



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
CIBICI-CONICET

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas

VACUNAS: Nanoestructura de tipo cristal líquido como sistema portador del adyuvante CpG-ODN para la inducción de una respuesta inmune

Bioq. María Fernanda Sánchez Vallecillo

Directora: Dra. Belkys A. Maletto

Córdoba-Argentina

-2014-

Directora de tesis:

Dra. Belkys. A. Maletto

Comisión de tesis:

Dra. Eva Acosta Rodríguez

Dr. Gabriel Cuadra

Dr. José Luis Daniotti

Evaluador Externo:

Dra. Juliana Cassataro

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (Foncyt), Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba y por el financiamiento a través de las becas de doctorado tipo I y II otorgadas por CONICET.

Córdoba, 23 de octubre de 2014

A Juan

A mi mamá y mi papá

A mis hermanos

Agradecimientos

Al terminar de escribir este trabajo de tesis, mi gratitud es tanto más profunda cuanto que yo mido hasta qué punto esa recompensa excede cualquier mérito personal. Carente de la habilidad para poder expresar mi verdadero sentimiento y sin ningún dominio de la retórica, desde la humildad más grande, tengo la gran necesidad de decir: **¡GRACIAS!**

En primer lugar agradezco a mi directora, Belkys. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender al lado tuyo brindándome todo tu apoyo, confianza y aliento necesario desde el primer día. Gracias por haberte puesto el guardapolvo y haber trabajado junto a mí, siguiéndome en cada paso para darme la seguridad necesaria y quitarme el miedo a equivocarme. Sos un ejemplo de tenacidad, esfuerzo, pasión y humildad. Lograste contagiarme y transmitirme todos estos valores que no sólo me formaron como científica sino también me enriquecieron como persona.

Gracias Cristina, por haberme adoptado desinteresadamente desde el primer día, brindándome todo tu apoyo y tu experiencia científica. Gracias por todas las veces que me escuchaste y te preocupaste porque este bien. Siempre me brindaste parte de tu tiempo para poder expresarte mis inquietudes y problemas.

Gracias Gabriel por tu gran apoyo científico, brindándome generosamente tu extenso conocimiento y tu tiempo para poder discutir mis resultados. Gracias por saber llevar con paciencia y caballerosidad las obsesiones de tantas mujeres y por transmitirnos tu practicidad.

Flor, querida amiga, son tantos años los que compartimos juntas y en los que mezclamos alegrías, tristezas, nervios, estrés, casamiento, todo junto.... Sos un pilar increíble para mí y te aseguro que una gran parte de esto. Gracias por festejar cada uno de mis logros como si fueran tuyos y por consolar y aliviar cada una de mis angustias; por protegerme como una hermana; por mirarme y saber cómo estaba ese día, sin la necesidad de decirte una palabra, gracias por ESTAR siempre.

Ine, primero que nada gracias por todo tu conocimiento, por ser tan paciente y generosa desde el primer día, por tener siempre una respuesta y por ser nuestro salvavidas!!! Gracias por permitirme conocer una amiga, que me

acompañó en toda mi carrera y no mendigó consejos ni cariño. Me enseñaste tanto querida amiga, desde lo profesional hasta lo personal, no sabes cuanto me llevo de vos!!!

Tefi, el destino nos hizo emprender este camino casi juntitas y agradezco eternamente todo tu apoyo y contención. Gracias por todo el tiempo que me brindaste para escucharme y para brindarme tu ayuda tan desinteresadamente. Tu sinceridad, tu oído incondicional y tu sexto sentido me aliviaron todo este camino. Gracias por ser una gran amiga que me deja esta tesis.

Sofi, sos una personita tan transparente que desde el primer día nos miramos y nos entendimos. Gracias por acompañarme en esta última parte de mi camino (la más difícil), por escucharme y aconsejarme, por contenerme, por permitirme ser tu amiga. Gracias por tu curiosidad que me llevaron a buscar respuestas que no tenía.

Ana y reich, el dúo dinámico. Gracias Ana, por ser una gran compañera, por tu sinceridad y transparencia, por tu compromiso desmedido. Con toda tu ayuda me aliviaste muchísimo esta cuesta y no sabes cuanto lo valoro!. Gracias reich, por la alegría que nos brindabas todos los días, por tu buen trato, por tu buena predisposición, por hacernos la rutina divertida y liviana. Gracias por tu cariño!.

Gracias Vir, porque a pesar de que nos encontramos hace muy poquito, no dudaste en abrirme tu corazón. Gracias por tu bondad, por tu dulzura y por ser incondicional en lo que necesitaba.

Gracias Caro y Romi, por su guía en mis primeros años, por brindarme generosamente todo su conocimiento. Gracias por enseñarme su tenacidad, esfuerzo y prolijidad.

Gracias a los Drs. Santiago Palma y Daniel Allemandi por permitirme realizar este trabajo de tesis. Gracias Dr. Palma, por explicarme con paciencia y excelente predisposición mis dudas, así como dedicar su tiempo para discutir mis resultados.

Detrás de la puerta de mi laboratorio hay tanta gente que me gustaría agradecerle y estoy segura que no voy a olvidar a nadie porque los llevo en mi recuerdo y en mi corazón. Gracias a todos mis compañeros del CIBICI. En especial a Ceci. R, Nico. P, Vani. A; por ayudarme a transitar este camino, por su aliento, por sus charlas y consejos sinceros, por permitirme su amistad desde el primer día, por

ser excelentes personas. Gracias Meli.G, Ceci. V, Agu. P, Jime. L, Silvi. A, por su dulzura y cariño sin importar el tiempo que compartían conmigo. Gracias a Adri, Laura, Martín, Pauli, Pili, Ale, Diego, Fabri y Luis Navarro por su trabajo y dedicación que me permitió llevar a cabo esta tesis.

No puedo dejar de agradecer a los investigadores que fueron generosos conmigo en su conocimiento y me ayudaron a crecer y formarme en la ciencia. En especial a la Dras. Acosta y Stempin y a los Drs. Cuadra y Daniotti.

Gracias Andre, Silvia y Mabel por ser mi ejemplo como docentes y ayudarme con paciencia a crecer y saber dar en esta otra parte de mi profesión.

Gracias a mis amigas Pau, Agu, Noe, Cami, Tefi, Xime y Euge por apoyarme, acompañarme y por sobretodo, confiar incondicionalmente en mí.

Gracias a toda mi familia (política y no) por alentarme, apoyarme y comprender mis ausencias. Gracias por su cariño incondicional. Gracias mamá, por entregarme tu vida, porque tu presencia incondicional me dio la seguridad para enfrentarme a lo que sea y porque tu generosidad y tu amor me permitieron volar y realizarme. Gracias papá por ser un ejemplo de tenacidad, honestidad, esfuerzo y pasión, por enseñarme que estos tres valores son un ingrediente fundamental de mi profesión. Gracias por contagiarme tu positividad y tus ganas. A los dos, gracias por ser mi fan número uno y por su amor incondicional. No pudo dejar de nombrar a mis hermanos, mis compañeros de vida y mis mejores amigos. Gracias chicos porque sin su apoyo, amor y comprensión no podría haber logrado nada. Gracias por ser mi mejor respaldo, por cuidarme y por alentarme. Mi mayor premio es tenerlos!

Finalmente y como no agradecerte!!! Gracias Juan, por ser mi compañero tantos años y por darme tu amor y apoyo incondicional. Tu sabiduría, pasión y calma me hacen crecer como persona. Gracias por escucharme y alivianarme mis preocupaciones diarias, por sacarme de mis estructuras. Tenerte al lado es el mayor estímulo porque estamos creciendo juntos. Por supuesto, no puedo olvidarme de esta pancita que se está asomando día a día, gracias a vos chiquitita, por permitirme culminar todo este gran camino (a pesar de los nervios y el estrés) y acompañarme de ahora en más por siempre. Gracias Juan por hacerme la mujer más feliz del mundo!!!

Tabla de contenidos

	PÁGINA
Resumen.	xii
Summary.	xiii
Abreviaturas y Acrónimos.	xv
Introducción General.	
Vacunas. Generalidades.	2
1. Liberación sostenida en el tiempo del antígeno desde el sitio de inyección (efecto “depot”)	7
2. Inducción de citoquinas y quimioquinas. Reclutamiento de células a nivel del sitio de inyección	7
3. Presentación antigénica	8
4. Activación y maduración de células presentadoras de antígeno	8
5. Activación del inflamasoma	9
Características de un adyuvante ideal	11
1. Actividad Biológica	12
2. Aspectos físico-químicos	13
CpG-ODN	14
1. Clases de CpG-ODN	15
2. Mecanismo de acción de CpG-ODN	16
3. El rol de CpG-ODN en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa	18
4. Aplicaciones terapéuticas de CpG-ODN	19
5. Seguridad frente a la activación de TLR9 en ratón y humanos	22
6. Limitaciones que presenta CpG-ODN como adyuvante	23
Nanoestructura de tipo cristal líquido derivada de palmitato de ascorbilo: Coagel o Coa-ASC16	25
Hipótesis de trabajo	31
Objetivos	
Objetivo General	33
Objetivos Específicos	33
Capítulo I: “Potenciación de la actividad adyuvante de CpG-ODN mediante su formulación en un sistema nanoestructurado”	
Estrategias previas de formulación de CpG-ODN	35
Resultados I	39
1. Estudio de la actividad adyuvante de CpG-ODN formulado en Coa-ASC16	39

2. Estudio de la cinética de liberación de OVA y CpG-ODN formulados con Coa-ASC16	44
3. Evaluación de la protección ejercida por Coa-ASC16 sobre CpG-ODN frente a la degradación por nucleasas.	45
4. La formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 como adyuvante ideal	47
4.1. Evaluación de la respuesta inmune de memoria	47
4.2. Comparación entre la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 con la previamente conocida CpG-ODN/Al(OH) ₃	49
4.3. Evaluación de la eficacia adyuvante de la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 utilizando diferentes esquemas de inmunización	51
4.4. Estudios de toxicidad	54
5. Estudios del sitio de la inyección	56
6. Comparación entre dos regimenes de inmunización: Co-inyección vs. Co-formulación.	57
7. Conclusión capítulo I	59

Capítulo II: “Coa-ASC16: un nuevo adyuvante que requiere la proteína adaptadora MyD88”

Respuesta inmune innata	62
Receptores que reconocen patrones (PRRs)	63
Mecanismo de señalización de TLRs	65
La inflamación como mecanismo adyuvante	67
DAMPs: adyuvantes endógenos	68
¿Cómo señalizan los DAMPs?	69
IL-1	70
El inflamasoma	71
El inflamasoma NLRP3: mecanismo de activación	73
Resultados II	75
1. Estudio de la actividad inflamatoria de Coa-ASC16	75
1.1. Caracterización de la respuesta inflamatoria	75
1.2. Evaluación de la fuente de IL-6	77
1.3. Evaluación de la implicancia de IL-6 en la respuesta inflamatoria de Coa-ASC16	79
2. Evaluación de los posibles mecanismos de acción de Coa-ASC16	80
2.1. Estudio de la actividad inflamatoria del ácido ascórbico o vitamina C	80
2.2. Estudio de la actividad inflamatoria de ASC16 en fase gel	83
2.3. Relación entre la concentración del éster y la respuesta inflamatoria	84
2.4. Estudio de la actividad inflamatoria modificando la longitud de la cadena alifática del ácido graso que compone al éster	86
2.5. Estudio del mecanismo molecular de señalización	87
2.5.i. Evaluación de la implicancia de la molécula adaptadora MyD88 en la respuesta inflamatoria de Coa-ASC16	87

2.5.ii. Evaluación de la posible señalización a través de TLRs	88
2.5.iii. Evaluación de la muerte o daño celular a nivel local	94
2.5.iv. Evaluación de la implicancia de NLRP3 en la actividad inflamatoria de Coa-ASC16	97
3. Estudio de la capacidad adyuvante del Coa-ASC16	98
4. Conclusión capítulo II	101
Discusión	102
Conclusión General	115
Materiales y métodos	
Ratones	117
Reactivos	117
Oligodeoxinucleótidos sintéticos	118
Medios de cultivo	118
Preparación del Coa-ASC16	118
Estudios de cinética de liberación	119
Ensayo de digestión por nucleasa	119
Inmunizaciones	120
Inyección intraperitoneal y obtención de lavado peritoneal	120
Cultivos celulares	121
ELISA para determinar el título de anticuerpos anti-OVA en suero	121
Determinación de citoquinas mediante ELISA sandwich	122
Ensayo de proliferación <i>in vivo</i>	123
Citometría de flujo	124
Determinación enzimática	126
Análisis Histológico	126
Tratamiento <i>in Vitro</i> con DNasa y cuantificación de ADN	126
Análisis Estadístico	126
Soluciones	
1. Soluciones buffer	127
1.a. Solución buffer salino de fosfatos (PBS)	127
1.b. Solución salina balanceada de Hank's (HBSS)	127
2. Solución utilizada para contar células	127
3. Solución utilizada para citometría de flujo	127
3.a. EDTA	127
3.b. Azida sódica	128
4. Soluciones utilizadas para medición de anticuerpos por ELISA	128
4.a. Buffer Carbonato	128
4.b. Solución de lavado	128
4.c. Solución de bloqueo	128
4.d. Solución para diluir muestras	128
4.e. Buffer fosfato-citrato	128
5. Soluciones utilizadas para medición de citoquinas por ELISA	129
5.a. Buffer fosfato	129

5.b. Solución de bloqueo	129
5.c. Solución de lavado	129
5.d. Solución para dilucir las muestras	129
Referencias Bibliográficas	130
Publicaciones Científicas	144

RESUMEN

Los adyuvantes aprobados para uso humano, cuando se administran con antígenos recombinantes o purificados (vacunas de la nueva generación), inducen una débil respuesta inmune celular. Por lo tanto, existe un gran interés en desarrollar nuevas estrategias adyuvantes. Oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG no metilados en un contexto particular de bases (CpG-ODN) están siendo utilizados con éxito como adyuvante en ensayos clínicos de fase I y III, pero los mismos poseen una biodisponibilidad reducida. Nosotros evaluamos la actividad adyuvante de CpG-ODN formulado en un sistema nanoestructurado derivado de 6-*o*-palmitato de ascorbilo (Coa-ASC16). Los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (régimen de co-formulación) desarrollaron una potente respuesta inmune humoral (IgG1 e IgG2a) y celular (Th1 y Th17) específica sin generar efectos adversos. Esta respuesta fue superior a la inducida por animales inmunizados con OVA/CpG-ODN o con la formulación OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃. Además, la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 facilitó la generación de una respuesta inmune específica de memoria (principalmente de tipo celular) durante al menos 6,5 meses. La administración de OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (régimen de co-inyección) indujo una respuesta inmune específica similar a la inducida con la administración de OVA/CpG-ODN, lo cual indica que se necesita de la formulación completa para potenciar la actividad inmunoadyuvante del oligodeoxinucleótido. Por otro lado, Coa-ASC16 por sí mismo, genera una liberación controlada de CpG-ODN y OVA *in vitro* e induce una respuesta inflamatoria local. Esto último, coincide con estudios recientes que demuestran que determinados biomateriales no son inmunológicamente inertes, aunque el mecanismo por el cual muchos de ellos son reconocidos por el sistema inmune innato aún no se describe por completo. El efecto inflamatorio inducido por Coa-ASC16 se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high}, así como por la inducción de IL-1 β , IL-6 e IL-12 a nivel del sitio de la inyección. Este efecto resultó dependiente de la señalización mediada por la proteína adaptadora MyD88. Además, TLR4, TLR2, TLR7 y NLRP3 no están implicados en el reclutamiento celular ni en la producción de IL-6 e IL12. La

administración de Coa-ASC16 se asocia con un aumento de la concentración de ADN de doble hebra (dhADN) en el sitio de la inyección. Frente al tratamiento previo con DNasa o en ratones Tlr9^{-/-} no hubo modificación en el reclutamiento celular pero la producción de IL-6 se vio afectada. Por otro lado, Coa-ASC16 posee actividad adyuvante “per se”, la cual depende de MyD88 e IL-6. Nuestros resultados muestran una conexión mediada por IL-6, entre la respuesta inmune innata y adaptativa inducida por Coa-ASC16. De esta manera, Coa-ASC16 no sólo constituye una plataforma para la administración de CpG-ODN, sino también posee propiedades adyuvantes intrínsecas. Estos resultados demuestran el potencial de esta nueva formulación para el desarrollo de vacunas más eficaces. Además, la comprensión del mecanismo de acción de Coa-ASC16 es muy importante para su uso de manera más racional en el futuro.

Palabras claves.

CpG-ODN

Adyuvante

Palmitato de ascorbilo

Nanoestructura

Patrones moleculares asociados al daño (DAMPs)

SUMMARY

The adjuvants approved in human vaccine with recombinant/purified antigens induce a weak cellular immune response, thus the development of new adjuvant strategies is necessary. Synthetic oligodeoxynucleotides containing unmethylated CpG motifs (CpG-ODN) has successfully been used as adjuvants (phase I-III clinical trials) but its bioavailability needs to be improved. We investigated the adjuvant ability of CpG-ODN formulated with a liquid crystal nanostructure of 6-*o*-ascorbyl palmitate (Coa-ASC16). Mice immunized with OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (co-formulation regimen) elicited potent antigen-specific antibodies (IgG1, IgG2a) and also Th1/Th17 cellular responses without systemic adverse effects. These responses were superior to those induced by OVA/CpG-ODN (solution of OVA with CpG-ODN) or by the formulation OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃. In addition, the immunization with OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 resulted in a long-lasting cell-mediated immune response (at least 6.5 months). Remarkably, the adjuvant capacity of CpG-ODN co-injected with Coa-ASC16 (OVA/CpG-ODN plus Coa-ASC16) was similar to the adjuvant activity of OVA/CpG-ODN, supporting the requirement for whole formulation to help CpG-ODN adjuvanticity. Furthermore, Coa-ASC16 allows a controlled release of CpG-ODN and OVA *in vitro* and induces a local inflammatory response. The latter agrees with current evidences that certain biomaterials are not immunologically inert, but how these are sensed is little understood. We found that the inflammatory response elicited by Coa-ASC16 alone (neutrophil and monocyte recruitment and IL-1 β , IL-6, IL-12 production) was dependent on MyD88 adaptor protein. TLR2, TLR4, TLR7 and NLRP3 inflammasome were not required for induction of cell recruitment and IL-6, IL-12 production. The administration of Coa-ASC16 was associated with the local release of double-stranded DNA (dsDNA). In mice pretreated with DNase or in *Tlr9*^{-/-} mice although the cell recruitment was not modified, the IL-6 production was absent. In addition, Coa-ASC16 revealed adjuvant activity when administered with an antigen, and this property was affected by the absence of MyD88 and IL-6 cytokine. Our results show a connection involving IL-6 cytokine, between the innate and the adaptive responses. Thus, Coa-ASC16 has not only a platform

capacity but it also exhibits an intrinsic adjuvant property. All these results show the potential of this formulation, opening a new avenue for the development of better vaccines. Understanding the mechanisms of action of this biomaterial is important for its use in a more rational way in future.

Key words.

CpG-ODN

Adjuvant

Ascorbyl palmitate

Nanostructure

Danger-associated molecular patterns (DAMPs)

Abreviaturas y Acrónimos

ADN: ácido desoxirribonucleico

dhADN: ácido desoxirribonucleico de doble hebra

AEP: asparagina endopeptidasa

ALT: alanina aminotransferasa

AP-1: del inglés *adaptor protein-1*

AP-3: del inglés *adaptor protein-3*

ARN: ácido ribonucleico

dhARN: ácido ribonucleico de doble hebra

shARN: ácido ribonucleico de simple hebra

ASC: del inglés *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ASC16: 6-*o*-hexanodecanoato palmitato de ascorbilo 16

ASO4: 3-*o*-desacil-4'-monofosforil lípido A formulado con sales de aluminio

AST: aspartato aminotransferasa

CD: célula dendrítica

CDp: célula dendrítica plasmacitoidea

CFA: adyuvante completo de Freund (del inglés *complete Freund's adjuvant*)

CFSE: carboxifluoresceína succinimidil éster

CLR: receptor de lectinas de tipo C (del inglés *C-type lectin receptor*)

CMC: concentración micelar crítica

Coa-ASC16: Nanoestructura de tipo cristal líquido derivada de palmitato de ascorbilo 16

CPA: célula presentadora de antígeno

CpG-ODN: oligodeoxinucleótido sintético que contiene motivos CpG no metilados

CREB: del inglés *cyclic AMP-responsive element-binding protein*

CSF₃: factor estimulante de colonia 3 (del inglés *colony stimulating factor 3*)

CTL: linfocito T citotóxico (del inglés *cytotoxic T lymphocyte*)

DAMP: patrón molecular asociado a daño (del inglés *damage-associated molecular pattern*)

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA: ensayo inmunoenzimático en fase sólida (del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*)

ERK: del inglés *extracellular signal regulated kinase*

e.v.: endovenosa

FDA: del inglés *Food and Drug Administration*

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GRAS: del inglés *generally referred as safe*

GRP94: del inglés *glucose-regulated protein of 94 kDa*

HBSS: solución *buffer* de Hanks (del inglés *Hank's balanced salt solution*)

HMGB1: del inglés *High-mobility group box 1 protein*

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés *High-performance liquid chromatography*)

HSP: proteína de choque térmico (del inglés *heat shock proteins*)

i.d.: intradérmica

IFA: adyuvante incompleto de Freund (del inglés *Incomplete Freund's adjuvant*)

IFN: interferón

IL: interleuquina

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

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

IRF: factor regulador de interferón (del inglés *interferon regulatory factor*)

JNK: del inglés *jun N-terminal kinase*

LDH: lactato deshidrogenasa

LDLox: lipoproteína de baja densidad oxidada (del inglés *oxidized low-density lipoprotein*)

LPS: lipopolisacárido

LRO: organelas relacionadas con lisosomas (del inglés *lysosome-related organelles*)

LRR: múltiples repeticiones ricas en leucina (del inglés *leucine-rich repeats*)

MACS: separación de células utilizando perlas magnéticas (del inglés, *Magnetic-activated cell sorting*)

MAL: del inglés *MyD88-adaptor-like protein*

MAPK: quinasa activadas por mitógenos (del inglés *mitogen-activated protein kinase*)

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*)

MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (del inglés *myeloid differentiation primary response gene 88*)

NF- κ B: factor nuclear κ B (del inglés *nuclear factor κ B*)

NK: del inglés *natural killer*

NLR: receptor que contiene un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones de leucinas (del inglés *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat-containing receptor*).

OVA: albúmina de huevo de gallina (del inglés *ovalbumin*)

PAMP: patrón molecular asociado a patógeno (del inglés *pathogen-associated molecular pattern*)

PBS: solución *buffer* de fosfatos (del inglés *phosphate balanced solution*)

PI3K: fosfoinositol 3-quinasas (del inglés *phosphatidylinositide 3-kinase*)

PGA: del inglés *poly glycolic acid*

PLA: del inglés *poly lactic acid*

PLGA: del inglés *polylactic-co-glycolic acid*

PO: enlace fosfodiéster

PRAT4A: del inglés *protein associated with TLR4 A*

PRR: receptor de reconocimiento de patrones (del inglés *pattern-recognition receptor*)

PS: enlace fosforotioato

PYD: del inglés *pyrin-domain*

RE: retículo endoplasmático

RLR: receptor tipo RIG-I (del inglés *RIG-I like receptor*)

ROS: especies reactivas del oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

s.c.: subcutáneo

SFB: suero fetal bovino

sIL-6R: receptor de IL-6 soluble

SPF: sistema portador de fármacos

STING: del inglés *stimulator of interferon genes*

TIR: dominio *Toll*/receptor de IL-1

TLR: receptor tipo Toll (del inglés *toll-like receptor*)

TMC: temperatura micelar crítica

TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*)

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral

TRAF6: del inglés *TNF receptor-associated factor 6*

TRAM: del inglés *TRIF-related adaptor molecule*

UNC93B1: del inglés *uncoordinated 93 homolog B1*

wt: salvaje (del inglés *wild type*)

Listado de figuras y tablas

Tablas

Tabla 1. Tipos de vacunas incluidas en el calendario Nacional de vacunación de la República Argentina	3
Tabla 2. Adyuvantes licenciados para uso humano	5
Tabla 2.1. Principales TLRs y sus ligandos	64
Tabla 2.2. Solventes utilizados para solubilizar ASC16 2%	83

Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción propuesto para adyuvantes	6
Figura 2. El inflammasoma NLRP3	11
Figura 3. Principales beneficios de un adyuvante	12
Figura 4. El esqueleto del oligodeoxinucleótido nativo y modificado	16
Figura 5. Esquema de las posibles vías de señalización de CpG-ODN/TLR9	18
Figura 6. Efectos inmunoestimulatorios de CpG-ODN	19
Figura 7. Esquema de la estructura de ASCn	26
Figura 8. Estructura química del 6-o-hexadecanoato de ascorbilo 16 (ASC16)	26
Figura 9. Estructura esquemática de los distintos agregados. Fase coagel, gel y micelar	27
Figura 10. Fotografías obtenidas para describir macroscópicamente la formación de Coa-ASC16	28
Figura 1.1. El Coa-ASC16 mejora la actividad adyuvante de CpG-ODN	40
Figura 1.2. La actividad inmunoestimulante de la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es independiente de la señalización a través de TLR4	41
Figura 1.3. El Coa-ASC16 coopera en la inducción de la respuesta de células T	41
Figura 1.4. El Coa-ASC16 induce una mayor proliferación linfocítica enmarcada exclusivamente en el ganglio drenante	43
Figura 1.5. El Coa-ASC16 modifica el perfil de liberación de OVA y CpG-ODN	45
Figura 1.6. Coa-ASC16 protege a CpG-ODN de la degradación por nucleasas	46
Figura 1.7. La potenciación de la respuesta inmune inducida por Coa-ASC16 se mantiene a lo largo del tiempo	48
Figura 1.8. La formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es más eficaz que la formulación CpG-ODN/Al(OH) ₃	50
Figura 1.9. El Coa-ASC16 permite una rápida seroconversión	52
Figura 1.10. El Coa-ASC16 permite reducir la dosis de CpG-ODN	53
Figura 1.11. El Coa-ASC16 no induce efectos tóxicos	55
Figura 1.12. El Coa-ASC16 induce una respuesta inflamatoria a nivel del sitio de inyección	57

Figura 1.13. Se necesita de la formulación para potenciar el efecto adyuvante de CpG-ODN	58
Figura 2.1. Desarrollo de vacunas y las implicancias de los TLRs	62
Figura 2.2. Estructura representativa de los NLRs	65
Figura 2.3. Mecanismo de señalización de los TLRs	66
Figura 2.4. Composición de inflamasomas “canónicos” y “no-canónicos”	72
Figura 2.5. Mecanismos propuesto para la activación de NLRP3	74
Figura 2.6. El Coa-ASC16 genera el reclutamiento de neutrófilos y monocitos Ly6C ^{high} con producción de IL-1 β , IL-6 e IL-12	76
Figura 2.7. Los neutrófilos y monocitos Ly6C ^{high} son una fuente importante de IL-6	77
Figura 2.8. Ratones <i>Ccr2</i> ^{-/-} luego del tratamiento con Coa-ASC16 inducen menores niveles de IL-6 e IL-12	78
Figura 2.9. La deficiencia de IL-6 no afecta el reclutamiento celular ni la producción de IL-12 en el sitio de inyección	80
Figura 2.10. El ácido ascórbico no induce una respuesta inflamatoria similar a la de su derivado Coa-ASC16	81
Figura 2.11. La respuesta inflamatoria inducida por ASC16 en fase gel difiere de la generada por Coa-ASC16	84
Figura 2.12. La respuesta inflamatoria depende de la concentración del éster utilizada	85
Figura 2.13. Coa-ASC8 y Coa-ASC18 son también capaces de inducir una respuesta inflamatoria	87
Figura 2.14. La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 depende de la proteína adaptadora MyD88	88
Figura 2.15. La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de TLR2 y TLR4	89
Figura 2.16. LPS y Coa-ASC16 inducen diferente actividad inflamatoria	90
Figura 2.17. La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de TLR7 a excepción de la producción de IL-12	91
Figura 2.18. La producción de IL-6 e IL-12 inducida por Coa-ASC16 depende de TLR9	92
Figura 2.19. Ratones <i>Tlr9</i> ^{-/-} fallaron en la inducción de IL-6 e IL-12 luego del tratamiento con Coa-ASC16	93
Figura 2.20. Coa-ASC16 induce daño celular transitorio a nivel del sitio de inyección	94
Figura 2.21. Coa-ASC16 induce la liberación de enzimas intracelulares a nivel del sitio de inyección	95
Figura 2.22. El Coa-ASC16 genera un aumento transitorio de dhADN en el sitio de inyección	96
Figura 2.23. La señalización a través de dhADN inducida por Coa-ASC16 es responsable de la producción de IL-6 e IL-12	97
Figura 2.24. La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de NLRP3	98

Figura 2.25. El Coa-ASC16 posee actividad adyuvante independiente de TLR4 pero dependiente de MyD88	99
Figura 2.26. La actividad adyuvante de Coa-ASC16 depende de IL-6	100

Introducción

VACUNAS. Generalidades

Las vacunas tienen como objetivo desarrollar en el huésped una respuesta inmune adaptativa con capacidad de mantenerse en el tiempo (memoria) y sin producir daño en el huésped (efectividad y seguridad). Las vacunas tradicionales están constituidas por microorganismos vivos atenuados (BCG, vacuna para sarampión, rubéola, parotiditis y poliomelitis (Sabin)) o inactivados por calor (vacuna para influenza, poliomielitis, *Bordetella pertussis* formulada con el microorganismo intacto), son muy efectivas, pero en ocasiones pueden producir efectos secundarios no deseados (1-2). Este tipo de vacunas contiene adyuvantes (del vocablo latino “*adjuvare*”, “ayuda”) microbianos intrínsecos naturales, como son los patrones moleculares asociados a patógenos (cuya sigla es: **PAMPs**, en inglés pathogen associated molecular patterns) que son ligandos de los receptores que reconocen patrones (cuya sigla es: **PRRs**, en inglés pattern recognition receptors). Los PRRs incluyen: los receptores tipo Toll (cuya sigla es **TLRs**, en inglés Toll-like receptors), los receptores tipo lectinas tipo C (cuya sigla es: **CLRs**, en inglés C-type lectin like receptors), los receptores tipo RIG-1 (cuya sigla es: **RLRs**, en inglés RIG-1 like receptors), los receptores tipo NOD (cuya sigla es: **NLRs**, en inglés nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors, como por ejemplo NOD1, NOD2, NLRP3, NLRC4, NLRP1, NLRP6, NAIP, entre otros) y los receptores citosólicos y nucleares que reconocen ADN (DAI y AIM2, entre otros). Desde la sistematización de los principios de vacunación establecidos por Louis Pasteur en 1886 (aislamiento, inactivación e inyección), la mayoría de los inmunólogos han focalizado su investigación en antígenos específicos para ser utilizados como inmunógenos, haciendo especial énfasis en la identificación de epitopes determinados. De esta manera, se han desarrollado vacunas a subunidades proteicas (hepatitis B, virus del papiloma humano, etc.) las cuales son más seguras y menos costosas que las anteriores, pero poseen menor inmunogenicidad. Es por esto que se considera, desde hace ya un tiempo, a los adyuvantes como componentes esenciales de esta nueva generación de vacunas. Actualmente los tres tipos de vacunas (a microorganismos vivos atenuados, inactivados por calor y a subunidades proteicas) son administradas en muchos países del mundo, entre ellos Argentina (Tabla. 1).

Vacunas	BCG	Hepatitis B (HB)	Neumococo Conjugada	Quintuple Pentavalente DTP-HB-Hib	Cuadruple o Quintuple Pentavalente	Sabin (OPV)	Triple Viral (SRP)	Gripe	Hepatitis A (HA)	Triple Bacteriana Celular (DTP)	Triple Bacteriana Acelular (dTpa)	Doble bacteriana (dT)	Virus Papiloma Humano (VPH)	Doble Viral (SR)	Fiebre Amarilla (FA)	Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA)
Edad																
Recién Nacido	Única dosis	Dosis Neonatal														
2 Meses			1ª Dosis	1ª Dosis		1ª Dosis										
4 Meses			2ª Dosis	2ª Dosis		2ª Dosis										
6 Meses				3ª Dosis		3ª Dosis		Dosis Anual								
12 Meses			Refuerzo				1ª Dosis		Única dosis							
15-18 Meses					1ª Refuerzo	4ª Dosis										
18 Meses															1ª Dosis	
24 Meses																
5-6 Años						Refuerzo	2ª Dosis			Refuerzo						
11 Años		Iniciar o completar esquema					Iniciar o completar esquema				Refuerzo		3ª Dosis (mujeres)		Refuerzo	
A partir de los 15 Años																Única Dosis
Adultos		Iniciar o completar esquema									Refuerzo			Iniciar o completar esquema		
Embarazadas								Dosis Anual			Refuerzo					
Puerperio								Dosis Anual						Iniciar o completar esquema		
Personal de salud		Iniciar o completar esquema						Dosis Anual			Única dosis			Iniciar o completar esquema		

Tabla 1. **Tipos de vacunas incluidas en el calendario nacional de vacunación de la República Argentina.** Adaptado del manual de Recomendaciones Nacionales de Vacunación Argentina, 2014. Ministerio de Salud.

Los adyuvantes, fueron descriptos por Ramon en 1924 como “sustancias que utilizadas en combinación con un antígeno específico, producen una respuesta inmune más robusta que el inmunógeno sólo” (3). Actualmente este concepto es más amplio y se considera que los adyuvantes son componentes capaces de mejorar y/o organizar o “dar forma” a la respuesta inmune desencadenada por el antígeno co-administrado (4). De esta manera, con un adyuvante es posible guiar el tipo o calidad de la respuesta inmune adaptativa que se desea obtener, lo cual constituye la base del desarrollo de vacunas personalizadas; por ejemplo, aquellas destinadas a neonatos o personas de edad avanzada quienes no poseen una adecuada inmunocompetencia. Diversas clases de compuestos han sido descriptos como adyuvantes incluyendo sales minerales, productos microbianos, emulsiones, saponinas, polímeros, citoquinas, micro y nanopartículas y liposomas (5). Sin embargo, sólo un número reducido está licenciado para su uso en vacunas humanas tales como: sales de aluminio, emulsiones de aceite en agua (MF59 y ASO₃), virosomas y ASO₄ (3-*o*-desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL) formulado con sales de aluminio) (Tabla 2) (4). Por

otro lado, muchas sustancias están siendo evaluadas como adyuvantes en ensayos clínicos, entre ellos, oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG no metilados en un contexto particular de bases (CpG-ODN) (ligando de TLR9) (6-7). Algunos de estos estudios ya se encuentran en fase clínica III (8).

A pesar del amplio uso de adyuvantes en vacunas destinadas tanto a humanos como animales, no se conoce por completo su mecanismo de acción. Sin embargo, recientes avances en el área han permitido establecer varios mecanismos a través de los cuales operarían, tales como: **1-** liberación sostenida en el tiempo del antígeno desde el sitio de la inyección (efecto “depot”), **2-** inducción de citoquinas y quimioquinas, **3-** reclutamiento celular a nivel del sitio de inyección, **4-** aumento de la captura como de la presentación antigénica por células presentadoras, **5-** activación y maduración de las células presentadoras de antígeno (CPA) con su posterior migración a ganglios linfáticos, **6-** activación del inflammasoma (9) (Fig. 1). Hay evidencia certera de que muchos de los adyuvantes podrían utilizar uno o más de los mecanismos anteriormente descritos (Tabla 2).

En el momento de la selección del adyuvante y formulación de una vacuna deben tenerse en cuenta varios parámetros, tales como, la naturaleza física y química del antígeno, el tipo de respuesta inmune deseada, el promedio de edad de la población a la cual va dirigida y la vía de administración. Las cualidades deseadas para cada vacuna en particular pueden requerir adyuvantes con propiedades específicas, lo que resalta la inminente necesidad de estudiar en profundidad los mecanismos de acción de estos compuestos, lo que a su vez, proporcionará las herramientas necesarias en el diseño de nuevas estrategias inmunoadyuvantes.

Adyuvantes	Mecanismo de acción propuesto	Respuesta inmune	Vacuna licenciada
Sales de Aluminio	Efecto depot? Activación de NLRP3 in vivo? Independiente de la señalización por TLR. ↑Citoquinas y quimioquinas. ↑Reclutamiento celular. ↑Presentación antigénica. Liberación de moléculas endógenas (dhADN, ácido úrico).	↑Anticuerpos ↑Respuesta Th2 Pobre respuesta Th1	Muchas vacunas para humanos (Hepatitis A, Hepatitis B, etc)
MF59	No genera efecto depot. Independiente de NLRP3, dependiente de ASC. Independiente de la señalización por TLR, dependiente de MyD88 para la producción de anticuerpos. ↑Citoquinas y quimioquinas. ↑Reclutamiento celular. ↑Presentación antigénica. Liberación de moléculas endógenas (ATP).	Respuesta Th2/Th1 balanceada ↑Anticuerpos	Vacuna para influenza (Fluad®, Aflunov®, Focetria®, Celtura®)
ASO4	Señalización por TLR4. ↑Citoquinas y quimioquinas. ↑Reclutamiento celular. ↑Presentación antigénica.	↑Anticuerpos Th1?	Vacuna para el papiloma virus HPV (Cervarix™), Hepatitis B (Fendrix®)
ASO3	Colocalización espacio-temporal con el antígeno. ↑Citoquinas. ↑Reclutamiento celular. ↑Presentación antigénica.	↑Anticuerpos ↑Memoria inmunológica	Vacuna para influenza (Pandemrix®)
Virosomas	Vehículo del antígeno. Endocitosis mediada por receptor. Escapan a la degradación endosomal. ↑Presentación antigénica.	↑Anticuerpos ↑CTL	Vacuna para influenza: Inflexal® V y Invivac®. Vacuna para HepA Epaxal®

CTL: Linfocitos T citotóxicos, dhADN: ácido desoxirribonucleico de doble hebra.

Tabla 2. Adyuvantes licenciados para uso humano.

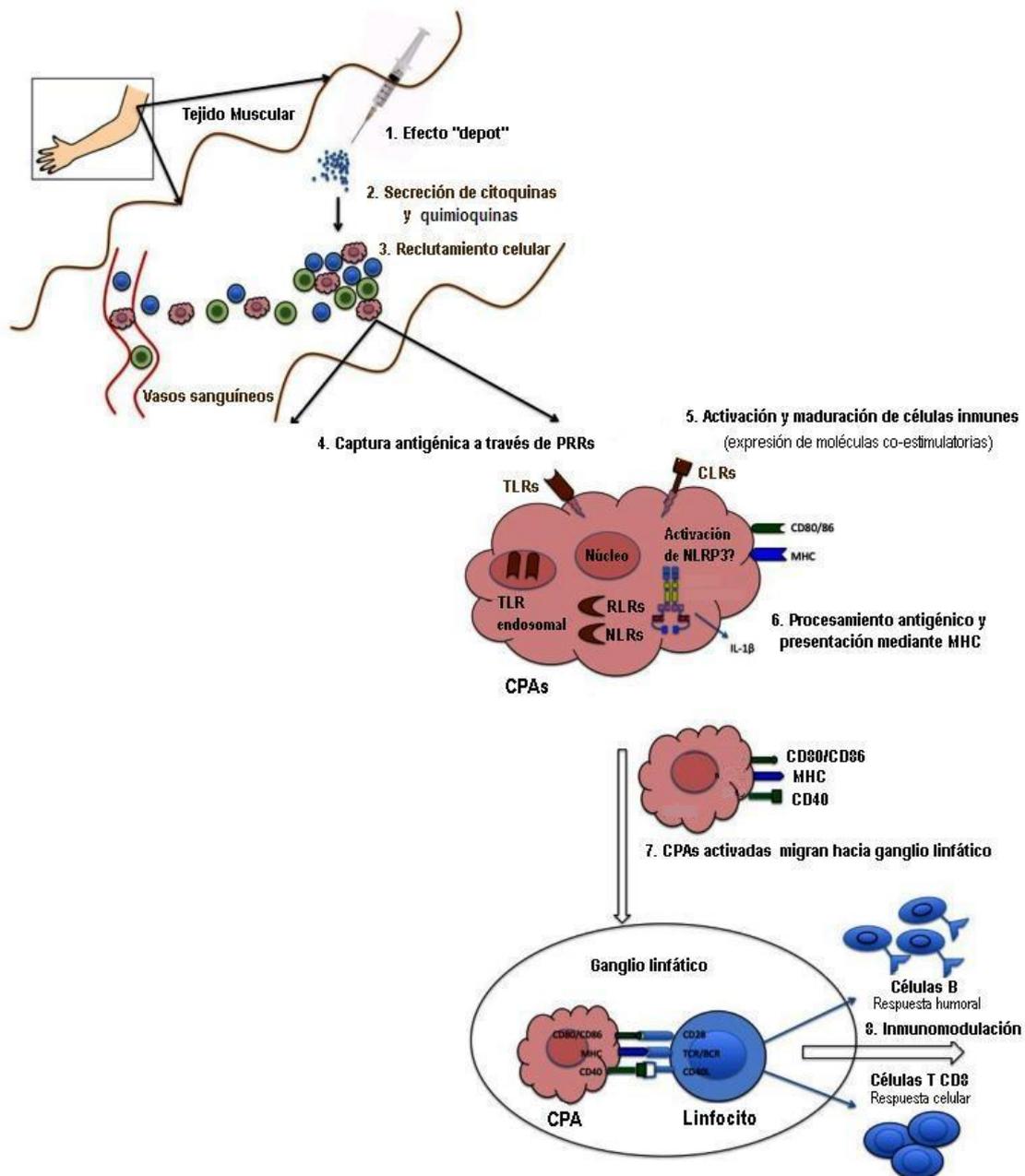


Figura 1. **Mecanismos de acción propuestos para adyuvantes.** (1) Algunos adyuvantes forman un depósito en el sitio de la inyección, que se asocia con la liberación sostenida en el tiempo del antígeno. (2) Otros adyuvantes se asocian con la secreción transitoria de citoquinas y quimioquinas. (3) Las citoquinas y quimioquinas secretadas están implicadas en el reclutamiento de diversas células inmunes al sitio de inyección. Estas células reclutadas secretan citoquinas y quimioquinas, que a su vez, atraen a otras células. Todos estos acontecimientos conducen a la formación de un entorno local immuno-competente en el sitio de inyección. (4) Las CPA reclutadas expresan diversos PRRs, tanto en su superficie (TLRs, CLR) como en su citoplasma (NLRs y RLRs), que se activan con los adyuvantes. (5) Esto lleva a su maduración y activación. Las CPA maduras inducen la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y moléculas coestimuladoras. (6) También se caracterizan por el aumento de su capacidad en el procesamiento y presentación de antígenos. (7) Las CPA maduras, luego migran a ganglios linfáticos drenantes para interactuar con linfocitos T/B antígeno-específicos. (8) Activan células B productoras de anticuerpos o células T CD8⁺ efectoras. Adaptado de Awate, S y col. 2013 (9).

1. Liberación sostenida en el tiempo del antígeno desde el sitio de la inyección (efecto “depot”).

La formación de “depot” es quizás el más antiguo y reconocido mecanismo de acción descrito. La liberación sostenida en el tiempo del antígeno desde el sitio de la inyección asegura una constante estimulación del sistema inmune y la consecuente generación de altos títulos de anticuerpos específicos. Glenn y col. (1926) (10) fueron los primeros en proponer la importancia del efecto “depot” en la actividad adyuvante de las sales de aluminio, aunque más tarde diferentes hallazgos científicos independizan la influencia de la liberación sostenida del antígeno sobre el efecto inmunoestimulante de este reconocido adyuvante (11-12). Al contrario, ASO₄ demostró inducir una óptima respuesta inmune sólo cuando se co-localiza con el antígeno, indicando que las sales de aluminio presentes en la formulación le otorgan un efecto “depot” (13), mientras que MF59 tiene un rápido “clearance” del sitio de inyección y se demostró que no posee efecto “depot” (14).

2. Inducción de citoquinas y quimioquinas. Reclutamiento celular a nivel del sitio de la inyección.

Muchos de los adyuvantes poseen la capacidad de generar una respuesta inmune innata en el sitio de la inyección, lo que genera un micro-ambiente inflamatorio con los elementos necesarios para facilitar la posterior inmunidad adaptativa desencadenada por las vacunas (15). Las quimioquinas juegan un rol crítico en la migración de células inmunes a sitios específicos y se demostró que las mismas aumentan frente a la administración de adyuvantes en el sitio de la inyección (16). MF59 aumenta la expresión de CCR2, receptor de CCL2 (16), involucrada en el reclutamiento de monocitos, e induce la liberación de CCL2, CCL3 y CXCL8 (17). ASO₃ induce en el sitio de la inyección interleuquina 6 (IL-6), el factor estimulante de colonia 3 (CSF3, citoquina que moviliza neutrófilos) y CCL2, CCL3 y CCL5 (quimioquinas que reclutan leucocitos) (18). De la misma forma, el infiltrado celular inflamatorio inducido por las sales de aluminio se acompaña de la liberación de CCL2, CXCL1 (importante en el reclutamiento de neutrófilos), y CCL11 (importante en el reclutamiento de eosinófilos) (19). CpG-ODN desencadena una

cascada de señalización la cual permite la traslocación al núcleo de factores de transcripción a través de los cuales aumenta la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e inmunoregulatorias tales como: IL-6, IL-12, y TNF (9).

Se ha descrito para las sales de aluminio, MF59, ASO₃, ASO₄ y CpG-ODN la capacidad de reclutar células de la inmunidad innata a nivel del sitio de inyección, las cuales, en la mayoría de los casos, transportan el antígeno a ganglios linfáticos con el fin de generar una respuesta inmune específica, (13, 18, 20-22). Sin embargo, no se ha podido establecer aún, una relación directa (causa-efecto) entre la capacidad de reclutamiento celular y la actividad adyuvante, para ello se requieren estudios de mayor profundidad (9).

3. Presentación antigénica.

La presentación antigénica a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresado en las CPA es de gran relevancia en el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. Este proceso comprende internalización, degradación y presentación del antígeno a los linfocitos. La mayoría de los adyuvantes licenciados para uso humano favorecen la etapa de internalización de este mecanismo. El rol de los adyuvantes en las etapas de degradación y presentación antigénica ha sido menos estudiado (9). Investigaciones recientes muestran que algunos adyuvantes favorecen este proceso de presentación antigénica reduciendo el grado de degradación del antígeno previamente internalizado (23-24).

4. Activación y maduración de células presentadoras de antígeno.

La activación y maduración de las CPA es esencial en la inducción de una respuesta inmune adaptativa. El aumento en la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras (CD86, CD80, CD40, etc) (marcadores de activación y maduración celular) lleva a un incremento en la habilidad de las CPA para generar la activación y diferenciación de linfocitos T (25). Liposomas, CpG-ODN, sales de aluminio, MF59 y ASO₄, entre otros, han demostrado emplear este mecanismo (17, 26-28).

5. Activación del inflamasoma.

Las células de la inmunidad innata expresan los PRRs con el fin de reconocer microorganismos. Muchos de los adyuvantes utilizados son ligandos de estos receptores de la inmunidad innata. A diferencia de los agonistas de PRRs, los adyuvantes particulados (o adyuvantes que no poseen un PAMP descrito, tales como, sales de aluminio, liposomas, emulsiones, etc.) no son reconocidos por un PRR específico y aún así tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune adaptativa. La hipótesis de que estos últimos operarían a través de una “señal de daño” fue establecida en primer lugar por Matzinger en 1994, quien propuso que no sólo los agentes infecciosos, sino también las “señales de daño” provenientes de células y de tejidos alterados pueden desencadenar la activación del sistema inmune (29). Moléculas tales como cristales de ácido úrico, nucleótidos, ATP, especies reactivas de oxígeno y citoquinas son liberadas por daño tisular en el sitio de inyección (30). Estas señales no infecciosas han sido denominadas en conjunto como patrones moleculares asociados al daño (cuya sigla es: **DAMPs**, en inglés damaged associated molecular patterns) para distinguirlas de los PAMPs (31). Los adyuvantes particulados pueden causar daño local del tejido en el sitio de inyección y así generar señales de daño que desencadenan la activación no específica del sistema inmune innato, lo que subsecuentemente dará lugar a la respuesta inmune adaptativa.

El inflamasoma es un complejo proteico intracitoplasmático que posee tres componentes principales: un PRRs, la proteína ASC (de la sigla en inglés apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) y pro-caspasa 1 (Fig. 2). La activación de los PRRs induce el ensamblaje del complejo proteico y la consecuente inducción de la forma activa de caspasa 1 la cual es la encargada de clivar a la pro-IL-1 y pro-IL-18 dando lugar a las citoquinas activas o maduras (31). Hasta el momento se ha descrito que forman inflamasoma los siguientes PRRs: NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4 (todos pertenecientes a la familia NLRs) (32) y AIM2 (perteneciente a la familia de receptores que reconocen ADN) (33). Actualmente el inflamasoma formado por NLRP3 está siendo ampliamente estudiado en el área de vacunas debido a su posible rol en la actividad adyuvante.

El inflamasoma NLRP3 puede ser activado por diferentes estímulos incluyendo: PAMPs, DAMPs, irritantes ambientales (asbestos, sílica), estrés metabólico y por radiación UVB. La flagelina de bacterias Gram negativas (*Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila*, y *Pseudomonas aeruginosa*) media la señalización del inflamasoma NLRP3. La toxina del *Bacillus anthracis* activa el inflamasoma NLRP1 y dhADN citosólico activa el inflamasoma AIM2 (34).

Se describió que las sales de aluminio activan el inflamasoma NLRP3. Algunas investigaciones muestran un rol crucial del inflamasoma NLRP3 en las propiedades adyuvantes de las sales de aluminio (35-37). Sin embargo, simultáneamente, otros científicos establecieron que si bien la activación del inflamasoma NLRP3 era crucial para la actividad inflamatoria del aluminio, su actividad adyuvante no dependía de esta vía de señalización (20, 38). Por otro lado, se demostró que la activación de esta vía citoplasmática no es requerida para la actividad inmunoadyuvante de MF59 (39-40); sin embargo, se estableció que la molécula adaptadora requerida para el ensamblaje del inflamasoma, ASC, cumple un rol central en la actividad adyuvante de la emulsión (39). Los estudios de Embry y col. muestran que MPL no es capaz de activar el inflamasoma NLRP3 (41).

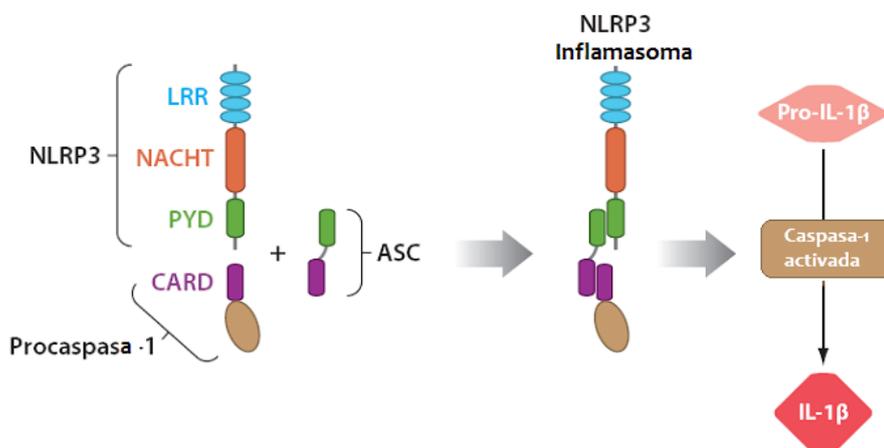


Figura 2. **El inflammasoma NLRP3.** Complejo de proteínas heterotrimérico compuesto por NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC) y pro-caspasa 1. Su subunidad NLRP3 está compuesta de tres dominios distintos. Uno de ellos es una región de repetición rica en leucina (cuya sigla es: **LRR**, en inglés leucine-rich repeat) que se cree que está involucrada en el reconocimiento de ligandos. Los otros dos dominios, NACHT y PYD (de la sigla en inglés Pyrin-domain), están involucrados en interacciones proteína-proteína. El dominio PYD de NLRP3 se une al dominio PYD en ASC. Utilizando su dominio CARD, ASC, recluta la pro-caspasa 1. Este complejo se ensambla en el citosol de las células. Tras la activación escinde y libera caspasa 1 activa, que luego escinde pro-IL-1β en su forma madura y activa. Adaptado de Rock, K y col. 2010 (31).

La mayoría de los adyuvantes licenciados para uso humano se comenzaron a utilizar de forma empírica. En los últimos años, se ha avanzado en el estudio del mecanismo de acción de los mismos pero aún no se lo conoce por completo para muchos de ellos. Consideramos que el estudio en profundidad del mecanismo de acción de un adyuvante permite su uso racional en futuras vacunas y el predecir su posible toxicidad.

Características de un adyuvante ideal.

Como se comentó anteriormente, la inmunización con antígenos proteicos altamente purificados o recombinantes resulta en la inducción de una respuesta inmune humoral modesta, mientras que, en muchos casos, son incapaces de inducir una respuesta celular específica (requerida en las infecciones por patógenos intracelulares o en cáncer). Debido a esto, en ocasiones, se recurre a administraciones múltiples con el fin de lograr la respuesta deseada o “suficiente”. Si bien, los adyuvantes se incluyeron con el objetivo de mejorar la inmunogenicidad de las vacunas de la nueva generación, encontrar la combinación

ideal no es tarea fácil para los inmunólogos. Por ejemplo, aunque se ha producido una considerable inversión en el desarrollo de vacunas recombinantes contra la gripe causada por influenza (responsable de numerosas pandemias), las formulaciones desarrolladas hasta el momento requieren dosis relativamente altas debido a su débil inmunogenicidad, lo que tiene un impacto negativo sobre su potencial para el suministro global (4). De esta manera, es importante resaltar e incluir algunas de las características prácticas que debería reunir un adyuvante ideal (Fig. 3).

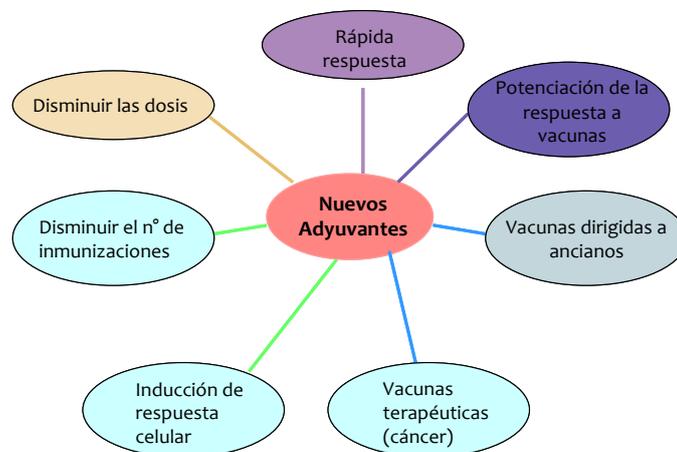


Figura 3. **Potenciales beneficios de un adyuvante.** Adaptado de Reed y col. 2013 (4).

1. **Actividad Biológica.**

- ✓ Seguridad: la formulación debe ser segura y eficaz en todos los grupos etarios. Debe estar compuesta preferentemente por sustancias que puedan ser metabolizadas por nuestro organismo. La actividad inflamatoria debe ser localizada y transitoria, con mínima exposición sistémica.
- ✓ Administración: Cada vía de inoculación puede tener diferentes requerimientos en la formulación.
- ✓ Disminución en la dosis de antígeno: El adyuvante debería permitir la disminución de la dosis de antígeno así como el número de inmunizaciones.

- ✓ Amplia respuesta protectora: El adyuvante debería otorgar protección frente a cepas heterólogas de un patógeno.
- ✓ Respuesta de anticuerpos: La respuesta de anticuerpos debe mejorar y prolongarse mediante la utilización del adyuvante.
- ✓ Inmunidad celular: El adyuvante debe inducir y/o prolongar la respuesta de células T CD8⁺ y/o CD4⁺ antígeno específicas.
- ✓ Calidad de la respuesta inmune: El adyuvante debería modular el perfil de la respuesta inmune según se desea (Por ejemplo, balance Th1/Th2).
- ✓ Mejorar la respuesta en grupo poblacional no inmunocompetente: tales como, neonatos, ancianos o inmunocomprometidos.

2. Aspectos físico-químicos.

- ✓ Materias primas: son preferibles los adyuvantes sintéticos por la pureza, estabilidad y seguridad. Adyuvantes a base de plantas pueden ser aceptables si los sintéticos son demasiado costosos o tienen bajo rendimiento; mientras que los provenientes de fuentes animales deben ser evitados por posibles enfermedades. Deben estar disponibles, poseer bajo costo y poder metabolizarse y excretarse.
- ✓ Manufactura: Los equipos y procesamiento deben ser accesibles, transferibles y deben permitir la producción de lotes consistentes.
- ✓ Morfología: La carga y estructura química son factores cruciales en su bioactividad. Se debe tener en cuenta la toxicidad generada por materiales catiónicos.
- ✓ Asociación con el antígeno: Los efectos del adyuvante en la estructura del antígeno deben caracterizarse, en general se prefiere cierto nivel de asociación entre ambos componentes, aunque ésta no debe ser tan fuerte que perjudique la actividad biológica.
- ✓ Estabilidad: Los excipientes e ingredientes farmacéuticos activos deben mantener la estructura química, tamaño de partícula, forma, polidispersidad y el aspecto visual. Su envasado debe evitar la degradación oxidativa.

CpG-ODN.

La inmunogenicidad del ADN procariota fue establecida por primera vez cuando se descubrió que una pequeña fracción de ADN del bacilo *Mycobacterium bovis* cepa Calmette-Guerin (BCG), era capaz de inducir interferón (IFN) tipo I, generando la activación de células NK (de la sigla en inglés natural killer), lo que generó un efecto antitumoral (42). Luego, Krieg y col. (43) establecieron que la respuesta inmune es generada sólo cuando los motivos CG (citosina-guanina) se incluyen en la fracción de ADN y su inmunogenicidad se ve afectada cuando estos se encuentran metilados. Esta secuencia CG no metilada es más frecuente en el ADN bacteriano que en el genoma de vertebrados. Debido a que la mayoría de las secuencias CG en mamíferos están metiladas, la capacidad del sistema inmune para reconocer sólo aquellas que no se encuentran metiladas es una característica muy importante que le permite a nuestro organismo, diferenciar el ADN procariota del propio. Además, en este mismo trabajo, los autores demuestran que se obtiene el mismo efecto inmunoestimulante, utilizando un oligodeoxinucleótido sintético que contiene motivos CpG (citosina unida por enlace fosforotioato a guanina, conocido como CpG-ODN (PS)) no metilados (43). Cinco años más tarde, Hemmi y col. (44), establecieron que TLR9 es el receptor que reconoce ADN rico en secuencias CpG no metiladas.

La característica fundamental de las células de la inmunidad innata que les permite detectar y categorizar una infección parece ser su repertorio de PRRs, los cuales reconocen una amplia variedad de moléculas que provienen de diferentes patógenos. La familia más estudiada de PRRs son los TLRs; algunos de los cuales se expresan en la superficie celular (TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10) y otros son intracelulares (endosomales) como es el caso de los receptores que reconocen ácidos nucleicos: TLR3, 7, 8 y 9. Se cree que la localización endosomal de estos receptores permite la detección eficaz de ácidos nucleicos procariotas, mientras que previene la estimulación “accidental”, específicamente de TLR9, por motivos CG en el ADN propio. Cabe destacar que bajo ciertas condiciones (por ejemplo un “delivery” artificial forzado al endosoma) un CpG-ODN (PO) (oligodeoxinucleótido sintético que contiene motivos citosina unidos por el enlace fosfodiéster natural a guanina) también puede señalar a través de TLR9 lo cual es independiente de los

motivos CG (45). Más recientemente, se han demostrado otras vías intracelulares de detección de dhADN (de origen vertebrado y procariota), lo cual destaca su importancia en el desarrollo de la inmunidad innata (33). La expresión de los distintos TLRs es heterógena en las diferentes células que forman parte de la inmunidad innata (46). En lo que respecta a TLR9, este se expresa en humanos principalmente en células B y células dendríticas plasmacitoideas (CDp) en condiciones basales. Algunos estudios también han reportado la expresión de este receptor tanto en neutrófilos, monocitos, células natural killer como en células epiteliales pulmonares luego de un estímulo (47-49).

Los patrones celulares de expresión de TLRs varían entre las especies. Por ejemplo, los ratones se diferencian de los primates en que, en condiciones basales, expresan TLR9 no sólo en células B y CDp, sino también en monocitos y células dendríticas (CD) convencionales. Esto desafortunadamente, dificulta la predicción de los efectos frente a la activación de TLR9 en humanos mediante la extrapolación directa de los resultados obtenidos en ratones (50).

Clases de CpG-ODN.

Se han descrito diferentes clases de CpG-ODN, entre las cuales principalmente se destacan tres. La primera es a la que hace referencia este trabajo de tesis y pertenece a la denominada **clase B** (también llamada clase K) que posee la fórmula general “purina - pirimidina -CG- pirimidina – pirimidina”.

Estos oligodeoxinucleótidos no forman estructuras ordenadas. El motivo específico que estimula el TLR9 humano (5'-GTCGTT-3'), difiere del murino (5'-GACGTT-3'). Estos CpG-ODN generalmente contienen un esqueleto completo con uniones fosforotioato (PS), que los hace resistentes a la degradación por nucleasas, a la cual si son susceptibles aquellos oligodeoxinucleótidos que contienen el esqueleto fosfodiéster (PO) natural (Fig. 4). En humanos, los CpG-ODN clase B principalmente activan células B e inducen la maduración y una producción moderada de IFN- α por las CDp. En ratón, tienen los mismos efectos y además inducen la maduración de las CD convencionales.

Por otro lado, la segunda clase de CpG-ODN son los de **tipo A** (también llamado D), los cuales a diferencia de los anteriores, son potentes estimuladores

de Cdp para la producción de IFN- α , mientras que su capacidad para estimular células B es más limitada. Estos oligodeoxinucleótidos presentan un esqueleto mixto PO/PS, el cual consta de una región central PO que contiene uno o más motivos CpG y extremos palindrómicos con motivos poli-G (tres o más guaninas) PS en 5' y/o 3', estos últimos son responsables de que estos oligodeoxinucleótidos formen por autoensamble estructuras altamente ordenadas conocidas como G-tetrámeros.

Finalmente los CpG-ODN **clase C** combinan las propiedades inmunológicas de los dos anteriores. Su estructura generalmente consiste en una secuencia palindrómica PO en el extremo 3' combinada con un extremo 5' CpG PS, similar al de clase B. Estos oligodeoxinucleótidos forman estructuras tipo dúplex.

Cabe destacar que para el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizó el CpG-ODN clase B, ya que es el que está actualmente en uso en la mayoría de los ensayos clínicos realizados en humanos (8); por otro lado, Liu y col., establecieron que esta clase de oligodeoxinucleótido es la más eficaz a la hora de potenciar una respuesta inmune humoral como celular específica (51).

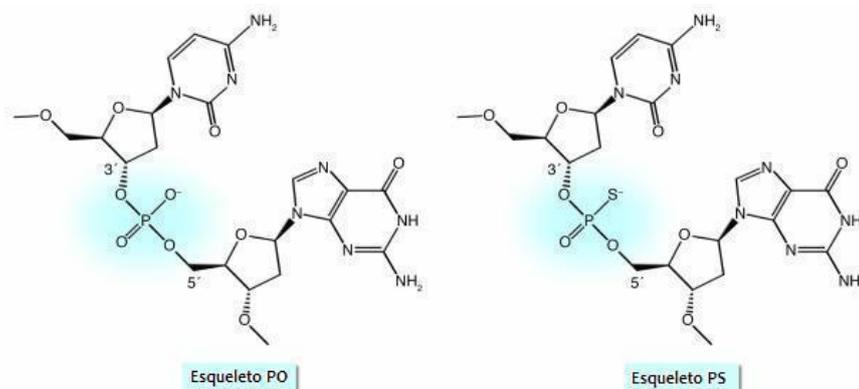


Figura 4. **Esqueleto del oligodeoxinucleótido nativo y modificado.** Este último difiere del nativo (PO) en la sustitución de un átomo de azufre por uno de oxígeno. Este cambio mejora la estabilidad *in vivo* del oligodeoxinucleótido. Adaptado de Krieg y col 2007 (52).

Mecanismo de acción de CpG-ODN.

En estado basal, el TLR9 se encuentra predominantemente a nivel del retículo endoplasmático (RE) donde las chaperonas GRP94 (de la sigla en inglés, glucose-regulated protein of 94 kDa) y PRAT4A (de la sigla en inglés, protein associated with TLR4 A) son responsables de su plegamiento adecuado (53). La estimulación de una célula con CpG-ODN requiere su internalización, sin embargo

no se conoce aún con exactitud este mecanismo. Está descrito, que en células en cultivo CpG-ODN es internalizado de forma espontánea (no necesita transfección), dependiente de la temperatura y la provisión energética e independiente de la secuencia (50). Además, se conoce que es un proceso de endocitosis mediada por un receptor (54), aun no muy bien identificado. Recientemente, se ha propuesto a DEC-205 como receptor de CpG-ODN clase B (55) y se ha demostrado que granulina (una proteína sérica) es un cofactor soluble que asiste a CpG-ODN en la internalización y “delivery” al endosoma (56). Frente al estímulo con su ligando, TLR9 se transporta desde el RE a los compartimentos endosomales mediante la chaperona UNC93B1 (de la sigla en inglés, uncoordinated 93 homolog B1) (53). La proteólisis de TLR9 ha sido descrita como prerrequisito para su activación, para ello se ven involucradas catepsinas tales como: C, B, F, H, K, L, S, V, X y AEP (asparagina endopeptidasa) (57). Los primeros pasos en las vías de transducción de señales inducidas por CpG-ODN pueden ser bloqueados por inhibidores de acidificación o maduración endosomal, o por inhibidores de fosfatidilinositol 3-quinasa (cuya sigla es **PI3K**, en inglés phosphatidylinositol-3-kinase), que parece tener un papel en la internalización de CpG-ODN (50). Luego de la internalización en un compartimento endosomal, los motivos CpG interactúan con el fragmento C-terminal (aa 471-1034, endodominio) de TLR9, lo que permite el reclutamiento de la molécula adaptadora **MyD88** (de la sigla en inglés, myeloid differentiation primary response gene 88) hacia la porción intracelular del TLR, el dominio **TIR** (de la sigla en inglés, Toll/IL-1 receptor). Luego, MyD88 moviliza a **IRAK** (de la sigla en inglés, IL-1 receptor associated kinase) **1 y 4**, a **IRF7** (de la sigla en inglés, interferon regulatory factor-7) y **TRAF6** (de la sigla en inglés, TNF receptor-associated factor 6). De esta forma ocurre la activación de distintas MAPKs (de la sigla en inglés, mitogen activated protein kinases): **ERK** (de la sigla en inglés, extracellular signal regulated kinase), **p38 y JNK** (de la sigla en inglés, jun N-terminal kinase), como así también del complejo de quinasas **IκB** que resulta en la migración del factor de transcripción **NF-κB** (de la sigla en inglés, nuclear factor κB) al núcleo (50) (Fig. 5). Por otra parte, el complejo proteico **AP3** (de la sigla en inglés, adaptor protein 3) media la traslocación de TLR9 al endosoma tardío o

lisosoma donde la señalización a través de **IRF7** es iniciada con la consecuente producción de IFN tipo I (53).

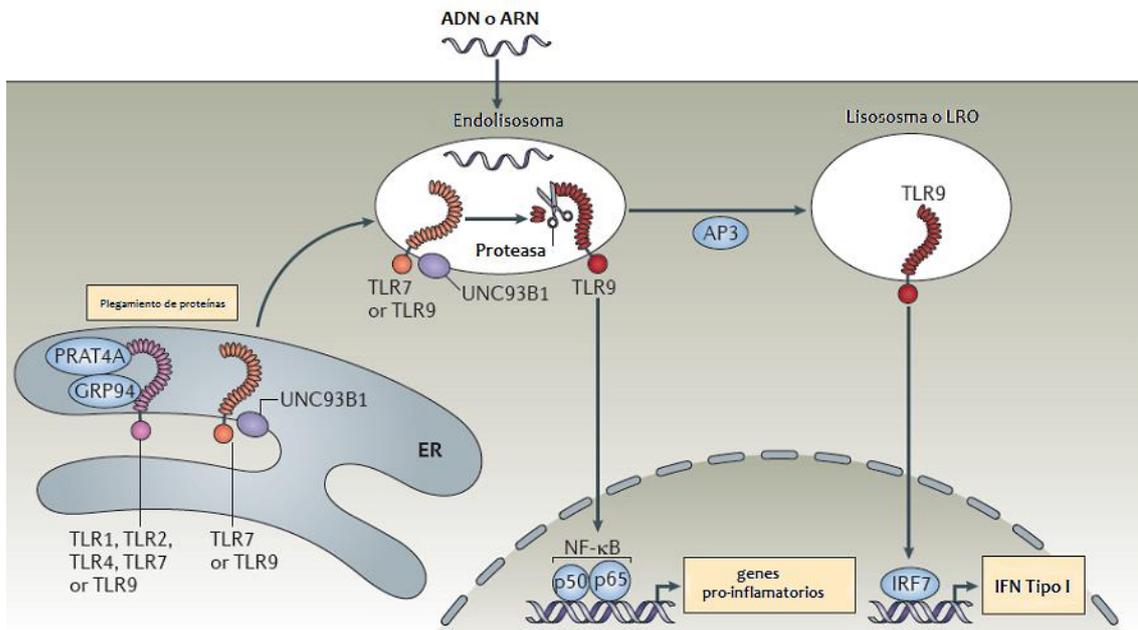


Figura 5. Esquema de las posibles vías de señalización de CpG-ODN/TLR9. LRO: de la sigla en inglés lysosome-related organelles. Adaptado de Lee y col. 2012 (53).

El rol de CpG-ODN en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa.

Como se describió anteriormente, en humanos TLR9 se expresa principalmente en células B y CDp. De esta manera, CpG-ODN estimula estas células generando una respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Fig. 6).

Cuando las células B son estimuladas por el oligodeoxinucleótido secretan citoquinas, tales como: IL-6, IL-10 e IL-12. La citoquinas IL-6 e IL-12 están involucradas en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa; por ejemplo IL-6 promueve la expansión y activación de células B y por lo tanto el aumento en la producción de anticuerpos (58).

Por otro lado, las CDp estimuladas con CpG-ODN, secretan citoquinas tales como: IFNs y TNF. Éstas son capaces de activar a las células NK. Además las CDp activadas por el ligando específico de TLR9 secretan IL-12 que promueve la diferenciación de células T helper (Th) o a Th1 (productoras de IFN- γ), induciendo la migración de estas últimas para interactuar con las células B mediante IP-10 (de la sigla en inglés, IFN- γ inducible protein of 10 KDa o CXCL10). De esta manera las células B se diferencian a células plasmáticas, las cuales poseen la capacidad de

producir anticuerpos, una función central en la inmunidad adaptativa. Además el IFN- α promueve la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) (58).

Debido a estas propiedades que presenta CpG-ODN, sus aplicaciones para el tratamiento de enfermedades infecciosas, asma, alergia y cáncer son muy prometedoras (8).

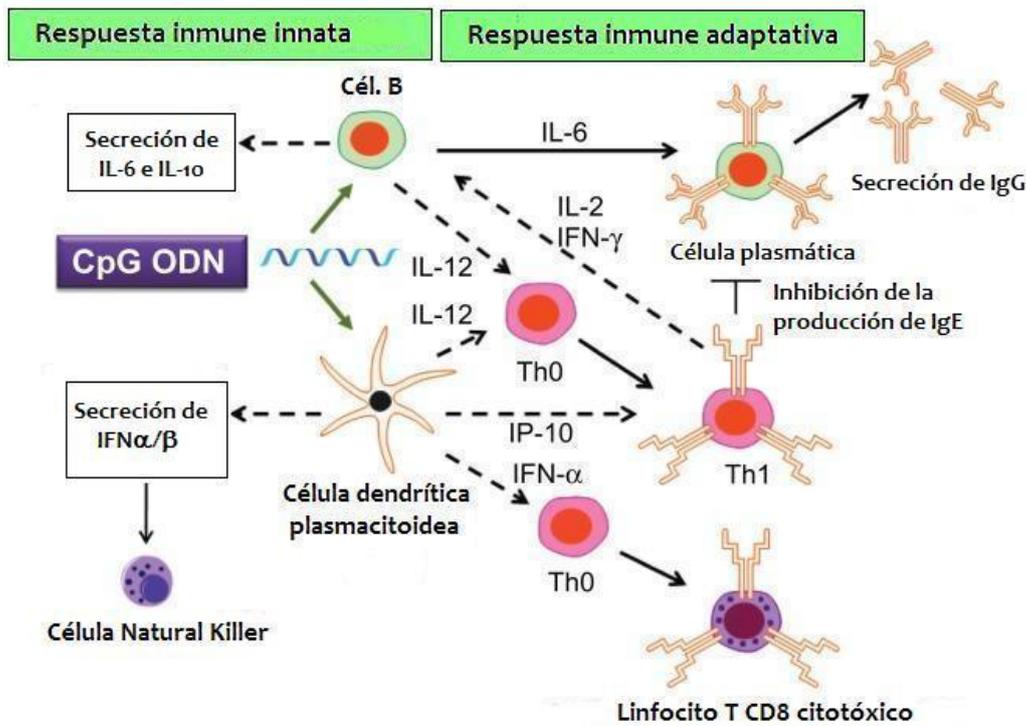


Figura 6. Efectos inmunostimulatorios de CpG-ODN. Adaptado de Hanagata 2012 (58).

Aplicaciones terapéuticas de CpG-ODN.

Desde el descubrimiento de los motivos CpG en 1995, la percepción de sus efectos inmunostimulatorios se ha modificado desde ser considerado un efecto inespecífico, no deseado, a una respuesta inmune selectiva con propiedades que hacen del mismo una sustancia de interés para una gran variedad de aplicaciones terapéuticas.

Durante la última década se están realizando decenas de estudios clínicos en humanos con CpG-ODN (sobre todo clase B). Estos estudios abarcan su utilización como adyuvante en vacunas así como en inmunoterapias para la alergia, cáncer y enfermedades infecciosas. Si bien muchos de los resultados son positivos, estos se acompañan de algunas limitaciones relacionadas con su biodisponibilidad, en los distintos enfoques terapéuticos (8).

1. Utilización de CpG-ODN en enfermedades infecciosas.

Debido a que CpG-ODN produce una activación del sistema inmune innato se especuló que podría ser utilizado como terapia antiviral o en situaciones de bioterrorismo.

La activación de TLR9 rápidamente potencia la respuesta inmune innata, la cual prepara el escenario para una óptima respuesta inmune humoral y celular antígeno-específica. Los mecanismos que contribuyen a la actividad adyuvante de CpG-ODN clase B (el más utilizado en los ensayos clínicos en humanos) son los siguientes: **a.** sinergia en la estimulación de TLR9 y el receptor de células B, generando una importante expansión de esta última población específica para el antígeno (43); **b.** inhibición de la apoptosis de células B promoviendo su sobrevivencia (59); y **c.** mayor maduración de la respuesta de anticuerpos (60). Aparentemente el TLR9 no se expresa en células T vírgenes (que no han sido estimuladas), por lo tanto la potenciación de la respuesta de células T CD4⁺ y CD8⁺ en vacunas que contienen CpG-ODN es atribuida a la secreción de citoquinas y quimioquinas que favorecen el perfil Th1, así como a la maduración y diferenciación de CD (8).

Muchos adyuvantes que originariamente parecían prometedores en estudios con animales, fallaron en potenciar la respuesta inmune en humanos. Afortunadamente, este no es el caso de CpG-ODN, el cual ha demostrado eficacia y buena tolerancia en múltiples estudios clínicos. Un ejemplo claro es la utilización de CpG-ODN clase B con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (fase clínica III); esta vacuna (Hepilisav) indujo una respuesta inmune superior en pacientes con enfermedad crónica renal respecto a la vacuna aprobada (Engerix-B) (8).

Por otro lado, la malaria es una enfermedad infecciosa huérfana (sin vacuna profiláctica aprobada) y muchas de las vacunas que se están desarrollando adolecen de una inmunogenicidad limitada. Estudios clínicos en fase II proponen la utilización de CpG-ODN clase B como adyuvante en una vacuna para esta infección (8).

2. Utilización de CpG-ODN en alergia.

La respuesta de perfil Th1 inducida por CpG-ODN se opone e incluso puede sobreponerse a la respuesta de tipo Th2 desencadenada durante los procesos alérgicos. En ratones, este adyuvante posee la capacidad de redireccionar la respuesta característica de procesos alérgicos tipo Th2 (61). Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que CpG-ODN es capaz de inducir respuesta inmune específica Th1 en ratones de edad avanzada que presentan un perfil Th2 preexistente (62-63).

Una de las limitaciones básicas en el concepto de vacunas contra la alergia es que la mayoría de los individuos que padecen este proceso inflamatorio crónico son alérgicos a múltiples y diferentes antígenos. Debido a esto, sería muy complejo y caro el desarrollo de vacunas específicas contra un alérgeno en particular; es así como los objetivos están puestos en el desarrollo de inmunoterapias universales que permitan una protección completa contra diversos alérgenos. Varias compañías están llevando a cabo ensayos clínicos con terapias con CpG-ODN para el tratamiento de la alergia. Un ejemplo claro es la compañía AstraZeneca que en conjunto con Dynavax, están desarrollando estudios en fase preclínica para el tratamiento del asma con CpG-ODN (8).

3. Utilización de CpG-ODN en oncología.

Diversos estudios clínicos que utilizaron CpG-ODN como inmunoterapia en pacientes con cáncer (melanoma, glioblastoma, carcinoma de célula renal, linfoma no-Hodgkin's, leucemia linfática crónica, etc.) mostraron clara evidencia de su actividad antitumoral. Uno de los estudios más avanzados es el que propone la inyección subcutánea (s.c.) de CpG-ODN para el tratamiento de melanoma (fase II) (8).

De la mayoría de las publicaciones que describen en ratones los efectos beneficiosos de CpG-ODN en diversas aplicaciones antitumorales, los resultados más alentadores han sido cuando CpG-ODN fue utilizado como adyuvante para vacunas contra el cáncer (64). Estudios clínicos abordados, entre otros, por la compañía GlaxoSmithKline proponen una vacuna contra melanoma y cáncer de pulmón utilizando como antígeno MAGE-3 y como adyuvante CpG-ODN (fase

clínica II) (8). Se cree que CpG-ODN es más efectivo cuando se lo combina con otras terapias antitumorales tales como anticuerpos monoclonales, terapia con radiación y tratamientos quirúrgicos y quimioterapia.

Seguridad frente a la activación de TLR9 en ratón y humanos.

Como se mencionó anteriormente las principales características de una vacuna es que sea efectiva y segura. Si bien ya se describieron algunas de las propiedades que hacen de este oligodeoxinucleótido una sustancia adyuvante, es de suma importancia evaluar las condiciones de seguridad y posible toxicidad del mismo.

Los perfiles de seguridad de CpG-ODN difieren significativamente entre ratones y primates, ya que el TLR9 se expresa en una mayor cantidad de células en ratones, estos últimos tienden a sobrestimar los posibles efectos tóxicos generados en humanos.

Uno de los mecanismos de toxicidad en ratones parece ser la secreción de TNF (y otras citoquinas y quimioquinas) mediante la estimulación directa del TLR9 de monocitos (65-67). En humanos, estas células no expresan el receptor específico de CpG-ODN y no se ha reportado la producción de TNF en respuesta a la estimulación con el oligodeoxinucleótido tanto *in vivo* como *in vitro*; por lo tanto no se ha observado este mecanismo de toxicidad (66, 68).

Actualmente, más de un millón de pacientes han participado en ensayos clínicos que involucran a CpG-ODN. En estos casos, la dosis promedio del oligodeoxinucleótido utilizada fue de 1,5-15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ siguiendo un esquema de administración semanal o, en otros casos, mensual. En estudios preclínicos, se determinó que dosis de CpG-ODN mayores a 2,5 mg/kg administradas a ratones diariamente, genera serios efectos adversos tales como, toxicidad hepática, agrandamiento del bazo y ganglios linfáticos, hematopoyesis extramedular e inflamación sistémica (69). Por lo tanto, las bajas dosis y los esquemas de administración que se utilizan en humanos, sumado a las diferencias en la expresión de TLR9 entre primates y ratones, provee de un perfil favorable en lo que respecta a toxicidad.

Por otro lado, el tratamiento con CpG-ODN puede exacerbar procesos autoinmunes en varios modelos de ratón pero, a la vez, en otros previene o reduce la enfermedad inflamatoria (70). Entre los millones de humanos tratados con diferentes CpG-ODN en estudios clínicos, sólo se reportó un paciente normal que fue diagnosticado con enfermedad granulomatosa de Wegener luego de la segunda inyección con la vacuna Heplisav contra la hepatitis B (8), si bien esto fue profundamente investigado, no se pudo establecer una posible asociación con el tratamiento, y el caso seguramente representa un evento espontáneo muy raro que tiende a ocurrir durante el desarrollo clínico de alguna droga luego de que muchos pacientes sean expuestos a la misma. La experiencia clínica a la fecha indica que el tratamiento con CpG-ODN tanto en pacientes normales, como aquellos que padecen cáncer o están infectados con el virus del HIV o hepatitis C, no induce enfermedad autoinmune. Sin embargo, la duración del tratamiento es usualmente menor a seis meses; sólo pocos pacientes han recibido una terapia crónica por más de tres años. De esta manera, vale la pena tener en cuenta que la activación de TLR9 induce la secreción de IFN- α y debido a que el tratamiento crónico con el recombinante de IFN- α induce enfermedades autoinmunes en un 4-19% de los pacientes tratados en forma crónica (71), una continua vigilancia sería prudente frente a pacientes con tratamientos de tiempos muy prolongados.

Limitaciones que presenta CpG-ODN como adyuvante.

* **Vida media corta:** A consecuencia de la degradación producida por nucleasas endógenas (72) y por el rápido “clearance” (rápida absorción desde el sitio de administración a la circulación general), esto conduce a una corta permanencia a nivel local. La degradación por nucleasas fue relativamente solucionada modificando los enlaces internucleótidos fosfodiéster naturales (CpG-ODN PO) por fosforotioato (CpG-ODN PS) (73). En la mayoría de los trabajos científicos y en los ensayos clínicos se utiliza CpG-ODN PS. De esta manera, mientras que la vida media de un ODN PO es de 5 minutos (74), la de un ODN PS es de 0,5-1 hora en plasma y 20-120 horas en tejido (75). Si bien esta modificación otorga estabilidad para el oligodeoxinucleótido, el enlace PS tiene algunos efectos secundarios independientes de la secuencia CpG. Por ejemplo, en algunos ensayos el

tratamiento con oligodeoxinucleótido PS produce una prolongación transitoria del tiempo de tromboplastina parcial como consecuencia de la unión de ODN PS a la trombina (76). Por otro lado, CpG-ODN PS es aún, en cierta medida, sensible a las nucleasas, de hecho la principal vía de metabolización ocurre por las nucleasas tisulares (76). Recientes estrategias novedosas, lograron la resistencia de CpG-ODN PS a nucleasas a través de la modificación de sus estructuras lineales a otras tales como “dumbbell-like DNA” y “dendrímero-like DNA” (58).

* **Baja internalización celular:** CpG-ODN PS es un polianión que posee igual carga que las membranas plasmáticas lo que determina que su internalización sea un proceso poco eficiente. Además, la internalización de CpG-ODN PS no es selectiva de un tipo celular específico o de la expresión de TLR9.

* **Alta unión a proteínas:** CpG-ODN PS es químicamente una molécula hidrosoluble y polianiónica, lo que determina una alta capacidad de unión a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. Motivo por el cual cuando CpG-ODN PS se administró en humanos por vía endovenosa (e.v.) (incluso a altas dosis) no fue capaz de inducir una respuesta Th1 (68); sin embargo, esta respuesta sí se logró cuando se administró por vía s.c. Esto no representa un inconveniente cuando se utiliza CpG-ODN PS como adyuvante de vacuna con un régimen de administración por vía s.c o intramuscular (i.m.).

* **Farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción de una droga en el cuerpo) y biodistribución (localización de una droga en el cuerpo) no favorable:** CpG-ODN PS tiene un rápido “clearance” desde el sitio de administración a la circulación sistémica. Cuando se administra por vía s.c. drena a los ganglios linfáticos (en forma soluble o transportado por células) y a circulación sistémica, luego rápidamente se distribuye en forma no uniforme en varios órganos. Luego de la administración por vía s.c. o e.v., CpG-ODN PS se acumula principalmente en hígado y riñón y, en menor medida, en bazo y médula ósea. No atraviesa la barrera hematoencefálica ni testicular. El patrón farmacocinético y de biodistribución de CpG-ODN PS ha sido muy bien caracterizado y éste es

independiente de la secuencia CpG (50, 76). En un estudio en animales de experimentación se administró CpG-ODN PS por vía s.c. y se encontró que la concentración en los ganglios linfáticos drenantes corresponde sólo al 10-15% de la encontrada en el sitio de inyección y la mayor cantidad de CpG-ODN PS (% de la dosis administrada) se encontró en hígado (32% a las 4 horas), seguido por el sitio de inyección (23% a las 4 horas) (77).

Por lo cual, actualmente en la mayoría de los protocolos, CpG-ODN se está utilizando formulado. Por ejemplo, en los ensayos clínicos cuando se lo utiliza como adyuvante de vacuna está asociado a sales de aluminio o a montanide (similar al adyuvante incompleto de Freund (cuya sigla es: **IFA**, en inglés Incomplete Freund's adjuvant)) y en ensayos preclínicos se ha formulado con DOTAP (liposomas catiónicos), IFA, etc.

Nanoestructura de tipo cristal líquido derivada de palmitato de ascorbilo: Coagel o Coa-ASC16.

Como se describió anteriormente, el desarrollo de nuevas estrategias inmunoadyuvantes es uno de los objetivos principales en el área de vacunas. De esta manera, este trabajo de tesis, mediante la fusión interdisciplinaria de inmunólogos e investigadores farmacéuticos expertos en sistemas portadores de fármacos (SPF), plantea la formulación de CpG-ODN en un sistema nanoestructurado de tipo cristal líquido derivado de 6-o-palmitato de ascorbilo (coagel o Coa-ASC16).

El ácido L-ascórbico (vitamina C) está químicamente constituido por un grupo polar (L-gulofuranolactona), es soluble en agua y constituye un antioxidante de bajo costo por excelencia. Sin embargo, su uso está muy limitado por su baja solubilidad en la mayoría de los solventes a excepción del agua. Esta es la principal razón por la cual la vitamina C no puede penetrar membranas biológicas. Por lo tanto, con el fin de aumentar su liposolubilidad y extender sus propiedades antioxidantes a sistemas lipídicos, es que a partir del ácido ascórbico se han sintetizados ésteres en posición C6 con un ácido graso de largo de cadena variable (ASC_n, Fig. 7) (78). La síntesis de los **ASC_n** consiste en una esterificación en medio ácido concentrado (ácido sulfúrico) durante 16 horas bajo constante

burbujeo de nitrógeno (79). Los ASCn en dispersiones acuosas se comportan como moléculas anfifílicas ya que poseen un grupo polar (ácido ascórbico) y un grupo hidrofóbico (cadena alifática) y tienen la propiedad de autoensamblarse.

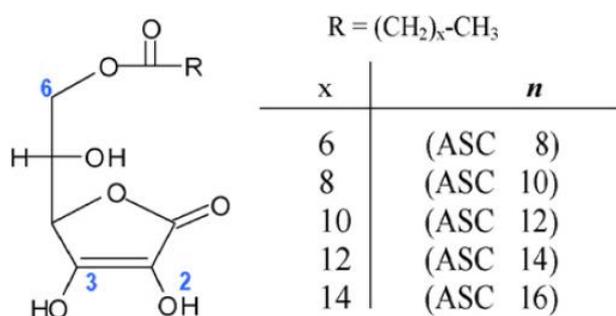


Figura 7. Esquema de la estructura química de ASCn (80)

En el presente trabajo de tesis se trabajó específicamente con 6-o-hexadecanoato palmitato de ascorbilo 16 (ASC16) (Fig. 8). El ASC16 es utilizado sólo o en combinación con α -tocoferoles como estabilizantes para aceites en formulaciones farmacéuticas orales y productos alimenticios. También, es utilizado como antioxidante en formulaciones con compuestos sensibles al oxígeno para administración oral y tópica (81).

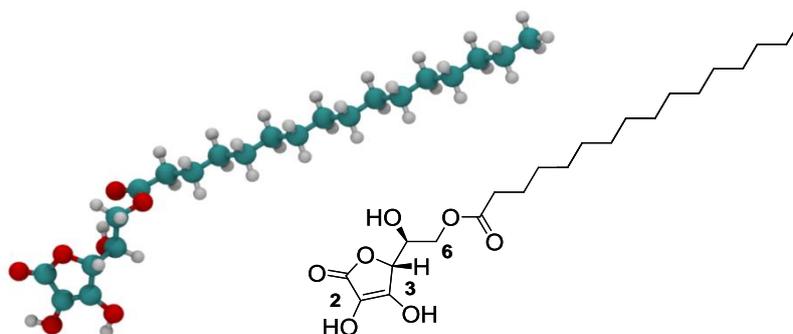


Figura 8. Estructura química de 6-o-hexadecanoato de ascorbilo 16 (ASC16). Las esferas blancas, celestes y rojas corresponden a los átomos de hidrógeno, carbono y oxígeno respectivamente.

ASC16, presenta una porción polar (ácido ascórbico) y una porción apolar (cadena alifática del ácido palmítico), estructura características de sustancias surfactantes (aquellas que se ubican en las interfases y que pueden cambiar las propiedades de las mismas, proviene del inglés “surface active agent”).

El ASC16 es insoluble en agua a temperatura ambiente, lo cual le impide alcanzar la concentración crítica de agregación. Cuando se lo calienta por encima de una temperatura específica (temperatura micelar crítica, **TMC**), la solubilidad aumenta hasta alcanzar la concentración micelar crítica (**CMC**) dando lugar a dispersiones claras. La TMC de los ASCn se incrementa con el largo de la cadena alifática (18°C para ASC8 y 62,5°C para ASC16 en agua). Los ASCn con $n \leq 10$ son solubles en solución acuosa a temperatura ambiente (25°C) y forman micelas como forma de agregación. Los ASCn con $n > 11$ poseen una TMC mayor a 30°C y forman como agregado una fase gel. Luego de enfriar estas dispersiones, se observa la aparición de un sistema semisólido, descrito en algunos casos como un coágulo opaco. Esta fase es típicamente definida como una mesofase semicristalina, un cristal pobremente hidratado o más usualmente como **“coagel” (Coa-ASCn)** (82) (Fig. 9).

Se ha descrito que las fases gel transparentes exhiben un grado menor de cristalinidad que los coageles. En el estado coagel, las cadenas hidrofóbicas poseen un mínimo grado de libertad pero un aumento de temperatura resulta en una expansión anisotrópica de las cadenas. Esto último, 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 (Fig. 9).

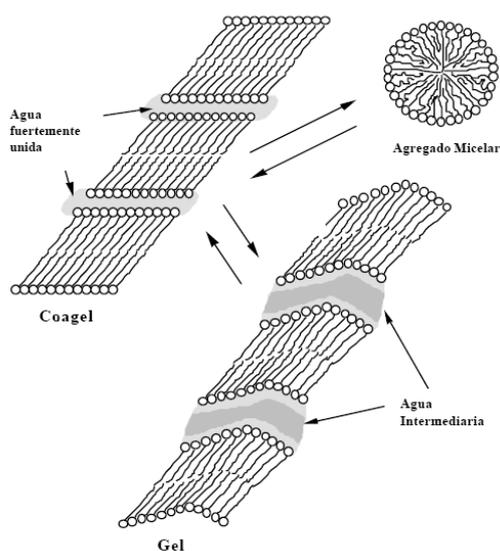


Figura 9. Estructura esquemática de los distintos agregados. Fase coagel, gel y micelar. El área gris indica las moléculas de agua que rodean a los grupos polares (gris claro: agua de fuerte unión; gris oscuro: agua intermedia) (80).

En la siguiente secuencia de fotos, figura 10, se puede observar el fenómeno de formación de estas mesofases de modo macroscópico para ASC16.

En la figura 10 A, puede apreciarse el estado inicial del sistema, donde el surfactante se encuentra en suspensión. A medida que aumenta la temperatura y a partir de un valor determinado (TMC) comienza a producirse la transición de fases debido a la formación del agregado supramolecular. De esta manera, se observa una dispersión opalescente, viscosa, debido a un ordenamiento en lamelas, dando lugar a una estructura tipo gel (Fig. 10 B). Finalmente, cuando el sistema regresa a temperaturas inferiores a la TMC, puede observarse la formación de coagel (Fig. 10 C), con su característica configuración altamente estructurada. Su estructura microscópica muestra un empaquetamiento cerrado de capas lamelares que producen patrones característicos de difracción de rayos X, como así también birrefringencia óptica (80).

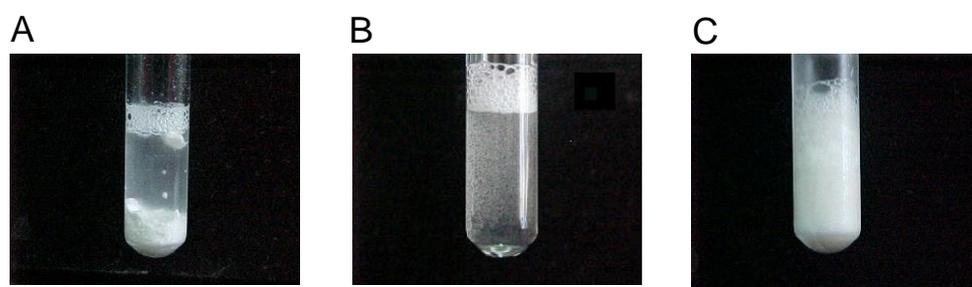


Figura 10. Fotografías obtenidas para describir macroscópicamente la formación de Coa-ASC16.

En la fase coagel, las cadenas hidrocarbonadas tienen una movilidad limitada, y una distancia interlamelar de aproximadamente 10\AA . Una pequeña cantidad de agua fuertemente unida y estructurada separa las bicapas lamelares (83) (Fig. 9). El sistema acuoso de ASC16 ha sido estudiado por integrantes de este trabajo interdisciplinario, mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido y microscopía de luz polarizada (84). De esta manera se han identificado tres capas de agua que varían en función de la transición de fases. Una primera capa que cuenta con $11,47\pm 0,95$ moléculas de agua/molécula de surfactante, que se une fuertemente (mediante puentes de hidrógeno) a la porción polar del éster; la segunda capa presenta 59 ± 17 moléculas de agua/molécula de surfactante y finalmente, una tercer capa que usualmente se define como aquella que posee propiedades similares al agua en estado puro. En la fase gel, las cadenas alifáticas del ácido graso poseen mayor grado de libertad y las altas temperaturas inducen

una expansión anisotrópica de la estructura, lo que permite que el agua penetre en mayor cantidad que en la fase coagel (Fig. 9) (80).

Nosotros elegimos trabajar con Coa-ASC16 (coagel formado a partir de ASC16) ya que fue el más manejable. Coa-ASC16 tiene una consistencia semisólida, se puede cargar en una jeringa y puede ser administrado por vía parenteral y tópica. El grupo de los Drs. Daniel Allemandi y Santiago Palma (Dep. de Farmacia, UNITEFA, FCQ, UNC) y el grupo del Dr. Pierandrea Lo Nostro (Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, Italy), sintetizaron y caracterizaron fisicoquímicamente muchos de los ASCn (80).

Antecedentes previos del grupo demostraron que la permeación de antralina estuvo significativamente aumentada cuando la droga fue vehiculizada en Coa-ASC12, 14 o 16 en comparación con otros sistemas farmacéuticos. Además, se observó que la aplicación tópica en piel de ratón de Coa-ASC12, 14 o 16 no produjo ningún efecto colateral (85). Estos resultados indican que CoaASC16 constituye una novedosa herramienta para la aplicación y vehiculización de diferentes drogas.

Sumado al interés científico de estudiar las diferentes estructuras, interacciones y propiedades del coagel, se ha descrito que estas estructuras pueden ser importantes en procesos de manufactura de alimentos y principalmente en el diseño de formulaciones farmacéuticas, área en la cual su utilización ha sido escasamente explorada.

Coa-ASC16 ofrece varias ventajas como biomaterial para la preparación de un sistema portador de sustancias, entre ellas: a) sus componentes son biodegradables (vitamina C y el ácido palmítico), b) la vitamina C conserva sus propiedades antioxidantes, c) el componente químico (ASC16) de Coa-ASC16 fue licenciado para uso humano en formulaciones farmacéuticas orales y alimentos (listado de GRAS, de la sigla en inglés Generalley refered as safe) y señalado como de uso seguro en el Handbook of pharmaceutical excipients (81), d) forma un sistema nanoestructurado (estructura lamelar con distancia interlamelar de aproximadamente 10Å), que brinda un entorno apropiado para transportar diversos tipos de moléculas ya que ofrece la posibilidad de cargar sustancias de naturaleza hidrofílicas (como es CpG-ODN), hidrofóbicas y anfifílicas, e) es bien

tolerado fisiológicamente (observaciones del grupo basadas en experimentos pre-clínicos (85-86) y f) es posible desde el punto de vista técnico producirlo en gran escala y a bajo costo cumpliendo las buenas prácticas de producción (78).

Sumado a esto, hallazgos de los últimos años indican que materiales utilizados como sistemas transportadores además de trabajar como vehículo pueden actuar *in vivo* como estimuladores del sistema inmune (87-88).

HIPÓTESIS

En base a la experiencia del grupo en el uso de CpG-ODN como adyuvante (62-63, 89-90) y al conocimiento sobre las propiedades fisicoquímicas de los coageles (80), hipotetizamos que **Coa-ASC16** podría ser utilizado como plataforma del adyuvante **CpG-ODN** con el fin de aumentar su bioactividad. La estrategia propuesta permitiría potenciar la actividad adyuvante de CpG-ODN, ya que Coa-ASC16 posee cierta rigidez que permitiría modular su liberación hacia el medio biológico y/o proporcionarle protección de agresiones del medioambiente. De esta manera, la nanoestructura podría tener una o varias implicancias in vivo, tales como: aumentar la vida media de CpG-ODN incrementando su resistencia a nucleasas y/o generar la liberación sostenida en el tiempo del antígeno y/o adyuvante (efecto “depot”). Si los resultados obtenidos son alentadores, aportarán una herramienta muy importante en el diseño racional de futuras vacunas.

Objetivos

Objetivo General

*Evaluar el uso de **Coa-ASC16** como sistema portador de **CpG-ODN** a los fines de promover el aumento de su actividad biológica.*

Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad inmunoadyuvante de CpG-ODN formulado con Coa-ASC16.
2. Estudiar el/los mecanismo/s por el cual el Coa-ASC16 mejora la actividad adyuvante de CpG-ODN.
3. Evaluar las propiedades adyuvantes intrínsecas de Coa-ASC16.

Capítulo I

“Potenciación de la actividad adyuvante de CpG-ODN mediante su formulación en un sistema nanoestructurado”.

Los adyuvantes licenciados para uso humano son pobres inductores de respuesta de tipo celular Th1. El adyuvante completo de Freund (cuya sigla es: **CFA**, en inglés Complete Freund's adjuvant) utilizado experimentalmente, es un potente inductor de respuesta Th1, pero está asociado con eventos adversos muy severos por lo tanto su uso no está aprobado en humanos (91). Se ha demostrado que CpG-ODN posee actividad adyuvante tanto en humanos como en animales y que promueve una respuesta inmune de tipo Th1, y a diferencia de CFA, no causa una reacción inflamatoria local severa. Además, se puede mejorar el efecto adyuvante de CpG-ODN en ratones si este es formulado o co-administrado con otros adyuvantes (22).

A pesar de que existen numerosas evidencias que demuestran que CpG-ODN tiene potente actividad biológica, su biodisponibilidad es reducida y en consecuencia se necesita la administración de altas dosis y en forma repetida para lograr los efectos biológicos deseados. La potenciación de la actividad de CpG-ODN es más importante en humanos y animales de gran porte, ya que en estas especies este adyuvante es menos potente que en los roedores, probablemente debido a la diferencia en el patrón de expresión de TLR9. La biodisponibilidad reducida de CpG-ODN limita severamente el potencial que tiene para ser utilizado ampliamente en la clínica. Entonces, dado su potencial uso como agente inmunoterapéutico en humanos, existe un gran interés **en desarrollar estrategias relacionadas con la formulación de CpG-ODN que optimicen su actividad biológica** (58, 92-93).

Estrategias previas de formulación de CpG-ODN.

Estudios previos, en coincidencia con este trabajo de tesis, demuestran que la potenciación de la actividad adyuvante de CpG-ODN puede ser alcanzada mediante su formulación con diversos compuestos. De esta manera, a partir del año 2009 se han ensayado numerosas estrategias con este fin (22, 58, 94-97). Los mecanismos que median este efecto no se conocen por completo, aunque muchos factores podrían estar contribuyendo, tales como: **1)** la protección de CpG-ODN de la degradación enzimática, **2)** un incremento en la captura de CpG-ODN por CPA, **3)** una mayor concentración en el endosoma **4)** una habilidad de

concentrarse en los tejidos blancos, 5) una liberación más lenta, local y sostenida en el tiempo en el sitio de administración. Algunos ejemplos se describen a continuación.

Conjugación de CpG-ODN con el antígeno. Una manera de incrementar el efecto adyuvante de este oligodeoxinucleótido es la unión química del mismo con el antígeno, de manera tal, que el ligando de TLR9 y el antígeno sean internalizados por la misma CPA (94, 97). Una de las estrategias utilizadas con este fin, es la utilización del complejo biotina-avidina para conjugar ambos compuestos, lo cual resultó en un aumento de 10 veces en la respuesta inmune generada en comparación con la que induce la solución del antígeno sólo más CpG-ODN (98). La conjugación de CpG-ODN con el antígeno favorece la internalización del antígeno y la presentación cruzada (fenómeno que refiere a la capacidad de ciertas CPA para procesar y presentar patógenos extracelulares a células T CD8⁺ citotóxicas) (99-102), lo cual es muy importante en el tratamiento contra patógenos intracelulares y cáncer.

Liposomas. Los liposomas fueron una de las primeras estrategias desarrolladas para la formulación de CpG-ODN y el antígeno de interés (103-105). Estos representan partículas sintéticas cerradas, compuestas por bicapas lipídicas concéntricas que están separadas por regiones acuosas, en las cuales se puede formular moléculas lipofílicas e hidrofílicas. Actualmente existen numerosos tipos de liposomas con diferentes propiedades fisicoquímicas (método de preparación, composición lipídica, tamaño de la partícula (100-2000 nm), fluidez de la bicapa lipídica, carga de la partícula, etc.), que determinan los efectos que ejercen *in vivo* sobre el sistema inmune (106). Los liposomas además son biodegradables, lo que hace de ellos un atractivo vehículo para el “delivery” de diferentes moléculas bioactivas. Los mecanismos por los cuales estos incrementan la actividad inmunoadyuvante de CpG-ODN son varios, tales como: los protegen de la degradación por nucleasas y retrasan su distribución en tejidos, por lo tanto aumentan su vida media (107); por otro lado, facilitan su internalización celular (108-109). Además, luego de la administración s.c. de ciertos liposomas, se

produce la fagocitosis de los mismos por macrófagos como su localización y concentración en ganglios linfáticos drenantes (110). Dado que los ganglios linfáticos contienen un mayor número de células que expresan TLR9 en comparación con otros tejidos como músculo y piel, la concentración de CpG-ODN en los ganglios linfáticos drenantes puede ser un importante mecanismo por el cual un liposoma puede aumentar la bioactividad de este ligando.

Micro y nanopartículas fabricadas con diferentes materiales. Micropartículas fabricadas con polímeros biodegradables aprobados por la FDA (de la sigla en inglés, Food and Drug Administration), como el PLGA (de la sigla en inglés, Polylactic-co-glycolic acid), PLA (de la sigla en inglés, Poly lactic acid) y PGA (de la sigla en inglés, Poly glycolic acid), en las últimas dos décadas han demostrado un gran potencial en el “delivery” tanto de proteínas y péptidos como de ADN. Estas partículas incrementan la inmunogenicidad de los antígenos encapsulados debido a su naturaleza particulada y a su capacidad de controlar el grado de liberación del mismo (95).

Recientemente, otros numerosos materiales fueron utilizados para sintetizar micro y nanopartículas con el objetivo de formular CpG-ODN, entre ellos: nanopartículas de gelatina (111), de fosfato de calcio (112), de sílica mesoporosa modificada (113) y de poliestireno decoradas con un polímero catiónico (114).

Combinación con otros compuestos. Un ejemplo es con el aluminio, el cual es el principal adyuvante de uso humano y veterinario. Muchos trabajos han demostrado que la co-administración de aluminio, CpG-ODN y el antígeno lleva a un incremento de la actividad biológica del oligodeoxinucleótido en animales de experimentación, animales de gran porte y humanos (8, 60, 115). Otro ejemplo es el Emulsigen, una emulsión de aceite en agua utilizada en vacunas veterinarias. La formulación de CpG-ODN (un inductor de respuesta Th1) con Emulsigen (un inductor de respuesta Th2) induce la potenciación del efecto adyuvante cuando se combinan con un antígeno determinado resultando en una respuesta inmune balanceada Th1/Th2 (116).

Finalmente, los polifosfacenos son una nueva clase de polímeros sintéticos, únicos por su flexibilidad y versatilidad en su aplicación para el “delivery” de distintas drogas. La combinación de estos con CpG-ODN promovió un aumento en el título de anticuerpos (IgG1 e IgG2a) cuando se administraban con el antígeno de superficie de la Hepatitis B (22).

Estas estrategias son algunas de las ensayadas para mejorar la actividad de CpG-ODN, muchas otras se encuentran detalladas en (58, 93). Si bien muchas de ellas parecen prometedoras, la mayoría presentan ciertos inconvenientes relacionados con la estabilidad y la manufactura, tales como la producción a gran escala y la toxicidad asociada a compuestos catiónicos (58, 117). Teniendo en cuenta las características descritas anteriormente para un adyuvante ideal, estas no cumplirían con todos los ítems propuestos.

Considerando las evidencias antes mencionadas, en estos últimos años, ha surgido la imperiosa necesidad de estudiar estrategias inmunoadyuvantes que colaboren en el desarrollo eficaz de una respuesta inmune específica, sobre todo dirigida a patologías que hoy en día siguen siendo recidivantes, que respetan o no márgenes geográficos y que además afectan a un número considerable de la población mundial. Teniendo en cuenta no sólo ofrecer protección sino también asegurar que el acceso a esta no esté supeditado a las condiciones socio-económicas vigentes, es que planteamos una novedosa y sencilla estrategia. Para ello, formulamos CpG-ODN y el antígeno modelo Ovoalbúmina (OVA) con Coa-ASC16 y examinamos en ratones la actividad inmunoadyuvante de esta nueva estrategia.

RESULTADOS I

1. Estudio de la actividad adyuvante de CpG-ODN formulado con Coa-ASC16.

Con el fin de evaluar la actividad adyuvante de CpG-ODN formulado con Coa-ASC16, se desarrolló un protocolo de inmunización utilizando OVA (albúmina de huevo de gallina) como antígeno modelo. De esta manera, ratones BALB/c se inmunizaron de forma s.c. en los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN, OVA/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. En el día 21, se sacrifican los animales, se obtiene el plasma y el bazo, con el fin de evaluar los títulos de inmunoglobulinas específicas (respuesta inmune humoral) y la inducción de citoquinas por reestimulación *ex vivo* de los esplenocitos con el antígeno OVA (un parámetro indicativo del desarrollo de una respuesta inmune celular antígeno específica). De esta forma, se observó que aquellos ratones que habían sido inmunizados con la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaban mayores títulos tanto de IgG e IgG1 (asociada con un perfil de respuesta Th2) como de IgG2a (asociada con un perfil de respuesta Th1) específicos respecto a los inmunizados con OVA/CpG-ODN. Además, ratones inmunizados con la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujeron una mayor cantidad de IgG2a que aquellos que se inmunizaron sólo con OVA/Coa-ASC16 (Fig. 1.1 A). Por otro lado, los esplenocitos que provenían de ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujeron una mayor secreción de IFN- γ e IL-17 en respuesta al antígeno, en comparación con aquellos ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/Coa-ASC16 (Fig. 1.1 B). La concentración de IL-4 en todos los grupos en estudio fue menor al límite de detección del ensayo.

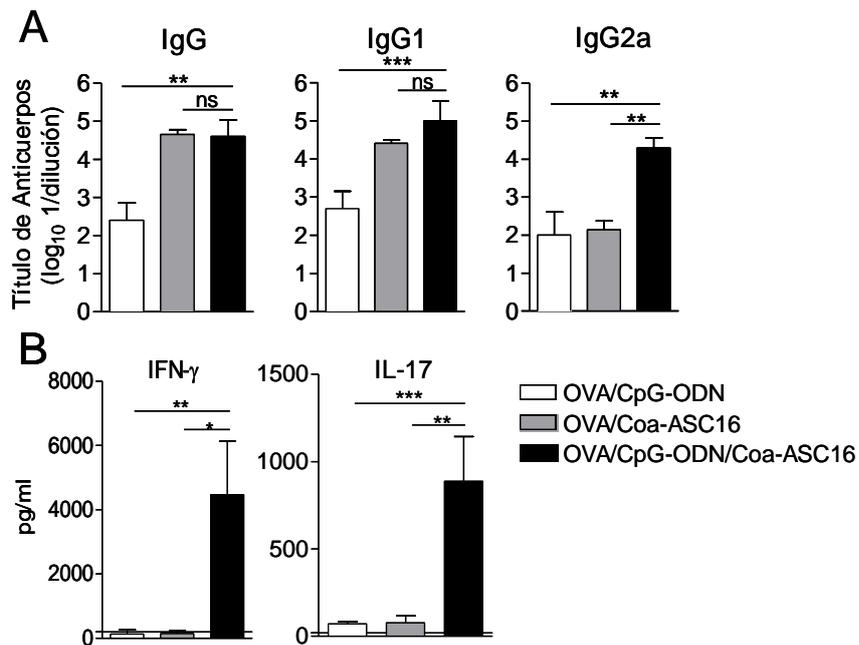


Figura 1.1. **El Coa-ASC16 mejora la actividad adyuvante de CpG-ODN.** Ratones BALB/c fueron inmunizados (s.c.) con OVA/CpG-ODN, OVA/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo. **(A)** Título de IgG, IgG1 y IgG2a específicos para OVA. **(B)** Producción específica de citoquinas proveniente de suspensiones de esplenocitos cultivados con medio u OVA durante 72 horas determinada por ELISA. La concentración de citoquinas producidas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en los pocillos con medio. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de tres/cuatro experimentos independientes. La línea continua representa el límite de detección del ensayo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Se obtuvieron resultados similares en ratones *Tlr4*^{-/-} comparados con su contraparte wild type (wt) cuando se los inmunizó con la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Fig. 1.2 A-C), demostrando que la actividad adyuvante de CpG-ODN/Coa-ASC16 no es debida a contaminantes como la endotoxina bacteriana ni depende de la señalización a través de TLR4.

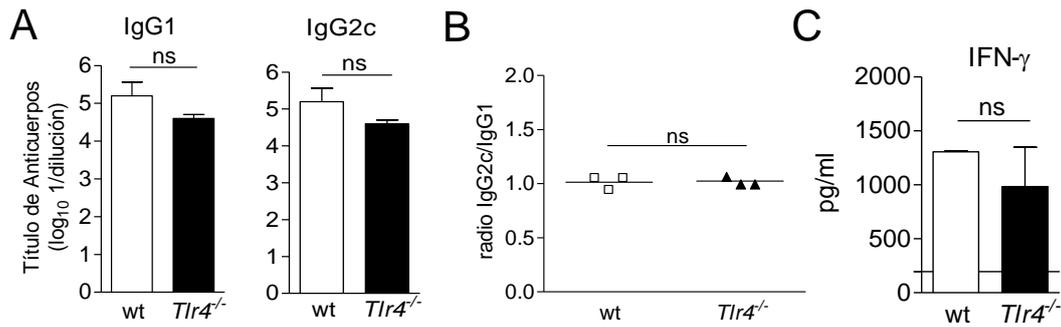


Figura. 1.2. La actividad inmunoestimulante de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es independiente de la señalización a través de TLR4. Ratones C57BL/6 (wt) y *Tlr4*^{-/-} fueron inmunizados (s.c.) con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo. (A) Título de IgG1 y IgG2c específicos para OVA. (B) Relación IgG2c/IgG1. (C) Producción específica de citoquinas proveniente de suspensiones de esplenocitos cultivados con medio u OVA durante 72 horas determinada por ELISA. La concentración de citoquinas producidas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en los pocillos con medio. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de tres/cuatro experimentos independientes. La línea continua representa el límite de detección del ensayo. ns: no significativo.

Por otro lado, para identificar la fuente de IFN-γ en células de bazo, así como para evaluar la calidad de la respuesta de células T, se efectuó una tinción intracelular para IFN-γ de los esplenocitos y un posterior análisis mediante citometría de flujo. Como se observa en la figura 1.3, el bazo de los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 contiene una mayor frecuencia de células T CD8⁺ y CD4⁺ productoras de IFN-γ en respuesta a OVA, en comparación con el bazo de ratones que fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN. Esto indica claramente que el Coa-ASC16 coopera en la inducción de la respuesta de células T.

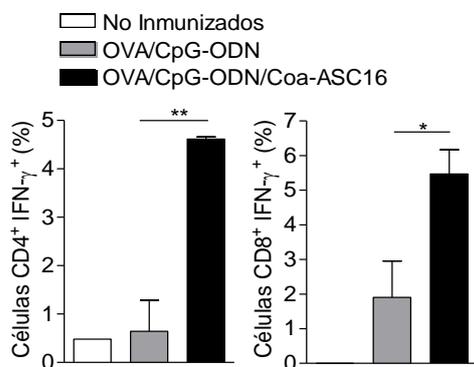


Figura. 1.3. El Coa-ASC16 coopera en la inducción de la respuesta de células T. Ratones BALB/c fueron inmunizados (s.c.) con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. En el día 21 luego de la primera inmunización se extrajo el bazo. Los esplenocitos se reestimularon *ex vivo* con OVA. La frecuencia de células T CD4⁺ IFN-γ⁺ y células T CD8⁺ IFN-γ⁺ fue determinada mediante tinción intracelular y citometría de flujo. Los datos se calcularon basados en el control de isotipo y restando el porcentaje de células T IFN-γ⁺ de los pocillos con medio. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos estudiar si una de las causas de la potenciación de la actividad adyuvante de CpG-ODN inducida por Coa-ASC16, era el aumento en la capacidad de proliferación linfocitaria. De esta manera, realizamos un ensayo de proliferación *in vivo* por dilución de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE). Para ello, se aislaron por selección negativa, linfocitos T CD4⁺ del bazo de ratones transgénicos OT-II utilizando anticuerpos unidos a perlas magnéticas, MACS (de la sigla en inglés, Magnetic-activated cell sorting), con el fin de obtener una población homogénea de linfocitos T CD4⁺ con su TCR específico para el epítopo OVA₃₂₃₋₃₃₉. Una vez purificados, los linfocitos fueron marcados con el colorante intracelular CFSE para poder evaluar la proliferación celular mediante la dilución del mismo. Finalmente, estos fueron inyectados de forma e.v. en animales que al día siguiente fueron inmunizados en ambos lados de la región inguinal con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Al cabo de 3 días se tomaron ganglios inguinales (drenantes) y ganglios mesentéricos (no drenantes, como control), los cuales fueron procesados para su análisis por citometría de flujo.

Como se observa en la figura 1.4 A, B y C, el porcentaje de proliferación en el ganglio inguinal de ambos grupos de ratones es similar. Sin embargo, considerando que el número absoluto de células es significativamente mayor en ganglios drenantes de ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 respecto a los inmunizados con OVA/CpG-ODN (Fig. 1.4 D); analizamos la proliferación específica de linfocitos T CD4⁺ teniendo en cuenta esta diferencia (Fig. 1.4 E). De esta manera podemos concluir que existe una diferencia en el número de linfocitos que proliferan, lo cual podría ser una de las causas del efecto potenciador de Coa-ASC16 sobre la actividad adyuvante de CpG-ODN y que esta tomaría lugar exclusivamente a nivel del ganglio linfático drenante. Este es uno de los resultados que apoya nuestra hipótesis respecto a que la presencia de la nanoestructura direccionaría más específicamente la respuesta hacia los ganglios linfáticos drenantes optimizando el resultado final (Fig. 1.4 C).

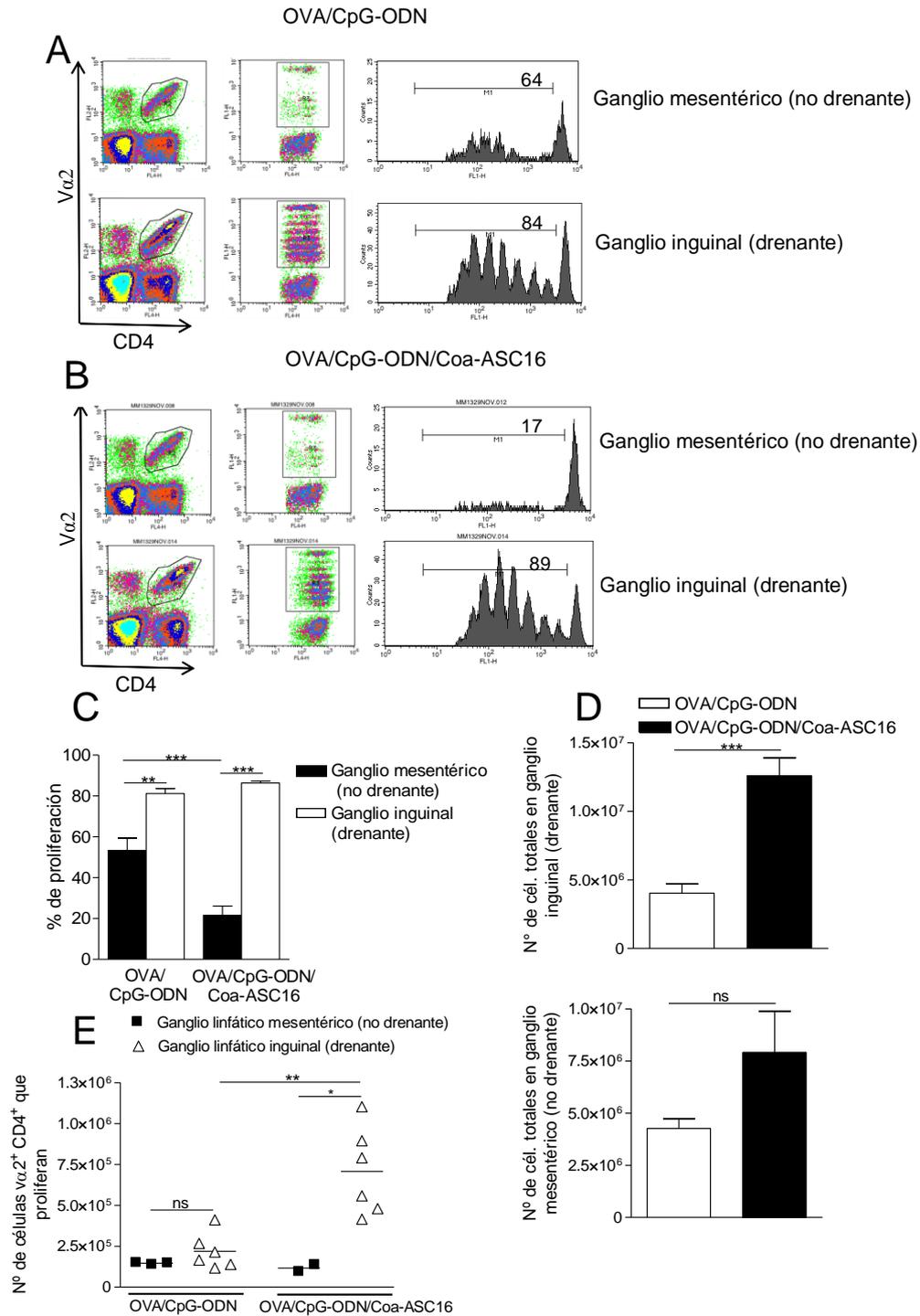


Figura 1.4. El Coa-ASC16 induce una mayor proliferación linfocitaria enmarcada exclusivamente en el ganglio drenante. Ratones C57BL/6 fueron inyectados e.v. con $10 \cdot 10^6$ linfocitos T $CD4^+$ provenientes de ratones OTII marcados con CFSE (día 0). En el día 1, los mismos ratones se inmunizaron con 50 μ l de OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en ambos lados de la región inguinal. En el día 4, se obtuvieron ganglios inguinales (drenantes) y mesentéricos (no drenantes) y se procesaron para su análisis por citometría de flujo. (A y B) Análisis de proliferación *in vivo* (gate en cél $\nu\alpha 2^+ CD4^+$). Los histogramas representan el porcentaje de proliferación en cada uno de los grupos de estudio. En este caso se representa sólo 1 animal de un n=3 por grupo. (C) Porcentaje de proliferación en ganglio inguinal y mesentérico representado en gráfico de barras. (D) Número absoluto de células totales en ganglio inguinal (drenante) y mesentérico (no drenante). (E) Número absoluto de células que proliferan. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones/tratamiento). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo.

2. Estudio de la cinética de liberación de OVA y CpG-ODN formulados con Coa-ASC16.

Debido a que nuestra estrategia adyuvante involucra la formulación de OVA y CpG-ODN con Coa-ASC16 y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se examinó como la nanoestructura podría afectar el perfil de liberación tanto del antígeno como del adyuvante. Esto se realizó a 37°C en una celda de difusión de Franz modificada, la cual cuenta de un compartimento donante y otro receptor ambos separados por un disco sinterizado plano. Desde el compartimento receptor se obtuvieron muestras para la cuantificación de CpG-ODN por HPLC (de la sigla en inglés, high performance liquid chromatography) y de OVA por la técnica de Bradford. Como se observa en la figura 1.5 A, CpG-ODN fue rápidamente liberado (más de un 90% en 15 minutos) desde la solución acuosa. La inclusión de OVA en esta solución no afectó este patrón de liberación (Fig. 1.5 B). Cuando el CpG-ODN se formuló con Coa-ASC16, la cantidad de oligodeoxinucleótido liberada fue aproximadamente un 45% a los 60 minutos (Fig. 1.5 A) y la inclusión de OVA en la formulación prácticamente no afectó la liberación de CpG-ODN, la cual fue en este caso, de un 30% en el mismo periodo de tiempo (Fig. 1.5 B). Por otro lado, la liberación de OVA fue también modificada cuando esta molécula se formuló con Coa-ASC16 (Fig 1.5 C). De esta manera, estos resultados nos permiten afirmar que Coa-ASC16 genera una liberación controlada de CpG-ODN y OVA al menos en ensayos de liberación *in vitro*.

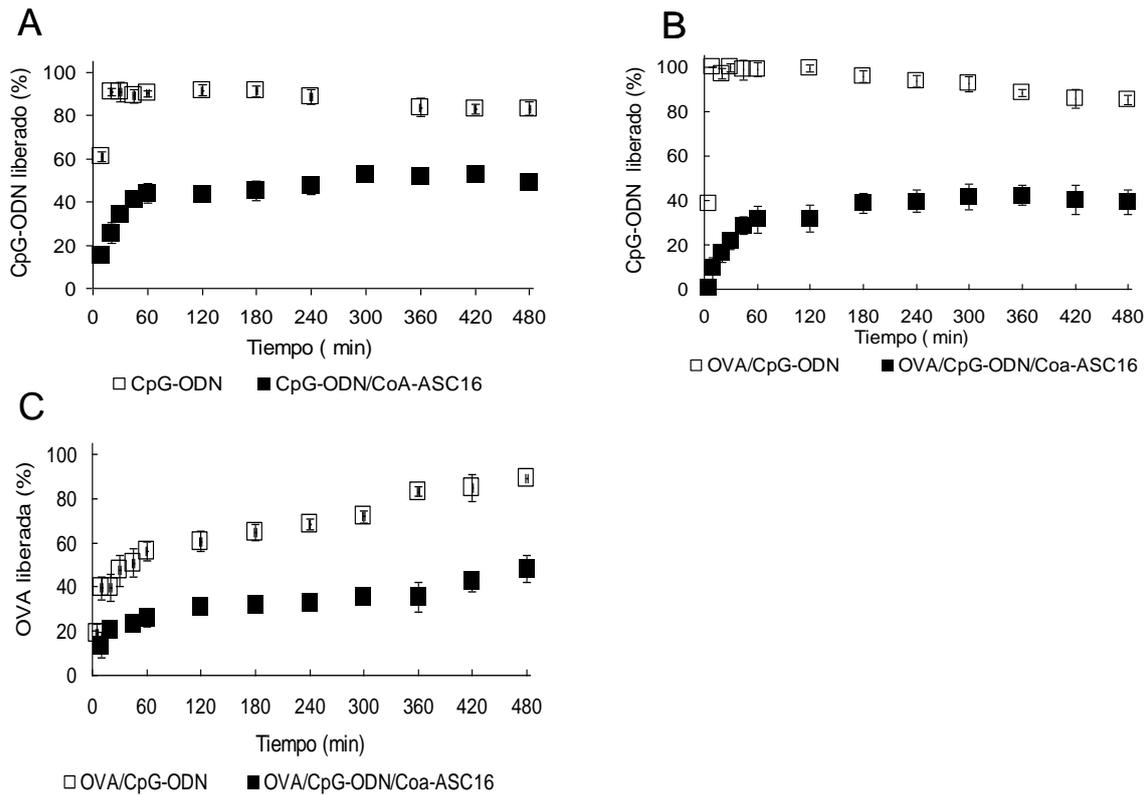


Figura 1.5. **El Coa-ASC16 modifica el perfil de liberación de OVA y CpG-ODN.** (A-C) Perfiles de liberación *in vitro* de OVA y CpG-ODN en el buffer Tris-HCl. El oligodeoxinucleótido utilizado fue CpG-ODN (PS). (A) Se muestra la liberación de CpG-ODN cuando se encuentra en solución y formulado con Coa-ASC16. (B) Se muestra la liberación de CpG-ODN cuando está en solución con el antígeno (OVA/CpG-ODN) versus la formulación completa OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. (C) Se muestra la liberación de OVA desde la solución OVA/CpG-ODN o desde la formulación completa OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales. Cada uno de los puntos se analizó por triplicado y son representativos de tres experimentos independientes.

3. Evaluación de la protección ejercida por Coa-ASC16 sobre CpG-ODN frente a la degradación por nucleasas.

Teniendo en cuenta que CpG-ODN es un oligodeoxinucleótido y como tal es susceptible a la degradación por nucleasas, se realizó una modificación en sus enlaces fosfodiésteres naturales por enlaces fosforotioato (Fig. 4 Introducción). Si bien esta estrategia indujo gran resistencia a este tipo de degradación enzimática, también trajo aparejado otros efectos secundarios independientes de la secuencia CpG (76). A pesar de que el oligodeoxinucleótido que se utiliza actualmente en la mayoría de los ensayos clínicos es el CpG-ODN (PS) y que por lo tanto es el que utilizamos en este trabajo de tesis; teniendo como objetivo científico mejorar la calidad de las futuras vacunas, es que decidimos evaluar si Coa-ASC16 protege a CpG-ODN de la degradación enzimática. Para observar mejor el fenómeno, en

estos ensayos se utilizó CpG-ODN (PO) como control positivo. De esta manera, soluciones de CpG-ODN (PS) o CpG-ODN (PO) y las formulaciones CpG-ODN (PS)/Coa-ASC16 o CpG-ODN (PO)/Coa-ASC16 se expusieron a una solución de la enzima 3'-exonucleasa a 37°C. Luego de diferentes periodos de tiempo, la reacción se frenó mediante el calentamiento a 80°C durante 15 minutos y en estas muestras, se determinó la cantidad de CpG-ODN mediante HPLC. Como se muestra en la figura 1.6 A, el porcentaje de oligodeoxinucleótido remanente luego de 0,8 horas del tratamiento con la enzima fue mayor para CpG-ODN (PO)/Coa-ASC16 que para CpG-ODN (PO) en solución, demostrando que el Coa-ASC16 protege al oligodeoxinucleótido de la 3'-exonucleasa. Por otro lado, no se observó lo mismo para CpG-ODN (PS) debido a que este es muy resistente a la degradación enzimática, manteniéndose prácticamente intacto incluso luego de 28/30 horas del tratamiento (Fig. 1.6 B). Si bien se conoce que la vía de metabolización final del oligodeoxinucleótido modificado es por exonucleasas (76), esto ocurre luego de un tiempo mucho más prolongado que el empleado en estos ensayos.

De esta manera podemos sugerir que si bien este es un ensayo *in vitro*, estos resultados denotan que existe la posibilidad de, mediante esta estrategia, utilizar en un futuro la forma nativa CpG-ODN (PO) como adyuvante, lo cual a su vez, nos permitiría evitar los efectos secundarios negativos de CpG-ODN (PS).

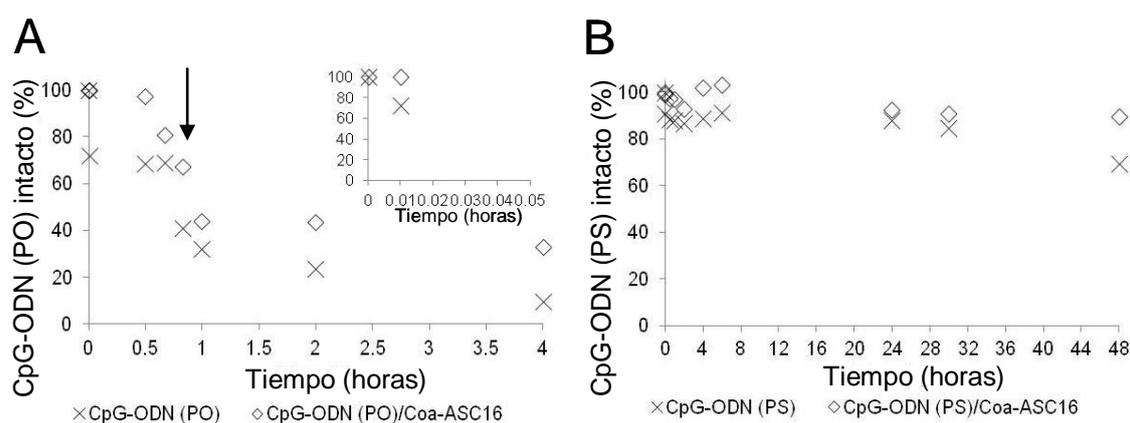


Figura 1.6. **Coa-ASC16 protege a CpG-ODN (PO) de la degradación por nucleasas. (A-B)** Ensayo de degradación por nucleasas. Los oligodeoxinucleótidos utilizados fueron CpG-ODN (PO) y CpG-ODN (PS) en solución (X) o formulado en Coa-ASC16 (◊). Porcentaje del oligodeoxinucleótido intacto luego de el tratamiento con la enzima 3'-exonucleasa. La flecha indica 0,8 horas. El porcentaje esta basado teniendo en cuenta la cantidad total de oligodeoxinucleótido en la reacción, determinada por HPLC. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

4. La formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 como adyuvante ideal.

4.1. Evaluación de la respuesta inmune de memoria

Como describimos inicialmente, una característica importante de una vacuna es la capacidad de generar una respuesta inmune protectora que se mantenga a lo largo del tiempo. De esta manera, con el fin de estudiar la persistencia de la respuesta inmune inducida por la estrategia adyuvante propuesta en este trabajo de tesis, ratones BALB/c recibieron tres inmunizaciones de forma s.c. en los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y fueron desafiados con OVA de forma intraperitoneal (i.p) al día 190 luego de la primera inmunización (lo que simula un segundo encuentro con el antígeno). A diferentes tiempos durante el ensayo, se obtuvieron muestras de plasma y al día 197 (una semana posterior al reestímulo) se obtuvo el bazo de los ratones inmunizados. Como se puede observar en la figura 1.7 A, ambos grupos experimentales fueron capaces de sostener durante al menos 6,5 meses una respuesta inmune humoral específica contra OVA. Durante todo el ensayo, previo al desafío con el antígeno, los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron mayores títulos de IgG, IgG1 e IgG2a respecto a los que habían sido inmunizados con OVA/CpG-ODN (Fig. 1.7 A). Una semana después del desafío con el antígeno (día 197), el título en plasma de IgG, IgG1 e IgG2a específicas contra OVA fueron similares en ambos grupos de estudio (Fig. 1.7 A). Además, no hubo diferencias en la relación IgG2a/IgG1 durante todo el ensayo (Fig. 1.7 B), lo que indica que la formulación con Coa-ASC16 modifica de forma cuantitativa pero no de forma cualitativa la respuesta inmune humoral específica. Por otro lado, los esplenocitos reestimulados *ex vivo*, provenientes de ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 produjeron mayores cantidades de IFN- γ e IL-17 específicas para OVA que aquellos ratones que habían sido inmunizados con OVA/CpG-ODN. No hubo diferencias respecto a la producción de IL-4 entre ambos grupos experimentales (Fig. 1.7 C). Estos datos indican que la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 facilita la generación de una respuesta inmune específica de memoria (principalmente de tipo celular) más robusta que el oligodeoxinucleótido soluble.

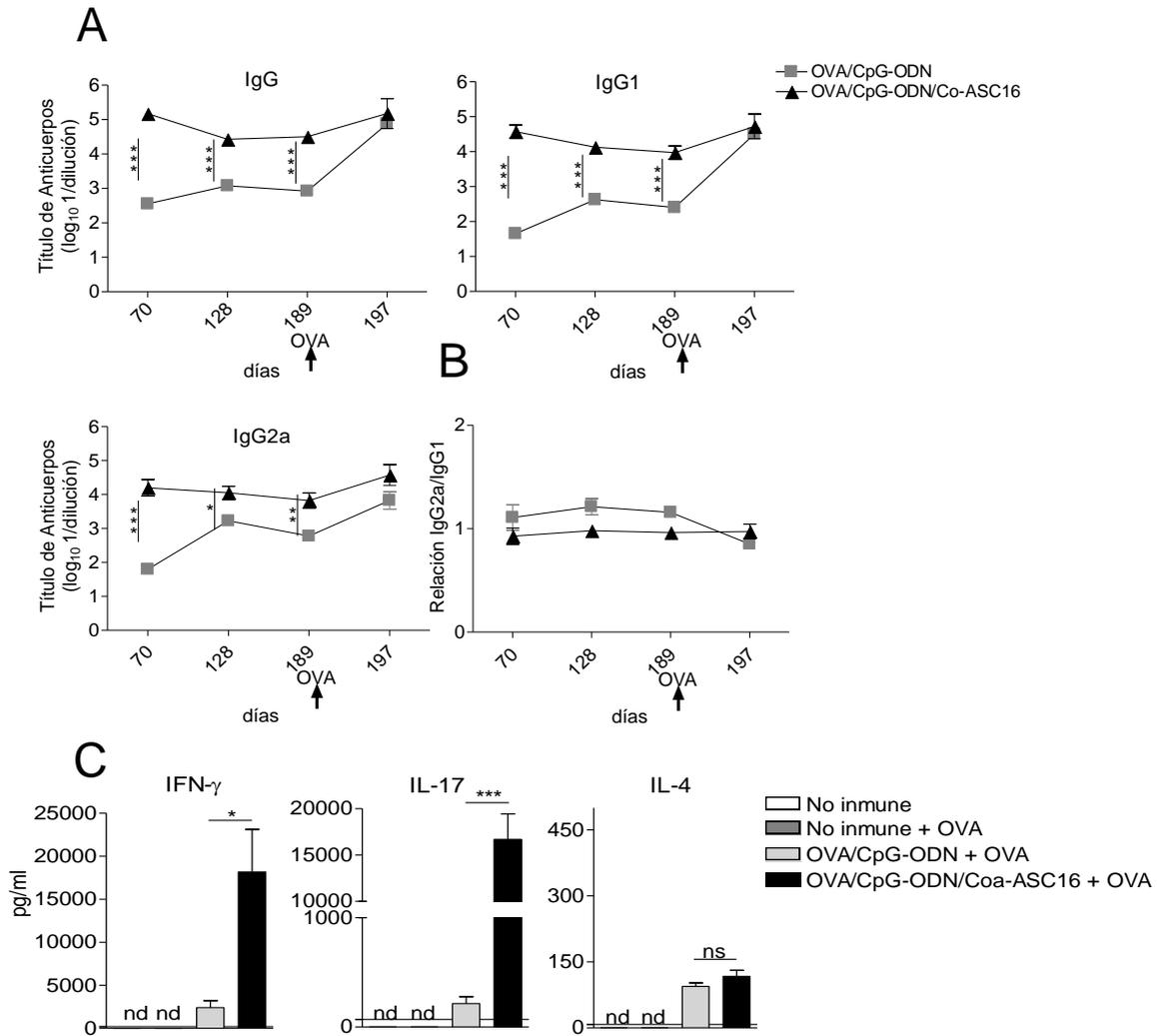


Figura. 1.7. **La potenciación de la respuesta inmune inducida por Coa-ASC16 se mantiene a lo largo del tiempo.** Ratones BALB/c fueron inmunizados de forma s.c. con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. Al día 190 luego de la primera inmunización, los ratones fueron desafiados en forma i.p con OVA. Las muestras de plasma fueron obtenidas a diferentes tiempos durante el ensayo y los bazos se obtuvieron en el día 197. **(A)** Producción de anticuerpos específicos contra OVA en función del tiempo. Los títulos de IgG, IgG1, IgG2a fueron determinados en los días 70, 128, 189 y 197 luego de la primera inmunización. **(B)** Relación IgG2a/IgG1. **(C)** Producción de citoquinas específicas contra OVA provenientes de cultivos de suspensiones de esplenocitos con medio u OVA (100 µg/ml, 1x10⁶/pocillo) durante 72 horas determinadas por ELISA. Los niveles de citoquinas en respuesta a OVA fueron calculados mediante la sustracción de la concentración de las mismas en pocillos con medio. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y representativos de dos experimentos independientes. La línea completa representa el límite de detección del ensayo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; nd: no detectado, ns: no significativo.

4.2. Comparación entre la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 y la previamente conocida CpG-ODN/Al(OH)₃

Para poder evaluar objetivamente la eficiencia de CpG-ODN/Coa-ASC16 como adyuvante, se lo comparó respecto a la formulación CpG-ODN/Al(OH)₃, este último representa un adyuvante muy conocido y el primero en ser licenciado para su uso en humanos (6). Además la formulación CpG-ODN/Al(OH)₃ representa un ensayo clínico (recombinante del antígeno de superficie de la Hepatitis B (rHBsAg) adsorbido en aluminio + CpG-ODN) que ha completado la fase Ib (8). Para ello, se desarrolló un protocolo de inmunización donde ratones BALB/c fueron inmunizados en los días 0, 7 y 14 con OVA/Al(OH)₃, OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃ u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. En el día 21 se obtuvo el plasma y el bazo de los ratones inmunizados, con el fin de determinar la respuesta inmune humoral y celular específica. Como se muestra en la figura 1.8 A, la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujo mayores títulos tanto de IgG1 como de IgG2a específicas para OVA respecto a OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃. De forma similar, la secreción de IFN- γ y de IL-17 por los esplenocitos de los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 fue significativamente mayor respecto a los inmunizados con OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃. La secreción de IL-4 sólo se observó en el bazo de ratones inmunizados con OVA/Al(OH)₃ (Fig. 1.8 B). De esta manera podemos concluir que la vacuna con la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es significativamente más eficiente que aquella que posee la formulación CpG-ODN/Al(OH)₃ para inducir una respuesta inmune humoral como celular (Th1 y Th17) específica.

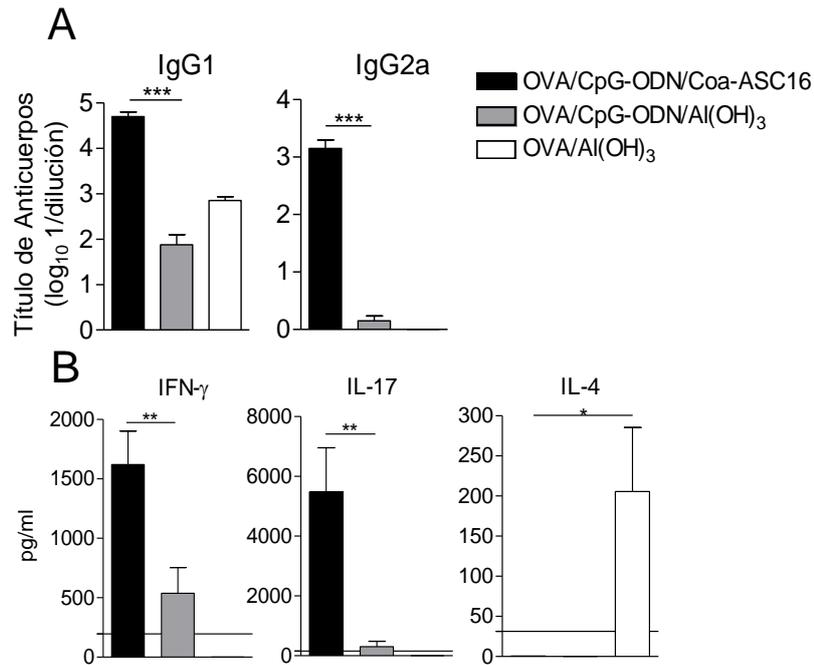


Figura. 1.8. La formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es más eficiente que la formulación CpG-ODN/Al(OH)₃. Ratones BALB/c fueron inmunizados (s.c.) con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16, OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃ u OVA/Al(OH)₃ en los días 0, 7 y 14. En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo de estos ratones. **(A)** Título de IgG, IgG1 e IgG2a específicos para OVA. **(B)** Producción específica de citoquinas proveniente de suspensiones de esplenocitos cultivados con medio u OVA durante 72 horas determinada por ELISA. La concentración de citoquinas producidas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en los pocillos con medio. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. La línea continua representa el límite de detección del ensayo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.3. Evaluación de la eficacia adyuvante de la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 utilizando diferentes esquemas de inmunización

Lo ideal en el área de vacunas es brindar la respuesta deseada con la menor dosis vacunal posible para incrementar el rendimiento de la misma minimizando los costos y los posibles efectos tóxicos. Teniendo esto en cuenta, se evaluó la potencia de CpG-ODN/Coa-ASC16 como adyuvante, utilizando esquemas de inmunización más cortos. De esta manera, ratones BALB/c se inmunizaron de forma s.c. con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0 y 7. En el día 13 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma de los animales para la determinación de inmunoglobulinas específicas contra OVA. El grupo que había sido inmunizado con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujo mayores títulos de IgM, IgG, IgG1 e IgG2a específicos contra OVA respecto a aquellos que habían sido inmunizados con OVA/CpG-ODN (Fig. 1.9 A). Estos resultados demuestran claramente que Coa-ASC16 permite una rápida seroconversión.

Luego se evaluó la eficacia de la estrategia utilizando dos protocolos de inmunización diferentes. De esta manera, los ratones recibieron dos (día 0 y 7) o tres (día 0, 7 y 14) inmunizaciones de forma s.c. con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y la respuesta inmune específica contra OVA se evaluó en el día 21 luego de la primera administración. Como se muestra en la figura 1.9 B, los títulos de IgG1 e IgG2a fueron, en todo momento, significativamente mayor en ratones que habían sido inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 respecto a OVA/CpG-ODN. Sin embargo, había una diferencia en los títulos de IgG2a de ratones que habían recibido la formulación completa cuando se optaba por el esquema de dos administraciones en vez de tres. Además, el esquema más largo de inmunización indujo mayores cantidades de IFN- γ específico contra el antígeno sin observar diferencias en la inducción de IL-17 (Fig. 1.9 C).

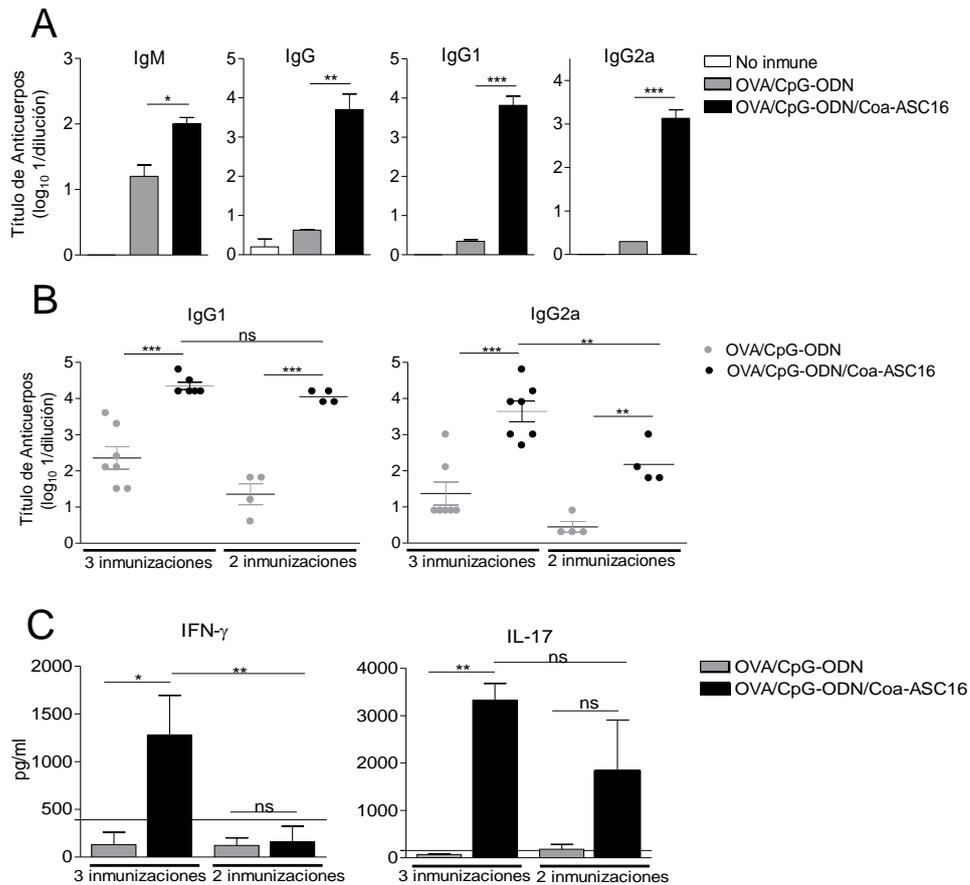


Figura. 1.9. **El Coa-ASC16 permite una rápida seroconversión.** Ratones BALB/c fueron inmunizados de forma s.c. dos (día 0 y 7) o tres (día 0, 7 y 14) veces con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. **(A y B)** Títulos de IgM, IgG, IgG1 y IgG2a específicos contra OVA determinados en el día 13 (A) o a día 21 (B) luego de la primera inmunización. **(C)** Los bazo fueron obtenidos en el día 21 luego de la primera inmunización y se determinó en cultivos de esplenocitos con medio u OVA durante 72 horas la producción de citoquinas específicas mediante la técnica de ELISA. La producción de citoquinas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en pocillos con medio. En B, cada símbolo representa un animal individual y la media de los valores está representada mediante una línea horizontal. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos/tres experimentos independientes. La línea completa representa el límite de detección del ensayo *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Finalmente, ya que el Coa-ASC16 potencia la actividad adyuvante de CpG-ODN, se evaluó la utilización de una dosis menor del oligodeoxinucleótido para inducir una respuesta inmune específica contra OVA. De esta manera, ratones BALB/c fueron inmunizados de forma s.c. en el día 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN (75 μ g/ratón)/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN (30 μ g/ratón)/Coa-ASC16. La respuesta inmune humoral y celular específica fue evaluada en el día 21 luego de la primera inmunización. Ambas dosis de CpG-ODN (75 ó 30 μ g) formulado en Coa-ASC16 indujeron cantidades equivalentes tanto de IgG1 e IgG2a como de IFN- γ e IL-17 (Fig.

1.10 A y B). Además la relación IgG2a/IgG1 no demostró diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Fig. 1.10 C).

En conjunto, todos estos resultados aportan aún más evidencia, de que el Coa-ASC16 incrementa la actividad adyuvante de CpG-ODN.

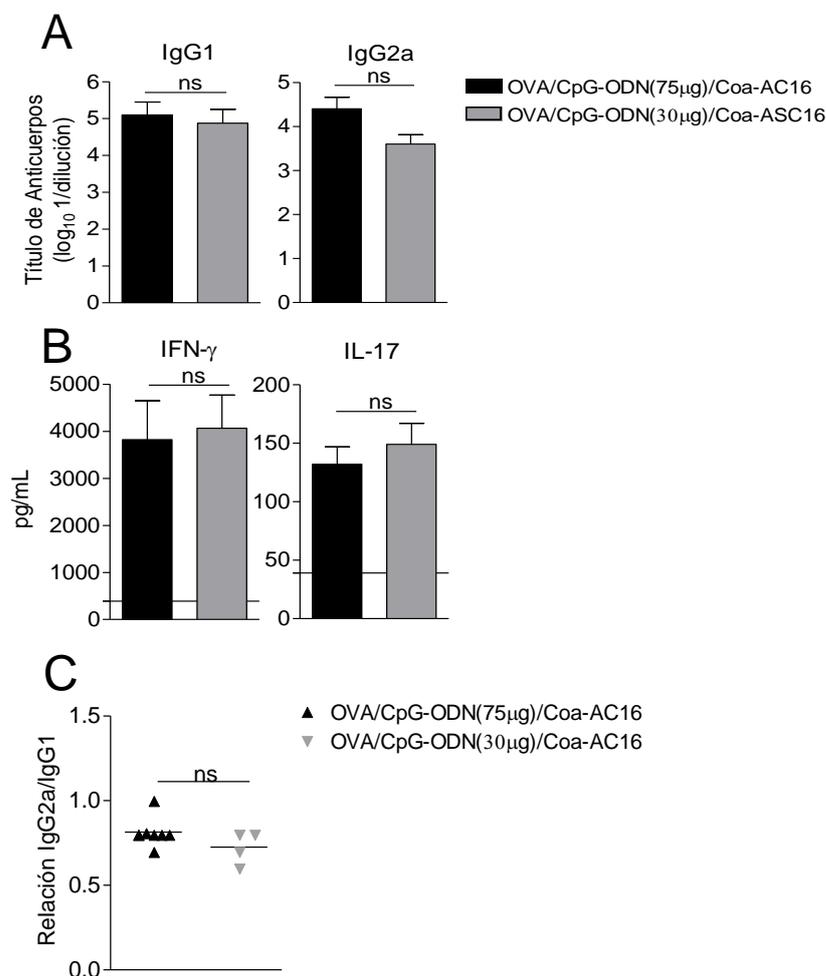


Figura. 1.10. **El Coa-ASC16 permite reducir la dosis de CpG-ODN.** Ratones BALB/c fueron inmunizados de forma s.c. con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14 utilizando 75 ó 30 µg/ratón de CpG-ODN (PS). **(A)** Títulos de IgG1 e IgG2a específicos contra OVA determinados en el día 21 luego de la primera inmunización. **(B)** Los bazo fueron obtenidos en el día 21 luego de la primera inmunización y se determinó en cultivos de esplenocitos con medio u OVA durante 72 horas la producción de citoquinas específicas mediante la técnica de ELISA. La producción de citoquinas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en pocillos con medio. **(C)** Relación IgG2a/IgG1, cada símbolo representa un animal individual y la media de los valores está representada mediante una línea horizontal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos/tres experimentos independientes. La línea completa representa el límite de detección del ensayo, ns: no significativo.

4.4. Estudios de toxicidad

Teniendo en cuenta que uno de los parámetros principales en el diseño de una vacuna es la seguridad, es por esto que decidimos abarcar el estudio de los posibles efectos tóxicos que puede generar esta nueva estrategia inmunoadyuvante. Nuestro grupo demostró previamente que la inmunización con OVA/CpG-ODN no generaba signos de toxicidad en ratones (63). Por otro lado, el ASC16 forma parte de las sustancias GRAS, por lo tanto es un compuesto no tóxico cuando se utiliza como antioxidante en formulaciones farmacéuticas orales y productos alimenticios (81). Sin embargo, no podemos asumir que esto es también cierto para su derivado Coa-ASC16. De esta manera, se evaluaron los posibles efectos adversos de la vacunación con CpG-ODN formulado en Coa-ASC16 a través de análisis bioquímicos e histológicos.

De esta manera, luego de la inmunización s.c. con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14, se evaluó tanto el perfil enzimático y niveles de creatinina en plasma como la histología de hígado, riñón, pulmón y bazo en muestras obtenidas al día 21 (protocolo de tiempo corto) y a los 6,5 meses (protocolo de tiempo largo) luego de la primera inmunización. Todos los animales sobrevivieron a los esquemas de vacunación completos (tanto 21 días como 6,5 meses) y no se observó evidencia macroscópica de daño ni diferencias histopatológicas entre los órganos en estudio de ratones que recibieron los diferentes tratamientos (Fig. 1.11 A). En los días 21 y 197 luego de la primera inmunización las concentraciones plasmáticas de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatinina estaban dentro de los rango normales en animales inmunizados tanto con OVA/CpG-ODN como con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16, teniendo como parámetro normal los ratones no vacunados (Fig 1.11 B y C). Todos estos resultados sugieren que la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es capaz de inducir una potente respuesta inmune específica sin inducir efectos biológicos adversos.

A

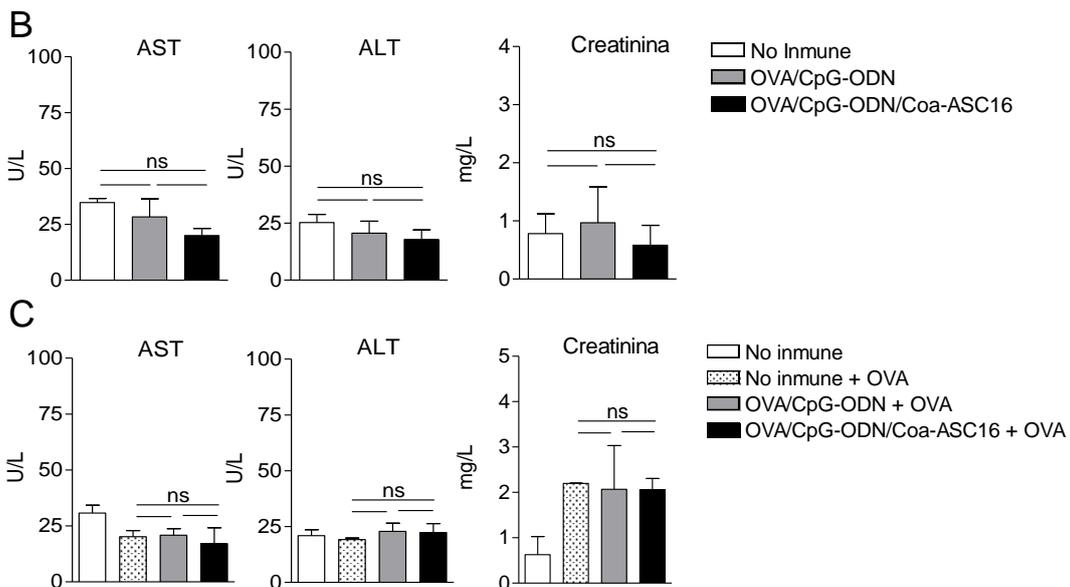
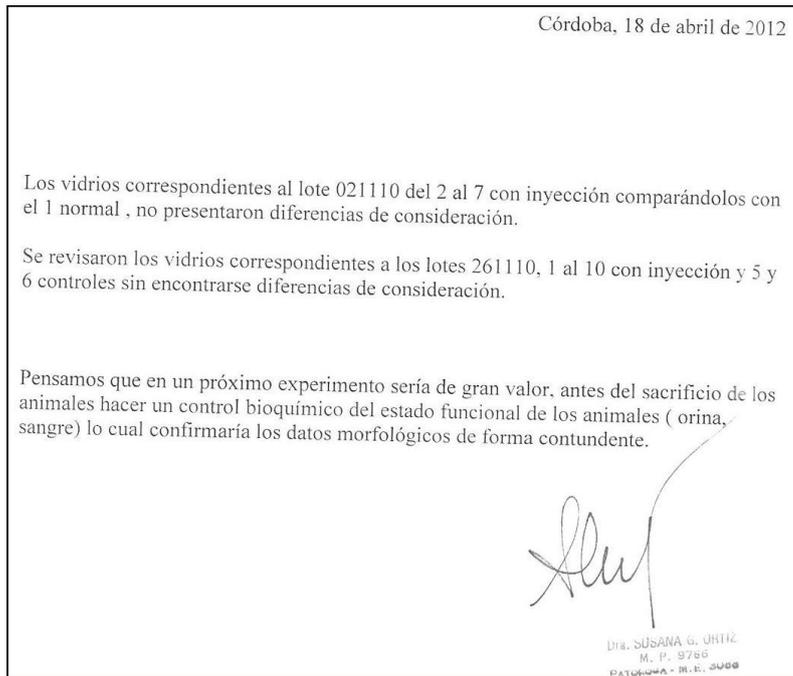


Figura. 1.11. **El Coa-ASC16 no induce efectos tóxicos.** Ratones BALB/c fueron inmunizados de forma s.c. en los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. En los días 21 o 197 luego de la primera inmunización, se obtuvieron muestras de plasma e hígado, riñón, bazo y pulmón. **(A)** Informe del análisis histológico de los órganos en cuestión. **(B)** Concentración plasmática de ALT, AST y creatinina fueron determinadas en el día 21 luego de la primera inmunización (control: no inmune). **(C)** Al día 190 luego de la primera inmunización los ratones se desafiaron en forma i.p. con OVA para evaluar la respuesta inmune de memoria y por lo tanto en paralelo un estudio de toxicidad de tiempo más prolongado fue desarrollado en estos ratones. Las concentraciones plasmáticas de ALT, AST y creatinina fueron determinadas en el día 197 post primera inmunización. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos/tres experimentos independientes ns: no significativo.

5. Estudios del sitio de la inyección.

Nuestros resultados muestran que la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es un potente adyuvante para la inducción de respuestas inmunes de perfil Th1 y Th17. Para comenzar a dilucidar los mecanismos involucrados en la potenciación de la respuesta inmune específica, se evaluó si el sistema inmune es capaz de reconocer el Coa-ASC16 a nivel del sitio de la inyección.

De esta manera, se inyectó en forma s.c. OVA, Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16 y 43 horas después se obtuvo el plasma y el sitio de la inyección (piel y tejido celular subcutáneo). El análisis histológico del sitio de la inyección de ratones inyectados con OVA mostró un infiltrado celular escaso (Fig. 1.12 A y B). De forma contraria, el sitio de la inyección obtenido de animales inyectados con Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16 mostró un infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares neutrófilos tanto en dermis como en tejido subcutáneo (Fig. 1.12 A y B). La figura 1.12 C representa una vista macroscópica del sitio de la inyección de ratones a los cuales se les administró Coa-ASC16.

Con el fin de independizar los efectos locales de posibles efectos sistémicos inducidos por Coa-ASC16, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de citoquinas pro-inflamatorias a las 43 horas de haber realizado la inyección. En ninguno de los grupos de estudio se detectó IL-6 o TNF, indicando que en este periodo de tiempo, la actividad inflamatoria del Coa-ASC16 no se extendía más allá del sitio de inyección. Además, la concentración plasmática de enzimas indicadoras de daño hepático (ALT y AST) fue similar en todos los grupos de estudio (datos no mostrados), lo cual también contribuye a la evidencia de que el Coa-ASC16 no posee efectos sistémicos severos.

Los ratones inyectados con OVA/CpG-ODN presentaron un leve infiltrado celular en el sitio de la inyección principalmente compuesto por células mononucleares (Fig. 1.12 A). Estos hallazgos concuerdan con otros previamente reportados (16, 118). En contraste, los ratones inyectados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Co-formulación) presentaron un mayor infiltrado celular respecto al grupo descrito anteriormente a expensas de un incremento del número de polimorfonucleares neutrófilos (Fig. 1.12 A OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Co-formulación) vs OVA/CpG-ODN). Estos datos indican claramente que la

composición celular a nivel del sitio de la inyección es principalmente definida por la presencia de Coa-ASC16 en vez de CpG-ODN.

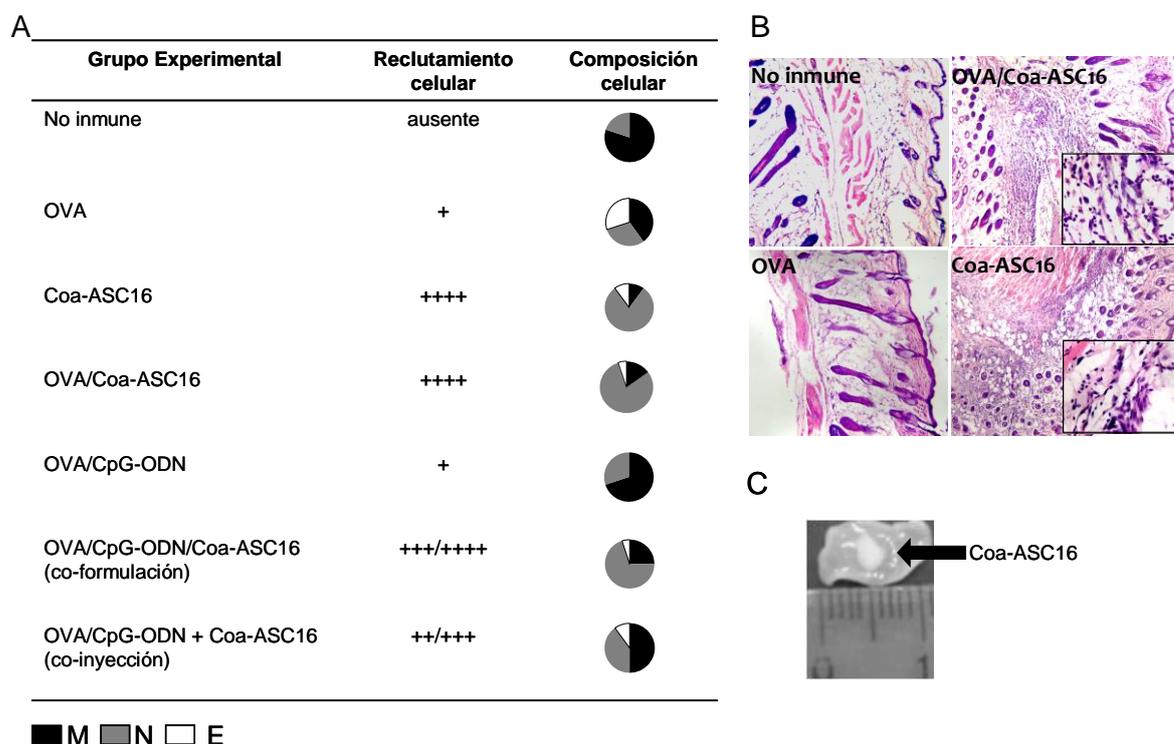


Figura. 1.12. El Coa-ASC16 induce una respuesta inflamatoria a nivel del sitio de la inyección. Ratones BALB/c fueron afeitados 7 días previos al comienzo del experimento. Al día 7, cada animal fue inyectado en cinco sitios (base de la cola, lomo, nuca y a ambos lados de la región inguinal) de forma s.c. con OVA, Coa-ASC16, OVA/Coa-ASC16, OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16. Se utilizó CpG-ODN (PS) a una dosis de 75 μ g/ratón. A las 43 horas luego de la inyección se tomaron las muestras del sitio de la inyección y fueron procesadas para su análisis histológico. **(A)** Evaluación semicuantitativa y recuento diferencial del infiltrado celular en el sitio de la inyección previamente teñido con hematoxilina/eosina. Se define al infiltrado como “ausente” para el caso de ratones no inmunes (normales) que sólo presentan la población celular residente de piel, (+) “escaso”, (++) “moderado”, (+++) “abundante” y (++++) “muy abundante”. M: células mononucleares, N: neutrófilos, E: eosinófilos. **(B)** Microfotografía representativa del sitio de inyección (Aumento de las imágenes: 40x y 400x). **(C)** Visión macroscópica del sitio de inyección de ratones inyectados con Coa-ASC16. La flecha indica la presencia de Coa-ASC16. 3-4 ratones/tratamiento en cada experimento. Los resultados provienen de dos experimentos independientes.

6. Comparación entre dos regímenes de inmunización: Co-inyección versus Co-formulación.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se hipotetizó de que la acción potenciadora de Coa-ASC16 sobre la actividad adyuvante de CpG-ODN podría reflejar la activación de procesos biológicos complementarios, ya que ambas moléculas han demostrado que poseen actividad inflamatoria por sí mismas. Por otro lado, este efecto también podría depender de la estrategia de formulación. Por lo cual, que se realizó un análisis comparativo de la respuesta

inmune específica inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Co-formulación) versus la inmunización con OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (Co-inyección). En este último grupo, el Coa-ASC16 fue administrado en el mismo sitio de inyección de OVA/CpG-ODN, incluso con la misma aguja, la cual no fue removida entre ambas inyecciones sucesivas. La administración de OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (régimen de Co-inyección) indujo una respuesta inmune específica tanto humoral como celular similar a la inducida con la administración de OVA/CpG-ODN, por lo tanto, bajo estas condiciones, Coa-ASC16 es incapaz de potenciar el efecto inmunoadyuvante de CpG-ODN (Fig. 1.13 A y B). Además, el sitio de la inyección de animales inyectados con el régimen de co-inyección mostró diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en infiltrados celulares locales respecto a aquellos que recibieron el régimen de Co-formulación. Los ratones inyectados con OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 mostraron un patrón mixto similar al que presentaban aquellos que habían sido inyectados con CpG-ODN o Coa-ASC16 de forma individual (Fig 1.12 A).

Estos resultados indican que se necesita de la formulación completa para potenciar la actividad inmunoadyuvante de CpG-ODN y que el Coa-ASC16 parece no tener este efecto cuando se administra de forma separada al oligodeoxinucleótido.

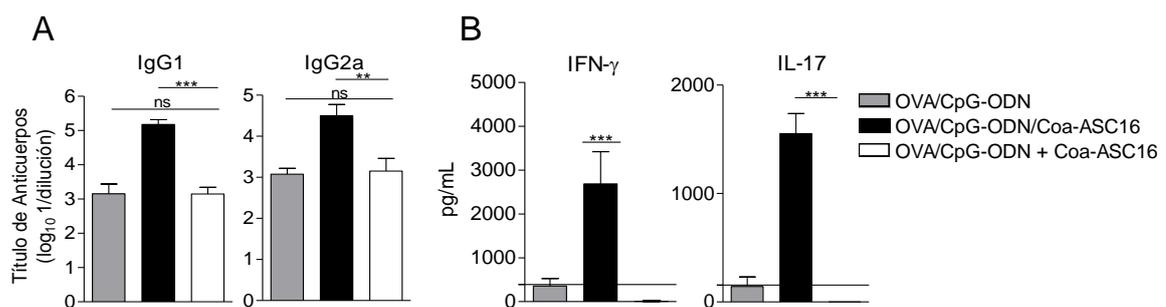


Figura. 1.13. **Se necesita de la formulación para potenciar el efecto adyuvante de CpG-ODN.** Ratones BALB/c fueron inmunizados en forma s.c. en los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Co-formulación) u OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (Co-inyección). En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo. **(A)** Título de IgG1 e IgG2a específicos contra OVA. **(B)** Producción específica de citoquinas proveniente de cultivos de esplenocitos con medio u OVA durante 72 horas determinada por ELISA. La producción de citoquinas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en pocillos con medio. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3-4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. La línea completa indica el límite de detección del ensayo. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

7. Conclusiones capítulo I

En este primer capítulo se demostró que la formulación del adyuvante CpG-ODN con Coa-ASC16 lleva a una potenciación de la respuesta inmune específica tanto humoral como celular frente a un antígeno proteico modelo, la cual incluso se mantiene por un largo periodo de tiempo. Además, la nanoestructura no es inerte ya que posee la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria local.

En base a estos resultados surge la necesidad de dilucidar los mecanismos de acción de Coa-ASC16. La inducción de un ambiente apropiado de células de la inmunidad innata/citoquinas y el efecto “depot” en el sitio de la inyección, creemos que son elementos claves y responsables de este efecto inmunopotenciador. La modificación en las cinéticas de liberación tanto del antígeno como del oligodeoxinucleótido son coincidentes con el hecho de que es necesaria la formulación completa (OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16) para mejorar la actividad adyuvante de CpG-ODN, en esto se sustenta nuestra hipótesis de efecto “depot”.

En esta primera parte del trabajo se ha logrado demostrar el potencial adyuvante de combinar una nanoestructura con un agonista de TLR9, promoviendo este sistema, un perfil de respuesta Th1 y Th17. Por lo tanto, consideramos que esta estrategia es ideal a la hora de utilizar la amplia variedad de antígenos emergentes débilmente inmunogénicos, lo cual es de suma importancia en el diseño de futuras vacunas más efectivas.

Capítulo II

“Coa-ASC16: un nuevo compuesto adyuvante que requiere la proteína adaptadora MyD88”.

El desarrollo de la nueva generación de vacunas exige, cada vez en mayor medida, la identificación de antígenos inmunoprotectores y, en la mayoría de los casos, particularmente para vacunas donde la respuesta de células T es crítica, la administración de estos antígenos con adyuvantes.

La identificación y caracterización de las moléculas adyuvantes, y el progreso en el entendimiento acerca de la importancia de formular estas moléculas, han permitido tanto el diseño de respuestas inmunes efectivas y seguras, como la disminución en la dosis de antígeno administrada lo que conlleva a la economización y permite la extensión de su uso.

Como se describió anteriormente, se han propuestos diversos mecanismos a través de los cuales los adyuvantes pueden alcanzar estos efectos en donde se incluye: la generación de un efecto “depot”, el reclutamiento de células de la inmunidad innata en el sitio de inyección, el aumento en la presentación antigénica en las CPA, la activación y maduración de las CPA, la inducción de citoquinas apropiadas que permiten direccionar la respuesta inmune, entre otros. El sistema inmune reconoce PAMPs mediante los PRRs, lo cuales incluyen a los TLRs, NLRs, RLRs, CLR y sensores de dhADN. La primera generación de vacunas consiste en virus o bacterias inactivados o atenuados, por lo que poseen actividad adyuvante inherente ya que contienen moléculas que representan ligandos de estos receptores (Fig. 2.1). Por ejemplo, debido a que las paredes bacterianas, el ADN bacteriano y el ARN viral activan distintos PRRs expresados en las CPA, los ligandos de PRRs han sido utilizados involuntariamente en vacunas durante décadas.

Durante los últimos 20 años, el progreso en el entendimiento sobre la naturaleza celular y molecular de la inmunidad innata y de las señales que desencadenan determinadas respuestas mediadas por las CPA, han permitido la identificación de nuevos adyuvantes. Para la nueva generación de vacunas, la adición de adyuvantes bien caracterizados ha sido y será completamente necesario.



Figura 2.1. **Desarrollo de vacunas y las implicancias de los TLRs.** LPS: lipopolisacárido bacteriano, shARN: ácido ribonucleico de simple hebra.

Respuesta inmune innata

Frente al ingreso de un agente invasor, el sistema inmune genera una reacción rápida (en cuestión de minutos) que se denomina ***inmunidad innata***. De esta manera la respuesta inmune innata constituye la primer línea de defensa para contener el agente extraño. Sus mecanismos efectores incluyen la activación de CPA como macrófagos y/o CD y la liberación de citoquinas que modulan el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa específica (119). La inmunidad adaptativa, utiliza la selección y expansión clonal de células inmunes que poseen la capacidad de generar rearrreglos en sus receptores (células T y B) reconociendo antígenos provenientes de un determinado patógeno y por lo tanto provee de una protección específica y de larga duración (memoria inmunológica) (120).

La mayoría de los PAMPs reconocidos por los PRRs son comunes a una amplia clase de microorganismos y representan moléculas que no se encuentran en el huésped. Sin embargo, una clara excepción a esta generalización es el reconocimiento de ácidos nucleicos. Debido a que estas macromoléculas son comunes entre el huésped y el posible patógeno, sus receptores tienen el potencial de responder a ligandos propios. Evidencias recientes indican que los

PRRs son también responsables del reconocimiento de moléculas endógenas liberadas por células dañadas, lo que se conoce como DAMPs (31). Los PRRs se expresan de forma diferencial en una amplia variedad de células inmunes, incluyendo, neutrófilos, macrófagos, CD, células NK, células B y algunas otras células que no forman parte del sistema inmune como las células epiteliales. El reconocimiento de los ligandos específicos por parte de los PRRs lleva a la activación celular y, consecuentemente, a la liberación de citoquinas y quimioquinas, así como, a la maduración y migración de otras poblaciones celulares. En conjunto, estos eventos promueven un microambiente inflamatorio que permite el desarrollo posterior de la respuesta inmune adaptativa específica (46).

PRRs.

Los miembros de la familia de TLRs tienen la capacidad de reconocer lípidos, carbohidratos, péptidos y ácidos nucleicos (Tabla 2.1). En humanos se expresan diez TLRs funcionales (TLR1-TLR10) mientras que en el ratón han sido identificados doce TLRs (TLR1-TLR9 y TLR11-TLR13). Algunos TLRs se expresan en la superficie celular (TLR2, 4, 5, 6, 10 y 11), mientras que otros se expresan en membranas endosomales (TLR3, 7, 8 y 9). Los TLRs son proteínas de transmembrana tipo I y se componen de un ectodominio de LRRs, el cual está involucrado en forma directa o mediante moléculas accesorias al reconocimiento del ligando; por otro lado poseen un dominio citoplasmático TIR que interactúa con moléculas adaptadoras frente a la activación (53, 121).

TLR	Ubicación	Ligando	Origen del ligando
TLR1/2	Membrana plasmática	Triacil lipoproteína	Bacterias
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteína, peptidoglicanos, glicolípidos, ácido palmítico, HMGB1	Bacterias, virus, parásitos, endógeno.
TLR2/6	Membrana plasmática	Diacil lipoproteína, ácido lipoteicoico, zymosan	Bacterias, virus y hongos
TLR3	Endolisosoma	dhARN	Virus
TLR4	Membrana plasmática	LPS, ácido palmítico, HSP60, HSP70, HMGB1, fibrinógeno, níquel	Bacterias, virus, endógeno.
TLR4/6	Membrana plasmática	LDLox, amiloide β	Endógeno
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias
TLR7/8 (no funcional en ratón)	Endolisosoma	shARN	Virus, bacterias, endógeno
TLR9	Endolisosoma	CpG-ADN	Virus, bacterias, protozoos, endógeno
TLR10	Endolisosoma	Desconocido	Desconocido
TLR11 y TLR12	Membrana plasmática	Moléculas similares a profilina	Protozoos
TLR13	Endolisosoma??	23S ARN ribosomal (no identificado en células eucariotas)	Bacterias

Tabla 2.1. **Principales TLRs y sus ligandos.** HMGB1: de la sigla en inglés, high mobility group box1 protein, dhARN: ácido ribonucleico de doble hebra, HSP: de la sigla en inglés, heat shock protein, LDLox: de la sigla en inglés, oxidized low-density lipoprotein.

Aunque los TLRs representan un importante sistema en el reconocimiento de patógenos, no son los únicos PRRs con esta función. En la superficie celular, los CLRs también participan tanto en la detección como en la captura de componentes microbianos. Por otra parte, aquellas moléculas tanto bacterianas como virales que logran ingresar al citoplasma celular son reconocidas por otros PRRs, los receptores citosólicos. Estos últimos se agrupan en tres familias principales: los NLRs, los RLRs y sensores de ADN.

Los NLRs representan una familia con más de 20 miembros pero hasta el momento sólo la mitad de los miembros han sido caracterizados en detalle. Estos receptores estructuralmente pueden dividirse en tres partes: 1) un extremo C-

terminal con secuencias de tipo LRRs, que estaría involucrado en reconocer al ligando; 2) un dominio central denominado NACHT o NOD, requerido para la oligomerización y 3) un dominio efector N-terminal (dominio de interacción proteína-proteína) (Fig. 2.2).

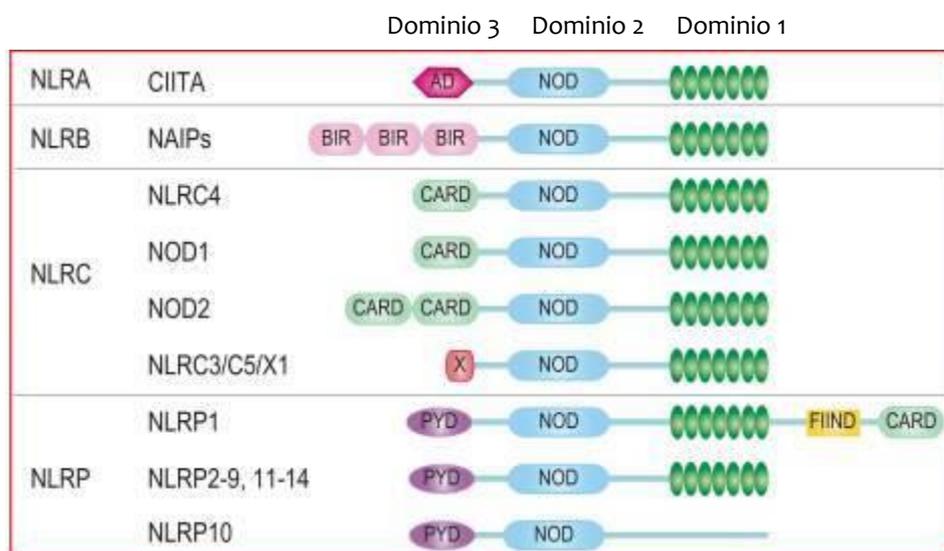


Figura. 2.2. **Estructura representativa de los NLRs.** Estos receptores se caracterizan por presentar tres dominios diferentes: el de reconocimiento de ligandos rico en secuencias repetidas de leucina (LRRs), el dominio de oligomerización (NOD), y el dominio efector (N-terminal) que puede ser: de transactivación ácida, baculovirus IAP repeat domain (BIR), caspase recruitment domain (CARD) o pirin domain (PYD). Basados en la naturaleza de su dominio N-terminal, los NLRs se subdividen en cuatro familias: NLRA, NLRB, NLRC y NLRP. Abreviaciones: FIIND, function to find; AD, activation domain; CIITA, MHC class II transcription activator. Adaptado de Zhong y col. 2013 (32).

Mecanismo de señalización de TLRs.

A través de la señalización de todos los TLRs, a excepción del TLR3, y de la familia de los receptores de IL-1R (incluye: IL-1R1, IL-1R18 e IL-1R33, entre otros) se induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias dependiente del factor de transcripción NFκB por una vía que involucra la proteína adaptadora MyD88. Por otro lado, el TLR3 y en parte TLR4 utilizan una vía de señalización independiente de MyD88 que involucra a la molécula adaptadora TRIF (122-123).

TLR5, TLR11, TLR4 y los heterodímeros TLR2/TLR1 o TLR2/TLR6 interaccionan con sus ligandos en la superficie celular; mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan en endosomas donde son capaces de reconocer ácidos nucleicos de origen tanto microbiano como endógeno. La señalización de estos receptores desencadena el reclutamiento de proteínas adaptadoras, ya sea, MyD88 y MAL (en inglés, MyD88-adaptor-like protein) o TRIF y TRAM (en inglés,

TRIF-related adaptor molecule). Estas proteínas desencadenan la activación de IRAKs y las moléculas adaptadoras TRAFs lo que lleva a la activación de MAPKs, JNK y p38, como así también de factores de transcripción. Dentro de estos últimos se destacan: NFκB, IRFs, CREB (de la sigla en inglés, cyclic AMP-responsive element-binding protein) y AP-1 (de la sigla en inglés, activator protein 1). La principal consecuencia de la señalización a través de los TLRs es la inducción de citoquinas pro-inflamatorias a través de NFκB y de IFN tipo I a través de IRFs (Fig. 2.3) (123).

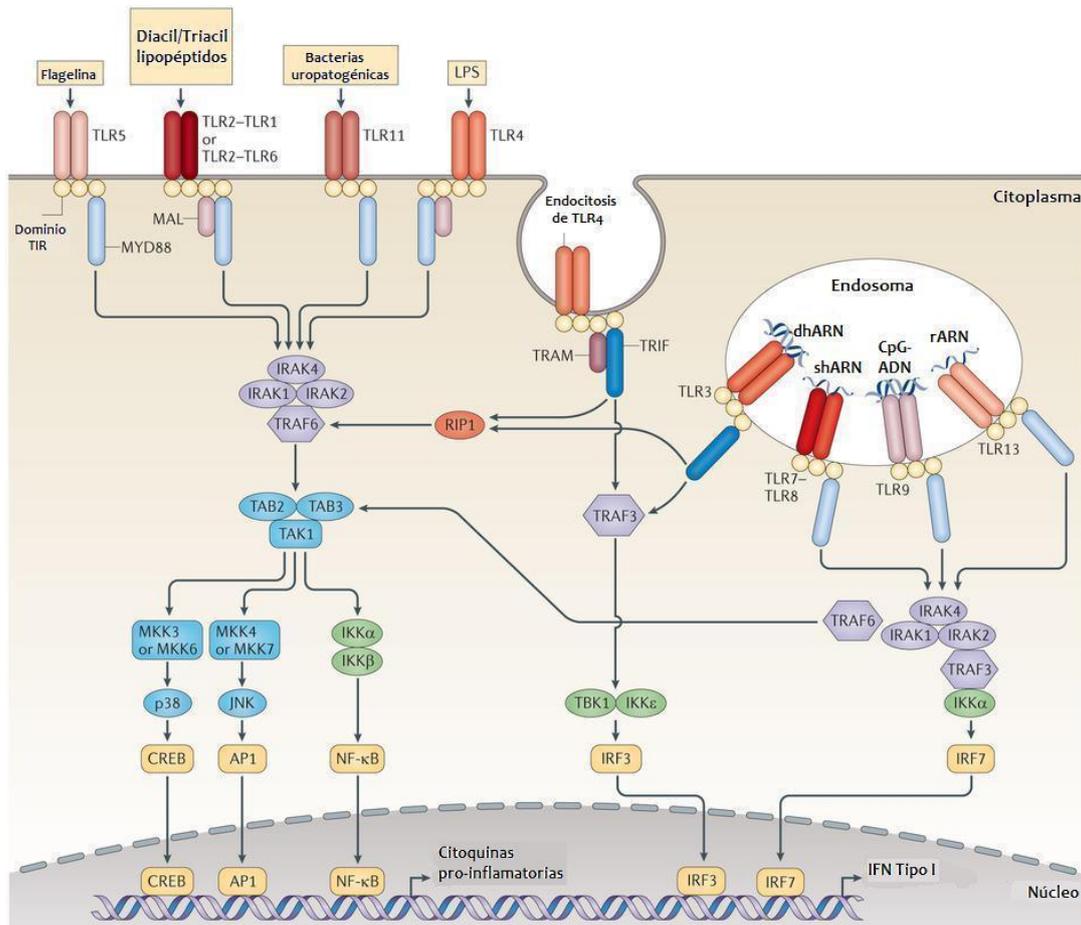


Figura 2.3. **Mecanismo de señalización de los TLRs.** Adaptado de O'Neill y col. 2013 (123).

La inflamación como mecanismo adyuvante.

Los adyuvantes están representados por diferentes clases de compuestos (productos microbianos, productos naturales, sales minerales, emulsiones, micro y nanopartículas, liposomas, etc.) y sus mecanismos de acción aún no se han descrito por completo, lo que dio lugar a que en el año 1989, Janeway se refiera a estos como “el pequeño secreto sucio de los inmunólogos” (124). Sin embargo, hoy está claro que muchos de los adyuvantes licenciados tales como: MPL, MF59 y las sales de aluminio potencian la respuesta inmune induciendo activación/maduración de las CPA (entre otros efectos), las cuales mediante el reconocimiento y procesamiento del antígeno representan un puente de conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa. La forma mediante la cual estas células especializadas son activadas por los adyuvantes puede ser directa, mediante moléculas que representan PAMPs (MPL, CpG-ODN, entre otros) o indirecta mediante el reconocimiento de DAMPs (cristales de ácido urico, dhADN, ATP, HMGB1, HSP, etc) liberados por daño celular. Se ha demostrado que muchos de los adyuvantes que no contienen PAMPs, activan el sistema inmune desencadenando un reclutamiento de células de la inmunidad innata en el sitio de inyección creando de esta manera un microambiente local pro-inflamatorio. Esta respuesta inflamatoria es mediada por la producción de DAMPs como es el caso del aluminio (19, 125-126) y del MF59 (127). El efecto inflamatorio en el sitio de inyección desencadena una amplificación de la respuesta dirigida por quimioquinas y citoquinas que aumentan el número de CPA que participan en el comienzo de la misma. Sin embargo, aún no se ha podido establecer claramente una relación causa-efecto entre reclutamiento de células de la inmunidad innata en el sitio de inyección y actividad adyuvante. Este modo de activación dual (directa e indirecta) es la base para comprender el mecanismo de acción de la mayoría de los inmunopotenciadores, entre ellos, Coa-ASC16.

DAMPs: Adyuvantes endógenos.

El estudio de los DAMPs surge a partir de que no era posible explicar las respuestas inmunes contra transplantes, algunos tumores e incluso enfermedades autoinmunes, debido a que en todas estas situaciones aparentemente no existirían componentes microbianos. De esta manera, P. Matzinger propone la hipótesis de daño en 1994, donde postula que el sistema inmune adaptativo evolucionó para responder a la muerte celular no fisiológica, al daño o estrés (29). En este modelo se estableció que las células o tejidos dañados liberan sus componentes que representan “adyuvantes endógenos” a los cuales se los denominó como DAMPs, utilizado para hacer referencia a señales de daño de origen no microbiano (128). Estas señales de daño endógeno, al igual que los PAMPs, activan las células hematopoyéticas y/o células no-hematopoyéticas desencadenando una respuesta inflamatoria que puede o no traducirse en una respuesta inmune adaptativa (actividad adyuvante). De hecho, fue demostrado que cuando se administran células muertas con un antígeno, estas potencian la respuesta de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas (129-130).

Dado que los DAMPs involucrarían una amplia variedad de moléculas, se considera importante dejar en claro parámetros que permitan utilizar esta definición de forma más estricta: a) un DAMP debe ser activo como molécula altamente purificada, b) su acción biológica debe ser independiente de su contaminación con PAMPs, teniendo en cuenta de que en muchas ocasiones ambos tipos de moléculas señalizan a través de los mismos receptores, c) debe ser activo en concentraciones presentes en situaciones patofisiológicas, d) la eliminación o inactivación selectiva del DAMP debe inhibir su efecto biológico tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*.

Las siguientes moléculas, entre otras, representan DAMPs: cristales de urato monosódico que se forman en el medio extracelular (19), dhADN (125-126), HMGB1 (una proteína asociada a la cromatina que es liberada durante la necrosis celular y, en ocasiones, por células vivas mediante un mecanismo de secreción no convencional) (131), ATP (127), la ribonucleoproteína SAP130 (132), IL-1 α (133), IL-33 (134), las proteínas S100 (135), HSP (136). Además, las proteasas celulares que se

liberan en procesos de daño son capaces de clivar componentes de la matriz extracelular y generar fragmentos bioactivos (128). Si bien ya se han descrito varias de estas moléculas, seguramente aún quedan varias por descubrir (128).

¿Cómo señalizan los DAMPs?

Los TLRs generalmente reconocen sólo PAMPs pero en ocasiones también son capaces de detectar DAMPs. TLR2 y TLR4 son los TLRs más involucrados en el reconocimiento de DAMPs. Por ejemplo, en relación a los cristales de ácido úrico, los primeros experimentos sugirieron un posible rol de TLR2 y TLR4 en la respuesta a esta molécula (137), aunque estudios posteriores no pudieron confirmar este hallazgo (138). Por otro lado, se ha establecido que estos dos últimos receptores participarían en el reconocimiento del ácido palmítico (139-141). Además, la inyección de células muertas en ratones desencadena una respuesta inflamatoria, la cual no fue inducida en ratones deficientes de la proteína adaptadora MyD88, la cual es necesaria para la transducción de señales por parte de la mayoría de los TLRs, mientras que en ratones deficientes tanto en TLR2 como en TLR4 esta respuesta fue afectada levemente (142). También hay evidencia de que TLR3 y TLR9 son capaces de detectar daño celular frente a isquemia intestinal (143) y toxicidad/injuria hepática/pancreática respectivamente (144-147).

Por otra parte, se observó que en ratones *Myd88^{-/-}* se afectaba el reclutamiento de neutrófilos desencadenado frente al daño celular. Esto llevó al estudio de las otras vías dependientes de MyD88, los receptores de IL-1 e IL-18. Los resultados obtenidos en ratones que carecen del receptor de IL-1 coincidieron con el fenómeno que se observaba en los que carecían de la proteína MyD88 (138, 142). Esto último abrió las puertas hacia el estudio de otra posible vía de señalización para los DAMPs.

Por otro lado, NLRP3 (un receptor de la familia NLRs que al activarse forma el complejo inflamasoma, responsable de la producción de IL-1 β e IL-18) es activado por numerosas y muy variadas moléculas endógenas (cristales de ácido

úrico, cristales de colesterol, fibrillas de amiloide β , ATP, glucosa, ácido hialurónico, etc.) (34, 148).

IL-1.

La familia de IL-1 es una familia de proteínas ancestrales que está compuesta por 11 miembros, entre ellos: IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra (149). Estas tres proteínas se unen con alta afinidad al mismo receptor: IL-1R1. IL-1 α y IL-1 β son agonistas de IL-1R1 mientras que IL-1ra representa un antagonista competitivo de este receptor. Otras proteínas (IL-18, IL-33, IL-36, etc.) pertenecen a la misma familia pero utilizan otros receptores.

IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria, cuya síntesis es controlada a nivel tanto transcripcional, translacional como de maduración y secreción. Existen muchos estímulos (incluyendo ligandos de TLR, TNF e IL-1 o IL-18) que son capaces de activar la transcripción del gen de IL-1 β . Esta citoquina es producida en el citosol como una proforma inactiva (proIL-1 β), la cual requiere un clivaje proteolítico para su activación. En la mayoría de los tipos celulares, esta proteólisis está principalmente bajo el control de una cisteína proteasa intracelular, conocida como caspasa 1. Sin embargo, proIL-1 β puede ser liberada de las células y clivada a nivel extracelular por otras proteasas (proteínasa-3, elastasa, metaloproteasa, granzyma A) (150). En células en estado basal, la caspasa 1 se presenta como un zimógeno, pro-caspasa 1, y su conversión a la forma activa está bajo el control de un complejo proteico denominado inflammasoma (151). La activación de este complejo cliva la pro-caspasa 1, la cual una vez activada, hidroliza la proIL-1 β a IL-1 β (su forma activa o madura).

IL-1 α se expresa en forma constitutiva en una gran variedad de células. Frente a un estímulo, se activa la transcripción del gen de IL-1 α la cual, al igual que la IL-1 β , se sintetiza como una proforma (proIL-1 α que generalmente se la denomina como IL-1 α). A diferencia de la proIL-1 β , esta proforma es biológicamente activa, al igual que la forma clivada y una mínima porción de la misma también se puede expresar en la membrana plasmática, particularmente en

monocitos y en células B (150). La mayor parte de IL-1 α , permanece de forma intracelular como proforma y se cree que funciona como un mensajero autócrino. También, ha sido postulado que la proforma presente en la membrana celular podría actuar como mensajero parácrino de células adyacentes (152). Por otro lado, también se han descrito que las proteasas involucradas en el clivaje de proIL-1 α podrían ser diferentes a aquellas que procesan la IL-1 β , aunque esto aún no está definido por completo. De hecho, este paso no requeriría del inflamasoma, aunque se reportó que hay una disminución de IL-1 α en células *Caspasa-1*^{-/-} (153) y se han reportado interacciones físicas entre la IL-1 α y caspasa 1 (154). De esta manera, mientras que IL-1 β es un mediador sistémico sin función intracelular, IL-1 α es principalmente un regulador de eventos intracelulares (un factor de crecimiento autócrino) y mediador de inflamación local.

Finalmente, **IL-1ra** es producida y secretada por las mismas células que expresan IL-1, funciona como un antagonista competitivo del receptor, se une a IL-1R1 pero no activa a la célula blanco.

El inflamasoma.

Es un complejo multiproteico citoplasmático que se compone de: un PRR, la proteína adaptadora ASC y pro-caspasa 1. El mismo, inicia la autocatálisis de pro-caspasa 1 (algunos inflamasomas no canónicos involucran pro-caspasa 11) en caspasa 1. De esta manera, frente a su activación, el PRR sufre un cambio conformacional que promueve el reclutamiento de pro-caspasa 1 que se ensambla a través de la molécula adaptadora denominada ASC, esto origina que pro-caspasa 1 se active a caspasa 1 para finalmente clivar pro-IL-1 β /pro-IL-18 originando sus formas maduras o activas (IL-1 β /IL-18 maduras) (Fig. 2.4). Hasta el momento se han descrito cinco inflamasomas, cada uno conteniendo un PRR diferente (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM-2 y NLRP6). Los inflamasomas NLRP1, NLRC4 (también denominado IPAF) y NLRP6 son activados por productos microbianos. El inflamasoma constituido por AIM-2 representa un sensor de ácidos nucleicos (dhADN), mientras que para el complejo NLRP3 no se han identificado aún los ligandos pero si se conoce que se activa por numerosos estímulos: PAMPs,

El inflamasoma NLRP3-mecanismo de activación.

Aún no se conoce por completo el mecanismo a través del cual el receptor NLRP3 reconoce a sus ligandos y activa el complejo proteico inflamasoma. NLRP3 es un receptor citoplasmático por lo que resulta difícil comprender como es capaz de reconocer células muertas o partículas irritantes las cuales son extracelulares. En general, se considera que la detección de moléculas tan diferentes entre sí, sería a través de un mecanismo indirecto. En función de esto se postula, que NLRP3 reconocería moléculas endógenas que son inducidas o modificadas por estos agentes. De esta manera, se han formulado diversas hipótesis en relación con la activación del inflamasoma NLRP3 que se pueden resumir como sigue: 1) liberación de K^+ , 2) traslocación de NLRP3 a la mitocondria, 3) producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la mitocondria, 4) liberación de DNA o cardiolipina mitocondrial, 5) liberación al citosol de catepsinas lisosomales (Fig. 2.5).

Lo que está claro es que la activación del inflamasoma NLRP3, requiere de dos señales (al menos para los experimentos *in vitro*). **La primera**, un ligando de PRRs, IL-1R o TNFR (de la sigla en inglés, tumor necrosis factor receptor) que activa NF-kB para sintetizar pro-IL-1 β y NLRP3, y **la segunda** un agente que activa NLRP3 (por ejemplo ATP) (155).

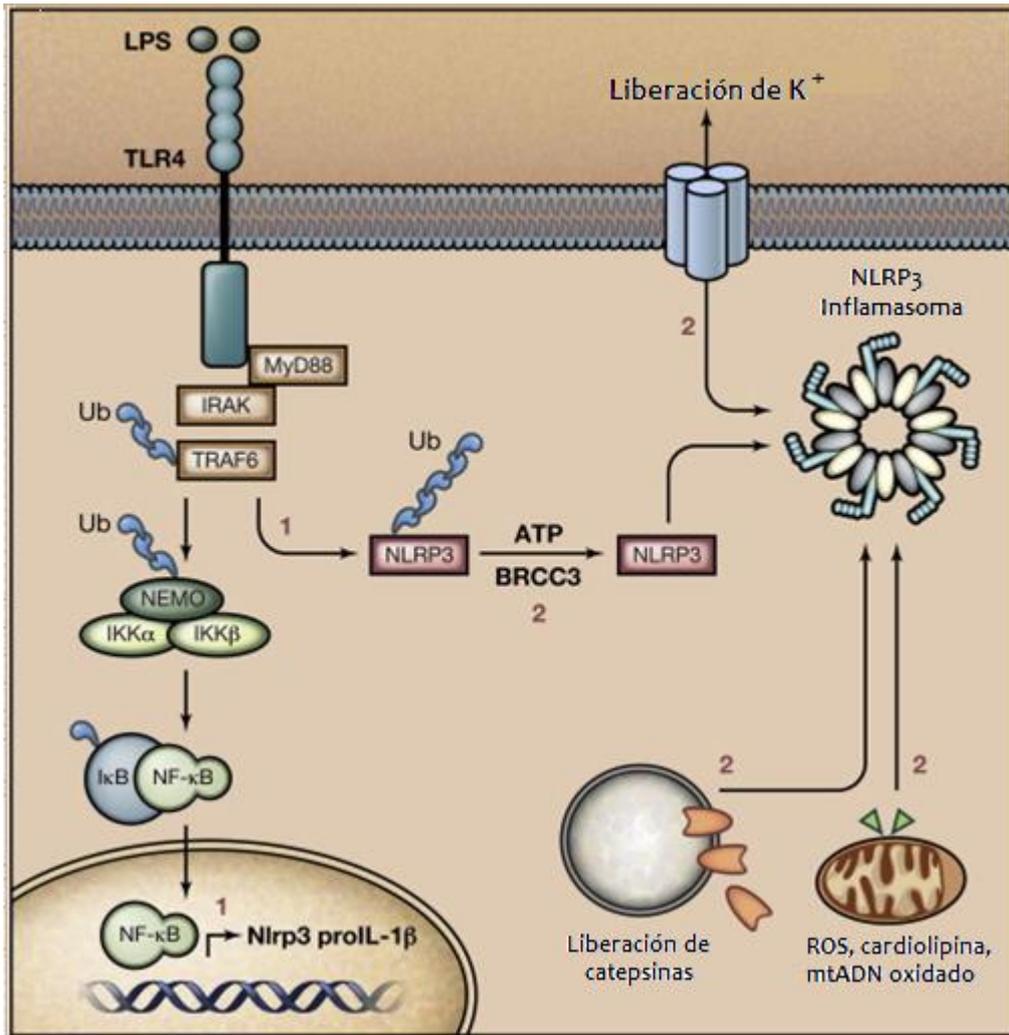


Figura. 2.5. **Mecanismos propuestos para la activación de NLRP3.** Aunque no se conocen los mecanismos exactos que permiten la activación del inflammasoma NLRP3, si está bien establecido que para la activación de NLRP3 se requieren dos señales. La interacción LPS (ligando)/ TLR4 (receptor), en este caso, proporciona la primera señal la cual, mediada por NF-κB, induce la síntesis de NLRP3 y proIL-1β. Alternativamente, TLR4 puede proporcionar la señal 1 a través de otra vía de señalización no del todo dilucidada pero que involucra a MyD88, IRAK1 e IRAK4 sin la necesidad de una síntesis proteica *de novo*. Es requerida la desubiquitinación mediada por BRCC3 para la formación y activación, inducida por ATP u otros estímulos, del complejo NLRP3 inflammasoma. A su vez, estos estímulos proporcionan una segunda señal la cual puede estar representada por la liberación de K⁺, la liberación citosólica de las catepsinas lisosomales, la relocalización de NLRP3 desde el citosol a las mitocondrias, o la liberación al citosol de componentes mitocondriales tales como especies reactivas de oxígeno (ROS), ADN mitocondrial (mtADN) oxidado. Adaptado de Lamkanfi y col 2014 (155).

RESULTADOS II

1. Estudio de la actividad inflamatoria de Coa-ASC16

1.a. Caracterización de la respuesta inflamatoria.

Como se observó en el capítulo I, la inyección s.c. de Coa-ASC16 (sin CpG-ODN) genera una respuesta inflamatoria local a nivel del sitio de la inyección (Fig. 1.12 A y B). Dado que en este segundo capítulo nuestra intención es caracterizar en profundidad esta respuesta inflamatoria, es que utilizamos la vía intraperitoneal, ya que representa una forma más fácil y accesible para este tipo de estudio.

De esta manera, ratones BALB/c se inyectaron en forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (grupo control) y, a diferentes periodos de tiempo, se obtuvo el lavado peritoneal. De este último, se separaron, por un lado, las células, para realizar una inmunomarcación de superficie y analizarlas por citometría de flujo y por otro lado, el sobrenadante del lavado peritoneal para la determinación de citoquinas. Como se puede observar en la figura 2.6 A y B, a las 0,16 horas (10 minutos) luego de la inyección de Coa-ASC16 se observa una disminución severa de macrófagos, con un reclutamiento de neutrófilos y de monocitos Ly6C^{high} (a partir de las 2 y 4 horas, respectivamente). No hay variación en el número de células NK, NKT y células T (datos no mostrados). En sobrenadantes de lavado peritoneal, se determinó la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y regulatorias. A las 0,16 horas posteriores a la inyección de la nanoestructura, se detectó un aumento de IL-1 β que permanece hasta las 2 horas luego del tratamiento. Además, Coa-ASC16 también indujo la producción de IL-6 (principalmente) e IL-12 (Fig. 2.6 C). No hubo diferencias entre los grupos de estudio cuando se evaluó TNF, IFN- γ , IL-17, GM-CSF, IL-10, óxido nítrico y arginasa (datos no mostrados).

Estos resultados nos permiten decir que Coa-ASC16 genera una respuesta inflamatoria local, con el reclutamiento de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} y la producción de citoquinas tales como: IL-1 β , IL-6 e IL-12.

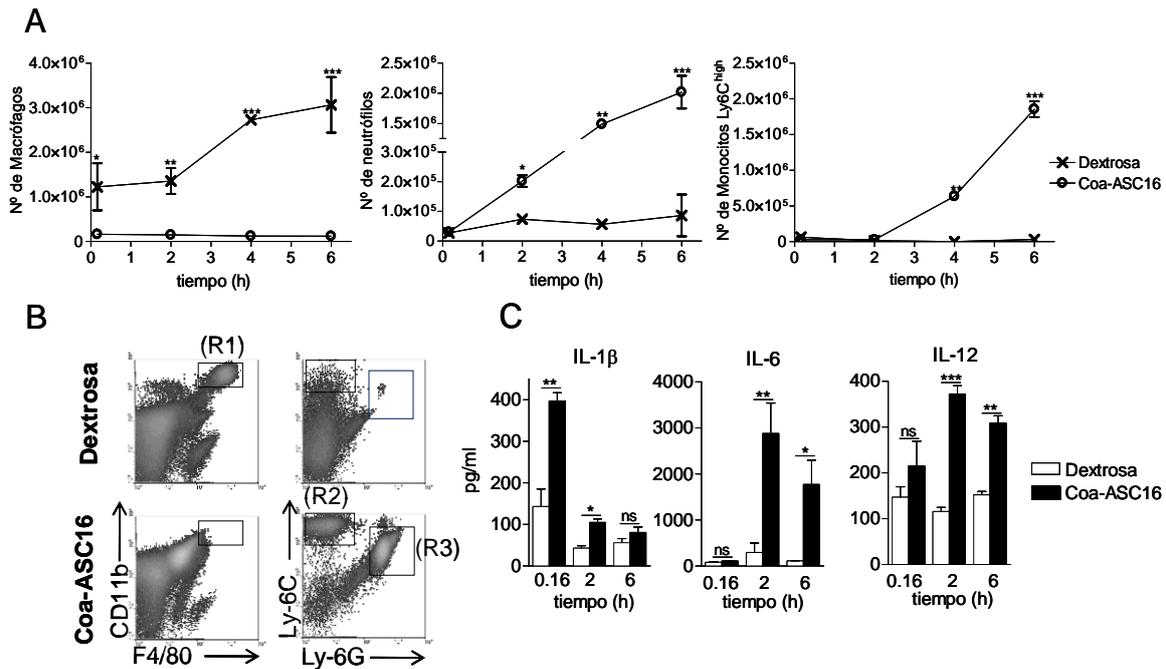


Figura. 2.6. El Coa-ASC16 genera el reclutamiento de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} con producción de IL-1β, IL-6 e IL-12. Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 50 μL de Coa-ASC16 o dextrosa (control). Luego de la inyección (0,16; 2; 4 y 6 horas), la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. (A) Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6C^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal a diferentes tiempos. (B) Gráfico tipo density plot representativo de ratones inyectados con Coa-ASC16 o dextrosa a las 6 horas post inyección. (R1) macrófagos, (R2) monocitos Ly-6C^{high}, (R3) Neutrófilos. (C) Concentración de IL-1β, IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 4/5 experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

La mayoría de los experimentos descriptos a continuación, se realizaron 6 horas después de la administración i.p. de Coa-ASC16. Esto se debe, a que nosotros nos focalizamos en estudiar el tiempo en el que el escenario inflamatorio estaba definido por la presencia de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} y un aumento significativo de las citoquinas IL-6 e IL-12. Sólo en algunos experimentos nos propusimos estudiar IL-1β, estos ensayos se realizaron a tiempos cortos, ya que a las 6 horas, en la mayoría de los casos, ya no se observa una diferencia significativa en la producción de esta citoquina.

1.b. Evaluación de la fuente de IL-6

Se conoce que numerosos tipos celulares, incluyendo células derivadas de médula ósea y estromales son una fuente importante de IL-6 durante cuadros inflamatorios (156). Teniendo en cuenta que Coa-ASC16 desencadena una robusta producción de IL-6 acompañada por un importante infiltrado celular, se decidió evaluar si estas células de la inmunidad innata eran productoras de esta citoquina. Para ello, se utilizaron ratones BALB/c, un grupo fue inyectado de forma i.p. con Coa-ASC16 mientras que el otro no recibió tratamiento (control), después de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Luego, se desarrolló una citometría intracelular de células de lavado peritoneal con tinción para IL-6. De esta manera, se observó que en los ratones inyectados con Coa-ASC16 hay un importante aumento en el porcentaje de células IL-6⁺ (Fig. 2.7 A) y que además todos los neutrófilos y la mitad de los monocitos Ly6C^{high} son productores de esta citoquina (Fig 2.7 B).

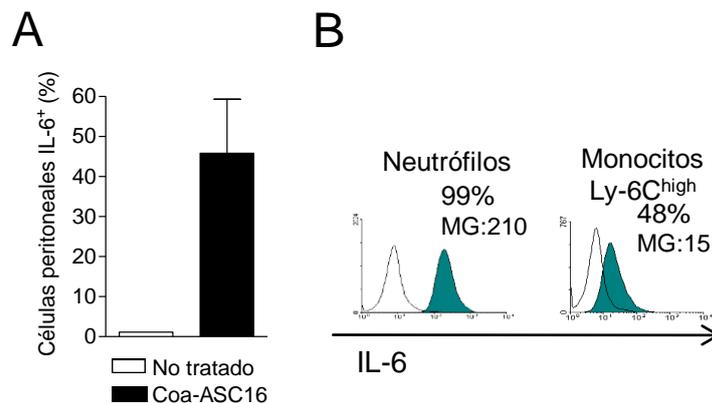


Figura 2.7. **Los neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} son una fuente importante de IL-6.** Ratones BALB/c fueron inyectados o no de forma i.p. con Coa-ASC16 y se obtuvo el lavado peritoneal 6 horas después. **(A y B)** Citometría de flujo intracelular con tinción para IL-6. **(A)** Porcentaje total de células IL-6⁺. **(B)** Los histogramas coloreados muestran la expresión intracelular de IL-6 en el gate de la población de interés y la línea gris representa el control de isotipo. El número indica la frecuencia de células IL-6⁺ en cada población celular. MG: representa la media geométrica calculada teniendo en cuenta la diferencia entre la muestra problema y el control de isotipo. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 2 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que los monocitos Ly6C^{high} son reclutados por la inyección de Coa-ASC16 y que los mismos representan una importante fuente de IL-6, se investigó como repercute en la respuesta inmune innata la incapacidad en el influjo de esta población celular al sitio de inyección. Se conoce que en muchos

modelos experimentales los monocitos Ly6C^{high} requieren del receptor CCR2 para su egreso desde la médula ósea (157) hacia el sitio afectado; por lo tanto, ratones wt y *Ccr2*^{-/-} se inyectaron de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). Luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Ambos grupos de animales, fueron capaces de reclutar neutrófilos y presentaron un menor número de macrófagos; sin embargo los animales deficientes de CCR2, fueron incapaces de reclutar monocitos Ly6C^{high}. La ausencia de esta última población celular a nivel del sitio de inyección se asoció con menores concentraciones de IL-6 e IL-12 respecto a su contraparte wt (Fig. 2.8 A y B). Esto último resalta la importancia de los monocitos Ly6C^{high} en la inducción de estas citoquinas y nos permite hipotetizar que probablemente esta población celular cumpla un rol en la respuesta inmune adaptativa en nuestro modelo experimental.

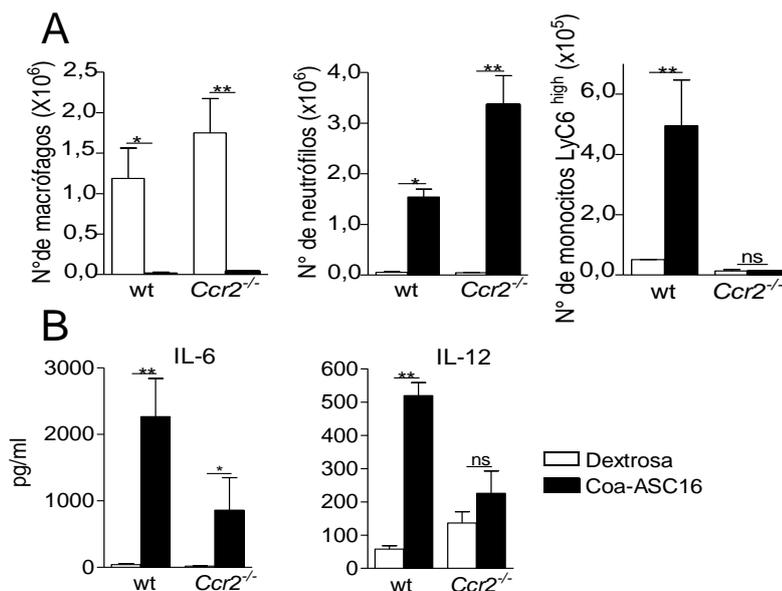


Figura. 2.8. **Ratones *Ccr2*^{-/-} luego del tratamiento con Coa-ASC16 inducen menores niveles de IL-6 e IL-12.** Ratones wt (C57BL/6) y *Ccr2*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ns: no significativo.

1.c. Evaluación de la implicancia de IL-6 en la respuesta inflamatoria de Coa-ASC16.

En la mayoría de los procesos inflamatorios agudos, la llegada al sitio de inflamación de los monocitos es dependiente de la presencia previa en el mismo de neutrófilos. Se conoce que diferentes vías pueden mediar el reclutamiento de monocitos dependiente de neutrófilos; entre ellas, quimioquinas, proteínas de los gránulos de los neutrófilos (158-159) y el complejo IL-6/sIL-6R (receptor de IL-6 soluble) a lo que se denomina como trans-señalización (160-161). Debido a que la respuesta inmune innata inducida por Coa-ASC16 se caracteriza por el reclutamiento de ambas poblaciones celulares y una alta producción de IL-6, decidimos estudiar la implicancia de esta citoquina en la respuesta inflamatoria generada luego de la administración de Coa-ASC16. Para ello, ratones wt y *Il-6^{-/-}* se inyectaron de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). Luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal para el estudio mediante citometría de flujo de las poblaciones celulares y las citoquinas en el sitio de inyección. Como se puede observar en la figura 2.9 A y B la deficiencia de IL-6 no afecta el reclutamiento de neutrófilos ni monocitos Ly6C^{high} y tampoco es relevante para la producción de IL-12. Si bien, en este trabajo de tesis no estudiamos si el reclutamiento de monocitos depende de la presencia previa de neutrófilos, nuestros resultados nos permiten concluir que en nuestro modelo experimental el reclutamiento de monocitos es dependiente de la interacción CCL2/CCR2 (Fig. 2.8) y no del complejo IL-6/sIL-6R (Fig. 2.9).

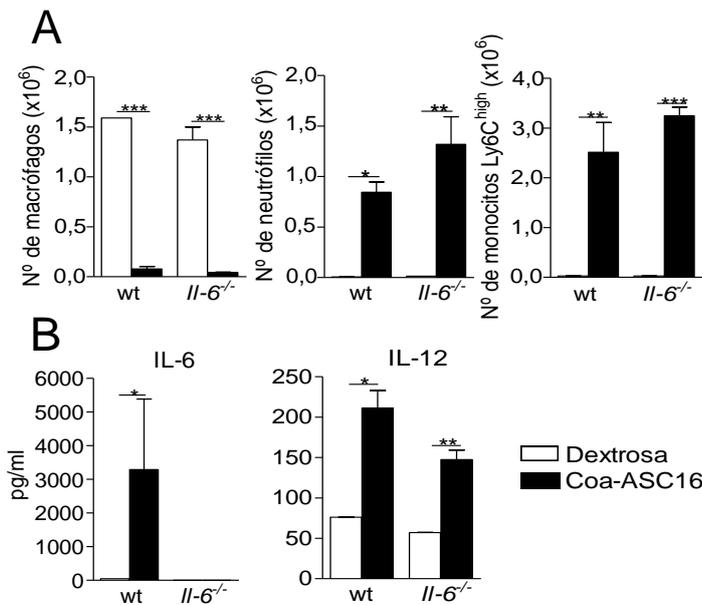


Figura. 2.9. **La deficiencia de IL-6 no afecta el reclutamiento celular ni la producción de IL-12 en el sitio de inyección.** Ratones wt (C57BL/6) y *Il-6*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

2. Evaluación de los posibles mecanismos de acción de Coa-ASC16.

Para comenzar a estudiar cuáles son los posibles mecanismos de acción a través de los cuales Coa-ASC16 induce este efecto inflamatorio local, realizamos diferentes experimentos tratando de correlacionar las características físico-químicas de la nanoestructura con la respuesta inmune innata.

2.1. Estudio de la actividad inflamatoria del ácido ascórbico o vitamina C.

Teniendo en cuenta que el ácido ascórbico es uno de los componentes principales de Coa-ASC16, es que decidimos estudiar si este podría ser reconocido por el sistema inmune innato. De esta manera, ratones wt y *Tlr4*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con vitamina C (en cantidad equimolar con la presente en Coa-ASC16), lipopolisacárido (LPS) o dextrosa (los dos últimos representan controles). Teniendo en cuenta que los ratones deficientes en el receptor TLR4, presentan una respuesta defectuosa frente a la estimulación con endotoxinas de

origen bacteriano, esto nos permitirá independizar posibles efectos del ácido ascórbico generados meramente por contaminantes bacterianos; por otro lado, la administración de LPS en ratones wt y *Tlr4*^{-/-}, nos permite asegurarnos de la correcta delección del gen. A las 6 horas de haber realizado la inyección, se obtuvo el lavado peritoneal de los ratones. De esta manera, mediante el estudio por citometría de flujo de la células de la cavidad peritoneal, se pudo establecer que ninguno de los grupos en estudio fueron capaces de reclutar neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} (datos no mostrados) como sucede frente a la inyección con Coa-ASC16. Además, como se observa en la figura 2.10 el ácido ascórbico no indujo cantidades significativas de IL-6 ni IL-12 en el sitio de inyección. Estos resultados nos permiten establecer que el ácido ascórbico o vitamina C no induce una respuesta inflamatoria local como la observada con su derivado Coa-ASC16.

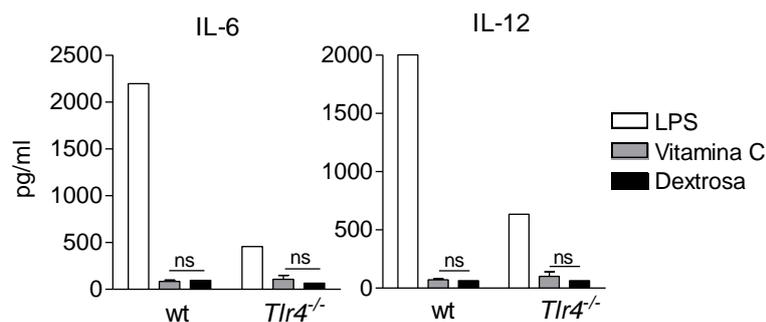


Figura 2.10. **El ácido ascórbico no induce una respuesta inflamatoria similar a la de su derivado Coa-ASC16.** Ratones wt (C57BL/6) y *Tlr4*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con vitamina C, LPS (100µg/ratón) o dextrosa. A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. ns: no significativo.

Continuando con el análisis de las características físico-químicas del Coa-ASC16, determinamos su pH inmediatamente antes de inyectarlo, el cual fue de 4,2. Teniendo en cuenta que ha sido reportado que la acidosis extracelular es considerada una señal de daño causante del desarrollo de una respuesta inflamatoria y se la ha vinculado con la inducción de IL-1β (162), los resultados del experimento anterior nos ayudaron a resolver si el pH ácido jugaba un rol en nuestro modelo experimental. Esto se debe, a que el ácido ascórbico posee un pH

de 2,9, por lo tanto si la acidosis jugara un papel en el desarrollo de la respuesta inflamatoria inducida por Coa-ASC16, tendríamos que haber visto un efecto inflamatorio causado por la inyección de vitamina C.

Por otro lado, se realizaron numerosos intentos para dilucidar si ASC16 (monómero de Coa-ASC16) poseía actividad inflamatoria. Debido a que el mismo se utiliza en una concentración de $4,9 \times 10^{-2}$ M (2%) en casi todos los experimentos realizados, nuestro objetivo fue lograr solubilizarlo (y de esta manera prevenir que forme el agregado supramolecular) respetando dicha concentración. De esta manera, evaluamos la utilización de numerosos solventes orgánicos, afines a la liposolubilidad del éster y que a la vez fueran inertes para el animal (Tabla 2.2). En la mayoría de los solventes estudiados, el ASC16 no resultó soluble a la concentración requerida. Aquellos solventes que sí lograron solubilizar el éster, desencadenaron una respuesta inflamatoria una vez que se administraron en el animal, lo cual enmascaraba cualquier posible efecto de ASC16. De esta manera, encontramos grandes impedimentos para evaluar este punto y a pesar de que se evaluaron otras posibles técnicas de solubilización (por ejemplo, unión química a una proteína), también presentaron inconvenientes. Por todo ello, consideramos que en este momento no es posible lograr resultados al respecto.

Solvente	Solubilidad de ASC16
Polietilenglicol	Soluble
Labrafac (triglicéridos)	Insoluble
Captex 8000 (triglicéridos de ácido caprílico)	Insoluble
Oleato de etilo	Insoluble
Miristato de isopropilo	Insoluble
Imwitor 318 (surfactante)	Soluble
Vitamina E	Insoluble
Castor Oil	Insoluble
Migliol 812 (aceite neutro)	Insoluble
Migliol 840	Insoluble
Plurol Oleique (surfactante)	Insoluble
Aceite de soja	Insoluble
Aceite de oliva	Insoluble
Ácido oleico	Soluble

Tabla. 2.2. Solventes utilizados para la solubilización de ASC16 2%.

2.2. Estudio de la actividad inflamatoria de ASC16 en fase gel.

Como se describió anteriormente, por encima de una CMC y de una TMC (> 72°C, cuando la suspensión del éster se realiza en dextrosa) se forma un agregado de ASC16 en fase gel, luego cuando se enfría y alcanza la temperatura ambiente, se forma la fase Coa-ASC16 (Fig. 9 de Introducción). Para lograr obtener la fase gel a temperatura fisiológica, utilizamos polietilenglicol 400 (PEG-400) para preparar la suspensión de ASC16, un co-solvente, que se ha demostrado que tiene la propiedad de reducir la temperatura de transición entre las diferentes mesofases (84). PEG-400 es ampliamente utilizado en diferentes formulaciones farmacéuticas de administración parenteral, tópica, oftalmológica, oral y rectal (81). De esta manera, se utilizó la mínima concentración del co-solvente que permitiera obtener la fase deseada (fase gel). R ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 50 µL de una solución de PEG-400 (15%)/ASC16 (85%) (siendo la concentración final de ASC16 2%) o PEG-400 (15%)/Dextrosa (85%) (control). Luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal y se realizó una citometría de flujo mediante la tinción de células de la cavidad peritoneal y la determinación de citoquinas en sobrenadantes de lavado peritoneal. Como se puede observar en la

figura 2.11 A y B, si bien ASC16 en fase gel es capaz de reclutar neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} con la inducción de IL-6 e IL-12 en el sitio de inyección, la población de macrófagos lejos de disminuir severamente, como ocurre luego de la inyección de Coa-ASC16 (Fig. 2.6 A), aumenta significativamente respecto al control. Estos resultados nos permiten establecer que si bien ASC16 en fase gel posee actividad inflamatoria, esta respuesta no es igual a la observada luego de la inyección de Coa-ASC16, por lo tanto, su efecto, o al menos parte de él, depende de la mesofase en la que se encuentra la nanoestructura.

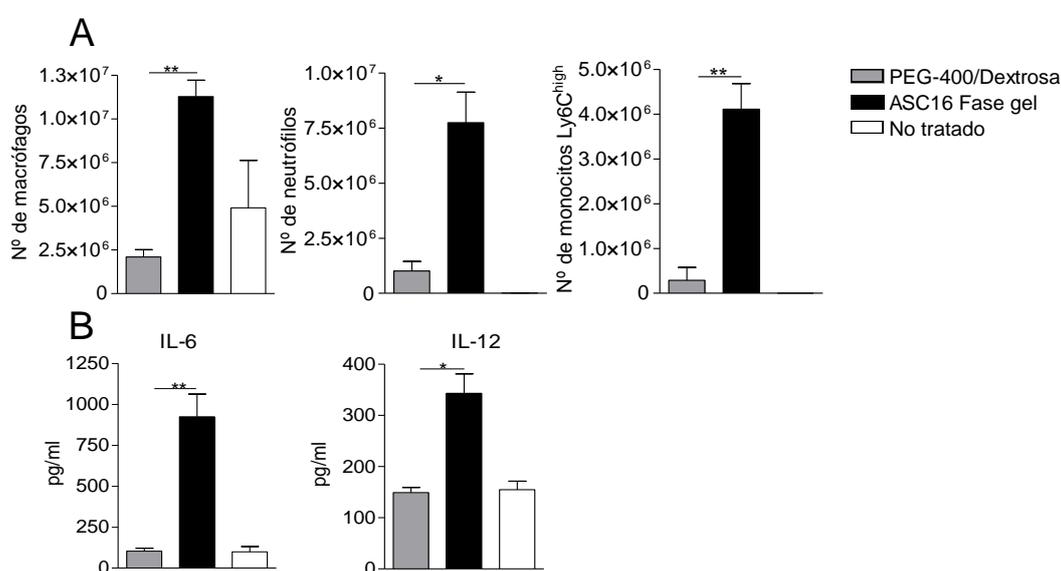


Figura. 2.11. **La respuesta inflamatoria inducida por ASC16 en fase gel difiere de la generada por Coa-ASC16.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 50 μ L de PEG-400/ASC16 (fase gel) o PEG-400/dextrosa (control). Luego de la inyección (6 horas), la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01.

2.3. Relación entre la concentración del éster y la respuesta inflamatoria.

En todos los experimentos el Coa-ASC16 es ASC16 al 2%, para evaluar si existe una relación entre la concentración del éster y el efecto inflamatorio, estudiamos la respuesta inflamatoria utilizando diferentes concentraciones de ASC16. De esta manera ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con Coa-

ASC16 2% (ó $4,9 \times 10^{-2} M$ el que originalmente utilizamos), Coa-ASC16 0,2% (ó $4,9 \times 10^{-3} M$), Coa-ASC16 0,05% (ó $1,2 \times 10^{-3} M$) o ASC16 $1 \times 10^{-6} M$. En los tres primeros casos la concentración utilizada supera la CMC, por lo tanto, por encima de la TMC, se forma el agregado supramolecular y una vez que se enfría el Coa-ASC16. En el cuarto caso, la concentración a la que se encuentra el éster es menor a la CMC, por lo tanto sólo tenemos el éster en suspensión (monómero). Luego de 6 horas de la inyección, se obtuvo el lavado peritoneal y se estudiaron las diferentes poblaciones celulares mediante citometría de flujo y la inducción de citoquinas en sobrenadantes del lavado peritoneal. Como se puede observar en la figura 2.12 A y B tanto el reclutamiento celular como la inducción de IL-6 e IL-12 dependen de la concentración del éster utilizada.

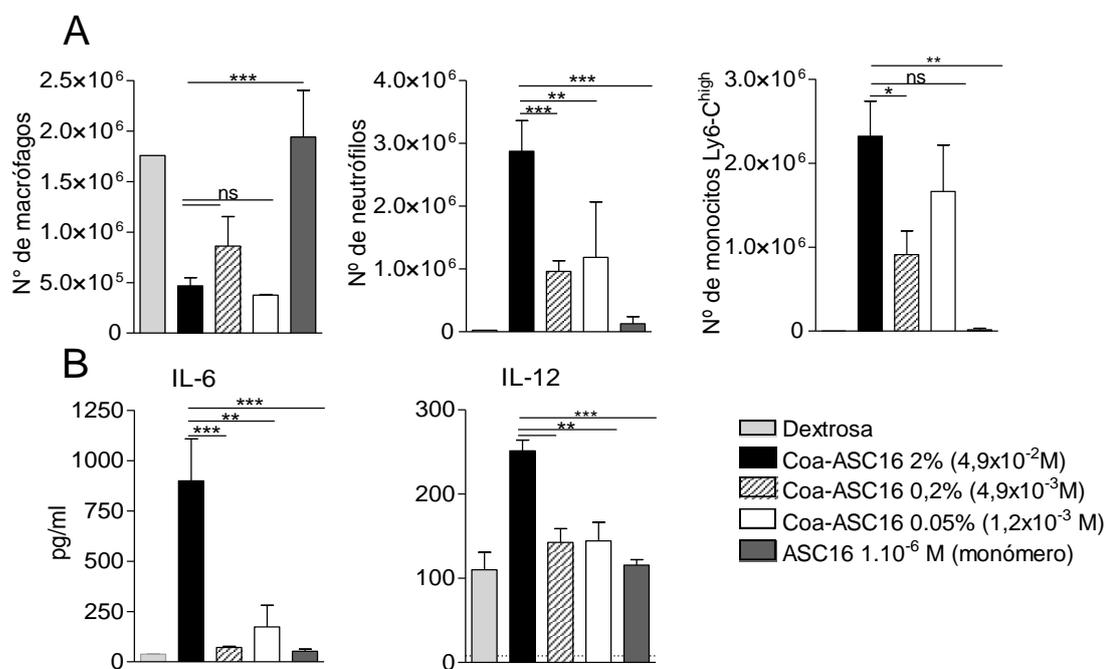


Figura. 2.12. **La respuesta inflamatoria depende de la concentración del éster utilizada.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 50 μL de Coa-ASC16 2%, Coa-ASC16 0,2%, Coa-ASC16 0.05%, ASC16 $1 \times 10^{-6} M$ o dextrosa (control). Luego de la inyección (6 horas), la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos ($F4/80^+$), neutrófilos ($Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C^+$) y monocitos ($Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}$) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de tres experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ns: no significativo.

2.4. Estudio de la actividad inflamatoria, modificando la longitud de la cadena alifática del ácido graso que compone al éster.

Como se describía anteriormente, nosotros utilizamos coagel a partir de ASC16; sin embargo, si observamos la figura 7 de la sección introducción, se han sintetizado diferentes ASCn que difieren entre sí en el ácido graso utilizado. La variación en el largo de la cadena alifática del ácido graso, tiene una influencia directa sobre sus propiedades físico-químicas, por ejemplo el punto de fusión al igual que la TMC, se incrementan de forma proporcional con el largo de la cadena. Los derivados con 6 ó 8 átomos de carbono poseen suficiente solubilidad a temperatura ambiente para formar agregados supramoleculares en agua (micelas); por otro lado, para aquellos que tienen más de 10 átomos de carbono, es necesario aumentar la temperatura hasta alcanzar la CMC dando lugar a una fase de tipo gel. Cuando la temperatura disminuye por debajo de la TMC, en todos los casos se forma Coa-ASCn (80).

Con motivo de evaluar si existe una relación entre la respuesta inflamatoria y el largo de la cadena alifática del ácido graso, es que ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC8, Coa-ASC16 y Coa-ASC18. Luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Como se puede observar en la figura 2.13 A, en los tres casos hay una disminución marcada de macrófagos y todos fueron capaces de reclutar neutrófilos y monocitos Ly6C^{high}. Estas dos últimas poblaciones fueron determinadas mediante la inmunomarcación con el anticuerpo anti-Gr1 que reconoce tanto a la molécula de superficie Ly6G como a Ly6C, por lo tanto el número absoluto de células Gr-1⁺ representa la sumatoria de los neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} presentes en la cavidad peritoneal. Además, los tres fueron capaces de inducir IL-6 e IL-12 (Fig. 2.13 B). Estos resultados nos permiten decir que tanto Coa-ASC8 como Coa-ASC18 poseen actividad inflamatoria al igual que la ya conocida de Coa-ASC16.

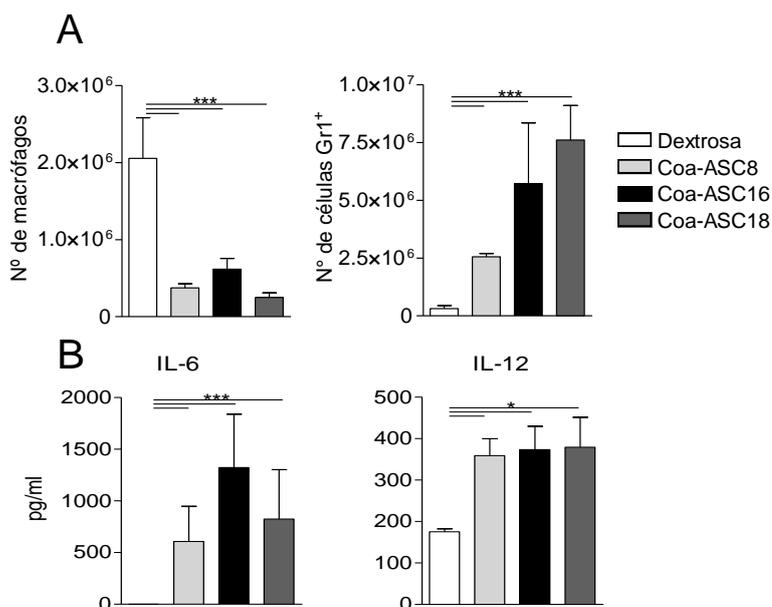


Figura. 2.13. **Coa-ASC8 y Coa-ASC18 son también capaces de inducir una respuesta inflamatoria.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 50 μ L de Coa-ASC8, Coa-ASC16, Coa-ASC18 (ASC8, ASC16 y ASC18 al 2%) o dextrosa (control). Luego de la inyección (6 horas), la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺) y células Gr1⁺ (las cuales incluyen neutrófilos y monocitos) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de tres experimentos independientes. *p < 0,05; ***p < 0,001.

En base a todos estos resultados donde se correlacionaron las características físico-químicas y la respuesta inflamatoria se incentiva el trabajo interdisciplinario y el grupo pretende abordar en un futuro el tema desde un aspecto biofísico.

2.5. Estudio del mecanismo molecular de señalización.

2.5.i. Evaluación de la implicancia de la molécula adaptadora MyD88 en la respuesta inflamatoria de Coa-ASC16.

Estudios previos han establecido que algunos adyuvantes, en los cuales no se ha demostrado la presencia de PAMPs, son capaces de activar el sistema inmune mediante un mecanismo que requiere de la proteína adaptadora MyD88 (19, 40, 163-164). Esta última, como se dijo anteriormente, es crítica en la transducción de señales dadas por la mayoría de los TLRs y receptores de la familia de los IL-1R.

Por lo tanto, en este marco, se investigó el efecto de la deficiencia de MyD88 en la respuesta inmune innata inducida por Coa-ASC16. Para ello, ratones wt y *Myd88*^{-/-} se inyectaron de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). Luego de 2 y 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Los ratones *Myd88*^{-/-} fueron incapaces de inducir tanto el reclutamiento celular como la producción de citoquinas (IL-1 β , IL-6 y IL-12) en el sitio de inyección (Fig. 2.14 A y B). Estos resultados nos permiten afirmar que la respuesta inflamatoria es dependiente de la proteína adaptadora MyD88.

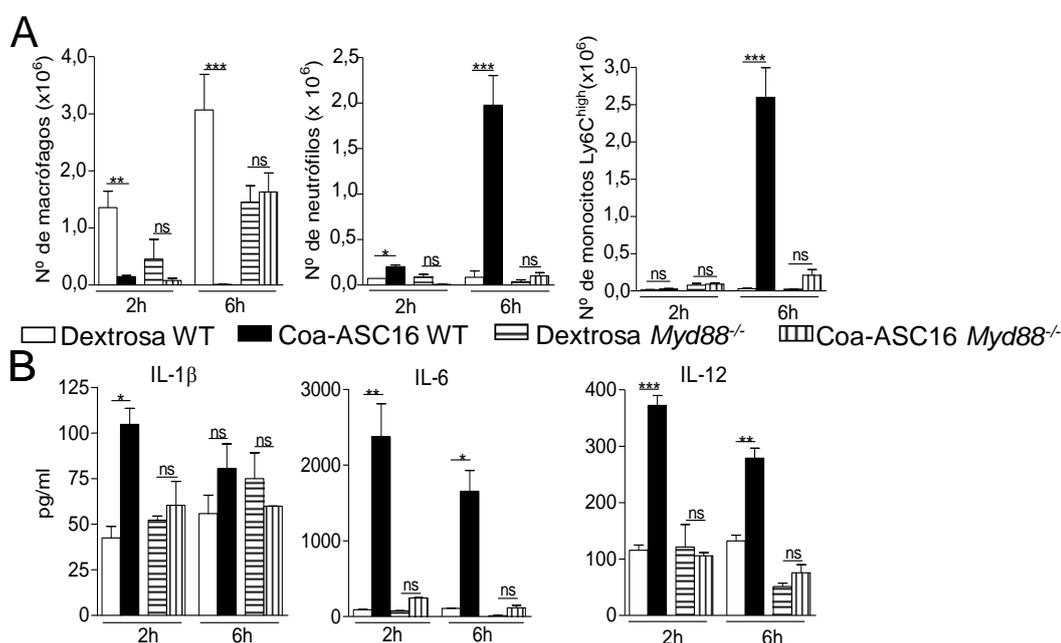


Figura. 2.14. La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 depende de la proteína adaptadora MyD88. Ratones wt (C57BL/6) y *Myd88*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). Luego de la inyección (2 y 6 horas), la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. (A) Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. (B) Concentración de IL-1 β , IL-6 y IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 3 experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

2.5.ii. Evaluación de la posible señalización a través de TLRs.

Teniendo en cuenta estos resultados, se comenzó con el estudio de la posible señalización a través de TLRs. Siendo TLR2 y TLR4 los receptores cuyos ligandos poseían mayores semejanzas estructurales con Coa-ASC16 (Tabla 2.1), es que se evaluó la respuesta inflamatoria en ratones *Tlr2*^{-/-} y *Tlr4*^{-/-}. De esta manera, los

animales se inyectaron de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control) y luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Ambas cepas, fueron capaces de montar una respuesta inflamatoria local tan eficiente como aquella lograda por las cepas wt (Fig. 2.15 A y B). Estos resultados permiten establecer que la actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de la señalización por TLR2 y TLR4 y que además, es independiente de la contaminación por endotoxinas, ya que el TLR4 reconoce al lipopolisacárido de bacterias Gram negativas.

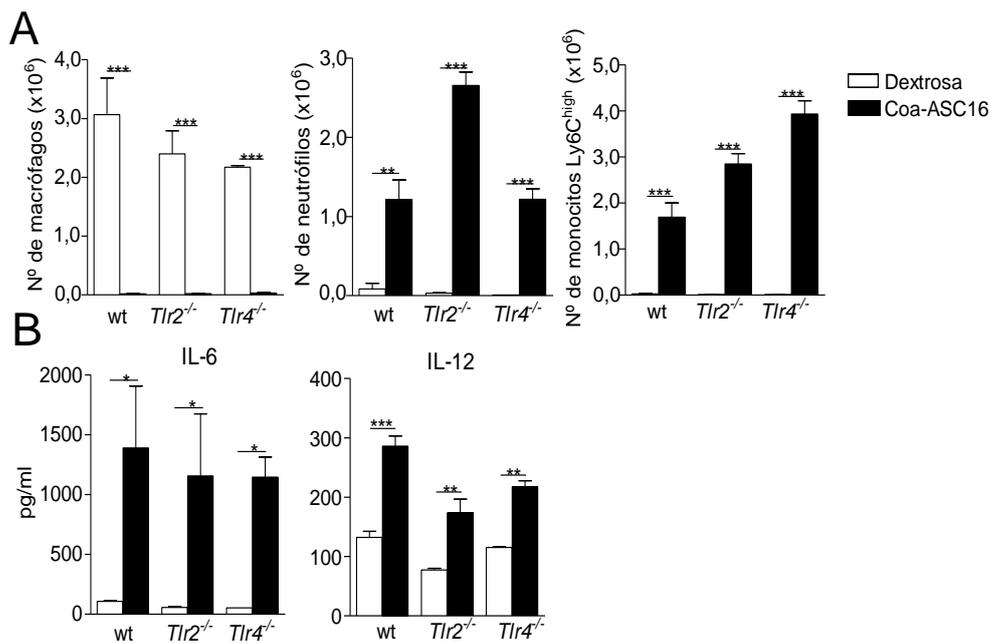


Figura 2.15. **La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de TLR2 y TLR4.** Ratones wt (C57BL/6), *Tlr2^{-/-}* y *Tlr4^{-/-}* fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12, determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 3 experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Debido a que consideramos de suma importancia independizar los efectos inmunoestimulantes de Coa-ASC16 de la presencia de contaminantes bacterianos, es que si bien, los resultados anteriores son contundentes y confirmatorios, decidimos comparar la respuesta inmune innata inducida por LPS y Coa-ASC16, para determinar si existen similitudes entre ellos. De esta manera, ratones BALB/c se inyectaron de forma intraperitoneal con Coa-ASC16, LPS o dextrosa (control) y al cabo de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal y el plasma. Como se puede

observar en la figura 2.16 A y B, los animales inyectados con LPS, fueron incapaces de reclutar neutrófilos y monocitos Ly6C^{high}; por otro lado, indujeron mayores cantidades de IL-6 tanto en plasma como en el sitio de inyección. Estos resultados nos permiten establecer claras diferencias entre ambas moléculas inmunoestimulantes.

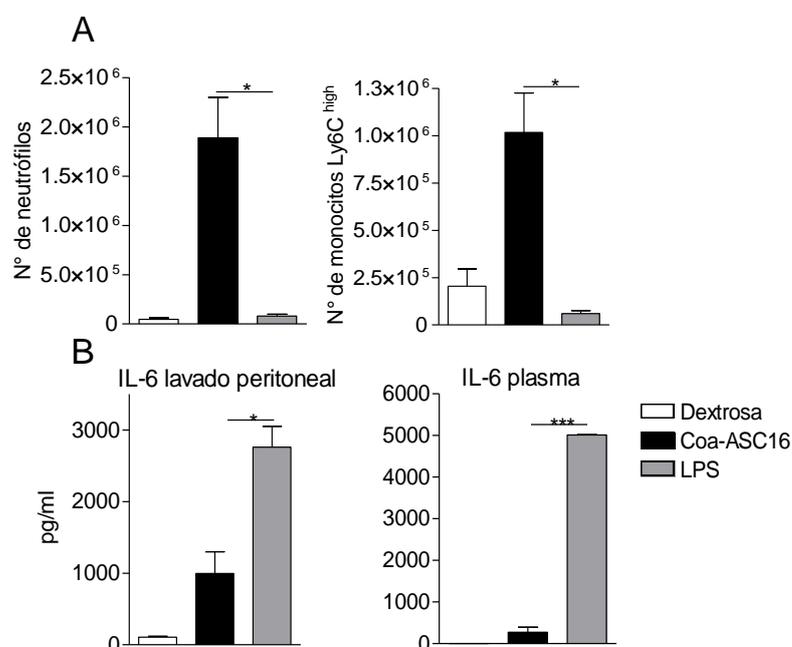


Figura 2.16. **LPS y Coa-ASC16 inducen diferente actividad inflamatoria.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con LPS (100µg/ratón), Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de neutrófilos (Ly-6C^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6C^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 determinada por ELISA en plasma y sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p < 0,05; ***p < 0,001.

Dado que TLR2 forma heterodímeros con TLR1 y TLR6; TLR4 con TLR6; TLR3 no involucra a MyD88 en su cascada de señalización; TLR5 reconoce la flagelina; TLR8 no es funcional en ratones; TLR11 y TLR12 responden a profilina del toxoplasma y TLR13 responde a ARN bacteriano, consideramos que sólo queda por evaluar la implicancia de TLR7 y TLR9.

Para comenzar a estudiar si TLR7 está involucrado en la respuesta inmune innata inducida por Coa-ASC16, ratones BALB/c se inyectaron de forma i.p. con 100 µg del inhibidor químico de TLR7: IRS661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3'), el cual ya ha sido utilizado para ensayos *in vivo* previamente (165). Luego de 10 minutos,

los mismos animales se inyectaron con 50 μ L de Coa-ASC16 o dextrosa (control). Al cabo de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal para el estudio del reclutamiento celular mediante citometría de flujo y niveles de citoquinas en sobrenadantes de lavado peritoneal. Como se observa en la figura 2.17 A y B, no hay diferencias en el influjo de células y la producción de IL-6, entre los ratones tratados y sin tratar previamente con el inhibidor de TLR7. Sin embargo, se puede observar que aquellos que recibieron el antagonista IRS661, fallan en la inducción de IL-12.

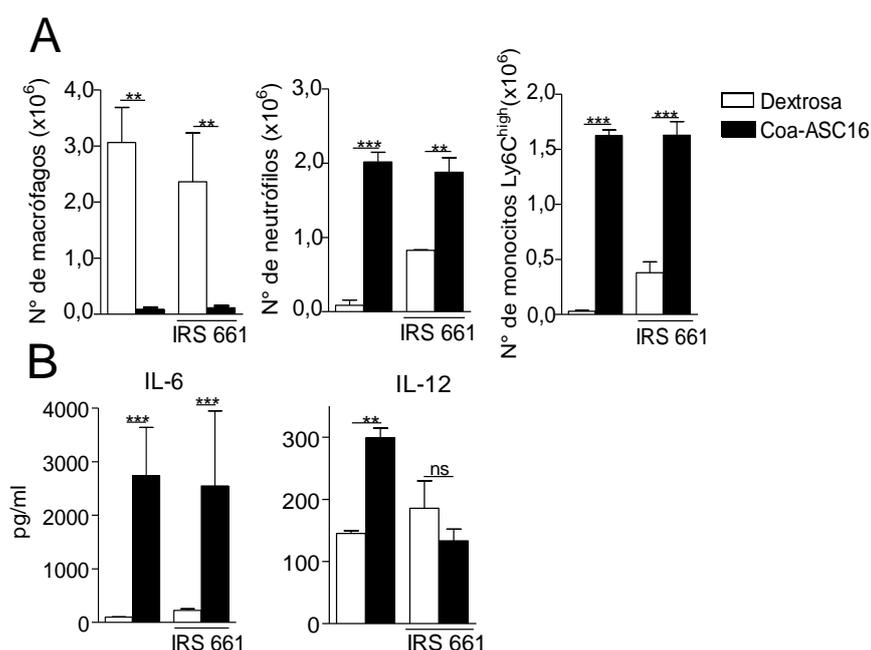


Figura 2.17. **La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de TLR7 a excepción de la inducción de IL-12.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 100 μ g de IRS 661 (5'TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') y 10 minutos después, se les administró de forma i.p. Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), Número de neutrófilos (Ly-6C^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6C^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12 determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

De la misma forma, se procedió al estudio de la implicancia de TLR9 en el mecanismo inflamatorio de Coa-ASC16. En este caso se utilizó el inhibidor químico de TLR9: IRS 869 (5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3), cuyo uso *in vivo* también ha sido reportado previamente (166). Ratones BALB/c se inyectaron de forma i.p. con 100 μ g del inhibidor y 10 minutos después se les administró a través de la misma vía

Coa-ASC16 o dextrosa. Al cabo de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Como se puede observar en la figura 2.18 A y B, los animales previamente tratados con el inhibidor fueron capaces de reclutar neutrófilos y monocitos Ly6C^{high}, pero fallaron en la inducción de IL-6 e IL-12. Estos resultados indican que la producción de citoquinas inducida por Coa-ASC16 en el sitio de inyección depende de la señalización a través de TLR9.

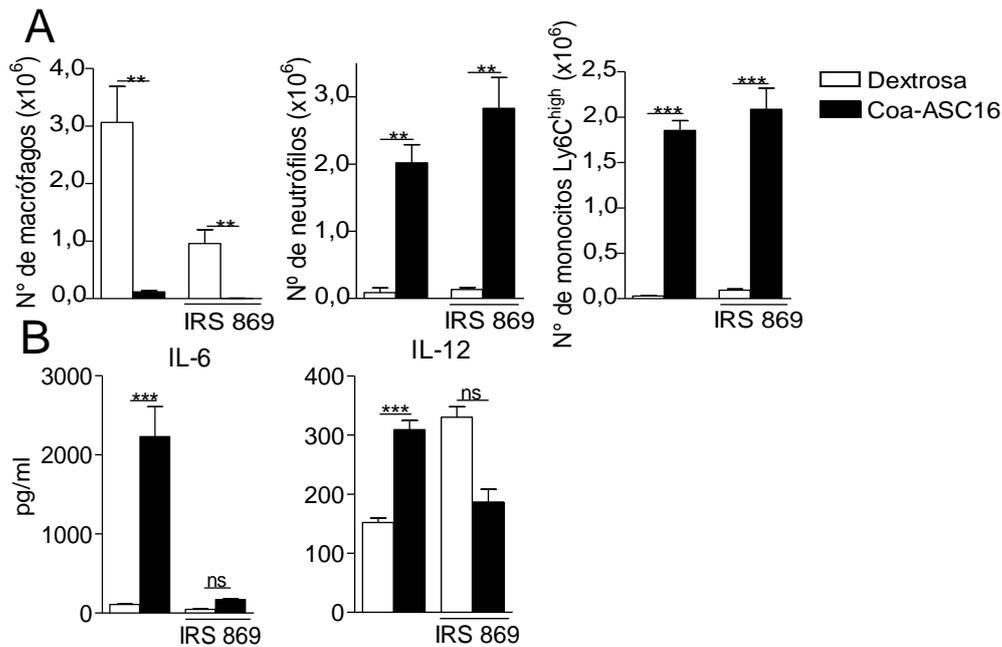


Figura 2.18. La producción de IL-6 e IL-12 inducida por Coa-ASC16 depende de TLR9. Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 100µg de IRS 869 (5'-TCCTGGAGGGTTGT-3) y 10 minutos después, se les administró por vía i.p. Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. (A) Número de macrófagos (F4/80⁺), Número de neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. (B) Concentración de IL-6 e IL-12 determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Con motivo de confirmar estos resultados, se repitió el experimento en ratones *Tlr9*^{-/-}. De esta manera estos animales y su contraparte wt, fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa. Luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal para el estudio del reclutamiento celular y la producción de citoquinas en el sitio de inyección. Como se observa en la figura 2.19 A y B, los resultados obtenidos coinciden con los anteriores, la deficiencia del receptor TLR9 afecta significativamente la producción de IL-6 e IL-12 en el sitio de inyección.

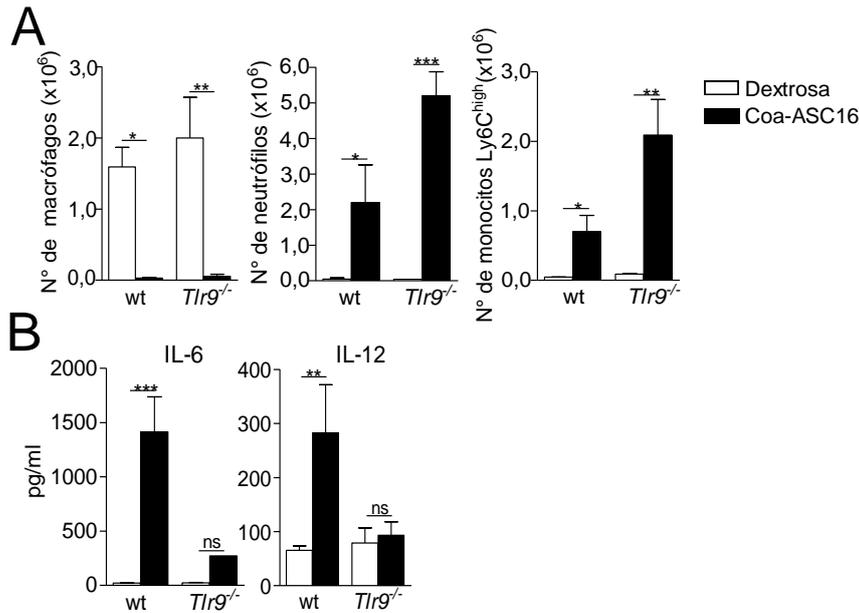


Figura 2.19. **Ratones *Tlr9*^{-/-} fallaron en la inducción de IL-6 e IL-12 luego del tratamiento con Coa-ASC16.** Ratones wt (C57BL/10) y *Tlr9*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), Número de neutrófilos (Ly-6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12 determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Teniendo en cuenta que los ligandos descritos para TLR7 y TLR9 son shARN y dhADN, respectivamente (Tabla 2.1); es que estos resultados nos permitieron hipotetizar que Coa-ASC16, probablemente, esté actuando mediante la inducción de “señales de daño”. Es decir, luego de su inyección, genera daño a nivel local con la consecuente liberación de DAMPs los cuales activan o “dan alarma” al sistema inmune innato. Esta hipótesis se basa además, en que el monómero de Coa-ASC16, ASC16, es una molécula anfifílica que se comporta como surfactante y como tal, se ha descrito previamente, que posee la capacidad de interactuar con membranas biológicas y artificiales (167-168). En base a estos antecedentes, nuestro próximo objetivo fue dilucidar si Coa-ASC16 induce un daño local y transitorio que genere DAMPs, los cuales se comportarían como “adyuvantes endógenos”.

2.5.iii. Evaluación de muerte o daño celular a nivel local

Con el objetivo de estudiar si la inyección de Coa-ASC16 podría estar generando daño celular local, se desarrolló un estudio de viabilidad celular mediante citometría de flujo. Para ello, ratones BALB/c se inyectaron de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa y luego de 10 minutos se obtuvo el lavado peritoneal. Se realizó una inmunomarcación de las células de la cavidad peritoneal utilizando anexina V y 7-aminoactinomicina D (7AAD), para luego ser analizadas por citometría de flujo. De esta manera, se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células 7AAD⁺ Annexina V 10 minutos luego de la inyección intraperitoneal con Coa-ASC16 (Fig. 2.20 A), lo que indica que la nanoestructura induce una muerte celular. Además, analizamos el número total de células de la cavidad peritoneal a las 2 y 6 horas luego del tratamiento con Coa-ASC16. La disminución de leucocitos que se observa a las 2 horas del tratamiento, es coincidente con el primer resultado, revirtiéndose el efecto rápidamente a las 6 horas (Fig. 2.20 B). De esta manera podemos decir que Coa-ASC16 genera una muerte celular local en el sitio de inyección.

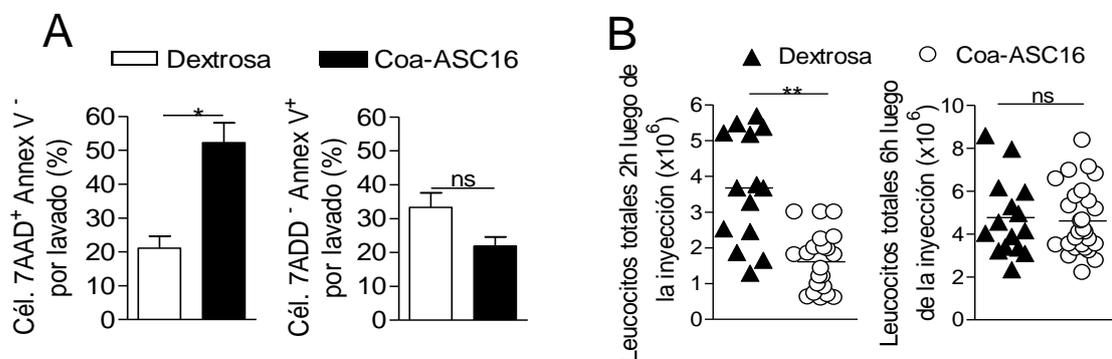


Figura. 2.20. **Coa-ASC16 induce daño celular transitorio a nivel del sitio de inyección.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con dextrosa o Coa-ASC16 y se obtuvo el lavado peritoneal. **(A)** Estudio de viabilidad celular por citometría de flujo. Las barras muestran el porcentaje total de células 7-AAD⁺ Annex V⁻ y células 7-AAD⁻ Annex V⁺ en la cavidad peritoneal 10 minutos luego de la inyección. **(B)** Número total de leucocitos en la cavidad peritoneal 2 y 6 horas después del tratamiento con Coa-ASC16. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 3 experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ns: no significativo.

Además, en sobrenadantes de lavado peritoneal se determinó un aumento transitorio y significativo de enzimas intracelulares tales como: ALT, AST y lactato deshidrogenasa (LDH), principalmente a las 2 horas luego de la inyección de Coa-ASC16 (Fig. 2.21), patrón que coincide con los experimentos anteriores de viabilidad celular (Fig. 2.20).

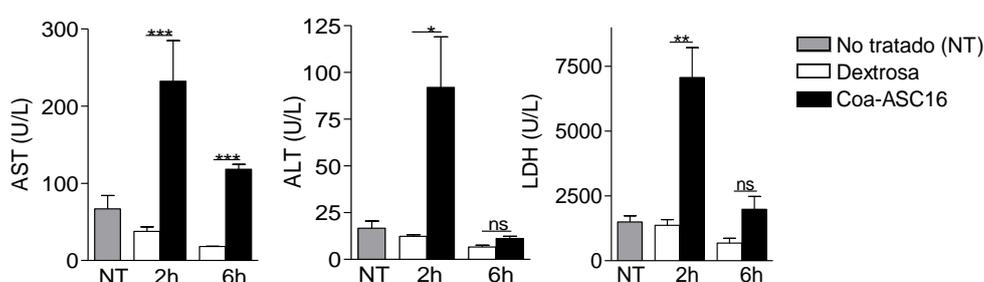


Figura. 2.21. **Coa-ASC16 induce la liberación de enzimas intracelulares a nivel del sitio de inyección.** Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con dextrosa o Coa-ASC16. Concentración en sobrenadantes de lavados peritoneales de AST, ALT y LDH 2 y 6 horas luego de la inyección. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 5 experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y, como se describía en la introducción de este capítulo, que el daño o muerte celular tienen como consecuencia la inducción de DAMPs, los cuales pueden alertar al sistema inmune a través de los PRRs; es que se evaluó la presencia de algunas de estas “señales de daño” a nivel del sitio de inyección.

Basados en los resultados de los experimentos de viabilidad celular y los obtenidos respecto a la implicancia de TLR9 en la cascada de señalización desencadena luego de la administración de Coa-ASC16, es que se determinó la presencia de dhADN (ligando de TLR9) en sobrenadantes de lavado peritoneal. De esta manera, se detectó un aumento significativo de dhADN en el sitio de inyección luego de 2 horas de la administración de Coa-ASC16, el cual fue reducido por el tratamiento previo de las muestras con la enzima DNasa (Fig. 2.22).

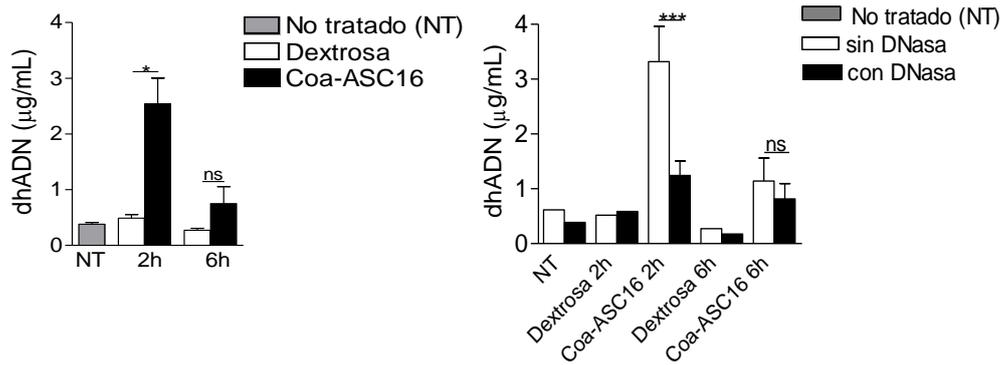


Figura 2.22. **El Coa-ASC16 genera un aumento transitorio de dhADN en el sitio de inyección.** Concentración de dhADN en lavado peritoneal con o sin tratamiento previo con DNasa. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de 5 experimentos independientes. *p < 0,05; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Con el objetivo de establecer si el dhADN liberado luego de la administración de Coa-ASC16, es responsable *in vivo* de la producción de las citoquinas IL-6 e IL-12; es que ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con 1mg de DNasa I 10 minutos antes de la administración de Coa-ASC16. Luego de 6 horas del tratamiento con la nanoestructura, se obtuvo el lavado peritoneal. Como se puede observar en la figura 2.23 A y B el tratamiento con la enzima no afecta el reclutamiento celular pero si la producción de IL-6 e IL-12 a nivel del sitio de inyección (patrón similar a lo observado con los ratones *Tlr9*^{-/-} y con el inhibidor de TLR9). Todos estos resultados indican que efectivamente el Coa-ASC16 induce la liberación del DAMP dhADN el cual es reconocido por TLR9 cuya activación induce la producción de IL-6 e IL-12.

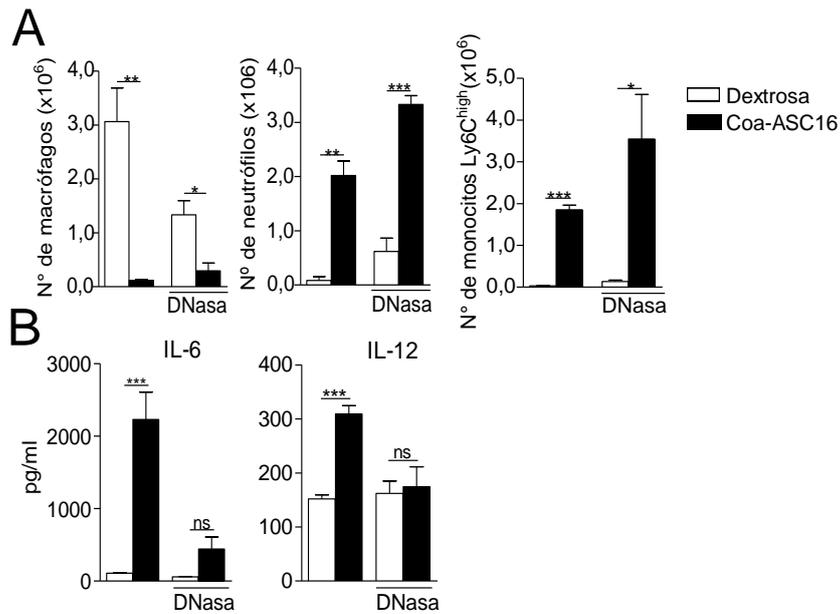


Figura 2.23. La señalización a través de dhADN inducida por Coa-ASC16 es responsable de la producción de IL-6 e IL-12. Ratones BALB/c fueron inyectados de forma i.p. con DNase I 10 minutos antes de la administración de Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly6G^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6G^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12 determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p<0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

2.6.iv. Evaluación de la implicancia de NLRP3 en la actividad inflamatoria de Coa-ASC16

NLRP3 es un PRR capaz de reconocer una gran variedad de DAMPs incluyendo dhADN (169) con la consecuente producción de IL-1 β . También ha sido involucrado en el mecanismo de acción de algunos de los adyuvantes en los cuales no se han detectado PAMPs (170). Estos datos nos llevaron a hipotetizar que podría existir una relación entre éste y la actividad inflamatoria del Coa-ASC16. Para evaluarlo, ratones wt y *Nlrp3*^{-/-} se inyectaron de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control) y luego de 6 horas se obtuvo el lavado peritoneal. Como se puede observar en la figura 2.24 A y B la deficiencia de NLRP3 no afecta la actividad inflamatoria de Coa-ASC16.

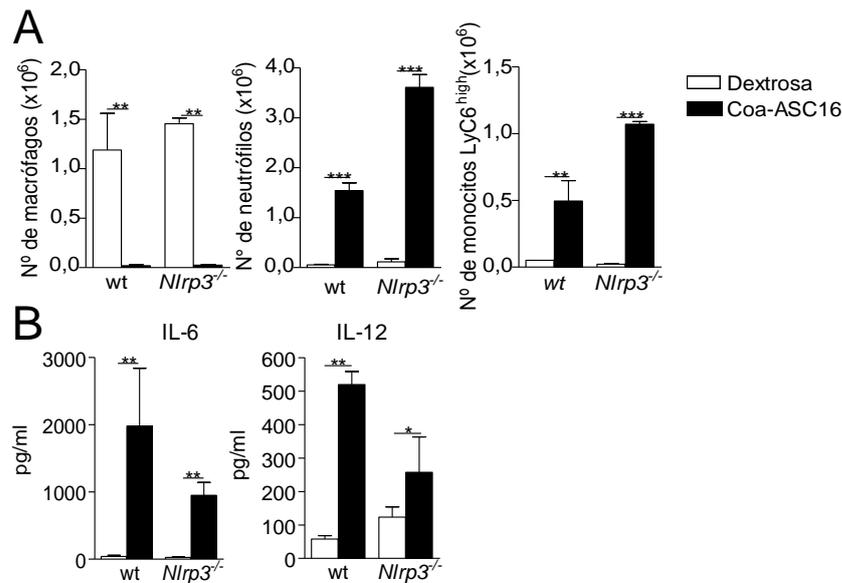


Figura 2.24. **La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es independiente de NLRP3.** Ratones wt (C57BL/6) y *Nlrp3*^{-/-} fueron inyectados de forma i.p. con Coa-ASC16 o dextrosa (control). A las 6 horas luego de la inyección, la cavidad peritoneal fue lavada con HBSS a 4°C. **(A)** Número de macrófagos (F4/80⁺), neutrófilos (Ly-6C^{high} F4/80^{neg} Ly-6C⁺) y monocitos (Ly6C^{neg} F4/80^{neg} Ly-6C^{high}) en la cavidad peritoneal. **(B)** Concentración de IL-6 e IL-12 determinada por ELISA en sobrenadantes de lavado peritoneal. Los datos representan la media±SEM de valores individuales (3/4 ratones/tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p<0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Si bien está descripto que la activación del inflamasoma NLRP3 es uno de los mecanismos a través del cual se induce la maduración de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β , aún no hemos evaluado si el mismo está involucrado en este proceso luego de la administración de Coa-ASC16. Para ello, se requieren estudios a tiempos más cortos y de mayor profundidad, los cuales constituyen objetivos a corto plazo como proyección del presente tema de investigación. Además, en el grupo se proyecta el estudio de la implicancia de la vía IL-1/IL-1R1 en el desarrollo de la respuesta inmune innata desencadenada por Coa-ASC16.

3. Estudio de la capacidad adyuvante de Coa-ASC16.

El éxito de algunos de los adyuvantes consiste en la inducción de un influjo de células de la inmunidad innata al sitio de inyección y una subsecuente activación del sistema inmune adaptativo (171). Para estudiar si este es el caso del Coa-ASC16, se decidió evaluar si el mismo presenta actividad adyuvante “per se”. De esta manera, se inmunizaron ratones de forma s.c. en el día 0, 7 y 14 con OVA u

OVA/Coa-ASC16. En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo. Como se puede observar en la figura 2.25 A, aquellos animales que habían sido inmunizados con OVA/Coa-ASC16 presentaron mayores títulos de IgG1 e IgG2c en plasma que los inmunizados con OVA. Además, la producción de IFN- γ luego de que los esplenocitos fueran estimulados *ex vivo* con OVA, también fue significativamente mayor en este grupo de animales (Fig. 2.25 B). Por otro lado, cuando el protocolo de inmunización se repitió en animales *Tlr4*^{-/-} y su contraparte wt se determinó que la actividad adyuvante de Coa-ASC16 es independiente de la señalización a través de TLR4 (Fig. 2.25 A y B).

Dado que la actividad inflamatoria de Coa-ASC16 depende de la proteína adaptadora MyD88 (Fig. 2.14), se evaluó la propiedad adyuvante del mismo en ratones que carecen de esta proteína adaptadora. De esta manera, se repitió el protocolo de inmunización por vía s.c. en ratones wt y *Myd88*^{-/-}. El último grupo falló en la inducción principalmente de IgG2c e IFN- γ ; sin embargo fueron capaces de producir IgG1 aunque en menor cantidad que su contraparte wt (Fig 2.25 A y B). Estos resultados demuestran que la respuesta inflamatoria del Coa-ASC16 está vinculada o desencadena una posterior respuesta inmune adaptativa y que además, su actividad adyuvante es independiente de la señalización por TLR4, por lo que tampoco se debe a la contaminación por endotoxinas.

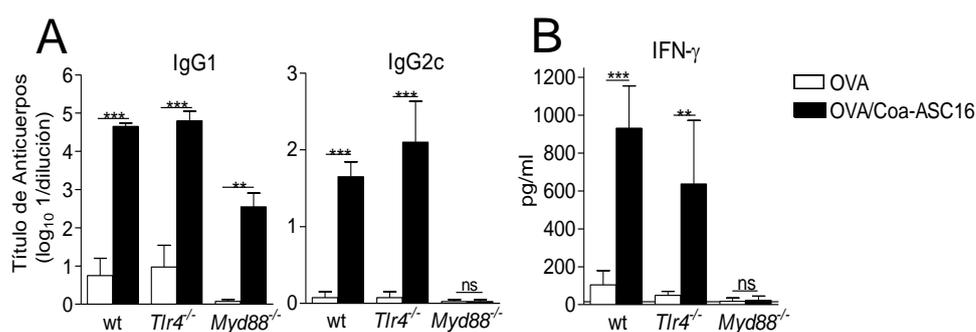


Figura. 2.25. El Coa-ASC16 posee actividad adyuvante independiente de TLR4 pero dependiente de MyD88. Ratones wt (C57BL/6), *Myd88*^{-/-} y *Tlr4*^{-/-} fueron inmunizados (s.c.) con OVA u OVA/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo de estos ratones. **(A)** Título de IgG1 e IgG2c específicos para OVA. **(B)** Producción específica de IFN- γ proveniente de suspensiones de esplenocitos cultivados con medio u OVA durante 72 horas determinadas por ELISA. La concentración de esta citoquina producidas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en los pocillos con medio. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones/ tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. La línea completa representa el límite de detección del ensayo. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

Por otro lado, teniendo en cuenta estos últimos resultados y que una de las señales que desencadena la respuesta inmune innata inducida por Coa-ASC16 es el dhADN, ligando de TLR9, con la consecuente inducción de IL-6; es que evaluamos la implicancia de esta citoquina en la actividad adyuvante de Coa-ASC16. Para ello, ratones wt y *Il-6*^{-/-} fueron inmunizados de forma s.c. al día 0, 7 y 14 con OVA u OVA/Coa-ASC16. Al día 21 se obtuvo el plasma y bazo. Como se puede observar en la figura 2.26 A y B los animales deficientes de IL-6 e inmunizados con OVA/Coa-ASC16 no fueron capaces de inducir IgG2c e IFN- γ . Estos resultados sitúan a IL-6 como una molécula puente entre la inmunidad innata y la adaptativa inducida por Coa-ASC16.

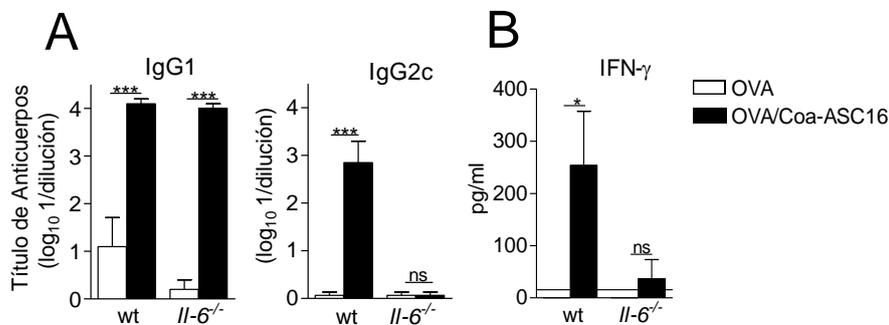


Figura. 2.26. La actividad adyuvante de Coa-ASC16 depende de IL-6. Ratones wt (C57BL/6) y *Il-6*^{-/-} fueron inmunizados (s.c.) con OVA u OVA/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. En el día 21 luego de la primera inmunización, se obtuvo el plasma y el bazo de estos ratones. **(A)** Título de IgG1 e IgG2a específicos para OVA. **(B)** Producción específica de IFN- γ proveniente de suspensiones de esplenocitos cultivados con medio u OVA durante 72 horas determinadas por ELISA. La concentración de esta citoquina producidas en respuesta a OVA se calculó mediante la sustracción de las concentraciones determinadas en los pocillos con medio. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones/ tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. La línea completa representa el límite de detección del ensayo **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: no significativo.

4. Conclusiones Capítulo II.

En este segundo capítulo, se pudo demostrar que Coa-ASC16 induce un importante reclutamiento celular a nivel del sitio de inyección, el cual es a expensas de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} con producción de IL-1 β , IL-6 e IL-12. Este efecto es dependiente de la proteína adaptadora MyD88 e independiente de la señalización por TLR2 y TLR4. También demostramos un mecanismo indirecto de activación del sistema inmune innato mediado, al menos en parte, por un DAMP (dhADN) a través de TLR9.

Por primera vez se presenta al Coa-ASC16 como adyuvante, cuya propiedad es dependiente de MyD88 e IL-6, lo que permite establecer una relación de causa-efecto entre su efecto inflamatorio y la posterior respuesta inmune adaptativa.

De esta manera, se considera que el estudio profundo del mecanismo del Coa-ASC16 es esencial para su uso racional en el diseño de nuevas vacunas. Además, constituye un desafío para la inmunobiología básica que desde hace unos años ha comenzado a estudiar el impacto que estos nuevos biomateriales tienen en el sistema inmune innato.

Discusión

Las vacunas se pueden clasificar en tres grandes grupos: vivas atenuadas, inactivadas y a subunidades proteicas. El último grupo es más seguro pero menos inmunogénico, por lo tanto el adyuvante tiene un papel central en la generación de una respuesta efectiva (172). Además, se ha demostrado recientemente que las diferencias a nivel genético y de exposición ambiental entre los individuos de diferentes regiones del mundo, determinan diferencias en la respuesta inmune innata hacia los adyuvantes, lo que lleva a la heterogeneidad en la eficacia de las vacunas. El modo de nacimiento (natural o cesárea), el peso al nacer, y la estación del año tienen impacto en la respuesta inmune innata postnatal. Por ejemplo, los nacimientos en invierno están asociados con menor producción de IL-12p70 mediada por TLR3 y mayor producción de IL-10 tras la estimulación de TLR7; lo que conduce a una menor respuesta a las vacunas (173). Otros factores como la edad, el estado nutricional, enfermedades crónicas y enfermedades infecciosas emergentes también repercuten en la respuesta inmune hacia los adyuvantes. Por lo tanto, existe una necesidad urgente en desarrollar estrategias inmunoadyuvantes especialmente dirigidas y que protejan a aquellos individuos más vulnerables (174).

En este contexto, nosotros analizamos una nueva estrategia adyuvante que consiste en la formulación de CpG-ODN con Coa-ASC16 utilizando OVA como antígeno modelo. Se demostró que la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 comparada con CpG-ODN sin formular, aumentó de manera significativa tanto los niveles de IgG1 e IgG2a (respuesta inmune humoral), como la inducción de IFN- γ e IL-17 (respuesta inmune celular); incluso utilizando la mitad de la dosis del oligodeoxinucleótido (Fig. 1.1 A y B, 1.10 A y B). También se observó que el Coa-ASC16 acelera la seroconversión (Fig. 1.9 A). La potenciación de la actividad de CpG-ODN es de mayor relevancia tanto en animales domésticos como humanos, ya que en estos casos, el oligodeoxinucleótido, no tiene la misma potencia que la demostrada en roedores, posiblemente debido a las diferencias entre roedores y otros mamíferos respecto a la expresión de TLR9 (50, 175). Aunque el costo del oligodeoxinucleótido no sería el principal factor limitante en vacunas destinadas a humanos, esto sí podría serlo en animales de gran tamaño. Además, el uso de una menor dosis de CpG-ODN podría limitar la toxicidad observada en situaciones en

las que CpG-ODN sin formular se utilizó de manera crónica. Por ejemplo, Heikenwalder y col. observaron toxicidad hepática a partir del día 20 cuando se les administró a roedores una dosis de 60 µg/día (69). Por lo tanto, la posibilidad de reducir la dosis de CpG-ODN representa otro beneficio de esta nueva estrategia adyuvante. Además, la utilización de menores dosis de antígeno (no evaluado en esta tesis)/adyuvante y la alta velocidad en la seroconversión en una respuesta inmune específica, son puntos críticos en situaciones de pandemia.

Los hallazgos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis, son consistentes con otros previos que demuestran la potenciación de la actividad adyuvante de CpG-ODN mediante su formulación con una amplia variedad de estrategias (22, 96-97, 176). Sin embargo, resulta complicado comparar las diferentes formulaciones reportadas en la literatura con la nuestra, ya que tanto la dosis como el tipo de CpG-ODN, naturaleza y dosis del antígeno, vía de administración y la cepa de ratón son diferentes. Por ejemplo, dos trabajos diferentes muestran el incremento en la respuesta contra OVA mediante la formulación de CpG-ODN con nanoliposomas aniónicos (105) o ISCOMATRIX (177). Erikci y col., reportaron que ratones BALB/c inmunizados (día 0 y 14) con OVA libre de endotoxinas/CpG-ODN tipo A, encapsulados en nanoliposomas cargados negativamente mostraban títulos anti-OVA de IgG1 e IgG2a en el día 28 post primera inmunización (105), similares a los que se presentan en este trabajo de tesis en el día 13 post primera inmunización, luego de haber inmunizado los ratones con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0 y 7 (86). De la misma forma, McCluskie y col., mostraron que ratones C57BL/6 inmunizados con OVA/CpG-ODN/ISCOMATRIX (día 0, 14 y 21) presentaban títulos anti-OVA de IgG2c en el día 28 post primera inmunización (177), similares a los que se obtienen con nuestra formulación (86).

Uno de los principales objetivos de la vacunación es generar una protección contra infecciones o cáncer que se mantenga a lo largo del tiempo, es decir, una respuesta inmune de memoria (178). Una característica que distingue a la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es la potenciación de la respuesta inmune celular con perfil Th1 y Th17 y el hecho de que esta se mantiene en el ratón, hasta

por lo menos, 6,5 meses (Fig. 1.7), lo que representa en los roedores aproximadamente un tercio de su promedio de vida.

Son muchos los ensayos clínicos que han evaluado la actividad adyuvante de ligandos de TLR9, principalmente CpG-ODN “clase B” (también llamado clase K). En algunos de estos, se ha evaluado la utilización de CpG-ODN combinado con vacunas ya licenciadas. Un ejemplo es la administración de la vacuna comercial Engerix-B (recombinante del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B adsorbido en aluminio) formulada con CpG-ODN, esta vacuna induce títulos de anticuerpos protectivos en adultos infectados con HIV los cuales no responden a la vacunación con Engerix-B sin CpG-ODN (fase clínica 1b completa) (8, 179). En este trabajo de tesis, se encontró que la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 es más eficiente que CpG-ODN/Al(OH)₃ en inducir una respuesta celular de tipo Th1 y Th17 (Fig. 1.8). Cabe aclarar que si bien es cierto que a las células Th17 se las ha involucrado en la inducción de autoinmunidad, también ha sido demostrado que una respuesta Th17 puede cumplir un rol fundamental en ciertas vacunas contra un amplio rango de patógenos, por ejemplo contra *Klebsiella pneumoniae* β-lactamasa resistente a antibióticos (180). Sin embargo, los adyuvantes licenciados para su uso en humanos no son buenos promotores de una respuesta celular Th1 y/o Th17. El adyuvante CFA, el cual se utiliza sólo de forma experimental, es uno de los más potentes en inducir respuesta Th1 conjuntamente con Th17 (181), pero este está asociado con múltiples efectos adversos y por lo tanto su uso no está aprobado en humanos (91). Sería prematuro sugerir que la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 no induciría efectos secundarios adversos en estudios clínicos futuros. Sin embargo, teniendo en cuenta los estudios preclínicos de toxicidad sistémica realizados en sangre y mediante la evaluación histopatológica de diversos órganos (Fig. 1.11 A-C), CpG-ODN/Coa-ASC16 parecería no tener estas limitaciones. Esta formulación es por lo tanto un interesante avance para el desarrollo de nuevas vacunas contra diversos patógenos, cáncer y para grupos de pacientes específicos no inmunocompetentes tales como neonatos y ancianos.

El adyuvante CpG-ODN no es del todo efectivo cuando se utiliza de forma soluble y por lo tanto muchos grupos han desarrollado diferentes estrategias para potenciar su actividad adyuvante *in vivo* (22, 96-97, 176). Muchas de estas

estrategias fueron efectivas pero muchas de ellas presentan inconvenientes fundamentalmente relacionados con la imposibilidad de producción a gran escala y la toxicidad asociada con las matrices catiónicas. La formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 que se propone en este trabajo de tesis posee muchas de las características que definen a un adyuvante ideal y algunas de ellas se describen en la introducción de este trabajo (generar una respuesta que se mantenga a lo largo del tiempo, producción fácil, de bajo costo y a gran escala, contener un mínimo número de moléculas biológicas, etc). Además Coa-ASC16 posee muchas características que hacen del mismo una plataforma atractiva para uso biomédico: i) es un compuesto formado por ácido ascórbico y palmítico, ambos biodegradables, ii) el ácido ascórbico preserva sus propiedades antioxidantes (81); de hecho, recientemente, un investigador colaborador de esta línea de investigación, utilizó ASC16 como antioxidante de la amiodarona (un fármaco para el tratamiento de enfermedades cardíacas), con el fin de reducir la conocida toxicidad de la droga (182). Finalmente, iii) ASC16 se encuentra dentro de la lista de sustancias GRAS, iv) es de fácil producción y de bajo costo.

Otro punto de importancia es el hecho de que ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN desarrollaron una respuesta inmune específica muy débil. Estos hallazgos coinciden con los reportados por otros autores que utilizaron antígenos altamente purificados (177, 183), pero difieren de numerosos estudios publicados. Por ejemplo, otros investigadores y trabajos previos de nuestro grupo, muestran que ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN en solución eran capaces de desarrollar una muy buena respuesta inmune específica (62). Una posible explicación de esta discrepancia podría ser el tipo de OVA utilizada, debido a que algunas formas comerciales de la misma usualmente contienen contaminantes. Además en este trabajo demostramos que en ausencia de TLR4, la potenciación de la respuesta inmune generada por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 era similar a la obtenida en su contraparte wt (Fig. 1.2 A y B). Esto excluye la posibilidad que trazas residuales de endotoxina en OVA, CpG-ODN o Coa-ASC16 podrían ser responsables de este efecto. Por lo tanto, estos resultados indican que OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es una excelente estrategia para inducir una respuesta inmune específica cuando el antígeno posee una inmunogenicidad débil (antígenos a

subunidad) como es el caso del antígeno OVA utilizado en el presente trabajo de tesis.

En inmunología, el término “adyuvante” compromete a todas las moléculas, compuestos o formulaciones que son capaces de modificar la respuesta inmune específica cuando se utilizan en combinación con el antígeno. Los adyuvantes modifican la respuesta inmune adaptativa a través de uno o varios mecanismos, incluyendo la formación de un “depot” (liberación local y sostenida en el tiempo de los componentes de una vacuna), una respuesta inflamatoria local apropiada, un aumento de la biodisponibilidad y en consecuencia, en la duración de la acción de compuestos inmunomoduladores, el “delivery” específico a determinados tipos celulares del antígeno y/o adyuvantes, etc (7, 9, 184-185). Muchos adyuvantes fueron descubiertos de forma empírica y el progreso en el conocimiento de sus mecanismos de acción es lento, lo que en parte explica porque el número de adyuvantes aprobados para uso humano es muy bajo (21). La primera parte de este trabajo de tesis muestra que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 posee propiedades adyuvantes significativas. Luego se comenzó a estudiar el/los posible/s mecanismo/s de acción involucrado/s. El correspondiente a CpG-ODN ha sido bien caracterizado. Los motivos CpG, característicos del DNA bacteriano representan “señales de daño” para el sistema inmune innato (50), siendo el TLR9 el mediador de este efecto inmunoestimulante (44). Sin embargo al inicio de esta tesis, nada se conocía acerca de cómo actúa el Coa-ASC16 para mejorar la efectividad de este inmunomodulador.

El estudio del mecanismo permite aportar datos básicos sobre el modo de acción de esta nueva estrategia adyuvante, hecho sumamente relevante ya que el entendimiento del mecanismo de un adyuvante y/o su plataforma permite la selección racional del mismo en el momento del diseño de futuras vacunas y predecir posibles efectos tóxicos.

De esta manera, en primer lugar, se investigó si la formulación completa era necesaria para lograr el efecto potenciador. Para lo cual se realizó un análisis de inmunización comparativo entre el régimen de co-formulación vs el régimen de co-inyección. Bajo este último, no se observó un aumento en la actividad

adyuvante de CpG-ODN (Fig. 1.13 A y B), lo que indica que la formulación del oligodeoxinucleótido en Coa-ASC16 es requerida para lograr este efecto. Estos datos sugieren, que la inyección mediante el régimen de co-formulación probablemente provea otros beneficios *in vivo*, no estudiados en este trabajo de tesis, como la formación de un efecto “depot” para mantener los componentes de la vacuna a nivel del sitio de la inyección. Es conocido que estructuras como el Coa-ASC16 poseen cierta rigidez, lo que les confiere la capacidad de modular la liberación de ciertas moléculas al medio biológico y proveerles de cierta estabilidad (80). En este trabajo, cuando se formuló OVA/CpG-ODN con Coa-ASC16 se detectó, *in vitro*, una liberación sostenida tanto del antígeno como del adyuvante (Fig. 1.5 A-C). Este tipo de cinética de liberación podría generar *in vivo* un efecto “depot”, el cual en ocasiones hace posible la reducción de la dosis y/o el número de inmunizaciones requeridas para una respuesta óptima. Relacionado con esto, la formulación de CpG-ODN con Coa-ASC16 permitió utilizar la mitad de la dosis del oligodeoxinucleótido (Fig. 1.10 A-C). Además, la respuesta inmune específica luego de dos inmunizaciones (día 0 y 7) con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 fue mayor que la observada en ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN que recibieron tres inmunizaciones (día 0, 7 y 14) (Fig. 1.9 B y C). Evidentemente, se podría estar dando *in vivo* un efecto de liberación sostenida en el tiempo, tanto del antígeno y/o adyuvante, lo que hace de esta estrategia un reservorio para los componentes de la vacuna a nivel del sitio de la inyección. Por otro lado, no se puede afirmar que el efecto potenciador de Coa-ASC16 sobre CpG-ODN podría estar dado, al menos en parte, por la protección que ejerce la nanoestructura sobre el oligodeoxinucleótido de la degradación por nucleasas, ya que se trabajó con CpG-ODN (PS), el cual es relativamente resistente a esta acción enzimática (Fig. 1.6 A-B). Sin embargo, no se subestima el efecto de protección que Coa-ASC16 ejerce sobre CpG-ODN (PO), ya que esta estrategia podría hacer posible el reemplazo de CpG-ODN (PS) por el CpG-ODN (PO) en futuros estudios de vacunas. Por otro lado, también se demostró que la formulación con Coa-ASC16 aumenta el número absoluto de células en ganglios linfáticos drenantes y por lo tanto el número de linfocitos que proliferan en respuesta a un estímulo específico (Fig. 1.4

C y D), todos estos resultados explican, al menos en parte, la potenciación que ejerce Coa-ASC16 sobre la actividad adyuvante de CpG-ODN.

Luego, estudiamos si Coa-ASC16 es un material inerte o no para el sistema inmune. Por cuestiones de practicidad y fácil acceso empleamos la vía i.p. Nuestros estudios demostraron que el Coa-ASC16, por sí mismo, es reconocido por el sistema inmune innato, desencadenando una respuesta inflamatoria temprana en el sitio de la inyección (Fig. 1.12 A y B, Fig. 2.6 A-C). Esta respuesta fue caracterizada por el rápido reclutamiento de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} (dependiente de la interacción CCL2/CCR2, figura 2.8 A) asociado con la producción de IL-6, IL-12 y IL-1 β . Este efecto inflamatorio resultó independiente de la señalización por TLR4 y TLR2 (Fig. 2.15 A y B). Además cuando se utilizó Coa-ASC16 para formular OVA/CpG-ODN, el influjo celular en el sitio de inyección desencadenado por este último, se modificó tanto cualitativa como cuantitativamente (Fig. 1.12 A). Ya que el Coa-ASC16 se administró sin antígeno (algunos grupos experimentales de la Fig. 1.12 y Fig. 2.6), la activación de las células de la inmunidad innata fue independiente de este y, seguramente, “upstream” de las CD. Si bien, somos conscientes que los resultados obtenidos mediante los experimentos realizados luego de la inyección i.p. de Coa-ASC16, no son directamente extrapolables a lo que sucede una vez que la nanoestructura se administra de forma s.c.; cabe destacar que en ambos casos se observó un marcado infiltrado inflamatorio a expensas de células polimorfonucleares y mononucleares. En este trabajo de tesis no se abordó el estudio del rol de estas poblaciones celulares en el posterior desarrollo de una respuesta inmune específica, sin embargo hay trabajos si estudiaron este tópico. Vittoriano-Souza y col. demostraron que la inyección intradérmica (i.d.) de saponina, IFA y MPL induce el reclutamiento de neutrófilos, monocitos, linfocitos y CD, con la consecuente producción de citoquinas y quimioquinas (15). Los mismos resultados obtuvieron Calabro y col. cuando evaluaron la respuesta inmune innata luego de la inyección i.m. de sales de aluminio y MF59, en combinación o no con OVA o hemaglutinina del virus de influenza (21). Estos últimos, observaron que los neutrófilos y monocitos eran capaces de capturar el antígeno y migrar a ganglios linfáticos drenantes. Sin embargo, la exclusión de neutrófilos, no afectó la

actividad adyuvante de MF59 (21). Posiblemente otros tipos celulares son capaces de llevar a cabo las funciones de la población celular ausente.

Durante un largo periodo de tiempo, se relacionó a los neutrófilos exclusivamente con la respuesta inmune innata. Sin embargo, publicaciones de nuestro laboratorio y otros autores han demostrado que estos sirven de vehículo para transportar el antígeno hacia órganos linfáticos secundarios (21, 186). Los neutrófilos colaboran en el inicio de la respuesta inmune adaptativa mediante diversos mecanismos, tales como: la producción de citoquinas y quimioquinas que reclutan monocitos y CD así como modulan la diferenciación de macrófagos a un estado pro o antiinflamatorio (187-188); el transporte de patógenos intracelulares a ganglios linfáticos (189-190) y la internalización de antígenos para su “delivery” a CD (191). Tanto la caracterización de la respuesta inmune innata luego de la inyección s.c. de Coa-ASC16, como el estudio de la función e implicancia de los neutrófilos y monocitos reclutados al sitio de la inyección serán futuros objetos de estudio del tema de investigación.

En base a nuestros resultados, los descriptos anteriormente y por analogía con otros adyuvantes reconocidos (19, 125, 192) comenzamos a hipotetizar que el microambiente inmunocompetente local creado por Coa-ASC16 podría impactar en la respuesta inmune específica final contra OVA. Para probar esta hipótesis se comparó la respuesta inmune en ratones inmunizados con OVA vs OVA/Coa-ASC16, los resultados de estos experimentos mostraron que Coa-ASC16 posee actividad adyuvante por sí mismo (Fig. 2.25) y que tanto la actividad inflamatoria como la adyuvante dependen de la proteína adaptadora MyD88 (Fig. 2.14 y 2.25). Por lo tanto, esto permite establecer una relación de causa-efecto entre ambas propiedades. Además, mostramos que una de las moléculas que actúa como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa en nuestro modelo experimental es IL-6 y su producción requiere de la señalización inducida por dhADN (componente endógeno), que actúa como “señal de daño” (Fig. 2.23 A-B). De esta manera, estos resultados proveen de fuerte evidencia acerca de que el dhADN cumple un rol en la actividad adyuvante de Coa-ASC16. En coincidencia, muchos trabajos han implicado moléculas endógenas como el ácido úrico, dhADN y el ATP en las propiedades adyuvantes del aluminio y MF59 (19, 125-127).

MyD88 es una proteína adaptadora crítica en la señalización a través de los TLRs (excepto TLR3) y de los receptores de la familia de IL-1R (IL-1R1, IL-1R18, IL-1R33 o ST2) (193). En este trabajo se determinó que la actividad inflamatoria de Coa-ASC16 es totalmente independiente de TLR2, TLR4 y parcialmente dependiente TLR7 (Fig. 2.15 y 2.17). Sin embargo, la señalización a través de TLR9 estaría involucrada en la producción de IL-6 e IL-12 (Fig. 2.18 y 2.19). Ya que TLR2 forma heterodímero con TLR1 y TLR6; TLR5 se une a la flagelina; TLR8 no es funcional en ratón, TLR11 y TLR12 son los receptores para la profilina toxoplasmática y TLR13 responde a ARN ribosomal de origen bacteriano, consideramos que la señalización a través de los TLRs se ha evaluado de forma completa. Sin embargo, no podemos excluir los receptores de la familia de IL-1R, los cuales también podrían contribuir al efecto generado por Coa-ASC16, pero el estudio de los mismos no es abordado en este trabajo de tesis.

El Coa-ASC16 está formado por un éster que aún no se ha descrito como un PAMP. Sin embargo, se describió que uno de sus componentes, el ácido palmítico, es capaz de activar TLR2 (139, 141) y TLR4 (140), aunque nuestros resultados confirmaron que ambos receptores no son necesarios para inducir la respuesta inflamatoria generada por la nanoestructura. Por lo tanto, nosotros proponemos que el sistema inmune innato reconoce al Coa-ASC16 por un mecanismo indirecto mediado por dhADN y posiblemente otras moléculas endógenas, lo que probablemente surge de la habilidad de este tipo de estructura para interactuar y desestabilizar membranas biológicas y artificiales (167-168). Respecto a esto, Rasia y col. establecieron que la incubación de glóbulos rojos de sangre periférica de pacientes, con ASC8, ASC10, ASC12 y ASC16, a una concentración determinada, induce una pérdida significativa de la capacidad de deformabilidad característica de estas células, con un aumento de la fragilidad osmótica y la lipoperoxidación de la membrana (167). Esto se refuerza con un trabajo de Flach y col. donde proponen que las sales de aluminio activan a las CD alterando la estructura lipídica de su membrana plasmática, de esta manera, los lípidos de la membrana plasmática de las CD estarían actuando como sensores de adyuvantes como las sales de aluminio (194).

Estudios previos han establecido que la producción de IFN- γ por las células T y el “switch” a IgG2a/c es absolutamente dependiente de MyD88 (195-196). En este trabajo, se detectó que esta proteína adaptadora es necesaria tanto para la respuesta inmune innata como adaptativa desencadenada por el Coa-ASC16 (Fig. 2.14 y 2.25). Si el mecanismo adyuvante de esta nanoestructura dependiera exclusivamente de la inmunidad innata desencadenada por la señalización a través de MyD88, esta respuesta se vería afectada en su totalidad en ausencia de esta proteína adaptadora. Sin embargo, cuando se evaluó la respuesta inmune adaptativa de la formulación OVA/Coa-ASC16 en animales wt y *Myd88*^{-/-}, los ratones mostraron que a pesar de que la deficiencia de esta proteína reducía marcadamente la producción de IgG2c e IFN- γ , algo de la actividad adyuvante se mantenía particularmente en relación a la producción de IgG1 anti OVA (Fig. 2.25 A), lo que indica un efecto adyuvante adicional independiente de MyD88 (que es lo mismo que decir independiente de su actividad inflamatoria). Estos resultados eran de esperar, ya que además de la activación del sistema inmune innato, el Coa-ASC16 podría también aumentar la disponibilidad del antígeno/adyuvante a nivel del sitio de inyección. Esto último está basado en el hecho de que Coa-ASC16 es capaz de proteger y permitir una liberación controlada de las moléculas cargadas en su estructura (86). Otros autores han demostrado que adyuvantes en los cuales no se han detectado PAMPs actúan mediante un mecanismo que requiere MyD88 y nuestros resultados son compatibles con estos datos. Seubert y col. establecieron que la producción específica de IgG1 e IgG2b inducida por MF59 y de IgG2b inducida por las sales de aluminio dependen de MyD88 (40); y Wilson y col. demostraron que la respuesta de células T se veía afectada en ratones *Myd88*^{-/-} inmunizados con ISCOMATRIX (164). Además, nuestros datos obtenidos en ratones *Tlr4*^{-/-} (Fig. 1.2, 2.15 y 2.25) indican que los resultados presentados no son debido a una contaminación de nuestras preparaciones con endotoxinas.

La respuesta inmune innata inducida por Coa-ASC16 resultó similar tanto en ratones tratados con DNasa o IRS869 (inhibidor de TLR9) como en animales *Tlr9*^{-/-} (Fig. 2.18, 2.19, 2.23). En todos los casos, luego del tratamiento con Coa-ASC16, los ratones fallaron en inducir IL-6 e IL-12 pero no tuvo impacto en el reclutamiento celular. El dhADN es capaz de activar diversas vías de señalización a través

diferentes receptores tales como TLR9 (197-198) y numerosos receptores intracelulares cuya señalización no es dependiente de MyD88 (33, 169). Fue descrito que el dhADN liberado por otros adyuvantes como las sales de aluminio, señalizan a través de receptores intracelulares, mediante la proteína STING (de la sigla en inglés, stimulator of interferon genes), debido a la capacidad que posee este adyuvante para el “delivery” del ADN endógeno al citosol (125-126). Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis sugieren una vía de señalización para el dhADN dependiente de TLR9. En el caso de Coa-ASC16, posiblemente el dhADN se acumule en un tiempo corto en gran concentración a nivel extracelular como resultado de su liberación por muerte celular (Fig. 2.20 y 2.21) y es poco probable que alcance el citosol.

Se ha descrito previamente que adyuvantes no-PAMPs, operarían a través de un mecanismo dependiente del inflamasoma NLRP3 (170). La actividad inflamatoria de Coa-ASC16 resultó independiente de esta vía de señalización (Fig. 2.24). Teniendo en cuenta que la activación del inflamasoma NLRP3 está vinculada con la producción de IL-1 β , una citoquina detectada en el sitio de la inyección luego de la administración de Coa-ASC16, consideramos que se requieren estudios adicionales para dilucidar estos eventos, los cuales forman parte de los próximos objetivos del grupo de investigación.

Si bien nosotros no hemos estudiado el impacto que tienen los monocitos Ly6C^{high} reclutados por Coa-ASC16 en la respuesta inmune adaptativa, otros autores previamente mostraron que los mismos pueden cumplir un rol inmunomodulador (tanto activando como suprimiendo) en una respuesta inmune específica desencadenada por un determinado adyuvante (17, 19, 125-126, 199-201). Por ejemplo, Kool y col. mostraron que en el microambiente originado por las sales de aluminio, los monocitos Ly6C^{high} dan origen “de novo” a CD, que ayudan a la respuesta inmune originada por este adyuvante (19). En otro modelo experimental donde se utiliza un adyuvante constituido por un liposoma catiónico asociado a ADN, los monocitos Ly6C^{high} cumplen un rol supresor de la respuesta inmune adaptativa. De esta manera, cuando los autores suprimen el reclutamiento de monocitos a nivel del ganglio linfático (tanto por ensayos de depleción como

utilizando ratones *Ccr2*^{-/-}) se genera una marcada amplificación de la respuesta tanto humoral como celular específica (201).

IL-6 ha sido descrita como una citoquina multifuncional y puede ser un mediador pro-inflamatorio entre las respuestas inmunes innata y adaptativa (156), por lo tanto hay un gran interés en el estudio del rol de esta citoquina en el área de vacunas. El Coa-ASC16 promueve un aumento significativo de IL-6 el cual es específico del estímulo dado por dhADN a través de TLR9 (Fig. 2.18 y 2.23). En nuestro sistema la deficiencia de IL-6 no afectó el reclutamiento de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} (Fig. 2.9 A) pero si tuvo un profundo impacto en el desarrollo de la respuesta inmune antígeno específica (Fig. 2.26). Estos resultados coinciden con un trabajo de Hui y col., donde demuestran que la IL-6 cumple un rol muy importante en el desarrollo de la respuesta de anticuerpos inducida por una vacuna que contiene al adyuvante MPL (192).

En resumen, es este trabajo se evaluó una nanoestructura como plataforma del adyuvante CpG-ODN, otorgando ventajas indiscutibles en la inducción de una respuesta inmune adaptativa. Además, se estableció su capacidad adyuvante, la cual está asociada con su efecto inflamatorio y ambos dependen de la proteína adaptadora MyD88. Consideramos que la comprensión acerca de cómo trabaja el Coa-ASC16 es de particular importancia para el diseño vacunas de la nueva generación. Esto representa un desafío para la inmunobiología básica, ya que en los últimos años han tomado protagonismo nuevos biomateriales que no son inmunológicamente inertes.

CONCLUSIÓN GENERAL

En este trabajo de tesis demostramos que Coa-ASC16 mejora notablemente la actividad adyuvante de CpG-ODN. Los resultados indican que se necesita de la formulación completa para potenciar la actividad inmunoadyuvante del oligodeoxinucleótido. Además, se estableció que Coa-ASC16 posee actividad inflamatoria “per se”, la cual se relaciona con su propiedad adyuvante. Por lo tanto, esta propiedad intrínseca de la nanoestructura, es uno de los factores que contribuyen a la potenciación de la actividad adyuvante de CpG-ODN. Sin embargo, la respuesta inmune innata desencadenada por Coa-ASC16 parece no ser un estímulo suficiente, al menos cuando se administra de forma separada al CpG-ODN. Esto sugiere que Coa-ASC16 está realizando otros aportes, quizás un efecto “depot”. La modificación en las cinéticas de liberación tanto del antígeno como del oligodeoxinucleótido observada por ensayos in vitro, es coincidente con el hecho de que es necesaria la formulación completa para mejorar la actividad adyuvante de CpG-ODN.

Materiales y Métodos

Ratones

Se utilizaron ratones hembra BALB/c y C57BL/6 de 8-10 semanas de edad que fueron adquiridos en la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Ratones *Tlr4*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-} y *Myd88*^{-/-} y *Il-6*^{-/-} fueron provistos por Jackson Laboratory. Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas-UNC, donde dispusieron de alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los protocolos de uso de animales estuvieron en acuerdo con la Guía para el uso y cuidado de animales de experimentación publicada por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales (expediente N° A5802-01) asignado por la oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Los ratones C57BL/10, *Tlr9*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-} y *Nlrp3*^{-/-} y *OTII* fueron utilizados en el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid), en el marco de un proyecto de cooperación científica y tecnológica España-Argentina bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Ardavín.

Reactivos

Se utilizó OVA de Worthington Biochemical Corp (Lakewood, NJ) como antígeno (24, 202). La solución stock de OVA y de CpG-ODN fue preparada en solución fisiológica estéril apirógena 0,9% NaCl (B. Braun Medical S.A, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina). Las endotoxinas fueron removidas de la solución stock de OVA (10mg/mL) mediante Detoxi-Gel™ Endotoxin removing columns (Thermo Scientific), teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. Los niveles de endotoxina determinados (en la solución de OVA 10 mg/mL) antes y después del tratamiento con las columnas fue <10UE/mL y <1 UE/mL respectivamente, utilizando el ENDOSAFE Test. Para llevar a cabo el capítulo I de este trabajo de tesis, se utilizó la solución de OVA que no fue sometida a la remoción de endotoxina, mientras que en el capítulo II se utilizó la solución de OVA previamente purificada. ASC8, ASC16 y ASC18 fueron obtenidos de Fluka Analytical (Milan, Italia). Solución de dextrosa al 5% estéril apirógena Laboratorios Roux-Ocefa (Buenos Aires, Argentina). Alu-Gel-S (hidróxido de aluminio 2%) de

Serva Electrophoresis GMBH (Heidelberg, Alemania). DNasa I y LPS (proveniente de *Escherichia coli* 0111:B4) de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Vitamina C y PEG-400 de PARAMARM (Buenos Aires, Argentina).

Oligonucleótidos sintéticos

El CpG-ODN (secuencia 5'-TCCATGACGTCCTGACGTT-3') fue sintetizado con un esqueleto fosforotioato resistente a las nucleasas (CpG-ODN (PS)) (1826, oligodeoxinucleótido clase B) o con un esqueleto fosfodiéster natural (CpG-ODN (PO)). En todos los experimentos de este trabajo se utilizó CpG-ODN (PS) y en el ensayo de digestión por nucleasas también fue utilizado el CpG-ODN (PO) (Operon Technologies, Alameda, CA, USA). El contenido de endotoxina de los oligodeoxinucleótidos luego de la reconstitución (solución stock 1 mg/mL) determinada por el test de Limulus por lisado de amebocitos (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) fue <1 UE/ml. Los inhibidores de TLR9, IRS 869 (5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3') y de TLR7, IRS 661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') fueron sintetizados con un esqueleto fosforotioato resistente a las nucleasas libres de LPS (Operon Technologies).

Medios de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo completo RPMI 1640 GIBCO® (Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 1 % de L-Alanil-L-Glutamina (GlutaMAX I™, GIBCO®), 2 % de suero fetal bovino (SFB) (Natocor S.A) ó 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y antibióticos: penicilina 100 U/ml con estreptomycinina 100 μ g/ml (Life Technologies). Todas las células fueron incubadas en una estufa a 37 °C, atmósfera controlada con 5 % CO₂.

Preparación del Coa-ASC16

Las muestras fueron preparadas mediante la mezcla de los componentes en proporciones adecuadas en tubos herméticamente cerrados (ASC8, ASC16 o ASC18 y solución de dextrosa 5%). En un caso particular, la mezcla se preparó

mezclando la dextrosa con PEG-400, en una relación dextrosa-ASC16 85% / PEG-400 15%. Estas dispersiones fueron calentadas (hasta alcanzar la TMC) y luego homogeneizadas en un baño ultrasónico durante 15 minutos y finalmente se las dejó en reposo para que alcancen temperatura ambiente. CpG-ODN y OVA se incorporaron en la mezcla de ASC16 y dextrosa 5% y luego se prosiguieron las instrucciones que se describen anteriormente. En la mayoría de los experimentos la concentración de ASC16 (al igual que ASC8 y ASC18) fue 2% (peso/vol) ($4,9 \times 10^{-2} \text{M}$), a excepción de un experimento donde además se utilizó ASC16 0,2% (ó $4,9 \times 10^{-3} \text{M}$), ASC16 0,05% (ó $1,2 \times 10^{-3} \text{M}$) y ASC16 $1 \times 10^{-6} \text{M}$. Este último no forma coagel ya que su concentración está por debajo de la CMC, por lo tanto sólo representa el monómero. El Coa-ASC16 posee una consistencia semisólida.

Estudios de cinética de liberación.

Los estudios de liberación de OVA y CpG-ODN formulados en Coa-ASC16, se realizaron en celdas de difusión de Franz modificadas a 37°C. Un disco plano (17mm de diámetro y 5mm de grosor) fue colocado entre el compartimento del donador y el del receptor 1mL de Coa-ASC16 formulado con 300 µL de una solución de CpG-ODN (1mg/mL) y/o 24 µL de una solución de OVA (10mg/mL) se colocó en el compartimento superior (donante). En el compartimento receptor se colocó 4,3 mL del buffer Tris-HCl pH: 7,2 y se agitó a 200 rpm con una barra de agitación magnética revestida en teflón. Periódicamente, se tomaron alícuotas de 0,4mL y este volumen se reemplazó por el buffer Tris-HCl. Los datos fueron corregidos para la dilución. La concentración de CpG-ODN fue determinada por HPLC y la de OVA por Bradford. Los datos analizados fueron realizados por triplicado.

Ensayo de digestión por nucleasas.

Para evaluar el efecto de Coa-ASC16 sobre la estabilidad de CpG-ODN, se realizó un ensayo de digestión por nucleasas, exponiendo soluciones de CpG-ODN (PS) o CpG-ODN (PO) o ambas formuladas en Coa-ASC16 a una solución de 3' exonucleasa. Elegimos esta enzima ya que fue reportado que la degradación de los oligodeoxinucleótidos con esqueleto fosforotioato administrados de forma subcutánea ocurre predominantemente mediante una enzima 3' exonucleasa (77).

Las muestras (900µL) se mezclaron con el buffer de reacción (100 µL) (670 mM de glicina, KOH pH 9.5 a 25°C, 67 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT), luego la mezcla se dividió en 9 tubos de 100µL y cada uno se incubó a 37°C con 0,5µL de 3' exonucleasa I (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). La reacción fue inactivada mediante el calentamiento a 80°C durante 15 minutos a diferentes tiempos. La cantidad de CpG-ODN remanente en cada muestra fue cuantificada por HPLC.

Inmunizaciones.

Los ratones fueron inmunizados de forma s.c. con una solución de OVA, OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Co-formulación), OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (Co-inyección), OVA/Coa-ASC16, OVA/Al(OH)₃ y OVA/CpG-ODN/Al(OH)₃. Se utilizaron dos esquemas diferentes de inmunización: en el primero, las inmunizaciones se realizaron al día 0, 7 y 14; en el segundo: estas fueron administradas sólo dos veces (día 0 y 7). Cada ratón se inmunizó con una dosis total de 250 µL igualmente distribuida en cinco sitios: origen de la cola, lomo, región de la nuca y en ambas regiones inguinales (50 µL/sitio). El CpG-ODN fue administrado a una dosis de 75 µg/ratón o 30 µg/ratón. La dosis de OVA utilizada fue de 60 µg/ratón para todos los grupos experimentales. El Al(OH)₃ fue administrado a una dosis de 500 µg/ratón en todos los casos.

Inyección intraperitoneal y obtención del lavado peritoneal.

Los ratones se inyectaron de forma i.p. con dextrosa 5% (control), vitamina C (16,8 mg/ratón), LPS (100µg/ratón) o Coa-ASC16, 50µL de volumen final en todos los casos. También 10 min antes de la inyección de Coa-ASC16 o dextrosa, en algunos casos, se les administró, por la misma vía, IRS 869 (100µg/ratón), IRS661 (100µg/ratón) o DNAsa I (1mg/ratón), 100 µL de volumen final en todos los casos. A diferentes tiempos post inyección, se obtuvo el lavado peritoneal. La cavidad peritoneal fue lavada 3 veces con HBSS a 4°C ó con RPMI 1640 (en el caso de realizar cultivos celulares) 1mL por vez y lo que se obtuvo, fue centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos con el fin de separar el sobrenadante de las células. Las

células se reservaron para su inmunomarcación y análisis por citometría de flujo y el sobrenadante se guardó a -80°C para la posterior determinación de citoquinas.

Cultivos celulares.

Los bazos fueron removidos quirúrgicamente y colocados en placas bacteriológicas de 60 mm de diámetro conteniendo RPMI con antibiótico y 2 % SFB. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disgregación mecánica, seguido de tratamiento con *buffer* de lisis (Sigma) durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos. Luego de un lavado, las células se resuspendieron en medio completo (RPMI 1640, 10% SFB, 1% GlutaMAX y antibiótico) y se realizó el recuento celular con líquido de Turk. De esta manera, los esplenocitos (1×10^6 células/pocillo) fueron incubados en una placa de 96 pocillos fondo en U a 37°C, en atmósfera controlada con 5 % CO₂ con medio u OVA (100µg/mL). La producción de citoquinas fue determinada por ELISA en muestras de sobrenadante recolectadas luego de 72 horas del cultivo. Para la detección de citoquinas intracelulares, las suspensiones celulares se cultivaron durante 48 horas y se agregó Golgi Stop (Monensina 4µL/6mL de cultivo celular) (Becton Dickinson Argentina SRL) durante las últimas 5 horas del cultivo.

En el caso de cultivos de células de la cavidad peritoneal, una vez obtenido el lavado peritoneal con RPMI 1640, se centrifugó y las células se resuspendieron en medio completo y se realizó el recuento celular con líquido de Turk. En placas de 96 pocillos fondo en U, se colocaron 5×10^5 cél/pocillo con medio y se le agregó Golgi Stop (Monensina 4µL/6mL de cultivo celular) durante 4-5 horas.

ELISA para determinar el título de anticuerpos anti-OVA en suero.

Placas de 96 pocillos fondo plano fueron sensibilizadas con 100 µl de una solución con 10 µg/ml de OVA diluída en un buffer carbonato-bicarbonato pH:9,6 durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0,05 %, y los pocillos fueron bloqueados con 100 µl de una solución de PBS/gelatina 0,5 % durante 45 min a 37 °C en cámara húmeda. Luego de

tres lavados con PBS/Tween 0,05 %, se agregaron 50 µl de las muestras de suero con diluciones seriadas en PBS/gelatina 0,5 %/Tween 0,05 %. Se incubó 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados y se agregó 50 µl de un anticuerpo anti-IgM (policlonal), anti-IgG (policlonal) (ambos de Sigma-Aldrich), anti-IgG1 (clon X56) o anti-IgG2a/c (clon R19-15) (ambos de Becton Dickinson Argentina SRL, Buenos Aires, Argentina), conjugados con peroxidasa, los cuales se incubaron 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. El anti- IgG2a/c específico para ratón reconoce un epítopo en el dominio CH₃ de IgG2a de ratón con fuerte reactividad para el alotipo Igh-I[a] (IgG2a, BALB/c) y menor reactividad para Igh-I[b] (IgG2c, C57BL/6). Este no reconoce otros isotipos, por lo tanto se utilizó este anticuerpo para detectar IgG2a en ratones BALB/c y IgG2c en ratones C57BL/6. Finalmente se realizaron tres lavados y se agregaron 50 µl de una solución de H₂O₂ y o-fenilendiamina en buffer citrato para revelar la presencia de peroxidasa. La reacción colorimétrica se frenó con 50µL de una solución de H₂SO₄ 4N y se midió en un lector de placas a 490 nm. Los títulos se calcularon como la última dilución de la muestra que es igual al doble del promedio de los blancos. El plasma de los animales no inmunizados no fueron reactivos a OVA.

Determinación de citoquinas mediante un ELISA sándwich.

Placas de 96 pocillos “high-binding” fondo plano para microtécnica fueron sensibilizadas con 25 µl de anticuerpo de captura específico para la citoquina a determinar, diluido en un buffer fosfato, durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos fueron bloqueados con 100 µl de *buffer* de bloqueo (PBS/10 % SFB) durante 90 min a temperatura ambiente. Luego de cuatro lavados con PBS/Tween 0,05 %, se agregaron 50 µl del sobrenadante de cultivo o de lavado peritoneal de las muestras problemas. En paralelo se realizó la curva del testigo con 50 µl de diluciones seriadas de una solución de la citoquina recombinante de interés de concentración conocida. Se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se realizaron cinco lavados y se incubó con 50 µl de anticuerpo de detección biotinilado por 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron seis lavados y se agregaron 50 µl de estreptavidina

marcada con peroxidasa (BD Biosciences). La presencia de peroxidasa fue revelada con el reactivo BD OptEIA™ TMB Substrate-Chromogen (BD Biosciences).

Anticuerpos utilizados para ELISA de citoquinas.

ESPECIFICIDAD	CLON	FUNCIÓN	EMPRESA/ORIGEN
IFN- γ	R4-6A2	Captura	BD Biosciences
	XMG1.2	Biotinilado	
IL-6	MP5-20F3	Captura	eBiosciences
	MP5-32C11	Biotinilado	
IL-10	JES-52A5	Captura	BD Biosciences
	JES5-16E3	Biotinilado	
IL-12p40	C15.6	Captura	BD Biosciences
	C17.8	Biotinilado	
IL-17	17CK15A5	Captura	BD Biosciences
	17B7	Biotinilado	
IL-4	11B11	Captura	BD Biosciences
	BVD6-24G2	Biotinilado	
TNF α	1F3F3D4/XT3	Captura	BD Biosciences
	XT22	Biotinilado	
IL-1 β	B122	Captura	eBiosciences
	policlonal	Biotinilado	
GM-CSF	MP1-22E9	Captura	BD Biosciences
	MP1-31G6	Biotinilado	

Ensayo de proliferación in vivo.

Los linfocitos T CD4⁺ se purificaron mediante selección negativa a partir de suspensiones celulares de bazos de ratones OTII, incubando primero las células

con anti-B220, CD8 α , CD49b, Ly6G, CD11b, F4/80 conjugados con biotina y posteriormente con perlas conjugadas con estrepto-avidina MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La pureza obtenida tras la depleción magnética fue superior al 95%. Luego se marcaron con 5 μ M de CFSE en RPMI al 1% de SFB durante 20 min a 37°C. Las células se lavaron con abundante cantidad de suero (aproximadamente 10 mL) y luego con PBS al 3% de EDTA.

Se inyectaron 10 x 10⁶ células en un volumen final de 200 μ l de PBS, por vía e.v. en la base de la cola de ratones C57BL/6. A día siguiente, a estos ratones se les administró por vía s.c. OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 a ambos lados de la región inguinal (dosis de OVA: 60 μ g/ratón, dosis de CpG-ODN: 75 μ g/ratón) con un volumen final de 50 μ l para cada sitio de inyección. A los tres días se extrajeron los ganglios inguinales (drenantes) de cada ratón y los mesentéricos como control (no drenantes). Estos se procesaron y las células se marcaron con anti V α 2, CD4, CD62L para su análisis por citometría de flujo.

Citometría de flujo.

Aproximadamente 1x10⁶ células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD16/CD32 (clon 2.4G2) (para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas) más los anticuerpos monoclonales correspondientes marcados con un fluorocromo o con biotina (disueltos de acuerdo a concentraciones preestablecidas en la solución *buffer* para citometría: HBSS 2 % SFB 5 mM EDTA y 0,1 % de azida sódica) durante 30 minutos a 4°C. Los lavados se realizaron con la solución *buffer*. Los anticuerpos marcados con biotina se revelaron mediante estreptavidina marcada con un fluorocromo.

Para determinar la frecuencia de células productoras de IFN- γ e IL-6, los esplenocitos y células de lavado peritoneal (5x10⁵) fueron cultivadas como se indicó anteriormente y marcadas con anticuerpos de superficie, luego fijadas y permeabilizadas utilizando BD Cytotfix/CytopermTM Plus Kit (Becton Dickinson Argentina SRL) y finalmente marcadas con anticuerpos dirigidos hacia las respectivas citoquinas (IFN- γ (XMG1.2, Becton Dickinson Argentina SRL); IL-6 (MPS-20F3, R&D Systems)) o anticuerpos como control de isotipo.

Para el ensayo de viabilidad celular, células de la cavidad peritoneal (1×10^5) fueron resuspendidas en 100 μ L de binding buffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) e incubadas 15 minutos a temperatura ambiente con 3 μ L de anexina V y luego con 1,25 μ L of 7-AAD (ambos de BD Biosciences).

Posteriormente y en todos los casos, las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson Argentina S.R.L). Finalmente, los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR).

ESPECIFICIDAD	CLON	EMPRESA/ORIGEN
Ly-6G	1A8	BD Biosciences
Ly-6C	AL-21	BD Biosciences
CD19	1D3	BD Bioscience
CD49b	DX5	BD Biosciences
CD3	145-2C11	BD Biosciences
CD4	H129.9	BD Biosciences
CD8	53-6.7	BD Biosciences
F4/80	BM8	Life Technologies
CD11c	HL-3	BD Biosciences
B220	RA3-6B2	BD Biosciences
CD8 α	53-6.7	BD Biosciences
V α 2	B20.1	BD Biosciences
CD62L	MEL-14	BD Biosciences

Determinación enzimática.

La concentración plasmática de ALT, AST y LDH fueron determinadas utilizando un Kit para detección enzimática de Wiener Lab (Rosario, Argentina), bajo el protocolo del fabricante.

Análisis histológico.

Las muestras de tejido fueron fijadas en buffer formalina neutra 10%, aclaradas con xilol, embebidas en parafina, seccionadas y cortadas para luego ser teñidas con hematoxilina-eosina para su análisis histológico. Estas se analizaron con un microscopio Star Zeiss y los campos representativos fueron fotografiados con una cámara digital (Moticam 2000). Los estudios histopatológicos fueron realizados con la colaboración de las Médicas Patólogas Susana Ortiz y Carolina Luque Buteler (docentes de Patología Humana, Facultad de Ciencias Químicas, UNC), quienes no estaban vinculadas con el tema de investigación.

Tratamiento in vitro con DNasa y cuantificación de DNA.

Muestras de sobrenadante de lavado peritoneal fueron incubadas con DNasa I (5 µg/mL) y MnCl₂ (0,01M) (ambas concentraciones finales) 45 minutos a 37°C. La reacción fue frenada con EDTA (25mM como concentración final). El dhDNA se cuantificó mediante Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Análisis Estadístico.

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 5 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Los resultados se expresan como el promedio ±SEM. Se utilizó ANOVA de una vía seguido del post test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para comparar dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Todas las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

SOLUCIONES

1. Soluciones buffer

a. Solución buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7,2-7,4

NaCl.....	7,20 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	14,80 g
H ₂ O.....	c.s.p. 1000 ml

b. Solución salina balanceada de Hank's (HBSS)

KCl.....	0,40 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Na ₂ HPO ₄	0,05 g
NaCl.....	8,00 g
Glucosa	1,00 g
H ₂ O.....	c.s.p. 1000 ml

2. Soluciones utilizadas para contar células

Líquido de Turk

Solución de violeta de genciana o azul de metileno en ácido acético glacial al 3 % en H₂O.

3. Soluciones madres utilizadas en citometría de flujo

a. EDTA (Cicarrelli)

Solución 0,5 M en H₂O, pH 8.

b. Azida sódica (Sigma-Aldrich)

Solución 10 % en H₂O.

4. Soluciones utilizadas para mediciones de anticuerpos por ELISA

a. Buffer carbonato pH 9,6 (Sensibilización)

Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO₃ 2,93 g

H₂O c.s.p. 1000 ml

b. Solución de lavado

PBS con Tween 20 al 0,05 %.

c. Solución de bloqueo

PBS con gelatina bacteriológica al 0,5 %.

d. Solución para diluir las muestras

PBS con gelatina bacteriológica al 0,5 % más Tween 20 al 0,05 %.

e. Buffer fosfato-citrato (pH 4,9-5,2)

Na₂HPO₄ 7,25g

Ácido cítrico 3,50g

H₂O c.s.p 1000ml

5. Soluciones utilizadas para mediciones de citoquinas por ELISA

a. *Buffer fosfato pH 9 (Sensibilización)*

Solución A: 0,1 M de Na_2HPO_4 en H_2O .

Solución B: 0,1 M de NaH_2PO_4 en H_2O .

Ajustar el pH de la solución A a pH=9 con la solución B.

b. *Solución de bloqueo*

PBS con SFB al 10 %. Filtrar con membrana de 0,22 μm .

c. *Solución de lavado*

PBS con Tween 20 al 0,05 %.

d. *Solución para diluir las muestras*

PBS con SFB al 10 % más Tween 20 al 0,05 %.

Referencias Bibliográficas

1. Gershon AA. Varicella vaccine: rare serious problems--but the benefits still outweigh the risks. *J Infect Dis.* 2003 Oct 1;188(7):945-7.
2. Decker MD, Edwards KM. Acellular pertussis vaccines. *Pediatr Clin North Am.* 2000 Apr;47(2):309-35.
3. Ramon G. Sur la toxine et surranatoxine diphtheriques. *Ann Inst Pasteur.* 1924;38:1.
4. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine.* 2013 Dec;19(12):1597-608.
5. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jul;5(7):505-17.
6. Wang W, Singh M. Selection of adjuvants for enhanced vaccine potency. *WJV* 2011;1(2):33-78.
7. Levitz SM, Golenbock DT. Beyond empiricism: informing vaccine development through innate immunity research. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1284-92.
8. Krieg AM. CpG still rocks! update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* 2012 Apr;22(2):77-89.
9. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114.
10. Glennly AT, Pope C, Waddington H, Wallace U. Immunological Notes: XVII–XXIV. *J Pathol Bacteriol.* 1926;29:31-40.
11. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol.* 2013;4:214.
12. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Journal of Medical Microbiology.* 2012 Jul;61(Pt 7):927-34.
13. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. ASO₄, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6186-97.
14. Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van Hoogevest P, Van Nest G. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:277-96.
15. Vittoriano-Souza J, Moreira N, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Siqueira FA, Vieira PM, et al. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One.* 2012;7(7):e40745.
16. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 29;105(30):10501-6.
17. Seubert A, Monaci E, Pizza M, O'Hagan DT, Wack A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J Immunol.* 2008 Apr 15;180(8):5402-12.
18. Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhay S, Baras B, Jacob V, et al. Adjuvant system ASO₃ containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine.* 2011 Mar 16;29(13):2461-73.

19. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2008 Apr 14;205(4):869-82.
20. McKee AS, Munks MW, MacLeod MK, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4403-14.
21. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine*. 2011 Feb 17;29(9):1812-23.
22. Mutwiri G, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Mar 28;61(3):226-32.
23. Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett*. 2012 Sep;147(1-2):55-62.
24. Crespo MI, Zacca ER, Nunez NG, Ranocchia RP, Maccioni M, Maletto BA, et al. TLR7 triggering with polyuridylic acid promotes cross-presentation in CD8alpha+ conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cell surface. *J Immunol*. 2013 Feb 1;190(3):948-60.
25. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):203-9.
26. Copland MJ, Baird MA, Rades T, McKenzie JL, Becker B, Reck F, et al. Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine*. 2003 Feb 14;21(9-10):883-90.
27. Shah JA, Darrah PA, Ambrozak DR, Turon TN, Mendez S, Kirman J, et al. Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):281-91.
28. De Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, Thiriart C, et al. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol*. 2000 Jun;12(6):807-15.
29. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991-1045.
30. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003 Oct 2;425(6957):516-21.
31. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:321-42.
32. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol*. 2013;4:333.

33. Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity*. 2013 May 23;38(5):870-80.
34. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137-61.
35. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1122-6.
36. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):17-21.
37. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):3755-9.
38. Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol*. 2008 Aug;38(8):2085-9.
39. Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, DeBeauchamp J, Kanneganti TD, Webby RJ. Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):2927-32.
40. Seubert A, Calabro S, Santini L, Galli B, Genovese A, Valentini S, et al. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):11169-74.
41. Embry CA, Franchi L, Nunez G, Mitchell TC. Mechanism of impaired NLRP3 inflammasome priming by monophosphoryl lipid A. *Sci Signal*. 2011;4(171):ra28.
42. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Apr;72(4):955-62.
43. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995 Apr 6;374(6522):546-9.
44. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):740-5.
45. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):315-23.
46. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.
47. Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Sep;287(3):L552-8.

48. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, et al. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol.* 2004 Jul 15;173(2):1219-23.
49. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2660-9.
50. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jun;5(6):471-84.
51. Liu Y, Luo X, Yang C, Yu S, Xu H. Three CpG oligodeoxynucleotide classes differentially enhance antigen-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine.* 2011 Aug 5;29(34):5778-84.
52. Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1184-94.
53. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar;12(3):168-79.
54. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J.* 1998 Nov 2;17(21):6230-40.
55. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 2;109(40):16270-5.
56. Park B, Buti L, Lee S, Matsuwaki T, Spooner E, Brinkmann MM, et al. Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity.* 2011 Apr 22;34(4):505-13.
57. Manoury B. TLR9 regulation by proteolysis: a friend or a foe. *Eur J Immunol.* 2011 Aug;41(8):2142-4.
58. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2181-95.
59. Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol.* 1998 Jun 15;160(12):5898-906.
60. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):870-6.
61. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol.* 1998 Mar 15;160(6):2555-9.
62. Maletto B, Ropolo A, Moron V, Pistoiresi-Palencia MC. CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *J Leukoc Biol.* 2002 Sep;72(3):447-54.
63. Maletto BA, Ropolo AS, Liscovsky MV, Alignani DO, Glocker M, Pistoiresi-Palencia MC. CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice. *Clin Immunol.* 2005 Dec;117(3):251-61.

64. Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*. 2008 Jan 7;27(2):161-7.
65. Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 1996 Jan 15;156(2):558-64.
66. Campbell JD, Cho Y, Foster ML, Kanzler H, Kachura MA, Lum JA, et al. CpG-containing immunostimulatory DNA sequences elicit TNF-alpha-dependent toxicity in rodents but not in humans. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2564-76.
67. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, et al. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol*. 1997 Jul;27(7):1671-9.
68. Krieg AM, Efler SM, Wittpoth M, Al Adhami MJ, Davis HL. Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CPG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist. *J Immunother*. 2004 Nov-Dec;27(6):460-71.
69. Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*. 2004 Feb;10(2):187-92.
70. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:251-69.
71. Ioannou Y, Isenberg DA. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum*. 2000 Jul;43(7):1431-42.
72. Wickstrom E. Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *J Biochem Biophys Methods*. 1986 Sep;13(2):97-102.
73. De Clercq E, Eckstein E, Merigan TC. [Interferon induction increased through chemical modification of a synthetic polyribonucleotide]. *Science*. 1969 Sep 12;165(3898):1137-9.
74. Sands H, Gorey-Feret LJ, Cocuzza AJ, Hobbs FW, Chidester D, Trainor GL. Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Mol Pharmacol*. 1994 May;45(5):932-43.
75. Farman CA, Kornbrust DJ. Oligodeoxynucleotide studies in primates: antisense and immune stimulatory indications. *Toxicol Pathol*. 2003 Jan-Feb;31 Suppl:119-22.
76. Levin AA. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 10;1489(1):69-84.
77. Noll BO, McCluskie MJ, Sniatala T, Lohner A, Yuill S, Krieg AM, et al. Biodistribution and metabolism of immunostimulatory oligodeoxynucleotide CPG 7909 in mouse and rat tissues following subcutaneous administration. *Biochem Pharmacol*. 2005 Mar 15;69(6):981-91.
78. Wade A, Weller P. Handbook of pharmaceutical excipients. 3rd edition. American Pharmaceutical Association. 2000.

79. Palma S, Manzo R, Allemand D, Fratoni L, Lo Nostro P. Coagels from ascorbic acid derivatives. *Langmuir*. 2002;18:9219-24.
80. Palma S, Manzo R, Lo Nostro P, Allemandi D. Nanostructures from alkyl vitamin C derivatives (ASCn): properties and potential platform for drug delivery. *Int J Pharm*. 2007 Dec 10;345(1-2):26-34.
81. Rowe RC, Heskey PJ, Owen SC. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th ed Pharmaceutical Press, London. 2009:p. 43-6.
82. Köhler UY, P. W; Weng and Mantsch, H. H. Structure and polymorphic phase behavior of ascorbyl palmitate in water. *Canadian Journal of Spectroscopy*. 1988;3315:122-7.
83. Tsuchiya MT, D; Maki, M and Tanaka, T. Statical mechanical theory of the coagel-gel phase transition in ionic surfactant/water systems. *Journal of Physical Chemistry*. 1994;98(24):6187-94.
84. Benedini L, Schulz EP, Messina P, Palma S, Allemandi D, Schulz P. The ascorbyl palmitate-water system: phase diagram and state of water. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2011;375:178-85.
85. Palma SD, Maletto B, Lo Nostro P, Manzo RH, Pistoiresi-Palencia MC, Allemandi DA. Potential use of ascorbic acid-based surfactants as skin penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006 Aug;32(7):821-7.
86. Sanchez Vallecillo MF, Ullio Gamboa GV, Palma SD, Harman MF, Chiodetti AL, Moron G, et al. Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials*. 2014 Mar;35(8):2529-42.
87. Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA. Materials engineering for immunomodulation. *Nature*. 2009 Nov 26;462(7272):449-60.
88. Fadeel B. Clear and present danger? engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13609.
89. Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Ropolo A, Moron G, Pistoiresi-Palencia MC. Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J Leukoc Biol*. 2005 Jun;77(6):898-905.
90. Liscovsky MV, Ranocchia RP, Gorlino CV, Alignani DO, Moron G, Maletto BA, et al. Interferon-gamma priming is involved in the activation of arginase by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs in murine macrophages. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e159-69.
91. Ahmed SS, Plotkin SA, Black S, Coffman RL. Assessing the safety of adjuvanted vaccines. *Sci Transl Med*. 2011 Jul 27;3(93):93rv2.
92. Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S, Babiuk LA. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release*. 2004 May 31;97(1):1-17.
93. Salem AK, Weiner GJ. CpG oligonucleotides as immunotherapeutic adjuvants: innovative applications and delivery strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Mar 28;61(3):193-4.
94. Krishnamachari Y, Salem AK. Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Mar 28;61(3):205-17.

95. Malyala P, O'Hagan DT, Singh M. Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Mar 28;61(3):218-25.
96. Wilson KD, de Jong SD, Tam YK. Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Mar 28;61(3):233-42.
97. Wagner H. The immunogenicity of CpG-antigen conjugates. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Mar 28;61(3):243-7.
98. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol.* 2004 Apr;4(4):249-58.
99. Heit A, Huster KM, Schmitz F, Schiemann M, Busch DH, Wagner H. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1501-7.
100. Maurer T, Heit A, Hochrein H, Ampenberger F, O'Keeffe M, Bauer S, et al. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2002 Aug;32(8):2356-64.
101. Heit A, Maurer T, Hochrein H, Bauer S, Huster KM, Busch DH, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):2802-5.
102. Zhang XQ, Dahle CE, Weiner GJ, Salem AK. A comparative study of the antigen-specific immune response induced by co-delivery of CpG ODN and antigen using fusion molecules or biodegradable microparticles. *J Pharm Sci.* 2007 Dec;96(12):3283-92.
103. Badiie A, Jaafari MR, Khamesipour A. Leishmania major: immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. *Exp Parasitol.* 2007 Feb;115(2):127-34.
104. Semple SC, Klimuk SK, Harasym TO, Hope MJ. Lipid-based formulations of antisense oligonucleotides for systemic delivery applications. *Methods Enzymol.* 2000;313:322-41.
105. Eriksi E, Gursel M, Gursel I. Differential immune activation following encapsulation of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in nanoliposomes. *Biomaterials.* 2011 Feb;32(6):1715-23.
106. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine.* 2012 Mar 16;30(13):2256-72.
107. De Oliveira MC, Boutet V, Fattal E, Boquet D, Grognet JM, Couvreur P, et al. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sci.* 2000 Aug 18;67(13):1625-37.
108. Zhang YM, Rusckowski M, Liu N, Liu C, Hnatowich DJ. Cationic liposomes enhance cellular/nuclear localization of 99mTc-antisense oligonucleotides in target tumor cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001 Oct;16(5):411-9.
109. Gursel I, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM. Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3324-8.

110. Oussoren C, Storm G. Role of macrophages in the localisation of liposomes in lymph nodes after subcutaneous administration. *Int J Pharm.* 1999 Jun 10;183(1):37-41.
111. Bourquin C, Anz D, Zwiorek K, Lanz AL, Fuchs S, Weigel S, et al. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):2990-8.
112. Sokolova V, Knuschke T, Kovtun A, Buer J, Epple M, Westendorf AM. The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials.* 2010 Jul;31(21):5627-33.
113. Zhu Y, Meng W, Hanagata N. Cytosine-phosphodiester-guanine oligodeoxynucleotide (CpG ODN)-capped hollow mesoporous silica particles for enzyme-triggered drug delivery. *Dalton Trans.* 2011 Oct 21;40(39):10203-8.
114. Chen HC, Sun B, Tran KK, Shen H. Effects of particle size on toll-like receptor 9-mediated cytokine profiles. *Biomaterials.* 2011 Feb;32(6):1731-7.
115. Rankin R, Pontarollo R, Gomis S, Karvonen B, Willson P, Loehr BI, et al. CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine.* 2002 Jul 26;20(23-24):3014-22.
116. Ioannou XP, Gomis SM, Karvonen B, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littelvan den Hurk S. CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein. *Vaccine.* 2002 Nov 22;21(1-2):127-37.
117. Choksakulnimitr S, Masuda S, Tokuda H, Takakura y, Hashida M. In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *J Control Release.* 1995;34(3):233-41.
118. Caproni E, Tritto E, Cortese M, Muzzi A, Mosca F, Monaci E, et al. MF59 and Pam3CSK4 boost adaptive responses to influenza subunit vaccine through an IFN type I-independent mechanism of action. *J Immunol.* 2012 Apr 1;188(7):3088-98.
119. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):295-8.
120. Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol.* 2004 Oct;16(5):323-33.
121. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007 Mar;7(3):179-90.
122. Warner N, Nunez G. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol.* 2013 Jan 1;190(1):3-4.
123. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):453-60.
124. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
125. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine.* 2011 Aug;17(8):996-1002.

126. McKee AS, Burchill MA, Munks MW, Jin L, Kappler JW, Friedman RS, et al. Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 19;110(12):E1122-31.
127. Vono M, Taccone M, Caccin P, Gallotta M, Donvito G, Falzoni S, et al. The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 24;110(52):21095-100.
128. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008 Apr;8(4):279-89.
129. Shi Y, Zheng W, Rock KL. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14590-5.
130. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine*. 1999 Nov;5(11):1249-55.
131. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):191-5.
132. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol*. 2008 Oct;9(10):1179-88.
133. Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Nunez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol*. 2008 Dec 15;181(12):8194-8.
134. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008;3(10):e3331.
135. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):28-37.
136. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 2001 Mar;14(3):303-13.
137. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum*. 2005 Sep;52(9):2936-46.
138. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2262-71.
139. Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol*. 2013 Oct 15;191(8):4337-47.
140. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab*. 2012 Apr 4;15(4):518-33.

141. Zaman M, Toth I. Immunostimulation by Synthetic Lipopeptide-Based Vaccine Candidates: Structure-Activity Relationships. *Front Immunol.* 2013;4:318.
142. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine.* 2007 Jul;13(7):851-6.
143. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, et al. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med.* 2008 Oct 27;205(11):2609-21.
144. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *Journal of Clinical Investigation.* 2009 Feb;119(2):305-14.
145. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology.* 2011 Sep 2;54(3):999-1008.
146. Huang H, Chen HW, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, et al. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol.* 2013 Sep 1;191(5):2665-79.
147. Hoque R, Sohail M, Malik A, Sarwar S, Luo Y, Shah A, et al. TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 2011 Jul;141(1):358-69.
148. Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol.* 2012 Apr;13(4):321-4.
149. Carta S, Lavieri R, Rubartelli A. Different Members of the IL-1 Family Come Out in Different Ways: DAMPs vs. Cytokines? *Front Immunol.* 2013;4:123.
150. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
151. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65.
152. Molto A, Olive A. Anti-IL-1 molecules: new comers and new indications. *Joint Bone Spine.* 2010 Mar;77(2):102-7.
153. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1995 Mar 31;267(5206):2000-3.
154. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 2008 Mar 7;132(5):818-31.
155. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014 May 22;157(5):1013-22.
156. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011 May;1813(5):878-88.
157. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006 Mar;7(3):311-7.

158. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1461-71.
159. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*. 2009 Nov 19;114(21):4613-23.
160. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, et al. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1748-55.
161. Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, et al. The IL-6-soluble IL-6R α autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3435-42.
162. Rajamaki K, Nordstrom T, Nurmi K, Akerman KE, Kovanen PT, Oorni K, et al. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13410-9.
163. Norton JT, Hayashi T, Crain B, Corr M, Carson DA. Role of IL-1 receptor-associated kinase-M (IRAK-M) in priming of immune and inflammatory responses by nitrogen bisphosphonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):11163-8.
164. Wilson NS, Yang B, Morelli AB, Koernig S, Yang A, Loeser S, et al. ISCOMATRIX vaccines mediate CD8⁺ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. *Immunology and Cell Biology*. 2012 May;90(5):540-52.
165. Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007 Jun;18(6):1721-31.
166. Duramad O, Fearon KL, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, et al. Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5193-200.
167. Rasia M, Spengler MI, Palma S, Manzo R, Lo Nostro P, Allemandi D. Effect of ascorbic acid based amphiphiles on human erythrocytes membrane. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;36(2):133-40.
168. Mottola M, Wilke N, Benedini L, Oliveira RG, Fanani ML. Ascorbyl palmitate interaction with phospholipid monolayers: electrostatic and rheological preponderancy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013 Nov;1828(11):2496-505.
169. Shrivastav M, Niewold TB. Nucleic Acid Sensors and Type I Interferon Production in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2013;4:319.
170. Harris J, Sharp FA, Lavelle EC. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):634-8.
171. Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4 Suppl):S63-8.
172. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):509-17.

173. Kollmann TR. Variation between populations in the innate immune response to vaccine adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:81.
174. Rappuoli R, Mandl CW, Black S, De Gregorio E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nat Rev Immunol.* 2011 Dec;11(12):865-72.
175. Mutwiri G. TLR9 agonists: immune mechanisms and therapeutic potential in domestic animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2012 Jul 15;148(1-2):85-9.
176. Rozenfeld JH, Silva SR, Raneia PA, Faquim-Mauro E, Carmona-Ribeiro AM. Stable assemblies of cationic bilayer fragments and CpG oligonucleotide with enhanced immunoadjuvant activity in vivo. *J Control Release.* 2012 Jun 10;160(2):367-73.
177. McCluskie MJ, Weeratna RD, Evans DM, Makinen S, Drane D, Davis HL. CpG ODN and ISCOMATRIX adjuvant: a synergistic adjuvant combination inducing strong T-Cell IFN-gamma responses. *Biomed Res Int.* 2013;2013:636847.
178. Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. *Immunity.* 2010 Oct 29;33(4):451-63.
179. Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, et al. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS.* 2005 Sep 23;19(14):1473-9.
180. Kumar P, Chen K, Kolls JK. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. *Curr Opin Immunol.* 2013 Jun;25(3):373-80.
181. Tigno-Aranjuez JT, Jaini R, Tuohy VK, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Encephalitogenicity of complete Freund's adjuvant relative to CpG is linked to induction of Th17 cells. *J Immunol.* 2009 Nov 1;183(9):5654-61.
182. Benedini L, Antollini S, Fanani ML, Palma S, Messina P, Schulz P. Study of the influence of ascorbyl palmitate and amiodarone in the stability of unilamellar liposomes. *Mol Membr Biol.* 2014 Mar-May;31(2-3):85-94.
183. Demento SL, Bonafe N, Cui W, Kaech SM, Caplan MJ, Fikrig E, et al. TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. *J Immunol.* 2010 Sep 1;185(5):2989-97.
184. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010 Oct 29;33(4):492-503.
185. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? important considerations for new generation adjuvants. *Immunity.* 2007 Nov;27(5):687-90.
186. Maletto BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky MV, Ranocchia RP, Moron VG, et al. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood.* 2006 Nov 1;108(9):3094-102.
187. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol.* 2003 Dec 1;171(11):6052-8.
188. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* 2004 Aug;21(2):215-26.

189. Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, Tanguy M, et al. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1843-50.
190. Bonneau M, Epardaud M, Payot F, Niborski V, Thoulouze MI, Bernex F, et al. Migratory monocytes and granulocytes are major lymphatic carriers of *Salmonella* from tissue to draining lymph node. *J Leukoc Biol*. 2006 Feb;79(2):268-76.
191. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2006 May;79(5):977-88.
192. Hui G, Hashimoto C. Interleukin-6 has differential influence on the ability of adjuvant formulations to potentiate antibody responses to a *Plasmodium falciparum* blood-stage vaccine. *Vaccine*. 2007 Sep 4;25(36):6598-603.
193. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Oct;7(10):827-40.
194. Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nature Medicine*. 2011 Apr;17(4):479-87.
195. Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN-gamma production from T cells and control switching to IgG2c. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1005-12.
196. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2001 Oct;2(10):947-50.
197. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):564-9.
198. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*. 2009 Feb;119(2):305-14.
199. Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, et al. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol*. 2009 Apr;10(4):394-402.
200. Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 2010 Oct 29;143(3):416-29.
201. Mitchell LA, Henderson AJ, Dow SW. Suppression of vaccine immunity by inflammatory monocytes. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5612-21.
202. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):445-59.

Publicaciones Científicas

Publicaciones derivadas del presente trabajo de tesis doctoral.

1. **“Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal”**. María F. Sánchez Vallecillo , Gabriela V. Ullio Gamboa , Santiago D. Palma, María F. Harman, Ana L. Chiodetti, Gabriel Morón, Daniel A. Allemandi, María C. Pistoresi-Palencia, Belkys A. Maletto. *Biomaterials* 35 (2014) 2529-2542.
2. **“Liquid crystal nanostructure of 6-O-ascorbyl palmitate: a novel adjuvant that requires the MyD88 adaptor protein”** María F. Sánchez Vallecillo, Gabriela V. Ullio Gamboa, María M. Minguito de la Escalera, Santiago D. Palma, Leticia González-Cintado, Ana L. Chiodetti, María V. Aguirre, Gabriel Morón, Daniel A. Allemandi, Carlos Ardavín, María C. Pistoresi-Palencia, Belkys A. Maletto. *Enviado a publicar*.
3. **“Development and validation of a chromatographic (HPLC) method for CpG-oligodeoxynucleotides determination in a novel liquid crystal-based formulation”** Gabriela Ullio Gamboa; Juan M Llabot; Maria F. Sanchez Vallecillo; Belkys A. Maletto; Santiago D. Palma; Daniel A. Allemandi. *Enviado a publicar*.