

Uso de Micropartículas de Polímeros Como Vehículo de Antígenos

Silvia Moreno-Mendieta* y Romina Rodríguez-Sanoja

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510

E-mail: moreno.sa@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

La asociación de proteínas o péptidos con micropartículas de polímeros, tanto naturales como sintéticos, es una estrategia para la administración de antígenos por vía parenteral y mucosas y su transporte hasta los sitios de procesamiento e inicio de la respuesta inmune. No sólo se puede estabilizar y retener la actividad biológica del péptido o proteína inmovilizada, sino que también se puede inducir respuesta inmune a nivel local y/o sistémico. Incluso, así como sucede con otros sistemas particulados más complejos, es posible potenciar y modular dicha respuesta por lo que también pueden utilizarse como adyuvantes. Sin embargo, los procesos de inmovilización sobre micropartículas generalmente requieren la preparación del soporte y el uso de compuestos químicos y métodos complejos para favorecer la unión covalente del antígeno. En consecuencia, se pueden presentar preocupaciones relacionadas con la inocuidad y un incremento en los costos. Por esta razón, en el campo de desarrollo de sistemas de transporte de antígenos que puedan ser utilizados en humanos, se buscan materiales con propiedades como la biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad, que en su mayoría poseen los polímeros naturales, así como métodos de preparación más simples, ambientalmente amigables y que puedan escalarse más fácilmente a nivel industrial. En este trabajo se analiza el estado actual del uso de micropartículas de polímeros como vehículos de antígenos, se abordan sus ventajas y las perspectivas de esta tecnología en el campo de la vacunación.

Palabras clave: Micropartículas, Polímeros, Vacunas

ABSTRACT

The association of proteins or peptides with microparticles of natural and synthetic polymers is a strategy for the parenteral and mucosal administration of antigens and their transport to the sites for processing and initiation of the immune response. Not only it is possible to stabilize and retain the biological activity of the immobilized protein or peptide, but it is also possible to induce immune responses at local and/or systemic levels. As with other more complex particulate systems, they can even enhance and modulate that response, making it possible to use them as adjuvants. However, the processes of immobilization on microparticles generally require the preparation of the matrix and the use of chemicals and complex methods to promote the covalent attachment of the antigen. Consequently, there may be safety concerns and increased costs. For this reason, there is a continuous search to find new materials

with properties, such as biocompatibility, biodegradability and safety, for the development of antigen carrier systems that can be used in humans. Additionally, it is important to find simpler methods of preparation that are environmentally friendly and easy to scale at industrial levels. This paper describes the current status of the use of polymer microparticles as antigen carriers and discusses their advantages and the prospects of this technology in the field of vaccination.

Key words: Microparticles, Polymers, Vaccines

INTRODUCCIÓN

Los sistemas particulados como liposomas, micro y nano partículas han tenido un enorme impacto en un amplio rango de aplicaciones biomédicas. Además de ser utilizados en biosensores, como matriz para separación por afinidad, marcaje celular y cell sorting (Suri et al., 2013), se usan especialmente para la liberación controlada y focalizada de moléculas como hormonas, agentes anti-inflamatorios, péptidos y antígenos. En este último caso, se han realizado esfuerzos significativos para el mejoramiento de los sistemas existentes y el desarrollo de nuevos sistemas que sean seguros para su incorporación en formulaciones vacunales para uso humano (Zhao et al., 2014).

Debido a sus ventajas únicas como tamaño en el rango de micrones y extensa área para su funcionalización y cargado de moléculas, las micropartículas han sido utilizadas ampliamente como sistemas de transporte y liberación de proteínas, tanto para el desarrollo de fármacos como de vacunas (Tan et al., 2010). Su tamaño, forma y material dependen del uso que tendrá la micropartícula y son parámetros cruciales que pueden modular significativamente su función, pues pueden impactar en el reconocimiento y captura por parte de las células blanco del sistema inmune (Suri et al., 2013). Se sabe que las micropartículas en el rango de 1 a 10 μm

promueven la presentación de antígenos al sistema inmune, facilitando su fagocitosis y presentación por parte de células especializadas conocidas como células presentadoras de antígeno (CPAs) con la consecuente activación de la respuesta inmune (Reddy et al., 2006). Así mismo se sabe que las micropartículas fabricadas con materiales naturales y sintéticos como los poli láctido-co-glicólidos (PLGAs por sus siglas en inglés) son bien toleradas debido a que los productos de su metabolismo, el ácido láctico y el ácido glicólico, pueden ser bien tolerados y eliminados por el organismo. Gracias a sus características, estos materiales se han clasificado como biodegradables y biocompatibles y han sido los principales candidatos para la fabricación de micro o nano partículas para uso en humanos (O'Hagan et al., 2006; Kumari et al., 2010).

En esta revisión se resume el estado actual del uso de micropartículas preparadas a base de polímeros para la administración de antígenos. Se revisan y discuten los materiales, la fabricación, el mecanismo de captura, así como las ventajas del uso de polímeros naturales ya que gracias a su composición y fácil funcionalización, resulta una alternativa más segura para el desarrollo de vacunas de nueva generación que puedan administrarse tanto en humanos como en animales. Finalmente se

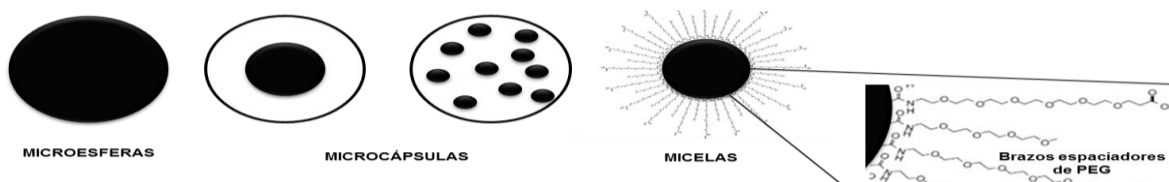
presentan algunas consideraciones y perspectivas sobre esta tecnología en el campo de la vacunación.

MATERIALES Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN E INMOVILIZACIÓN

La selección del polímero para la preparación de la partícula, depende de la aplicación biomédica que ésta tendrá y de la vía de administración utilizada. En general las partículas de polímeros se preparan a partir de monómeros, bien sean naturales o sintéticos, o a partir de copolímeros (tabla 1), mediante técnicas que crean microcápsulas, microesferas o micelas (figura 1) listas para el cargado de moléculas o ya preparadas con la molécula que se va a administrar. En función de su tamaño pueden clasificarse como micropartículas si se encuentran en el rango de los micrones (1–1000 μm) o sub-micrones (100–1000 nm), o como nanopartículas, si se encuentran en un rango de 1–100 nm (Suri et al., 2013). En función de su forma las partículas pueden ser esféricas, amorfas, agregados o tener formas geométricas específicas (Hermanson, 2013).

Los métodos más comunes para su preparación son la evaporación del disolvente, el secado por aspersión o secado en spray y la polimerización. Una descripción general de estos métodos y sus ventajas y desventajas se resumen en la tabla 2. Por otro lado, los métodos para la inmovilización de las proteínas sobre las

micropartículas pueden agruparse como métodos de inmovilización no covalente (adsorción) y métodos de inmovilización covalente (Datta et al., 2013). En el primer caso, micropartículas de naturaleza hidrofóbica permiten la adsorción directa de proteínas mediante interacciones con aminoácidos aromáticos (Karshikoff, 2006). En el caso de la inmovilización covalente, para la funcionalización de las partículas y cargado de moléculas se requieren reacciones de activación y acoplamiento que necesitan compuestos y solventes orgánicos. Básicamente se busca que las micropartículas tengan los grupos reactivos o funcionales desplegados en la superficie para permitir la unión covalente de las proteínas. La cantidad y tipo de estos grupos varía en función de los monómeros utilizados en el proceso de fabricación de la micropartícula. Los más comunes son de tipo carboxilato, aldehído, amina, amida, hidroxilo, epóxido, entre otros (Hemerson, 2013). Las partículas carboxiladas por ejemplo, se pueden obtener por copolimerización con monómeros del ácido acrílico o metacrílico y pueden unir moléculas con grupos amina formando uniones amida (Wikingsson & Sjöholm, 2002). Las partículas con grupos amina se pueden obtener por entrecruzamiento con compuestos como el glutaraldehído y poliglutaraldehído permitiendo la unión de proteínas mediante puentes disulfuro (Fundueanu et al., 2007), mientras



que partículas con grupos hidroxilo pueden obtenerse con copolímeros de poli hidroxietil metacrilato (pHEMA por sus siglas en inglés) (Devy et al., 2006) y/o poliestireno las cuales pueden activarse con compuestos como el carbonil diimidazol o el disuccinil carbonato (CDI y DSC por sus siglas en inglés) formando un grupo carbonilo reactivo a los grupos amina (Tauer et al., 2005). Partículas con grupos epóxido, introducidos mediante copolimerización con monómeros de vinilo (alil glicidil éter o glicidil metacrilato) pueden unir ligandos con grupos tiol, amino o hidroxilo mediante reacciones facilitadas bajo condiciones alcalinas. Este grupo reactivo por lo tanto puede utilizarse para unir no solo proteínas sino ácido nucleicos, azúcares y carbohidratos más complejos (Traina et al., 2012).

No obstante todos los avances en el área, todavía son muchos los desafíos para que los métodos de formación y funcionalización de las partículas no afecten adversamente la estabilidad y estructura de las proteínas y en consecuencia su papel biológico (Amidi et al., 2010). Subrayando que sigue siendo un reto controlar el tamaño de la partícula y lograr el escalamiento a nivel industrial

CARACTERIZACIÓN

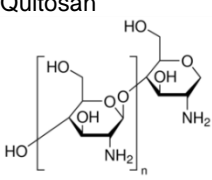
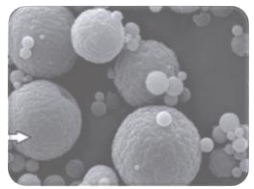
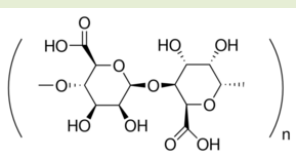
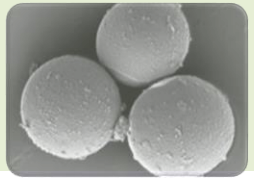
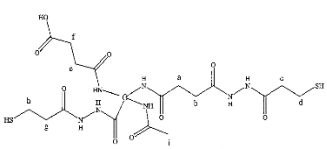
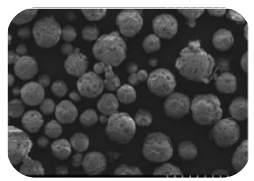
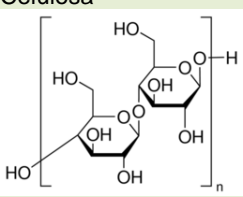

Una vez preparadas las micropartículas y dependiendo de la técnica utilizada para su preparación, se debe realizar una evaluación y caracterización cuidadosa de las mismas, no sólo para determinar el impacto de los procesos de fabricación sobre su estabilidad y la del ligando sino para establecer su idoneidad como sistema de transporte y liberación de antígenos

o fármacos. Tanto para microcápsulas como para microesferas es importante la morfología y el tamaño (μm), la capacidad de carga (%), la eficiencia de encapsulación (%), la concentración de polímero (mg/mL) y el perfil de liberación, en especial cuando se trata de fármacos (Ye et al., 2010; Wieber et al., 2011). Los estudios de morfología y tamaño se realizan mediante técnicas de microscopía de las cuales la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es la más empleada seguida de la microscopía confocal y de fluorescencia. Estos estudios revelan información importante sobre la forma, regularidad de la superficie (presencia, distribución y tamaño de poros), presencia de defectos y agregación (Saez-Martínez, 2011).

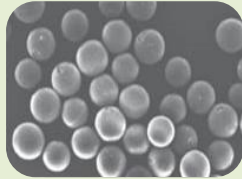
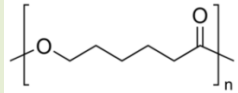
La eficiencia de encapsulación o atrapamiento, expresada como el porcentaje de proteína que quedó en la micropartícula con respecto a la cantidad total utilizada para el procedimiento, puede determinarse después de la hidrólisis o extracción de las micropartículas, mediante la cuantificación de las proteínas totales por cualquiera de los métodos convencionales (absorbancia a 280 nm, Lowry, Bradford y micro BCA). Por su parte, la carga hace referencia a la cantidad de proteína encapsulada o atrapada por unidad de masa de micropartículas y también se expresa en porcentaje (Mathew et al., 2014).

Finalmente, los perfiles de liberación también se analizan dependiendo si la micropartícula es una microesfera o una microcápsula y si el material con el que se preparó es biodegradable o hidrolizable ya que la liberación del compuesto

Tabla 1. Polímeros frecuentemente utilizados para la fabricación de micropartículas.

MATERIALES NATURALES	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS	USOS
<p>Quitosán</p> 	 <p>Polisacárido catiónico formado de unidades de glucosamina con enlaces β (1\rightarrow4). Obtenido por la deacetilación de la quitina, polímero presente en el exoesqueleto de insectos y crustáceos marinos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ●Biocompatibilidad y biodegradabilidad ●Abundancia de aminas primarias que lo hacen soluble en soluciones ácidas, lo que elimina el uso de químicos orgánicos durante su síntesis. ●Mayor tiempo de residencia en mucosa. 	<ul style="list-style-type: none"> ●Liberación oral de antígenos y fármacos como la insulina. ●Liberación de toxoides diftérico y tetánico. ●Liberación de DNA y RNA.
<p>Alginato</p> 	 <p>Copolímero no ramificado de ácido D-manurónico y L-gulurónico con enlaces β (1\rightarrow4) derivado de las algas marinas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ●Biocompatibilidad ●Baja inmunogenicidad ●Condiciones suaves de preparación sin el uso de solventes orgánicos. ●Se pueden entrecruzar con cloruro de calcio y quitosán para mejorar el perfil de liberación. 	<ul style="list-style-type: none"> ●Microencapsulación de proteínas, drogas y células. ●Liberación oral y nasal de antígenos.
<p>Gelatina</p> 	 <p>Forma desnaturalizada del colágeno.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ●Excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. ●No es inmunogénica. ●Alta solubilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> ●Liberación prolongada de citotóxicos, corticoides y antibióticos
<p>Celulosa</p> 	 <p>Homopolímero de unidades de glucosa con uniones β (1\rightarrow4).</p>	<ul style="list-style-type: none"> ●Biocompatibilidad. ●Biodegradabilidad. ●Sus derivados también conservan estas propiedades 	<ul style="list-style-type: none"> ●Liberación de antiinflamatorios, analgésicos, corticoides
<p>Celulosa-Acetato-Butirato (CAB)</p>	<p>Homopolímero de unidades de glucosa con uniones β (1\rightarrow4) derivado de la celulosa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ●Biodegradabilidad ●Ofrece amplia capacidad para modificaciones 	<ul style="list-style-type: none"> ●Liberación de citotóxicos.

Poli (ϵ -caprolactona)
(PCL)

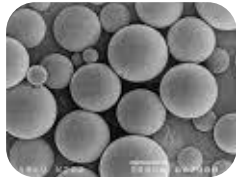
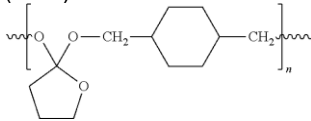


Polímero semicristalino de ϵ -caprolactona.

- Biodegradabilidad.
- Biocompatibilidad.
- Alta permeabilidad.
- No tóxico.
- Cinética lenta de degradación.

- Encapsulación y liberación de antibióticos.
- Liberación de antígenos y adyuvantes por vía oral.
- Co-encapsulación de drogas lipofílicas e hidrofílicas.

Poli (ortho-ester)
(POE)



Polímero de ortoésteres producto de la alquilación de los ácidos ortocarboxílicos.

- Biocompatibilidad.
- Biodegradabilidad.

- Liberación de proteínas y ácidos nucleicos.

Adaptada de Campos *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2010; Suri *et al.*, 2013.

de interés, puede darse por diferentes mecanismos dependientes de estos factores (Coelho et al., 2010; Sáez-Martínez, 2011). En el caso de las microesferas en las que la proteína está distribuida en la matriz polimérica, la liberación puede darse por difusión o por la erosión de la partícula, mientras que en el caso de las microcápsulas, la liberación ocurre principalmente por difusión, por lo tanto, los perfiles de liberación pueden ser variados (Ye et al., 2010). Si bien los análisis de liberación que se hacen in vitro pueden no correlacionar con lo que ocurre in vivo, son una herramienta importante para predecir la utilidad de las micropartículas como sistemas de liberación. Otros análisis más rigurosos pueden incluir además, la determinación de humedad y solvente residual, índice de hinchamiento, y estabilidad en diferentes condiciones de temperatura y pH con respecto al tiempo. Para estos análisis y en general para verificar la estructura y función de la proteína, la presencia de agregados y otros productos, se utilizan técnicas analíticas como cromatografía, espectrometría de masas, electroforesis, dicroísmo circular y ensayos de bioactividad (Teekamp et al., 2015). También resultan importantes los ensayos de degradación enzimática tanto in vitro como in vivo y los de citotoxicidad pues proveen información sobre su inocuidad (Devy et al., 2006; Liu et al., 2014).

PROPIEDADES Y CONDICIONES

De forma general, las propiedades de las micropartículas pueden modularse variando su composición, estructura y tamaño, dependiendo del uso y la vía de administración seleccionada,

pues las vías de administración parenteral (subcutánea, intramuscular, etc.) representan retos diferentes que las vías de administración por mucosas (oral, nasal, pulmonar, vaginal, etc.). Las propiedades físicas y químicas como el tamaño, la forma, la hidrofobicidad, la carga, la presencia de grupos funcionales para el acoplamiento o inmovilización de las moléculas, la solubilidad, la biocompatibilidad y biodegradabilidad, son además criterios fundamentales ya que determinan la estabilidad tanto in vitro como in vivo, la funcionalidad e inocuidad de las micropartículas y en particular su capacidad para modular la respuesta inmune (Liu et al., 2014). Por ejemplo, se ha observado que el tamaño es fundamental para obtener un tipo de respuesta deseado. Se ha reportado que micropartículas con tamaños inferiores a 10 μm pueden ser fagocitadas por las células presentadoras de antígeno y además pueden prolongar la presentación in vitro de la proteína o péptido asociado (Audran et al., 2003). Cuando son administradas por vía mucosa, aquellas con tamaños de hasta 5 μm pueden ser transportadas rápidamente por los vasos linfáticos eferentes hasta los órganos linfoides periféricos como el bazo e inducir respuesta inmune sistémica, o si son mayores de 5 μm pueden permanecer en las placas de Peyer ubicadas en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT por sus siglas en inglés) e inducir respuesta inmune local (Gutierrez et al., 2002). La forma que tengan las micropartículas también es un factor que se ha reportado afecta la respuesta inmune ya que juega un papel determinante en la activación del citoesqueleto

Tabla 2. Métodos más comunes de fabricación de Micropartículas.

MÉTODOS	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS Y DESVENTAJAS	EJEMPLOS
<p>I. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS</p> <p>Coacervación simple y compleja (o separación de fases)</p>	<p>Proceso de tres pasos en los que se forma una emulsión agua/aceite (W/O) con el polímero disuelto en la fase orgánica y la proteína o compuesto en la fase acuosa. La adición de un segundo polímero causa la precipitación del primero en forma de gotas líquidas o partículas sólidas que se estabilizan en otro disolvente orgánico. Las partículas obtenidas se lavan exhaustivamente, centrifugan y secan por congelación.</p>	<p>V: Muy estudiados a nivel de laboratorio, elevada eficiencia de encapsulación.</p> <p>D: Difícil obtención de partículas pequeñas, dificultad para su escalamiento y aplicación a nivel industrial, persistencia en la presencia de residuos de solvente en el producto final.</p>	<p>Toxoide diftérico en micropartículas de quitosano cubiertas de alginato (Shukla <i>et al.</i>, 2015)</p>
<p>II. MÉTODOS FÍSICO-MECÁNICOS</p> <p>a. Emulsificación-Evaporación del disolvente</p> <p>b. Secado por aspersión</p>	<p>Se forman emulsiones con la molécula contenida en la fase acuosa interna, el polímero en un disolvente orgánico en la fase oleosa, y una fase acuosa externa. El disolvente es eliminado a baja presión y temperatura para aumentar la viscosidad de la fase interna, seguida del aislamiento de las microesferas.</p> <p>En el secado por aspersión, la molécula en disolución acuosa o en</p>	<p>V: Amplio uso en el laboratorio, alta eficiencia de encapsulación, fácil escalamiento. El secado por aspersión además es más rápido y permite la obtención de micropartículas porosas entre 1 y 100 μm.</p> <p>D: Dificultad para controlar el tamaño de partícula, poca estabilidad y afectación de las proteínas por exposición a solventes y elevadas</p>	<p>a. Antimicrobiano (ácido usnico) en micropartículas de ácido poliláctico (Martinelli <i>et al.</i>, 2014)</p> <p>b. Inmunomoduladores como oligos CpG en micropartículas de PGLA (Malyala <i>et al.</i>, 2009)</p>

forma de partículas se dispersa en una disolución de polímero disuelto en un solvente orgánico volátil. La mezcla se bombea hacia el atomizador de aire caliente del secador y las partículas secas se llevan a un separador.

temperaturas, pérdida de producto final.

III. MÉTODOS QUÍMICOS

Polimerización Interfacial y heterogénea

Una fase no acuosa con surfactantes y una fase acuosa conteniendo el ligando se mezclan para formar una emulsión w/o en hielo. Se agrega otra fase no acuosa para que ocurra la polimerización en la interfase entre la solución acuosa que contiene el ligando y la solución orgánica que contiene los monómeros.

V: Puede llevarse a cabo bajo condiciones suaves que conservan toda o parte de la actividad biológica de la proteína encapsulada.

D: Presencia de residuos del monómero en el producto final.

Dificultad para su escalamiento y aplicación a nivel industrial.

Albúmina Sérica Bovina en microcápsulas de hidrietil almidón (Devy *et al.*, 2006).

Adaptada de Yeo *et al.*, 2001

de las CPAs y macrófagos y el proceso de fagocitosis (Champion & Mitragotri, 2006; Sharma et al., 2010). Este parámetro está estrechamente ligado con la carga, pues también promueve la fagocitosis por parte de los macrófagos, la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la expresión de moléculas coestimuladoras como el CD80 y la secreción de interleucinas, lo que le confiere propiedades adyuvantes a las micropartículas (Audran et al., 2003; Liu et al., 2014).

Con los métodos de fabricación e inmovilización seleccionados, se puede conseguir modular estas propiedades y contribuir a la estabilidad simultáneamente. Por ejemplo, la adición de carboxilatos puede resultar en la estabilización de las partículas en solución previniendo fenómenos de agregación por carga ya que es frecuente que muchas partículas, en especial las de menor tamaño se agreguen por interacciones de van der Waals o hidrofóbicas. Por el contrario, las partículas hidrofílicas (con grupos polares como los hidroxilos) pueden ser más estables por los efectos repulsivos que le confiere la capa de agua que se forma a su alrededor estando en solución acuosa (Hermanson, 2013). Sin embargo, en el caso de polímeros hidrofílicos como el almidón soluble, el método más común para preparar estas micropartículas para que sean resistentes a disolución en un ambiente fisiológico, es el entrecruzamiento de las cadenas de polisacárido, introduciendo grupos vinilo o diacrilato (Campos et al., 2013). También es común que para inhibir o reducir la degradación enzimática ocurrida en ambientes

fisiológicos como el tracto gastrointestinal y garantizar la cantidad adecuada del agente terapéutico, las micropartículas de polímeros solubles se combinen con otros polímeros como la poli- ϵ -caprolactona (Balmayor et al., 2009), o que la modificación química de los oligosacáridos, por acilación o acrilación, que se hace para permitir la unión covalente de los antígenos, también contribuya a su estabilidad en estos ambientes, lo cual además es esencial para la inducción de la respuesta inmune (Sternman et al., 2006).

Por otra parte, es muy importante que las micropartículas utilizadas como vehículo de antígenos sean biocompatibles y biodegradables, es decir que no provoquen ninguna respuesta fisiológica adversa que dañe el material después de interactuar con tejidos y fluidos corporales, y que los productos de su degradación no sean tóxicos y se procesen por las vías metabólicas usuales. Como estrategias para promover estas propiedades y limitar interacciones inespecíficas con otras proteínas o biomoléculas, es común agregar coberturas hidrofílicas a núcleos hidrofóbicos (micelas poliméricas). Los polímeros más utilizados con este propósito incluyen el polietilenglicol (PEG), el polivinil alcohol (PVA), el ácido poliacrílico (PAA) y cualquier polímero que tenga grupos éster, ortoéster o amida (Coelho et al., 2010; Jokerst et al., 2011). También se usa como estrategia la unión de brazos espaciadores hidrofílicos, que generalmente son moléculas orgánicas como el PEG con grupos polares en la cadena que pueden interactuar con el medio y que tienen en un extremo un líinker hidrofóbico para unirse a la partícula y en el otro extremo un

grupo funcional como el carboxilato para la unión del ligando. Esta estrategia llamada pegilación, no solo mejora la biocompatibilidad de la micropartícula sino que además contribuye con su estabilización (Jokerst et al., 2011; Teekamp et al., 2015).

Finalmente, y cumplidas todas estas condiciones, también se espera que un sistema de transporte y liberación basado en micropartículas permita: 1. Aumentar la solubilidad y estabilidad de la molécula asociada, 2. La liberación o entrega controlada, dirigida y en algunos casos sostenida de la molécula evitando efectos secundarios adversos, 3. El uso de menores concentraciones del fármaco o el antígeno y 4. Mejorar su distribución y biodisponibilidad (Tan et al., 2010; Campos et al., 2013). Estos objetivos se pueden alcanzar utilizando tanto la vía de administración parenteral como mucosa, sin embargo los resultados más promisorios se han obtenido utilizando esta última vía. Si bien se deben penetrar las barreras del epitelio para alcanzar las células competentes ubicadas en mucosa y superar condiciones drásticas de pH y presencia de proteasas (Stertman et al., 2006), las propiedades mucoadhesivas de las micropartículas de polímeros pueden resultar ventajosas ya que pueden favorecer el suministro constante de los antígenos.

MECANISMOS DE CAPTURA Y DESTINO

Los mecanismos de captura y destino de las micropartículas dependen estrechamente de su tamaño, material y vía de administración. Cuando son administradas por vía parenteral, las micropartículas pueden activar los

mecanismos de opsonización, haciéndose más reconocibles para el sistema fagocítico en periferia y en consecuencia pueden ser removidas de circulación antes de llegar al blanco deseado. Al contrario de lo ocurrido con las nanopartículas que pueden escapar de la fagocitosis y circular en el torrente sanguíneo por más tiempo, las partículas mayores de 200 nm circulan poco tiempo y finalmente pueden ser aclaradas por el hígado, el bazo o los pulmones, o dependiendo de la carga pueden favorecer una fagocitosis no específica por células diferentes a las células blanco (Yu et al., 2015).

Por su parte, cuando las micropartículas son administradas vía mucosas, el moco es la principal barrera física que deben atravesar, una vez que atravesaron barreras como el pH y las proteasas. Básicamente el moco es un hidrogel complejo, compuesto de fibras de mucina entrecruzadas y unidas mediante interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, que forman poros de tamaños diferentes y que pueden además retener sales, anticuerpos, bacterias y detritos celulares. Las mucinas, pueden ser secretadas o pueden estar unidas a las células, representando entre un 2-5% del moco en peso seco. Estas proteínas contienen grandes cantidades de residuos de serina, treonina y prolina con N- (2-3%) y O-glicosilaciones (40-80%) que varían en tamaño y nivel de ramificación dependiendo su ubicación (Ensign et al., 2012).

La carga negativa del moco y la variabilidad en su composición y grosor (relación entre sus capas ligera y firmemente adherente) a lo largo

Artículos

del tracto gastrointestinal y en otras cavidades cubiertas de moco, son factores determinantes también para el destino de las partículas. Éstas pueden atravesarlo, adherirse o incluso ser excluidas, según sea su composición, carga y tamaño (ver figura 2). Como sistemas de liberación de antígenos o fármacos se buscan partículas penetrantes o mucoadhesivas, por lo que se puede recurrir a estrategias para variar estas características. Para la obtención de partículas penetrantes se pueden utilizar las coberturas con PEG y copolímeros de bajo peso molecular o incluir agentes mucolíticos en la partícula (Liu et al., 2015). Para la obtención de partículas mucoadhesivas se utilizan polímeros

hidrofílicos, o se pueden adicionar grupos tiol en el esqueleto del polímero para promover la formación de puentes disulfuro con los dominios ricos en cisteína de las mucinas.

El proceso de mucoadhesión resulta favorable ya que prolonga el tiempo de residencia y mejora la biodisponibilidad en el sitio de aplicación facilitando el contacto del fármaco o el antígeno con la superficie del tejido blanco. Este proceso incluye dos etapas: el contacto, en el que ocurre la hidratación e hinchamiento del polímero para permitir su penetración y la consolidación, en la que ocurre el entrecruzamiento con las fibras de mucina y la formación de interacciones débiles (van der

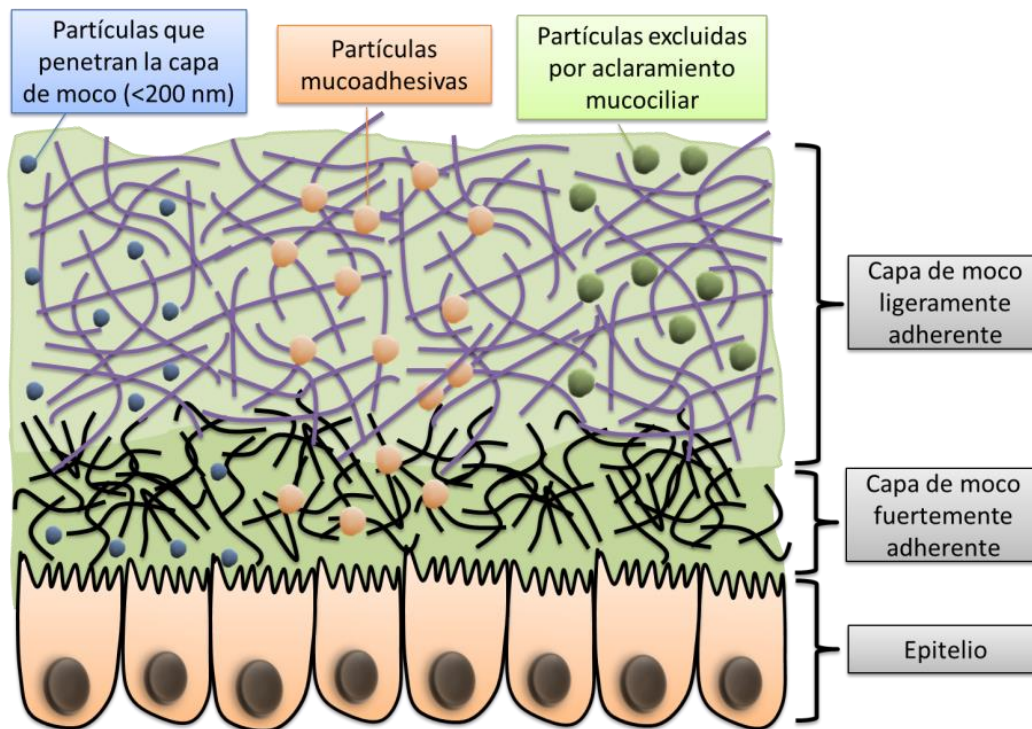


Fig. 2. Destino de las partículas de polímeros en la barrera de moco. Partículas aniónicas pequeñas pueden atravesar la malla de moco entrando en contacto directo con las células del epitelio. Micropartículas catiónicas con propiedades mucoadhesivas interaccionan con las fibras de mucina aumentando el tiempo de residencia y la biodisponibilidad del antígeno o fármaco. Partículas de otros materiales pueden ser aclaradas en la capa ligeramente adherente del moco y por acción de los cilios. Adaptada de Liu *et al.*, 2015.

Artículos

Waals y puentes de hidrógeno). Para esto, y sin importar la estrategia utilizada para la fabricación, la partícula polimérica debe tener suficientes grupos OH^- disponibles para los puentes, debe tener una carga aniónica superficial, alto peso molecular, flexibilidad de las cadenas y tensión superficial que permita su distribución en la capa de moco (Boddupalli et al., 2010).

Las propiedades físico químicas que determinan si las partículas serán penetrantes o mucoadhesivas (carga y tamaño) también son determinantes para los procesos de transporte en mucosa. Las partículas mucoadhesivas pueden ir liberando el antígeno o fármaco antes de entrar en contacto con las células del epitelio o bien, como pasa con las partículas penetrantes, pueden quedar en la superficie del epitelio y ser transportadas si tienen el tamaño adecuado. Una vez en el nivel de contacto con las células del epitelio, las partículas pueden ser

transportadas al lumen por cuatro posibles mecanismos, que también están descritos para las micropartículas de origen endógeno y que son: la endocitosis mediada por receptores, el transporte paracelular, la persorción y la transcitosis (ver figura 3) (Powell et al., 2010; Plapied et al., 2011).

La endocitosis mediada por receptores es la vía de entrada por las células epiteliales regulares, mientras que el transporte paracelular ocurre entre las uniones celulares. Estas dos vías dan paso preferencial a nanopartículas de hasta 50 nm. Para las micropartículas el principal mecanismo de entrada es la transcitosis, que es el paso a través de las células M presentes en el tejido linfoide asociado tanto a intestino como a nasofaringe (GALT y MALT respectivamente y por sus siglas en inglés). Durante la transcitosis, las proteínas o péptidos cargados en las micropartículas pueden sufrir degradación parcial en los lisosomas y ser

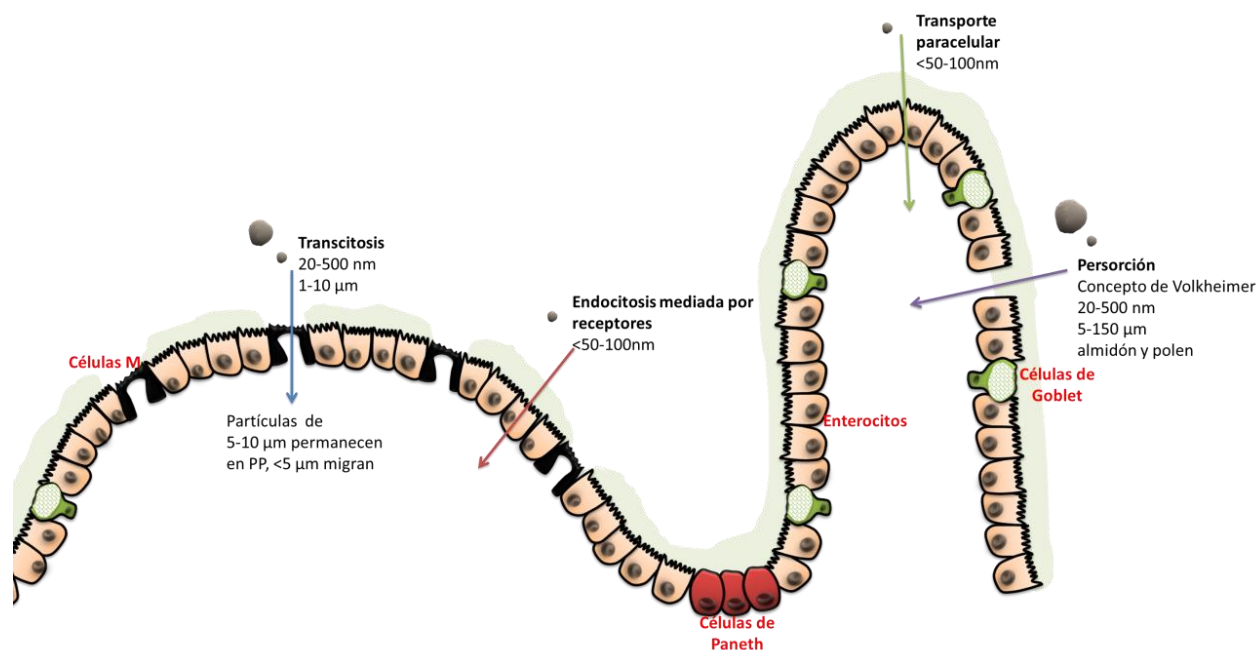


Fig. 3. Transporte de las micropartículas a través de mucosa intestinal.

liberados listos para su cargado en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las CPAs y para su procesamiento y presentación a los linfocitos T (Ménard et al, 2010). Con mucha menor frecuencia, las micropartículas también pueden pasar a través de los gaps del epitelio (ocurridos por pérdida celular) en un fenómeno conocido como persorción o concepto de Volkheimer (O'Hagan, 1998).

VENTAJAS DEL USO DE POLÍMEROS NATURALES PARA LA FABRICACIÓN DE MICROPARTÍCULAS: EL ALMIDÓN COMO ALTERNATIVA

Entre los polímeros naturales utilizados para la fabricación de micropartículas para administración de antígenos, el quitosán ha sido tal vez, el más utilizado. No sólo es biodegradable, biocompatible y mucoadhesivo sino que se sabe es un modificador natural de la respuesta inmune, una propiedad reportada para la mayoría de los beta glucanos. Entre sus propiedades están la activación de macrófagos y la inducción de citocinas proinflamatorias (INF- γ , TNF- α , IL-12 e IL-18) y anticuerpos. Estos efectos están mediados por la interacción de las partículas con receptores de patrones de reconocimiento (PRRs por sus siglas en inglés) presentes en macrófagos y células dendríticas, y que reconocen carbohidratos tales como receptores de manosa, Dectina-1 y TLR-2 (Petrovsky & Cooper, 2011). En consecuencia, y para explotar todas estas propiedades son muchos los protocolos reportados para la fabricación de estas micropartículas, bien como

componente único en las formulaciones o en combinación con otros polímeros.

Por otra parte, el uso del almidón, también se ha reportado para el diseño y fabricación de micropartículas con propiedades adyuvantes (Rydell et al., 2005). Estas micropartículas, preparadas a base de almidón soluble (malto-oligosacáridos) y modificadas químicamente para el atrapamiento o conjugación de los antígenos se han administrado por diferentes vías como la oral, parenteral y nasal (Stertman et al., 2004; Rodrigues & Emeje, 2012), comprobándose el aumento de su estabilidad en condiciones como las del tracto gastrointestinal y su eficiencia para inducir respuesta sistémica y local de anticuerpos así como respuesta de tipo celular (Rydell & Sjöholm, 2004). Sin embargo, no existen antecedentes del uso de micropartículas, tanto de almidón como de otros polímeros naturales, que no hayan sido modificadas químicamente para permitir la unión de antígenos para su posterior administración. La tabla 1 resume las principales aplicaciones exploradas para los principales biopolímeros.

Una alternativa desarrollada recientemente, aprovecha un sistema para la inmovilización no covalente de antígenos sobre micropartículas de almidón crudo. La adsorción, mediada por un Dominio de Fijación al Almidón (DFAtag), que interactúa con el almidón a través de uniones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, permite estabilizar a los antígenos en su trayecto por el tracto gastrointestinal cuando son administrados vía oral. La administración de diferentes antígenos inmovilizados en micropartículas de almidón a través de este dominio favorece la inducción de una respuesta inmune antígeno-

específica que puede ser de tipo humoral o celular, tanto por la vía oral como por la vía nasal (Guillén et al., 2014; Moreno-Mendieta et al., 2014). Esta alternativa resulta muy ventajosa ya que no requiere la funcionalización de la partícula con la consecuente disminución en costos y riesgos derivados del uso de solventes orgánicos. Además se aprovechan las propiedades intrínsecas del almidón, tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad e inocuidad.

PERSPECTIVAS SOBRE EL USO DE MICROPARTÍCULAS DE POLÍMEROS EN EL CAMPO DE LA VACUNACIÓN

En las últimas décadas, ha sido notorio y acelerado el progreso en el área de desarrollo de sistemas microparticulados de administración y liberación de proteínas o péptidos. No solo como herramienta para la administración de fármacos, la cual es ampliamente utilizada en la industria de medicamentos desde hace mucho tiempo, sino como alternativa para la administración de antígenos o inmunoestimulantes, con la consecuente aplicación en el área de la vacunación. La persistencia de enfermedades como el cáncer y las enfermedades infecciosas o degenerativas, demanda la búsqueda de nuevas vacunas y/o tratamientos, por lo que el uso de micropartículas de polímeros en estos modelos también se ha evaluado.

Por ejemplo, desde hace algunos años se ha explorado el uso de microcápsulas de hidroxietil almidón para proteger antígenos utilizados en el tratamiento del melanoma (Devv et al., 2006), o en modelos celulares de

adenocarcinoma colorectal, se han utilizado exitosamente partículas de β -glucanos para la activación de citocinas proinflamatorias y receptores tipo Toll y tipo lectina. Administradas por vía oral se ha demostrado que estas micropartículas tienen la capacidad de inducir una respuesta específica de anticuerpos (De Smet et al., 2013). También se han utilizado microesferas de PLGA y quitosán para la administración del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), comprobándose su idoneidad como vacunas de aplicación única con la capacidad para estimular respuesta inmune específica y de memoria gracias a su perfil de liberación controlada y sostenida (revisado en McHug et al., 2015). Incluso se ha evaluado el uso de micropartículas para la administración subcutánea y nasal del péptido beta amiloide, como estrategia para evitar respuestas adversas de tipo celular y lograr el diseño de una vacuna contra el Alzheimer (Puras et al., 2011).

Como se describió en los apartados anteriores, los sistemas microparticulados para la administración de antígenos ofrecen múltiples ventajas en el área ya que, pueden contribuir a la estabilidad de las proteínas, facilitar y dirigir su liberación en tejidos y células especializadas y además pueden conferir propiedades adyuvantes necesarias en una vacuna. Sin embargo, los retos continúan. Con los sistemas de administración vía mucosas, la inestabilidad de los antígenos en condiciones drásticas como las del tracto gastrointestinal o la fuerte respuesta que puede inducirse en algunas zonas como la nasofaringe, siguen limitando su uso. Con los sistemas de administración

parenteral el rápido aclaramiento después de la inyección y el consecuente aumento en la frecuencia de las aplicaciones, impactan en el apego de los individuos a los esquemas de inmunización o tratamiento. Por otra parte se sabe que los protocolos de preparación y funcionalización de las micropartículas pueden afectar la estructura y funcionalidad de las proteínas así como la inocuidad de las preparaciones debido al uso de compuestos orgánicos no deseados, con repercusiones en los procesos de escalamiento a nivel industrial.

Con este panorama, el diseño de micropartículas para la administración de antígenos, debe orientarse más al uso de polímeros naturales y a la búsqueda de métodos más limpios y fáciles de preparación que permitan además estabilizar a las formulaciones para su almacenamiento (prescindiendo de cadenas frías para su conservación) y una disminución importante en los costos para su comercialización. Así mismo resulta importante optimizar este tipo de sistemas para su uso vía mucosas dadas la ventajas que tiene esta ruta con respecto a la vía de administración parenteral y al hecho que, sin existir adyuvantes mucosales aprobados para su uso en humanos, se puede tomar partido de las propiedades adyuvantes que tienen estos polímeros.

REFERENCIAS

- Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W & Hennink WE (2010) Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60: 59-82.
- Audran R, Petter K, Dannull J, Men Y, Scandelle E, Groettrup M, Gander B & Corradin G (2003) Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine.* 21: 1250–1255.
- Balmayor ER, Tuzlakoglu K, Azevedo HS & Reis RL (2009) Preparation and characterization of starch-poly-[epsilon]-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia.* 5: 1035-1045.
- Boddupalli BM, Mohammed ZNK, Nath RA & Banji D (2010) Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1: 381-387.
- Campos E, Branquinho J, Carreira AS, Carvalho A, Coimbra P, Ferreira P & Gil MH (2013) Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *Eur. Polym. J.* 49: 2005-2021.
- Champion JA & Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 4930–4934.
- Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Góis JR & Gil MH (2010) Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA J.* 1: 164-209.
- Datta S, Christena LR & Rajaram YRS (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech.* 3: 1-9.
- Devy J, Balasse E, Kaplan H, Madoulet C & Andry MC (2006) Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor

- immunotherapy application. *Int. J. Pharm.* 307: 194-200.
- De Smet R, Demoor T, Verschuere S, Dullaers M, Ostroff GR, Leclercq G, Allais L, Pilette C & Dierendonck M (2013) β -Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *J. Control. Release.* 172: 671-678.
- Ensign LM, Cone R & Hanes J (2012) Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Del. Rev.* 64: 557–570.
- Fundueanu G, Constantin M, Bortolotti F, Cortesi R, Ascenzi P & Menegatti E (2007) Cellulose acetate butyrate–pH/thermosensitive polymer microcapsules containing aminated poly(vinyl alcohol) microspheres for oral administration of DNA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 11-20.
- Guillén D, Moreno-Mendieta S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S & Rodríguez-Sanoja R (2014) Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydr. Polym.* 112: 210–215.
- Gutierrez I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR & Pedraz JL (2002) Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine.* 21: 67-77
- Hermanson GT (2013) Chapter 14. Microparticles and Nanoparticles. In: *Bioconjugate Techniques*. Third Edition. Academic Press, Elsevier. pp. 549-587.
- Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN & Gambhir SS (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine.* 6: 715-728.
- Karshikoff A (2006) *Non-covalent interactions in proteins*. Imperial College Press. London. 333p.
- Kumari A, Yadav SK & Yadav SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 75: 1-18.
- Liu Y, Chen X, Wang L, Yang T, Yuan Q & Ma G (2014) Surface charge of PLA microparticles in regulation of antigen loading, macrophage phagocytosis and activation, and immune effects in vitro. *Particuology,* <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2014.02.006>
- Liu M, Zhang J, Shan W & Huang Y (2015) Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian J. Pharm. Sci.* 10: 275-282.
- McHugh KJ, Guarecuco R, Langer R & Jaklenec A (2015) Single-injection vaccines: Progress, challenges, and opportunities. *J. Control. Release.* 219: 596-609.
- Malyala P, O'Hagan DT & Singh M (2009) Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 218–225.
- Mathew S, Lendlein A & Wischke C (2014) Characterization of protein-adjuvant coencapsulation in microparticles for vaccine delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87: 403-407.
- Ménard S, Cerf-Bensussan N & Heyman M (2010) Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of

- dietary antigens. *Mucosal Immunol.* 3: 247-259.
- Moreno-Mendieta SA, Guillén D, Espitia C, Hernández-Pando R, Sanchez S & Rodríguez-Sanoja R (2014) A novel Antigen-carrier system: The Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. *Int. J. Pharm.* 474: 241–248.
- O'Hagan DT (1998) Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Adv. Drug. Del. Rev.* 34: 305-320.
- O'Hagan DT, Singh M & Ulmer JV (2006) Microparticle-based technologies for vaccines. *Methods.* 40: 10–19.
- Plapied L, Duhem N, des Rieux A & Préat V (2011) Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Curr. Opin. Colloid In. Sci.* 16: 228-237.
- Petrovsky N & Cooper PD (2011) Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert. Rev. Vaccine.* 10: 523-537.
- Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E & Pele LC (2010) Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J. Autoimmun.* 34: J226-33.
- Puras G, Salvador A, Igartua M, Hernández RM & Pedraz JL (2011) Encapsulation of A β 1–15 in PLGA microparticles enhances serum antibody response in mice immunized by subcutaneous and intranasal routes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44: 200-206.
- Reddy ST, Swartz MA & Hubbell JA (2006) Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *TRENDS Immunol.* 27: 573-579.
- Rodrigues A & Emeje M (2012) Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydr. Polym.* 87: 987–994.
- Rydell N & Sjöholm I (2004) Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. *Vaccine.* 22: 1265–1274.
- Rydell N, Stertman L & Sjöholm I (2005) Starch microparticles as vaccine adjuvant. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 2: 807-828.
- Saez-Martínez VM (2011) Microesferas de copolímeros de ácido láctico y glicólico cargadas con interferón alfa 2b y factor de crecimiento epidérmico: Obtención, caracterización y estudios de liberación. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad de la Habana. Habana, Cuba. pp. 1-134.
- Sharma G, Valenta DT, Altman Y, Harvey S, Xie H, Mitragotri S., et al. (2010). Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release.* 147: 408–412.
- Shukla A, Mishra V, Singh Bhoop B & Katare OP (2015) Alginate coated chitosan microparticles mediated oral delivery of diphtheria toxoid. Part A: Systematic optimization, development and characterization. *Int. J. Pharm.* 495: 220-233.
- Suri S, Ruan G, Winter J & Schmidt CE (2013) Chapter 1.2.19. Microparticles and Nanoparticles. In: *Biomaterials Science (Third Edition)*. Academic Press, Elsevier. pp. 360-388.

- Stertman L, Strindelius L & Sjöholm I (2004) Starch microparticles as an adjuvant in immunisation: effect of route of administration on the immune response in mice. *Vaccine*. 22: 2863–2872.
- Stertman L, Lundgren E & Sjöholm I (2006) Starch microparticles as a vaccine adjuvant: Only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response. *Vaccine*. 24: 3661-3668.
- Tan ML, Choong PEM & Dass CR (2010) Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. 31: 184-193.
- Tauer K, Imroz Ali AM, Sedlak M (2005) On the preparation of stable poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* 283: 351–358.
- Teekamp N, Duque LF, Frijlink HW, Hinrichs WLJ & Olinga P (2015) Production methods and stabilization strategies for polymer-based nanoparticles and microparticles for parenteral delivery of peptides and proteins. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 12: 1311-1331.
- Traina M, Galy J, Gérard JF, Dikic T & Verbrugge T (2012) Synthesis of cross-linked epoxy microparticles: Effect of the synthesis parameters. *J. Colloid Interface. Sci.* 368: 158-164.
- Wieber A, Selzer T & Kreuter J (2011) Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug delivery systems: a comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. *Int. J. Pharm.* 12: 151-159.
- Wikingsson L & Sjöholm I (2002) Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*. 20: 3355–63.
- Ye M, Kim S & Park K (2010) Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J. Control. Release*. 146: 241-260.
- Yeo Y, Baek N & Park K (2001) Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 213-230.
- Yu M, Wu J, Shi J & Farokhzad OC (2015) Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives, *J. Control. Release*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.012>
- Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao C, Milter N, Yu C. & Middelberg APJ (2014) Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 32: 327-337.