



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EN EL DESARROLLO
DE VACUNAS.**

Autor: Ortiz Valdez, Areangel Daniela

Fecha: Julio 2020

Tutor: Barcia Hernández, Emilia María

Índice

1.	RESUMEN	3
2.	INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	3
2.1	Nanotecnología y Nanomedicina	3
2.2	Vacunación	4
3.	OBJETIVOS.....	4
4.	METODOLOGÍA	5
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
5.1	Nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos.....	5
5.2	Aspectos biofarmacéuticos	6
5.3	estructura de las nanopartículas	7
5.4	Preparación de nanopartículas.....	7
5.4.1	Polímeros.....	7
5.4.2	Técnicas de preparación.....	8
5.4.3	Caracterización de las nanopartículas	10
5.5	Aplicación de nanopartículas en el desarrollo de vacunas.....	11
5.5.1	Sistema inmune	11
5.5.2	Inmunoadyudantes	12
5.5.3	Vías de administración	12
5.5.3.1	Administración parenteral.....	13
5.5.3.2	Vía oral.....	14
5.5.3.3	Vía nasal.....	15
6.	CONCLUSIÓN.....	16
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	17

1. RESUMEN

El presente trabajo consiste en una revisión bibliográfica de la situación actual de la nanotecnología aplicada en el campo de la medicina, concretamente en el uso de nanopartículas poliméricas para el desarrollo de vacunas frente a enfermedades infecciosas, aunque debido a su relevancia clínica también se realiza mención de vacunas frente a otras patologías como las alergias, y los procesos oncológicos. Se describen y analizan los conceptos generales de las nanopartículas y de los poliméricos sintéticos más empleados en su elaboración. Se analiza el papel que desempeñan en el tipo de respuesta inmune generada durante la vacunación. Este tipo de inmunización activa resulta fundamental para el control y erradicación de enfermedades que suponen un gran coste en la salud pública. Mediante la utilización de las nanopartículas poliméricas se busca aumentar la eficacia de la vacunación, potenciando la respuesta inmune generada y actuando como sistema de liberación controlada de los antígenos encapsulados. Con ello se pretende disminuir los efectos adversos derivados de la vacunación, razón por la cual un porcentaje de la población decide no vacunarse, siendo susceptibles a padecer la enfermedad.

Palabras claves: Nanopartículas, polímeros, vacunación, respuesta inmune, sistema de liberación controlada, inmunoadyudante, nanomedicina.

ABSTRACT

The following work aims to carry out a bibliographic review of the current situation about nanotechnology applied in the field of medicine, specifically in the use of polymeric nanoparticles (NPs) in the development of vaccines against infectious diseases, although due to their clinic relevance, it has to be mentioned, as well, to vaccines against other pathologies such as allergies and cancer. General concepts of NPs and synthetic polymers are described which are being studied for their role in the type of immune response elicited during vaccination. This type of active immunization is essential for the control and eradication of diseases that pose a great cost to public health. Through the use of NPs the aim is to increase the efficiency of vaccination, enhancing the generated immune response and acting as a controlled delivery system. This is expected to reduce the side effects of vaccination, which is the principal reason why a percentage of the population decides not to be vaccinated, being susceptible to suffering from the disease

Key words: Nanoparticles, polymers; vaccination; immune response, controlled drug delivery systems; nanomedicine.

2. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología y Nanomedicina.

El término nanotecnología se refiere a la manipulación de la materia en la escala de los átomos y las moléculas. Un nanómetro (nm) equivale a la milmillonésima parte de 1 m. A escala nanométrica, los materiales pueden presentar propiedades muy diferentes que los mismos materiales de la misma composición, a una escala mayor; propiedades como fuerza,

conductividad, color y toxicidad pueden verse modificadas (1). La primera mención que se hizo sobre la nanotecnología fue en el año 1959 por el Dr. Richard Feynman en una conferencia, donde habló acerca de la posibilidad de manipular directamente átomos y moléculas (2) pero en el año 1974 el término de nanotecnología fue utilizado por primera vez por Norio Taniguchi, científico en la universidad de Tokio, quien en sus investigaciones lo empleó para referirse a los materiales nanométricos (3). La nanotecnología se presenta como una nueva manera de trabajar con los materiales, que debido a su gran potencial, aporta numerosos beneficios en varias áreas de investigación, con el fin de llegar a aplicaciones en numerosos campos.

Entre sus aplicaciones se encuentran la Nanomedicina, que puede ser definida como la ciencia y la tecnología utilizada en el diseño y evaluación de sistemas complejos, a escala nanométrica, formado por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y, el segundo, es el propio sistema que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad (4).

La plataforma Europea de Nanomedicina ha publicado en noviembre de 2006 la Agenda Estratégica de Investigación en Nanomedicina, en la que se incluyen los campos de actuación, haciendo especial énfasis en las necesidades médicas, donde la Nanomedicina podrá proporcionar opciones de diagnóstico y de tratamiento muy esperanzadoras en numerosos campos, y en los que se encuentra el desarrollo de nuevas vacunas (5), aspecto en el que nos centramos en este trabajo.

2.2 Vacunación.

La vacunación consiste en la administración de un microorganismo o componente del mismo, ya sea en una forma muerta o atenuada, que no cause enfermedad, pero sí desencadene una respuesta inmunitaria que proporcione protección contra la infección por el microbio patógeno vivo (6). A pesar de que se conozcan los fármacos, pueden surgir problemas en el momento de su administración como puede ser: la necesidad de añadir al principio activo excipientes que aumenten su biodisponibilidad, la extravasación de agentes citotóxicos que pueden provocar daños en los tejidos. Otros problemas surgen debido a la naturaleza hidrofóbica de ciertos compuestos, lo que hace que puedan precipitar en un medio acuoso, o bien debido a que sufren un rápido proceso de eliminación por órganos, requiriendo dosis más elevadas, mientras que otros pueden tener una distribución generalizada por el organismo afectando en consecuencia a tejidos sanos (7).

En los últimos años se ha estudiado la encapsulación o adsorción de antígenos de superficie en nanopartículas biodegradables como una alternativa a los coadyuvantes actuales, y con el objetivo de desarrollar mejores vacunas y poder reducir tanto la frecuencia como el número de dosis requeridas para lograr la inmunización del paciente.

3. OBJETIVOS

- ⇒ Desarrollar el concepto de las nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos, abarcando también el estudio de los aspectos biofarmacéuticos.
- ⇒ Describir las técnicas de preparación y caracterización de las nanopartículas a base de poliésteres.
- ⇒ Conocer la aplicación de las nanopartículas en el desarrollo de vacunas, los retos a los cuales se enfrenta su desarrollo en la actualidad, y las perspectivas de futuro que presenta esta estrategia.

4. METODOLOGÍA

La realización de este trabajo consiste en una revisión bibliográfica en base de datos como Pub-Med-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), SciELO (www.scielo.org), ACS Publications (www.pubs.acs.org) y Elsevier (www.elsevier.com), además de consultar libros y artículos científicos. Para llevar a cabo la búsqueda de manera específica se emplearon palabras claves como: “nanomedicine”, “nanoparticle”, “polymers”, “drug delivery system”, “vaccination”, entre otras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos.

La aplicación de la nanotecnología en el campo de la Nanomedicina se concreta en mejoras en los métodos diagnósticos, medicina regenerativa y en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos. Es posible la obtención de nanosistemas multifuncionales, un ejemplo de ello fue desarrollado por Kogure y col. (8), denominado sistema MEND (multifunctional envelope-type nanodevice) el cual contenía ligandos de vectorización, péptidos tusígenos como actaarginina. Estos sistemas van a estar constituidos por el principio activo y por un sistema transportador, dentro de los cuales se encuentran: los liposomas, micelas poliméricas, vectores de ADN, conjugados poliméricos, dendrímeros y nanopartículas, entre otros. Estos sistemas transportadores tiene como finalidad transportar el fármaco hasta su diana, lugar donde ha de ser liberado de forma específica.

A pesar de existir diferentes sistemas, todos ellos persiguen las mismas finalidades (3):

- ⇒ Proteger al fármaco de su degradación tanto física como química.
- ⇒ Dependiendo de la vía de administración, incrementar la absorción de los fármacos.
- ⇒ Incrementar la penetración y distribución intracelular, aspecto fundamental cuando el fármaco actúa en una diana que se encuentra en el interior de la célula.
- ⇒ Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a determinados tejidos diana u órganos, con el objetivo de disminuir los efectos secundarios en órganos/tejidos no deseados, aumentando así su eficacia.
- ⇒ Modular la liberación del fármaco a partir del sistema nanométrico.

En general, los nanosistemas deben cumplir los siguientes requisitos: deben estar formados por materiales biocompatibles y biodegradables (si el sistema de administración parenteral, su tamaño ha de ser nanométrico (así se posibilita su entrada a través de poros y membranas celulares), poseer una elevada encapsulación en su interior del principio activo, presentar un prolongado tiempo de circulación en el torrente sanguíneo, logrando una liberación controlada sostenida del fármaco, y presentar una distribución más selectiva del principio activo, evitando de esta manera efectos adversos no deseados (3, 7). Lo deseable sería que el sistema tuviese la capacidad de acceder y liberar el principio activo en su biofase. Dicha capacidad se puede conseguir mediante la modificación de su superficie, logrando una vectorización pasiva, además posibilita el reconocimiento específico y unión a tejidos o células diana por medio de ligandos, como pueden ser los anticuerpos monoclonales o aptámeros. Esta modificación en la superficie también puede ser empleada para que el fármaco se libere en función de determinadas características, como puede ser el pH y la temperatura.

5.2 Aspectos biofarmacéuticos.

Los nanosistemas farmacéuticos presentan características diferentes y determinadas a la de los principios activos que contienen. Las nanopartículas son empleadas para proporcionar protección al principio activo y a su vez, disminuir el aclaramiento de fármacos que presenten semividas de eliminación cortas o sean degradados fácilmente.

La biodistribución de las nanopartículas (NPs) va a estar limitada por diversos factores: tamaño del poro de la membrana celular del tejido diana, carga superficial, hidrofobicidad de la nanopartícula y por el proceso de opsonización, entre otros (9). Por ejemplo, al ser administradas por vía intravenosa, las nanopartículas pueden sufrir procesos de degradación por enzimas específicos, o bien, si se encuentran contenidas en vectores que las protejan, pueden sufrir procesos de agregación o adhesión a los componentes plasmáticos.

Una vez en el torrente circulatorio las NPs, sin modificación en su superficie, son reconocidas como partículas extrañas por una serie de proteínas séricas conocidas como opsoninas, se van a depositar en su superficie, llevando a cabo el proceso de opsonización. Dichas opsoninas van a ser reconocidas por los macrófagos, lo que conduce a la internalización de las NPs, sufriendo aclaramiento por parte del sistema mononuclear fagocítico (SMF), lo cual supone una importante pérdida de las NPs presentes en la circulación (10).

Esta captación por el sistema SMF puede utilizarse como vía para la realización de una vectorización pasiva de fármacos que tengan su diana en el hígado o en el bazo, debido a que son captados por los macrófagos, así se puede emplear esta vectorización para la liberación de antineoplásicos en hepatocarcinomas o metástasis hepáticas procedentes de tumores ginecológicos, broncopulmonares o del tracto digestivo, entre otros. Por ejemplo, Cuvier y col. (11) han desarrollado NPs de isohexilcianoacrilato conteniendo doxorubicina en su interior, que son captadas por los macrófagos dando lugar a una elevada adsorción en la superficie celular, pero debido al complejo que forman con el polímero no son reconocidas por las glicoproteínas P, evitando así la resistencia al fármaco. Se han desarrollado también NPs cuya captación por el sistema SMF puede ser útil para la liberación intracelular de fármacos antiparasitarios en el tratamiento de la leishmaniosis. Ejemplo de ello son las NPs de polliisohexilcianoacrilato cargadas con primaquina y destinadas a actuar frente a *Leishmania donovani* (12).

Las NPs pueden presentar también modificaciones en su superficie mediante la conjugación con polietilenglicol (PEG) y otros polímeros, con la finalidad de reducir la absorción de proteínas, el proceso de opsonización, facilitar su acceso a determinadas dianas, y prolongar su circulación por el torrente sanguíneo, disminuyendo la captación por el SMF (13). Esta modificación también es empleada debido a las mínimas influencias que presenta sobre las propiedades farmacológicas del fármaco que se encuentra encapsulado y porque mejorar ciertas características como hidrosolubilidad y flexibilidad (14). Todo ello conduce a una mayor estabilización estérica que sin embargo, en ocasiones puede debilitar la interacción con la célula diana, disminuyendo la cantidad de fármaco liberada a nivel intracelular. Por lo tanto, si el fármaco puede atravesar con facilidad la membrana celular, se deberían realizar mínimas modificaciones para no comprometer su liberación y biodisponibilidad. Caso diferente sucede cuando el fármaco no puede atravesar la membrana plasmática y/o hematoencefálica, en cuyo caso se puede recurrir a la modificación de la superficie de las NPs (9).

Los tejidos patológicos; como lo son los tumores sólidos o zonas inflamadas o infectadas, presentan características diferentes a las del tejido fisiológico. Dicha peculiaridad es empleada para mejorar la liberación del fármaco en la célula diana. El efecto de permeabilidad y retención incrementada (EPR effect en la terminología inglesa) es un fenómeno de extravasación incrementada de macromoléculas de los vasos sanguíneos tumorales y su retención en el tejido patológico. Este presenta fenestras que permiten el acceso de las NPs y su acumulación en el espacio intersticial (14, 15).

Las dianas terapéuticas pueden estar presentes en la membrana plasmática, en el citoplasma o en el núcleo. En cualquiera de los casos es necesario un proceso de internalización de las NPs, que es un proceso complejo de interacciones entre el nanosistema y los componentes celulares de la membrana, que desencadena una cascada de señales celulares que determinan el mecanismo de internalización. Estos mecanismos pueden ser por endocitosis o pinocitosis inespecíficas siendo procesos concentración y tiempo dependientes (14) o endocitosis mediada por receptores ubicados en la membrana celular a través del cual se introduce el sistema nanométrico en vesículas recubiertas principalmente por la proteína clatrina (16). Esta vesícula formada recibe el nombre de endosoma primario y puede seguir dos rutas: reciclarse a la superficie celular o englobarse con lisosomas, formando un endolisosoma. Estas enzimas actúan a un pH ácido consecuencia de las bombas de protones localizadas en la superficie del endolisosoma (17), razón por la cual el sistema de liberación del fármaco tiene que poseer las características adecuadas para no ser degradado ni permitir la degradación del principio activo en condiciones de acidez (18). La rotura del endolisosoma permite que el nanosistema libere el fármaco, parte del cual puede o no sufrir degradación y parte alcanzar su diana, a nivel del citosol o el núcleo.

5.3 Estructura de las nanopartículas

Las NPs se pueden obtener en forma de nanocápsulas y de nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas tipo reservorio en cuyo interior se encuentra el fármaco recubierto por una membrana que controla su liberación, mientras que las nanoesferas son sistemas de tipo matricial, en las que el fármaco se encuentra disperso en la matriz polimérica de forma homogénea (14). La liberación del fármaco en las NPs se puede producir por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la difusión a través del sistema, la degradación o erosión del polímero y la combinación en ambos mecanismos (19). La selección del tipo de nanopartícula que vaya a constituir el sistema de liberación va a depender del método de elaboración, de las propiedades químicas, físicas y de las características del fármaco a encapsular.

5.4 Preparación de nanopartículas

Las NPs pueden elaborarse con diferentes tipos de materiales, siempre y cuando cumplan con los requisitos exigidos para poder ser administradas en el organismo mediante una vía determinada de administración. Para ello, se pueden emplear polímeros tanto naturales, de semisíntesis y de síntesis. Además, se pueden preparar las denominadas NPs lipídicas y NPs metálicas. En este trabajo nos centramos en la elaboración de NPs con polímeros sintéticos.

5.4.1 Polímeros

Un polímero es un compuesto de alto peso molecular que se forma por la repetición de subunidades llamadas monómeros (20). Los polímeros a utilizar en la elaboración de NPs han

de presentar características bien definidas en cuanto a propiedades químicas y físicas, ya que no solo intervienen en la protección del fármaco, sino también en el control de la liberación del mismo en la célula o tejido diana con el objetivo de optimizar el efecto terapéutico y disminuir los efectos adversos. Por otra parte, y en función de la vía de administración de las NPs deberán ser biodegradables o no (3). Como ya hemos indicado en este trabajo nos centramos en NPs preparadas con polímeros sintéticos biodegradables. Los polímeros sintéticos a diferencia de los polímeros naturales, los cuales son más difíciles de estandarizar, presentan una composición química conocida, lo cual permite predecir características físicas tales como la solubilidad y permeabilidad, y muchos de ellos presentan además una baja inmunogenicidad. Dentro de este tipo se encuentran, entre otros, los poliésteres, que son un grupo de polímeros muy empleados hoy en día en la elaboración de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada debido a sus buenas características de biodegradabilidad y biocompatibilidad (14).

Entre los tipos de polímeros empleados para la elaboración de NPs cabe mencionar:

- ⇒ **Ácido poli-láctico (PLA) y Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA):** Poliésteres alifáticos formados por monómeros de ácido láctico o bien dímeros de láctico-co-glicólico, que se encuentran aprobados por la FDA (Food and Drug Administration norteamericana) para la fabricación de sistemas de liberación de fármacos, incluidas las NPs, y otros usos biomédicos, como por ejemplo en la fabricación de suturas biodegradables (3). Estos polímeros han demostrado tener muy baja toxicidad tanto a nivel local como sistémica, habiéndose indicado a este respecto casos de inflamación, lisis celular, aunque dentro de unos límites aceptables (21). El PLGA se emplea mucho en la elaboración de vectores para la liberación de proteínas, péptidos, genes, vacunas, etc. (14). Este biomaterial presenta una serie de ventajas y desventajas en el momento de encapsulación de macromoléculas terapéuticas. La degradación de PLA y PLGA ocurre por vía hidrolítica dando lugar a la acumulación de monómeros ácidos, disminuyendo el pH de la zona, lo cual puede provocar la desnaturalización de la proteína que se encuentra en su interior (21). A pesar de ello, al carecer de toxicidad, sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación, hacen que el PLGA sea uno de los polímeros más empleados en formulaciones nanoparticulares con aplicación terapéutica. Se utiliza en el desarrollo de numerosas formulaciones para procesos inflamatorios, oncológicos, enfermedades neurodegenerativas, procesos oculares, entre otros (22).
- ⇒ **Poli- ϵ -caprolactona:** es un poliéster alifático, polímero semicristalino químicamente estable el cual presenta una degradación lenta. Se puede emplear en el desarrollo de formulaciones de NPs para la administración de fármacos que requieran una liberación durante periodos de tiempos prolongados. Por otra parte, a diferencia del PLGA genera durante su degradación una menor cantidad de productos ácidos. Las NPs de Poli- ϵ -caprolactona han sido utilizadas como vehículos para la liberación de un amplio grupo de fármacos como tamoxifeno, ácido retinoico y griseofulvina, entre otros (23).

5.4.2 Técnicas de preparación

Existen numerosos modos para la preparación de NPs, los cuales han ido evolucionando con el fin de utilizar de componentes de baja toxicidad, simplificar los procesos de fabricación a nivel industrial, para así favorecer su escalado y optimizar las técnicas en cuanto

a la eficacia de encapsulación del activo y el rendimiento de producción de las nanopartículas. Entre los principales métodos de elaboración de NPs a base de poliésteres se encuentran:

- ⇒ **Evaporación-extracción del disolvente tras la formación de una emulsión:** es una de las técnicas más empleadas en la preparación de las NPs y consiste en la emulsificación de dos fases; una fase acuosa que contiene al agente emulsionante y una fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo. La energía necesaria para llevar a cabo la emulsificación puede ser aportada mediante un homogenizador o por ultrasonidos, de manera que a mayor velocidad de agitación menor tamaño de las NPs. Una vez formada la emulsión, se procede a realizar la evaporación del solvente orgánico (generalmente acetato de etilo, cloroformo, diclorometano), lo que da lugar a la formación de las NPs produciéndose así la encapsulación del principio activo en el interior de las partículas. Finalmente, la suspensión de NPs formadas es sometida a una serie de lavados y procesos de filtración para eliminar el exceso de agente estabilizante (24). Esta técnica se puede emplear para la obtención de NPs de diferentes tamaños, controlando parámetros como el peso molecular del polímero, la concentración del principio activo en el polímero y el proceso de agitación. Hay que tener en cuenta que cuanto menor sea el tamaño de las partículas menor capacidad tendrán de encapsular en su interior el principio activo, lo que repercutirá en la dosis a administrar. Las emulsiones se van a diseñar en función de las características del principio activo a encapsular: una emulsión simple de fase externa acuosa (O/A) se empleará para la encapsulación de agentes hidrófobos, mientras que una emulsión múltiple (A/O/A), se puede utilizar para la encapsulación de compuestos hidrófobos (14).
- ⇒ **Nanoprecipitación:** la nanoprecipitación es uno de los métodos más sencillos, reproducibles, y por ello el más empleado en la fabricación de NPs. Las NPs obtenidas por este método pueden ser tanto en forma de nanocápsulas como nanoesferas. Esa técnica se base en la deposición interfacial del polímero sobre el principio activo seguido del desplazamiento del solvente polar que los recubre, el cual es miscible con el agua. En esa técnica van a existir dos fases: una fase solvente y una fase no solvente, denominadas fase orgánica y fase acuosa, respectivamente. En la fase orgánica se incorporan el material formador de la cubierta, en ese caso el polímero, el principio activo, un solvente orgánico (acetona, etanol), y un tensioactivo lipofílico. La fase acuosa está mayoritariamente constituida por agua. Tras la preparación de ambas fases, una fase de añade sobre la otra, y finalmente se lleva a cabo la evaporación del solvente orgánico a temperatura ambiente o con un rotavapor, lo cual permite la obtención de la suspensión de NPs en agua (25). La agregación de las NPs en la suspensión puede evitarse añadiendo tensioactivo en la formulación, aunque esto puede afectar a las características de las NPs. Para obtener nanocápsulas en lugar de nanoesferas, se suele añadir a la fase orgánica un aceite mineral o vegetal. Esta técnica se emplea principalmente para la encapsulación de principios activos hidrofóbicos (24), aunque se han realizado diversos estudios donde se evalúan varios parámetros de la formulación con la finalidad de mejorar la incorporación de agentes hidrófilos (26). La dificultad fundamental del método reside en la elección adecuada de la combinación de fármaco/polímero/solvente/no solvente con el objetivo de obtener al final una elevada eficacia de encapsulación del fármaco.

5.4.3 Caracterización de las nanopartículas.

Debido a la naturaleza de la aplicación de las NPs como sistemas de liberación de fármacos, es de suma importancia su caracterización atendiendo a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. A continuación se detallan los parámetros a caracterizar una vez preparadas las NPs.

- ⇒ **Tamaño y morfología:** El tamaño, la distribución de tamaño de partícula y la morfología de las NPs son factores críticos que condicionan la idoneidad de la formulación preparada para una aplicación específica. Es una información básica que se puede obtener mediante distintos tipos de técnicas, tales como: microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy; SEM), microscopía electrónica de transmisión; TEM) o difracción de luz (Dynamic light scattering). Debido a que la internalización de las NPs es vía endocitosis, un aumento del tamaño de las NPs puede suponer una disminución en la captación y potencialmente en la biodisponibilidad del fármaco (3).
- ⇒ **Carga superficial:** se calcula el potencial Zeta que determina la carga superficial de las NPs, factor que condiciona la distribución de las mismas en el organismo y la captación e interacción con las células. Se puede determinar mediante anemometría láser Doppler o mediante técnicas electroforéticas (13). Valores alrededor de +/- 30 mV son típicos de sistemas coloidales estables. Las dispersiones que presenten valores inferiores +/-25 mV tenderán a la aglomeración de las NPs debido a las interacciones interparticulares del tipo de enlaces de hidrógenos y fuerzas de Van der Waals (27). Las membranas celulares se encuentran cargadas negativamente, por ello presentan una mayor afinidad electrostática por NPs cargadas positivamente. Para ello se pueden realizar modificaciones en la superficie de las NPs que favorezcan la interacción. La potencial zeta es por tanto una determinación muy importante para poder entender la superficie de las NPs y poder predecir su estabilidad (13).
- ⇒ **Eficiencia de encapsulación:** se puede definir como la relación que existe entre la cantidad de fármaco que ha sido encapsulada (valor experimental) y la cantidad de fármaco añadida al comienzo del proceso (valor teórico). Se expresa en porcentaje. El contenido de principio activo se determina mediante la ruptura de las NPs en un disolvente específico, centrifugación y posterior cuantificación de la cantidad de fármaco encapsulado utilizando para ello diversas técnicas, como puede ser la espectrofotometría UV y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otras (13). La eficacia de encapsulación va a depender del polímero empleado, del tipo de principio y del método utilizado para la preparación de las NPs, entre otros factores. Dependiendo de la formulación, pueden darse casos donde existan agregados de principio activo no encapsulado. Para evitar esto se puede recurrir por ejemplo, al uso de polímeros anfifílicos que actúen como estabilizadores de la superficie de las NPs (28).
- ⇒ **Liberación in vitro:** estudio fundamental ya que permite obtener una idea aproximada de cómo será la liberación del principio a partir de las NPs en el organismo, aunque evidentemente es solo una aproximación, ya que la liberación suele ser más rápida in vivo, debido a la presencia de enzimas en los fluidos biológicos. La liberación va a depender de diferentes factores, tales como: la desorción del fármaco de la superficie de las NPs, combinación de los procesos de erosión de la matriz polimérica, y del tipo

de sistema elaborado, entre otros. Así por ejemplo, si el sistema es en forma de nanoesferas, que presentan una distribución uniforme del fármaco, en primer lugar se producirá una liberación rápida del fármaco adsorbido en la superficie las partículas, lo que se conoce como efecto burst, seguido de una liberación más lenta desde la matriz dependiente de los procesos de difusión y erosión. En el caso de las nanocápsulas, el fármaco tiene que difundir a través de la pared polimérica (29).

5.5 Aplicación de nanopartículas en el desarrollo de vacunas.

Las vacunas tienen como objetivo lograr una inmunización profiláctica frente a enfermedades infecciosas e incluso alergias. Cuando se trata de vacunas víricas o bacterianas atenuadas uno de los requisitos y preocupaciones principales en su desarrollo está relacionada con la seguridad. Así, la vacuna de la poliomielitis oral con virus vivos atenuados ha erradicado prácticamente la enfermedad, aunque en ocasiones, poco frecuentes, el virus de la vacuna se reactiva y produce una poliomielitis paralítica. Las investigaciones actuales sobre vacunas tienen dentro de sus objetivos identificar antígenos o epítomos microbianos con mayor capacidad inmunogénica, sintetizarlos en el laboratorio y emplear estos antígenos sintéticos como vacunas (30). Para poder generar una correcta respuesta inmunitaria, además del agente que se inocula, es necesario un coadyuvante entre cuyas funciones se encuentran el facilitar el paso a través de las membranas biológicas y estimular las células del sistema inmune (31).

5.5.1 Sistema inmune.

La defensa contra los microorganismos es llevada a cabo mediante dos tipos de respuestas que se encuentran coordinadas, y que se denominan inmunidad innata e inmunidad adaptativa. El sistema inmunitario innato es la primera defensa frente a los microorganismos durante las primeras horas o días, mientras la inmunidad adaptativa reconoce de forma específica las sustancias microbianas y no microbianas, denominadas antígenos, y genera una respuesta específica ante su presencia (30). La inmunidad adaptiva actúa por dos mecanismos: la producción de anticuerpos (Ac), realizada por las células B, es lo que se conoce como inmunidad humoral; y por otra parte, la activación de las células T, llevada a cabo por la presentación de un fragmento del antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), siendo conocida como inmunidad celular.

Las células se diferencian en linfocitos T citotóxicos, dirigidos principalmente contra patógenos intracelulares, linfocitos T colaboradores (por sus siglas en inglés *T helper*, Th), cuya función principal es colaborar con la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, aunque también participan en la eliminación de patógenos que se reproducen en el interior de células fagocíticas. Una vez activados, los linfocitos T colaboradores secretan citocinas con efectos autocrinos (sobre la propia célula) o paracrinos (sobre las células próximas).

Según el tipo de citocina secretada se subdividen en diferentes subpoblaciones que juegan diferentes papeles fisiopatológicos en los procesos inflamatorios agudos o crónicos (32), como pueden ser las respuestas Th1 y Th2, entre otras. La respuesta de tipo Th1 (las citocinas secretadas son IFN, IL-2, TNF- β) va a incrementar la proliferación de linfocitos T y B, activan a los macrófagos infectados, por ello es fundamental en la eliminación de patógenos intracelulares e incluso limitan los procesos alérgicos. Mientras que las respuestas de tipo Th2, promueven las respuestas humorales y la producción de IgE, especializados en

facilitar la eliminación de patógenos extracelulares y también participan en los procesos alérgicos.

5.5.2 Inmunoadyudantes.

Son coadyuvantes que mejoran o modulan la inmunogenicidad generada por un antígeno administrado. Pueden estimular tanto la respuesta innata como la respuesta adaptiva. En la actualidad existen muy pocos compuestos que se encuentren autorizados para el uso humano; el único coadyuvante aprobado por la FDA es el hidróxido de aluminio (33), más conocido como “alum”. Este coadyuvante estimula la respuesta Th2, pero no induce un perfil Th1 (necesario si se quiere diseñar una vacuna frente a un patógeno intracelular) y presenta limitaciones en su aplicación en vacunas basadas en péptidos o antígenos de pequeño tamaño.

Existen dos tipos de mecanismo a través de los cuales los coadyuvantes pueden mejorar la respuesta del sistema inmune:

- ⇒ Aumentando la captación del antígeno por las APCs (células presentadoras de antígeno); el coadyuvante puede ser envuelto directamente por la célula o bien formar un depósito sobre la superficie de esta, lo cual lleva a una exposición prolongada del antígeno, incrementado la captación por las APCs.
- ⇒ Activar directamente las células del sistema inmune innato. Esta acción puede ser llevada a cabo por estímulos inflamatorios, citoquinas o bien por los patrones moleculares asociados a antígenos (PAMPs).

Los sistemas nanoparticulados van a actuar fundamentalmente mediante el primer mecanismo, aunque algunos estudios postulan que las NPs poliméricas son capaces de estimular la producción de citoquinas y anticuerpos (34). Por otra parte, las NPs por sí solas pueden provocar una reacción inmunitaria mediada principalmente por los fagocitos, responsables de su eliminación. Hay que tener en cuenta los distintos de factores que pueden condicionar la interacción entre las NPs y las células del sistema inmune: la pureza de las NPs no va a ser la misma que la obtenida cuando están recién preparadas, una vez administradas pueden sufrir cambios a nivel químico y físico. Pueden sufrir también fenómenos de aglomeración o agregación, dependiendo de sus características fisicoquímicas y de las condiciones del medio (fuerza iónica, adsorción de proteínas o de moléculas de naturaleza no proteica), e interacciones con otros agentes presentes en los fluidos corporales (35). La superficie de las NPs también se va a ver modificada; cuanto mayor sea su hidrofobicidad, más fácil será su recubrimiento por proteínas dominantes como lo son las opsoninas (Ig3 o factores del complemento C3). Los macrófagos presentan receptores para estas opsoninas. El recubrimiento de los nanotrasnportadores con este tipo de ligandos se puede utilizar como estrategia para mejorar la liberación del antígeno en su diana (29).

5.5.3 Vías de administración.

Las vías más comunes de administración de vacunas son la vía intramuscular y la vía subcutánea, mediante las cuales se desencadena una respuesta inmunitaria a nivel sistémico. En la actualidad se están realizando estudios con otras vías para la administración de vacunas con la finalidad de, además de evitar la perforación de la piel, mimetizar en parte la vía natural de entrada del patógeno en el huésped, aumentando así la eficacia de la vacuna, ya que de esta forma no solo se induciría la respuesta inmune sistémica, sino también la local.

5.5.3.1 Administración parenteral.

Las NPs poliméricas están siendo investigadas en la elaboración de diferentes vacunas destinadas a su administración parenteral, debido a las características de seguridad, biodegradabilidad y capacidad de control de liberación de la partícula inmunogénica. A pesar de ser eliminadas de forma natural por los fagocitos, se pueden llevar a cabo modificaciones en su superficie, como lo es la adición de polímeros hidrofóbicos como el polietilenglicol (PEG), que aumentan su permanencia en sangre debido a la estabilización estérica generada que impide el proceso de opsonización. Hay diversos estudios de vacunas desarrolladas en forma de NPs de PLGA frente a distintas patologías. Entre ellas se encuentra la hepatitis B, enfermedad que en la actualidad ha visto incrementadas su prevalencia y morbilidad. Bharali et al. (36) han demostrado, en ratones, la inmunogenicidad de una vacuna formulada como NPs de PGLA-PEG y en la que el antígeno encapsulado es HBsAg. También evaluaron la misma vacuna, pero sin la presencia de PEG (polietilenglicol). La respuesta humoral obtenida por la vacuna formulada con PEG fue mucho más sostenida en el tiempo y el nivel de anticuerpos hallados fue mayor, en comparación con la preparada sin dicho coadyuvante, lo que indicaría el efecto de vector de dicho agente al incluirlo en la formulación de NPs.

Desai et al. (37) han demostrado también las propiedades como vectores espaciales de las NPs de PGLA en las que el antígeno encapsulado es la enterotoxina estafilocócica B; la respuesta inmune obtenida tras la administración subcutánea de dicha vacuna en conejos fue similar a la obtenida con la vacuna que contenía al mismo antígeno y el coadyuvante alum.

En el caso de procesos alérgicos, Schöl et al. (38) han estudiado y demostrado la eficacia de una vacuna a base de NPs de PGLA como inmunoayudantes, en la que el antígeno encapsulado es Bet v1. La formulación se administró por vía s.c. en un modelo de ratón BALB/C. La respuesta inmunitaria obtenida mejoró significativamente, no produciéndose hipersensibilización en los animales nativos, y además fue capaz de modular una respuesta de tipo Th2, sin suprimir la respuesta de tipo Th1.

También se está investigando el uso de vacunas para estimular al sistema inmune en el tratamiento de procesos oncológicos. Una vacuna ideal contra el cáncer constaría de tres componentes principales: un antígeno; que provoque una reacción inmunitaria, un adyuvante; capaz de potenciar esa respuesta e inducir su activación temprana y prolongada y, un sistema de transporte; que contenga al antígeno y al adyuvante y permita la liberación de forma específica y prolongada en una célula diana. Hamdy et al. (39) han evaluado la eficacia de una vacuna constituida por NPs de PLGA que portaban al antígeno específico del tumor (melanoma b16) y como adyuvante un análogo de MPLA (anhídrido maléico de PLA). Como se ha mencionado anteriormente, las NPs son fagocitadas por las CDs, se produce la liberación del Ag, el cual, mediante los complejos de histocompatibilidad, dejan expuestos fragmentos del mismo, estimulando la respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T. Tras la administración subcutánea de esta vacuna experimental, se obtuvo una estimulación específica de respuesta celular frente al antígeno, y se observó una disminución significativa del tamaño del tumor. En esta misma línea, otros investigadores (40) han estudiado la posibilidad de encapsular distintos antígenos en NPs de PGLA, con la finalidad de revertir el microambiente tumoral dominado por células supresoras, en células activas del sistema inmune y con el fin de obtener una mejor respuesta antitumoral.

5.5.3.2 Vía oral.

La administración oral es una de las vías más sencillas y aceptadas por los pacientes, dado que se evita el dolor y el riesgo de infección asociado a administraciones parenterales. Esta vía de administración permite además la búsqueda de un efecto tanto local como sistémico. A nivel de mucosas, la secreción de la inmunoglobulina IgA es elevada y constituye uno de los factores más importantes de la respuesta humoral, ya que se considera como la primera barrera de defensa frente a la entrada de los patógenos. Sin embargo, hay que tener en cuenta los distintos factores que intervienen en esta vía, como son: la presencia de las enzimas digestivas, el pH ácido del medio, y la capa protectora de moco que limita el acceso al epitelio de la mucosa. Es importante recordar brevemente la anatomía funcional del sistema inmunitario adaptativo en el tubo digestivo para una mejor comprensión de ese aparato. Los tejidos linfoides asociados al intestino y adyacentes al epitelio de la mucosa, se denominan GALT (por sus siglas en inglés “Gut-Associated Lymphoid Tissue”), siendo la estructura más destacada las Placas de Peyer, sobre las cuales se encuentran las células microplegadas (células M) que constituyen una vía importante de transporte del antígeno desde la luz al GALT. Por esta razón, las células M representan una “puerta de entrada” para las vacunas elaboradas a base de NPs. Las principales funciones de las NPs como vacunas son: la protección del antígeno, actuar como reservorios del antígeno, para así lograr una exposición prolongada, interactuando con los componentes de la mucosa intestinal mediante mecanismos de bioadhesión, y dependiendo de la respuesta inmune que se quiera inducir, local o sistémica, atravesar las células M (31). Las NPs poliméricas se caracterizan por ser más estables a nivel gastrointestinal que otros transportadores coloidales, como los liposomas, y además, su superficie puede ser modificada, ya sea por procedimientos de adsorción de compuestos, como polietilenglicol (PEG), moléculas bioactivas como lectinas o invasinas o poloxámeros, lo que contribuye a su estabilidad, a su fijación a las NPs, y a su captación por las células intestinales. Diferentes formulaciones han sido evaluadas con el fin de, además de mejorar la estabilidad, favorecer el transporte a través de la mucosa intestinal, mediante interacciones específicas entre el sistema nanotransportador y el epitelio intestinal. En este sentido Yoncheva et al. (41) han evaluado las propiedades bioadhesivas de diversas formulaciones de NPs pegiladas elaboradas con poli (metal vinil éter-co-anhídrido maleico), en las que se trabajó con PEG de distinto peso molecular, con el fin de determinar el grado más adecuado de pegilación. Tanto el PEG₁₀₀₀ como PEG₂₀₀₀ presentaron una mayor afinidad por las células intestinales que por las células estomacales.

Kim et al. (42) realizaron un estudio con la administración de NPs de PGLA que contenían antígenos de *Helicobacter pylori*, para estimular tanto la respuesta local como la sistémica e inducir la respuesta de tipo Th2 en modelos de ratones BALB/C. Se logró la inducción de la respuesta inmune a nivel de la mucosa, con producción de anticuerpos IgA, y en suero se detectaron anticuerpos de tipo IgG e IgA, en una proporción significativamente mayor que en los ratones inmunizados solo con el antígeno.

Entre los adyuvantes inmunológicos se encuentra el monofosforil lípido A (MPLA), que es un componente no tóxico derivado del lipopolisacárido de las paredes celulares bacterianas, y que ha sido aprobado para el uso en vacunas frente a la hepatitis B (43). Sarty et al. (44) han formulado NPs de PGLA encapsulando como antígeno ovoalbúmina junto con el inmunomodulador MPLA. La evaluación in vivo de la formulación se realizó en ratones BALB/C mediante administración por vía oral de la formulación a tres de las seis cohortes y como resultado se obtuvieron valores significativamente mayores de IgG e IgA, en comparación con los controles, lo que avala el uso de NPs como sistemas transportadores,

protectores y reguladores de la liberación del antígeno para la obtención de una mejor respuesta inmune.

5.5.3.3 Vía nasal.

Los microorganismos patógenos o alérgenos pueden penetrar en el organismo por diferentes vías, siendo la vía nasal una de las más comunes. La mucosa nasal desempeña un papel importante en el sistema inmune, dado que es el primer punto de contacto con el antígeno. Esta forma de inmunización induce tanto la respuesta local como sistémica, que se caracteriza por la generación de inmunoglobulinas, específicamente IgA, capaz de atravesar las membranas epiteliales y prevenir la entrada de los agentes patógenos.

A diferencia de la administración por vía oral, las vacunas no se van a ver expuestas a bajos ácidos de pH o enzimas que puedan alterarlas. Otras ventajas de esta vía son su elevada vascularización, muy buena permeabilidad, y la presencia de las microvellosidades que recubren el epitelio nasal, incrementando la superficie de absorción (45). Esta vía permite el acceso directo al tejido linfóide asociado a la nariz (por sus siglas en inglés “nasal-associated lymphoid tissue” y al tejido linfóide asociado a la mucosa (por sus siglas en inglés “mucosa associated lymphoid tissue”, y cuya principal función es la captación del antígeno.

Jun et al. (46) han evaluado la respuesta local y sistémica inducida por la administración de NPs poliméricas que contenían como antígeno el toxoide tetánico, tras realizar la administración de la vacuna tanto por vía oral como por vía nasal a ratones. Tras administración nasal se obtuvo una respuesta inmune humoral significativamente más elevada que cuando se empleó la vía oral, con valores más elevados de IgG e IgA. Se determinó que la dosis requerida para proporcionar una respuesta similar por vía oral, era diez veces mayor que la administrada por vía intranasal, lo cual se deba probablemente a una captación menos eficaz a nivel del intestino y a la intervención de otros factores propios de la vía oral.

La administración de vacunas por vía nasal también se ha estudiado como medida profiláctica frente a la infección ocasionada por el VIH. En los estudios llevados a cabo para el desarrollo de vacunas usando NPs, es de suma importancia que el antígeno mantenga su integridad durante todo el proceso de elaboración y posterior administración. Akashi et al. (47) han estudiado la encapsulación de partículas de VIH-1 y gp120 en NPs de poliestireno recubiertas con concanavalina A, evaluando posteriormente la inmunización por vía intranasal de estas NPs. Los resultados demostraron una mayor generación de IgA en comparación con otras rutas de inmunización a través de mucosas.

La vía de administración intranasal también ha sido estudiada para el desarrollo de una vacuna frente a la difteria caracterizada por causar una grave obstrucción respiratoria y por ser el hombre el único reservorio, lo cual puede facilitar su erradicación en un futuro, si se logra crear una vacuna realmente eficaz. En este sentido, Singh et al. (48) han encapsulado como antígeno el toxoide diftérico (DT) en un estudio llevado a cabo por demostraron el potencial que presentan las NPs formadas por copolímeros de PLGA-PCL en la inducción de anticuerpos IgG específicos en contraste con las NPs elaboradas solo con PLGA y también en comparación con la administración del toxoide DT solo. Combinaron ambos polímeros con la finalidad de aprovechar las ventajas de ambos: incremento de la hidrofobicidad, lo cual facilita el proceso de fagocitosis, que proporciona la policaprolactona (PCL), y la liberación rápida que proporciona el PLGA. La producción de citoquinas, que juegan un papel fundamental tanto en la respuesta innata como en la respuesta adaptativa, parece estar

relacionada con el tipo de polímero empleado. Así, tanto las NPs de PGLA-PCL, como las NPs de PCL, produjeron niveles de IL-6 significativamente mayores que las NPs de PGLA, tanto en la administración intranasal como intramuscular de las mismas a ratones. La secreción de INF γ , sin embargo, se vio incrementada fundamentalmente al realizar la administración intranasal de las NPs de PGLA-PCL, probablemente debido a la mayor cantidad de antígeno encapsulada por esta formulación y a su mayor biodisponibilidad.

A pesar de los estudios que se están llevando a cabo, todavía falta profundizar acerca de la interacción entre las NPs y la mucosa nasal, y el mecanismo que lleva a la estimulación de una respuesta inmune u otra.

6. CONCLUSIÓN

La aplicación de la Nanotecnología en el campo de la Medicina supone una excelente herramienta que puede ser empleada, no solo para generar nuevos tratamientos, sino también en la mejora de los ya existentes.

Las nanopartículas poliméricas están siendo investigadas para el desarrollo de vacunas debido a sus características de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los polímeros sintéticos tienen la ventaja de presentar una composición química conocida, la cual se puede modificar con el fin de poseer unas características fisicoquímicas específicas, que cumplan con las necesidades requeridas en el desarrollo de vacunas. Propiedades como la hidrofobicidad, el tamaño de las NPs o el peso molecular del polímero son primordiales a la hora de diseñar una vacuna, dado que van a determinar el tiempo de residencia de estas en la sangre o bien favorecer o evitar su captación por el sistema mononuclear fagocítico. Cabe destacar el papel fundamental que desempeñan las nanopartículas poliméricas como reservorio del antígeno, impidiendo su degradación, actuando como un sistema de liberación controlada del mismo, y presentando propiedades como inmunoayudantes las cuales están siendo muy estudiadas en la actualidad, ya que aún no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual pueden potenciar la respuesta inmunitaria durante la vacunación. También hay bastante investigación en cómo influye la vía de administración elegida para la vacuna en la respuesta generada.

La Nanomedicina tiene aún un largo camino de investigación por delante. Entre sus retos pendientes se encuentra la adaptación de los procesos de fabricación de estos sistemas a escala industrial, los cuales se llevan a cabo en la actualidad en condiciones asépticas, dado que los poliésteres son susceptibles de degradación al verse expuestos al calor, humedad o a productos químicos empleados normalmente durante los procesos de esterilización. A pesar de ciertas limitaciones, supondría un gran avance el desarrollo de vacunas constituidas por sistemas de liberación controlada en forma de nanopartículas, con las que se lograra una elevada tasa de encapsulación del antígeno y que fuesen fácilmente escalables a nivel industrial.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kaehler T. Nanotechnology: basic concepts and definitions. *Clinical Chemistry*, 40(9):1797-1799, 1994.
2. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, 23(5):22-36, 1960.
3. Thassu D, Deleers M, Yashwant P. eds. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. Vol. 166. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2007.
4. Morais de MG, Martins VG, Steffens D, Veira Costa JA. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1):1007-1017, 2014.
5. Weltring K-M, Gouze N, Martin N, Pereira N, Baanante I, Gramaica F. *Nanomedicine Strategic Research and Innovation Agenda*. European Technology Platform for Nanomedicine, 2016.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S eds. *Inmunología Celular y Molecular*. 9º ed. Elsevier, 2018.
7. Sharma CP ed. *Drug Delivery Manosystems for Biomedical Applications*. Elsevier, Oxford, United Kingdom, 2018.
8. Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, Ueno M, Futaki S, Harashima H. Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. *Journal of Controlled Release*, 98(2):317–323, 2004.
9. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):496–504, 2008.
10. Hashida M, Opanasopit P, Nishikawa M. Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19(3):191–234, 2002.
11. Cuvier C, Roblot-Treupel L, Millot JM, Lizard G, Chevillard S, Manfait M, Couvreur P, Poupon MF. Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 44(3):509-517, 1992.
12. Rodrigues JM Jr, Croft SL, Fessi H, Bories C, Devissaguet JP. Rodrigues, JM Jr., Croft SL, Fessi H, Bories C, Devissaguet J.P. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected mice. *Tropical Medicine Parasitology*, 45:223–228, 1994.
13. Zhou H, Fan Z, Li PY, Deng J, Arhontoulis DC, Li CY. Dense and dynamic polyethylene glycol shells cloak nanoparticles from uptake by liver endothelial cells for long blood circulation. *ACS Nano*, 12(10):10130–10141, 2018.
14. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2:147–157, 2007.
15. Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71:409–419, 2009.
16. Popova NV, Deyev IE, Petrenko AG. Clatrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. *Acta Naturae*, 5(3):62-73, 2013.

17. Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. 13ª ed. Elsevier, Madrid, 2016.
18. Andresen TL, Jensen SS, Jørgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in Lipid Research*, 44:68-97, 2005.
19. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Methods in Molecular Biology*, 624:163-175, 2010.
20. Owens FJ, Poole CP. Introducción a la Nanotecnología. Editorial Reverte S.A., Barcelona, España, 2003.
21. Shalaby W, Burg KJL. Absorbable and biodegradable polymers. 1st ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2004.
22. Qi F, Wu J, Li H, Ma G. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 13: 14–27, 2019.
23. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278:1-23, 2004.
24. Lee BK, Yun Y, Park K. PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107:176–191, 2016.
25. Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532:66-81, 2017.
26. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57(2):171–185, 1999.
27. Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27):12871-12934, 2018.
28. Cai K, He X, Song Z, Yin Q, Zhang Y, Uckun FM, et al. Dimeric drug polymeric nanoparticles with exceptionally high drug loading and quantitative loading efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 137(10):3458–3461, 2015.
29. Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Valizadeh H, Shadbad MRS, Nokhodchi A, Omid Y et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11(1):167-177, 2008.
30. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Propiedades y generalidades de las respuestas inmunitarias. En: *Inmunología celular y molecular*. 9ª ed. Elsevier, Madrid, 2018.
31. Kreuter J. Nanoparticles as adjuvants for vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6:463-472, 1995.
32. Juan Otero M, Engel Rocamora P, Lozano Soto F., Jaraquemada Pérez de Guzmán D, García-Zepeda EA, Soldevila Melgarejo MG. Sistema Inmunitario: Introducción, Principales Elementos y Respuesta Inmunitaria. En *Medicina Interna*, Elsevier, Madrid, 2016.
33. Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine*, 20(3):S24-33, 2002.

34. Pati R, Shevtsov M, Sonawane A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 9:2224, 2018.
35. Boraschi D, Italiani P, Palomba R, Decuzzi P, Duschl A, Fadeel B, et al. Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. *Seminars in Immunology*, 34:33–51, 2017.
36. Bharali DJ, Pradhan V, Elkin G, Qi W, Hutson A, Mousa SA, et al. Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine. *Nanomedicine*, 4(4):311-317, 2008.
37. Desai MP1, Hilfinger JM, Amidon GL, Levy RJ, Labhasetwar V. Immune response with biodegradable nanospheres and alum: studies in rabbits using staphylococcal enterotoxin B-toxoid. *Journal of Microencapsulation*, 17(2):215-225, 2000.
38. Schöll I, Weissenböck A, Förster-Waldl E, Untersmayr E, Walter F, Willheim M, et al. Allergen-loaded biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles down-regulate an ongoing Th2 response in the BALB/c mouse model. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(2):315–321, 2004.
39. Roy A, Singh MS, Upadhyay P, Bhaskar S. Nanoparticle mediated co-delivery of paclitaxel and a TLR-4 agonist results in tumor regression and enhanced immune response in the tumor microenvironment of a mouse model. *International Journal of Pharmaceutics*, 445(1–2):171–180, 2003.
40. Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z, et al. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine*, 26(39):5046–5057, 2008.
41. Yoncheva K, Lizarraga E, Irache JM. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): Preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(5):411–419, 2005
42. Kim SY, Doh HJ, Jang MH, Ha YJ, Chung SII, Park HJ. Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles. *Helicobacter*, 4(1):33–39, 1999.
43. Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Review Vaccines*, 6:133-140, 2007..
44. Sarti F, Perera G, Hintzen F, Kotti K, Karageorgiou V, Kammona O, et al. In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. *Biomaterials*, 32(16):4052–4057, 2011.
45. Partidos CD. Intranasal vaccines: forthcoming challenges. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 3(8):273-281, 2000.
46. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Hungerer KD, Hundt E, Kissel T. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharmaceutical Research*, 18(3):352–360, 2001.
47. Akagi T, Kawamura M, Ueno M, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Akashi M, Baba M. Mucosal immunization with inactivated HIV-1-capturing nanospheres induces a significant HIV-1-specific vaginal antibody response in mice. *Journal of Medical Virology*, 69:163–172, 2003.

48. Singh J, Pandit S, Bramwell VW, Alpar HO. Diphtheria toxoid loaded poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*, 38(2):96–105, 2006.