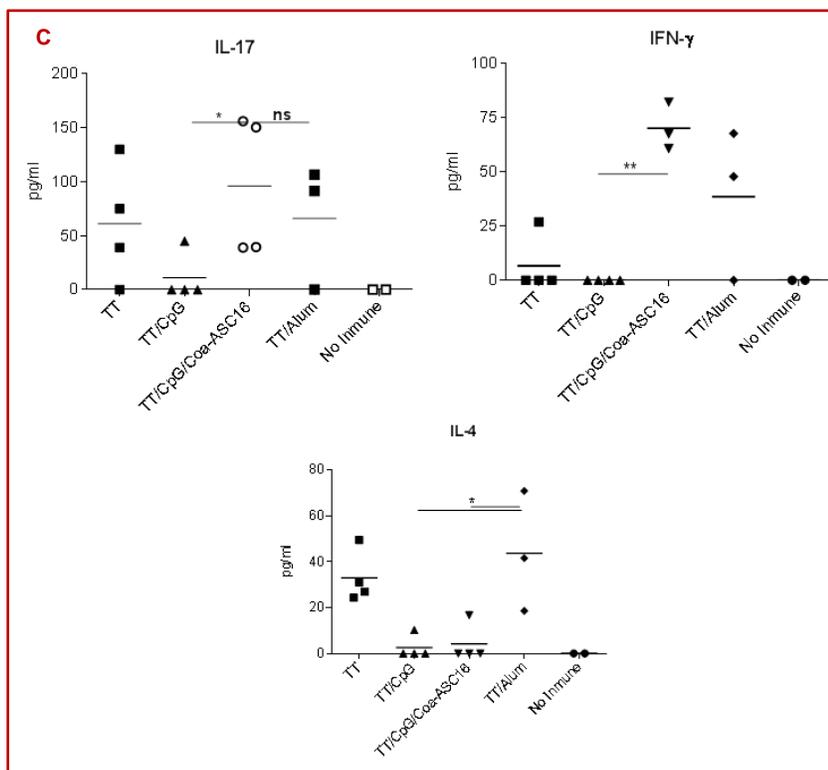
De este modo, el objetivo de esta etapa fue constatar si los efectos de potenciación de la respuesta inmune encontrada para Coa-ASC16 cuando se lo administraba junto al adyuvante (CpG-ODN) y un antígeno modelo, se mantenían cuando se reemplazara por un antígeno vacunal, el toxoide tetánico, simulando de esta manera la formulación de una vacuna. Siguiendo el mismo esquema de inmunización descrito anteriormente para OVA, se evaluó la respuesta celular y humoral obtenida tras la administración en ratones BALB/c por vía subcutánea de TT (antígeno soluble), TT/CpG-ODN, TT/CpG-ODN/Coa-ASC16 y TT/Coa-ASC16 (antígeno particulado). Como control positivo se empleó la vacuna aprobada para tétanos (TT adsorbido en hidróxido de aluminio). Como se presenta en la **figura 4.12.A.**, los títulos de anticuerpo IgG1 para TT y TT/Aluminio son elevados, lo cual es coincidente con el hecho de que tanto el antígeno aislado como el antígeno combinado con aluminio favorecen el desarrollo de una respuesta inmunológica de tipo Th2.

Por otra parte, los títulos de IgG2a obtenidos para la solución de toxoide (TT) son menores comparativamente a la solución de adyuvante y toxoide (CpG/TT), y TT/CpG-

ODN/Coa-ASC16. Esto es consistente con el hecho de que CpG-ODN favorece el desarrollo de un perfil tipo Th1. No obstante, no se observan diferencias entre estos dos últimos grupos como cabría de esperar si se repitiera el fenómeno encontrado para OVA. Aparentemente la vehiculización de TT/CpG-ODN en Coa-ASC16 no aumenta la actividad adyuvante de CpG-ODN, tal como se observó en los estudios donde se utilizó OVA como antígeno. De igual modo, no se observan diferencias significativas en los títulos de anticuerpos obtenidos para el antígeno (TT) en solución o cuando se vehiculiza en los coageles (particulado).

Si se comparan los títulos de IgG2a obtenido para OVA/CpG-ODN (**figura 4.2.A.**) y TT/CpG-ODN (**figura 4.12.A.**), puede verse que esta última combinación es más eficiente en la inducción de este anticuerpo y por ende, luego no se observan diferencias significativas cuando se vehiculiza en Coa-ASC16. Por lo tanto, no puede afirmarse que Coa-ASC16 no actúe como potenciador de la respuesta inmune inducida por CpG-ODN sino que en este caso particular, la combinación antígeno/adyuvante ya es eficiente. No obstante, al realizar el cociente IgG2a/IgG1 (**fig. 4.12.B.**) se observa una diferencia significativa entre los grupos TT/CpG-ODN/Coa-ASC16 y TT/CpG-ODN, lo que indica que no sólo se favorece el perfil Th1 (dado que el cociente es  $>1$ ) sino que en el primer grupo obtenemos una potenciación de la respuesta que podría atribuirse a Coa-ASC16.





**Figura 4.12. Evaluación de la respuesta de anticuerpos y citoquinas con un antígeno vacunal: Toxide Tetánico**

Ratones hembras BALB/c de 3 meses fueron inyectados a los días 0, 7 y 14 con 250  $\mu$ l/ratón/dosis por vía subcutánea. Los controles fueron inyectados con una solución de dextrosa estéril y apirógena y la dosis de CpG-ODN (PS) empleada fue de 75  $\mu$ g/animal. A) La respuesta inmune humoral específica para TT se midió en el día 21 después de la primera inmunización. B) Relación IgG2a/IgG1. Los valores medios se indican mediante una línea horizontal. C) Se determinó la producción de citoquinas específica de TT 21 días post primera inmunización en suspensiones de células de bazo cultivadas con medio o TT (100  $\mu$ g/ml,  $1 \times 10^6$  células/pocillo) durante 72 horas y se midió por técnica de ELISA. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DS de los valores individuales (3-4 ratones/grupo de tratamiento) y son representativos de un experimento ( $n=2$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns: no significativo.

La **figura 4.12.C.** presenta la respuesta de citoquinas. Teniendo en cuenta que la presencia de IFN- $\gamma$  e IL-17 son propias de una respuesta inmune de tipo Th1 y Th17 e IL-4 de una respuesta Th2, los resultados indican que las mayores cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-17 se encontraron en el grupo TT/CpG/ODN/Coa-ASC16. Por otra parte, es interesante resaltar que la concentración de esta última ha sido mayor en el grupo TT/CpG-ODN respecto a OVA/CpG-ODN (**figura 4.3.**). Para IL-4, los niveles detectados estuvieron próximos al límite

de cuantificación de la técnica para todos los grupos, salvo para los que recibieron sólo TT, lo cual es acorde al perfil inmunológico de este antígeno.

#### **4.4. Conclusiones del Capítulo**

Los resultados presentados en este capítulo, demuestran que los coageles formados a partir de la autoagregación del palmitato de ascorbilo no son inertes desde el punto de vista inmunológico, generando una respuesta inflamatoria local en el sitio de inyección. La vehiculización del inmunomodulador CpG-ODN en este sistema conduce al incremento de la respuesta humoral y celular específica para OVA por seis meses. Si bien nuestros estudios no permiten dilucidar completamente el mecanismo por el cual Coa-ASC16 ejercería su efecto, podrían estar involucrados más de un mecanismo tales como la generación de un ambiente adecuado de citoquinas y la formación de un depósito de adyuvante en el sitio de inyección, prolongando la duración de la acción de CpG-ODN. En cuanto a este último aspecto, hemos observado que el sinergismo del coagel es ejercido sólo cuando CpG-ODN está vehiculado dentro de la estructura y no cuando son administrados simultáneamente en el mismo sitio en forma separada.

Finalmente, el presente estudio confirma el potente efecto adyuvante de CpG-ODN cuando se combina junto a TT administrado por vía subcutánea en ratones. La inmunogenicidad del antígeno y la potencia del adyuvante no se vio sustancialmente aumentada cuando se lo vehiculizó en Coa-ASC16 lo que permite afirmar que este sistema portador es antígeno-dependiente y por lo tanto debe evaluarse para cada antígeno en particular.

## **SEGUNDA PARTE**



## **CAPITULO 5**

### **NANOCAPSULAS LIPIDICAS PARA LA VEHICULIZACION DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS: IVERMECTINA**





## Capítulo 5

# *Nanocápsulas Lipídicas para la vehiculización de fármacos antiparasitarios: Ivermectina*

### **5.1. Introducción**

Las nanocápsulas lipídicas (NCLs) se caracterizan por poseer una estructura híbrida entre las nanocápsulas poliméricas y los liposomas y sus tamaños varían entre 20 y 100 nm. Como se expuso anteriormente, el proceso de obtención se basa en la técnica de inversión de fases de una emulsión que conduce a la formación de una suspensión de nanopartículas homogéneamente dispersas. Dentro de las principales características de las NCLs puede mencionarse su excelente estabilidad física, aumento de la solubilidad y de la internalización celular del fármaco encapsulado como así también la liberación controlada y el direccionamiento sitio-específico del mismo [Heurtault y cols., 2003a,b].

Ivermectina (IVM) es un compuesto semi-sintético de amplio espectro activo contra endo y ectoparásitos utilizado en medicina veterinaria y humana (ver sección M.1. del anexo II). IVM se encuentra actualmente disponible como inyectable y formulaciones tópicas tipo *pour on* para su uso en el ganado vacuno, y en formulaciones orales para los rumiantes pequeños, perros y seres humanos. Se ha reportado que la disposición farmacocinética de IVM en diferentes especies animales puede ser afectada por el diseño de la formulación ya que el vehículo en el que se

formula este compuesto puede influir en el proceso de absorción y por consiguiente en la concentración de fármaco que alcanza el torrente sanguíneo y los tejidos blanco [Lo y cols., 1985; Lifschitz y cols., 2000]. IVM ejerce su acción endectocida contra los parásitos localizados en las diferentes capas de la piel, sitios de ubicación de parásitos artrópodos como moscas y trino, el tracto gastrointestinal (TGI) y a nivel pulmonar en ganado vacuno y ovino [Bogan y McKellar, 1988].

Luego de la introducción de la primera formulación de IVM aprobada constituida por propilenglicol/glicerol formal (60:40), se han realizado diferentes modificaciones en la formulación tendientes a prolongar la actividad endectocida de IVM, un atributo relevante en programas de control de parásitos en el ganado. Posteriormente, las formulaciones de IVM al 1 % llamadas de acción prolongada fueron esencialmente preparaciones a base de aceite que permitían una absorción lenta desde el espacio subcutáneo logrando de este modo una prolongada persistencia sistémica y en los tejidos donde se localizan los parásitos [Lifschitz y cols., 1999] en comparación con la formulación original. Más recientemente, los preparados de acción prolongada de IVM al 3,15 % se han introducido en el mercado veterinario. El comportamiento farmacocinético de estas últimas formulaciones también ha sido evaluado aunque no se han reportado grandes ventajas [Lifschitz y cols., 2006].

Según lo expuesto anteriormente, resulta atractivo el desarrollo de nuevas estrategias de formulación para optimizar el comportamiento farmacocinético de este compuesto. En este contexto, los nuevos sistemas farmacéuticos nanoparticulados han evidenciado propiedades tales como la vehiculización de fármacos liposolubles, aumento de su estabilidad, disminución de efectos adversos y vectorización de los principios activos. Este último aspecto resulta interesante en la administración parenteral de antiparasitarios, donde la liberación localizada en distintos órganos es esencial [Underwood y cols., 2012].

Por otro parte, las nanocápsulas tienen el potencial de promover el aumento de la internalización de fármacos por las células fagocíticas del sistema retículo endotelial, que se co-localizan en el sitio de infección o bien son reservorios de parásitos intracelulares. Este hecho daría lugar a una mayor eficiencia en los sitios de infección periféricos [Larabi, 2009].

En función de lo expuesto, se realizaron distintos estudios tendientes al diseño de nanocápsulas lipídicas conteniendo IVM. En el presente capítulo se detallan los resultados concernientes a la obtención, caracterización físico-química, activación del sistema del complemento y evaluación de la performance biofarmacéutica.

## **5.2. Materiales y Métodos**

Para la preparación de las NCLs se empleó el método de inversión de fases (MIF) descrito en la sección M.4. del anexo II. En este capítulo, se seleccionaron las NCLs de 50 nm de diámetro para el cargado de IVM. La conductividad se determinó durante los ciclos de calentamiento/enfriamiento entre los 35 y 91 °C con agitación magnética constante (M.5. anexo II). Las partículas obtenidas se caracterizaron en términos de tamaño medio de partícula (TMP), índice de polidispersidad (IP) y potencial z (PZ). Estas mismas propiedades se evaluaron en un periodo de 60 días para estudiar la estabilidad física a largo plazo de estos sistemas. Los detalles experimentales se encuentran en la sección M.6. del anexo II. Para confirmar los resultados anteriores, se emplearon las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) y la microscopía de fuerza atómica (MFA). Estas técnicas se describen en M.7. y M.8. respectivamente (anexo II). La cantidad total de IVM en la formulación fue determinada a partir de una alícuota de IVM-LNCs diluida en metanol. Este solvente orgánico produce la ruptura del sistema permitiendo la solubilización del fármaco. Estas muestras fueron analizadas según se indica en el apartado M.10. del anexo II empleando la técnica de HPLC descrita por De Montigny y cols. (1995). En forma adicional, se evaluó la activación del sistema de complemento (SC) y la captura por parte de macrófagos de diferentes formulaciones blanco y cargadas (ver secciones M.11. y M.12., anexo II).

El aprendizaje de la técnica y los ensayos de caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas fueron llevadas a cabo en estrecha colaboración con el Dr. Jean-Pierre Benoit y el grupo de investigación que dirige perteneciente al laboratorio INSERM U1066, Université d' Angers (Francia).

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo preliminar del comportamiento farmacocinético en ratas con el fin de estimar la biodisponibilidad de esta nueva formulación y la distribución hacia los principales tejidos de localización de los

parásitos (hígado, pulmón, pared y contenido de intestino delgado). Los detalles de los experimentos *in vivo* se abordan en la sección M.13., anexo II. Estos ensayos fueron llevados a cabo en estrecha colaboración con el Dr Adrián Lifschitz y su grupo de investigación perteneciente al Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria (UNCPBA), CIVETAN-CONICET (Tandil, Argentina).

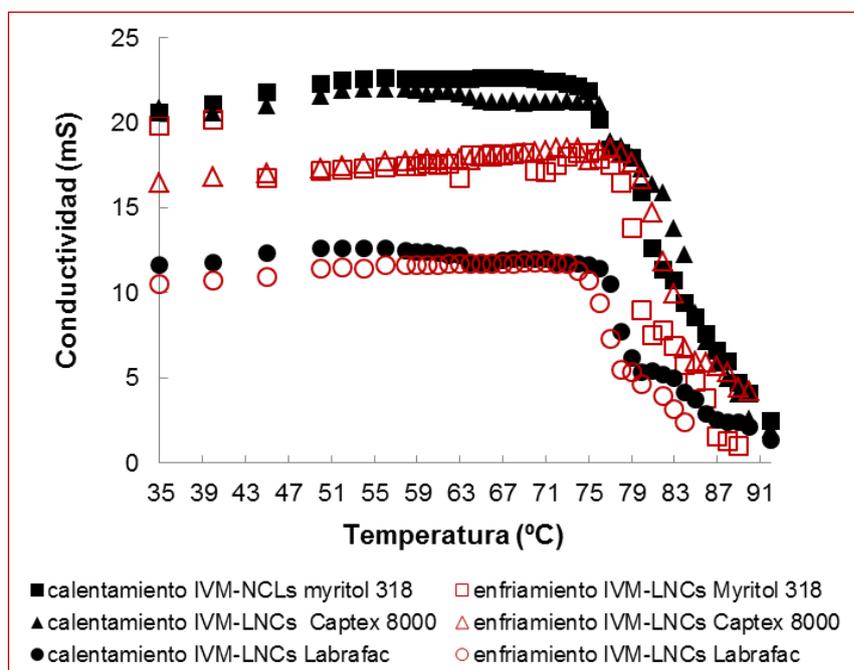
### **5.3. Resultados y Discusión**

#### **5.3.1. Obtención de las nanocápsulas lipídicas cargadas con ivermectina (IVM-NCLs) y determinación de la conductividad**

Con el objetivo de evaluar la factibilidad de incorporar IVM en el núcleo lipídico, se obtuvieron LNCs solubilizando 5, 10 y 20 mg de IVM (IVM-NCLs) en los lípidos formadores de matriz previamente seleccionados (Labrafac, Captex 8000 y Myritol 318, ver sección M.4.1. del anexo II) obteniéndose concentraciones finales de IVM de 0,28; 0,57 y 1,14 mg/ml de suspensión respectivamente. De manera visual, la incorporación de IVM no afecta la eficiencia del proceso de obtención de las NCLs. Para confirmarlo, se determinó la evolución de la conductividad de esta formulación. A los fines prácticos y para poder superponer las gráficas obtenidas, la **figura 5.1.** muestra valores arbitrarios de la conductividad en función de la temperatura registradas para las formulaciones cargadas con una dosis fija de IVM en las tres matrices lipídicas. Las curvas obtenidas pueden ser divididas en tres partes: a bajas temperaturas (<75 °C), la conductividad permanece constante y elevada indicando la presencia de una emulsión aceite/agua (o/w). Cuando la temperatura aumenta, se observa una fuerte disminución de la conductividad y el sistema tiene el aspecto traslucido, reflejando la formación de una microemulsión. Durante el enfriamiento, la temperatura correspondiente al límite inferior de la zona de inversión de fases (ZIF) fue de 70 °C. Este comportamiento concuerda con el fundamento de la técnica desarrollada por Heurtault y cols., 2002.

Durante tres ciclos sucesivos de enfriamiento-calentamiento se obtuvo una buena reversibilidad de esta curva. Por lo tanto, se pudo comprobar que este procedimiento era el apropiado para la obtención de una nanosuspensión estable. No se observaron cambios en la conductividad debido a la incorporación de IVM lo que

permite suponer que la misma se encuentra en el interior del núcleo lipídico de estas dispersiones. Este comportamiento fue también observado con anterioridad con otros fármacos como por ejemplo los anticancerígenos [Roger y cols., 2011].



**Figura 5.1. Evolución de la conductividad en función de la temperatura.**

*Se grafica un ciclo de calentamiento/enfriamiento comprendidos entre 35 °C y 91 °C de una formulación de NCLs cargada con una dosis fija de IVM (10mg). Los tres lípidos formadores de matriz empleados fueron Labrafac, Captex 8000 y Myritol 318.*

### 5.3.2. Caracterización fisicoquímica de IVM-NCLs

Basados en estos resultados, nos interesó evaluar el comportamiento de los diferentes lípidos como núcleo de las partículas y el efecto de la concentración del fármaco sobre las características fisicoquímicas del sistema. Las propiedades de las NCLs obtenidas se reportan en la **tabla 5.1**.

**Tabla 5.1. Tamaño medio de partícula (TMP), índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta (PZ) de diferentes suspensiones de NCLs formuladas con distintas concentraciones de IVM.**

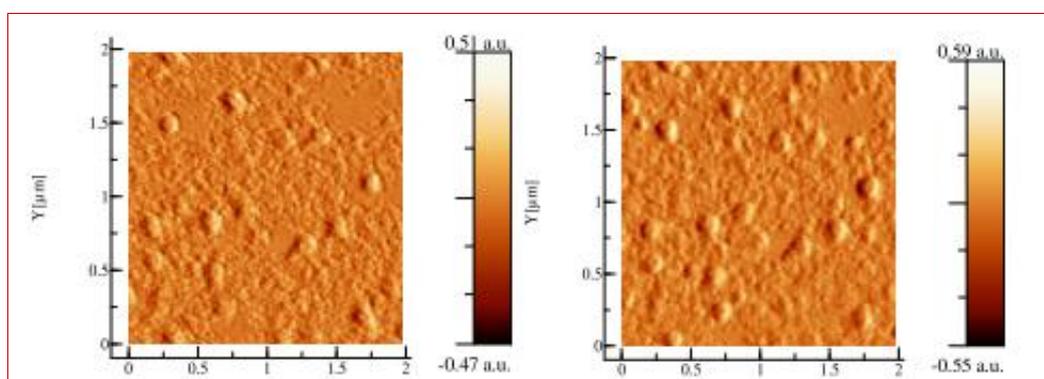
	<b>TMP±DS (nm)</b>	<b>IP</b>	<b>PZ ±DS (mV)</b>
NCLs blanco (Labrafac®)	54±3	0,06	-19±3
<b>IVM 0,286 mg/ml</b>			
Labrafac®	53,2±0,4	0,04	-18±6
Captex®8000	54,3±0,2	0,05	-20±4
Myritol®318	54,0±0,2	0,04	-19±3
<b>IVM 0,57 mg/ml</b>			
Labrafac®	55±2	0,08	-16±7
Captex®8000	55±2	0,05	-17±3
Myritol® 318	53,6±0,9	0,04	-20±4
<b>IVM 1,14 mg/ml</b>			
Labrafac®	52±1	0,05	-16±4
Captex®8000	54±1	0,05	-15±2
Myritol®318	54±2	0,05	-24±5

Como se observa, independientemente del lípido involucrado o la concentración de fármaco, en todos los casos las NCLs presentaron tamaño nanométricos entre 50-55 nm con una monodispersidad aceptable ( $IP < 0,2$ ). Desde este punto de vista, cualquiera de los lípidos empleados puede ser usado como matriz lipídica aunque su influencia en el comportamiento biofarmacéutico de la formulación final IVM-NCLs excede los fines de este trabajo y debería ser estudiado en profundidad.

Se ha descrito en la literatura que existe una fuerte dependencia entre el tamaño de partícula y la polidispersidad con las proporciones de los constituyentes de la formulación [Huynh y cols., 2009]. No obstante, en nuestro caso, mantuvimos constantes la proporción de lípidos, NaCl, y surfactantes en la fórmula, y sólo se cambió el tipo de triglicérido y la cantidad de fármaco empleado. Por lo tanto, las propiedades del sistema no se modificaron. En este contexto, para todos los ensayos que se describen a continuación se seleccionaron las IVM-NCLs conteniendo Labrafac como núcleo lipídico dado que esta matriz ha sido extensamente empleada con

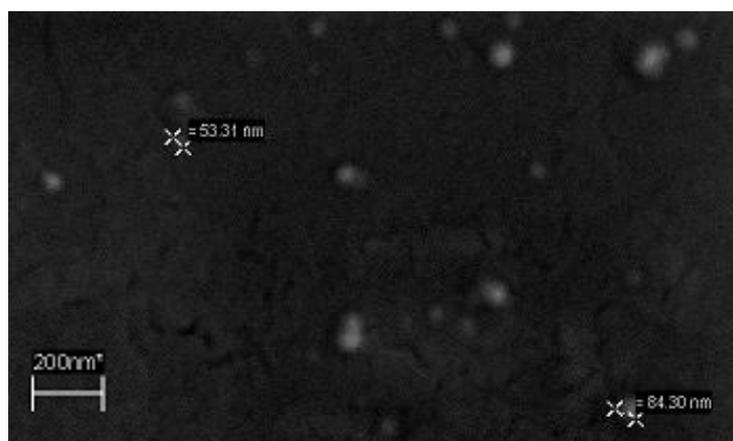
anterioridad [Allard y cols., 2008a, b; Hureauux y cols., 2010; Lamprecht y cols., 2002; 2006].

En las **figuras 5.2.** y **5.3.** se observan las microfotografías de MFA y MEB, respectivamente. El diámetro obtenido con estas técnicas difiere ligeramente de los valores obtenidos por la técnica de espectroscopía de correlación-fotón (ECF) debido a que las partículas sufren un aplanado durante la etapa de secado en la preparación de las muestras. Esta observación suele ser frecuente en el estudio de las NCLs aplicando esta técnica [Lamprecht y cols., 2004]. Las imágenes de MEB (**fig. 5.3.**) también muestran la homogeneidad de la suspensión de NCLs obtenidas aunque algunas partículas de mayor tamaño también pueden observarse.



**Figura 5.2.** Microfotografías de microscopía de fuerza atómica de IVM-NCLs.

*Las muestras fueron depositadas y secadas en una placa de mica y observadas en modo contacto. Izquierda: IVM-NCLs TOPO BKW  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ . Derecha: IVM-NCLs TOPO FRW  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ .*



**Figura 5.3.** Microfotografías de microscopía electrónica de barrido de una suspensión de IVM-NCLs.

La arquitectura de las NCLs obtenidas por el MIF ha sido descrita en detalle con anterioridad [Heurtault y cols., 2002b; 2003b]. Se corroboró que el sistema está constituido por un núcleo líquido correspondiente a los triglicéridos libres, rodeado por una membrana rígida compuesta por una combinación de surfactantes (Lipoid® y Solutol®). El primero de ellos, es decir el surfactante hidrofóbico Lipoid®, se une a la fase oleosa; mientras que el segundo componente, es decir el surfactante hidrofílico Solutol®, se orienta hacia la fase acuosa. De esta manera el núcleo lipídico es apto para solubilizar fármacos con baja solubilidad acuosa como IVM. Con el objetivo de verificar lo antes mencionado, se llevaron a cabo algunos estudios de calorimetría diferencial de barrido (CDB). Los detalles de la técnica se encuentran en la sección M.9. del anexo II. En la **figura 5.4.**, se observa claramente el pico exotérmico correspondiente a la fusión de IVM cuando se evaluó la sustancia sólida. Sin embargo, esta señal desaparece cuando se analizaron las muestras de las NCLs cargadas con IVM. Este resultado permite suponer que IVM estaría totalmente disuelta en el núcleo de NCLs.

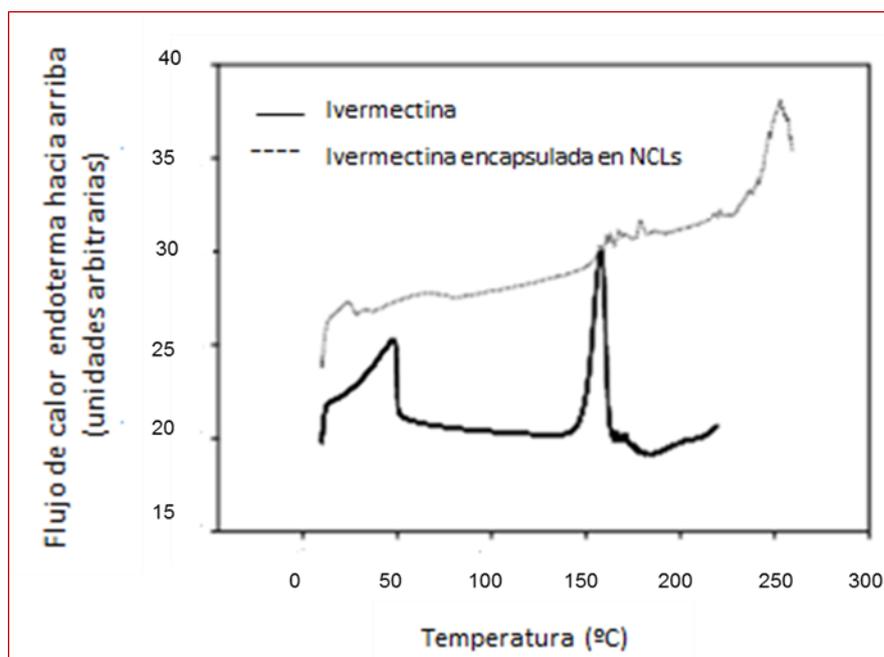
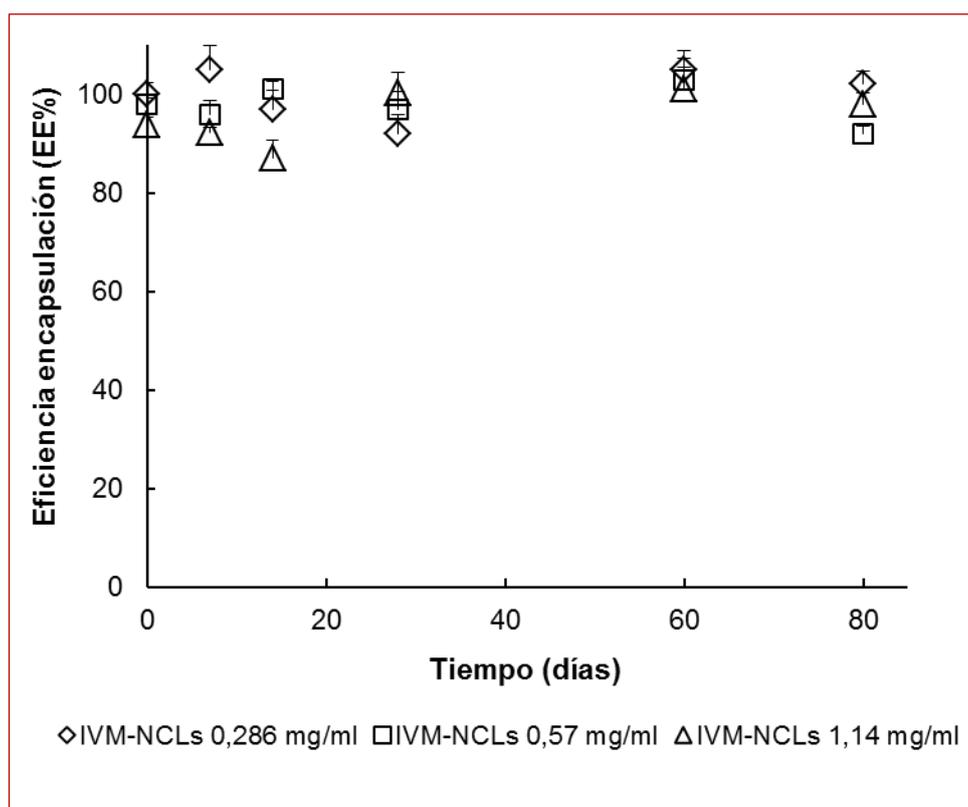


Figura 5.4. Termogramas de CDB obtenidos para IVM e IVM-NCLs.

### 5.3.3. Eficiencia de encapsulación de IVM-NCLs

Dado que el método de inversión de fases propone la encapsulación de un lípido en el cual el fármaco está previamente disuelto, en este tipo de sistemas es posible

lograr un elevado porcentaje de encapsulación, lo que se refleja en una elevada eficiencia de encapsulación, (EE%) mayor al 90%. El modo en que se calcula se explica en la sección M.10. del anexo II. La EE% se evaluó por un periodo de 80 días en lotes de NCLs encapsulando tres dosis diferentes de IVM conservadas a 4 °C. Como se observa en la **figura 5.5.**, el rendimiento de encapsulación prácticamente no se modifica en el tiempo estudiado lo que confirma no sólo la eficiencia del proceso sino también la estabilidad de las nanosuspensiones. Este comportamiento se ha reportado previamente para otros fármacos hidrofóbicos [Lamprecht y cols., 2002; 2004].



**Figura 5.5. Evaluación de la eficiencia de encapsulación (EE%).**

*Se probaron 3 formulaciones de IVM-NCLs empleando Labrafac como matriz lipídica. Las cantidades de IVM encapsulada fueron 5, 10 y 20 mg. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se hasta 80 días.*

#### **5.3.4. Estudios de estabilidad de IVM-NCLs**

La estabilidad física de las IVM-NCLs se evaluó a través del análisis del TMP, el IP de la suspensión y el PZ, durante 80 días, a dos temperaturas diferentes (4°C y 25 °C). Como se muestra en la **tabla 5.3.**, los valores de estos tres parámetros no presentaron

cambios significativos luego del almacenamiento a las dos temperaturas y en el periodo evaluado. De esta manera, los resultados obtenidos son similares a los reportados previamente para las NCLs blanco y también para las mismas nanopartículas cargadas con fármacos anticancerígenos [Heurtault y cols. 2002a; Garcion y cols., 2006; Allard y cols., 2008a,b]. Por otra parte, la variación en la concentración de IVM cargada en las NCLs no afecta su estabilidad física.

**Tabla 5.3. Estabilidad de IVM-NCLs. Se evaluaron los parámetros TMP, IP y PZ luego de 60 días a dos temperaturas (los mismos parámetros a tiempo 0 días se presentan en la tabla 5.2.).**

	TMP±DS (nm)	IP±DS	PZ±DS (mV)
<b>Temperatura (4 °C)</b>			
NCLs blanco	57,13±2,83	0,06±0,01	-10,9±0,9
IVM-NCLs 0,286 mg/ml	55,6±0,6	0,050±0,004	-13±3
IVM-NCLs 0,57 mg/ml	57±2	0,07±0,01	-14±3
IVM-LNCs 1,14 mg/ml	55±1	0,08±0,02	-12±1
<b>Temperatura (25 °C)</b>			
NCLs blanco	57±3	0,05±0,01	-26±5
IVM-NCLs 0,286 mg/ml	57±1	0,05±0,01	-19±9
IVM-NCLs 0,57 mg/ml	59±3	0,08±0,05	-21±9
IVM-NCLs 1,14 mg/ml	55,9±0,6	0,05±0,01	-12±3

### 5.3.5. Activación del sistema del complemento y captura macrofagocítica

Como se describe en la literatura, uno de los problemas relacionados a la vehiculización de fármacos empleando sistemas coloidales, es su rápida desaparición del torrente sanguíneo como consecuencia de su interacción con el sistema mononuclear fagocítico (SMF) que, junto con el SC, son responsables de la activación de la respuesta inmune innata. El SC es uno de los mecanismos principales por el cual los cuerpos extraños son reconocidos conduciendo al inicio de una respuesta inmune. Aproximadamente treinta proteínas componen el SC, algunas de ellas presentan propiedades enzimáticas o de unión, mientras que otras presentan receptores específicos en la superficie de las células del sistema inmune [Kinoshita y cols. 1991].

La base de la técnica empleada en este capítulo, consiste en la determinación de la cantidad de suero capaz de lisar el 50% de un número fijo de eritrocitos de oveja

previamente sensibilizados (CH50) [Basile y cols., 2012]. El consumo de CH50 es representado como una función del área de las nanopartículas ( $\text{cm}^2$ ), lo cual está relacionado al aumento de la concentración de nanocápsulas. Los resultados se muestran en la **figura 5.6**. La activación del SC es concentración-dependiente llegando al máximo de activación (30%) cuando el área es igual a  $1400 \text{ cm}^2/\text{ml}$ . Incluso, la presencia de PEG en la superficie de las NCLs no altera su comportamiento sino que se ha reportado que las cadenas de PEG en la interfase protegen a estos portadores del reconocimiento por parte del SC. En estudios previos llevados a cabo en condiciones similares, se han reportado también valores bajos de unidades de consumo de CH50 para estas NCLs; aproximadamente del 10% a  $1400 \text{ cm}^2/\text{ml}$  [Vonarbourg y cols., 2006]. De este modo, estos valores pueden ser despreciados y se espera una mínima activación del SC luego de la administración parenteral de esta clase de NCLs. Es importante remarcar que no existen diferencias significativas en la activación del SC entre las NCLs blanco (control) y las cargadas. Este resultado, es consistente con la estructura y la localización de IVM en el sistema: el fármaco solubilizado en el núcleo lipídico no altera la superficie de las partículas y por ende no se modifica el reconocimiento ni la activación de las proteínas del SC.

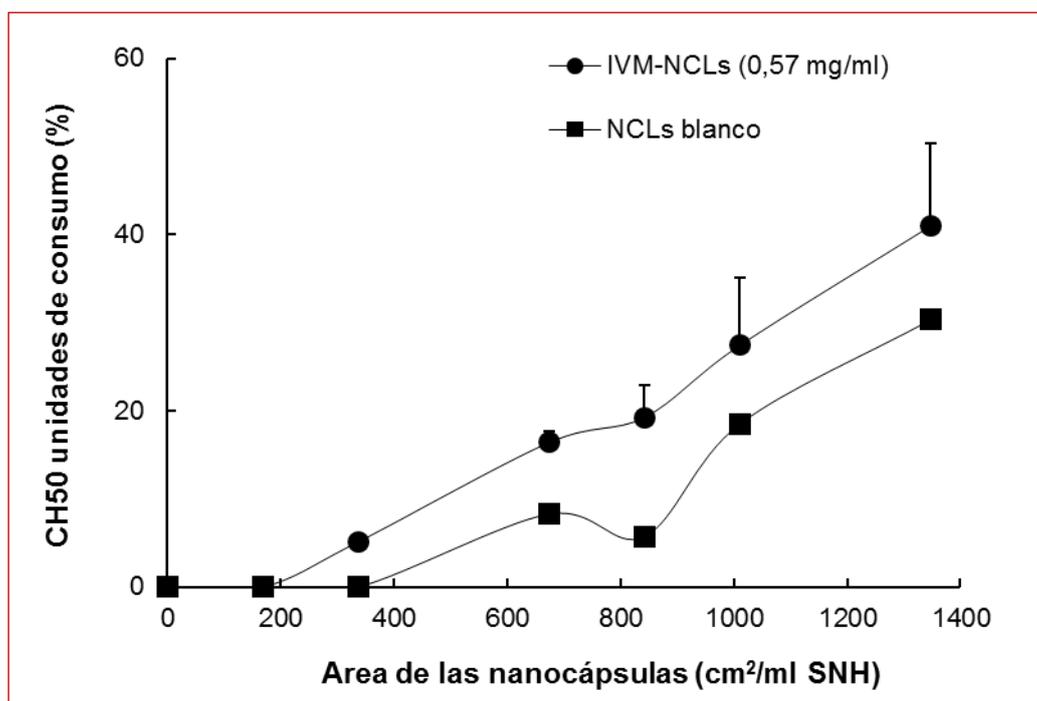


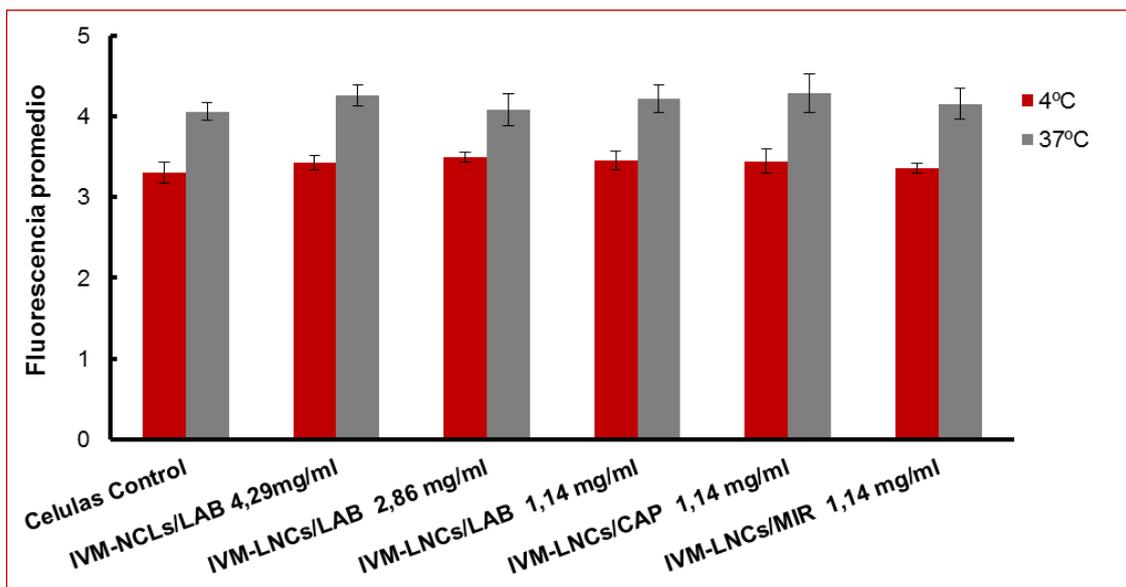
Figura 5.6. Consumo de unidades del complemento (CH50) a  $37^\circ\text{C}$  por NCLs blanco y cargadas con una dosis fija de IVM.

Cabe destacar que no hay una área óptima para las LNCs; sino que a partir del volumen de formulación que se inyecta en experimentos *in vivo* se calcula la superficie de NCLs y de este modo se determina la zona de la curva área/activación en la que se trabaja. Tomando en consideración los experimentos de farmacocinética llevados a cabo en este trabajo (ver próximo inciso) y aplicando las ecuaciones de la sección M.11. del anexo II, obtenemos que la cantidad de NCLs administradas en ratas es baja y se corresponde con una área total de partículas menor a  $10 \text{ cm}^2/\text{ml}$ , donde las unidades de consumo de CH50 serían no significativas. Esta observación permite inferir que tanto las NCLs como IVM-NCLs no serían reconocidas por el SC en ratas dentro del tiempo normal estimado de circulación en sangre de este sistema. Sin embargo, esta es una hipótesis que debe ser verificada, dado que el SC no es el único sistema que interviene en la eliminación del vector *in vivo*.

Para confirmar los resultados del ensayo de CH50, se llevó a cabo de manera paralela un estudio en células THP-1 de monocitos/macrófagos empleando nanocápsulas fluorescentes (Nile Red-NCLs; ver sección M.4. anexo II.) empleando distintos lípidos y cargando diferentes dosis de IVM. Los resultados se presentan en la **figura 5.7.** y se expresan como el porcentaje de fluorescencia luego del análisis por la técnica de FACS. Cabe destacar que el eje de las ordenadas en este gráfico representa el valor de fluorescencia medido por citometría de flujo para 10.000 células. Con respecto a las células control, no existe un valor de fluorescencia normal; sino que el valor depende de cada equipo que se emplee para realizar el ensayo y de cada tratamiento efectuado sobre las células. Por este motivo, se realiza un control de las células solas (sin tratamiento) cada vez que se lleva a cabo el experimento y se toma arbitrariamente este valor como el 100%.

En comparación con el control representado por las células sin tratar, ninguna de las formulaciones de NCLs muestran diferencias significativas en términos de la captura por parte de macrófagos (**fig. 5.7.**), siendo estos resultados coincidentes con los obtenidos en el ensayo de CH50. La fluorescencia registrada fue sólo del 5%, lo que indica que las IVM-NCLs cargadas con distintas dosis de IVM y formadas a partir de diferentes lípidos no fueron internalizadas luego del contacto con las células THP-1. Un comportamiento similar fue observado previamente para las nanocápsulas cargadas con paclitaxel [Basile y cols., 2012]. Los experimentos fueron también llevados a cabo a

37 °C y los resultados se muestran en la **fig. 5.7**. De igual modo, la internalización de las NCLs evaluadas fue mínima, con diferencias no significativas entre las formulaciones ensayadas. La captura de las NCLs se produce por medio de un mecanismo ATP dependiente, como se describió anteriormente y el ligero aumento de la fluorescencia observada puede deberse sólo a las interacciones de los sistemas con la membrana celular [Basile y cols., 2012].



**Figura 5.7. Evaluación de la captura macrofagocítica de diferentes formulaciones de NCLs.**

Las formulaciones se incubaron 90 minutos con células THP-1 a dos temperaturas (4 °C y 37 °C). La internalización por parte de células de macrófagos se representa por la fluorescencia promedio. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes. LAB= Labrafac; CAP= Captex 8000; MIR= Mirytol 318.

### 5.3.6. Estudios farmacocinéticos

La biodisponibilidad de un fármaco indica la velocidad y la cantidad de la forma inalterada del mismo que es absorbida, alcanza la circulación sistémica y, por lo tanto, se encuentra disponible para acceder a los tejidos y producir una acción farmacológica determinada. [Toutain y Bousquet-Mélou, 2004]. En otras palabras, expresa la fracción de la dosis de un fármaco que luego de ser administrado por una vía no vascular, llega a la circulación sistémica.

IVM es efectiva cuando se administra por vía parenteral, enteral o tópica [Fink y Porras, 1989]. La lenta absorción del fármaco se debería principalmente a su precipitación en el sitio de inyección [Lo y cols., 1985], siendo la tasa de absorción

desde el tejido subcutáneo el factor limitante en la disponibilidad de IVM [Lanusse, 2003]. Además, las diferencias en el flujo sanguíneo en el sitio de inyección y el área de superficie involucrada podrían afectar su disponibilidad [Nowakowski y cols., 1995]. En nuestro trabajo, se realizaron estudios farmacocinéticos comparativos entre IVM vehiculizada en NCLs y una formulación comercial (FC) control administradas ambas en ratas por vía subcutánea (SC) (ver sección M.13. del anexo II). Por otra parte, sólo se administraron las NCLs por vía peroral (PO) a la misma dosis para obtener información preliminar sobre la biodisponibilidad de IVM por esta vía. En ninguno de los grupos evaluados se reportaron efectos tóxicos agudos.

La **figura 5.8.** muestra el perfil de concentración plasmática de IVM en función del tiempo. Como se observa, la concentración de IVM resultó ser significativamente mayor luego de la administración de NCLs por la vía SC, comparado con la FC. La **gráfica 5.9.** presenta el mismo tipo de perfil pero comparando sólo las formulaciones de IVM-NCLs administradas por distintas vías. Aquí, la biodisponibilidad plasmática fue significativamente menor cuando se administraron las NCLs por la vía PO y se obtuvo una  $C_{max}$  promedio menor ( $15 \pm 5$  ng/ml), comparada con la obtenida luego de la administración SC ( $57 \pm 6$  ng/ml). Estudios anteriores han demostrado que la glicoproteína P (P-gp) desempeña un rol importante en la secreción intestinal de IVM. Debido a la gran inespecificidad de esta proteína y a su actividad a nivel de intestino, P-gp puede reducir la biodisponibilidad oral de un amplio rango de endoparasiticidas, entre ellos las lactonas macrocíclicas, principalmente ivermectina. Se ha reportado que la administración oral en ovejas presenta una disponibilidad sistémica baja para otros antiparasitarios de la misma familia [Imperiale y cols., 2004; Lloberas y cols., 2012].

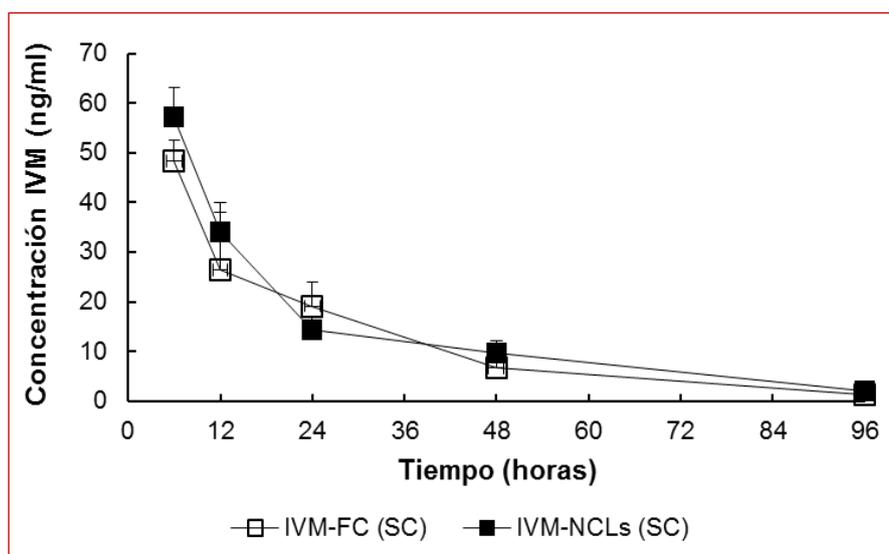


Figura 5.8. Perfil de concentración plasmática de IVM en función del tiempo.

Se administraron en ratas Wistar por vía SC dos formulaciones de IVM (dosis 0,2 mg/kg) y a tiempos preestablecidos se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca. La concentración de IVM se determinó por la técnica de HPLC con detección por fluorescencia y los resultados son el promedio de cuatro animales/grupo tratamiento.

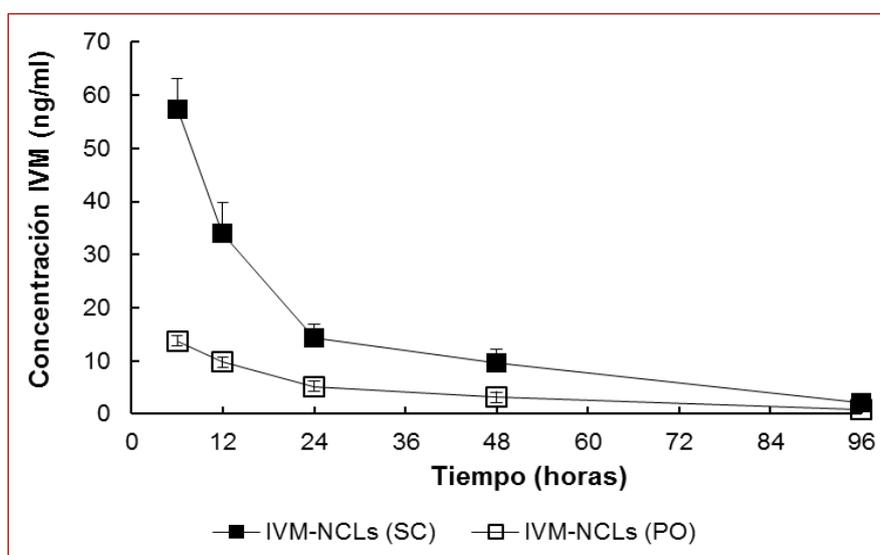


Figura 5.9. Perfil de concentración plasmática de IVM en función del tiempo.

Se administraron en ratas Wistar por vía SC y PO una formulación de IVM-NCLs (dosis 0,2 mg/kg) y a tiempos preestablecidos se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca. La concentración de IVM se determinó por la técnica de HPLC con detección por fluorescencia y los resultados son el promedio de cuatro animales/grupo tratamiento.

Los parámetros farmacocinéticos más relevantes correspondientes a los grupos en estudio luego del tratamiento por vía PO o SC se resumen en la **tabla 5.4**.

**Tabla 5.4.** Parámetros farmacocinéticos para IVM obtenidos luego de la administración de la formulación de NCLs (por vía SC y PO) y de la FC administrada por vía SC. (dosis de IVM: 0,2 mg/kg)

Parámetro farmacocinético	IVM-NCLs(SC)	IVM-NCLs(PO)	IVM-FC (SC)
$C_{max}$ (ng/ml)	57±6 <sup>a</sup>	15±5 <sup>b</sup>	48±4 <sup>a</sup>
ABC <sub>total</sub> (ng h/ml)	1367±63 <sup>a</sup>	430 ±67 <sup>b</sup>	1194±37 <sup>c</sup>
$T_{1/2\text{ el}}$ (horas)	20±1	24±5	19±3

*C<sub>max</sub>*: pico de concentración plasmática máxima; ABC área total bajo la curva de concentración en función del tiempo, extrapolada a infinito; *T<sub>1/2el</sub>* tiempo medio de eliminación. Los valores se expresan como el promedio ± DS(n= 3). Los valores que no presentan una letra en común son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).NCLs=nanocápsulas lipídicas; SC= subcutáneo; PO= peroral; FC= formulación comercial.

Los valores de ABC reportados en la **tabla 5.4.** indican que la biodisponibilidad por vía SC fue 3 veces mayor que la obtenida por la vía PO para las NCLs. Además de la diferencia de permeabilidad de estas dos vías, la biodisponibilidad oral reducida de IVM puede atribuirse en parte a la elevada afinidad que tiene esta molécula por la P-gp, presente en el tracto gastrointestinal (TGI) [Virkel y cols., 2005; Ballent y cols., 2007]. Esta proteína puede transportar activamente IVM fuera de los enterocitos y hacia el lumen intestinal, reduciendo la cantidad absorbida luego de la administración oral. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo medio de eliminación de IVM, luego de la administración de NCLs por ambas vías. En función de lo expuestos anteriormente, el comportamiento farmacocinético de IVM-LNCs indicaría que estos sistemas podrían ser promisorios para mejorar la terapéutica antiparasitaria y auspicia el desarrollo de nuevos estudios tendientes a optimizar esta herramienta para el tratamiento de parasitosis.

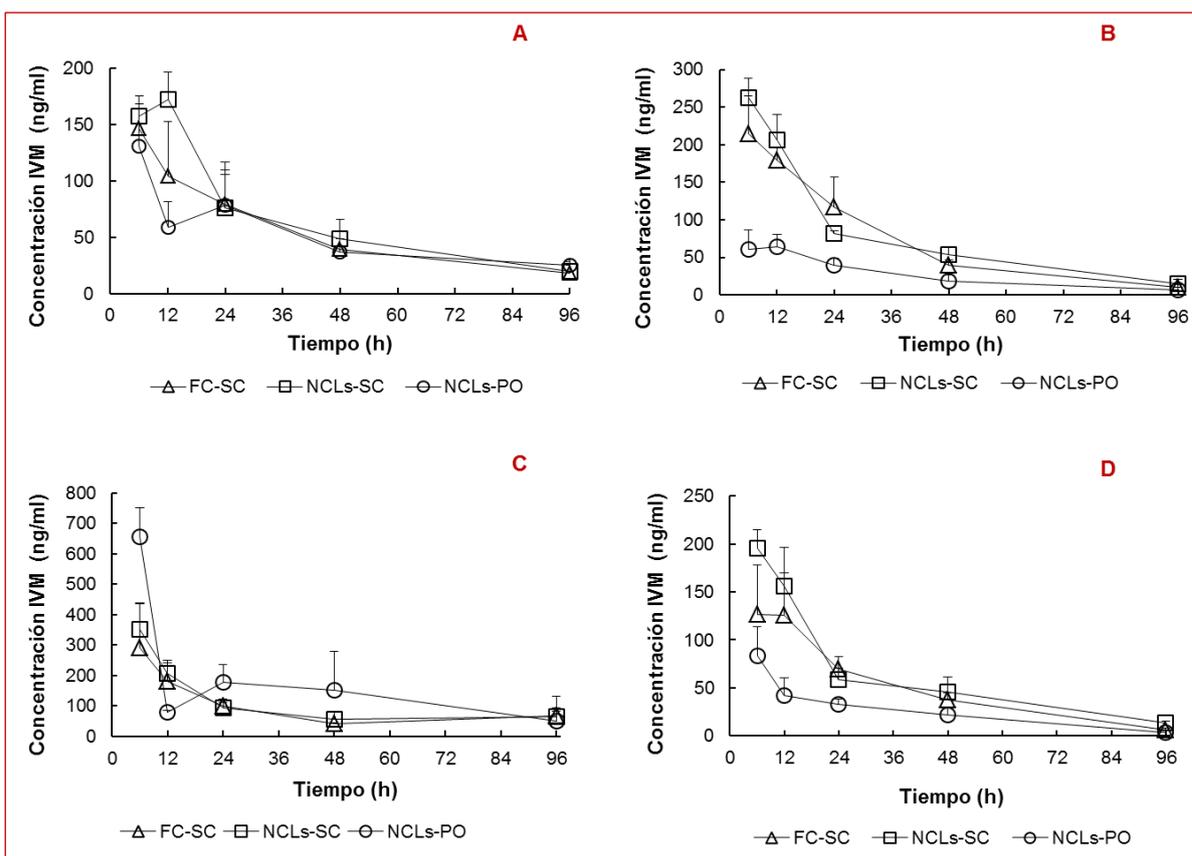
### 5.3.7. Estudios de biodistribución a los principales órganos/tejidos de localización parasitaria

Los parásitos helmintos viven en la superficie de la mucosa del TGI, bronco-pulmonar, conductos biliares o intracelularmente. Así, el fármaco tiene que ser liberado de su formulación, absorbido y transportado por la circulación hasta el lugar donde se localizan los parásitos. En plasma, una fracción de IVM se une

reversiblemente a las proteínas y la fracción libre es la que interviene en los procesos de distribución tisular, metabolismo y eliminación [Lanusse, 1994]. Además, la distribución de IVM puede estar afectada significativamente por la condición del animal, dado que pequeñas diferencias produce cambios drásticos en el tamaño del compartimiento corporal. Los estudios farmacocinéticos se han centrado tradicionalmente en los perfiles de concentración del fármaco obtenidos a partir del torrente sanguíneo. Sin embargo, muchos compuestos ejercen sus efectos sobre órganos/tejidos blanco no vasculares bien definidos, a los que acceden luego de ser distribuidos desde el compartimento sanguíneo central. Por esta razón, los cuatro tejidos de interés seleccionados para los estudios de biodistribución fueron: pulmón, pared intestino delgado (PID), contenido intestino delgado (CID) e hígado. Los resultados se presentan en la **figura 5.10**. Para el análisis, consideraremos en primer lugar la administración SC de las nanocápsulas.

Como se observa, se obtuvieron concentraciones de IVM elevadas, (mayores a 25 ng/ml) por al menos 48 horas en todos los tejidos evaluados luego de administradas las NCLs. La mayor concentración de fármaco obtenida en los tejidos blancos se refleja en el valor de  $C_{max}$  obtenido a las 12 horas para PID ( $173 \pm 24$  ng/ml) y a las 6 horas para CID ( $350 \pm 85$  ng/ml). Asimismo estos valores permanecen elevados y se mantienen incluso luego de 48 horas post-tratamiento. Esto se refleja en el prolongado tiempo medio de residencia (TMR) obtenido en el ensayo para los cuatro órganos evaluados (entre  $33 \pm 4$  y  $43 \pm 6$  horas).

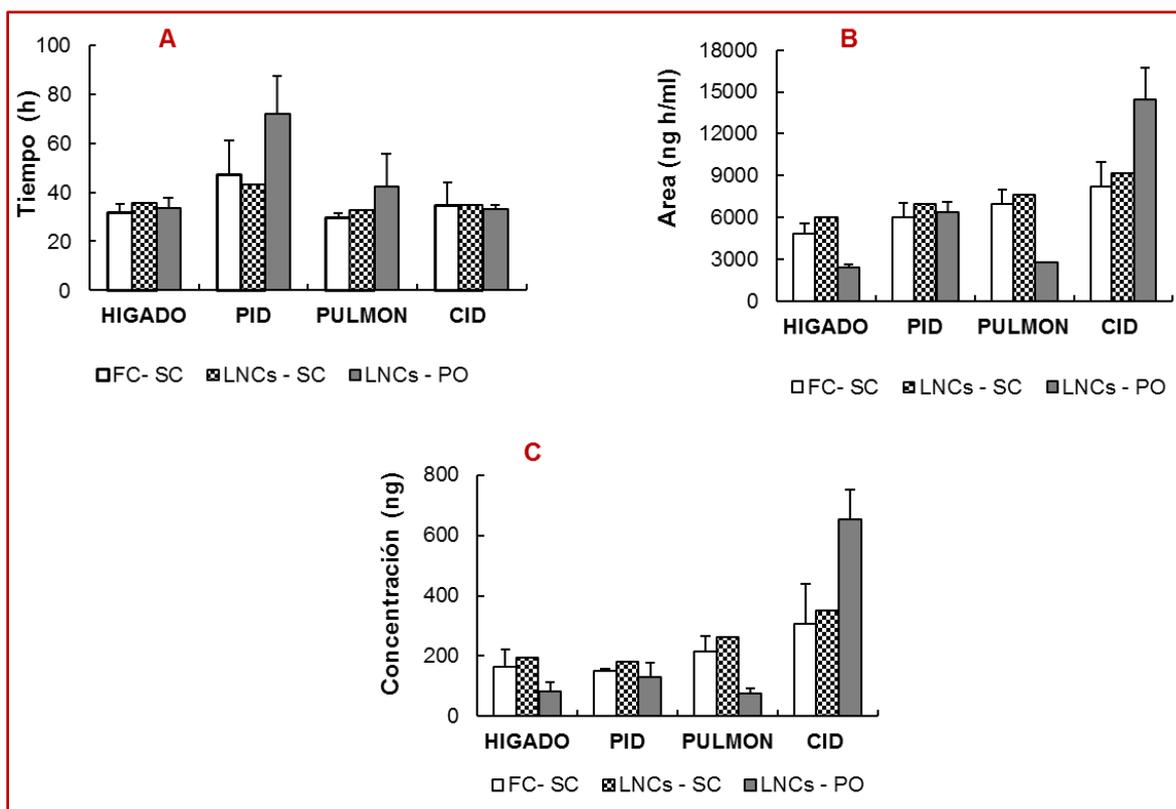
Los resultados aquí presentados nos permiten decir que nuestra formulación de NCLs es igualmente eficaz que una formulación comercial para alcanzar una concentración relevante de IVM en los principales sitios de localización parasitaria. Nuestro próximo objetivo será entonces, trabajar sobre aspectos de la formulación a fin de incrementar la biodisponibilidad de IVM vehiculizada en estos sistemas y evaluar la eficiencia frente a nematodos susceptibles y resistentes.



**Figura 5.10. Perfiles comparativos de concentración de IVM en función del tiempo obtenidos para cuatro órganos/tejidos de interés.**

A) Pared Intestino Delgado (PID) B) Pulmón C) Contenido Intestino Delgado (CID) D) Hígado. La FC y las LNCs se administraron en ratas por vía SC y PO y a tiempos predeterminados se evaluó la concentración de fármaco (dosis: 0,2 mg/kg).

Por otra parte, el eflujo de IVM mediado por P-gp se ha propuesto como uno de los principales mecanismos de resistencia [Pouliot y cols., 1997; Stephens y cols., 2001]. Dada su localización específica del lado apical de las células epiteliales, P-gp juega un importante rol en la absorción de IVM. No obstante, es interesante notar que luego de las 48 horas, las concentraciones de IVM provenientes de la administración de NCLs por ambas vías tienden a igualarse lo cual representa una ventaja para esta formulación, administrada por vía oral.



**Figura 5.11. Variables cinéticas para IVM en diferentes tejidos. A) MRT: tiempo medio de residencia B) ABC: área bajo la curva de concentración de IVM en función del tiempo; C) C<sub>max</sub>: máxima concentración de IVM.**

Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron a partir del análisis de los datos de concentración de fármaco en función del tiempo luego de la administración de diferentes formulaciones de IVM a una concentración de 0,2 mg/kg por vía SC y PO en ratas. PID: pared intestino delgado; CID: contenido intestino delgado.

La amplia distribución tisular de IVM coincide con la elevada concentración de este fármaco encontrado en el TGI (pared y contenido de intestino delgado), pulmones e hígado. Además, si se realiza La relación ABC tejido (IVM-NCLs)/ABC plasma (IVM-NCLs) para los cuatro tejidos evaluados, los valores oscilan entre 4,5 y 6,5 lo que claramente demuestra la mayor concentración de IVM alcanzada en la los órganos blanco tras la administración de la formulación en estudio (**figura 5.11.**) IVM es efectiva contra la mayoría de los nematodos adultos y larvas gastrointestinales [McKellar y Benchaoui, 1996] y contra *Dictyocaulus viviparus*, parásito nemátodo de los bronquios, ejerciendo un efecto protector prolongado [Armour y cols., 1985; Jones y cols., 1993]. De este modo, la persistencia de la actividad antihelmíntica de este fármaco contra los parásitos del TGI se ve facilitada por su patrón de distribución y su prolongada residencia en el tejido de la mucosa digestiva luego de la vehiculización en

las NCLs. Por otra parte, la concentración de endectocida requerida en el sitio de localización parasitaria para inhibir el establecimiento o el desarrollo de los parásitos no ha sido determinada con exactitud aún. Sin embargo, los estudios anteriores llevados a cabo en los órganos blanco, podría proveer información útil para estimar con precisión la concentración de fármaco por debajo del cual la eficiencia contra los parásitos adultos y larvas comienza a disminuir [Lifschitz y cols., 2000].

De este modo, considerando el supuesto teórico de que concentraciones en el tejido blanco por encima de 1 ng/g representan el nivel mínimo de fármaco requerido para una actividad antiparasitaria óptima, sería posible estimar el período de tiempo post-tratamiento durante el cual el nivel de endectocida en el sitio de localización se mantiene por encima de dicho nivel plasmático. Para todos los tejidos evaluados, la concentración de IVM luego de la administración de las NCLs, en los cuatro días post-tratamiento se mantuvo por encima de este valor, lo que constituye un resultado interesante en el control de la parasitosis.

#### **5.4. Conclusiones del capítulo**

El MIF resultó óptimo para la obtención de NCLs estables conteniendo IVM. El núcleo lipídico compuesto por Labrafac ha permitido la encapsulación de diferentes dosis de IVM. Las técnicas microscópicas y espectroscópicas han demostrado que en todos los casos se obtienen suspensiones de partículas nanométricas y monodispersas.

Por otra parte, el consumo de unidades de CH50 por parte de IVM-NCLs no fue significativo, lo que permite presuponer que las partículas no serían reconocidas *in vivo* por el SC, con un tiempo de circulación sanguínea aceptable. Esta observación fue corroborada a través del ensayo de la captura macrofagocítica.

Por otra parte, el perfil de concentración plasmática luego de la administración de IVM-NCLs por vía SC tiende a ser significativamente mayor en comparación a las FC disponible. Además, no se registraron cambios en el patrón de distribución tisular evaluado para IVM entre ambas formulaciones.

De lo expuesto hasta aquí, podemos concluir que las NCLs constituyen un sistema prometedor para aumentar el tiempo de exposición de IVM frente a los parásitos en los órganos blancos.

# **CAPITULO 6**

## **NANOCAPSULAS LIPIDICAS PARA LA VEHICULIZACION DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS: ALBENDAZOL**





## Capítulo 6

# *Nanocápsulas Lipídicas para la vehiculización de fármacos antiparasitarios: Albendazol*

### **6.1. Introducción**

En la actualidad se encuentran descritos en la literatura científica numerosos sistemas conocidos como nanoportadores para albendazol (ABZ). Entre ellos, el desarrollo de liposomas PEGilados [Panwar y cols., 2010] parece ser uno de los más prometedores logrando un direccionamiento activo del fármaco [Beduneau y cols., 2007b] sin embargo estas formulaciones no han sido investigadas en profundidad todavía. Como se detallara en capítulos anteriores, en nuestro laboratorio, hemos desarrollado NCLs que se obtuvieron por el método de emulsificación, en el que se emplean excipientes reconocidos como seguros (GRAS, su sigla en inglés) y no se requiere el uso de solventes orgánicos.

En cuanto a la administración oral, las NCLs se han formulado para lograr la inhibición de la P-gp en el tracto gastrointestinal; logrando así, por ejemplo, un aumento en la concentración plasmática de paclitaxel [Peltier y cols., 2006]. Si bien esta plataforma ha sido ampliamente estudiada en los últimos años como sistema de transporte y liberación para numerosos fármacos anticancerígenos, [Lamprecht y cols.,

2006] aún no se ha investigado su potencial aplicación en el campo de la veterinaria, más específicamente en las zoonosis.

Estas comprenden aquellas enfermedades e infecciones que se transmiten, en forma natural, entre los animales vertebrados y el hombre [Chomel, 2008]. La hidatidosis, también conocida como enfermedad hidatídica o echinococcosis, es una zoonosis causada por la forma larval de los parásitos del género *Echinococcus Rudolphi 1801*, y se caracteriza por el crecimiento de los quistes hidatídicos en el hospedador intermediario, como herbívoros domésticos y el hombre [McManus y cols., 2012]. Esta infección parasitaria es una enfermedad crónica, compleja y es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales enfermedades desatendidas a nivel mundial [Brunetti y cols., 2011]. Además, la hidatidosis es una de las parasitosis con mayor efecto sobre la economía debido a pérdidas significativas en la producción de carne, leche y en el valor de la lana [Eckert y Deplazes, 2004]. En Argentina, la enfermedad está difundida en todo el territorio nacional, con un área de riesgo que abarca casi el 30% del mismo. En esta área, residen casi 4 millones de personas, de las cuales más de 400 mil corresponden a niños menores de 5 años [OPS, 2004].

Las estrategias de tratamiento de la hidatidosis dependen en gran medida de diferentes factores tales como el tamaño y la localización del quiste, la viabilidad del mismo, la interacción de éste con los tejidos del hospedador, la presencia de contaminación bacteriana o fúngica y las complicaciones debidas a una ruptura quística y diseminación de protoescólices [Kern, 2003;2006]. En la actualidad existen cuatro alternativas de tratamiento en humanos: cirugía, PAIR (aspiración monitoreada por ecografía), quimioterapia con benzimidazoles (BZ) y la modalidad de observar y esperar (watch and wait, en inglés) para quistes inactivos, clínicamente silentes [Stojkovic y cols., 2009; Elissondo y cols., 2013].

Si bien la cirugía es en muchos casos exitosa, principalmente en la hidatidosis primaria con quistes poco numerosos o de fácil acceso, está lejos de serlo cuando se trata de hidatidosis secundaria diseminada o de presentaciones clínicas inoperables. El tratamiento de la hidatidosis basado en la cirugía como único método de cura ha cambiado sustancialmente en los últimos 30 años con la introducción del tratamiento médico con BZ [Salvitti y cols., 2002], tales como albendazol (ABZ) y mebendazol

(MBZ); y hasta incluso en algunos casos se utiliza el derivado heterocíclico isoquinolónico praziquantel (PZ) [Hemphill y Müller, 2009].

No obstante, los únicos antihelmínticos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) son MBZ, ABZ y su principal metabolito ABZ sulfóxido (ABZSO), con una efectividad que no supera el 50%. ABZ ha demostrado una mayor efectividad que MBZ dado que presenta una mayor absorción intestinal, logrando, por lo tanto, una mayor concentración plasmática en relación a la dosis administrada. Es por ello que en la actualidad ABZ es el fármaco más utilizado para el tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis humana. Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ABZ debe ser administrado en dosis de 10 a 15 mg/kg de peso corporal dividido en dos tomas diarias luego de la ingestión de alimentos por un período de entre 3 y 6 meses. No obstante, todavía no se ha definido adecuadamente la duración del tratamiento ni la eficacia del mismo.

Se ha reportado que entre un 20-40% de los pacientes no responden de manera favorable al tratamiento quimioterapéutico tanto con los BZM como con PZ [Hemphill y Müller, 2009], produciendo en la mayoría de los casos la estabilización de la enfermedad en vez de su cura [Horton, 2003]. Más aun, a lo largo del tratamiento, es necesario un monitoreo riguroso de los potenciales efectos adversos a través de exámenes específicos tales como medición de las aminotransferasas y el recuento de células sanguíneas, cada dos semanas (para los primeros 3 meses), luego mensuales (para el primer año) y posteriormente cada 3 meses [Horton, 1997; Vuitton, 2009]. Por todo lo expuesto anteriormente, se evidencia que, en lo que respecta al tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis en humanos, no existen al momento fármacos que demuestren un 100% de eficacia sobre el estadio larval de este cestode.

Ya sea por la toxicidad de los compuestos empleados o por su falta de eficacia, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para optimizar el tratamiento en humanos. De esta manera se evitarían los riesgos de la cirugía y se abaratarían los costos que implica para el sistema de salud. En este contexto, numerosos esfuerzos se han llevado a cabo para aumentar la solubilidad de los BZ a fin de mejorar su efectividad en el tratamiento de las infecciones sistémicas causadas por cestodos [Wen y cols. 1993]. Entre las estrategias más importantes desarrolladas con este fin, es importante destacar la ionización en medio ácido de ABZ, ya que este

fármaco es de naturaleza básica. Sin embargo, este aumento de solubilidad no es suficiente para la preparación de formulaciones que requieran elevadas concentraciones [García y cols. 2003]. Otra alternativa es el empleo de surfactantes como los polisorbatos o las sales biliares; o co-solventes como Transcutol® [Torrado y cols., 1996; Redondo y cols., 1998]. Sin embargo, las propiedades surfactantes de estos compuestos se asocian con la irritación de la mucosa gástrica. De igual modo, el empleo de hidroxipropil ciclodextrinas y polivinilpirrolidona fueron ampliamente investigados [García y cols. 2003; Daniel-Mwambete y cols., 2004].

En relación con la equinocosis quística (EQ) se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar la eficacia de ABZ como la preparación de emulsiones aceite en agua [Shuhua y cols., 2002], la incorporación en liposomas [Mingjie y cols., 2002; Lin y cols., 2011] y liposomas combinados con extractos acuosos de Huaier [Lv y cols., 2013]. Es importante remarcar que ABZ es convertido en su metabolito menos activo, ABZ-SO, por el metabolismo del primer paso hepático. De esta manera, el éxito del tratamiento quimioterapéutico en la hidatidosis se basa en la capacidad del fármaco para ejercer su acción en la capa germinativa y en los protoescólices del interior del quiste hidatídico en concentraciones adecuadas y por períodos de tiempo suficientes [Truong-Conga y cols., 2008].

En este contexto, la utilización de portadores micro y nanoparticulados emergen como una alternativa promisoriosa para mejorar la eficacia terapéutica de ABZ. Una ventaja adicional de esta clase de sistemas es la vectorización de ABZ hacia el sitio de acción, es decir, los quistes. Existen relativamente pocos estudios sobre la eficacia de las nanopartículas cargadas con ABZ sobre *Echinococcus* sp. Rodríguez y cols. (1995) describieron el uso de una formulación inyectable de nanopartículas poliméricas cargadas con ABZ aplicadas a *E. multilocularis*, agente causante de la equinocosis alveolar. Cong y cols. (2008) desarrollaron nanopartículas poliméricas cargadas con ABZ-SO y estudiaron la penetración *in vitro* a través de la membrana de quistes hidatídicos en ovejas.

En este capítulo, nos focalizamos en la mejora de la biodisponibilidad de ABZ aprovechando las propiedades favorables de las nanocápsulas como por ejemplo la solubilización de fármacos hidrofóbicos en el núcleo lipídico, la protección frente al metabolismo de primer paso hepático y la vectorización de fármaco hacia los sitios de

localización de los quistes. Se presentan los resultados concernientes a la formulación de ABZ en NCLs, incluyendo el método de obtención, la caracterización físico-química, la estabilidad y la eficacia quimioproliférica *in vivo* en el modelo murino de equinococosis quística.

## **6.2. Materiales y Métodos**

El primer paso en el diseño de las nanocápsulas fue evaluar la solubilidad de una concentración fija de ABZ en diferentes medios. En forma breve, 5 mg de ABZ se agregan a 1 g de diferentes excipientes lipídicos. Con el fin de facilitar la solubilización, las preparaciones se colocaron en un baño con ultrasonido durante 15 minutos, y después se filtraron usando un filtro Minisart® 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Alemania). La solubilidad de ABZ se determinó siguiendo la metodología M.14. descrita en el anexo II. En primer lugar, ABZ se solubilizó en ácido oleico (AO) a una concentración de 0,025 % p/p. En esta solución, se añadió Labrafac® y luego el proceso se continuó como se detalla en M.4. del anexo II.

La distribución de tamaño (TMP), el índice de polidispersidad (IP) y el potencial zeta (PZ) de las dispersiones de NCLs fueron determinados por espectrofotometría de correlación-fotón (ECF). Los detalles de las citadas técnicas se describen en M.6. del anexo II. Luego, para la determinación de la eficiencia de carga y el rendimiento de encapsulación (EE%), las dispersiones fueron filtradas empleando un filtro Ministar® de 0,22 µm. Las concentraciones de ABZ en el sobrenadante se midieron por triplicado empleando HPLC, de acuerdo con el protocolo descrito en USP 31–NF 26 (2008). Ambas metodologías se detallan en la sección M.10. del anexo II.

Los estudios de efectividad *in vivo*, en el caso de *E. granulosus*, están generalmente orientados a evaluar: a) *La efectividad quimioproliférica*, simulando experimentalmente lo que sucedería si se produce una rotura quística y consecuentemente la dispersión de la arena hidatídica; y b) *el tratamiento de hidatidosis secundaria*, donde se permite el desarrollo de las formas quísticas y se comienza el tratamiento aproximadamente a los 7 meses post-infección con protoescolices [Denegri y cols., 2002].

En este capítulo se detallan los resultados de estudios de efectividad quimioproliférica. Se trabajó con protoescolices obtenidos de quistes hepáticos y/o pulmonares de ovinos. Se inocularon ratones CF1 por vía intraperitoneal y al día siguiente de la infección se inició la administración por vía oral de las distintas formulaciones consideradas para este ensayo, a la dosis de 5 mg/kg/día durante 30 días. A los seis meses post-tratamiento, tiempo suficiente para comprobar si se produjo el desarrollo de las masas quísticas, se sacrificaron los animales (ver en sección M.17. "Ética en el manejo de los animales de experimentación" del anexo II).

Se examinaron las características macroscópicas de los quistes extraídos como así también se realizó el estudio ultraestructural en MEB de las membranas de los quistes procedentes de los ratones controles y de los tratados. La característica macroscópica indicadora de la eficiencia del tratamiento fue la evolución del peso de los quistes. Los detalles de esta metodología experimental se desarrollan en la sección M.17. del anexo II.

Estos ensayos fueron llevados a cabo en estrecha colaboración con la Dra. Celina Elisondo y su grupo de investigación perteneciente al Laboratorio de Zoonosis Parasitarias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNMDP, Argentina).

### **6.3. Resultados y Discusión**

#### **6.3.1. Estudios de preformulación y formulación**

En la primera parte de este estudio se evaluaron distintos lípidos como matriz formadora del núcleo de las NCLs. Por otra parte, ABZ se presenta como un polvo cristalino estable, con alto punto de fusión (209 °C) que se caracteriza por ser insoluble en agua (0,01 mg/ml) [Kasim, NA y cols.; 2003], benceno y éter, soluble en dimetilsulfóxido, ácidos y bases fuertes y poco soluble en etanol y cloroformo. La estructura química se presenta en la sección M.2. del anexo II. De manera preliminar y teniendo en cuenta las propiedades ácido-base de este compuesto, evaluamos la solubilidad de ABZ en HCl 0,1M y la subsiguiente encapsulación en la fase oleosa interna. Este método se ha reportado con anterioridad para otros fármacos hidrofóbicos [Roger y cols., 2011].

Sin embargo, en este caso la capacidad de carga y la EE% obtenidas fueron bajas y por ello consideradas como no aceptables para aplicaciones preclínicas y clínicas. Con el objetivo de obtener más información acerca de los núcleos lipídicos alternativos como así también de los co-surfactantes que presentasen características adecuadas para la formulación de NCLs y que al mismo tiempo permitiesen la solubilización de ABZ, llevamos a cabo un estudio de solubilidad como se describe en la sección M.14. del anexo II.

Teniendo en cuenta algunos ensayos preliminares y considerando la dosis comúnmente usada para los estudios *in vivo* en modelos murinos de hidatidosis, evaluamos una serie de lípidos y co-surfactantes capaces de solubilizar el fármaco a una concentración de 0,5 % p/p o mayor. La **tabla 6.1.** presenta la lista de materiales ensayados.

Tabla 6.1. Solubilidad de ABZ en diferentes lípidos (NS: no soluble; S: soluble).

Aceite/Surfactante	Solubilidad (0,5% p/p)
Acido Oleico (AO)	<b>S</b>
Aceite de castor	N/S
Aceite de girasol	N/S
Aceite de sesamo	N/S
Aceite de oliva	N/S
Ácido esteárico	N/S
Alfa-tocoferol	N/S
Captex® 200	N/S
Captex® 500	N/S
Captex® 8000	N/S
Cremophor EL	N/S
Inwitor® 380	N/S
Labrafac® CC	N/S
Labrafil® M1944CS	N/S
Labrasol®	N/S
Lauroglycol® 90	N/S
Lauroglycol® FCC	N/S
Miristato de etilo	N/S
Mygliol® 812	N/S
Mygliol® 840	N/S
Myritol® 318	N/S
Oleato de etilo	N/S
Parafina líquida	N/S
Plurol® isostearico	N/S
Plurol® oleico	N/S
Span® 80	N/S
Transcutol® P	<b>S</b>
Tween® 20	N/S
Vitamina E	N/S

A esta concentración, sólo AO y Transcutol®P fueron capaces de solubilizar ABZ. Dado que estos compuestos son utilizados comúnmente como co-surfactantes en

dispersiones de nanopartículas, la estrategia que se empleó fue combinar los lípidos Captex 8000 y Labrafac con estos co-surfactantes. Cuando se combinaron distintas proporciones de Transcutol®P con Labrafac, las NCLs resultantes presentaron tamaño de partícula e IP no aceptables. Como resultado, este núcleo lipídico fue descartado para estudios posteriores. Para el caso del AO, se obtuvo que la cantidad máxima de AO que podía incorporarse a la formulación sin alterar las propiedades fisicoquímicas de las NCLs era de 1,14% p/p. Incluso, la presencia de ABZ solubilizado en AO no afectó ni el tamaño ni el IP de las NCLs.

En paralelo con esto, y con el objetivo de obtener información sobre la eficiencia del material lipídico para el cargado de fármaco, se evaluaron 3 lotes de NCLs (llamados A, B y C) utilizando como fase lipídica Labrafac, Captex® 8000 y una combinación (50:50) Captex® 8000/Labrafac®. En la **tabla 6.2.** se resumen las propiedades físico-químicas y la eficiencia de carga de estas dispersiones.

**Tabla 6.2. Composición y caracterización (TMP, IP, PZ y EE % de tres lotes de NCLs (n=3).**

<b>FORMULACIONES</b>			
<b>Componentes (g)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
AO	0,0002	0,0002	0,0002
Labrafac®	-----	1,028	0,5140
Captex® 8000	1,0280	-----	0,5140
Lipoid® S75-3	0,0750	0,0750	0,0750
Solutol® HS-15	0,8460	0,8460	0,8460
NaCl	0,0890	0,0890	0,0890
Agua (RT) <sup>a</sup>	2,9620	2,9620	2,9620
Agua (0 °C)	12,5000	12,5000	12,5000
<b>Propiedades fisico-químicas</b>			
TMP (nm)	56,2±0,2	48±1	54,2±0,9
IP	0,08	0,08	0,09
PZ (mV)	-16±2	-19±3	-18±3
EE (%)	77±2	98±2	75±4

El TMP de los tres lotes de NCLs variaron entre 48±1 y 56,2±0,2 nm, con valores de PZ negativos. Para todas las formulaciones el IP fue menor a 0,2. Sin embargo, una EE% de ABZ mayor al 90% solo se obtuvo con Labrafac como matriz lipídica. De hecho, los parámetros de estabilidad para este lote fueron mejores que los obtenidos para los

otros dos evaluados en un periodo de 30 días. Consecuentemente, la formulación detallada en la **tabla 6.3.** fue la seleccionada para estudios posteriores.

**Tabla 6.3. Composición de ABZ-NCLs (concentración final de ABZ: 0,286 mg/ml de dispersión).**

ABZ -NCLs	
Componentes	Cantidades (g)
Solutol® HS15	0,8460
Lipoid® S75-3	0,0750
NaCl	0,0890
Aceite (Labrafac®)	1,0280
AO	0,0002
Agua destilada (TA)	2,9620
Agua destilada (0 °C)	12,5000
ABZ	0,0050

TA= temperatura ambiente

### 6.3.2. Caracterización fisicoquímica de ABZ-NCLs

Además de las propiedades mencionadas anteriormente, también empleamos las microscopias (MEB y MET) para una caracterización más exhaustiva de los sistemas.

Las **figuras 6.1. y 6.2.**, confirman la homogeneidad de las suspensiones aunque algunas partículas de tamaño mayor pueden ser observadas también. Los diámetros difieren ligeramente de los obtenidos por la técnica de ECF, dado que las nanopartículas sufren un aplanado en el proceso de secado durante la preparación de las muestras para microscopía. Esta particularidad suele ser frecuente y observada ya con anterioridad en el estudio de estos sistemas [Lamprecht y cols., 2004].



**Figura 6.1. Microfotografías de MEB de una nanosuspensión de ABZ-NCLs (concentración de ABZ: 0,286 mg/ml)**

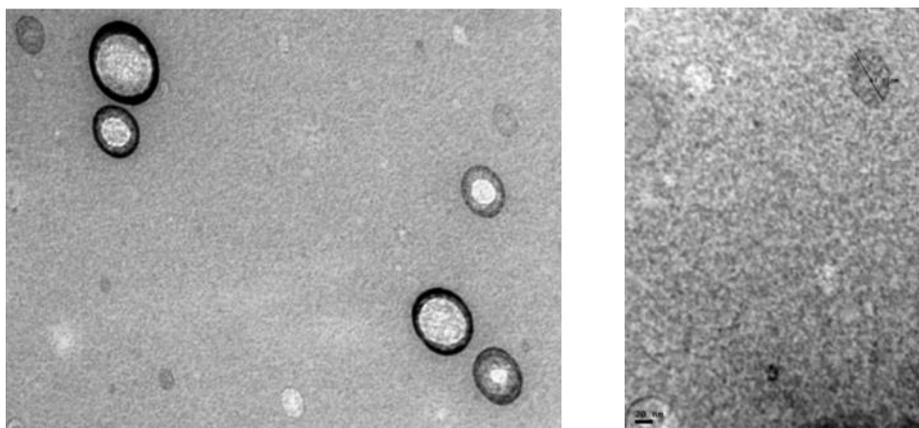


Figura 6.2. Microfotografías de MET de suspensiones de ABZ-NCLs (concentración de ABZ: 0,286 mg/ml). Izquierda: 100.000 x. Derecha: 200.000 x.

### 6.3.3. Ensayos de liberación *in vitro*

En la literatura científica se han descrito diferentes patrones de liberación para las NCLs, siendo la naturaleza del fármaco un factor clave. De esta manera, se han informado porcentajes de liberación no significativos para fármacos voluminosos y de elevado peso molecular como paclitaxel [Garcion y cols., 2006] y 7-etil-10-hidroxicamptotecina [Roger y cols., 2011], mientras que para moléculas pequeñas e hidrofílicas se ha reportado una liberación de aproximadamente el 30 % en un periodo de 7 días [Weyland y cols., 2011].

En nuestro caso, para ABZ se observó una mayor tasa de liberación, como puede apreciarse en la **figura 6.3**. El patrón de liberación presenta diferentes fases: la liberación fue muy baja dentro de las primeras tres horas ( $\approx 0,5$  %), luego una liberación súbita moderada (*burst effect*, en inglés) alcanzando una liberación del 5,5 % luego de 6 horas. Posteriormente, la liberación de ABZ se mantuvo relativamente constante durante las 96 horas restantes hasta alcanzar un porcentaje de liberación del 41% al final del ensayo. Los resultados concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores donde se postula que la proporción o la naturaleza del surfactante no constituyen un factor clave en el mecanismo o la velocidad de liberación del fármaco mientras la concentración de aquel permanezca constante [Abdel-Mottaleb y cols., 2010]. De este modo, la velocidad de liberación del F estaría solo afectada por la interacción fármaco/glicérido y una liberación rápida o prolongada podría ser lograda cambiando el núcleo lipídico empleado [Abdel-Mottaleb y cols., 2010].

Por otra parte, y teniendo en cuenta que no se observó degradación *in vitro*, la liberación del fármaco podría ocurrir principalmente por difusión a través del núcleo lipídico de la nanocápsula, como ya ha sido descrito para otros fármacos [Washington y cols., 1996]. Dado que la posible erosión del sistema portador no es considerado en estos ensayos, es de esperarse que el comportamiento de liberación *in vitro* de las NCLs no correlacione bien con lo que sucede *in vivo*. De todas maneras, este ensayo puede brindarnos información útil sobre el mecanismo de liberación del F desde las NCLs.

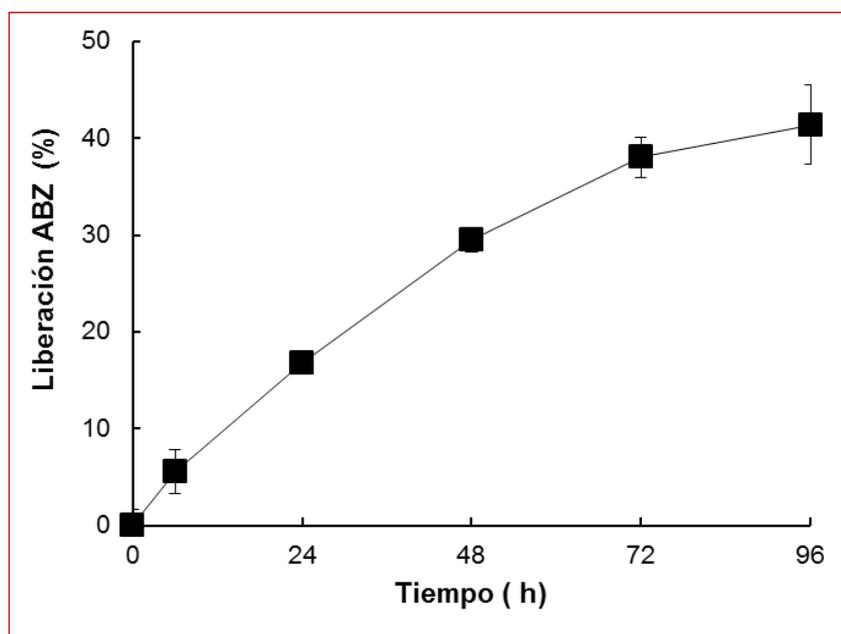


Figura 6.3. Perfil de liberación de ABZ desde las NCLs.

*Se empleó como medio receptor una solución de PBS1X con el agregado de 2% de Tween® 80 (n=3, los datos se muestran como la media  $\pm$  DS)*

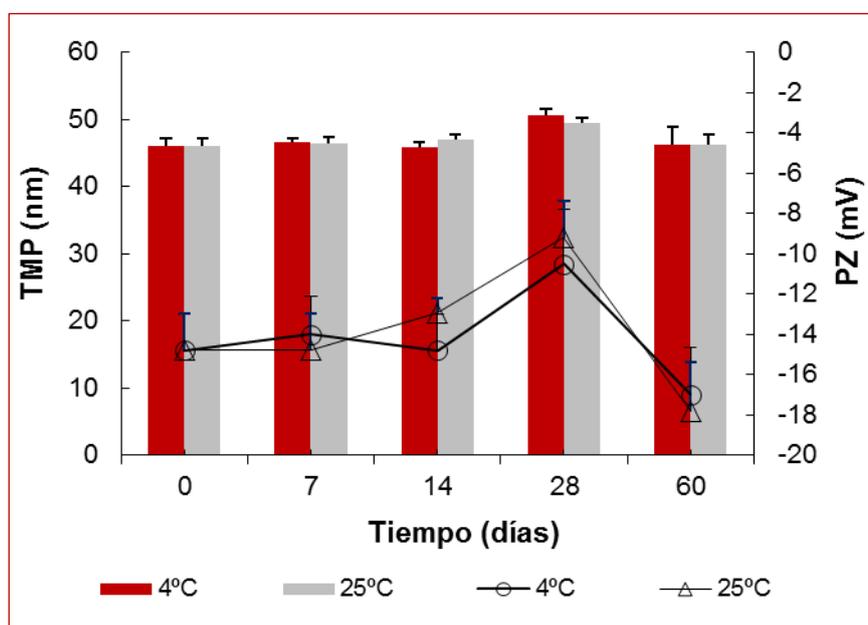
#### 6.3.4. Estabilidad de ABZ-NCLs

La estabilidad de las partículas fue evaluada por 60 días a dos temperaturas (4 °C y 25 °C). Como se muestra en la **figura 6.4.**, las suspensiones de ABZ-NCLs fueron físicamente estables a ambas temperaturas y en el tiempo estudiado, no observándose cambios significativos en el tamaño ni el potencial z (**tabla 6.4.**). Para todas las formulaciones se obtuvo un  $IP < 0,2$ , lo que demuestra la monodispersidad de las formulaciones. La EE% de ABZ fue mayor al 90% y se mantuvo constante a lo largo del tiempo evaluado con una concentración media final de fármaco igual a  $0,286 \pm$

0,008 mg/ml de nanosuspensión. Por otra parte, las diferencias encontradas entre los lotes no fueron significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 6.4.** Carga de fármaco y eficiencia de encapsulación (EE%) para ABZ en las NCLs. (n=4; los datos se muestran como el promedio  $\pm$  DS)

	EE (%) 4 °C	Cargado de F (mg/ml) 4 °C	EE (%) 25 °C	Cargado de F (mg/ml) 25 °C
0 días	98 $\pm$ 2	0,28 $\pm$ 0,05	98 $\pm$ 2	0,28 $\pm$ 0,05
60 días	91 $\pm$ 2	0,26 $\pm$ 0,05	92 $\pm$ 1	0,26 $\pm$ 0,03



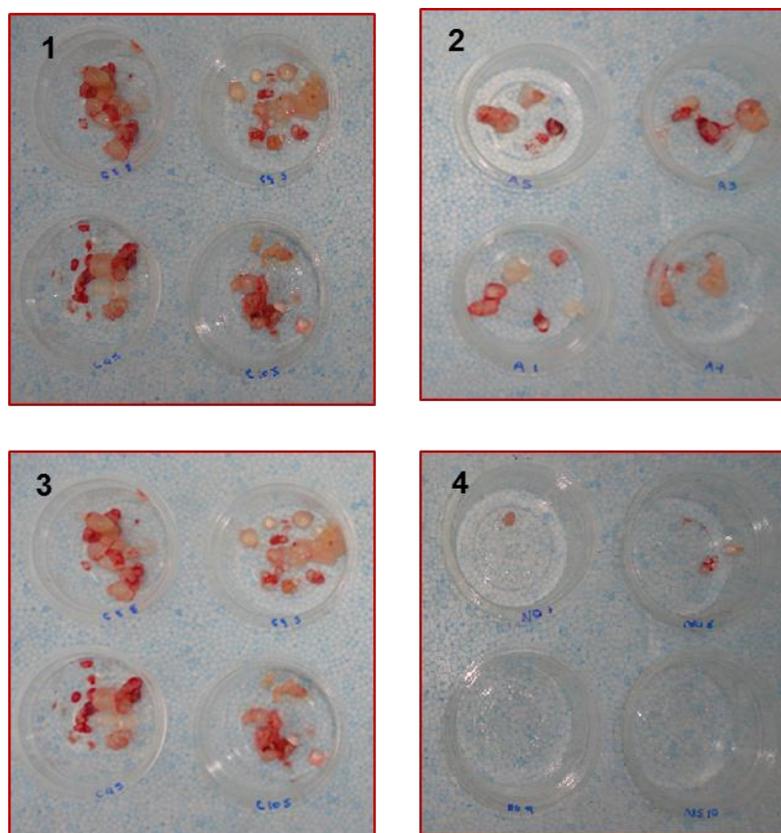
**Figura 6.4.** Estabilidad de las ABZ-NCLs

Se evaluó el tamaño medio de partícula (barras) y el potencial z (líneas) de cuatro formulaciones de ABZ-NCLs. El tiempo de estudio fueron 60 días y las muestras se conservaron a 4°C y 25 °C. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.

### 6.3.5. Estudio de eficacia quimioprolifáctica

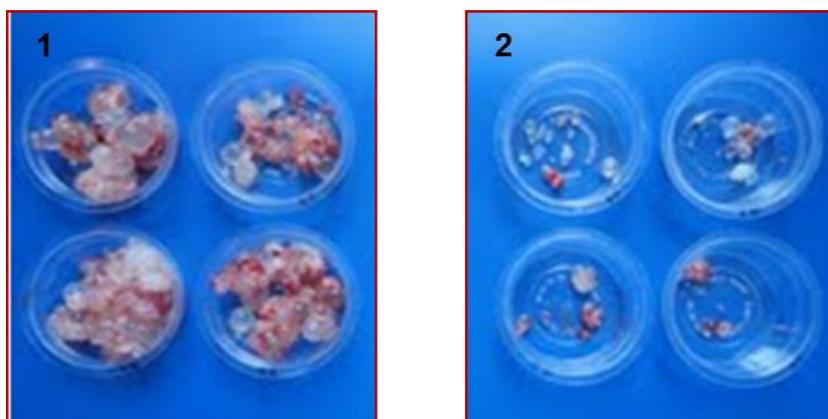
La **figura 6.5.** muestra los quistes obtenidos luego de la necropsia de los ratones de los cuatro grupos tratados, donde cada bandeja representa un animal. Todos los ratones infectados provenientes de los grupos control y los que recibieron la suspensión de ABZ desarrollaron quistes en su cavidad abdominal, mientras que en cuatro de los diez ratones del grupo tratado con ABZ-NCLs, no se observó evolución de la infección puesta de manifiesto a través de la ausencia de quistes. Además, en este grupo se observó menor desarrollo de masas quísticas.

Los mismos resultados se obtuvieron en estudios preliminares luego de la administración de las nanosuspensiones por vía SC. Estos últimos resultados se muestran en la **figura 6.6**.



**Figura 6.5. Vista macroscópica de quistes hidatídicos recuperados de ratones luego del experimento.**

*Cada bandeja representa los quistes obtenidos de un animal (se muestran sólo 4 animales por grupo). 1) Grupo control, 2) Grupo tratado con suspensión de ABZ, 3) Grupo control con NCLs blanco, 4) Grupo tratado con ABZ-NCLs. Dosis de ABZ: 5mg/kg peso del animal.*



**Figura 6.6. Vista macroscópica de quistes hidatídicos recuperados de ratones del experimento preliminar luego de la administración del tratamiento por vía subcutánea.**

*Cada bandeja representa los quistes obtenidos de un animal (se muestran sólo 4 animales por grupo). 1) Grupo control, 2) Grupo tratado con ABZ-NCLs.*

La **tabla 6.5.** y el **gráfico 6.7.** resume los resultados de los pesos de los quistes luego del tratamiento de los diferentes grupos implicados en los estudios de eficacia quimioproláctica. En este punto cabe aclarar que debido a una deficiencia del modelo murino de echinococcosis quística no es posible lograr niveles de infección parejos en todos los animales. Para explicar esto deben tenerse en cuenta diferentes factores como por ejemplo, la compleja relación parásito-hospedador, la variabilidad individual del hospedador y la heterogeneidad inmunológica intrapoblacional. Sin embargo, está aceptado y validado por la bibliografía internacional como un modelo útil para la evaluación de la eficacia de fármacos y sistemas portadores. [Cucher y cols., 2013].

Como se observa, no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el peso de los quistes provenientes del grupo control ( $4,38 \pm 3,39$  g) comparado con los grupos tratados con NCLs blanco ( $4,22 \pm 2,5$  g).

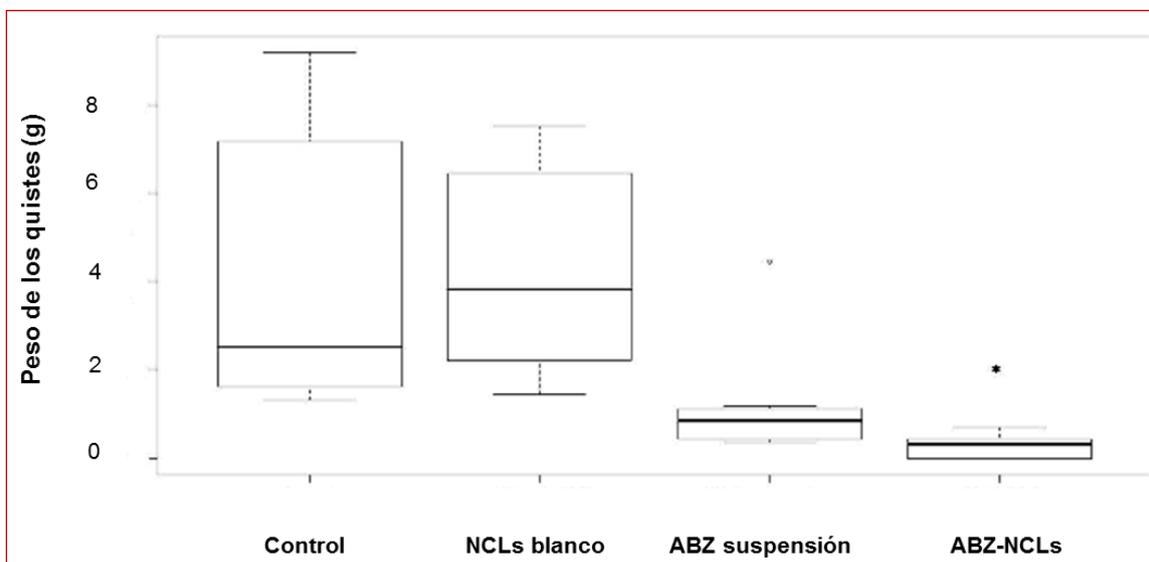
**Tabla 6.5.** Estudio de eficacia quimioproláctica. Se presenta el peso de los quistes hidatídicos recuperados de ratones luego del tratamiento (dosis ABZ: 5mg/kg).

Estudio de Eficacia Quimioproláctica		
	Peso de los quistes (g) (media $\pm$ DS)	Eficacia (%)
Grupo Control (agua)	4,38 $\pm$ 3,39	--
NCLs blanco	4,22 $\pm$ 2,50	--
ABZ-NCLs	0,25 $\pm$ 0,24**	94,30
Suspensión de ABZ	1,25 $\pm$ 1,44*	71,46

\*  $p < 0,01$ ; diferencias estadísticamente significativas entre el grupo ABZ-NCLs vs. el grupo control. \*  $p < 0,05$ ; diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que recibió la suspensión de ABZ y el grupo control. \*\*  $p < 0,05$ ; diferencias estadísticamente significativas entre el grupo ABZ-NCLs y el grupo que recibió la suspensión de ABZ.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en el peso de los quistes recuperados de los animales sin tratar comparados con los obtenidos del grupo ABZ-NCLs ( $p < 0,01$ ). Todos los ratones infectados en el grupo control y los tratados con la suspensión de ABZ desarrollaron quistes hidatídicos en la cavidad abdominal, mientras que en sólo cuatro de diez ratones tratados con ABZ-NCLs la infección no progresó. Además, los ratones que recibieron ABZ-NCLs exhibieron una reducción significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el peso de los quistes ( $0,25 \pm 0,24$ g) comparado con los animales tratados con la suspensión de ABZ ( $1,25 \pm 1,44$ g).

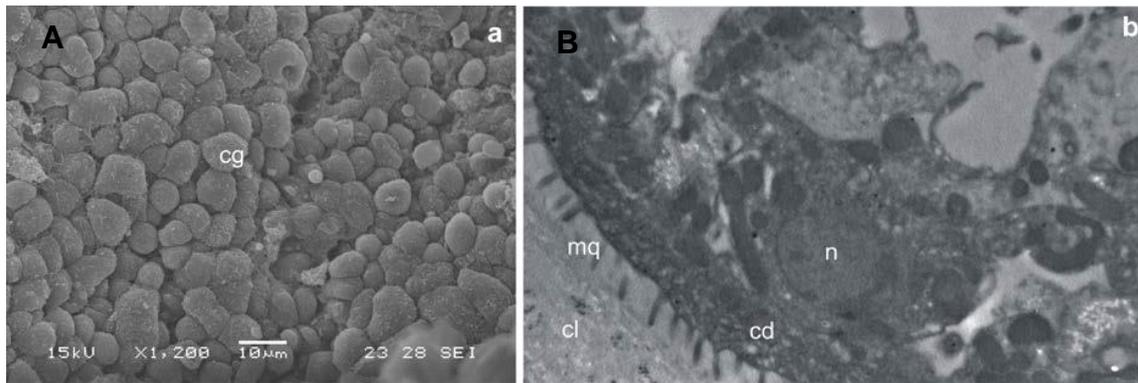
Estos resultados permiten afirmar que se obtiene una mayor eficacia quimioproléctica luego del tratamiento con ABZ-NCLs comparada con la suspensión de ABZ.



**Figura 6.7. Diagrama de cajas (box-plot) de la distribución comparativa del peso (g) de los quistes recuperados de los ratones.**

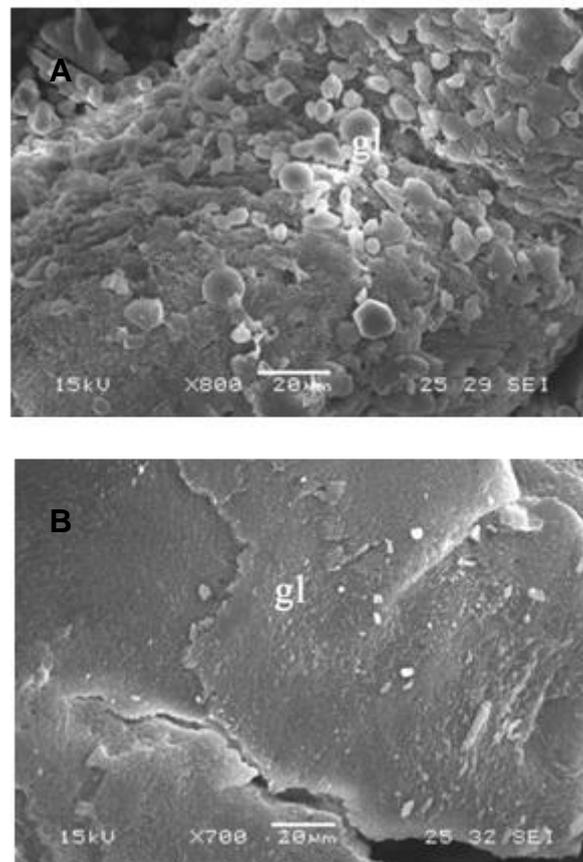
Los grupos fueron: control (no tratado), grupos tratados con las NCLs blanco y cargadas con ABZ y la suspensión de ABZ. El tratamiento fue por vía oral cada 24 h por 30 días seguidos a la infección (dosis de ABZ: 5 mg/kg). Se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los pesos de los quistes recuperados del grupo ABZ-NCLs, los controles, las NCLs blanco y el tratamiento con la suspensión de ABZ. (\*) Reducción significativa del peso de los quistes ( $p < 0,001$ ) en el grupo ABZ-NCLs.

La **figura 6.8.** muestra la apariencia ultraestructural de la capa germinativa luego de los estudios en MEB y MET realizados en quistes provenientes del grupo control. Todos los quistes presentaron en MEB la estructura multicelular característica (**figura 6.8.A.**). En MET, la capa laminar se presentó con su habitual estructura amorfa y altamente glicosilada. Hacia el interior se observó el tegumento del parásito, un tejido sincicial con numerosas microtriquias protruyendo hacia la capa laminar. Más internamente, la capa germinativa que contiene numerosos tipos celulares, se mostró inalterada (**figura 6.8.B.**). En contraste, el estudio ultraestructural de los quistes desarrollados en los ratones tratados con ABZ-NCLs o suspensión de ABZ, evidenció cambios en la capa germinativa con claros signos de destrucción celular. Sin embargo, la extensión en el daño resultó ser mayor luego de la administración de ABZ-NCLs comparada con la suspensión-(**figura 6.9.A.y B.**).



**Figura 6.8. Microfotografías de MEB de quistes de *E. granulosus* obtenidos de ratones experimentalmente infectados.**

A) Detalle de la capa germinativa de un quiste del grupo control. Notar la abundancia de células (1200x). B) MET de quiste de *E. granulosus* del grupo control (1200x). Capa germinativa (cg), capa laminar (cl), microtriquias (mq), citoplasma distal (cd), núcleo (n).



**Figura 6.9. Microfotografías de MEB de los quistes recuperados de los animales tratados.**

A) Microfotografía del grupo tratado con la suspensión de ABZ (dosis de ABZ: 5mg/kg peso). Se observan alteraciones en la capa germinativa (gl) mientras que apenas pocas células mostraron una morfología intacta (x800). B) MEB de los quistes obtenidos de los animales tratados con ABZ-NCLs. La capa germinativa se encuentra alterada y solo fragmentos celulares pueden observarse (700x).

Luego de la administración oral de ABZ, ambas formulaciones (ABZ-NCLs y ABZ suspensión) demostraron un efecto quimioproláctico. Sin embargo, ABZ-NCLs mostró un efecto significativamente mayor en comparación con la suspensión. En primer lugar, el 40% de los ratones que recibieron ABZ-NCLs no desarrollaron ningún quiste mientras que en todos los ratones tratados con la suspensión de ABZ la infección progresó. El efecto perjudicial del fármaco sobre los protoescolices de *E. granulosus* en el momento de la infección podría ayudar a explicar la falta de desarrollo de quistes observados en algunos animales del grupo ABZ-NCLs. Adicionalmente, se hallaron diferencias significativas en el peso de los quistes obtenidos en estos grupos. El peso de los quistes obtenidos de ABZ-NCLs o de la suspensión de ABZ mostraron una reducción de 94% y del 71% respectivamente. (**tabla 6.5.**) Así, ABZ-NCLs no sólo reduciría el número de quistes desarrollados sino que también inhibirían el desarrollo de una hidatidosis secundaria en ratones.

#### **6.4. Conclusiones del capítulo**

Las NCLs conteniendo ABZ fueron desarrolladas según el método de inversión de fases. Las nanodispersiones obtenidas de esta manera poseen un tamaño de partícula de aproximadamente 50 nm con un IP menor a 0,2, y una eficiencia de encapsulación mayor al 90%. Mostraron ser estables por al menos 60 días según los resultados de los estudios llevados a cabo a 4 °C y 25 °C. La liberación de ABZ desde las NCLs resultó dependiente principalmente de las interacciones y la partición del fármaco entre el núcleo lipídico y el medio acuoso externo.

Respecto a los ensayos *in vivo*, las ABZ-NCLs mostraron una eficacia profiláctica significativamente mayor que la suspensión de ABZ administrada por vía PO.

Si bien se observaron cambios en la capa germinativa de los quistes desarrollados en los ratones tratados con ABZ-NCLs o con la suspensión de ABZ, la extensión del daño parece ser significativamente mayor luego del tratamiento con ABZ-NCLs comparado con la suspensión. Por lo expuesto anteriormente, este trabajo sería el primero en reportar el efecto *in vivo* de un sistema portador nanométrico para ABZ contra el estadio larval de *E. granulosus*. Basado en estos resultados, ABZ-NCLs podría ser una estrategia interesante para prevenir la hidatidosis secundaria.

## **CAPITULO 7**

### **FUNCIONALIZACION DE LA SUPERFICIE DE NANOCAPSULAS LIPIDICAS MEDIANTE LA TECNICA DE POST-INSERCIÓN**





## Capítulo 7

# *Funcionalización de la superficie de nanocápsulas lipídicas mediante la técnica de post-inserción*

### **7.1. Introducción**

En el campo de la nanomedicina y más específicamente en el desarrollo de sistemas farmacéuticos formulados a escala nanométrica, se espera que las superficies de las nanopartículas presenten diferentes propiedades que favorezcan el transporte activo y pasivo de fármacos [Gupta y Gupta 2005; Pellegrino y cols., 2005; Nasongkla y cols.,2006; Byrne y cols.,2008] y eviten el reconocimiento y la captura del sistema por parte de las células del sistema inmune [Fang y cols., 2009]. La estrategia más exitosa parece ser el uso de polímeros hidrofílicos que protegen las partículas del reconocimiento por parte del sistema del complemento. Estos portadores modificados estabilizados estéricamente también son conocidos como sistemas “fantasma”. El polietilenglicol (PEG) es el excipiente más frecuentemente utilizado dado que las moléculas de PEG pueden formar una cubierta hidrofílica protectora en la superficie de las nanopartículas que permite “ocultarlas” de la interacción con los componentes de la sangre [Owens y Peppas, 2006].

De manera amplia, puede decirse que todos los sistemas portadores descritos en la literatura científica tienen la misma estructura general, es decir una superficie

interna, una superficie externa y una interfase. En algunos casos, la fase externa es la que provee las propiedades de interés y sirve de base para futuras aplicaciones. De este modo, no es coincidencia que el desarrollo de la ingeniería de materiales sea una herramienta emergente en el diseño de sistemas a escala nanométrica.

En forma paralela, en las últimas décadas se han investigado numerosas estrategias propuestas como vehículos para antígenos proteicos; principalmente la atención se ha centrado en el área de formulación de vacunas, utilizando diversos compuestos/moléculas para obtener nanopartículas, que permitan liberar el antígeno y/o adyuvante de manera controlada. Las nanopartículas también han sido exploradas por sus propiedades adyuvantes intrínsecas, con antígenos adsorbidos en su superficie o incluidos dentro del núcleo. Se ha reportado la capacidad adyuvante de diferentes sistemas particulados que contienen uno o más antígenos, como los liposomas [Zhao y cols., 2009; Kwong y cols., 2011] y los complejos inmunoestimulantes [Beg y cols., 2012]. No obstante, aún continúa siendo un desafío el desarrollo y la formulación de nuevas vacunas o bien la incorporación a las ya existentes de nuevos adyuvantes aún en fase de estudio clínico.

Por su parte, las nanocápsulas lipídicas han sido originalmente diseñadas para la vectorización de sustancias hidrófobas y por ello están constituidas por una fase lipofílica, por lo general, triglicéridos de cadena media que constituyen el núcleo de la cápsula. La vehiculización de fármacos hidrofílicos también es posible pero empleando algunas estrategias tales como la solubilización del fármaco en micelas invertidas y posterior incorporación al sistema, lo que conlleva a realizar cambios radicales en los protocolos de obtención establecidos y por lo tanto modificaciones de las técnicas desde el comienzo, con el evidente costo material y económico adicional. Teniendo en consideración lo expuesto anteriormente, ha surgido un nuevo enfoque al respecto: en lugar de trabajar en la modificación de los procesos de obtención, se considerará a las nanocápsulas obtenidas por el método clásico como plataformas nanométricas sobre las que pueden realizarse modificaciones de forma racional y controlada. De esta manera, surgen las técnicas de post-inserción como una alternativa a la modificación del proceso de obtención. Así, las NCLs pueden ser modificadas mediante la técnica de post-inserción de moléculas anfifílicas en su cubierta semirrígida. El anfífilo por lo general pertenece a la familia de los fosfolípidos pegilados o a la familia de los

esteroles pegilados. [Steenpaß y cols., 2006; Pan y cols., 2007; Zhao y cols., 2007] La unión de los polisacáridos a la superficie ofrece la ventaja de modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas del núcleo de estas partículas. Otros de los motivos que promueven este tipo de post-inserción es la mejora en la biodistribución del fármaco [Hoarau y cols., 2004; Richard y cols., 2008; Morille y cols., 2010], el direccionamiento del mismo a los órganos/tejidos blanco [Morille y cols., 2009] o bien su empleo como base para la posterior unión de otros compuestos activos [Béduneau y cols., 2007a;2008; Zou y cols., 2008].

Según esta última aplicación, las NCLs decoradas con un polímero en su superficie han sido propuestas como una plataforma prometedora para la unión de ligandos blanco, por ejemplo péptidos y proteínas o bien moléculas de interés en terapia génica, como por ejemplo, ARN pequeño de interferencia o silenciador (en inglés, siRNA).

El quitosano o quitosano (Ch) es un polímero ampliamente utilizado para mejorar las propiedades mucoadhesivas de nanopartículas [Mazzarino y cols., 2012]. Este compuesto, como así también su análogo lipofílico lipochitosan (LCh) presentan carga neta positiva, ofreciendo de esta manera la posibilidad de unir moléculas cargadas negativamente en la superficie de las nanocápsulas por interacciones electrostáticas [Hirsjärvi y cols., 2010].

Basados en estos antecedentes, el objetivo de este capítulo ha sido la obtención de NCLs por el método de inversión de fases (MIP) seguido de la funcionalización de su superficie mediante la adición del polímero catiónico LCh por la técnica de post-inserción y la evaluación de la estabilidad y toxicidad del sistema. Este capítulo incluye también los resultados del posterior acomplejamiento por interacción electrostática con un oligodeoxinucleótido fosforotionato (CpG-ODN) de carga neta negativa. Finalmente se evaluó la estabilidad de este nuevo sistema y la respuesta inmunológica en líneas celulares de macrófagos.

## **7.2. Materiales y Métodos**

### **7.2.1. Obtención de las NCLs con superficie modificada**

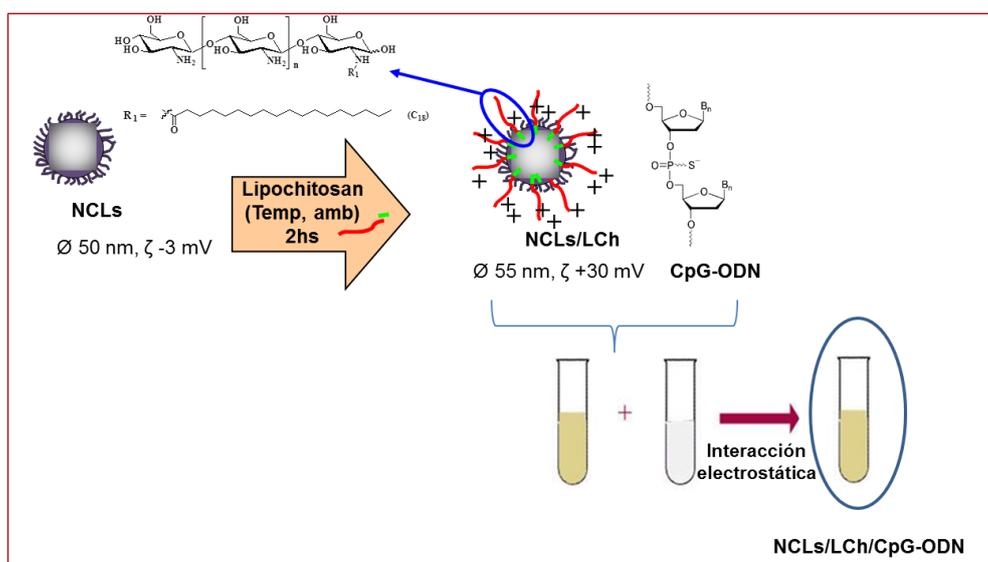
Las NCLs se prepararon por el método de inversión de fases descrito anteriormente [Heurtault y cols., 2002a]. La síntesis de LCh se presenta esquemáticamente en la figura 3 del anexo II de materiales y métodos. Se ensayaron diferentes concentraciones de NCLs blanco (15-115 mg/ml) incubadas con diferentes concentraciones de LCh (10-40 mg/ml) con agitación constante a temperatura ambiente. El progreso de la inserción fue controlada mediante la determinación del tamaño medio de partícula (TMP) y el potencial zeta (PZ) medido a diferentes tiempos (entre 1-24 horas) y se empleó el test de ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los valores observados [Hirsjärvi y cols., 2010]. Basados en estos estudios previos, se determinó que la concentración final óptima (en términos de toxicidad) de LCh y NCLs luego de la inserción sería igual a 20 y 76,67 mg/ml respectivamente (ver siguiente sección).

Para llevar a cabo la post-inserción, las NCLs fueron incubadas con la cantidad pre establecida de LCh bajo agitación magnética a 60 °C por 2 horas con un exceso de la molécula anfifílica [Perrier y cols., 2010] (**figura 7.1.**). Luego, la eficiencia de la inserción se verificó mediante la separación del exceso de LCh no adsorbido a la superficie por centrifugación (4000 rpm, 15 minutos) utilizando un dispositivo de centrifuga (PallNanosep®, MWCO 10 kDa) (Pall Corporation, Ann Arbor, EEUU) y analizando el filtrado. Las NCLs ahora con la post-inserción fueron dializadas empleando una membrana Spectra/Por de celulosa regenerada (50 kDa MWCO, Spectrum Laboratories, Inc., Breda, Países Bajos) por 24 horas con agitación magnética. Nuevamente el resultado de la modificación de la superficie se verificó mediante la determinación del TMP y PZ. Las mediciones se basaron en las técnicas descritas en detalle en la sección M.6. del anexo II.

El aprendizaje de la técnica y los ensayos de caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas fueron llevadas a cabo en estrecha colaboración con el Dr. Jean-Pierre Benoit y el grupo de investigación que dirige perteneciente al laboratorio INSERM U1066, Université d' Angers (Francia).

### 7.2.2. Incorporación de oligodeoxinucleótidos con motivos CpG

CpG-ODN fue adsorbido luego de una agitación manual suave por 10 minutos de los tubos que contenían previamente NCLs/LCh a temperatura ambiente (**figura 7.1.**). La cantidad de CpG-ODN adsorbida en la superficie de las NCLs debería determinarse mediante el método convencional: separación del fármaco no encapsulado en las NCLs por centrifugación usando un filtro especial (Pall Nanosep, derivado de celulosa, 10 kDa) y analizando el filtrado por HPLC según la técnica desarrollada en el capítulo 2. No obstante, debida a la interacción que experimenta CpG-ODN con varios tipos de derivados de celulosa, comprobada experimentalmente antes de realizar los estudios de liberación del capítulo 3, la determinación de la cantidad adsorbida se realizó de una manera indirecta a través del aumento del tamaño y variación del potencial electrocinético (en signo y magnitud) de las NCLs/LCh luego del agregado de concentraciones crecientes de CpG-ODN.



**Figura 7.1.** Esquema de obtención las NCLs con superficie funcionalizada.

*En una primera etapa se obtiene la adsorción de LCh por la técnica de post-inserción. Posteriormente por interacción electrostática se acompleja el oligodeoxinucleótido de carga opuesta. Se representa la estructura química de LCh post-insertado en la superficie de las NCLs.*

### 7.2.3. Estudios de estabilidad y caracterización fisicoquímica de los sistemas

El resultado de la modificación de la superficie se verificó por mediciones de TMP y PZ según se detalla en M.6. del anexo II. La determinación del tamaño de partícula se basó en la espectroscopía de correlación-fotón (ECF) y los tamaños se presentan sobre

la base de las distribuciones de volumen junto con los índices de polidispersidad (IP). Las movilidades electroforéticas se convirtieron a PZ utilizando la ecuación de Smoluchowski. La estabilidad de estas NCLs (NCLs/LCh y NCLs/LCh/CpG-ODN) se evaluó después del almacenamiento a 4 °C y a temperatura ambiente durante 30 días. La distribución del TMP y el PZ se determinaron después de la filtración de la muestra utilizando un filtro Minisart® 0,22µm (Sartorius, Goettingen, Alemania). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  DS.

#### **7.2.4. Evaluación de la respuesta inmune en línea celular de macrófagos**

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune de los sistemas, se emplearon cultivos celulares obtenidos a partir de los bazos de ratones según el protocolo descrito oportunamente en la sección M.10. del anexo I. Se determinaron las citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-10, IL-12) siguiendo el protocolo M.11. y M.12 del anexo I. Para ello, se emplearon bazos de ratones de la cepa Balb-C y TLR4 -/- para cerciorarse de que la respuesta obtenida no se debiera a la contaminación de la formulación con lipopolisacárido (LPS). En cada pocillo se colocó un volumen total de 500 µl constituido por 250 µl de células de bazo, 200 µl de medio y 50 µl de NCLs/LCh-CpG/ODN variando la cantidad de este último para obtener las cuatro concentraciones finales a ensayar. Estas últimas, son las mismas que se evaluaron en los estudios de caracterización y estabilidad *in vitro*. La **figura 7.2.** presenta el esquema de trabajo.

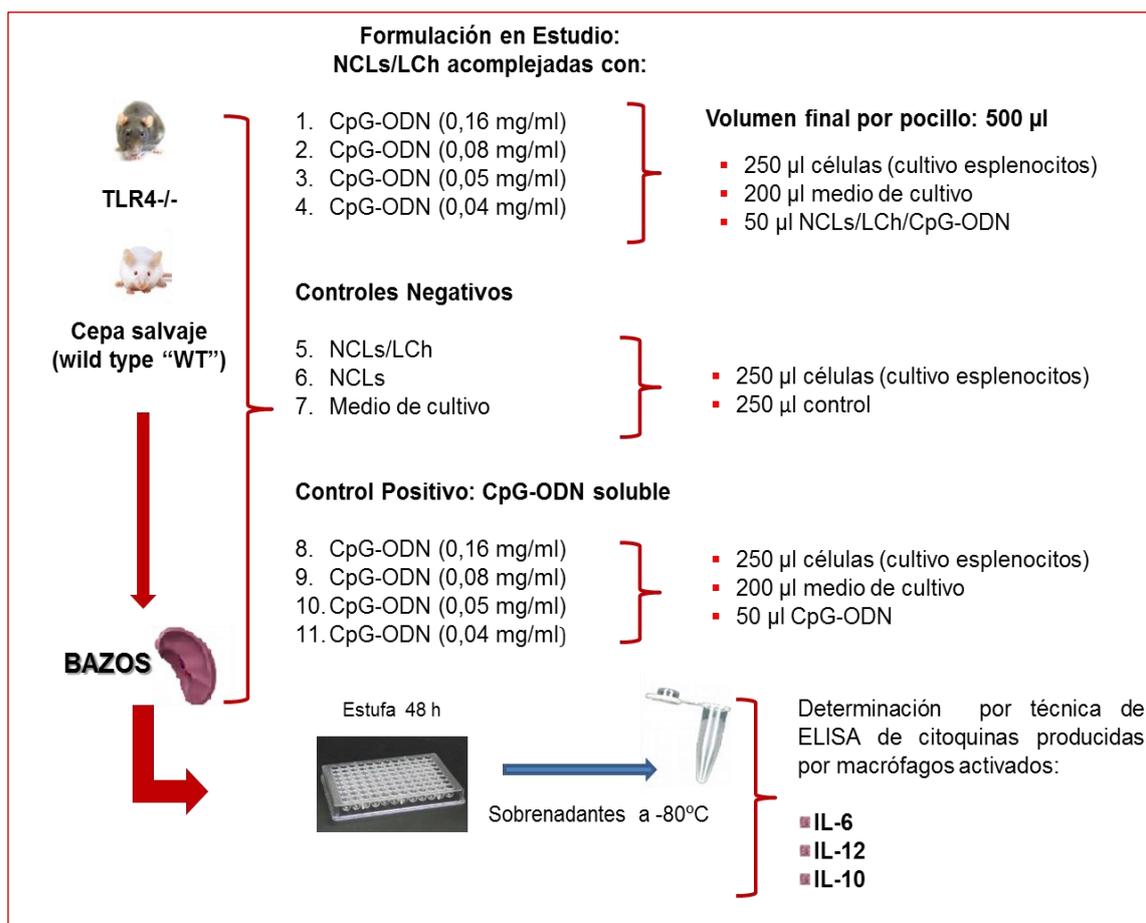


Figura 7.2. Esquema de trabajo para evaluar la respuesta inmune.

Se tomaron los bazos de ratones hembras BALB/c y TLR 4<sup>-/-</sup> de 3 meses y se procesaron según se describe en M.10. del anexo I. Luego se colocaron 250 µl del cultivo a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células por pocillo y 250 µl del tratamiento o el control (1 al 11 por triplicado) en una placa de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C por 48h, luego se centrifugaron (1500 rpm a 4 °C) y los sobrenadantes se colocaron en tubos rotulados a -80 °C para posterior determinación de citoquinas proinflamatorias por la técnica de ELISA según M.12. del anexo I.

### 7.3. Resultados y Discusión

#### 7.3.1. Obtención, caracterización fisicoquímica y evaluación de la estabilidad de NCLs modificadas

El lipochitosan (**fig.3 anexo II**) es un polisacárido lineal compuesto por grupos  $\beta$  (1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil D-glucosamina (unidades acetiladas). Esta modificación, como la acilación puede ser llevada a cabo a través de los grupos hidroxil y/o amino de D-glucosamina [Hirano y cols., 1976 y 2002; Hirano y Ohe 1975]. El Ch con un peso molecular mayor al usado en este estudio también puede reaccionar con el anhídrido esteárico como se describe en el anexo II, pero en

vez de disolverse, se hincha en agua. Así, sólo el Ch de bajo peso molecular puede ser considerado como un surfactante hidrofílico candidato para ser acomplejado.

La técnica de post-inserción ha sido originalmente usada para la pegilación o incorporación de moléculas blanco en la superficie de los liposomas [Uster y cols., 1996; Sou y cols., 2000; Fenske y cols., 2001; Moreira y cols., 2002]. En el caso de NCLs, se ha reportado que en lugar de deberse a los fosfolípidos de la superficie (Lipoid®), la incorporación de las moléculas anfifílicas es controlada por la conformación de las cadenas de polietilenglicol (PEG, Solutol®) la cual se ve favorecida por un aumento de la temperatura [Béduneau y cols., 2007b]. La conformación que adopta en forma de “cepillo” a elevadas temperaturas permite una mejor penetración de la molécula anfifílica entre las cadenas de PEG.

No obstante, llega un punto donde la densidad de PEG en la superficie actúa como una barrera estérica que impide continuar con la post inserción [Sou y cols., 2000]. De este modo, los parámetros más importantes que gobiernan la inserción son el tiempo de incubación, la temperatura y la concentración de la molécula a ser insertada. Debe tenerse siempre en cuenta que las modificaciones en la superficie de las partículas serían imposible si las partículas son demasiado pequeñas. De la misma manera, las modificaciones químicas interfaciales dependen fuertemente de la accesibilidad de los reactivos. Esta accesibilidad esta también muy relacionada con el radio de curvatura de las partículas. Así, resulta evidente la necesidad de controlar la proporción de moléculas acomplejadas para evitar cualquier tipo de inestabilidad coloidal, como la floculación.

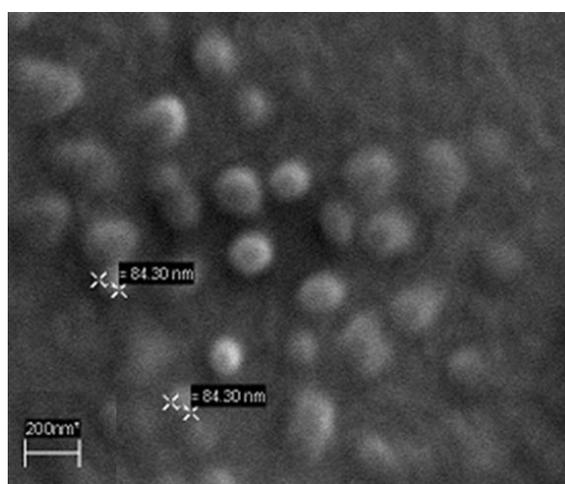
En estudios previos se evaluó la incubación de diferentes concentraciones de LCh y de NCLs variando el tiempo y la temperatura de incubación [Hirsjärvi y cols., 2010].

En este caso (**tabla 7.1.**), se evaluaron en términos de estabilidad fisicoquímica dos tamaños nominales de partículas (50 y 100nm) a una concentración preestablecida y el posterior acomplejamiento con una concentración fija de LCh. Se observa que las NCLs blanco presentan un TMP ligeramente menor antes de la incubación y un PZ negativo atribuible a los grupos PEG del Solutol® que forman dipolos capaces de interaccionar con contra-iones o dipolos del agua [Vonarbourg y cols., 2005]. El ligero aumento de tamaño y el cambio de signo del PZ luego de la post-inserción confirman el éxito de la modificación de la superficie. Cabe destacar que las suspensiones de

nanopartículas continuaron siendo monodispersas ( $IP < 0,2$ ) en los dos casos y para llevar a cabo los estudios posteriores se seleccionaron las NCLs de 50nm. La **figura 7.3.** presenta una microfotografía de estos últimos sistemas.

**Tabla 7.1. Caracterización fisicoquímica (TMP, IP y PZ) de dos NCLs blanco antes y después de la técnica de post-inserción.**

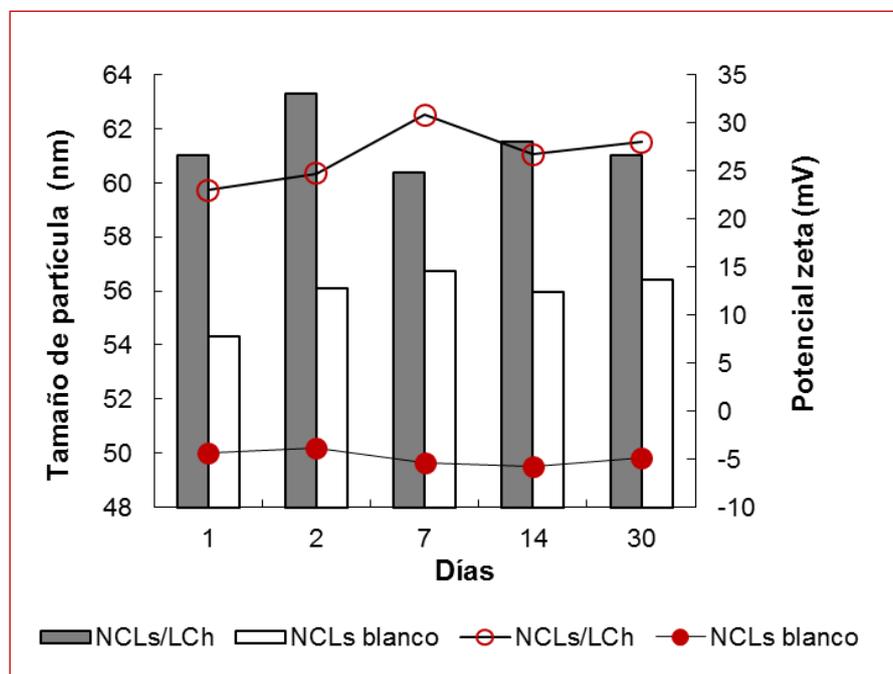
Formulación	LCh (20 mg/ml)	TMP (nm)	IP	PZ (mV)
NCLs 50nm	-	56±2	0,08	-5,2±0,2
NCLs 100nm	-	100±3	0,04	-4,5±0,3
NCLs 50 nm	si	110±1	0,09	24±1
NCLs 100nm	si	60±2	0,10	28,3±0,9



**Figura 7.3. Microfotografías de MEB de una nanosuspensión de NCLs de 50nm luego de la post-inserción con LCh. Magnificación 8000x.**

La estabilidad de las partículas está garantizada por la baja solubilidad en agua del núcleo lipídico y el uso de una compleja estructura de lípido/tensioactivo. Se ha reportado que la longitud de las cadenas de PEG está correlacionada con la adsorción de proteínas y el reconocimiento de las NCLs por parte del sistema inmune [Vonarbourg y cols., 2006]. Por lo tanto, al modificar la superficie de estas partículas, debe evaluarse nuevamente la estabilidad de los sistemas. La **figura 7.4.** presenta los resultados obtenidos. Al igual que lo observado en estudios previos [Heurtault y cols., 2003c; Delmas y cols., 2011], las formulaciones fueron estables en el período de tiempo estudiado observándose la monodispersidad en el tamaño de las partículas y el cambio de signo del PZ luego de la post-inserción. En este punto debe aclararse que la discrepancia en los valores de PZ de las NCLs blanco reportados en los capítulos 5 y 6

( $-20\pm 3$  y  $-19\pm 3$  respectivamente) respecto a los informados en este capítulo se debe a un cambio en el lote de excipientes usados para la obtención de las partículas y por ello esta diferencia no será considerada como significativa.



**Figura 7.4. Estabilidad de una formulación de NCLs blanco antes y luego de la post-inserción de LCh en su superficie.**

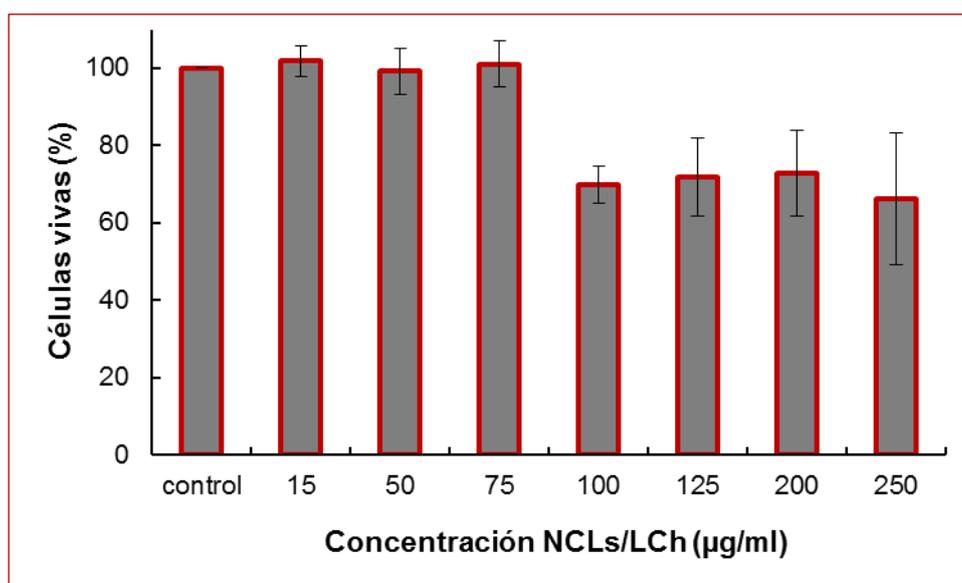
*Se evaluó el tamaño medio de partícula y el potencial z de muestras de NCLs/LCh conservadas a 4 °C por un período de 30 días. (n=3 de cada formulación).*

### 7.3.2. Obtención, estabilidad y capacidad máxima de acomplejamiento de NCLs/LCh con CpG-ODN

De modo general, la técnica de post-inserción se utiliza principalmente de dos maneras para insertar un compuesto en la superficie de las nanopartículas. Una de ellas es la incubación térmica de micelas funcionalizadas compuestas por el anfífilo de interés junto con las nanocápsulas. Esto conduce directamente a la funcionalización de las nanopartículas con una cantidad apropiada de un determinado anfífilo. Alternativamente, la técnica se puede emplear para introducir un ligando específico que puede reaccionar después con una amplia gama de sustancias químicas, o bien ejercer su acción directamente. Con este último objetivo, se evaluó entonces el acomplejamiento de un oligodeoxinucleótido con carga neta negativa, que se emplea como adyuvante de vacunas, ampliamente descrito y caracterizado en el capítulo 3 y

4. En primer lugar a fin de seleccionar una concentración fija de NCLs/LCh para luego llevar a cabo el acomplejamiento, se evaluó la toxicidad celular de diferentes concentraciones de NCLs/LCh. Los detalles del ensayo se describen en el apartado M.18. del anexo II.

Los resultados se presentan en el **gráfico 7.5**. Como puede observarse, la viabilidad de las células se mantiene casi en el 100% hasta una concentración de aproximadamente de 75  $\mu\text{g/ml}$  de NCLs/LCh; luego de este valor la concentración de partículas comienza a ser tóxica lo que se manifiesta en una reducción al 70% de la viabilidad celular. De acuerdo con estos resultados, se fijó para los ensayos posteriores una concentración igual a 76,67  $\text{mg/ml}$  para las NCLs/LCh asegurando que se cuenta con una formulación final lo suficientemente concentrada en nanocápsulas y que no produce la muerte celular.

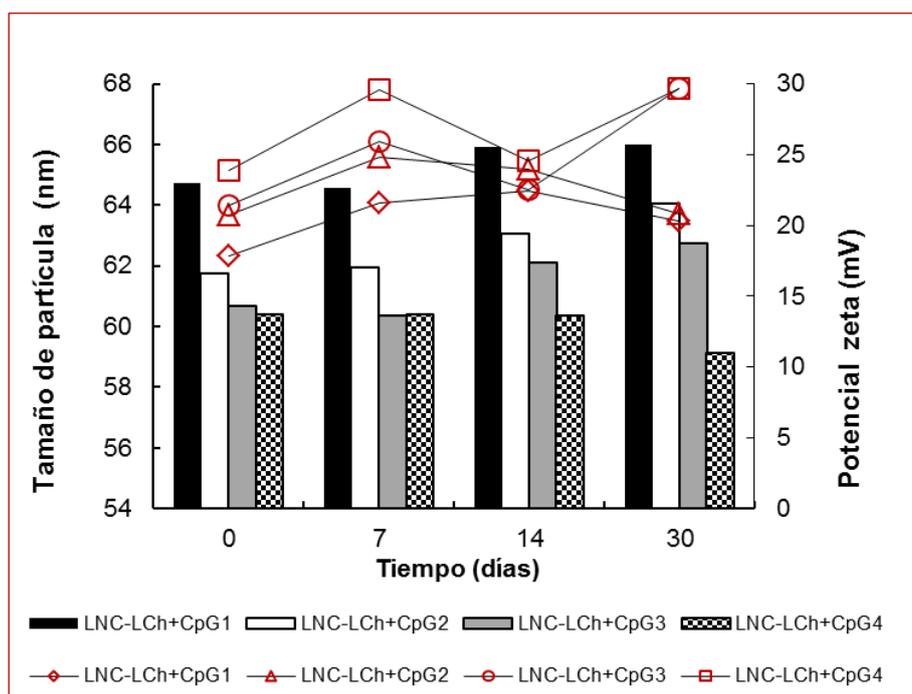


**Figura 7.5.** Citotoxicidad de las nanocápsulas evaluadas por el ensayo de MTS.

*Las células U87MG se colocaron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con distintas concentraciones de NCLs/LCh: 15, 50, 75, 100, 125, 200 y 250  $\mu\text{g/ml}$  por pocillo. Las células sin tratamiento fueron tomadas como referencia (100%). Los resultados se expresan como el porcentaje de la densidad óptica de las células, como la media  $\pm$  DS de 3 pocillos en 2 experimentos independientes.*

Luego de definir la concentración de NCLs/LCh, se procedió a ensayar diferentes concentraciones de CpG-ODN a adsorber en la superficie de las nanocápsulas funcionalizadas. En una primera instancia se evaluaron cuatro concentraciones y se realizó un estudio de estabilidad a 4  $^{\circ}\text{C}$  y por 30 días como anteriormente se realizó

para las NCLs/LCh. Como se presenta en la **gráfica 7.6**, el tamaño de partícula aumenta con el aumento de la concentración de CpG-ODN. Por otra parte, los PZ fueron siempre positivos. Este último resultado confirma nuevamente el éxito de la adsorción de LCh a la superficie de las NCLs tras la técnica de post-inserción pero indica a su vez que la superficie de las nanocápsulas aún no ha llegado al límite de saturación; en otras palabras, la superficie no se encuentra completamente cubierta por las moléculas de CpG-ODN. En este caso, el PZ debería ser próximo a cero y luego revertir su signo.



**Figura 7.6. Estabilidad de LNCs/LCh acomplejadas con CpG-ODN.**

*Distribución de TMP y PZ evaluados por 30 días para formulaciones de NCLs/LCh acomplejadas con cuatro concentraciones crecientes de CpG-ODN: 1) CpG1 (0,16 mg/ml); 2) CpG 2 (0,083 mg/ml); 3) CpG 3 (0,055 mg/ml) 4) CpG 4 (0,042 mg/ml). Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.*

La próxima instancia fue determinar la capacidad máxima de acomplejamiento de CpG-ODN en la superficie. En este caso, no hablamos de capacidad máxima de carga dado que el fármaco no está solubilizado en el interior lipídico de la nanocápsula sino que se encuentra adsorbido en su superficie. Cabe aclarar que la determinación se llevó a cabo de una manera indirecta y por lo tanto menos exacta; es decir, no se cuantificó directamente la concentración de CpG-ODN a través del método

convencional de centrifugación y posterior cuantificación del sobrenadante por una técnica de HPLC, sino que se procedió a aumentar la concentración de CpG-ODN bajo el supuesto que el tamaño de partícula aumentaría conforme aumenta la cantidad de CpG-ODN adsorbido y luego se volvería estable y constante. Por otra parte, se fueron determinando los PZ para corroborar el mismo fenómeno: el PZ pasaría de ser positivo al inicio y con el aumento de la cantidad de CpG/ODN adsorbido llegaría a la neutralidad para finalmente mantenerse ligeramente negativo y constante. De este modo, se llevó a cabo un nuevo experimento en idénticas condiciones al anterior pero aumentando la concentración de CpG-ODN. En la **tabla 7.2.** se presenta la concentración y composición de las muestras ensayadas.

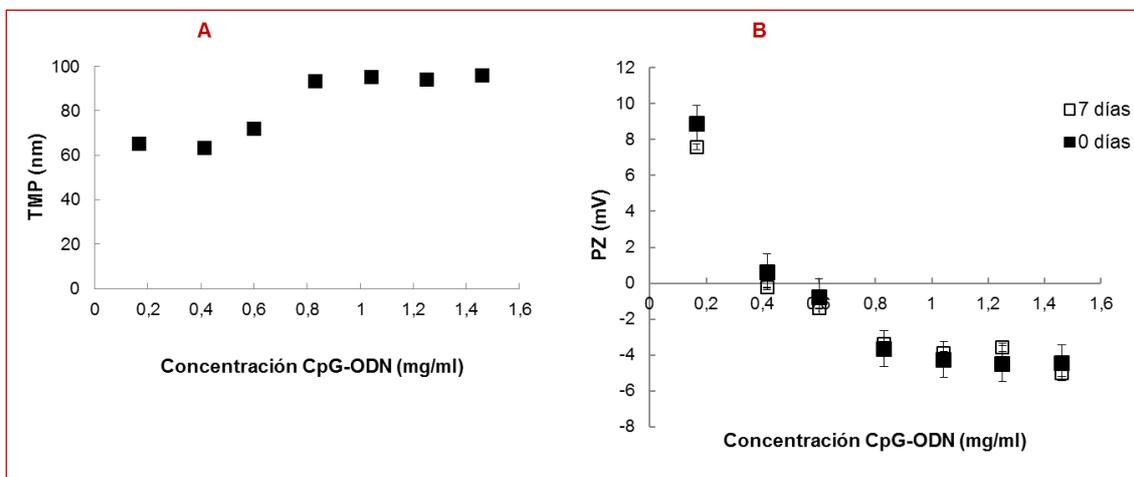
**Tabla 7.2. Composición, tamaño de partícula y potencial z de las formulaciones de NCLs/LCh/CpG-ODN ensayadas.**

NCLs/LCh ( $\mu$ l)	Concentración final CpG-ODN [mg/ml]	TMP (nm)	PZ (mV)
50	0,166	65,0 $\pm$ 0,9	-4,48 $\pm$ 0,03
50	0,42	63,2 $\pm$ 2,7	-4,5 $\pm$ 0,2
50	0,6	72,1 $\pm$ 2,9	-4,5 $\pm$ 0,2
50	0,83	93,4 $\pm$ 0,4	-4,3 $\pm$ 0,1
50	1,04	95 $\pm$ 2	-3,65 $\pm$ 0,07
50	1,25	94 $\pm$ 2	-0,77 $\pm$ 0,03
50	1,46	96,0 $\pm$ 0,4	0,62 $\pm$ 0,02
50	1,66	97 $\pm$ 1	8,9 $\pm$ 0,2

Como se observa en la **figura 7.7.** y en la **tabla 7.2.**, el TMP aumenta hasta alcanzar una concentración aproximada de 0,6-0,8 mg/ml de CpG-ODN. A partir de allí, a pesar de que aumente la concentración de CpG-ODN este exceso no se adhiere a la superficie. Estos resultados se confirman con la determinación del PZ para las mismas muestras. A medida que aumenta la concentración de CpG-ODN el PZ comienza a disminuir (adquirir valores absolutos menores) hasta intersectar el eje de las abscisas donde el valor del potencial z es cero. En este punto puede asumirse que las NCLs presentan prácticamente la misma cantidad de cargas positivas y negativas. Luego el valor del PZ es ligeramente negativo y tiende a estabilizarse entre -4 y -5 mV.

Coincidentemente con lo que ocurría con el TMP, el valor del PZ en el que se produce la inversión del signo corresponde a una concentración de CpG-ODN

alrededor de 0,6 mg/ml. En esta gráfica se presentan también los valores de PZ obtenidos luego de 7 días de conservación de las muestras a 4 °C corroborándose la estabilidad de las mismas en el período de tiempo evaluado.



**Figura 7.7. Determinación de la capacidad máxima de complejamiento.**

La determinación se llevó a cabo de modo indirecto a través de la medición de A) Tamaño medio de partícula (TMP) y B) El potencial Z (PZ) de formulaciones de NCLs/LCh complejadas con 7 concentraciones crecientes de CpG-ODN.

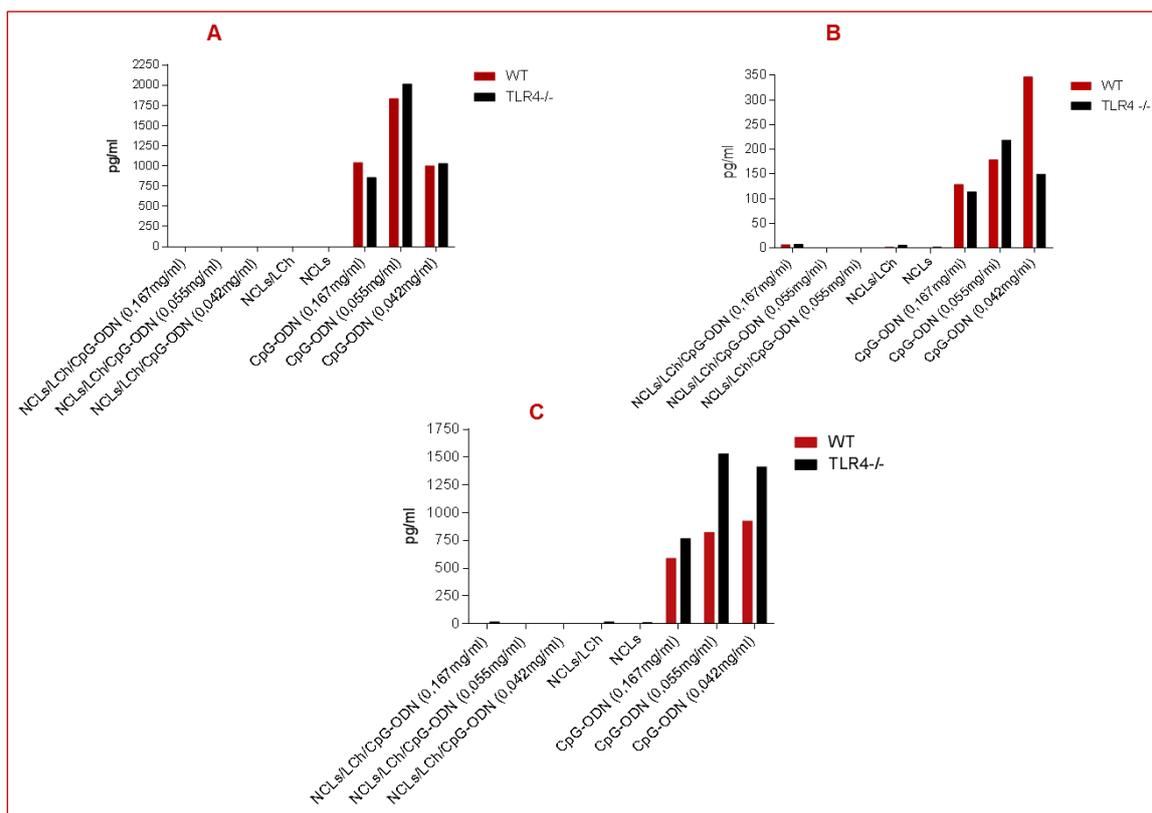
### 7.3.3. Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune inducida por CpG-ODN vehiculizado en NCLs/LCh

Los primeros resultados reportados mostraron que la adición de CpG-ODN a los antígenos proteicos convencionales como OVA aumentaba la producción de anticuerpos aproximadamente tres veces en comparación con la administración del antígeno sólo [Klinman y cols., 1999]. Posteriormente se ha demostrado que el efecto adyuvante de CpG-ODN podría incrementarse si se mantiene su proximidad al antígeno. De este modo, otros estudios han revelado que la actividad se mejora aún más mediante la vinculación de CpG-ODN directamente al antígeno, co-encapsulándolo por ejemplo en liposomas o micelas [Adams y cols., 1990; Xie y cols., 2005]. En línea con esto, en el capítulo 3 y 4 del presente trabajo doctoral, se evaluó la vehiculización de ambas moléculas en un sistema portador basado en la autoagregación de un surfactante anfílico derivado de la vitamina C. En este contexto, el objetivo en este capítulo fue evaluar el perfil de citoquinas de células de bazo estimuladas con CpG-ODN complejado con NCLs/LCh y establecer una

comparación cualitativa con la respuesta obtenida para CpG-ODN vehiculizado en coageles de ASC16. Para ello, se empleó el protocolo de trabajo descrito anteriormente y los ensayos también se llevaron a cabo con ratones TLR4<sup>-/-</sup>.

La **figura 7.8.** muestra los perfiles de IL-6, IL-10 e IL-12 obtenidas de los sobrenadantes luego del tratamiento de los bazos en ambas cepas de ratones. Las citoquinas secretadas por los macrófagos en respuesta a un estímulo activador constituyen un grupo de moléculas estructuralmente diverso e incluye la IL-6 (promueve la activación de linfocitos y la producción de anticuerpos), IL-12 (activa células NK e induce la diferenciación de células T CD4 a células Th1) y la IL-10. Si bien esta IL también es producida por los macrófagos activados pero actúa como regulador por retroalimentación negativa inhibiendo la síntesis de IL-12, la expresión de co-estimuladores y de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, poniendo fin a la respuesta y devolviendo el sistema inmune a su estado de reposo.

Lo primero que debe destacarse es que la respuesta de citoquinas obtenida para el grupo NCLs/LCh/CpG-ODN de los ratones TLR4<sup>-/-</sup> es idéntica a la obtenida para el mismo grupo pero en los ratones Balb C; lo que sugiere que la respuesta es independiente de la señalización vía TLR4 o de la contaminación con LPS. Por otra parte, CpG-ODN en su forma soluble induce una respuesta de citoquinas sin diferencias estadísticamente significativas entre los ratones Balb C y los ratones TLR 4<sup>-/-</sup>. De manera contraria a lo ya reportado para Coa-ASC16 como sistemas portador nanométrico propuesto para CpG-ODN, la vehiculización de esta molécula en NCLs/LCh anula el efecto inmunoestimulante del mismo.



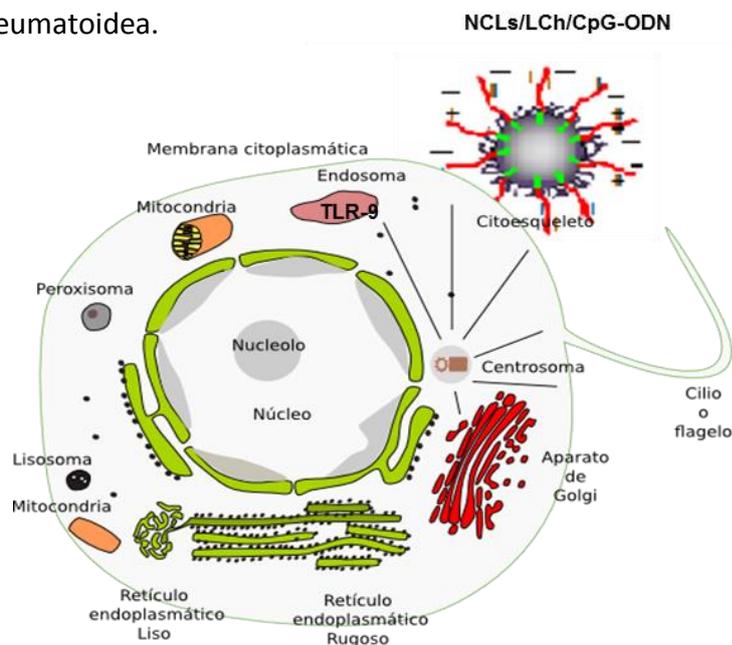
**Figura 7.8. Producción de citoquinas.**

Una suspensión de células de bazo ( $1 \times 10^6$ /pocillo) de ratones BALB/c se colocaron en una placa de 96 pocillos y se incubó con medio (control negativo), la formulación en estudio o los controles positivos (500  $\mu$ l por pocillo) por 72 horas. La producción de citoquinas se determinó por la técnica de ELISA. A) Perfil de IL-6; B) Perfil de IL-10; C) Perfil de IL-12.

En contraste con lo que ocurre con el fármaco libre, que puede atravesar la membrana plasmática por difusión activa o pasiva, la captación celular de los sistemas nanométricos generalmente requieren un proceso de endocitosis. Estudios previos reportan que la internalización de las NCLs es llevada a cabo de manera rápida por un proceso saturable mediado predominantemente por un mecanismo colesterol-dependiente y clatrina/caveola-independiente característico de la endocitosis. [Johannes y Lamaze, 2002; Conner y Schmid, 2003]. La acumulación celular y el tiempo de permanencia de las NCLs es suficiente para asegurar una adecuada biodisponibilidad intracelular de los fármacos que vehiculizan y este fenómeno no se restringe únicamente a las células cancerígenas. Además, las NCLs se localizan raramente en el lisosoma y se ha demostrado que desarrollan habilidades específicas para escapar de él [Paillard y cols., 2010]. Por otra parte, como se ha expuesto anteriormente, CpG-ODN es reconocido por el receptor TLR-9 que se expresa en

humanos de manera constitutiva en células dendríticas y células B. La localización del TLR9 dentro del endosoma permite la detección rápida y específica de ADN patógeno [Krieg y Vollmer 2007]. Luego de la endocitosis, CpG-ODN se une al receptor TLR-9 y se transloca al núcleo donde activa factores nucleares para iniciar la inducción de citoquinas y quimiocinas y modular la respuesta celular inflamatoria [Fonseca y Kline 2009].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis que se plantea es que las NCLs/LCh/CpG-ODN son internalizadas de manera rápida y por un mecanismo de endocitosis por las CPA sin embargo, presentan un acceso limitado al lisosoma o bien pueden escapar de él o una combinación de ambos eventos. La **figura 7.7.** ilustra este posible mecanismo de acción. Por otra parte, considerando el potencial riesgo de inactivación de muchos fármacos causado por las hidrolasas ácidas del lisosoma celular, el desarrollo de transportadores que puedan suprimir esta vía son de especial interés. En nuestro caso, donde se requiere una interacción ligando específica con el receptor TLR9 esto constituye una desventaja de estos sistemas; no obstante, a partir de aquí, se puede también inferir la potencial aplicación de las nanocápsulas lipídicas con superficie modificada para aquellas situaciones donde se busca inhibir/bloquear la respuesta inmunológica por ejemplo en las enfermedades autoinmunes como el lupus o la artritis reumatoidea.



**Figura 7.7.** Ilustración del posible mecanismo de acción de las NCLs/LCh/CpG-ODN luego del ingreso a una CPA que posee el receptor TLR-9.

#### **7.4. Conclusiones del Capítulo**

El proceso de post-inserción conduce a la obtención de suspensiones de nanopartículas funcionalizadas sin la necesidad de modificar el proceso de obtención de la formulación. De este modo, estas partículas cuentan con la ventaja adicional de poseer nuevas propiedades conferidas por la modificación de su superficie y convertirse de esta manera en una plataforma prometedora para el desarrollo de nuevos sistemas nanométricos con aplicaciones farmacéuticas.

Dos son los posibles resultados tras la aplicación de esta técnica según las condiciones experimentales: la inserción incompleta, que puede obtenerse si la cantidad de anfífilo no está adaptada al número y la naturaleza del receptor, y la inserción completa, que puede ser alcanzada si la relación de anfífilo/nanopartícula es correcta. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo hasta el momento que permitan determinar de manera fehaciente la cantidad de material adsorbido a la superficie. De hecho, el rendimiento de la técnica de post-inserción es difícil de evaluar. Por otra parte, es importante remarcar que las propiedades de estas nuevas estructuras se pueden modular a través de la elección de las nanocápsulas de partida, permitiendo acceder a nuevas y versátiles aplicaciones de las mismas.

La aplicación de los sistemas desarrollados y caracterizados en el presente capítulo, se centró en la evaluación *in vitro* de la respuesta inmunológica de CpG-ODN empleando estas nanocápsulas lipídicas con superficie modificada como sistemas portadores. El resultado fue la obtención de nanocápsulas estables, con buena capacidad de acomplejamiento para CpG-ODN en su superficie. No obstante, luego de la endocitosis, el proceso intracelular de liberación del fármaco depende de las propiedades intrínsecas de estos sistemas nanométricos. De este modo, estos sistemas que escapan al lisosoma, no inducen una activación del TLR-9 pero permitirían vehicular también en su núcleo fármacos sensibles a la degradación lisosomal o que requieren alcanzar un blanco de localización extra lisosoma.

Estudios complementarios deberán ser llevados a cabo en modelos murinos a fin de comprobar las hipótesis planteadas en este capítulo.

## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES GENERALES**





## Capítulo 8

### *Conclusiones Generales*

Los resultados obtenidos y discutidos durante el desarrollo de la tesis doctoral nos permitieron arribar a las siguientes conclusiones generales, las cuales pueden resumirse en los siguientes puntos:

- ❖ La autoagregación de un derivado de la vitamina C (palmitato de ascorbilo, ASC16) formando nanoestructuras denominadas coageles (Coa-ASC16) constituyen una plataforma para la administración de fármacos que necesitan amplificar su respuesta, puntualmente de CpG-ODN propuesto como adyuvante de vacunas.
- ❖ La técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación en ensayos *in vitro* de CpG-ODN resultó simple, sensible y fácilmente adaptable para la cuantificación de este compuesto en otras formulaciones farmacéuticas.

❖ La localización diferencial de CpG-ODN en las lamelas se vio reflejada en los diferentes patrones de liberación obtenidos *in vitro* como así también en el efecto protector que este portador ejerce frente a la degradación por exonucleasas. Por otra parte, la vehiculización de un antígeno modelo (OVA) y CpG-ODN en Coa-ASC16 permite una liberación controlada del adyuvante *in vitro*. Esta estrategia de formulación podría permitirnos reemplazar el uso de CpG-ODN (PS) por su análogo menos tóxico CpG-ODN (PO) en futuros ensayos de vacunación.

❖ CpG-ODN formulado en Coa-ASC16 aumenta la magnitud tanto de la respuesta humoral (IgG1 e IgG2a) como la celular (INF- $\gamma$  e IL-17) específica para OVA, comparada a la administración de CpG-ODN en solución. Además, este efecto se mantiene por un período de tiempo prolongado incluso cuando la dosis de CpG-ODN fue disminuida a la mitad.

❖ La activación del sistema inmune innato es antígeno independiente y podría luego influir sobre las células dendríticas. No obstante, al intentar aplicar este sistema a un antígeno vacunal real, vemos que la respuesta inmune específica efectivamente depende del antígeno vehiculado.

❖ Las nanocápsulas lipídicas (NCLs) son una promisorio herramienta de innovación farmacotécnica para mejorar el tratamiento con fármacos antiparasitarios (ivermectina, IVM y albendazol, ABZ) con aplicación en veterinaria.

❖ En una formulación estable y con un elevado rendimiento de encapsulación para IVM la disponibilidad sistémica de las NCLs por vía subcutánea en ratas fue significativamente mayor comparado al tratamiento con la formulación comercial sin mayores modificaciones en el patrón de distribución tisular de este fármaco.

❖ Este trabajo es el primero en reportar los efectos in vivo de un sistema portador nanométrico para ABZ contra el estadio larval de *E. granulosus*. Las ABZ-NCLs mostraron una mayor eficacia quimioprolifática que la suspensión de ABZ administrada por vía oral, constituyendo una alternativa interesante para prevenir la hidatidosis secundaria.

❖ Mediante la modificación de la superficie de las NCLs es posible otorgarles una nueva funcionalidad para la vehiculización de fármaco un hidrofílico, CpG-ODN, demostrando la viabilidad del proceso propuesto para la inserción, y la posterior interacción electrostática de esta nueva superficie con el CpG-ODN de carga opuesta.

❖ Estas nanocápsulas “decoradas” luego de una evaluación preliminar en un modelo celular de línea de macrófagos mostraron contrariamente a lo obtenido para los coageles de ASC16, que la respuesta inmune inducida por CpG-ODN no se ve amplificada tras su vehiculización en NCLs funcionalizadas sino todo lo contrario, la respuesta se anula. Esto abre un nuevo campo para la aplicación de las NCLs; posiblemente para el tratamiento de patologías caracterizadas por una respuesta inmune exacerbada, como es el caso de las enfermedades autoinmunes.



## **ANEXO I**

### **MATERIALES Y METODOS ESPECIFICOS PARTE I**



## **1. Materiales**

### ***M.1.- Ovoalbúmina (OVA)***

La OVA es la principal proteína de la clara del huevo, representa entre el 60-65% de las proteínas totales. Es una fosfoglicoproteína constituida por 385 aminoácidos, y una masa molecular relativa de 45kDa, está integrada por tres fracciones, A1, A2 y A3, en una proporción 85:12:3 respectivamente, que se diferencian por su contenido en fósforo. La OVA se caracteriza por un bajo contenido en triptófano y metionina y un elevado contenido en cistina y aminoácidos cargados (ácido aspártico y glutámico, lisina y arginina). Esta proteína está constituida por tres dominios homólogos (I, II, III) que están divididos en nueve bucles (L1-L9) por 17 puentes disulfuro formando un triplete. La estructura secundaria contiene entre un 50-68% de estructura  $\alpha$ -hélice y entre el 16-18% de hoja  $\beta$  [Sjoholm y Ljungstedt 1973]. La **figura I.1.** muestra la estructura primaria y terciaria de esta proteína.

La viscosidad de esta proteína en solución depende de sus propiedades intrínsecas como la masa, el tamaño, el volumen y la carga en la superficie. Asimismo, la viscosidad está influenciada por otros factores tales como el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio. [Tung 1978; Wetzel y cols., 1980].

Cuando se trata térmicamente, esta proteína pasa por dos etapas estructurales. La primera es reversible, mientras que la segunda es irreversible, aunque no necesariamente resulta en una destrucción completa de la estructura. Un calentamiento hasta 65 °C puede considerarse como el primer estadio; el calentamiento subsiguiente por encima de esta temperatura corresponde a la segunda etapa [Lin y Koenig, 1976].

Recientemente, los antígenos dirigidos a las CPA a través de receptores específicos que inducen una respuesta de células T específicas de antígeno, se han utilizado para estudiar nuevas estrategias de vacunación. De este modo, OVA se emplea ampliamente como un antígeno modelo para la caracterización de la captación de antígenos, procesamiento, y presentación a las CPA en modelos murinos.

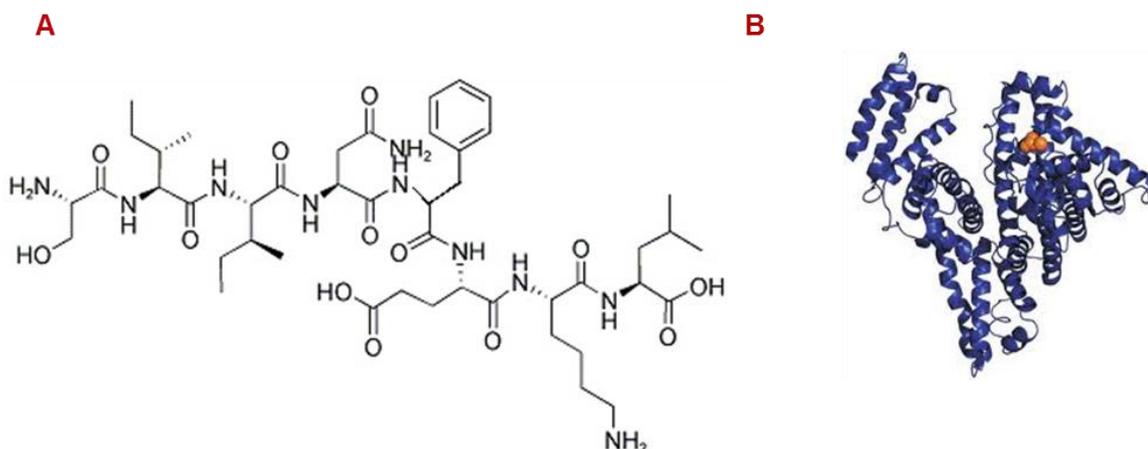


Figura 1.1. Estructura química de OVA. A) Estructura primaria; B) Estructura terciaria.

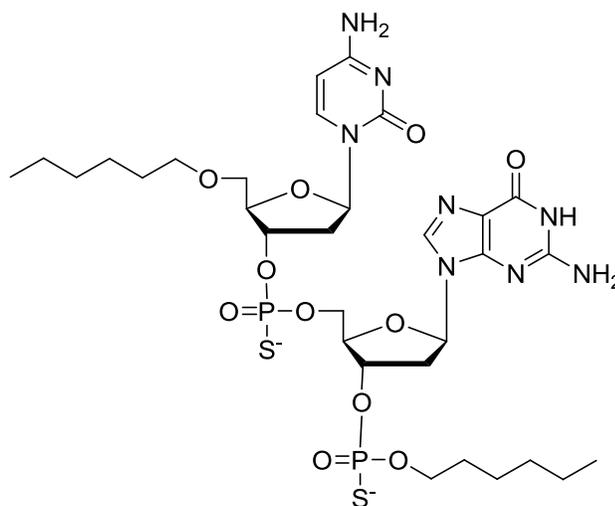
### M.2.- Oligodeoxinucleótidos sintéticos con motivos CpG (CpG-ODN)

El ADN bacteriano o viral es reconocido por los receptores TLR9 a través de los dinucleótidos no metilados citosina-fosfato-guanosina en un contexto particular de secuencias (motivos CpG) que son considerados como una señal de daño endógeno [Krieg y cols., 2006]. Los oligodeoxinucleótidos (ODN) más estudiados son los análogos de fosforotionato (ODN-PS), en los que uno de los átomos de oxígeno no unido directamente a la cadena principal de fosfato es reemplazado por un átomo de azufre, confiriéndole de esta manera una carga neta negativa (**figura 1.2.**). Estos ODN son resistentes a la actividad de las enzimas RNAasa similar a los ODN fosfodiéster (ODN-PO) pero presentan una mayor resistencia a la degradación por exonucleasas. Esta propiedad intrínseca hace que los ODN-PS sean la primera opción en la terapia con oligonucleótidos antisentido.

Aunque la fosforilación es una de las modificaciones que mantienen prácticamente intacta la estructura, las propiedades químicas de un fosforotionato son diferentes de su contraparte fosfodiéster. Por ejemplo, el mayor tiempo de retención de los primeros sugiere que estos compuestos son más hidrofóbicos y exhiben una estructura secundaria más compleja. Asimismo, la sustitución de un oxígeno simple por un azufre crea un centro quiral en el grupo fosfato [Gilar y cols., 1998].

La actividad inmunoestimuladora de los ODN-PS conteniendo motivos CpG dependen de la posición y el flanqueo de la secuencia. El mecanismo por el cual las células

se activan aún no ha sido bien descrito pero requiere la internalización del ODN-PS en la célula. Luego de la interacción con el receptor TLR9, se induce el desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1. Dado que las citoquinas características de este perfil como IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-12 pueden inhibir la respuesta Th2, estos ODN presentan un potencial para su aplicación en terapias inmunogénicas como cáncer, asma, y enfermedades infecciosas. Las propiedades inmunológicas de este compuesto se describen en detalle en el capítulo 4.



**Figura I.2. Estructura química de CpG-ODN.**

*Se muestra los grupos funcionales en citosina y guanina que sirven como donador/aceptor de enlaces puente hidrogeno.*

### ***M.3.- Palmitato de ascorbilo (ASC16)***

Este compuesto fue sintetizado con el objeto de aumentar la lipofilidad de la vitamina C y extender sus propiedades antioxidantes a sistemas lipídicos [Wade y Weller, 1994]. El palmitato de ascorbilo es esencialmente no tóxico y no irritante [Rowe y cols., 2009] y se obtiene por la esterificación en el carbono 6 del ácido ascórbico, por una molécula de ácido palmítico o hexadecanoico. De esta manera se forma el éster palmítico del ácido ascórbico cuya estructura se presenta en la **figura I.3**. Este compuesto posee tres grupos -OH libres en las posiciones 2 (pKa 11,6), 3 (pKa 4,2) y 5 (un hidroxilo secundario del grupo) (Palma y cols., 2002). Si bien la estructura presenta una porción polar (anillo del

ácido ascórbico) y una porción apolar (cadena alifática), la baja solubilidad del compuesto puede llegar a limitar sus propiedades tensioactivas. La solubilidad del ASC16 a 25 °C, determinada en solución acuosa, resulta de  $8,1 \times 10^{-7}$  M [Palma y cols., 2002 b].

Su estructura molecular le permite, además, formar agregados que ofrecen un ambiente óptimo para la solubilización de fármacos hidrofóbicos y fácilmente degradados cuando se exponen a la luz, calor, oxígeno disuelto y otras especies productoras de radicales [Lo Nostro y cols., 2002]. El estudio de estas estructuras y su potencial aplicación como sistemas portadores de fármacos hidrofílicos, como CpG-ODN, se discute en los capítulos 3 y 4 del presente trabajo.

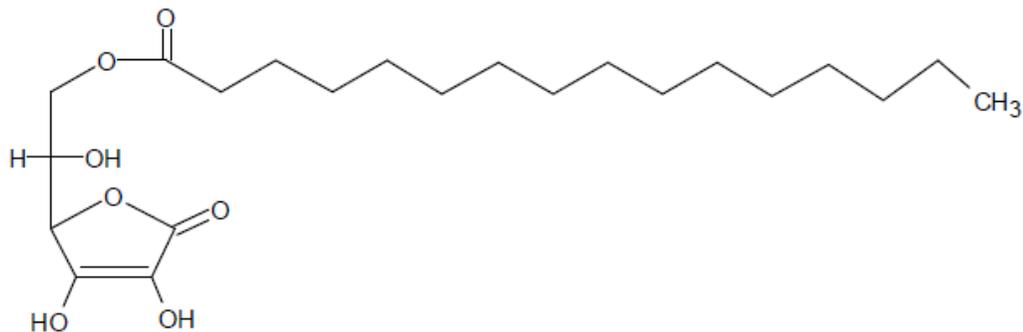


Figura I.3. Estructura química de 6-O-hexadecanoato de ascorbilo (ASC16).

## **2. Métodos *in vitro***

### ***M.4.- Obtención de los coageles de palmitato de ascorbilo (Coa-ASC16)***

A continuación se detalla el método de obtención de los coageles de ASC16 a partir de los cuales surge el desarrollo y la investigación propuesta en los capítulos 2, 3 y 4 de esta tesis doctoral. Los coageles fueron preparados mezclando ASC16 y solución de dextrosa al 5% p/p apirógena y estéril, en las proporciones adecuadas, en tubos de vidrio color caramelo cerrados herméticamente. Las dispersiones se calentaron a 72 °C (temperatura superior a la TMC, ver capítulo 3) y luego homogenizadas en un baño de ultrasonido por 15 minutos. Finalmente se permitió que el sistema alcance temperatura ambiente para de este modo obtener el coagel. La **figura I.4** ilustra este procedimiento y

la **figura I.5** muestra el aspecto real de los sistemas. Para la obtención de los coageles cargados, OVA y/o CpG-ODN fueron incorporados inicialmente en la mezcla ASC16/dextrosa en las proporciones adecuadas y luego los coageles cargados se obtuvieron mediante la técnica descrita anteriormente.

En todos los casos la concentración de ASC16 fue del 2% (p/p) en dextrosa. Debido a la consistencia semisólida de los coageles, se requirió de una leve agitación para facilitar la administración subcutánea de los animales en los ensayos de inmunización.

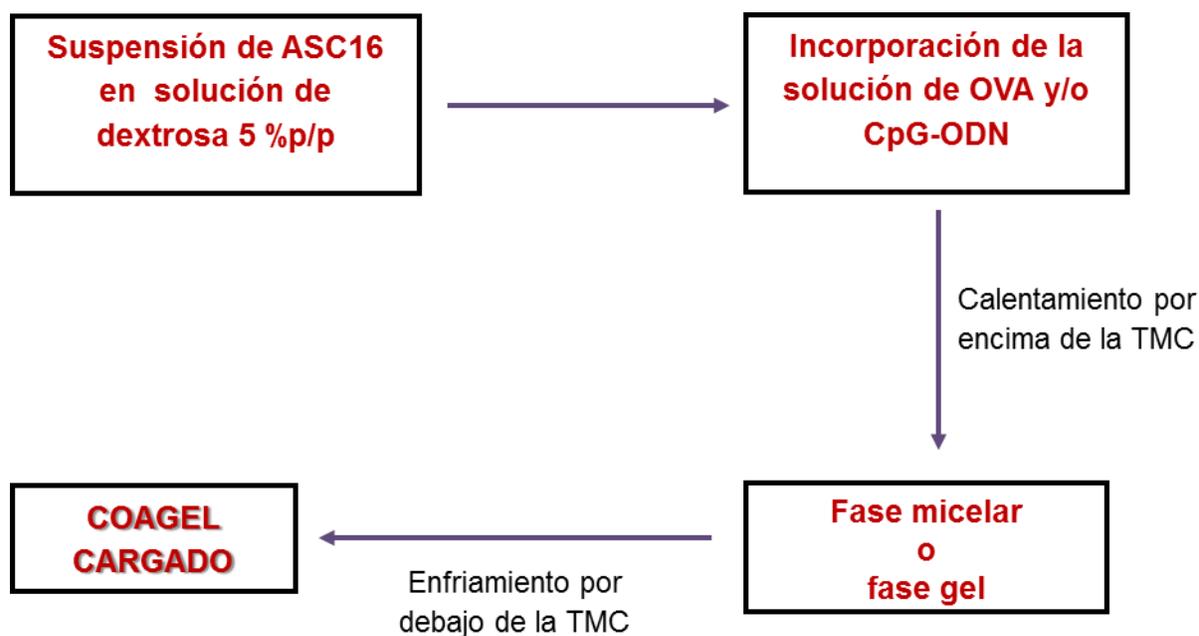
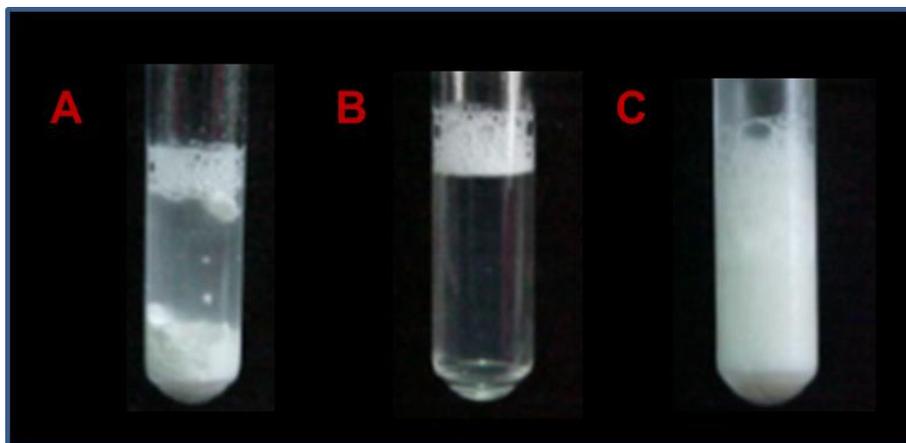


Figura I.4. Método de obtención de coagel cargado con OVA y/o CpG-ODN. ASC16: palmitato de ascorbilo; TMC: temperatura micelar crítica.



**Figura I.5. Diferentes fases comprendidas en la formación del coagel.**

*A) Suspensión de los derivados en medio acuoso a temperatura ambiente. B) Derivado por encima de la temperatura micelar crítica (TMC). C) Coagel formado a temperatura ambiente.*

### ***M.5.- Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)***

La CDB es una de las técnicas experimentales más directa y precisa para caracterizar sistemas moleculares bien definidos, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al modificar la temperatura [Brown, 1998].

Esta técnica es ampliamente utilizada en el estudio de sistemas binarios o multicomponente que contienen surfactantes. Su uso nos permite medir la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura, obteniéndose así el termograma. A partir de esta función, es posible, si el sistema macromolecular se encuentra definido, determinar los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura como por ejemplo cambios de entalpía ( $\Delta H$ ), de entropía ( $\Delta S$ ), de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y de la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) [McNaughton y Mortimer, 1995].

Además de los surfactantes, el uso de esta técnica es muy útil para determinar el estado del agua. Su comportamiento es sensible a la presencia de interfases adyacentes de diversa naturaleza y esta relación le imparte características que son muy diferentes a las que puede tener cuando se encuentra en solución. Por lo tanto, el análisis térmico del agua y del surfactante, pueden dar valiosa información del sistema en estudio.

Las mediciones se realizaron con un calorímetro diferencial de barrido Q20 (TA Instruments, New Castle, DE, EEUU). Las dispersiones fueron preparadas mezclando los componentes (ASC16 en solución de dextrosa al 5% y/o CpG-ODN y OVA) y se obtuvieron los coageles como se describió anteriormente en la sección M.4. Sólo para el ensayo de CDB se modificó el porcentaje en peso de ASC16 para evaluar los cambios inducidos por la concentración. De este modo, las concentraciones utilizadas para el sistema ASC16 en dextrosa 5% en fracciones p/p fueron: 0,02; 0,05; 0,10; 0,30; 0,50 y 0,70. Estas mismas concentraciones de ASC16 fueron ensayadas para los sistemas cargados con OVA y/o CpG-ODN a las concentraciones que se emplean para los ensayos inmunológicos in vivo (24 µg/animal/dosis y 75 µg/animal/dosis respectivamente).

#### ***M.5.1. Procedimiento realizado para cada análisis por CDB***

Las muestras para cada ensayo fueron preparadas en cazoletas (pans, denominación en inglés) de cierre hermético de aluminio y pesadas en balanza analítica a la quinta cifra decimal. La programación de cada análisis se realizó de la siguiente manera: se comenzó enfriando las muestras a -20 °C durante 5 minutos. Luego se fue aumentando la temperatura hasta 150 °C a una velocidad de 5 °C min<sup>-1</sup>. Por último, se mantuvo a 150 °C por un minuto. La elección de la temperatura de enfriamiento inicial de la muestra permite luego llevar a cabo el estudio del comportamiento del agua dado que es necesario asegurarse que la misma se encuentre congelada, con el propósito de detectar los diferentes tipos de agua presentes (ver capítulo 3) . Una vez que se determinan los intervalos de temperaturas dentro de los cuales se producen las transiciones, es necesario conocer las mesofases formadas dentro de éstos. Para ello se utilizó la microscopía óptica de luz polarizada con platina de temperatura controlada.

#### ***M.6.- Microscopía Óptica de luz Polarizada (MOP) con platina de calentamiento***

La microscopía óptica se realizó con un microscopio de polarización Nikon Eclipse E-200 POL (Tokio, Japón). A través de esta técnica, se puede determinar la presencia de las diferentes mesofases en función de los cambios de temperatura. Las muestras observadas al microscopio fueron las mismas que se usaron para obtener los termogramas por CDB.

Cada una de las muestras fue colocada sobre un porta objeto, cubierta con un cubre objeto y depositada dentro de una cavidad que posee una platina calefaccionada. La elección de las temperaturas a las cuales se observaron las muestras fue determinada previamente por CDB. De esta manera, se puso en evidencia la presencia de cada mesofase a la temperatura de transición y además, se pudo observar cómo se produce el cambio de estas fases al variar la temperatura. Las micrografías fueron tomadas con y sin polarizadores cruzados, y en algunos casos con el intercalado de una placa de retardación de  $1\lambda$ .

### ***M.7.- Espectroscopía Infrarroja (FT-IR)***

Los espectros FT-IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro FT-IR Thermo Nicolet-Nexus 470 con un detector Nichrome DTGS-KBr (Inter. Equipment Trading Ltd., Vernon Hill, Illinois, EE.UU). El rango de frecuencias comprendido fue entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  y se empleó un total de 64 escanes.

En primer lugar, se secaron las muestras y el bromuro de potasio (KBr). Luego se prepararon discos compactos de KBr anhidro de aproximadamente 150 mg conteniendo entre 1,5 y 2,0% del material a estudiar anhidro finamente pulverizado. Los discos se mantuvieron en un envase con cierre hermético hasta el momento de la medición para prevenir la hidratación y se los registró como dispersiones sólido en sólido contenidas en una microcápsula de accesorio de reflectancia difusa.

### ***M.8.- Estudios de liberación***

El estudio de liberación *in vitro* se llevó a cabo utilizando un modelo levemente modificado de celdas de difusión bicompartimentales de tipo Franz (**figura I.6**). Las celdas fueron montadas colocando entre el compartimiento donador y el receptor un disco plano de vidrio fritado (17 mm de diámetro y 5 mm de espesor) como membrana sintética con un área efectiva de difusión de  $1,25 \text{ cm}^2$ . En el compartimiento donador se colocó 1 ml de la formulación conteniendo OVA y/o CpG-ODN y se mantuvo en contacto con el compartimiento receptor. La cantidad de fármaco colocada en cada caso fue la necesaria

para garantizar que se mantuviesen las condiciones sumidero (sink, en inglés) es decir que la concentración final de estos compuestos en el medio receptor sea inferior al 10% de la concentración de saturación de los mismos ( $C_s$ ) o lo que es equivalente, inferior al 10% de su solubilidad [USP31-NF26, 2008]. Como medio receptor se empleó tampón Tris-HCl (pH 7,2 -7,4) previamente filtrado y desgasificado. El sistema se mantuvo a  $37,0 \pm 0,1$  °C y se aseguró la homogeneidad del mismo mediante agitación magnética constante y suave.

A intervalos de tiempo predeterminados se tomaron muestras de 0,5 ml del medio receptor y se reemplazó con el mismo volumen de tampón empleado como medio, previamente termostatzado a 37 °C. Los resultados obtenidos fueron convenientemente normalizados teniendo en cuenta este efecto de dilución. La extracción de las muestras se realizó en el punto medio del compartimiento receptor, con la ayuda de una jeringa y aguja de 10 cm. La concentración de CpG-ODN/OVA a cada tiempo se midió por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) mediante la técnica desarrollada y validada para CpG-ODN en el capítulo 2 o mediante la técnica de Bradford para la determinación de proteínas. Los datos experimentales corresponden al promedio de tres ensayos independientes y se expresan como el porcentaje de F liberado.

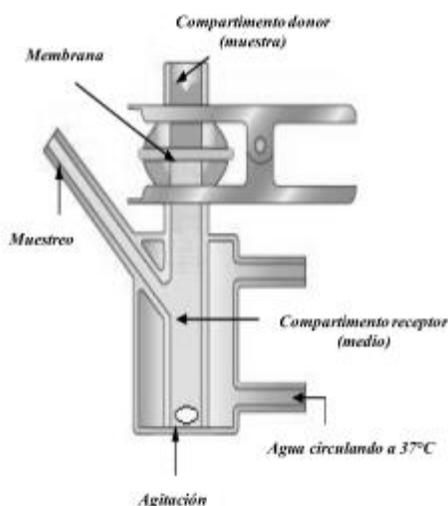


Figura I.6. Esquema de celda bicompartmental de tipo Franz.

### ***M.9.-Ensayo de degradación por nucleasas***

El objetivo de este ensayo, fue evaluar el posible efecto protector inducido por Coa-ASC16 en la estabilidad de CpG-ODN frente a la degradación por nucleasas. Para ello, se expusieron soluciones de ODN-PS u ODN-PO y ambos compuestos formulados en Coa-ASC16 a una solución de la enzima 3' exonucleasa. Estudios previos han demostrado que esta enzima es la principal responsable de la degradación de los oligodeoxinucleótidos cuando se los administra por vía subcutánea [Nol y cols., 2005].

En un tubo se colocó 300 µl del ODN (concentración 1mg/ml) y se llevó a volumen final de 900 µl con solución de dextrosa o coagel. Luego las muestras fueron diluidas en 100 µl de tampón salino (670mM glicina-KOH pH 9,5 a 25 °C, 67mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT) y fraccionadas en alícuotas de 100 µl en tubos plásticos. Finalmente, se les adicionó 0,5 µl de la enzima 3' exonucleasa (Exonuclease I, Thermoscientific, TecnoLab, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron en estufa a 37 °C. Luego de la incubación a tiempos predeterminados, los tubos fueron inactivados por calentamiento a 80 °C por 15 minutos. La cantidad de CpG-ODN no degradado y remanente en cada tubo fue cuantificada por la técnica de HPLC desarrollada en el capítulo 2.

### **3. Métodos *in vivo***

Los experimentos fueron llevados a cabo empleando ratones hembra de 8 a 10 semanas de edad de las cepas BALB/c y C57BL/6 provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Los ratones TLR4 -/- fueron comprados a Laboratorio Jackson. Estos ratones poseen una supresión en el gen TLR4 (TLR4<sup>lps-del</sup>) lo que resulta en una respuesta defectuosa a la estimulación con el lipopolisacárido (LPS). Los animales se mantuvieron en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET cumpliendo los lineamientos de la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicado por el Consejo Canadiense de los Animales, con el número de garantía A5802-01 asignado por la Oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud.

***M.10.- Cultivo de células de bazo***

Los bazos fueron removidos por cirugía y los glóbulos rojos fueron lisados empleando una solución tampón de lisis (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina). Luego del lavado, la suspensión de las células se cultivaron en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, empleando el medio Gibco® RPMI 1640 (Life Technologies, Buenos Aires, Argentina). El mismo fue suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), GIBCO® 2mM Glutamax, 100U/ml Penicilina y 100 µg/ml Streptomina (adquiridos en Life Technologies) y 50 µM 2-mercaptoetanol.

Los esplenocitos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) fueron incubados sólo con medio, con concanavalin A (5 µg/ml) como control positivo (Sigma-Aldrich) o con OVA (100 µg/ml). La producción de citoquinas específicas para OVA fue medida por la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en las muestras de los sobrenadante de bazos recolectadas luego de las 72 horas de incubación.

Para la detección de las citoquinas intracelulares específicas para OVA, las suspensiones de células fueron incubadas por dos días y finalmente se agregó Stop Golgi (Monensin 4 µl/6ml de cultivo celular) (Becton Dickinson Argentina SRL, Buenos Aires, Argentina) en las últimas 5 horas de cultivo celular.

***M.11.- Ensayo de detección de anticuerpos***

Los títulos de anticuerpos específicos para OVA fueron determinados por ELISA. Brevemente, una placa de 96 pocillos (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) conteniendo OVA (1 µg/pocillo) en solución tampón carbonato-bicarbonato de sodio (pH 9,6) se incubó toda la noche a 4 °C y se bloqueó con tampón fosfato salino de concentración 1X (PBS 1X) con el agregado de gelatina (0,5%). Luego del lavado con PBS 1X, se incubó la placa a 37°C por 1 hora con diluciones seriadas de plasma en PBS 1X con el agregado de 0,05 % de Tween®20 y 0,5 % de gelatina. Luego la placa fue incubada con anticuerpos (Ac) de detección conjugados con HRP anti IgM (policonal), IgG (policonal) ambos adquiridos en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina), IgG1 (clon X56) e IgG2a/c

(clon R19-15) ambos obtenidos de Becton Dickinson Argentina SRL (Buenos Aires, Argentina).

El anti-IgG2a/c de ratón es un anticuerpo monoclonal cuya porción inmunogénica reconoce inmunoglobulinas (Ig) de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6; puntualmente reconoce un epítipo en el dominio CH3 de IgG2a de ratón, con una fuerte reactividad para el alotipo Igh-I [a] (IgG2a, ratones BALB/c) y una reactividad más débil a Igh-I [b] (IgG2c, C57BL / 6), y no reacciona con otros isotipos. Por lo tanto, empleamos este anticuerpo para detectar IgG2a en ratones BALB/c e IgG2c en ratones C57BL/ 6. Por último, las placas se leyeron empleando un lector de placa a 490 nm luego de la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y o-fenilendiamina.

Los títulos de anticuerpos fueron calculados como la recíproca de la última dilución del plasma que produce una absorbancia por encima del doble del valor medio del blanco medido a 490 nm.

#### ***M.12-. Ensayo de detección de citoquinas***

La concentración de diferentes citoquinas fue medida por la técnica de ELISA sandwich en suspensiones de células de bazo siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones se calcularon restando las concentraciones medidas en cultivos sin el antígeno. Todos los ensayos se estandarizaron con las citocinas murinas recombinantes. Los pares de anticuerpos empleados fueron los siguientes (nombrados por captura/detección-biotinizados): IL-6, MP5-20F3/MP5-32C11; IL-12p40, C15.6/C17.8; IFN- $\gamma$ , R4-6A2/XMG1.2; IL-17A, 17CK15A5/17B7; IL-5, TRFK5/TRFK4; IL-4, 11B11/BVD6-24G2; TNF- $\alpha$  1F3F3D4/XT3/XT22; IL-1 $\beta$ , B122/policlonal; IL-10, JES5-2A5/JES5-16E3; GM-CSF, MP1-22E9/MP1-31G6. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de Becton Dickinson Argentina SRL o eBioscience (San Diego, CA).

***M.13.- Histología***

Las muestras de tejido fueron fijadas en solución tampón de formol, lavadas con xilol embebido en parafina, seccionadas y teñidas con hematoxilina y eosina para estudios histológicos.

***M.14.- Análisis estadístico***

El análisis de los datos comprendió one-way ANOVA seguido de Bonferroni (post-test) para comparaciones múltiples y el *test de Student t* (unpaired).



## **ANEXO II**

### **MATERIALES Y METODOS ESPECIFICOS PARTE II**

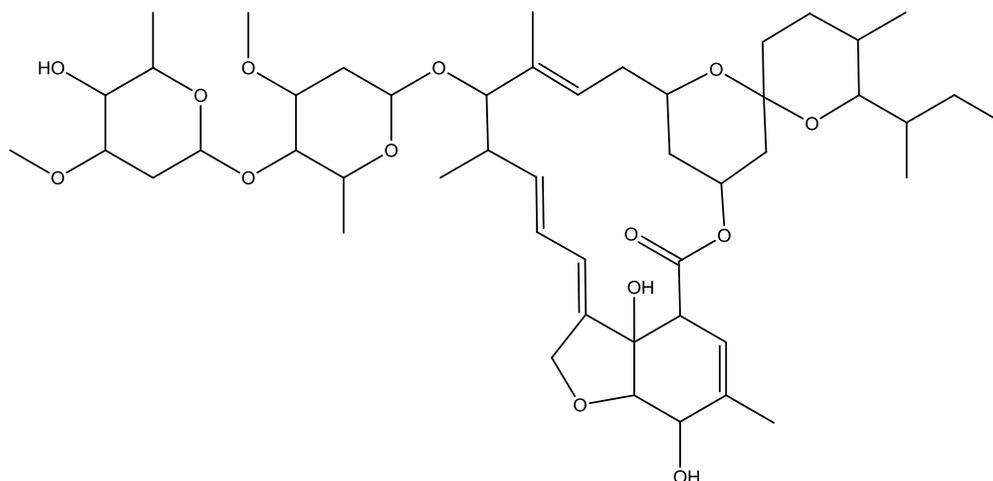


## 1. Materiales

### **M.1.- Ivermectina (IVM)**

Las avermectinas (a: sin+ verm: gusanos + ect: ectoparásitos + in: producto farmacéutico) [Egerton y cols., 1979] son una familia de lactonas macrocíclicas de 16 átomos carbonos, producidas por el actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, e incluyen una serie de compuestos tales como la abamectina, ivermectina y doramectina, las que poseen una potente actividad antihelmíntica e insecticida [Campbell y cols., 1983].

La ivermectina (IVM) es un derivado semisintético y fue el primer endectocida disponible para su uso en animales de abasto. Ivermectina es el nombre genérico dado a la mezcla de dos avermectinas químicamente modificadas que contienen no menos de un 80% de 22-23 dihidroavermectina B1a y no más de un 20% de 22-23 dihidroavermectina B1b [Fisher y Mrozik, 1989]. La **figura II.1.** ilustra su estructura química.



**Figura II.1. Estructura química de IVM.**

La fórmula empírica y el peso molecular de los homólogos a y b de Ivermectina son  $C_{48}H_{74}O_{14}$  (875,10 g/mol) y  $C_{47}H_{72}O_{14}$  (861,07g/mol) respectivamente. A pesar de que este compuesto presenta dos anillos azúcares y dos grupos polares hidroxil correspondientes al anillo dihidroxiciclohexeno, este fármaco es prácticamente insoluble en agua. Su solubilidad acuosa a temperatura ambiente está en el orden de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En otros

solventes apróticos como 1-butanol, metanol y 1 hexanol, su solubilidad alcanza el 20% p/v, sin embargo en solventes apróticos no polares tales como n-hexano, ciclohexano e isooctano su solubilidad es alrededor del 0,1% p/v.

Dado su alto peso molecular y lipofilidad, este fármaco se localiza principalmente en las grasas, lo que se traduce en una amplia distribución y en un mayor tiempo de residencia en el organismo, y en consecuencia, tiene una elevada y sostenida eficacia frente a parásitos internos y externos en animales. Se ha propuesto que el tejido graso actuaría como sitio de depósito, desde donde el fármaco se liberaría gradualmente [McKellar y Benchaoui, 1996; Lanusse y cols., 1997].

### ***M.2.- Albendazol (ABZ)***

Químicamente ABZ es metil 5-(propiltio)-2-benzimidazolcarbamato (**figura II.2.**) derivado del benzimidazol (BZD) que comprende a un sistema de 2 anillos bicíclicos, en el cual un grupo benceno es fusionado a las posiciones 4 y 5 del anillo imidazol. Las modificaciones que presenta este sistema de anillos bicíclicos es lo que da origen a los diferentes derivados BZD. En el caso de ABZ, su estructura se caracteriza por presentar en la posición 5 un átomo de azufre el cual le confiere un mayor efecto terapéutico [Sánchez Bruni y cols., 2002].

ABZ es una sustancia cristalina, estable, y con alto punto de fusión (209 °C); además es relativamente insoluble en agua (0,01 mg/ml), benceno y éter, pero altamente soluble en alcohol y solventes no polares [Kasim y cols., 2003]. Según el sistema de Clasificación Biofarmacéutica de fármacos, ABZ corresponde a la categoría II (Baja Solubilidad-Alta Permeabilidad) por tanto, su lenta velocidad de disolución limita la absorción. De este modo, es poco y erráticamente absorbido en el tracto gastrointestinal [Kasim y cols., 2003].

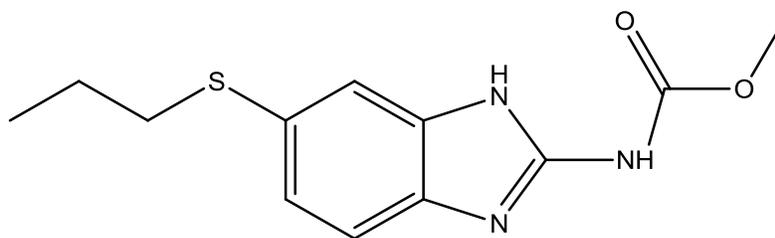


Figura 2. Estructura química de Albendazol

### ***M.3.- Lipochitosan (LCh)***

El quitosano o quitosano es un material natural que posee un gran potencial para ser utilizado en aplicaciones farmacéuticas [Kumar y cols., 2004]. Por medio de una reacción de acilación, es posible introducirle cadenas hidrofóbicas obteniéndose el quitosano modificado llamado lipochitosan (LCh) debido a su carácter lipofílico [Hirano y cols., 1976; Lee y cols., 2004]. La síntesis de LCh se representa esquemáticamente en la **figura II.3**.

Prácticamente, 5 g de Ch se disuelven en 100 ml de una solución acuosa al 20% v/v de ácido acético a temperatura ambiente y luego se diluye con 200 ml de metanol bajo agitación; gradualmente se va agregando 3,5 g de anhídrido esteárico a esta solución y la mezcla se agita toda la noche bajo reflujo. Luego de la remoción del solvente, el residuo se lava con acetona y se centrifuga y este paso se repite 5 veces a fin de remover el ácido graso excedente. El polvo marrón obtenido (LCh) se seca bajo vacío.

Finalmente se aplica la técnica de resonancia magnética nuclear de protones (RMN-<sup>1</sup>H) para corroborar la estructura química del LCh obtenido comparando su espectro con uno de referencia de Ch confirmando la presencia de los grupos acilos.

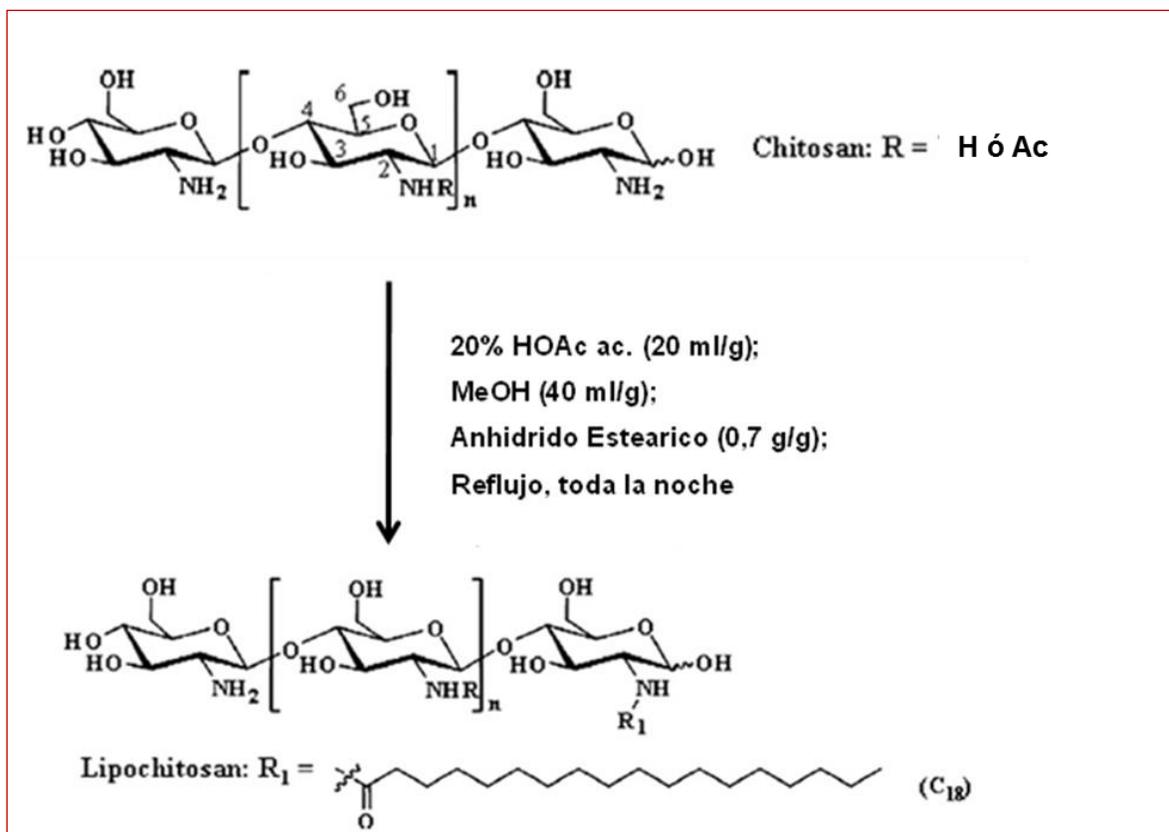


Figura 3. Acilación de Ch con anhídrido esteárico.

*R<sub>1</sub> puede unirse en cualquier grupo amino y no solo exactamente en la posición presentada en esta ilustración.*

## **2. Métodos *in vitro* e *in vivo***

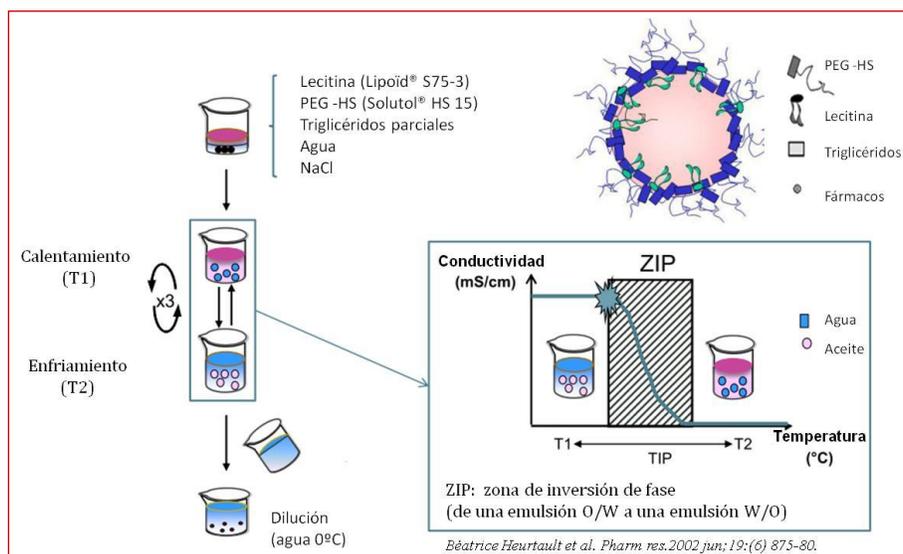
### ***M.4.- Obtención de las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs)***

La obtención de las nanocápsulas se realizó mediante la técnica de inversión de fases según la patente No. WO02688000 [Heurtault y cols., 2000] compuesta básicamente por dos etapas. La primera, consiste en mezclar todos los componentes, cuyas proporciones deben ser ajustadas según el tamaño de partícula requerido, bajo agitación magnética y calentando desde temperatura ambiente hasta una temperatura 2 (T<sub>2</sub>), por encima de la *temperatura de inversión de fases* (TIF) para obtener una emulsión de tipo agua en aceite (W/O). Luego sigue un proceso de enfriamiento hasta alcanzar la temperatura 1 (T<sub>1</sub>), por debajo de la TIF, conduciendo a la formación de una emulsión de

tipo aceite en agua (O/W). Tres ciclos de calentamiento/enfriamiento a través de la zona de inversión de fases (ZIF) entre T1 y T2 son llevados a cabo posteriormente. La temperatura antes de la dilución corresponde al inicio del proceso de inversión de fases y se define como el rango de temperatura establecido (entre 1-3 °C) desde el comienzo de la obtención de la emulsión O/W.

La etapa II, consiste en un shock irreversible inducido por la repentina dilución con agua fría aproximadamente a 0 °C agregada a la mezcla cuando alcanza la temperatura definida anteriormente. Este paso se realiza para quebrar la microemulsión formada en la ZIF y obtener finalmente las nanocápsulas estables. Finalmente, se aplica una agitación magnética suave por 5 minutos más (**figura II.4.**)

Para la obtención de las NCLs fluorescentes, se empleó Nile Red (Sigma, Argentina, nro. cat. N3013) según se describe en la literatura [Greenspan y cols. 1985]. Brevemente, Nile Red se disolvió en acetona al 1% (p/p), y la solución resultante se incorporó en la fase lipídica a una concentración final de 1:10 (p/p). Luego esta mezcla se dejó en campana bajo agitación a fin de evaporar la acetona y se prosiguió con la técnica tradicional de obtención de las NCLs detallado anteriormente.



**Figura II.4. Proceso de obtención de las NCLs.**

*Etapa 1, corresponde a la determinación de la temperatura de "calentamiento/dilución" luego de aplicar tres ciclos de temperatura al sistema. La etapa 2, conduce a la formación de las nanocápsulas luego de la rápida dilución con agua fría.*

### ***M.4.1.Composición y estructura general de las NCLs***

La estructura de estas nanocápsulas consiste en un núcleo líquido constituido por triglicéridos de cadena media y rodeados de una cubierta rígida formada por una combinación de un tensioactivo lipofílico y uno hidrofílico. El primero se encuentra en contacto con la fase oleosa, mientras que el segundo se orienta hacia la fase acuosa.

La formulación se basa en tres componentes principales: una fase lipídica, una fase acuosa y un surfactante no iónico. La fase oleosa está constituida generalmente por triglicéridos de ácido capríco y caprílico conocidos bajo su nombre comercial Labrafac WL1349 (empresa Gatefossé, Francia) y Myritol 318 (BASF, Alemania) o gliceril tricaprilato (Captex 8000, ABITEC, EEUU). El surfactante hidrofílico, denominado comercialmente Solutol HS15 (BASF, Alemania) derivado del polietilenglicol (PEG) es una mezcla de PEG660 e hidroxistearato de PEG 660. La fase acuosa consiste en agua milli Q (Millipore, Buenos Aires) y cloruro de sodio (NaCl). Además se emplea un surfactante lipofílico, una lecitina de soja compuesta por un 69% de fosfatidilcolina (Lipoid, GmbH, Alemania) que se emplea en pequeñas proporciones para incrementar la estabilidad del sistema. Todos estos excipientes se encuentran aprobados por la FDA para administración oral, tópica y parenteral. Cada componente y su influencia en la formulación y estabilidad de las NCLs se citan en la tabla II.1.

**Tabla II.1. Factores que influyen en la formulación y la estabilidad de las NCLs preparadas por el método de inversión de fases.**

<b>Factores</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencias</b>
Surfactante no iónico (Solutol HS15)	Mayor influencia en la formación y estabilidad de las NCLs	Heurtault y cols., 2002b, 2003c, Anton y cols., 2007a.
Ciclos de temperatura	Favorecen la formación y mejoran la calidad de la dispersión de NCLs	Anton y cols., 2007a, 2008.
Proporción de lípido	Aumento del tamaño de partícula	Heurtault y cols.2003c.
Cantidad de NaCl	Disminución de TIP	Heurtault y cols., 2002a, Anton y cols., 2007b
Surfactante lipofílico	Estabiliza la cubierta y favorece el proceso de liofilizado	Dulieu y Bazile 2005, Vonarbourg y cols., 2005.

### ***M.5.- Conductividad***

La conductividad fue medida empleando un conductímetro LF 325B (WTW, Weilheim, Alemania) con dos placas de aluminio unidas. Las determinaciones se llevaron a cabo en intervalos de 2 °C, entre 35 °C y 91 °C bajo agitación magnética y luego se graficaron los valores experimentales en función de la temperatura como una medida de la evolución de la conductividad de las dispersiones durante el proceso de formulación.

### ***M.6.- Dispersión dinámica de la luz y potencial electrocinético***

Los valores de Coeficiente de Difusión (CD), Diámetro Hidrodinámico ( $d_H$ ) ó comúnmente denominado tamaño medio de partícula (TMP) junto al índice de polidispersidad (IP) se determinaron por la técnica de espectroscopía de correlación-fotón (ECF) también llamada dispersión dinámica de luz (DDL, o conocido por su sigla en inglés DLS) . El potencial electrocinético ( $\zeta$ ) o potencial z (PZ) de las nanosuspensiones se determinó por la técnica de electroforesis dinámica de luz (EDL) utilizando un equipo DelsaNano-C (Beckman Coulter, Osaka, Japón) provisto de un láser de diodo de 658 nm y un ángulo de detección de 165°. Las mismas determinaciones se llevaron a cabo en el laboratorio INSERM U 1066, Université d' Angers (Francia) empleando un equipo Malvern Autosizer 4700 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, United Kingdom) y CoulterDelsa 440 (CoulterScientific Instruments, Amherst, MA, USA).

Los valores de CD y  $d_H$  se obtuvieron de la función de autocorrelación provista por el software del equipo (DelsaNano 2.20 software, BeckmanCoulter, Osaka, Jp.) utilizando el método de Cumulants, que infiere el  $d_H$  a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 1), considerando los valores de viscosidad del solvente informados en bibliografía.

$$RH = \frac{kT}{6\pi\eta CD}$$

*Ec. (1). Ecuación Stokes-Einstein.*

donde  $R_H$  es el radio hidrodinámico,  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura,  $CD$  es el coeficiente de difusión y  $\eta$  la viscosidad del líquido a 25 °C. Los valores de  $\zeta$  se obtuvieron a partir del análisis del software del equipo que utiliza la ecuación de Smoluchowski [Lyklema, 2003].

Todas las mediciones se realizaron por triplicado, a 25 °C a partir de las dispersiones diluidas 1:60 (v/v) en agua desionizada utilizando la intensidad de señal óptima calculada por el equipo. Se corroboró previamente que las mediciones no mostraran variaciones significativas en función de la dilución.

### ***M.7.- Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)***

En MEB, las imágenes y contrastes se construyen aprovechando la emisión de electrones de una muestra, cuando sobre ella incide un delgado haz de electrones enfocados de alta energía (superior a 40 keV, generalmente). La muestra también emite rayos X, los cuales pueden ser analizados para obtener información sobre la composición del material.

Una muestra para poder ser analizada por MEB debe estar completamente seca, ya que cualquier molécula de agua que permanezca en ella ocasionaría daños en el microscopio, y debe ser conductora de electrones, para lo cual suelen metalizarse con una delgada lámina de oro. Se obtuvieron microfotografías de los componentes por separado y luego de la formulación final de NCLs empleando un microscopio LEO Model EVO 40XVP. La suspensión de nanopartículas fue diluida (1:400) en agua destilada y fijada utilizando una cinta de aluminio de doble cara.

Con el objetivo de mejorar la conductividad, las muestras fueron recubiertas al vacío por una capa delgada de oro empleando un dispositivo de revestimiento por pulverización catódica (PELCO Model 3). La magnificación seleccionada fue suficiente para apreciar en detalle la morfología general de las muestras en estudio.

***M.8.- Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)***

Para caracterizar la morfología de las partículas, se utilizó la microscopía de fuerza atómica utilizando un equipo Bruker Innova® Atomic Force Microscope (Bruker Corp., Santa Barbara, EE.UU). Las muestras de suspensión de NCLs se diluyeron con agua Milli Q (1:60 v/v), se colocaron en un porta muestra de vidrio y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta evaporación total del agua. Las imágenes se obtuvieron en el modo tapping y fueron procesadas empleando el software específico del equipo, Nano Scope Analysis 1.40v (BrukerCorp).

***M.9.- Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y Termogravimetría (TGA)***

Se obtuvieron los termogramas de CDB de las muestras sólidas utilizando un equipo Pyris 1 (Perkin- Elmer, EE.UU) provisto de un software específico (Universal análisis 2000, versión 3.9 TA Instrumentas, Watersille). Previamente el equipo fue calibrado utilizando Indio como referencia. Se pesaron aproximadamente 8 mg de cada muestra (NCLs blanco, NCLs cargadas, y sólo el fármaco) y se colocaron en porta muestras herméticos de aluminio, a los cuales previamente se les practicó un orificio en la tapa.

Se realizó una rampa de calentamiento de 25 a 180 °C utilizando una velocidad de 10 °C/min. El calentamiento se produce en un horno provisto de un sensor que permite medir la diferencia entre los flujos de calor de la muestra y una referencia. Los termogramas de CDB se obtuvieron bajo atmósfera de nitrógeno.

***M.10.- Cargado de fármaco y Eficiencia de Encapsulación (EE%)***

Para determinar el cargado de fármaco, las dispersiones de NCLs fueron filtradas con un filtro de 0,22 µm Ministar® high-flow (Sartorius, Goettingen, Alemania). La cuantificación del fármaco (F) en las dispersiones filtradas y sin filtrar (control) para la posterior determinación de la EE % se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) específica para el F encapsulado.

La determinación de la EE% se llevó a cabo por comparación entre las relaciones de área del pico del F de las muestras y una curva de calibración realizada bajo las mismas

condiciones. El rendimiento o eficiencia de encapsulación se determinó dividiendo la carga de fármaco obtenida experimentalmente por el valor teórico de F agregado a la formulación. Las muestras se realizaron por triplicado y la carga de fármaco ( $\text{media} \pm \text{DS}$ ) se calculó como: mg de F/ g de dispersión de NCLs.

#### ***M.11.- Estudio de activación del sistema del complemento: Técnica de CH50***

El consumo del complemento fue llevado a cabo en suero normal humano (SNH) midiendo la capacidad hemolítica residual del complemento luego del contacto con las nanopartículas. La técnica consiste en la determinación de la cantidad de suero capaz de lisar el 50% de un número fijo de eritrocitos de oveja sensibilizados (CH50) [Mayer, 1961]. VBS (tampón salino Veronal) y VBS<sup>2+</sup> (VBS conteniendo 0,15 mM Ca<sup>2+</sup> y 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>) fueron preparados según un protocolo descrito anteriormente [Kazatchkine y cols., 1986]. El SNH se obtuvo a partir de 40 donadores de sangre proporcionado por el Establecimiento Francés de sangre (Angers, Francia) fraccionado y conservado a -80 °C hasta su uso. Para activar el sistema del complemento por la vía clásica, los eritrocitos de oveja (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) fueron sensibilizados con anticuerpos anti-eritrocitos de oveja obtenidos a partir de conejos (hemolytic serum, Biomérieux) y llevados a una dilución final de 1:800 (v/v) en VBS<sup>2+</sup>. Los eritrocitos de oveja activados fueron preparados a una concentración final de  $1 \times 10^8$  células/ml en VBS<sup>2+</sup>.

Para evaluar el consumo de las unidades de CH50 en presencia de las nanopartículas, cantidades crecientes de suspensiones de partículas fueron agregadas al SNH y diluidas en VBS<sup>2+</sup> obteniéndose una dilución final de SNH en la mezcla de reacción de 0,25% v/v en un volumen final de 1 ml. Las suspensiones fueron incubadas a 37 °C durante un periodo de tiempo preestablecido, con agitación magnética suave para permitir la reacción entre el suero y las NCLs. Luego, estas suspensiones fueron diluidas con VBS<sup>2+</sup> antes de mezclarlas con una suspensión de eritrocitos de oveja sensibilizados. Luego de una incubación a 37 °C bajo agitación suave, la reacción fue detenida con la adición de una solución de cloruro de sodio (NaCl) frío (0,15 M). Los eritrocitos sin lisar forman un depósito luego de la centrifugación por 10 min a 55 G. La densidad óptica de 200 µl del

supernadante, relativa a la capacidad lítica del suero, fue leída a 415 nm usando un lector de placa (Multiskan Anscnt, Labsystems SA, Cergy-Pontoise, Francia) y comparada con los resultados obtenidos con el suero control. Los controles positivos y negativos fueron usados en cada serie de experimentos para corregir cualquier diferencia en la respuesta de hemoglobina a partir de un dado preparado de eritrocitos. La dispersión de la luz por parte de las partículas así como la hemolisis espontanea de los eritrocitos fue corregida usando sólo partículas y eritrocitos como blancos.

Finalmente, se chequeó que la presencia de una solución de PEG ó la presencia de partículas sin suero, no conduzcan a la hemolisis de los eritrocitos de oveja sensibilizados dentro del rango de concentraciones usadas en el ensayo. Los resultados se expresaron en términos de unidades CH50, es decir, las diluciones de suero en las que ocurre el 50% de la hemolisis, y son calculadas por un ajuste lineal de una versión log-log de la ecuación de Von Krogh [Kazatchkine y cols., 1986].

Una alternativa es expresar el porcentaje de unidades de consumo de CH50 relativas a un control negativo según lo indica la ecuación 2:

$$\text{Consumo (\%)} = \frac{(\text{CH50 muestra} - \text{CH50 control})}{\text{CH50 control}} \times 100$$

*Ec. (2)*

Para comparar partículas de diferente tamaño, el consumo del complemento fue graficado como una función del área superficial. El área de las superficie de las partículas fue calculada, como se describió anteriormente [Passirani y cols., 1998] usando la ecuación 3:

$$S = n4r^2 \quad \text{y} \quad V = \frac{4}{3}r^3$$

*Ec. (3)*

El rearrreglo de la ecuación 3 conduce a la siguiente ecuación (Ec. 4)

$$S = 3\frac{V}{r} = 3m/rp$$

*Ec. (4)*

Donde  $S$  es el área de la superficie ( $\text{cm}^2$ ) y  $V$  el volumen ( $\text{cm}^3$ ) de una esfera de radio  $r$  (cm), masa  $m$  ( $\mu\text{g}$ ) y de densidad  $\rho$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ).

Se llevó a cabo un ensayo empleando una solución de 1,5 mM de etilenglicol bis (2-aminoetil éter)-N,N,N,N-ácido tetra acético / $\text{Mg}^{2+}$  (EGTA/ $\text{Mg}^{2+}$ ) [Liu y cols., 1995] que actúa como inhibidor de la vía clásica quelando los iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan con el desvío estándar correspondiente. Un análisis *t-student* (de tipo “*two non matched samples*” en inglés) fue empleado para testear las diferencias significativas de los resultados.

### ***M.12.- Evaluación de la captura macrofagocítica***

Para este ensayo, se emplearon células humanas de la línea monocito/macrófago del tipo THP-1 (ATCC, Manassas, USA) que se cultivaron en una suspensión al 5% de  $\text{CO}_2$  y 37 °C en medio ATCC. Los experimentos se llevaron a cabo en células diferenciadas y la diferenciación fue inducida en el mismo medio por adición de 200 nM de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia) por 24 horas para permitir su adherencia [Tsuchiya y cols., 1982]. Luego de la aspiración del medio para eliminar las células no adheridas, las células fueron incubadas en un medio fresco por otras 24 horas antes de la adición de las nanopartículas. Las células ( $0,6 \times 10^6/\text{ml}$ ) fueron colocadas en una placa de 24 pocillos e incubadas por 24 horas más a 37 °C ó 4 °C. Luego de este periodo, la suspensión de NCLs fluorescentes fue depositada en la monocapa de células e incubadas por 90 minutos más a ambas temperaturas. La cantidad de nanopartículas fagocitadas fue determinada cuantitativamente mediante la técnica de FACS.

### ***M.13.- Estudios farmacocinéticos***

#### ***M.13.1. Animales de experimentación, tratamiento y muestreo***

Para este experimento, se emplearon 45 ratas Wistar hembras de aproximadamente 250-350 g de peso. El manejo de los animales fue llevado a cabo según las guías para el bienestar de animales, institucional e internacionalmente aceptadas (Canadian Council on Animal Care, 1980; American Veterinary Medical Association, 2001). Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura y ciclos de luz/oscuridad.

Las ratas fueron asignadas al azar en tres grupos de 15 animales cada uno. Los animales del grupo A recibieron la formulación comercial de IVM (Ivomec®; Merial, Argentina) en una dosis igual a 0,2 mg/kg por vía subcutánea (SC). Para ello, la formulación original fue diluida en propilenglicol para ajustar el volumen de la dosis. Las ratas del grupo B recibieron las suspensiones de IVM cargada en las NCLs en una dosis equivalente a 200 µg/kg (300 µl por inyección) por vía subcutánea (IVM-NCLs-SC). Los animales del grupo C recibieron la misma formulación de NCLs cargadas con IVM con la misma dosis que el grupo B pero por vía oral (PO). La formulación original de IVM-NCLs (1,14 mg/ml) fue diluida en agua milli Q para ajustar el volumen de la dosis.

Tres animales de cada grupo fueron sacrificados bajo anestesia superficial con éter a 6, 12, 24, 48 y 96 horas post-tratamiento. Las muestras de sangre (3 ml) fueron recolectadas por punción cardíaca en tubos con heparina. Las muestras de tejido recogidas incluyeron pared del intestino delgado (PID) y su contenido (CID), pulmón, e hígado. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2000 G por 20 minutos, luego el plasma y las muestras de los tejidos recogidos fueron colocadas en viales y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

#### ***M.13.2. Procedimiento analítico***

La concentración de IVM fue determinada por HPLC con detección fluorescente usando un método automático de extracción en fase sólida, siguiendo un procedimiento previamente descrito por Alvinerie y cols., (1993) y modificado por Lifschitz y cols. (2000). El plasma o los tejidos recogidos fueron homogenizados y se tomó una muestra de

0,25 ml o 0,25 g respectivamente que luego fue combinada con 10 ng del estándar interno (abamectina), 0,25 ml de acetonitrilo y 70  $\mu$ l de agua. Esta nueva muestra fue homogeneizada empleando un MultiTube Vortexer (VWR Scientific Products, West Chester, PA, USA) por 20 minutos. Luego, las muestras de tejido fueron colocadas en un baño de ultrasonido por 10 minutos (Transsonic 570/H; Lab Line Instruments Inc., Melrosepark, IL, USA) y luego la mezcla de solvente/muestra (plasma o tejido) fue centrifugada a 2000 G por 15 minutos. El supernadante obtenido fue manualmente transferido a un tubo y este procedimiento se repitió una vez más para las muestras de tejido. La suma de los supernadantes obtenidos fue pasada a través de un cartucho Supelclean LC18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Luego del lavado con 1 ml de agua seguido de 1 ml agua/metanol (4:1, v/v), los cartuchos fueron secados por 5 minutos y las muestras eluidas con 1,5 ml de metanol. El eluato recolectado fue evaporado a sequedad empleando una corriente de nitrógeno y en un baño de agua a 60 °C.

La reconstitución fue realizada empleando el método descrito por De Montigny y cols. (1990). El residuo seco de la elución fue disuelto en 100  $\mu$ l de una solución de N-metilimidazol (Sigma, St Louis, MO, USA) en acetonitrilo y 150  $\mu$ l de una solución de trifluoroacético anhídrido (Sigma, Argentina) en acetonitrilo (1:2 v/v). Luego de completada la reacción, 100  $\mu$ l de cada muestra fue inyectada directamente en el cromatógrafo.

Las condiciones de la cromatografía incluyen una fase móvil constituida por ácido acético (0,2 % en agua)/metanol/acetonitrilo (5:40:55 v/v/v), bomba a un flujo de 1,5 ml/min a través de una columna de fase reversa C18 (5  $\mu$ m) 4,6mm x 250 mm (Selectosil; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se empleó un detector fluorescente (Spectrofluorometric detector RF-10; Shimadzu, Kyoto, Japan) a una longitud de onda de excitación igual a 365 nm y una longitud de onda de emisión de 475 nm. Una validación completa del procedimiento analítico para la extracción y cuantificación de IVM en plasma, el tejido de la pared gastrointestinal y el contenido luminal fue llevado a cabo con anterioridad a este estudio por Lifschitz y cols., (2006).

La concentración de IVM fue determinada por el método del estándar interno. Se consideraron las relaciones de área para el cálculo de las concentraciones de fármaco entre los estándares (validación) y las muestras experimentales, y no se detectaron interferentes de componentes endógenos en las determinaciones cromatográficas.

Las curvas de concentración en función del tiempo obtenidas del plasma y de cada tejido como así también los parámetros farmacocinéticos fueron determinados empleando el modelo no compartimental. El pico de concentración máxima ( $C_{max}$ ) para cada muestra de fluido y tejido fueron leídos directamente de la curva. El área bajo la curva (ABC) desde cero hasta el último tiempo de muestreo con una concentración medible (ABC 0-final), fue calculada según la regla del trapecioide [Gibaldi y Perrier 1982]. Los parámetros farmacocinéticos promedio para IVM obtenidos luego de la administración de IVM en su forma comercial o vehiculizada en NCLs fueron comparadas estadísticamente usando el *test de t-student*. Se empleó una transformación logarítmica donde se encontraron diferencias significativas entre las desviaciones estándares. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

#### **M.14.- Estudio de solubilidad**

La solubilidad de un sólido en una solución ideal depende de la temperatura, el punto de fusión del sólido, y el calor de fusión molar ( $\Delta H_f$ ), es decir, el calor absorbido cuando el sólido funde. En una solución ideal, el calor de la solución es igual al calor de fusión y se asume como una constante independiente de la temperatura. La solubilidad ideal, no es afectada por la naturaleza del solvente [Martin y Sinko, 2006].

Se estudió el equilibrio de solubilidad del F (concentración máxima en solución) colocando un exceso del mismo en 1 g de varios excipientes lipídicos. Las suspensiones fueron mantenidas a 37 °C y agitadas periódicamente de forma enérgica (utilizando un vortex) hasta alcanzar el equilibrio de saturación del medio. Luego, las muestras fueron filtradas empleando un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  Minisart® (Sartorius, Goettingen, Alemania) y la solubilidad del F se determinó midiendo la absorbancia por espectrofotometría UV

(Termo Evolution 300) a la longitud de onda de máxima absorbancia. En todos los casos el procedimiento se realizó por triplicado.

#### ***M.15.- Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)***

Los análisis de MET fueron llevados a cabo empleando un equipo JEOL JSM 100CXII ubicado en el CRIBABB (Bahía Blanca, Argentina). La suspensión de nanopartículas fueron rociadas mediante un proceso de aspersion (spray) sobre rejillas de cobre cubiertas con 1% de reactivo Formvar en cloroformo, y luego se hizo contraste con una solución de acetato de uranilo.

#### ***M.16.- Ensayo de liberación in vitro***

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron por la técnica de diálisis y en condiciones sink. Para ello, 1 ml de la nanosuspensión del F se coloca en un tubo de diálisis (Sigma®, 15 kDa) y ésta en un medio receptor conteniendo una solución tampón fosfato salino (PBS, 0,1M) adicionado con 0,1% de Tween® 80 (PBST, pH 7,4), en un baño termostatzado a 37 °C y con agitación constante (100 rpm). A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron alícuotas de 0,5 ml del medio receptor y se reemplazaron por 0,5 ml de medio fresco. La cantidad de fármaco liberado en cada muestra se determinó por HPLC según la técnica específica para el F.

#### ***M.17.- Quimioterapia experimental de la hidatidosis***

Los procedimientos y protocolos de manejo de animales se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido en “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Se evitó en todo momento el sufrimiento innecesario de los animales.

##### ***M.17.1. Infección de los ratones***

Ratones hembra CF-1 (modelo animal para enfermedades infecciosas) fueron infestados a través de inoculación intraperitoneal con 1500 protoescolices en 0,5 ml de

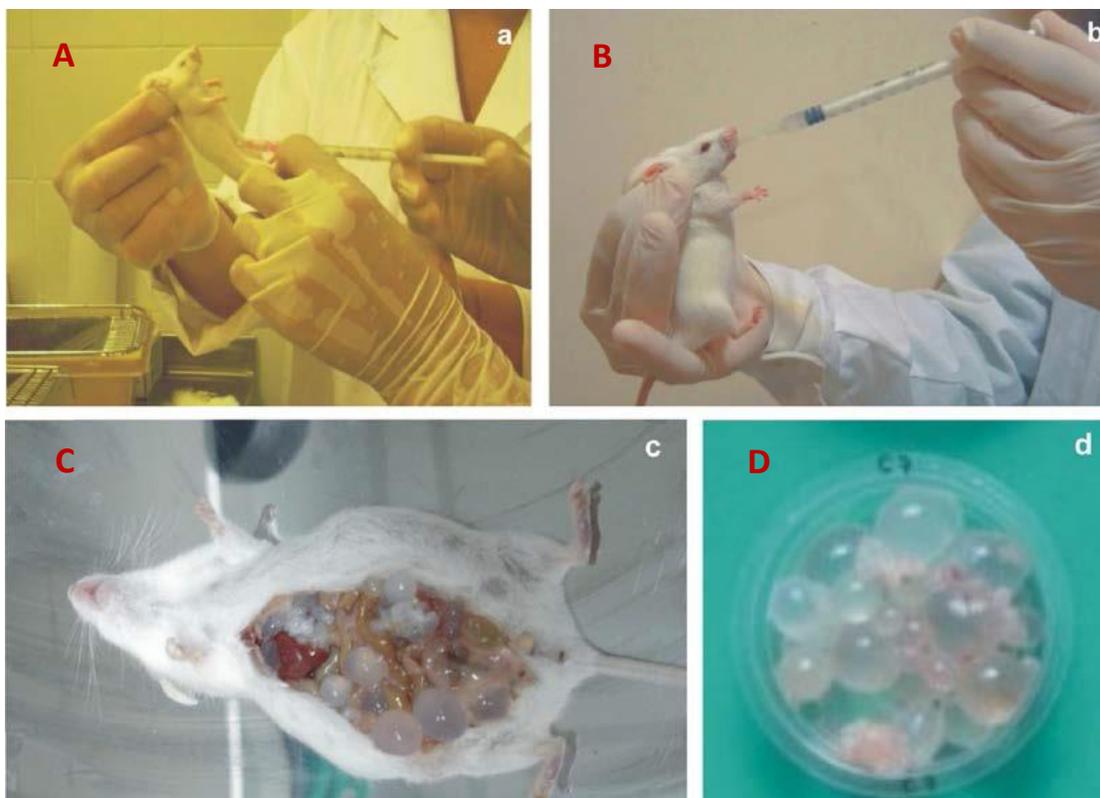
medio 199 para producir experimentalmente una hidatidosis secundaria [Elisondo y cols., 2007]. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio durante seis meses y se les suministró agua y alimento balanceado diariamente (**fig.5**).



**Figura 5. Administración intraperitoneal de protoescolices de *E. granulosus* en ratones CF-1.**

### ***M.17.2. Necropsia y obtención de quistes***

Luego de cinco a seis meses post-infección los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, previa anestesia con cloroformo. Se los diseccionó y se obtuvieron los quistes hidatídicos (**figuras 6 c y d**). Este procedimiento se llevó a cabo para la obtención de quistes para ser utilizados en los estudios *in vitro* (no se abordan en este trabajo de tesis doctoral), como así también para el análisis de las masas quísticas y la toma de muestras para MEB.



**Figura 6. A) Inoculación intraperitoneal de protoescolices de *E. granulosus* a en ratones hembras CF-1. B) Ratón siendo dosificado. C) Ratón necropsiado con quistes en su cavidad abdominal. D) Quistes extraídos de un ratón.**

### ***M.17.3. Eficacia quimioproláctica en ratones***

Los protoescolices fueron inoculados por vía intraperitoneal en 40 ratones CF-1 (1500 protoescolices por ratón) (figura 6.A). Inmediatamente luego de la infección, los animales fueron separados en cuatro grupos (n=10) según: 1) Grupo control: los animales recibieron agua destilada como placebo, 2) Grupo tratado: Control NCLs; los animales recibieron las NCLs blanco, 3) Grupo tratado: suspensión de ABZ, 4) Grupo tratado: ABZ-NCLs; los animales recibieron las nanocápsulas cargadas con ABZ. Los tratamientos en todos los grupos se llevaron a cabo diariamente por 30 días por administración intragástrica (0,53 ml/animal) con una dosis igual a 5 mg/kg de peso del animal de ABZ para los grupos 3 y 4 (figura 6. B.). Seis meses post-infección los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previa anestesia con cloroformo. Los animales fueron sacrificados, luego se llevó a cabo la necropsia y se registró el peso de los quistes

hidatídicos extraídos de cada animal (figura 6.C.). Las diferencias en el peso de los quistes entre los tratamientos se analizaron mediante el test de ANOVA y Tukey (R). Asimismo, se tomaron muestras para MEB y MET.

#### ***M.17.4. Análisis estadístico***

En cada experimento, los pesos de los quistes obtenidos durante la necropsia de los ratones (expresados como el promedio  $\pm$ DS) se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) seguido de un test de comparación múltiple de Dunn. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

#### ***M.17.5. Estudio ultraestructural***

El estudio ultraestructural se realizó por MET y/o MEB con la finalidad de investigar las posibles alteraciones ocurridas en las membranas quísticas. De este modo, los quistes obtenidos de todos los grupos se enjuagaron con tampón cacodilato y se fijaron durante 4 días en glutaraldehído al 3%. Luego se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con el mismo tampón. El material permaneció en el último lavado y se conservó en heladera hasta su procesamiento.

#### ***M.18.- Test de citotoxicidad (MTS)***

Este ensayo se emplea para la determinación del efecto citotóxico de un compuesto dado o de ciertas condiciones de ensayo. Los indicadores que se usan más frecuentemente son los colorantes aceptores de electrones como las sales de tetrazolio. Básicamente dos ensayos son los que se realizan a menudo para determinar la toxicidad según el colorante empleado. Por un lado, MMT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), y por otro MTS (sal interna de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio).

En esta tesis doctoral se empleó el test de MTS. Este ensayo se basa en la conversión del colorante (sal de tetrazolium) en un producto coloreado, acuoso llamado formazan (forma reducida del colorante) producido por la actividad mitocondrial de las células a 37 °C. Esta reacción es catalizada por la enzima deshidrogenasa de las células vivas y la

cantidad producida es directamente proporcional al número de células viables medido por absorbancia a 492 nm.

Prácticamente, se colocaron 200  $\mu$ l de una suspensión de células a una concentración predeterminada en una placa de 24 pocillos y se las incubó por 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, añadiendo también un control sin células (solo medio). Luego de transcurrido este tiempo, se descarta el contenido de cada pocillo, y se agregan 200  $\mu$ l de los grupos tratamiento, medio fresco (control negativo), y el control positivo (100% de dimetilsulfóxido, mortalidad total) en los respectivos pocillos. Cada grupo se realizó por triplicado. Luego, se incubó nuevamente por 4 u 24 horas según el protocolo establecido.

Transcurrido este tiempo, se retira el medio, se lava tres veces con 100  $\mu$ l de PBS precalentado y se agrega 100  $\mu$ l de reactivo MTS a cada pocillo. Se incubó nuevamente por dos horas a 37°C al abrigo de la luz y se coloca la placa bajo agitación por 10 minutos hasta que se observa una solución homogénea. Finalmente, se toman 100  $\mu$ l de cada pocillo y se colocan en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia en un lector de placa a 492 nm. La densidad óptica medida es una función de la concentración del colorante que se encuentra en su forma reducida.



## **BIBLIOGRAFIA**



**A**

---

**Abdel-Mottaleb MMA, Neumann D, Lamprecht A (2010).** In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC), *Int. J. Pharm.* 390:208-213.

**Adams S, Zordan T, Sainis K, Datta SK (1990).** T cell receptor V beta genes expressed by IgG anti-DNA autoantibody-inducing T cells in lupus nephritis: forbidden receptors and double negative T cells, *Eur. J. Immunol.* 20:1435-1443.

**Agrawal S, Tamsamani J, Yan Tang J (1991).** Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7595-7599.

**Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Ropolo A, Moron G, Pistoiresi-Palencia MC (2005).** Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice, *J. Leukoc. Biol.* 77:898-905.

**Allard E, Hindre F, Passirani C, Lemaire L, Lepareur N, Noiret N, Menei P, Benoit JP (2008)a.** Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 35:1838-1846.

**Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessieres A, Jaouen G, Benoit JP (2008)b.** Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas, *J. Control Release.* 130:146-153.

**Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P (1993).** Ivermectin in goat milk after subcutaneous injection, *Vet. Res.* 24:417-421.

**Armour J, Bairden K, Batty AF, Davison CC, Ross DB (1985).** Persistent anthelmintic activity of ivermectin in cattle, *Vet. Rec.* 116:151-153.

## B

---

**Ballent M, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C (2007).** Involvement of P-glycoprotein on ivermectin availability in sheep: itraconazole-mediated enhancement of gastrointestinal disposition, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30:242-248.

**Ballot S, Noiret N, Hindre F, Denizot B, Garin E, Rajerison H, Benoit JP (2006).** <sup>99m</sup>Tc/<sup>188</sup>Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 33:602-607.

**Banker G (2002).** Drug Products: their role in the treatment of disease, their quality, and their status as drug delivery systems. En: Banker G, Rhodes C (2002). *Modern Pharmaceutics*, 4<sup>a</sup> ed. Editorial Marcel Dekker. New York. 1-20.

**Barratt G (2000).** Therapeutic applications of colloidal drug carriers, *Pharm. Sci. Technol. Today.* 3(5):163-171.

**Basile L, Passirani C, Huynh NT, Béjaud J, Benoit JP, Puglisi G, Pignatello R (2012).** Serum-stable, long-circulating paclitaxel-loaded colloidal carriers decorated with a new amphiphilic PEG derivative, *Int. J. Pharm.* 426:231-238.

**Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O (2014).** Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 32(2):106-114.

**Bawa R, Bawa SR, Maebius SB, Flynn T, Wei C (2005).** Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents, *Nanomedicine.* 1:150-158.

**Beck JL, Colgrave ML, Ralph SF, Sheil MM (2001).** Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs metals, and proteins, *Mass Spectrom. Rev.* 20:61-87.

**Béduneau A, Saulnier P, Hindré F, Clavreul A, Leroux J C, Benoit JP (2007)a.** Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments, *Biomaterials.* 28:4978-4990.

**Béduneau A, Saulnier P, Benoit JP (2007)b.** Active targeting of brain tumors using nanocarriers, *Biomaterials.* 28:4947-4967.

**Béduneau A, Hindré F, Clavreul A, Jeroux JC, Saulnier P, Benoit JP (2008).** Brain targeting using novel lipid nanovectors, *J. Control Release.* 126:44-49.

**Beg S, Samad A, Nazish I, Sultana R, Rahman M, Ahmad MZ, Akbar M (2012).** Colloidal Drug Delivery Systems in Vaccine Delivery, *Curr. Drug Targets.* 13(14):1-15.

**Benedini L, Schulz EP, Messina P, Palma S, Allemandi D, Schulz P (2011).** The ascorbyl palmitate-water system: Phase diagram and state of water, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 375: 178-185.

**Benedini L (2012).** Interacción de un tensioactivo biocompatible con estructuras de interés farmacológico, Tesis doctoral. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

**Benedini L, Messina P, Palma S, Allemandi D, Schulz P (2012).** The ascorbyl palmitate-polyethyleneglycol 400-water system phase behaviour, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 89:265-270.

Berrozpe JD, Lanao JM, Plá D (2008). *Biofarmacia y Farmacocinética.* Editorial Síntesis.

**Biswas S, Dodwadkar N, Deshpande P, Torchilin V (2012).** Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo, *J. Control Release.* 159:393-402.

**Bogan JA, McKellar QA (1988).** The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 11(3):260-268.

**Bourquin C, Anz D, Zwiorek K, Lanz AL, Fuchs S, Weigel S, Wurzenberger C, Borch P, Golic M, Moder S, Winter G, Coester C, Endres S (2008).** Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity, *J. Immunol.* 181(5):2990-2998.

**Boyd B, Whittaker D, Khoo S, Davey G (2006).** Hexosomes formed from glycerate surfactants-Formulation as a colloidal carrier for irinotecan, *Int. J. Pharm.* 318:154-162.

**Brown ME, editor (1998).** Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry, Principles and practice, Vol.1. Editorial Elsevier. Amsterdam.

**Brunetti E, Garcia HH, Junghanss T (2011).** Cysticechinococcosis: Chronic, complex, and still neglected, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:1-5.

**Budhiana A, Siegelb S, Wineya K (2008).** Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 346:151-159.

**Buyun C, Bartlett M (2012).** A One-Step Solid Phase Extraction Method for Bioanalysis of a Phosphorothioate Oligonucleotide and Its 3' n-1 Metabolite from Rat Plasma by uHPLC-MS/MS, *J. AAPS.* 14:772-780.

**Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L (2008).** Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:1615-1626.



---

**Campbell W, Fischer M, Stapley E, Albers-Schönberg G, Jacobs T (1983).** Ivermectin a potent new antiparasitic agent, *Sci.* 221:823-828.

**Caproni E, Tritto E, Cortese M, Muzzi A, Mosca F, Monaci E, Baudner B, Seubert A, De Gregorio E (2012).** MF59 and Pam3CSK4 boost adaptive responses to influenza subunit vaccine through an IFN type I-independent mechanism of action, *J. Immunol.* 188(7):3088-3098.

**Chen S, Zhang H, Chinnathambi S, Hanagata N (2013).** Synthesis of novel chitosan-silica/CpG oligodeoxynucleotide nanohybrids with enhanced delivery efficiency, *Mater. Sci. Eng. C Mater Biol. Appl.* 33(6):3382-3388.

**Chia CSL, Robinson JR (1998).** Sistemas de liberación sostenida de drogas. En: Gennaro, AR (1998). Remington Farmacia, 19ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 2536-2559.

**Chomel B (2008).** Control and prevention of emerging parasitic zoonoses, *Int. J. Parasitol.* 38:1211-1217.

**Cohen AS, Bourque AJ, Wang BH, Smisek DI, Belenky A (1997).** A nonradioisotope approach to study the in vivo metabolism of phosphorothioate oligonucleotides, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:13-22.

**Collet J, Moreton, C (2002).** Modified-release peroral dosage formes. En: Aulton, ME (2002). *Pharmaceutics, the science of dosage form design*, 2ª ed. Editorial Churchill Livingstone Elsevier Science Limited. España. 290-305.

**Conner SD, Schmid SL (2003).** Regulated portals of entry into the cell, *Nature.* 422:37-44.

**Cong TT, Faivre V, Nguyen TT, Heras H, Pirot F, Walchshofer N, Sarciron ME, Falsón F (2008).** Study on the hydatid cyst membrane: Permeation of model molecules and interactions with drug-loaded nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 353:223-232.

**Cromelin DJS, Florence AT (2013).** Towards more effective advanced drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 15(1):496-511.

**Crooke RM, Graham MJ, Cooke ME, Crooke ST (1995).** In vitro pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligonucleotides, *J. Pharm. Exp. Ther.* 275:462-73.

**Couvreurand P, Vauthier C (2006).** Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharm. Res.* 23:1417-1450.

**Cucher M, Mourglia-Ettlinb G, Pradaa L, Costac H, Kamenetzky L, Poncini C, Dematteis S, Rosenzvit MC (2013).** *Echinococcus granulosus* pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice, *Vet. Parasitol.* 193:85-192.

## D

---

**Daniel-Mwambete K, Torrado S, Cuesta-Bandera C, Ponce-Gordo F, Torrado JJ (2004).** The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs, *Int. J. Pharm.* 272:29-36.

**Delmas T, Couffin A-C, Bayle PA, Fd Crécy, Neumann E, Vinet F, Bardet M, Bibette J, Texier I (2011).** Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity, *J. Colloid Interface Sci.* 360(2):471-481.

**De Montigny P, Shim JSK, Pivinichny JV (1990).** Liquid chromatographic determination of ivermectin with trifluoro-acetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8:507-511.

**Denegri G, Elissondo C, Dopchiz M (2002).** Impacto de los modelos experimentales de cultivo *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento médico de la hidatidosis. En: Denegri G, Elissondo M, Dopchiz M (2002). Situación de la hidatidosis-echinococcosis en la República Argentina. Editorial Martín. Mar del Plata, Argentina. 197-203.

**Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, Kielland A, Vosters O, Vanderheyde N, Schiavetti F, Larocque D, Van Mechelen M, Garçon N (2009).** AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity, *J. Immunol.* 183(10):6186-6197.

**Diwan M, Tafaghodi M, Samuel J (2002).** Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres, *J. Control Release.* 85:247-262.

**Düzgünes N (2001).** Lipid assemblies for drug delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47:137-138.

## **E**

---

**Eckert J, Deplazes P (2004).** Biological epidemiological, and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern, *Clin. Microbiol. Rev.* 17:107-135.

**Egerton J, Ostlind D, Blair L, Eary C, Suhayda D, Cifelli S, Riek R, Campbell W (1979).** Avermectins new family of potents anthelmintic agents: efficacy of the B1a component, *Antimicrob. Agents Chemother.* 15(3):372-378.

**Elissondo M, Ceballos L, Dopchiz M, Andresiuk V, Alvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C, Denegri G (2007).** In vitro and in vivo effects of flubendazole on *Echinococcus granulosus* metacestodes, *Parasitol Res.* 100(5):1003-1009.

**Elissondo MC, Bermudez JM, Ullio Gamboa GV, Pensel PE, Cid AG, Juarez MM, Allemandi DA, Palma SD (2013).** Hydatid Disease: current status of chemotherapy and drug delivery systems, current drug therapy. 8:197-205.

**Ermer J (2001).** Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24:755-767.

**Ermer J, Ploss HJ (2005).** Validation in pharmaceutical analysis Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37:859-870.

## F

---

**Fang C, Bhattarai N, Sun C, Zhang M (2009).** Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media, *Small.* 5(14):1637-1641.

**Farmacopea Argentina 8<sup>va</sup> edición (2008).** Disponible en Internet: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava\\_edicion](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava_edicion).

**Fenske DB, Palmer LR, Chen T, Wong KF, Cullis PR (2001).** Cationic poly(ethyleneglycol) lipids incorporated into pre-formed vesicles enhance binding and uptake to BHK cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:259-272.

**Fink DW, Porras AG (1989).** Pharmacokinetics of ivermectin in animals and humans. En: Campbell WC (Ed.) (1989). *Ivermectin and Abamectin*. Editorial Springer-Verlag. New York, USA. 113-130.

**Fisher MH, Mrozik H (1989).** Chemistry. En: Campbell, WC (Ed.) (1989). Ivermectin and Abamectin. Editorial Springer-Verlag. New York, USA. 1-23.

**Fonseca DE, Kline JN (2009).** Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61:256-262.

**Food and Drug Administration (1997).** FDA Guidance for Industry: SUPAC-SS Nonsterile semisolid dosage forms. Scale-Up and Post Approval Changes: Chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation, Department of Health and Human Services. Rockville (MD), USA.

**Food and Drug Administration (2001).** FDA Guidance for Industry, Bioanalytical, Method Validation, Department of Health and Human Services. Rockville (MD), USA.

## G

---

**Garcia JJ, Bolas F, Torrado JJ (2003).** Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of ABZ, *Int. J. Pharm.* 250:351-358.

**Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, Menei P, Benoit JP (2006).** A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats, *Mol. Cancer Ther.* 5(7):1710-1722.

**Garlapati S, Eng NF, Kiros TG, Kindrachuk J, Mutwiri GK, Hancock EW, Halperin SA, Potter AA, Babiuk LA, Gerds V (2011).** Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis, *Vaccine.* 29(38):6540-6548.

**Geary RS, Leeds JM, Henry SP, Monteith DK, Levin AA (1997).** Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 1. Pharmacokinetic properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *Anticancer Drug Des.* 12:383-393.

**Gibaldi M, Perrier D (1982).** Pharmacokinetics, revised and expanded 2<sup>nd</sup> ed. Editorial Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 45-109.

**Gilar M, Belenky A, Budman Y, Smisek DL, Cohen AS (1998).** Study of phosphorothioate-modified oligonucleotide resistance to 3'-exonuclease using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 714:13-20.

**Godin B, Sakamoto JH, Serda RE, Grattoni A, Bouamrani A, Ferrari M (2010)** Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases, *Trends Pharm. Sci.* 31:199-205.

**Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985).** Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *J. Cell Biol.* 100:965-973.

**Gupta AK, Gupta M (2005).** Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials.* 26:3995-4021.

## H

---

**Hanagata N (2012).** Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system, *Int. J. Nanomed.* 7:2181-2195.

**Hearnden V, Sankar V, Hull K, Vidovi Juras D, Greenberg M, Ker AR, Lockhart PB, Patton LL, Porter S, Tornhill MH (2012).** New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64:16-28.

**Helkenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, Zinkernagel R, Aguzzi A (2004).** Lymphoid follicle destruction and immuno suppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration, *Nat. Med.* 10:187-192.

**Herrera-Gómez A, Velázquez-Cruz G, Martín-Polo MO (2001).** Analysis of the water bound to a polymer matrix by infrared spectroscopy, *J. Applied Physics.* 89(10):5431-5437.

**Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Richard J, Benoit JP (2000).** Lipidic nanocapsules: preparation process and use as drug delivery systems. Patent No. WO02688000.

**Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP (2002)a.** A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res.*19:875-880.

**Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP (2002)b.** Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface, *Int. J. Pharm.* 242:167-170.

**Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Benoit JP, Proust JE (2003)a.** Interfacial stability of lipid nanocapsules, *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 30:225-235.

**Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP (2003)b.** Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, *Biomaterials.* 24:4283-4300.

**Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, PhanTan-Luu R, Benoit JP (2003)c.** The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18:55-61.

**Hemphill A, Müller J (2009).** Alveolar and cystic echinococcosis: towards novel chemotherapeutical treatment options, *J. Helminthol.* 83(2):99-111.

**Hirano S, Ohe Y (1975).** A facile N-acylation of chitosan with carboxylic anhydrides in acidic solutions, *Carbohydr. Res.* 41:C1-C2.

**Hirano S, Ohe Y, Ono H (1976).** Selective N-acylation of chitosan, *Carbohydr. Res.* 47:315-320.

**Hirano S, Yamaguchi Y, Kamiya M (2002).** Novel N-saturated-fatty-acyl derivatives of chitosan soluble in water and in aqueous acid and alkaline solutions, *Carbohydr. Polym.* 48:203-207.

**Hirsjärvi S, Qiao Y, Royere A, Bibette J, Benoit JP (2010).** Layer-by-layer surface modification of lipid nanocapsules, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76:200-207.

**Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux JC (2004).** Novel long-circulating lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 21:1783-1789.

**Horton R (1997).** Albendazole in the treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience, *Acta Trop.* 64:79-93.

**Horton J (2003).** Human gastrointestinal helminth infections: are they now neglected diseases?, *Trends Parasitol.* 19(11):527-531.

**Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Rousselet MC, Moal V, Urban T, Benoit JP (2010).** Toxicological Study and Efficacy of Blank and Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules After i.v. Administration in Mice. *Pharm. Res.* 27(3):421-430.

**Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP (2009).** Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.* 379:201-209.

I

---

**Imperiale F, Lifschitz A, Sallovitz J, Virkel G, Lanusse C (2004).** Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous administration, *J. Dairy Res.* 71: 427-433.

**International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005).** ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

**Ioannou XP, Gomis SM, Karvonen B, Hecker R, Babiuk LA, van DrunenLittel-van den Hurk (2002).** CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein, *Vaccine.* 21:127-137.

## J

---

**Johannes L, Lamaze C (2002).** Clathrin-dependent or not: is it still the question?, *Traffic.* 3:443-451.

**Johnson JL , Guo W, Zang J, Khan S, Bardin SA, Ahmad A, Duggan JX , Ahmad I (2004).** Quantification of raf antisense oligonucleotide (rafAON) in biological matrices by LC-MS/MS to support pharmacokinetics of a liposome-entrapped rafAON formulation, *Biomed. Chromatogr.* 19(4):272-278.

**Jones RM, Logan NB, Weatherley AJ, Little AS, Smothers CD (1993).** Activity of doramectin against nematode endoparasites of cattle, *Vet. Parasitol.* 49:27-37.

**Jurkovic P, Sentjurc M, Gasperlina M, Kristla J, Pecara S (2003).** Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsiones, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56(1)59-66.

**K**

---

**Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL (2003).** Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification, *Molecular pharmaceutics*, 1(1):85-96.

**Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL (2003).** Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification, *Molecular pharmaceutics*. 1(1):85-96.

**Kazatchkine MD, Hauptmann G, Nydegger U (1986).** *Techniques du Complément*, INSERM collection technique en immunologie. Paris.

**Kern P (2003).** Echinococcus granulosus infection: clinical presentation, medical treatment and outcome, *Langenbecks Arch. Surg.* 388(6):413-420.

**Kern P (2006).** Medical treatment of echinococcosis under the guidance of Good Clinical Practice (GCP/ICH), *Parasitol. Int.* 55:273-282.

**Kinoshita T (1991).** Biology of complement: the overture, *Immunol Today*. 12:291-295.

**Klinman DM, Barnhart KM, Conover J (1999).** CpG motifs as immune adjuvants, *Vaccine*. 17:19-25.

**Klinman MD (2004)a.** Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides, *Nat. Rev. Immunol.* 4:249-258.

**Klinman MD, Currie D, Gursel I, Verthelyi D (2004)b.** Use CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants, *Immunol. Rev.* 199:201-216.

**Köhler U, Yang PW, Weng S, Mantsch HH (1988).** Structure and Polymorphic Phase Behavior of Ascorbyl Palmitate in Water, *Can. J. Spectrosc.* 33(5):122-127.

**Krieg AM, Guga P, Stec W (2003).** P-chirality-dependent immune activation by phosphorothioate CpG oligodeoxynucleotides, *Oligonucleotides.* 13:491-499.

**Krieg AM (2006).** Therapeutic potential of Toll-Like receptor 9 activation, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:471-484.

**Krieg AM (2012).** CpG still rocks! Update on an accidental drug, *Nucleic Acid Ther.* 22(2):77-89.

**Krishnamachari Y, Salem A (2009).** Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61:205-217.

**Kumar P, Chen K, Kolls JK (2013).** Th17 cell based vaccines in mucosal immunity, *Curr Opin. Immunol.* 25:373-380.

**Kwong B, Liu H, Irvine DJ (2011).** Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy, *Biomaterials.* 32:1-14.

## L

---

**Larabi N (2009).** Nanoparticle therapy in parasites disease: possibility and reality. En: A. Lamprecht (Ed.), (2009). *Nanotherapeutics. Drug delivery concepts in nanoscience.* Editorial Pan Stanford Publishing Pte. Singapore. 227-259.

**Lamprecht A, Bouligand Y, Benoit JP (2002).** New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone, *J. Control Release* 84:59-68.

**Lamprecht A, Saumet JL, Roux R, Benoit JP (2004).** Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment, *Int. J. Pharm.* 278:407-414.

**Lamprecht A, Benoit JP (2006).** Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition, *J. Control Release* 112(2):208-213.

**Lanusse C (1994).** Factores que afectan la biodisponibilidad plasmática y eficacia de los fármacos antihelmínticos, *Arch. Med. Vet.* 26 (1):5-14.

**Lanusse C, Litschitz A, Vikel G, Alvarez L, Sanchez S, Sutra J, Galtier P, Alvinerie M (1997).** Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20:91-99.

**Lanusse C (2003).** Comparative pharmacokinetics of anthelmintic drugs in ruminants – update integration of current knowledge, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26(1):42-47.

**Laouini A, Andrieu V, Vecellio L, Fessi H, Charcosset C (2014).** Characterization of different vitamin E carriers intended for pulmonary drug delivery, *Int. J. Pharm.* 471:385-390.

**Lee DW, Powers K, Baney R (2004).** Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 58:371-377.

**Lifschitz A, Virkel G, Pis A, Imperiale F, Sanchez S, Alvarez L, Kujanek R, Lanusse C (1999).** Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle, *Vet. Parasitol.* 86:203-215.

**Lifschitz A, Imperiale F, Virkel G, Muñoz Cobeñas M, Scherling N, DE Lay R, Lanusse C (2000).** Depletion of moxidectin tissue residues in sheep, *J. Agric. Food Chem.* 48:6011-6015.

**Lifschitz A, Ballent M, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C (2006).** Sex-related differences in the gastrointestinal disposition of ivermectin in the rat: P-glycoprotein involvement and itraconazole modulation, *J. Pharm. Pharmacol.* 58:1055-1062.

**Lin V J, Koenig JL (1976).** Raman studies of bovine serum albumin, *Biopolymers.* 15:203-218.

**Lipford GB, Heeg K, Wagner H (1998).** Bacterial DNA as immune cell activator, *Trends Microbiol* 6:496-500.

**Lloberas M, Alvarez L, Entrocasso C, Virkel G, Lanusse C, Lifschitz A (2012).** Measurement of ivermectin concentrations in target worms and host gastrointestinal tissues: Influence of the route of administration on the activity against resistant *Haemonchus contortus* in lambs, *Exp Parasitol.* 131:304-309.

**Lo PA, Fink DW, Williams JB, Blodinger J (1985).** Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulation. *Vet. Res. Commun.* 9:251-268.

**Lo Nostro P, Ninham BW, Fratoni L, Palma S, Manzo RH, Allemandi D, Baglioni P (2002).** Effect of water structure on the formation of coagels from ascorbylalkanoates, *Langmuir.* 19:3222-3228.

**Lv H, Jiang Y, Liao M, Sun H, Zhang S, Peng X (2013).** In vitro and in vivo treatments of *Echinococcus granulosus* with *Huaiera queou* extract and albendazole liposome, *J. Parasitol. Res.* 112:193-198.

**Lyklema, J (2003).** Electrokinetics after Smoluchowski, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 222:5-14.

**M**

---

**Maletto B, Ropolo A, Moron V, Pistoiresi-Palencia MC (2002).** CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice, *J. Leukoc Biol.* 72:447-454.

**Maletto BA, Ropolo AS, Liscovsky MV, Alignani DO, Glocker M, Pistoiresi-Palencia MC (2005).** CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice, *Clin. Immunol.* 117:251-261.

**Malyala P, O'Hagan DT, Singh M (2009).** Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(3):218-25.

**Malzert-Fréon A, Vrignaud S, Saulnier P, Lisowski V, Benoit JP, Rault S (2006).** Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a triptentone, a new anticancer agent, *Int. J. Pharm.* 320(1-2):157-164.

**Martin AN y Sinko PJ (2006).** Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: Physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences, 5<sup>th</sup> ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.

**Mayer MM (1961).** Complement and complement fixation. En: Kabat E, Mayer MM (Eds.) (1961). *Experimental immunochemistry*. Editorial IL Thomas. Springfield. 133-240.

**Mazzarino L, Travelet C, Ortega-Murillo S, Otsuka I, Pignot-Paintrand I, Lemos-Senna E, Borsali R (2012).** Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications, *J. Colloid Interface Sci.* 370:58-66.

**Messina P (2003)**. Tesis doctoral. Propiedades coloidales de las soluciones del ácido n-decano fosfónico y de sus sales sódicas. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

**McKellar Q, Benchaoui H (1996)**. Avermectins and milbemycins, *J.Vet. Pharmacol. Ther.* 19:331-351.

**McManus DP, Gray DJ, Zhang W, Yang Y (2012)**. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis, *BMJ.* 344:1-13.

**McNaughton J, Mortimer C (1975)**. *Calorimetría Diferencial de Barrido*. Editorial Perkin Elmer Corporation.

**Mingjie W, Shuhua X, Junjie C, Bin L, Cheng F, Weixia S, Hotez P (2002)**. Albendazole soybean oil emulsion for the treatment of human cystic echinococcosis: Evaluation of bioavailability and bioequivalence, *Acta Trop.* 83:177-181.

**Moreira JN, Ishida T, Gaspar R, Allen TM (2002)**. Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formulated stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity, *Pharm. Res.* 19:265-269.

**Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhay S, Baras B, Jacob V, Planty C, Elouahabi A, Harvengt P, Carlsen H, Kielland A, Chomez P, Garçon N, Van Mechelen M (2011)**. Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity, *Vaccine.* 29(13):2461-2473.

**Morille M, Passirani C, Letrou-Bonneval E, Benoit JP, Pitard B (2009)**. Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting, *Int. J. Pharm.* 379:293-300.

**Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, Pitard B, Benoit JP, Passirani C (2010).** Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials*. 31:321-329.

**Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, O'Hagan D, Rappuoli R, De Gregorio E (2008).** Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105(30):10501-10506.

**Mui B, Raney SG, Semple SC, Hope MJ (2001).** Immune stimulation by a CpG-Containing oligodeoxynucleotide is enhanced when encapsulated and delivered in lipid particles, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:1185-1192.

**Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S, Babiuk LA (2004).** Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides, *J. Control Release* 97:1-17.

**Mutwiri GK, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA (2009).** Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61:226-232.

## N

---

**Nasongkla N, Bey E, Ren J, Ai H, Khemtong C, Guthi JS, Chin S-F, Sherry AD, Boothman DA, Gao J (2006).** Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems, *Nano Lett.* 6:2427-2430.

**Negash T, Liman M, Rautenschlein S (2013).** Mucosal application of cationic poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles as carriers of DNA vaccine and adjuvants to protect chickens against infectious bursal disease, *Vaccine*. 31:3656-3662.

**Nishikawa M, Mizuno Y, Mohri K, Matsuoka N, Rattanakit S, Takahashi Y, Funabashi H, Luo D, Takakura Y (2011)** Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice, *Biomaterials*. 32:488-494.

**Noll BO, McCluskie MJ, Sniatala T, Lohner A, Yuill S, Krieg AM, Schetter C, Davis HL, Uhlmann E (2005).** Biodistribution and metabolism of immunostimulatory oligodeoxynucleotide CPG 7909 in mouse and rat tissues following subcutaneous administration, *Biochem Pharmacol* 69(6):981-991.

**Nowakowski MA, Lynch MJ, Smith DG, Logan NB, Mouzin DE, Lukaszewicz J, Ryan NI, Hunter RP, Jones RM (1995).** Pharmacokinetics and bioequivalence of parenterally administered doramectin in cattle, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18:290-298.

## O

---

**OPS. Organización Panamericana de la Salud (2004).** Reunión Constitutiva del Proyecto Regional Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis - Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Montevideo, Uruguay: OPS; (OPS/DPC/VP/ 04). 8-71.

**Owens III DE, Peppas NA (2006).** Opsonization biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307:93-102.

## P

---

**Paillard A, Hindré F, Vignes-Colombeix C, Benoit JP, Garcion E (2010).** The importance of endolysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability, *Biomaterials*. 31:7542-7554.

**Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA, Fratoni L, Lo Nostro P (2002)a.** Solubilization of hydrophobic drugs in octanoyl-6-O-Ascorbic acid micellar dispersions, *J. Pharm. Sci.* 91(8): 1810-1816.

**Palma SD, Lo Nostro P, Manzo RH, Allemandi DA (2002)b.** Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16:37-43.

**Palma SD (2003).** Estudio de Compuestos Anfifílicos y su Utilización en Tecnología Farmacéutica, Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

**Palma S, Jiménez-Kairuz A, Fratoni L, Lo Nostro P, Manzo R, Allemandi D (2003)a.** 6-O-alkyl Ascorbic Acid Derivatives as drug carriers: Structure and rheology of coagels, *Il Farmaco* 58:1271-1276.

**Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA, Fratoni L, Lo Nostro P (2003)b.** Drugs solubilization in ascorbyl-decanoate micellar solutions, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 212:163-173.

**Palma SD, Manzo RH, Lo Nostro P, Fratoni L, Allemandi D (2003)c.** Vehiculización de Antralina en Coageles de n-alkil derivados del Ácido Ascórbico, *Acta Farm. Bonaerense* 22(4):305-312.

**Palma SD, Manzo R, Lo Nostro P, Allemandi D (2007).** Nanostructures from alkyl vitamin C derivatives (ASCn): Properties and potential platform for drug delivery, 345:26-34.

**Pan X, Wu G, Yang W, Barth R, Tjarks W, Lee R (2007).** Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR, *Bioconjugate Chem.* 18(1):101-108.

**Panwar P, Pandey B, Lakhera P, Singh K (2010).** Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes, *Int. J. Nanomedicine.* 5: 101-108.

**Parveen S, Misra R, Sahoo SK (2011).** Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging, *Nanomedicine.*8:147-166.

**Parveenand S, Sahoo SK (2008).** Polymeric nanoparticles for cancer therapy, *J. Drug Target.* 16:108-123.

**Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP, Labarre D (1998).** Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system, *Life Sci.* 62:775-785.

**Pellegrino T, Kudera, S, Liedl T, Javier AM, Manna L, Parak WJ (2005).** On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications, *Small.* 1:48-63.

**Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP (2006).** Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 23(6):1243-1250.

**Perche F, Patel N, Torchilin V (2012).** Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicin-loaded PEG-PE micelles in ovarian cancer cell spheroid model, *J. Control Release.* 164:95-102.

**Perrier T, Saulnier P, Fouchet F, Lautram N, Benoit JP (2010).** Post-insertion into lipid nanocapsules (LNCs): from experimental aspects to mechanisms, *Int. J. Pharm.* 396:204-209.

**Phillips JA, Craig SJ, Bayley D, Christian RA, Geary R, Nicklin PL (1997).** Pharmacokinetics, metabolism, and elimination of a 20-mer phosphorothioateoligodeoxynucleotide (CGP 69846A) after intravenous and subcutaneous administration, *Pharmacol. Biochem.* 54:657-68.

**Poirot-Mazeres I (2011).** Legal aspects of the risks raised by nanotechnologies in the field of medicine, *J. Int. Bioethique.* 22:99-118.

**Pouliot, JF, L'Heureux F, Liu Z, Prichard R, Georges E (1997).** Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectine, *Pharmacol. Biochem.* 53:17-25.

**Puig JE, Soltero JFA, Franses E, Torres LA, Schulz PC (1996).** En: AK Chattopadhyay, KL Mittal, (eds.) (1996). *Surfactants in solution. Surfactant science series 64.* Editorial Marcel Dekker. New York. 147-167.

## R

---

**Raney S, Wilson K, Sekirov L, Chikh G, De Jong S, Cullis P, Tam Y (2008).** The effect of circulation lifetime and drug-to-lipid ratio of intravenously administered lipid nanoparticles on the biodistribution and immunostimulatory activity of encapsulated CpG-ODN, *J. Drug Target.* 16(7-8):564–577.

**Redondo PA, Alvarez AI, Garcia JL, Villaverde C, Prieto JG (1998).** Influence of surfactants on oral bioavailability of ABZ based on the formation of the sulphoxide metabolites in rats, *Biopharm. Drug Dispos.* 19(1):65-70.

**Richard A, Barras A, Younes AB, Monfilliette-Dupont N, Melnyk P (2008).** Minimal chemical modification of reductive end of dextran to produce an amphiphilic polysaccharide able to incorporate onto lipid nanocapsules, *Bioconjugate Chem.* 19:1491-1495.

**Rodriguez JM, Bories JC, Emery I, Fessi H. Devissaguet JP, Liance M (1995).** Development of an injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestode, *Int. J. Parasitol.* 25:1437-1441.

**Roger E, Lagarce F, Benoit JP (2011).** Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79:181-188.

**Rowe R, Sheskey P, Quinn M (eds.) (2009).** Handbook of Pharmaceuticals Excipients. 6th ed. Editorial Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. Chicago.

**Rupley JA, Careri G (1991).** Protein hydration and function, *Adv. Protein Chem.* 41:37-172.

## S

---

**Sahooand SK, Labhasetwar V (2003).** Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discov Today.* 8:1112-1120.

**Saino V, Chetoni P, Palma SD, Allemandi DA (2009).** Effect of different coagels of 6-O-Ascorbic Acid alkanoates on permeation of Ibuprofen through hairless mouse skin, *Lat. Am. J. Pharm.* 28(3):438-442.

**Salem AK, Weiner GJ (2009).** CpG oligonucleotides as immunotherapeutic adjuvants, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 61:193-284.

**Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R (2010).** From vaccines to memory and back, *Immunity.* 33(4):451-463.

**Salvitti J, Mercapide C, Sustersic J, Del Carpio M, Odriozola M, Pereyra R, Pérez A (2002).** Tratamiento de la hidatidosis humana. En: Denegri G, Elissondo MC, Dopchiz MC (Eds.) (2002). Situación de la hidatidosis-echinococcosis en la República Argentina. Editorial San Martín. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.205-214.

**Sanchez Bruni S, Sallovitz J, Alvarez L, Lanusse C (2002).** Antiparasitarios internos fármacos antihelmínticos: benzimidazoles y otros nematocidas. En: Botana, Landoni, Martin-Jimenez (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 40: 517-544.

**Sánchez Vallecillo MF, Ullio Gamboa G, Harman MF, Chiodetti AL, Palma SD, Morón GV, Pistorresi-Palencia MC, Allemandi DA, Maletto BA (2014).** Improved adjuvant activity of CpG-ODN formulated in a novel liquid crystal formulation, *Biomaterials.* 35(8):2529-2542.

**Sawant RR, Vaze OS, Wang T, D'Souza GG, Rockwell K, Gada K, Khaw BA, Torchilin V (2012).** Palmitoyl ascorbate liposomes and free ascorbic acid: comparison of anticancer therapeutic effects upon parenteral administration, *Pharm. Res.*29:375-383.

**Schulz PC, Puig JE, Barreiro G, Torres LA (1994).** Thermal transitions in surfactant-based lyotropic liquid crystals, *Thermochim. Acta.* 231:239-256.

**Schulz PC (2006).** Water structure at surfactant microstructures and biological interfaces. En: Somasundaran P, Hubbard A (Eds.)(2006). Encyclopedia of Surface and Colloid Science. 2ªEd. Editorial Taylor & Frances. New York. 6562-6577.

**Semete B, Kalombo L, Katata L, Swa H (2010).** Nano-drug delivery systems: Advances in TB, HIV and Malaria treatment. En: Mishra AK, Tiwari A, Mishra SB (Eds.)(2010). Smart Biomol. Medicine. Editorial VBRI Press. Sud Africa. 15-52.

**Shah VP, Elkins JS, Williams RL (1999).** Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products, Pharm. Dev. Technol. 4(3):377-385.

**Shi R, Hong L, Wu D, Ning X, Chen Y, Lin T, Fan D, Wu K (2005).** Enhanced immune response to gastric cancer specific antigen Peptide by coencapsulation with CpG oligodeoxynucleotides in nanoemulsion, Cancer Biol. Ther. 4(2):218-224.

**Shimelis O, Giese RW (2007).** Nuclease P1 digestion/high-performance liquid chromatography, a practical method for DNA quantitation, J. Pharm. Biomed. Anal. 45:526-530.

**Shuhua X, Jiqing Y, Mingjie W, Pieying J, Fanghua G, Junjie C, Wei J, Hotez P (2002).** Augmented bioavailability and cysticidal activity of albendazole reformulated in soybean emulsion in mice infected with *Echinococcus granulosus* or *Echinococcus multilocularis*, Acta Trop. 82:77-84.

**Sjoholm I, Ljungstedt I (1973).** Studies on the tryptophan and drug-binding properties of human serum albumin fragments by affinity chromatography and circular dichroism measurements, J. Biol. Chem. 248:8434-8441.

**Steenpaß T, Lung A, Schubert R (2006).** Tressylated PEG-sterols for coupling of proteins to preformed plain or PEGylated liposomes, Biochim. Biophys. Acta. 1758(1):20-28.

**Stephens RH, O'Neill CA, Warhurst A, Carlson G L, Rowland M, Warhurst G (2001).** Kinetic profiling of Pglycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296:584-591.

**Stojkovic M, Zwahlen M, Teggi A, Vutova K, Cretu CM, Virdone R, Nicolaidou P, Cobanoglu N, Junghanss T (2009).** Treatment Response of Cystic Echinococcosis to Benzimidazoles: A Systematic Review, *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3:1-10.

**Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E (2000).** Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles, *Bioconjugate Chem.* 11:372-379.

**Spitzer S, Eckstein F (1988).** Inhibition of deoxyribonucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides, *Nucl. Acids Res.* 16:11691-11704.

## T

---

**Tártara I, Quinteros D, Saino V, Allemandi D, Palma SD (2012).** Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system, *J. Ocul. Pharmacol Ther.* 28:102-109.

**Temsamani J, Tang JY, Padmapriya A, Kubert M, Agrawal S (1993).** Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of capped oligodeoxynucleotidephosphorothioates in mice, *Antisense Res. Dev.* 3:277-284.

**Temsamani J, Roskey A, Chaix C, Agrawal S (1997).** In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide, *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 7:159-165.

**Torchilin VP (2007).** Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging, *AAPS.* 9:128-147.

**Toutain PL, Bousquet-Mélou A (2004).** Bioavailability and its assessment, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27:455-466.

**Torrado S, Torrado S, Cadorniga R, Torrado JJ (1996).** Formulation parameters of ABZ solution, *Int. J. Pharm.* 140:45-50.

**Truong-Conga T, Faivre V, Thanh-Nguyena T, Heras H, Piro F, Walchshofer N, Sarciron ME, Falson F (2008).** Study on the hydatid cyst membrane: Permeation of model molecules and interactions with drug-loaded nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 353:223-232.

**Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K (1982).** Induction of maturation in cultured human monocyticleukemia cells by a phorbol diester, *Cancer Res.* 42:1530-1536.

**Tung MA (1978).** Rheology of protein dispersions, *J. Texture Stud.* 9:3-31.

## U

---

**Underwood C, van Eps AW (2012).** Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality, *Vet. J.* 193: 12-23.

**USP 31-NF 26 (2008).** The United Pharmacopeial Convention United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, Maryland: The United Pharmacopeial Convention.

**Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ (1996).** Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time, *FEBS Lett.* 386:243-246.

**V**

---

**Venkateswarlu V, Manjunath K (2004).** Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles, *J. Control Release.* 64(3):627-638.

**Virkel G, Ballent M, Sallovitz JM, Pis A, Lanusse C (2005).** Moxidectin and ivermectin metabolic stability in sheep ruminal and abomasal contents, *J. Vet. Pharmacol Ther.* 28: 411-418.

**Vonarbourg A, Saulnier P, Passirani C, Benoit JP (2005).** Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface, *Electrophoresis.* 26:2066-2075.

**Vonarbourg C, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP (2006).** Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake, *J. Biomed. Mater Res. A.* 3:620-628.

**Vuitton D (2009).** Benzimidazoles for the treatment of cystic and alveolar echinococcosis: what is the consensus?, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 7(2):145-149.

**W**

---

**Wade A, Weller PJ (1994).** Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>th</sup> ed. Editorial American Pharmaceutical Association. Washington, USA.

**Washington C (1996).** Drug release from microparticulate systems. En: M. Dekker (Ed.) (1996). *Drugs and the pharmaceutical sciences.* Editorial Marcel Dekker. New York. 155-181.

**Wen H, New RRC, Craig PS (1993).**Diagnosis and treatment of human hydatidosis, Br. J. Clin Pharm. 35:565-574.

**Wetzel R, Becker M, Behlke J, Billwitz H, Bohm S, Ebert B, Hamann H, Krumbiegel J, Lasmann G (1980).** Temperature Behaviour of Human Serum Albumin, Eur. J. Biochem. 104:469-478.

**Weyland M, Manero F, Paillard A, Grée D, Viault G, Jarnet D, Menei P, Juin P, Chourpa I, Benoit JP, Grée R, Garcion E (2011).** Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1, J. Control Release. 151:74-82.

**Wilson JT, Keller S, Manganiello MJ, Cheng C, Lee CC, Opara C, Convertine, Stayton PS (2013).** pH-Responsive nanoparticle vaccines for dual-Delivery of antigens and immunostimulatory oligonucleotides, ACS Nano. 7:3912-3925.

**Wissing SA, Kayserb O, Müller RH (2004).** Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 56:1257-1272.

**Weeratna RD, McCluskie MJ, Xu Y, Davis HL (2000).** CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants, Vaccine. 18:1755-1762.

**X**

---

**Xie H, Gursel I, Ivins BE, Singh M, O'Hagan DT, Ulmer JB, Klinman DM (2005).** CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polylactide-co-glycolidemicroparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed anthrax vaccine, Infect Immun. 73:828-833.

**Z**

---

**Zhao G, Vasilakos JP, Tross D, Smirnov D, Klinman DM (2014).** Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors, *J. Immunother. Cancer.* 2-12.

**Zhao XB, Muthusamy N, Byrd JC, Lee RJ (2007).** Cholesterol as a bilayer anchor for PEGylation and targeting ligand in folate-receptor-targeted liposomes, *J. Pharm. Sci.* 96: 2424-2435.

**Zhou GW, Li GZ, Chen WJ (2002)** Fourier Transform Infrared Investigation on Water States and the Conformations of Aerosol-OT in Reverse Microemulsions, *Langmuir.* 18:4566-4571.

**Zou J, Saulnier P, Perrier T, Zhang Y, Manninen T, Toppila E, Pyykkö I (2008).** Distribution of lipid nanocapsules in different cochlear cell populations after round window membrane permeation, *J. Biomed. Mater. Res B Appl Biomater.* 87(1):10-8.





