

## **SISTEMAS DE VACUNACIÓN TRANSDERMAL: PARCHE NANOESTRUCTURADO vs HIDRO Y NANOGELES**

**Ana Sonzogni**

*INTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450 (3000) Santa Fe, Argentina*

**Área:** Ciencias Biológicas

**Sub-Área:** Biotecnología

**Grupo:** Y

**Palabras clave:** Vacunación transdermal, termosensibilidad, nanogeles.

### **INTRODUCCIÓN**

La vacunación transdermal surge como una alternativa de la inyección, ya que a pesar de ser el método más ampliamente utilizado cuenta con algunas limitaciones como dolor, contagios derivados de accidentes con agujas, etc. La simple aplicación tópica de vacunas no conduce a una respuesta inmune adecuada, lo cual ha llevado al desarrollo de sistemas capaces de entregar a eficientemente la vacuna a las células inmunológicas presentes en la epidermis (Mitragotri S., 2005). Dentro de la gran variedad de sistemas estudiados se encuentran los hidrogeles, estructuras poliméricas tridimensionales altamente hidrofílicas, con gran capacidad de retención de agua, y por lo tanto alta biocompatibilidad y gran capacidad para el transporte de proteínas. Existe un conjunto de hidrogeles que son capaces de responder frente a un cambio en la temperatura, los cuales tienen la ventaja de transportar la vacuna dentro de su matriz y liberarla selectivamente una vez superada la temperatura de transición, de manera de controlar el proceso de liberación. En los últimos años se observó un notable incremento del interés por el diseño de hidrogeles termosensibles de tamaño nanométrico, (Nanogeles, NGs). Estos presentan todas las propiedades beneficiosas de los hidrogeles, con las ventajas de presentar mayor área expuesta que favorece la carga y liberación de analitos, y mayor velocidad de respuesta (Molina M., 2015). La aplicación dermal de nanogeles termosensibles en suspensión, presentó la desventaja de secarse rápidamente y no permitir la liberación completa de la proteína. Por ese motivo trabajamos en la síntesis de un parche compuesto por nanogeles termosensibles, capaces de formar una película. Estos NGs (NGs PVCL-Ac), están compuestos por un polímero termosensible (poli *N*-vinilcaprolactama, PVCL) y un copolímero que permite la coalescencia de los NGs en el proceso de formación de película (poli(acrilato de butilo-co-ácido acrílico)). Con este parche nanoestructurado buscamos combinar las tecnologías de los hidrogeles y NGs, tratando de rescatar sus aspectos positivos, dejando a un lado sus limitaciones previamente observadas. En este trabajo se enfrenta al parche diseñado frente a un hidrogel y NGs sintetizados con el mismo polímero termosensible (PVCL), para comparar el comportamiento de los distintos sistemas en cuanto a su respuesta térmica, su biocompatibilidad, captura y liberación de proteínas *in vitro* y penetración de proteína en piel humana *ex vivo*.

### **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo es comparar la performance de un parche nanoestructurado diseñado para vacunación transdermal, con otras dos plataformas previamente existentes (Hidrogel y NGs de PVCL). De este objetivo global se desprenden los siguientes objetivos específicos:

a) Síntesis de las plataformas. b) Caracterización de sus propiedades. c) Estudio de la aplicación de los tres sistemas.

### **METODOLOGÍA**

Proyecto: C.A.I.+D. 501 201101 00210, "Síntesis y Caracterización de Polímeros producidos por Procesos en Emulsión y en Miniemulsión"

Director del proyecto: Luis Gugliotta

Director del becario: Roque Minari, Co-Directora: Verónica Gonzalez

## Polimerizaciones

**Nanogeles:** Las síntesis de los NGs se llevaron a cabo en un reactor de vidrio encamisado de 200 ml. La temperatura de polimerización y el tiempo de reacción para todos los experimentos fueron de 70°C y 120 min, respectivamente. La formulación de las polimerizaciones realizadas se describe en la Tabla 1. La síntesis de NGs de PVCL puros se llevó a cabo de la siguiente manera. Los monómeros, buffer (NaHCO<sub>3</sub>) y dodecil sulfato sódico (SDS) se mezclaron con agua en el reactor y se mantuvieron bajo agitación y burbujeo de nitrógeno a la temperatura de reacción durante 60 min. Persulfato de potasio (KPS), previamente disuelto en una pequeña cantidad de agua, se inyectó en el reactor para iniciar la polimerización. La síntesis de los NGs de PVCL-Ac se realizó cargando en el reactor 50% de la formulación correspondiente al agua, VCL, SDS, NaHCO<sub>3</sub> y la cantidad total de *N,N*-metilenbisacrilamida (BIS). Después de alcanzar la temperatura de reacción y purgar la dispersión con N<sub>2</sub> durante 60 minutos, se inyectó la solución de KPS para iniciar la polimerización. El 50% restante de agua, VCL, SDS, NaHCO<sub>3</sub> se alimentó a una velocidad constante durante 90 minutos desde el comienzo de la polimerización, después de 50 min de polimerización, se alimentó una dispersión acuosa que contenía acrilato de butilo, ácido acrílico y SDS, a una velocidad de alimentación constante durante 40 min. Una vez terminado el período de alimentación, se mantuvieron las condiciones de polimerización durante 30 min adicionales. Para preparar los parches se colocó 0.4 ml de dispersión de NGs de PVCL-Ac, obteniendo 40 mg de NGs, sobre moldes de 10 mm de diámetro y secando a temperatura ambiente en un desecador con gel de sílice hasta conseguir un peso constante. Con un espesor final de aproximadamente 1 mm.

**Hidrogelos:** Se llevaron a cabo en jeringas de 5 ml (10 mm de diámetro). Se disolvió la VCL, la BIS y el Azobisisobutironitrilo (AIBN) en una mezcla de etanol-agua (70-30) y se cargó la mezcla reaccionante en la jeringa. Se burbujeó nitrógeno durante 15 minutos y se sumergió en un baño de ultrasonido para eliminar las burbujas que puedan estar presentes, durante 5 min. Se llevó el sistema a 70°C durante 4 hs. La barra de gel obtenida se cortó con un bisturí en cilindros de igual altura y se lavaron reiteradas veces en agua desionizada, hasta extraer los residuos de la polimerización.

**Tabla 1.** Formulación de las polimerizaciones.

	VCL/H <sub>2</sub> O	BIS/VCL	NaHCO <sub>3</sub> /VCL	SDS/VCL	Iniciador/VCL
<b>NGs PVCL</b>	5%	4%	1%	4%	1%
<b>NGs/acrilicos</b>	10%	4%	1%	4%	1%
<b>Hidrogel</b>	50%	4%	-	-	1%

## Caracterización

**Respuesta térmica:** La respuesta térmica del parche y el hidrogel se determinó sumergiendo las muestras en agua desionizada a diferentes temperaturas (20, 30, 35, 40, 50 y 55 °C). A cada temperatura, las muestras se mantuvieron una hora para alcanzar el equilibrio y se determinó el peso de la muestra. La respuesta térmica de los NGs fue determinada por DLS, midiendo el diámetro medio de las partículas (D) de muestras diluidas (1 mg/mL) a temperaturas crecientes (de 20 °C a 55 °C a intervalos de 2,5 °C, con 20 min de estabilización). El D se midió por dispersión dinámica de la luz (DLS) con un ángulo de detección de 90°, en un fotómetro Brookhaven BI-9000 AT.

**Citotoxicidad:** La citotoxicidad de los NGs se determinó por contacto directo de diferentes concentraciones de NGs incubados por 48 hs con fibroblastos dermales humanos. La citotoxicidad del parche y el hidrogel fueron determinadas por contacto indirecto con fibroblastos dermales humanos. Se prepararon extractos de parche e hidrogel, incubando muestras en medio de cultivo durante 3 días. Dichos extractos se utilizaron para reemplazar el medio de los fibroblastos en diferentes proporciones. Para

determinar la viabilidad celular en todos los casos, se realizó el ensayo de detección de ATP CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se determinó con el lector de microplacas Tecan Infinite M200Pro. La viabilidad relativa se calculó dividiendo los valores de luminiscencia de las células tratadas, por los valores de las células no tratadas.

**Liberación in vitro:** Se cargó 3 mg de ovoalbúmina en cada uno de los sistemas (parche de 40 mg, hidrogel de 40 mg y 1 ml de una suspensión de 5 mg/ml de NGs). Se estudió la liberación en PBS (pH=7.4) a 25 y 37°C durante una semana. Para ello, a cada tiempo de muestreo se reemplazó completamente el medio y se midió por UV a 280 nm la concentración de OVA en cada muestra, mediante una curva de calibrado previamente realizada. Cada ensayo se realizó por triplicado.

**Penetración en piel:** La piel utilizada fue extraída en una reducción de busto de una mujer de 47 años, en el Hospital Universitario de la Universidad Libre de Berlín. Para realizar los ensayos se aplicaron parches de 40 mg, hidrogeles de 40 mg y 50µl de solución de 10 mg/ml de NGs sobre la piel, todos cargados con 0.125 mg de OVA. Una vez aplicadas las plataformas sobre la piel, se incubó por 6 hs aplicando un gradiente de temperatura de 30 a 37 °C. Luego se retiraron las plataformas y se realizó un corte transversal en el medio de liberación. Para la visualización de la penetración de proteína y su distribución en las diferentes capas de la piel, se observó con teñido histoquímico utilizando un anti-OVA marcado fluorescentemente, mediante el uso de un microscopio confocal. El ensayo se realizó por triplicado.

## RESULTADOS

### Respuesta térmica

Para estudiar la respuesta térmica en el parche y el hidrogel se analizó la evolución del peso de una muestra hidratada en función de la temperatura, mientras que para los NGs se analizó la evolución del diámetro de partícula con la temperatura. Los resultados expuestos en la Figura 1 permiten observar una temperatura de transición de 32.5°C en hidrogel y NGs, y de 35°C en el parche. Mientras que la capacidad de hinchamiento fue de 475% en el hidrogel 250% en los NGs y 446% en el parche.

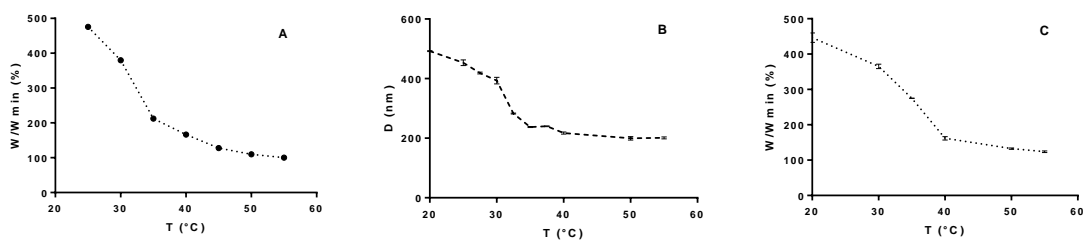


Figura 1. Respuesta térmica del hidrogel (A), de los NGs (B) y del parche (C).

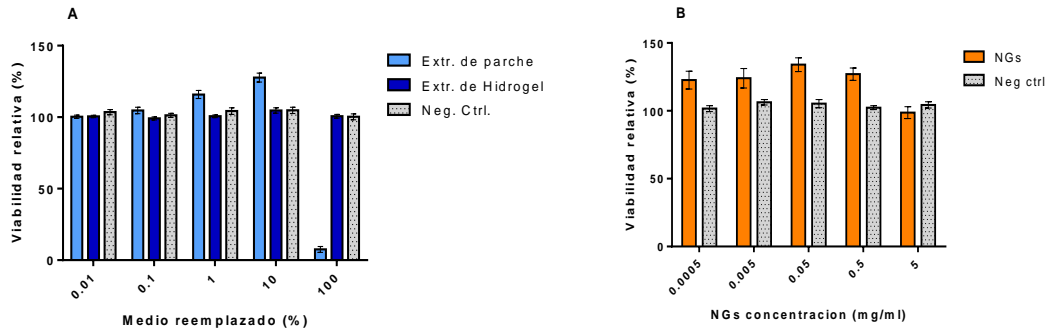
### Citotoxicidad

Los resultados de tolerabilidad de los sistemas en la piel, expuestos en la Figura 2 revelan indicios de reducción de la viabilidad celular únicamente a muy altas concentraciones del extracto del parche (reemplazando el 100% del medio de cultivo).

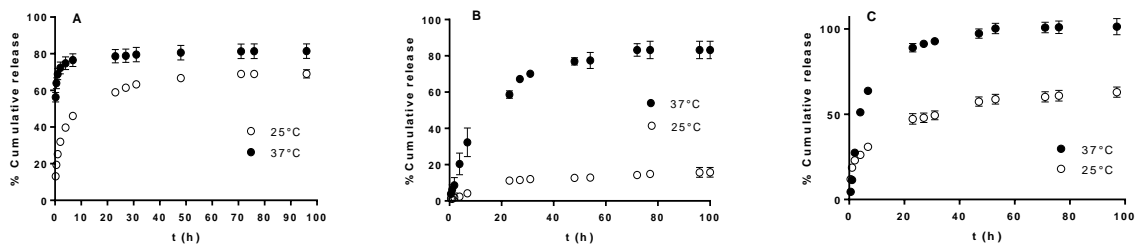
### Liberación de OVA in vitro

En los perfiles de liberación de OVA expuestos en la Figura 3, puede observarse que para todos los sistemas a 37°C la liberación se produce de manera más rápida y la cantidad de proteína final liberada es mayor que a 25°C. Esta diferencia se debe a la fuerza impulsora de la difusión, creada por el colapso de la PVCL, que en todos los sistemas es menor a 37°C. Cabe destacar que los NGs son el sistema que presenta

mejor efecto ON-OFF, lo que permite asegurar la permanencia de la proteína en el interior del sistema hasta ser expuesto a las condiciones de liberación. Mientras que en el hidrogel no puede observarse este efecto y en el parche se alcanza una condición intermedia entre ambos sistemas. También puede observarse que el máximo de liberación con el hidrogel se obtiene a los 7 minutos del ensayo, mientras que para los NGs y el parche se obtiene a los 52 min, indicando que estos dos últimos permiten liberar de manera más controlada.



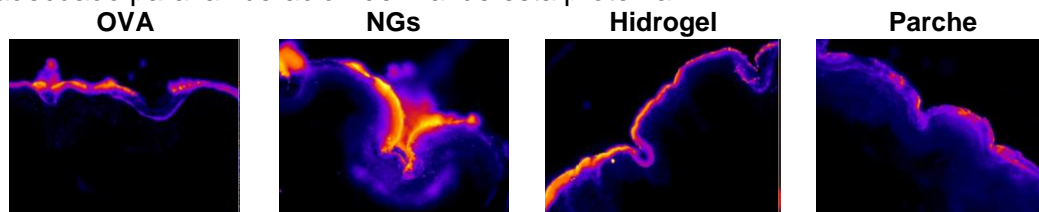
**Figura 2.** Viabilidad relativa de fibroblastos dermales humanos después de 48hs de exposición indirecta al parche e hidrogel (A), y directa a los NGs (B).



**Figura 3.** Perfil de liberación de OVA en PBS, desde el hidrogel (A), NGs (B) y parche (C).

### Penetración de OVA en piel humana

En la Figura 4 se observa la distribución de la OVA en las distintas capas de la piel luego de 6 hs de liberación. Se puede observar que la OVA en PBS aplicada sin ningún sistema y aplicada con el hidrogel, no penetra el estrato corneo (SC). En los NGs se observa una alteración en el SC, producto de la alta hidratación local que promueve la penetración de una alta cantidad de proteína, hasta llegar a la epidermis. Similar penetración se observa para el parche, pero sin la disrupción del SC. Teniendo en cuenta que las células inmunológicas se encuentran en la epidermis, y que la alteración del SC es no deseada, estos resultados muestran al parche como el sistema más adecuado para la liberación dermal de esta proteína.



**Figura 4.** Penetración de OVA en piel humana ex vivo.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Molina M., Asadian M., Balach J., Bergueiro J., Miceli E., Calderón M., 2015. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. Chem. Soc. Rev.44, 6161-6186.
- Mitragotri S., 2005. Immunization without needles. Nature Reviews. 5, 905-916.