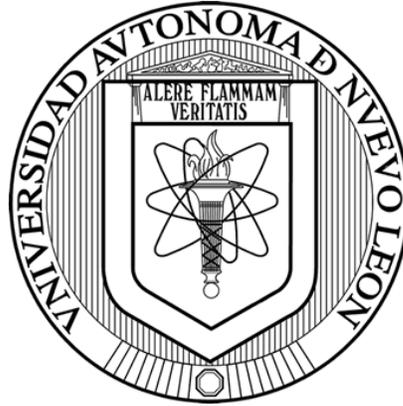


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE Y/O  
INMUNOESTIMULANTE DE UNA NANOEMULSIÓN DE ACEITE DE  
SEMILLA DE ALGODÓN ENRIQUECIDO CON ALFA-TOCOFEROL Y  
ZNO EN UN MODELO MURINO**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

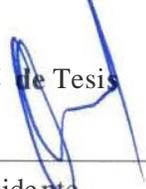
**PRESENTA:**

**MC. GUSTAVO SOBREVILLA HERNÁNDEZ**

**2023**

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE Y/O  
INMUNOESTIMULANTE DE UNA NANOEMULSIÓN DE ACEITE DE SEMILLA  
DE ALGODÓN ENRIQUECIDO CON ALFA-TOCOFEROL Y ZNO EN UN MODELO  
MURINO

Comité de Tesis



---

Presidente

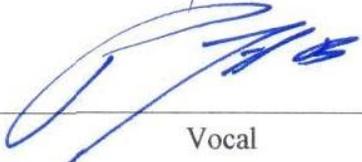
Dr. Moisés Armides Franco Molina



---

Secretario

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño



---

Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides

DIANA  
CABALLERO

---

Vocal

Dra. Diana E Caballero Hernández

Cynthia A. Alvizo Baez

---

Vocal

Dra. Cynthia A. Alvizo Baez



---

Subdirector de Posgrado

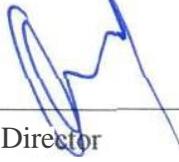
Dra. Katiushka Arévalo Niño



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE Y/O  
INMUNOESTIMULANTE DE UNA NANOEMULSIÓN DE ACEITE DE SEMILLA  
DE ALGODÓN ENRIQUECIDO CON ALFA-TOCOFEROL Y ZNO EN UN  
MODELO MURINO

Dirección de Tesis



---

Director

Dr. Moisés Armides Franco Molina



---

Director externo

PhD. Jorge Ramsy Kawas Garza

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A mis asesores***

Por todas sus enseñanzas y aconsejarme durante todo este proceso en especial al Dr. Moisés Armides Franco Molina y a la Dra. Diana Ginette Zárate Triviño.

### ***A mis compañeros de laboratorio y demás personas que me ayudaron en mi investigación.***

A todos los integrantes del laboratorio L6 (Paola, Kenia, Beatriz, David, Natanael, Pedro y Silvia) y los estudiantes del L18 por todo su apoyo en este proyecto. También agradecer especialmente a la Dra. Sara Paola Hernández Martínez por toda su ayuda en este proyecto.

### ***Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la UANL.***

Por facilitar sus instalaciones y materia de laboratorio para la realización de este proyecto.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia y esposa (Jocelyn) dedico esta tesis por todo su apoyo a lo largo de todo este proceso ya que sin su apoyo esto no podría haber sido posible.

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIAS .....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	III
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1.- INTRODUCCIÓN .....	1
2.- ANTECEDENTES .....	3
2.1.- Adyuvantes.....	3
2.2.- Emulsiones como adyuvantes .....	3
2.3.- Adyuvantes basados en emulsiones biocompatibles.....	4
2.4.- Aceites vegetales como sustituto del escualeno.....	4
2.5.- Otras fracciones inmunogénicas de aceites vegetales .....	5
2.5.1.- $\alpha$ -tocoferol .....	5
2.5.2.- Triglicéridos de cadena media (MCT) y triglicéridos de cadena larga (LCT).....	6
2.6.- Emulsiones basadas de aceite vegetal como adyuvantes en humanos .....	6
2.7.- Adyuvante de emulsión a base de aceite vegetal en modelos animales.....	7
2.8.- Minerales nanopartículas (NPs) como adyuvantes .....	9
2.9.- Efecto del Zn en el sistema inmune .....	10
3.- JUSTIFICACIÓN .....	12
4.- HIPÓTESIS .....	13
5.- OBJETIVOS .....	13
6.- MATERIALES Y METODOS.....	14
6.1.- Desarrollo y caracterización de nanoemulsiones .....	14
6.1.1.- Reactivos .....	14
6.1.2.- Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc .....	14
6.1.3.- Formulación de nanoemulsión.....	14
6.1.4.- Caracterización de nanoemulsiones.....	15
6.2.- Animales .....	15

6.3.- Obtención celular y condiciones de cultivo .....	15
6.4.- Declaración ética.....	16
6.5.- Toxicidad celular.....	16
6.6.- Producción de óxido nítrico (ON) y antioxidantes en macrófagos .....	16
6.7.- Captación y fagocitosis de macrófagos .....	17
6.8.- Fagocitosis de macrófagos de <i>candida albicans</i> .....	18
6.9.- Vacunación y toma de muestras.....	18
6.10.- Isotipos de anticuerpos e IgG anti-OVA elisa.....	19
7.-RESULTADOS .....	21
7.1.- Desarrollo y caracterización de nanoemulsiones .....	21
7.2.- Efecto de las nanoemulsiones sobre la función de las células inmunitarias .....	27
7.3.- Capacidad antioxidante .....	28
7.4.- Reclutamiento leucocitario.....	29
7.5.- Captación celular y fagocitosis de macrófagos .....	31
7.6.- Evaluación del perfil de citocinas .....	34
7.7.- Evaluación de isotipos de conmutación .....	36
7.8.- IgG específica anti-OVA.....	38
8.- DISCUSIÓN .....	40
9.- CONCLUSIONES .....	44
10.- PERSPECTIVAS.....	45
11.- REFERENCES .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Análisis DLS de las nanoemulsiones CN y CNZ a 25°C.....	21
<b>Tabla 2.</b> Espectro FTIR de los principales grupos funcionales de sulfato de zinc y nanopartículas de ZnO.....	23
<b>Tabla 3.</b> Grupos funcionales de aceite de semilla de algodón, $\alpha$ -tocoferol y nanoemulsión CN y CNZ.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Medición de distribución de tamaño de partículas e imágenes AFM de nanoemulsiones.....	22
<b>Figura 2.</b> Caracterización de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) sintetizadas.....	23
<b>Figura 3.</b> Caracterización de nanoemulsión CN y CNZ.....	24
<b>Figura 4.</b> Efecto de las nanoemulsiones sobre la viabilidad celular.....	27
<b>Figura 5.</b> Producción de RNS en macrófagos peritoneales murinos.....	28
<b>Figura 6.</b> Capacidad antioxidante total (CAT) en macrófagos peritoneales murinos.....	29
<b>Figura 7.</b> Migración de leucocitos al sitio de inoculación de las nanoemulsiones....	30
<b>Figura 8.</b> Cuantificación de macrófagos reclutados al sitio de inoculación. ....	31
<b>Figura 9.</b> Actividad de captación de macrófagos estimulados con las nanoemulsiones.....	32
<b>Figura 10.</b> Evaluación cualitativa de la actividad fagocítica de los macrófagos.....	33
<b>Figura 11.</b> Actividad fagocítica de macrófagos co-cultivados con <i>C. albicans</i> .....	34
<b>Figura 12.</b> Efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de citoquinas en un modelo murino.....	35
<b>Figura 13.</b> Efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de isotipos de anticuerpos en un modelo murino.....	37
<b>Figura 14.</b> Efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de anticuerpos específicos en un modelo murino.....	38

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AFM	Microscopio de fuerza atómica
ATR	Reflexión total atenuada
BMPC	Células plasmáticas de medula ósea
C=C	Grupo alqueno
C=O	Grupo carbonilo
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Fenilo
CAT	Capacidad antioxidante total
CD14	Cluster de diferenciación 14
CD4	Cluster de diferenciación 4
CD63	Cluster de diferenciación 63
CD66b	Cluster de diferenciación 66b
CD8	Cluster de diferenciación 8
CFA	Adyuvante completo de Freund
CN	Nanoemulsión de aceite de semilla de algodón
CNZ	Nanoemulsión de aceite de semilla de algodón con nanopartículas de óxido de zinc
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COOH	Grupo carboxilo
Cu <sup>+</sup>	Ion de cobre
Cu <sup>+2</sup>	Ion de cobre II
DC	Célula Detrítica
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardado
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Fluoreceína-5-isotiocianato
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
g	Gramos
h	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano
H&E	Hematoxilina y eosina
H1N1	Hemaglutinina 1, neuraminidasa 1
H5N1	Hemaglutinina 5, neuraminidasa 1
NaOH	Hidróxido de sodio
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1

IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G1
IgG2a	Inmunoglobulina G2a
IgG3	Inmunoglobulina G3
IgM	Inmunoglobulina M
IL-17	Interleucina 17
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
kg	Kilogramo
LCT	Triglicéridos de cadena larga
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MCT	Triglicéridos de cadena media
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MPM	Macrófagos peritoneales murinos
MTT	Metabolismo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol)
mV	Milivoltio
NAPDH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle
NK	Células Natural killers
nm	Nanómetro
NP	Nanopartícula
O/W	Emulsión aceite en agua
OH	Grupo hidroxilo
ON	Óxido nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Tampón fosfato salino
PDI	Polidispersidad
pH	Potencial de hidrogeno
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PZ	Potencial Zeta
FC	Fracción constante
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno

rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopio electrónico de barrido
STAT3	Traductor de señales y activador de transcripción 3
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Th17	Perfil T cooperador 17
Th2	Perfil T cooperador 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Trolox	(6-hidroxilo-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
UFC	unidades formadoras de colonias
W/O	Emulsión agua en aceite
W/O/W	Emulsión agua en aceite en agua
ZIP10	Importador de zinc 10
ZIP6	Importador de zinc 6
Zn	Zinc
Zn <sup>2+</sup>	Ion de zinc
ZnO	Óxido de zinc
ZnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc monohidrato
ZnT	Transportado de Zinc
(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>	Grupos sulfato
°C	Gados Celsius
μg	Microgramo

## RESUMEN

Las emulsiones han sido ampliamente utilizadas como adyuvantes inmunológicos, sin embargo, el uso de materiales derivados de plantas como el aceite de semilla de algodón y el  $\alpha$ -tocoferol o minerales como el Zinc, así como su uso a escala nanométrica, ha sido poco explorado. En este estudio, nuestro objetivo fue desarrollar una nueva nanoemulsión y evaluar su capacidad antioxidante y fagocítica, así como los parámetros relacionados con la estimulación de la respuesta inmune mediante la expresión de citoquinas y la producción de anticuerpos en un modelo de ratones.

Las nanoemulsiones formuladas CN (Nanoemulsión de aceite de semilla de algodón) y CNZ (Nanoemulsión de aceite de semilla de algodón con nanopartículas de óxido de zinc) se caracterizaron mediante imágenes de microscopía, DLS y FTIR. Se diseñaron una serie de experimentos in vitro e in vivo para evaluar la actividad de las nanoemulsiones formuladas. En cultivos primarios de macrófagos, esplenocitos y timocitos murinos se comprobó la seguridad y la dosis de las nanoemulsiones formuladas. En macrófagos se evaluó la capacidad antioxidante y fagocítica. En ratones Balb/C, la estimulación del sistema inmunológico estuvo determinada por la expresión de citocinas y la producción de anticuerpos.

La CN y CNZ presentaron estabilidad durante 90 días. Inmediatamente después de la preparación, la CN presentó un tamaño de partícula mayor (543.1 nm) que la CNZ presentó un tamaño de 320 nm. FTIR detecta la interacción entre los materiales que componen las nanoemulsiones, así como la correcta síntesis de las nanopartículas de ZnO. CN y CNZ (1.25 a 10  $\mu$ L/MI) no tuvieron efecto tóxico ( $P > 0.05$ ) sobre macrófagos, esplenocitos y timocitos. Todas las dosis probadas de CN y CNZ estimularon la producción de óxido nítrico y antioxidantes de manera dosis dependiente en comparación con el control. En tejido subcutáneo en el área femoral) con CN o CNZ con ovoalbúmina mostró inflamación con mayor infiltración de leucocitos en comparación con CFA. La inoculación intraperitoneal con CN, CNZ y CFA mostró un alto reclutamiento de células intraperitoneales totales con fenotipo CD14+, a las 24 h de la inoculación en comparación con el control ( $p < 0.05$ ). CN y CNZ aumentaron la capacidad fagocitaria con respecto a los macrófagos no tratados en el ensayo de macrófagos *Candida albicans*-fagocitosis, La

evaluación de las UFC residuales indicó que sólo el CN disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) este valor hasta las 3 h. Por otro lado, solo el CN incrementó ( $p < 0.01$ ) la producción de óxido nítrico en todos los tiempos evaluados. CNZ estimuló una mayor secreción de INF $\gamma$  en comparación con AFC en el día 7. Se observó una mayor secreción de IL-2 en los días 7 y 14, estimulada con CN y CNZ. CN y CNZ no afectan la producción de isotipos de anticuerpos (IgG1, IgG2a, IgG3, IgA e IgM) en los días 7, 14, 28 y 42. CN indujo una producción significativa de IgG contra OVA, pero menor que CFA. Las dos nuevas nanoemulsiones con capacidad adyuvante y antioxidante, capaces de generar infiltración leucocitaria y aumentar la producción de citocinas y anticuerpos.

## ABSTRACT

Emulsions have been widely used as immunological adjuvants, however, the use of materials derived from plants such as cottonseed oil and alpha tocopherol or minerals such as zinc, as well as their use at the nanometric scale, have been little explored. In this study, we aimed to develop a new nanoemulsion and evaluated its antioxidant and phagocytic capacity as well as parameters related to stimulation of immune response by expression of cytokine and antibodies production in a mice model. Formulated nanoemulsions CN (Cottonseed oil nanoemulsion) and CNZ (Cottonseed oil nanoemulsion whit Zinc oxide nanoparticles) were characterized by microscopy images, DLS and FTIR. A series of *in vitro* and *in vivo* experiments were designed to evaluate the activity of the formulated nanoemulsions. In primary cultures of murine macrophages, splenocytes and thymocytes was the safety and the dose of the formulated nanoemulsions. In macrophages the antioxidant and phagocytic capacity were evaluated. In Balb/C mice, the stimulation of the immune system was determined by the expression of cytokines and the production of antibodies. The CN and CNZ presented stability for 90 days. Immediately after preparation, the CN presented a higher particle size (543.1 nm) that CNZ presented a size of 320 nm. FTIR detects the interaction between the materials that make up the nanoemulsions as well as the correct synthesis of the ZnO nanoparticles. CN and CNZ (1.25 to 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) had no toxic effect ( $P > 0.05$ ) on macrophages, splenocytes, and thymocytes. All doses tested of CN and CNZ induced nitric oxide and antioxidants production in dose dependent manner when compared with the control. In subcutaneous tissue on femoral area) with CN or CNZ with ovalbumin showed inflammation with higher leukocyte infiltration compared with AFC. The intraperitoneal inoculation with CN, CNZ and CFA showed a high recruitment of total intraperitoneal cells with the CD14<sup>+</sup> phenotype, after 24 h of inoculation compared with control ( $p < 0.05$ ). CN and CNZ increased the phagocyte capacity with respect to the untreated macrophages in the macrophages *Candida albicans*-phagocytosis assay, The evaluation of residual CFU indicated that only CN significantly decreased ( $p < 0.05$ ) this value until the 3 h. By other side, only CN increased ( $p < 0.01$ ) the nitric oxide production in all times evaluated. CNZ

stimulated a major  $\text{INF}\gamma$  secretion compared with FCA at day 7. A major secretion of IL-2 was observed at days 7 and 14, stimulated with the CN and CNZ.

CN and CNZ not affect the production of antibody isotypes (IgG1, IgG2a, IgG3, IgA and IgM) at days 7, 14, 28 and 42. CN induced a significant production of IgG against OVA, but lesser than CFA. The two new nanoemulsions with adjuvant and antioxidant capacity, capable of generating leukocyte infiltration and increasing the production of cytokines and antibodies.

## 1.- INTRODUCCIÓN

Los adyuvantes se han utilizado para aumentar la inmunogenicidad de antígenos en vacunas o para modular el sistema inmunitario en diversas condiciones de enfermedad. Estos se pueden obtener de plantas, productos bacterianos, carbohidratos complejos, extractos animales y citocinas sintéticas (Shahbazi y Bolhassani, 2016). Las emulsiones basadas en aceites minerales tienen una amplia historia de uso clínico como adyuvantes que se remonta a la década de 1930 (Shah *et al.*, 2015). Diferentes tipos de emulsión se han utilizado como inmunoestimulantes o adyuvantes en la vacunación terapéutica o profiláctica. Una emulsión se forma cuando dos líquidos inmiscibles se juntan y uno de ellos se organiza en pequeñas gotas dispersas dentro del otro y se estabiliza por una capa interfacial de tensioactivo. Las emulsiones pueden ser agua en aceite (W/O), aceite en agua (O/W) o agua en aceite en agua (W/O/W) (Burakova *et al.*, 2018). Sin embargo, el uso de la emulsión basadas en aceite mineral en ocasiones produce fuertes reacciones adversas, como lesiones inflamatorias locales, dolor y malestar, que han prohibido su uso en vacunas animales y humanas (Burakova *et al.*, 2018). Por lo tanto, se han explorado emulsiones de aceite en agua biocompatibles basadas en aceites vegetales o animales en un esfuerzo por mejorar la tolerabilidad al disminuir la cantidad de aceite en el adyuvante y mejorar su biodegradabilidad (Shah *et al.*, 2015).

Algunas emulsiones desarrolladas como adyuvantes estaban basadas en escualeno. El escualeno es un tipo de lípido insaponificable que actúa como precursor biosintético de todos los esteroides en plantas y animales (He y Corke, 2003). Se han administrado adyuvantes a base de escualeno a humanos, incluidos niños, y se ha establecido un buen perfil de seguridad. Dada la percepción del público con respecto a la seguridad del escualeno y los malentendidos con respecto a su fuente, es necesario determinar si se podría usar algún otro aceite como reemplazo del escualeno (Fox *et al.*, 2011). Los aceites vegetales se pueden utilizar como coadyuvante alternativo a las emulsiones a base de escualeno en vacunas e inmunoestimulantes, por su gran variedad de principios activos que pueden afectar al sistema inmunitario. Varios aceites vegetales contienen  $\alpha$ -tocoferol (Grilo *et al.*, 2014). El  $\alpha$ -tocoferol tiene un efecto inmunomodulador sobre el desarrollo, la función y la regulación de las células dendríticas (DC), los macrófagos, las células

asesinas naturales (NK), las células T y las células B (Lee y Han, 2018). El aceite de semilla de algodón contiene  $\alpha$ -tocoferol ( $411 \pm 8.23$  a  $470.0 \pm 9.4$  mg/kg) (El-Mallah *et al.*, 2011). Además, la emulsión comercial AS03® utilizada como adyuvante en las vacunas contra la influenza Prepandrix® (prepandémica H5N1) y Pandemrix® (pandémica H1N1) contiene  $\alpha$ -tocoferol como inmunopotenciador (Shah *et al.*, 2015). Además, el zinc (Zn) es un mineral nutricional que participa en una variedad de funciones celulares, incluida la transducción, transcripción y replicación de señales; influye fuertemente en el sistema inmunológico afectando tanto la inmunidad inespecífica como la adquirida (Dardenne, 2002). Sin embargo, el Zn en forma de nanopartículas no se ha utilizado antes como parte de un adyuvante inmunogénico.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1.- Adyuvantes**

Los adyuvantes juegan un papel muy importante en la tecnología de vacunas para animales o humanos (Burakova *et al.*, 2018). El uso de adyuvantes promueve una mayor respuesta inmunitaria en el sitio de inoculación que es responsable de la mayor producción de anticuerpos neutralizantes de antígenos (Burakova *et al.*, 2018). Los adyuvantes mejoran la eficacia de las vacunas al aumentar la amplitud de la respuesta inmunitaria y aumentar la memoria inmunológica asociada con el sistema inmunitario adaptativo, lo que reduce la dosis de antígeno necesaria y, por lo tanto, reduce la frecuencia de vacunación (Shah *et al.*, 2015).

Durante el siglo pasado, hemos agregado diferentes sustancias como sales de aluminio, cloruro de calcio, saponinas, almidón, derivados bacterianos y emulsiones de aceite vegetal para mejorar las vacunas.

### **2.2.- Emulsiones como adyuvantes**

Las emulsiones se forman cuando se juntan dos líquidos inmiscibles; uno de ellos puede organizarse en pequeñas gotas, dispersarse dentro del otro y estabilizarse por una capa interfacial de tensioactivo. Se han utilizado diferentes tipos de emulsiones como adyuvantes de vacunas: agua en aceite (W/O), aceite en agua (O/W) y agua en aceite en agua (W/O/W). La emulsión W/O es una dispersión de gotas de agua dentro de una fase de aceite continua, las emulsiones O/W se forman por la dispersión de gotas de aceite en la fase acuosa y las emulsiones W/O/W son emulsiones multifásicas de gotas de aceite que contienen gotas de agua internas que se dispersan en una fase de agua continua (Burakova *et al.*, 2018). Los adyuvantes de emulsión también tienen una extensa historia de uso clínico que se remonta a la década de 1930 (Shah *et al.*, 2015). Los adyuvantes completos de Freund (FCA) son emulsión W/O a base de aceite de parafina. Sin embargo, esta emulsión produce fuertes reacciones adversas, como lesiones inflamatorias locales, dolor y malestar, que han prohibido su uso en vacunas animales y humanas (Burakova *et al.*, 2018). Además, algunos componentes del adyuvante de Freund también resultaron ser

oncogénicos en estudios preclínicos que excluyeron a FCA del uso clínico generalizado (Shah *et al.*, 2015). Por lo tanto, se han explorado emulsiones de aceite en agua biocompatibles basadas en aceites vegetales o animales en un esfuerzo por mejorar la tolerabilidad al disminuir la cantidad de aceite en el adyuvante y mejorar la biodegradabilidad del aceite (Shah *et al.*, 2015).

### **2.3.- Adyuvantes basados en emulsiones biocompatibles**

Algunas emulsiones desarrolladas para aplicaciones de vacunas, como MF59® y AS03®, están basadas en escualeno. El escualeno es un tipo de lípido insaponificable y actúa como precursor biosintético de todos los esteroides en plantas y animales (He y Corke, 2003). En modelos murinos y de rata se ha observado patología autoinmune asociada al escualeno. Sin embargo, se han administrado millones de dosis de MF59® y AS03® a humanos, incluidos niños, y se ha establecido un buen perfil de seguridad. Dada la percepción del público sobre la seguridad del escualeno y los malentendidos con respecto a su fuente, es necesario determinar si se pueden usar otros aceites como reemplazo del escualeno (Fox *et al.*, 2011). Los aceites vegetales pueden ser un adyuvante alternativo a la emulsión a base de escualeno como en la vacunación, ya que estos contienen una gran variedad de sustancias activas que pueden afectar el sistema inmunológico.

### **2.4.- Aceites vegetales como sustituto del escualeno**

Los aceites vegetales tienen un potencial mínimo de efectos secundarios adversos ya que son compuestos biodegradables. Los aceites vegetales como el de soja, maíz, oliva, sésamo, semilla de murici, colza, linaza, arroz, cacahuete, semilla de algodón y anacardos estimularon potentemente la respuesta inmunitaria humoral y celular (Freitas *et al.*, 2013).

El metabolismo de los lípidos y la inmunidad innata tienen una estrecha relación, la formación y acumulación de cuerpos oleosos celulares durante la inducción de las condiciones inflamatorias y la presentación cruzada en las células dendríticas se encuentran entre los principales mecanismos funcionales propuestos de los adyuvantes a base de aceite para mejorar las respuestas inmunitarias (Mohammadzadeh *et al.*, 2020).

Los recursos vegetales se consideran una fuente potencial de escualeno y se han investigado ampliamente; aceites como el de oliva, salvado de arroz, maíz, maní, colza, girasol y semilla de algodón contienen de 0,1 a 4 g/kg (He y Corke, 2003) o de 1,3 a 3,1 g/kg de escualeno (Kalogeropoulos y Andrikopoulos, 2004). Los adyuvantes comerciales como MF59® y AS03® contienen 0,0975 g y 0,1069 g por dosis, respectivamente (Shah *et al.*, 2015). Si se compara el escualeno por dosis de adyuvantes comerciales con el máximo de escualeno contenido en los aceites vegetales, se necesitan 2,43–2,67 g de aceite por dosis. Sin embargo, los aceites vegetales contienen otras fracciones con potencial inmunogénico, diferentes clases estructurales de aceites, incluido el  $\alpha$ -tocoferol, el aceite de triglicéridos de cadena media (MCT) y varios aceites de triglicéridos de cadena larga (LCT), aceite que podría usarse como reemplazo del escualeno (Fox *et al.*, 2011).

## **2.5.- Otras fracciones inmunogénicas de aceites vegetales**

### **2.5.1.- $\alpha$ -tocoferol**

Se han observado efectos inmunomoduladores del  $\alpha$ -tocoferol o la vitamina E que regulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) y modulan la transducción de señales. Además, en modelos animales y humanos en condiciones normales y de enfermedad. Con avances en la comprensión del desarrollo, la función y la regulación de las células dendríticas (DC), los macrófagos, las células asesinas naturales (NK), las células T y las células B. El  $\alpha$ -tocoferol es un antioxidante soluble en grasa que puede proteger los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la membrana de la oxidación (Lee y Han, 2018).

Varios aceites vegetales contienen  $\alpha$ -tocoferol, sin embargo, se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en los aceites vegetales. Por ejemplo, el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el aceite de canola es de  $120.3 \pm 4.2$  mg/kg, aceite de girasol  $432.3 \pm 86.6$  mg/kg, aceite de maíz  $173.0 \pm 82.3$  mg/kg y aceite de soja  $71.3 \pm 6.4$  mg/kg (Camara *et al.*, 2014). El  $\alpha$ -tocoferol contenido en el aceite de semilla de algodón está entre  $470.0 \pm 9.4$  y  $411 \pm 8.23$  mg/kg (El-Mallah *et al.*, 2011). La emulsión comercial AS03® utilizada como adyuvante en las vacunas contra la influenza Prepandrix®

(prepandemia H5N1) y Pandemrix® (pandemia H1N1) contiene  $\alpha$ -tocoferol como inmunopotenciador (Shah *et al.*, 2015).

### **2.5.2.- Triglicéridos de cadena media (MCT) y triglicéridos de cadena larga (LCT)**

Los MCT y LCT tienen efecto sobre la inmunidad celular, estos triglicéridos aumentan la expresión de las integrinas  $\beta 2$ , aumenta la captación de antígeno por parte de los linfocitos (18%) y macrófagos (387%), respectivamente, no estimulan las células, además, promueven la desgranulación celular CD63 (210 %), gránulos específicos CD66b (370 %) y adhesión aumentada e ICAM-1 (34 %  $\pm$  4 %). Aunque el MCT y el LCT aumentaron la expresión, la adhesión y la desgranulación de la integrina  $\beta 2$  de los neutrófilos, el LCT no tiene este efecto por sí mismo. Por lo tanto, la longitud de la cadena de triglicéridos podría ser una característica clave en la interacción de las emulsiones de lípidos y el sistema inmunitario de los fagocitos (Wanten *et al.*, 2000). Varios aceites vegetales de soja, sésamo y cártamo son ricos en MCT y LCT (Fox *et al.*, 2011).

### **2.6.- Emulsiones basadas de aceite vegetal como adyuvantes en humanos**

Los adyuvantes de emulsión MF59 y AS03 ya se han utilizado en vacunas humanas autorizadas para la influenza, para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos (O'Hagan *et al.*, 2011; Garcon *et al.*, 2012). Estos adyuvantes de vacunas han sido aprobados en la Unión Europea y en los EE. UU. (p. ej., el MF59 se usó en la vacuna inactivada estacional para ancianos y, en Canadá, para niños; las vacunas pandémicas con adyuvante MF59 y AS03 en Europa; la MF59- y las vacunas contra la influenza aviar H5N1 con adyuvante AS03 para almacenamiento en los EE. UU.) (Del Giudice *et al.*, 2018).

Los aceites minerales utilizados en las vacunas adyuvadas de primera generación no eran metabolizables y, a pesar de ser fuertes potenciadores de la respuesta de anticuerpos, provocaban abscesos asépticos que no se reabsorbían (Del Giudice *et al.*, 2018). En comparación con el aluminio, MF59 puede provocar una inmunidad más equilibrada, posiblemente al mejorar la captación de antígenos, reclutar células inmunitarias y promover la migración de células presentadoras de antígenos activadas (Liang *et al.*,

2020). Emulsiones como MF59 y AS03, que utilizan aceites completamente metabolizables, resolvieron el problema de los adyuvantes a base de aceites minerales al tiempo que mejoraron el desempeño de los a base de sales de aluminio y permitieron el desarrollo de vacunas inactivadas estacionales mejoradas contra la influenza, seguidas de vacunas contra la influenza aviar H5N1 y la influenza pandémica H1N1 en 2009 (Del Giudice *et al.*, 2018).

Estos adyuvantes de emulsión se utilizan en vacunas comerciales contra la gripe, por ejemplo, MF59 utilizado en (Fluad ®, Aflunov ®, Focetria ® y Celtura®) y AS03 utilizado en (Prepandrix ® y Pandemrix ®) (Shah *et al.*, 2015). El beneficio y la seguridad de la emulsión como adyuvante de vacunas ahora están muy bien establecidos, luego de su uso en millones de personas en todo el mundo. Las emulsiones se han utilizado como adyuvantes con varios antígenos en un amplio grupo de personas, como adultos, ancianos, niños, incluso recién nacidos, mujeres embarazadas, etc. (Del Giudice *et al.*, 2018).

## **2.7.- Adyuvante de emulsión a base de aceite vegetal en modelos animales**

En animales, los aceites vegetales como adyuvantes son seguros y efectivos. Por ejemplo, Marinho *et al.* (2016) en modelo murino demuestran que el efecto adyuvante de los aceites vegetales (soya, oliva y maíz) fue más efectivo que el hidróxido de aluminio (convencional usado en adyuvantes de vacunas) cuando se usa ovoalbúmina (OVA) como antígeno. El aceite de oliva tuvo el efecto adyuvante más lento de los tres aceites vegetales. Sin embargo, esto estimuló una mayor producción de anticuerpos específicos (anti-OVA IgG) y menores niveles de anti-OVA IgE, esto último indica un bajo riesgo de producir reacciones alérgicas a la vacuna. Los aceites vegetales como el de cacahuate y el aceite de semilla de algodón pueden ser utilizados como adyuvantes de vacunas, por ejemplo, el aceite de maní aumentó significativamente la síntesis de anticuerpos anti-OVA en la respuesta primaria, pero no favoreció la respuesta celular.

En ratones inmunizados con *Leishmania amazonensis*, los antígenos emulsionados con aceite de cacahuate exacerbaron las lesiones cutáneas y la detección del antígeno en los ganglios linfáticos, lo que sugiere una estimulación de la respuesta inmunitaria Th2 y una regulación a la baja de la respuesta Th1. El aceite de semilla de algodón demostró tener

efecto adyuvante a la respuesta humoral, estimulando una respuesta secundaria y favoreciendo la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) a la OVA. El aceite de arroz estimuló una fuerte reacción de DTH a OVA y mejoró la síntesis de anticuerpos después de la tercera dosis. Los ratones inmunizados con antígenos de *L. amazonensis* emulsionados con aceite de arroz o aceite de semilla de algodón quedaron protegidos contra el desarrollo de lesiones en la piel y la carga de parásitos en los ganglios linfáticos (Freitas *et al.*, 2013).

Actualmente se están formulando emulsiones adyuvantes con aceites vegetales y otros derivados de plantas como  $\alpha$ -tocoferol y/o saponinas. Cui *et al.* (2019,2020) formularon emulsión adyuvante a base de aceite de soya,  $\alpha$ -tocoferol y saponinas de ginseng; su grupo de estudio utilizó el virus de la fiebre aftosa (FMDV) como antígeno. Cuando los ratones fueron inmunizados con la vacuna contra el virus de la fiebre aftosa y un adyuvante de emulsión a base de aceite de soya que contenía tanto  $\alpha$ -tocoferol como saponinas de ginseng, se observó una producción significativamente mayor y más temprana de IgG sérica específica contra el virus de la fiebre aftosa. Este adyuvante aumentó el número de BMPC, una respuesta de proliferación de linfocitos mejorada promovió la producción de IL-4 e IL-6 y promovió una mayor respuesta de proliferación de linfocitos y la proporción de células T CD4+/CD8+ con producción de IFN $\gamma$  aumentado y TGF $\beta$ 1 disminuido por linfocitos. Estos resultados sugirieron que el adyuvante a base de aceite de soya activaba las respuestas inmunitarias Th1/Th2.

Yuang *et al.*, (2020) evaluaron el efecto adyuvante de la emulsión de aceite de semilla de girasol que contiene saponinas sobre la respuesta inmune inducida por un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) inactivado en pollos. Demostraron que la emulsión promovió mayores respuestas séricas de anticuerpos neutralizantes y específicos de NDV, niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 y respuestas proliferativas de linfocitos. Mediante un ensayo de transcriptoma se determinó que este adyuvante activan vías relacionadas con el sistema inmunitario predominantes en esta emulsión incluyeron "vía de señalización del receptor tipo Toll", "vía de señalización del receptor tipo NOD", "vía de señalización del receptor de lectina tipo C" y "sistema de señalización del fosfatidilinositol".

Aunque se han aprobado algunas emulsiones para su uso como adyuvantes en vacunas humanas, se basan en sustancias que contienen los aceites vegetales y no en el aceite en sí. Numerosas sustancias naturales como la emulsión de aceite vegetal pueden utilizarse como adyuvantes para mejorar la eficacia de las vacunas animales. Se deben considerar varios criterios al seleccionar/desarrollar adyuvantes para vacunas animales: eficacia en la especie animal de destino, inducción de una inmunidad protectora rápida y duradera, seguridad para los animales, cumplimiento de la normativa de seguridad alimentaria, viabilidad para aumentar la producción, por último, pero no menos importante, la rentabilidad (Burakova *et al.*, 2018).

## **2.8.- Minerales nanopartículas (NPs) como adyuvantes**

La nanotecnología es una de las innovaciones industriales más relevantes del siglo XXI, se utilizan en diversas aplicaciones y productos industriales, incluidos artículos deportivos, neumáticos, protectores solares, cosméticos, productos electrónicos y aditivos de combustible, así como variedad de fines médicos, como diagnóstico por imágenes y suministro de medicamentos, la aplicación de las NPs en el sistema inmunitario es un campo emergente, aunque ciertas NPs son inmunotóxicas o inmunomoduladoras, una descripción concisa de las interacciones entre las nanopartículas y el sistema inmune sería valiosa (Luo *et al.*, 2015).

La toxicidad debido a algunas NPs a base de metal como plata, oro y cobre aumentó con la disminución del tamaño, las NPs a base de metal no deben considerarse una población homogénea con atributos tóxicos simples porque actúan independientemente para mediar diversas reacciones biológicas, otras propiedades fisicoquímicas como la composición elemental, la carga, la forma, la cristalinidad, el área superficial, la solubilidad y los derivados superficiales también influyen en el potencial tóxico de los compuestos (Luo *et al.*, 2015). Algunos estudios han informado que  $Zn^{2+}$  liberado de ZnO NP está relacionado al menos parcialmente con su potencial citotóxico (Shen *et al.*, 2013).

Las ZnO NP son citotóxicas para el sistema inmunitario humano y pueden causar efectos negativos tanto a corto como a largo plazo en una dosis de 25 y 12  $\mu\text{g/mL}$  con un tamaño de partícula de entre 100 y 130 nm. El daño mitocondrial conduce a la activación de la

cascada de caspasas y, en consecuencia, a la apoptosis celular (Czyżowska y Barbasz, 2020). La citotoxicidad inducida por ZnO NP en monocitos y macrófagos humanos fue el resultado de la liberación intracelular de  $Zn^{2+}$  iónico provocada por el cambio de pH (Shen *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2010). Se ha observado que las ZnO NP en concentraciones menores a 1  $\mu\text{g/mL}$  no tienen efecto citotóxico sobre macrófagos, además, las ZnO NP fueron comparativamente más efectivas para mejorar la generación de ROS y la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-17) en comparación con las partículas de ZnO de mayor tamaño, sin embargo, los macrófagos captaron a las partículas de ZnO de mayor tamaño en mayor cantidad en comparación con las ZnO NP (Roy *et al.*, 2011).

## **2.9.- Efecto del Zn en el sistema inmune**

El Zn puede afectar la inmunidad a través de su importante papel en la replicación y proliferación celular, investigaciones en humanos, animales de laboratorio, ganado y cerdos se ha documentado que la deficiencia de Zn deteriora las respuestas inmunes y reduce la resistencia a las enfermedades (Spears y Weiss, 2008).

El Zn regula varios procesos cruciales implicados en la respuesta inmune innata a través de mecanismos aún no completamente entendidos, por ejemplo, el efecto de Zn sobre la fagocitosis permite el anclaje de la membrana y es crítica para la función y maduración del fagosoma y endosoma (Bonaventura *et al.*, 2015; Merithew *et al.*, 2003; Simonsen *et al.*, 1998) Para la neutralización de patógenos, el Zn es igualmente importante, tanto la deficiencia de Zn como el exceso de Zn inhiben la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), que regula la producción de anión superóxido responsable de la destrucción de los patógenos después de la fagocitosis (Bonaventura *et al.*, 2015; Hasegawa *et al.*, 2000). Además, el Zn promueve la adhesión de monocitos a las células endoteliales *in vitro* y es importante para la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , las interleucinas IL-1 $\beta$  y IL-6, también modula la respuesta de las células NK, la maduración de las CD observándose cambios dinámicos en la expresión de los transportadores de Zn (ZIP6 ZIP10 y ZnT) en la superficie celular dependiendo de la concentración de Zn en el medio (Bonaventura *et al.*, 2015).

Las células T son especialmente vulnerables a la deficiencia de Zn, tanto a nivel de desarrollo como funcional, debido a que la deficiencia de Zn causa atrofia tímica y posterior linfopenia de células T, el Zn también es crucial para el equilibrio entre los diferentes subconjuntos de células T, su deficiencia disminuye la producción de citocinas TH1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ ), lo que resulta en un desequilibrio entre TH1 y TH2. Las células proinflamatorias TH17 también se ven afectadas por los niveles plasmáticos de Zn. El desarrollo de estas células se controla críticamente mediante la activación de STAT3 inducida por IL-6- durante la inflamación crónica (Bonaventura *et al.*, 2015). Considerando el efecto que el aceite de semilla de algodón,  $\alpha$ -tocoferol y ZnO NPs tienen sobre el sistema inmune en las dosis adecuadas, en el presente trabajo se explora el uso potencial como adyuvante de la respuesta inmune de una nanoemulsión (aceite en agua) basada en estos materiales y determinar si esta puede emplearse como un adyuvante terapéutico y profiláctico.

### **3.- JUSTIFICACIÓN**

Los inmunoestimulantes representan una clase prometedora de fármacos para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas y cáncer. Los extractos de plantas y minerales traza como Zn tienen una aplicación potencial como inmunoestimulantes, ya que se pueden obtener fácilmente y no son costosos. Además, la utilización de inmunoestimulantes en escala nanométrica es un enfoque novedoso para mejorar las propiedades de inmunoestimulantes de estos. Sin embargo, se necesitan más estudios para identificar inmunoestimulantes efectivos sin efectos secundarios adversos y determinar su mecanismo de acción.

#### **4.- HIPÓTESIS**

La aplicación de una nanoemulsión enriquecida con  $\alpha$ -tocoferol y ZnO tendrá un efecto estimulante sobre la respuesta inmune innata y/o adaptativa en un modelo murino.

#### **5.- OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de una nanoemulsión enriquecida con  $\alpha$ -tocoferol y ZnO sobre la inducción de la inmunidad innata y adaptativa de un modelo murino.

##### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar físico- químicamente la nanoemulsión con y sin ZnO.
2. Probar el efecto de la nanoemulsión con y sin ZnO sobre la función de macrófagos peritoneales (RNS, CAT, fagocitosis, y CD14).
3. Analizar el efecto de la nanoemulsión con y sin ZnO sobre el perfil de citocinas.
4. Determinar el efecto de la aplicación de la nanoemulsión con y sin ZnO sobre la especificidad y cambio de isotipos de inmunoglobulinas en un modelo murino.
5. Determinar el efecto de la nanoemulsión con y sin ZnO sobre la memoria inmunológica de un modelo murino.

## **6.- MATERIALES Y METODOS**

### **6.1.- Desarrollo y caracterización de nanoemulsiones**

#### **6.1.1.- Reactivos**

El aceite de semilla de algodón de grado farmacéutico, el  $\alpha$ -tocoferol (96 % de pureza) y el sulfato de zinc monohidrato ( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) se adquirieron de Sigma-Aldrich Inc (Saint Louis, EE. UU.)

#### **6.1.2.- Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc**

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) se obtuvieron por el método de coprecipitación. Se disolvió el sulfato de zinc monohidrato ( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) en agua desionizada para obtener una solución 0,5 M que permaneció en agitación a 300 rpm mientras se añadía gota a gota solución (2M) de hidróxido de sodio (NaOH). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el precipitado formado se lavó con agua desionizada y se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min. El precipitado se secó en una estufa de aire caliente a 60 °C durante 24 h. Luego, el polvo obtenido se calcinó a 300 °C durante 2 h. en una mufla.

#### **6.1.3.- Formulación de nanoemulsión**

Se formularon dos nanoemulsiones de la siguiente manera: 1) Nanoemulsión de aceite de semilla de algodón (CN), para formar la fase oleosa,  $\alpha$ -tocoferol (25 mg), Tween 20 (35 mg) y DMSO (50 mg) fueron disueltos en aceite de semilla de algodón (275 mg), 2) Nanoemulsión de aceite de semilla de algodón + nanopartículas de ZnO (CNZ) se formularon de la misma manera que se describió anteriormente y se agregaron nanopartículas de ZnO (2,5  $\mu\text{g}$ ) en la fase oleosa. La fase oleosa se aforó con solución salina (1 mL) y se mezcló a 12.000 rpm en homogeneizador durante 10 minutos (ULTRA-TURRAX®, IKA Works Inc, Wilmington, EE. UU.).

#### **6.1.4.- Caracterización de nanoemulsiones**

El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial Zeta (PZ) se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en un Zetasizer ZS90-Nano (Malvern Instruments). Todos los resultados se midieron por triplicado a temperatura ambiente (25 °C). La morfología y el tamaño de ZnO se confirmaron mediante microscopio electrónico de barrido (SEM), y el tamaño de la nanoemulsión se confirmó mediante microscopio de fuerza atómica (AFM). La caracterización de los grupos funcionales de nanoemulsiones y sus componentes (aceite de semilla de algodón,  $\alpha$ -tocoferol y nanopartículas de ZnO) se determinó mediante reflexión total atenuada (ATR) en conjunto con la técnica de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Las muestras se colocaron en el cristal ATR de diamante y los espectros se registraron con un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (PERKIN ELMER, Waltham, MA, EE. UU.), con una acumulación de 16 escaneos a una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> entre 4500-500 cm<sup>-1</sup>. Los datos se analizaron con el software PERKIN ELMER espectro 10.

#### **6.2.- Animales**

Se usaron ratones macho Balb/C (de 6 a 8 semanas de edad) para todos los experimentos in vivo y ex vivo. Los animales se obtuvieron de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas (UANL, FCB) Bioterium. Los animales se mantuvieron a 24 °C y 50 % de humedad relativa en jaulas de polipropileno con cama de mazorca de maíz. El alimento y el agua se suministraron ad libitum.

#### **6.3.- Obtención celular y condiciones de cultivo**

Cultivos primarios de timo, bazo y macrófagos peritoneales, obtenidos de ratones sanos. Los cultivos celulares se mantuvieron en un medio que contenía suero fetal bovino (FBS)

al 5% y antibiótico y antimicótico, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95% a una temperatura constante de 37 °C.

#### **6.4.- Declaración ética**

Todos los experimentos relacionados con el uso de animales y su cuidado siguieron estrictamente los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la UANL FCB.

#### **6.5.- Toxicidad celular**

La toxicidad de las nanoemulsiones se evaluó in vitro en cultivos primarios de timo, bazo y macrófagos peritoneales. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo con 100 µl de medio de cultivo DMEM. Después de 24 h. de medio de cultivo de incubación se reemplazó por uno nuevo que contenía CN o CNZ (0, 1,25, 2,5, 5 y 10 µL/ml). La viabilidad celular se evaluó 24 h. después de tratamientos mediante la técnica del metabolismo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol) (MTT). La medición espectrofotométrica se realizó por triplicado a 570 nm en un lector de placas (Synergy HT, Biotec), el porcentaje de viabilidad se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{Absorbancia de la muestra} / \text{Absorbancia del control}) * 100$$

#### **6.6.- Producción de óxido nítrico (ON) y antioxidantes en macrófagos**

Para la determinación del efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de ON (en forma de nitrito) y la capacidad antioxidante total (CAT) se utilizaron macrófagos

peritoneales murinos (MPM). Como control positivo se utilizó lipopolisacárido (LPS) en una concentración de 5 µL/mL (L2262, Sigma-Aldrich Inc Saint Louis, EE. UU.).

El ON se determinó en base a la cantidad de nitrito producido. La concentración de nitrito en el sobrenadante de las células tratadas se determinó mediante la reacción de Griess (Griess Reagent, Catalog No. ab234044, Abcam, Cambridge, UK). MPM se cultivaron de la misma manera que se menciona en la sección de ensayos de toxicidad celular descrita anteriormente. Se recogieron los sobrenadantes (50 µL), se centrifugaron a 600 × g durante 5 min, se mezclaron con 100 µL de reactivo de Griess [N-(1-naftil)-etilendiamina al 0,1 %, sulfanilamida al 1 % en ácido fosfórico al 5 %] y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. La absorbancia se midió a 540 nm (Bie *et al.*, 2019).

Se determinó CAT en sobrenadantes de cultivo de MPM. Se cultivaron MPM y se recogieron los sobrenadantes en las condiciones descritas anteriormente. El kit de ensayo de antioxidantes (Nº de catálogo KA1622, Abnova, Taipei, Taiwán) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo mide la CAT por la reducción de Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+</sup> observada por la formación de un complejo coloreado. La curva estándar de Trolox (6-hidroxilo-2,5,7,8-tetrametilcro0mano-2-carboxílico) se midió a 540 nm

### **6.7.- Captación y fagocitosis de macrófagos**

Se diseñaron dos ensayos para determinar la captación de nanoemulsiones y el efecto de la actividad fagocítica en MPM. Para la estimulación celular se utilizaron CN y CNZ (10 µL/mL), para el control de la inhibición de la fagocitosis se utilizó clodronato disódico (0,6 mg/mL) y para el control negativo se utilizó medio DMEM. La capacidad de captación cuantitativa de MPM se determinó mediante un ensayo de rojo neutro (Bie *et al.*, 2019) utilizando el kit de ensayo de rojo neutro: viabilidad celular/citotoxicidad (n.º de catálogo ab234039, abcam, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el ensayo, se sembraron 2 x 10<sup>5</sup> macrófagos peritoneales murinos en placas de 96 pocillos, se lavaron 3 veces y luego se incubaron con rojo neutro al 10 % durante 2 h. Después de 3 lavados, el rojo neutro incorporado a los lisosomas se disolvió en la solución de lisis proporcionada por el kit y se leyó la absorbancia a 540 nm. La

actividad fagocítica cualitativa se determinó utilizando el kit de ensayo de fagocitosis (IgG FITC) (N° de catálogo 500290 Cayman Chemical, MI, EE. UU.). Los MPM se sembraron en cubreobjetos en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 h en medio DMEM. Después de 1 h de tratamientos, las células se incubaron con perlas de látex-complejo IgG-FITC de conejo durante 2 h. Las fotografías se observaron en microscopio de fluorescencia (Axioscope 5 Pol, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

### **6.8.- Fagocitosis de macrófagos de *candida albicans***

Para la evaluación de la capacidad fagocítica de MPM se utilizó *C. albicans* (ATCC 10261). MPM, obtenido de 3 ratones sanos. Se sembraron MPM en las condiciones descritas anteriormente en el ensayo de toxicidad celular. El ensayo de fagocitosis se realizó con base en el método propuesto por Alieke *et al* (2002). Se recolectó sobrenadante del cocultivo (macrófagos ( $1 \times 10^6$  células) / *C. albicans* ( $1 \times 10^8$ )) para evaluar el aumento o disminución de unidades formadoras de colonias (UFC) por el método de Mc-Farland (César-de Vasconcelos *et al.*, 2014). El porcentaje de microorganismos fagocitados se definió como  $(1 - (\text{número de UFC/UFC no fagocitadas al inicio de la incubación})) * 100$ . Se evaluó la muerte de *C. albicans* por fagocitos en las mismas monocapas. La producción de nitrito se determinó como se mencionó anteriormente.

### **6.9.- Vacunación y toma de muestras**

Se diseñaron tres experimentos independientes. Se utilizó ovoalbúmina (OVA), Sigma-Aldrich Inc Saint Louis, EE. UU.) como antígeno (10 mg por animal en 50  $\mu$ L de solución salina). Todas las inmunizaciones se aplicaron por vía subcutánea (s.c.) en un volumen total de 100  $\mu$ L por animal (50  $\mu$ L de nanoemulsión y 50  $\mu$ L de antígeno). Como control positivo se utilizó adyuvante completo de Freund (FCA, Sigma-Aldrich Inc Saint Louis, EE. UU.); como control se utilizó un grupo de antígenos únicos (ovoalbúmina 10 mg por dosis en 100  $\mu$ L de solución salina)

**Experimento A.** Los ratones inoculados con CN, CNZ, FAC y control fueron sacrificados por dislocación cervical 24 h. postoperatorio. El tejido anatómico del sitio de inoculación (tejido subcutáneo sobre el área femoral) fijado en formaldehído al 10% y teñido con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar la infiltración de leucocitos. Para la cuantificación y tipificación de células, los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con nanoemulsiones sin antígeno. Las células (células/ $\mu$ L) se ubicaron por tamaño y granularidad para establecer la puerta, y la expresión de CD14<sup>+</sup> se determinó por citometría de flujo. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante citometría de flujo (Accuri C6, DB biosciences, San Jose, Ca, EE. UU.).

**Experimento B.** Se inmunizaron ratones con OVA, y su combinación con CN, CNZ y FAC o control (solución salina) los días 0 y 14. Se tomaron muestras de sangre los días 7, 14, 28 y 42. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca en ratones anestesiados. El suero sanguíneo se separó y congeló a -80 °C hasta el momento de la determinación de anticuerpos de isotipo (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM) y determinación del perfil de citoquinas TH1 (IFN- $\gamma$  y IL-2) /TH2 (IL-10). Las citoquinas se midieron por citometría de flujo (Accuri C6, DB biosciences, San Jose, Ca, EE. UU.) utilizando un kit de citocinas Th1/Th2/Th17 de ratón de matriz de perlas citométricas (CBA) comercial (n.º de catálogo 560485, DB biosciences, San Jose, CA, EE. UU.).

**Experimento C.** Los ratones fueron inmunizados los días 0 y 14 con las diferentes nanoemulsiones (CN o CNZ) mencionadas anteriormente y desafiados con OVA el día 42 ya las 72 h. se tomaron muestras de sangre. El suero sanguíneo se separó para evaluar anticuerpos específicos y se congeló a -80 °C hasta su análisis.

#### **6.10.- Isotipos de anticuerpos e IgG anti-OVA elisa**

Los anticuerpos anti-OVA fueron evaluados por ELISA, como se describió previamente (Thommen *et al.*, 2011). Brevemente, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos (Falcon) durante la noche a 4 °C con 0,5 mg de OVA por pocillo en tampón de carbonato-bicarbonato pH 9,6, después se lavaron con PBS 0,05 %-Tween-20 y luego se bloquearon con 1 % -BSA/PBS durante 1h. a temperatura ambiente. Se añadió antisuero de ratón de

42 días por triplicado (diluciones en serie de 1:100) y se incubó durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y se incubaron durante 1 h. a 37 °C con IgG-HRP anti-ratón de cabra (Catálogo No. sc-2005, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Tx). Después de eso, se lavaron los pocillos y se añadió tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La placa se leyó a 450 nm en un lector de placas (Synergy HT, Biotec), valores que indican la densidad óptica (DO). Los isotipos de anticuerpos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM) se determinaron mediante el kit comercial Ig Isotyping Mouse Uncoated ELISA (Catalog No. 88-50630, Thermo Fisher Scientific Inc, Viena, Austria).

### **6.11.- Análisis estadístico**

Todo el análisis de datos se realizó con el software Minitab® (2014). Los datos se expresaron como media ± error estándar (EE). La significación estadística ( $\alpha= 0.05$ ) se determinó mediante ANOVA. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey.

## 7.-RESULTADOS

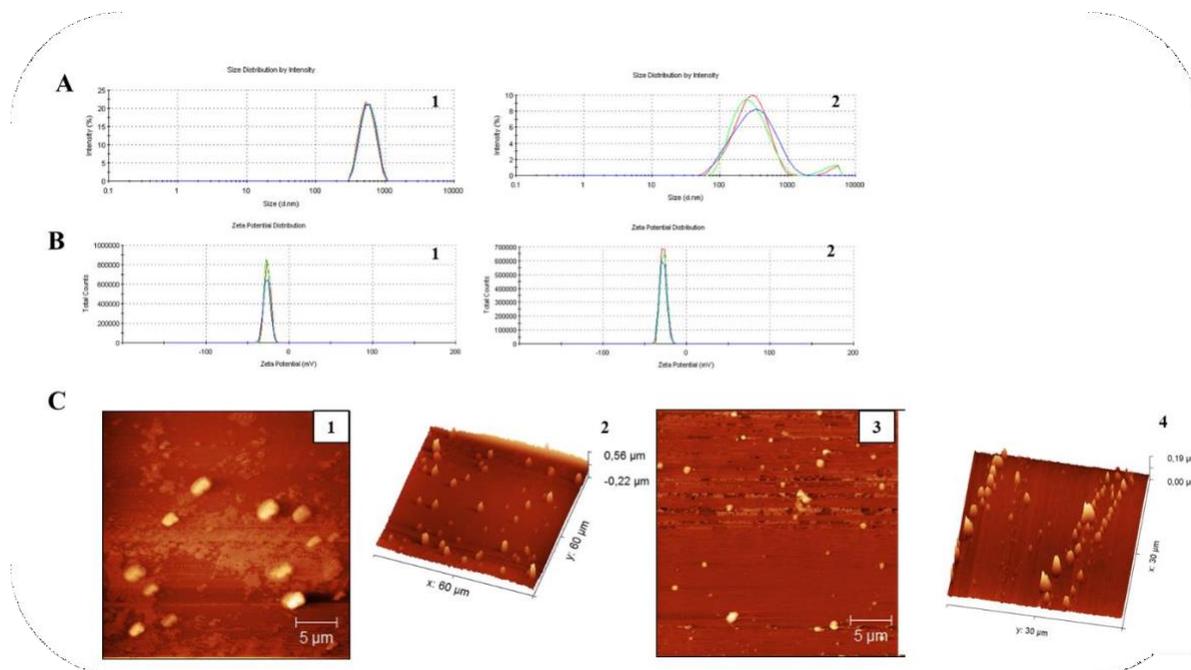
### 7.1.- Desarrollo y caracterización de nanoemulsiones

La nanoemulsión CN y CNZ presentó estabilidad por 90 días, y esto fue confirmado por análisis DLS (Cuadro 1 y Figura 1A y 1B).

**Tabla 1. Análisis DLS de las nanoemulsiones CN y CNZ a 25°C.**

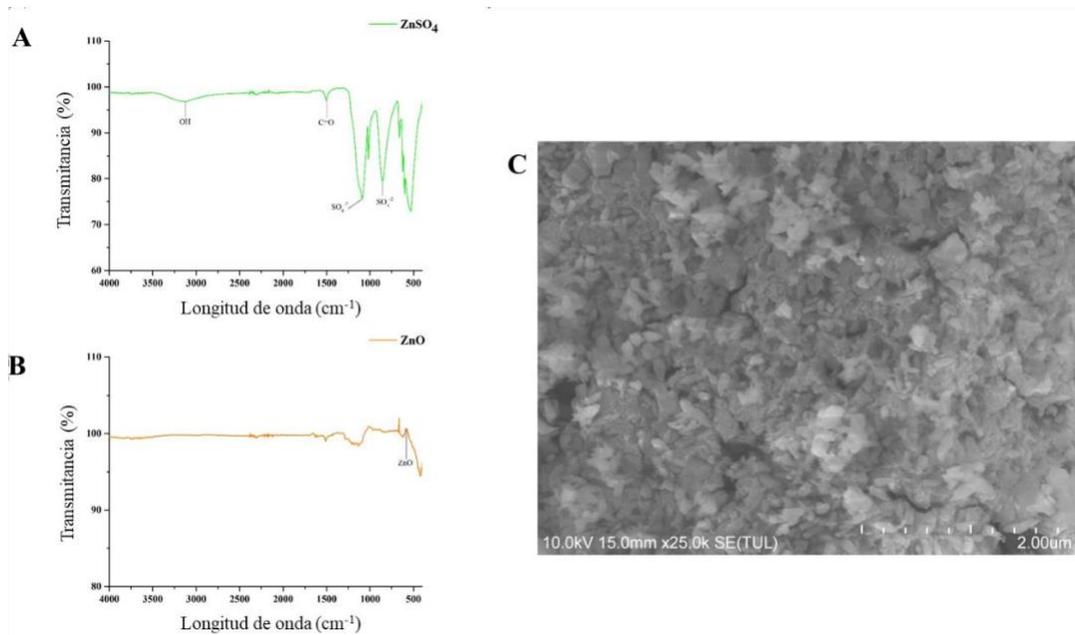
Nanoemulsiones	Tiempo (meses)		
	0	1	3
<b>CN</b>			
Tamaño de Partícula (d.nm)	543.1	506.1	542.7
PDI	0.074	0.192	0.225
Potencial Zeta (mV)	-26.6	-22.1	-13
<b>CNZ</b>			
Tamaño de Partícula (d.nm)	320	266.1	259.6
PDI	0.449	0.279	0.312
Potencial Zeta (mV)	-28.1	-30.6	-29.5

Inmediatamente después de la preparación, la nanoemulsión de CN presentó un tamaño de partícula mayor (543,1 nm) con un PZ = -26.6 mV y PDI = 0.074, en contraste con la CNZ que presentó un tamaño de 320 nm, un PZ = -28.1 mV y PDI = 0.449. Sin embargo, a los 90 días se observaron ligeras diferencias, la nanoemulsión de CN presentó disminución de potencial zeta (-13 mV) y aumento de PDI (0.225), y CNZ presentó disminución de tamaño (259.4 nm) y PDI (0.312) pero aumento de potencial zeta (-29.5 mV). La diferencia de tamaño de partícula de CN y CNZ se confirmó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) (Figura 1C), donde CN mostró grandes estructuras semiesféricas y CNZ pequeñas estructuras esféricas.



**Figura 1. Medición de distribución de tamaño de partículas e imágenes AFM de nanoemulsiones.** (A) Mediciones de (1) CN y (2) CNZ por dispersión de luz dinámica. (B) Mediciones del potencial zeta de (1) CN y (2) CNZ por dispersión de luz dinámica. (C) Imágenes por AFM 2D de (1) CN y (3) CNZ, y 3D de (2) CN y (4) CNZ.

Los espectros FTIR de las nanopartículas de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y ZnO se muestran en la Figura 2A y 2B, respectivamente. En la Figura 2A, se pueden observar los picos característicos de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , un grupo hidroxilo (OH) a  $3.135 \text{ cm}^{-1}$ , un grupo carbonilo (C=O) a  $1.506 \text{ cm}^{-1}$  y grupos sulfato  $(\text{SO}_4)^{2-}$  a  $1.090$  y  $855 \text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de las nanopartículas de ZnO (Figura 2B) mostraron un pico a  $576 \text{ cm}^{-1}$ , característico del modo de estiramiento de ZnO. La fotografía por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 2C) mostró aglomerados de nanopartículas de ZnO con morfología esférica.



**Figura 2. Caracterización de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) sintetizadas.** (A) Espectros FTIR de sulfato de zinc (precursor). (B) Espectros FTIR de nanopartículas de ZnO. (C) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con un tamaño inferior a 200 nm.

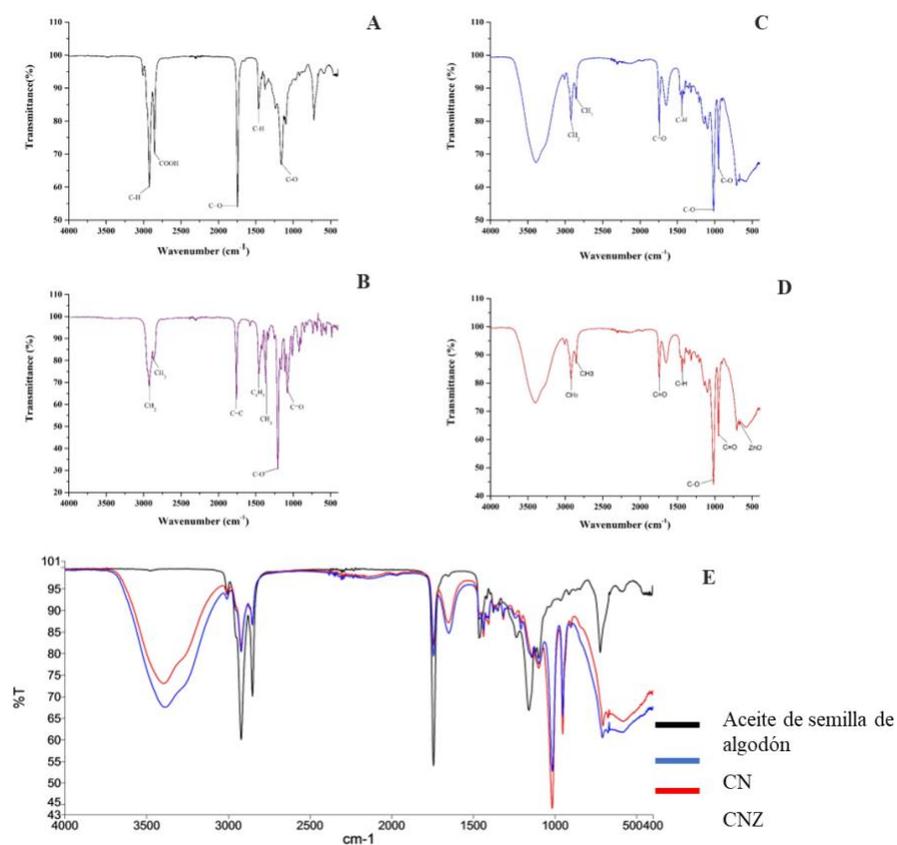
La Tabla 2. indica los principales grupos de nanopartículas de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y ZnO observados en los espectros FTIR.

**Tabla 2. Espectro FTIR de los principales grupos funcionales de sulfato de zinc y nanopartículas de ZnO.**

**Espectro FTIR de las nanopartículas de ZnO y su precursor.**

Grupo Funcional	Longitud de onda( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>Sulfato de Zinc</b>	
OH	3135
C=O	1506
$\text{SO}_4^{2-}$ (Grupo Sulfato)	1090 y 855
<b>Nanopartículas de ZnO</b>	
ZnO	576

Existe una diferencia cualitativa entre las dos muestras en el tamaño de las emulsiones, considerando que en la Figura 1 las emulsiones son más grandes en comparación con la Figura 2, además se observa un tamaño homogéneo en el caso de las emulsiones con CNZ, evidencia de una gran cantidad de residuos en la primera muestra probablemente debido a la ineficiencia del sistema de síntesis, lo que indica que en CNZ hay una mejora en la síntesis al agregar nanopartículas de zinc, probablemente debido a sus características hidrofílicas.



**Figura 3. Caracterización de nanoemulsión CN y CNZ.** (A) espectros FTIR de aceite de semilla de algodón, (B) espectros FTIR de  $\alpha$ -tocoferol, (C) espectros FTIR de CN, (D) espectros FTIR de CNZ y (E) espectros FTIR de nanoemulsiones CN, CNZ y aceite de semilla de algodón.

La Figura 3 muestra los espectros FTIR de nanoemulsiones y sus precursores. En aceite de semilla de algodón (Figura 3a) se observó el grupo C-H fuertemente estirado a  $2.922 \text{ cm}^{-1}$  y  $1,465 \text{ cm}^{-1}$ ; vibraciones de estiramiento del grupo carboxilo (COOH) a  $2856 \text{ cm}^{-1}$ ,

grupo cetona (C=O) a  $1744\text{ cm}^{-1}$  y grupo C-O a  $1156\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de  $\alpha$ -tocoferol (Figura 3b) mostraron picos en  $2927\text{ cm}^{-1}$  y  $2867\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , respectivamente. Se observaron picos a  $1758\text{ cm}^{-1}$  para un grupo alqueno (C=C), a  $1461\text{ cm}^{-1}$  para una flexión asimétrica de un grupo fenilo ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), y picos de flexión simétrica de metilo y metileno a  $1365\text{ cm}^{-1}$  y  $1203\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Los espectros de nanoemulsión CN FTIR mostraron la interacción de los grupos funcionales COOH, C=O y C-O del aceite de semilla de algodón con los grupos funcionales C=C y  $\text{C}_6\text{H}_5$  del  $\alpha$ -tocoferol (Figura 3c), además de la interacción de las nanopartículas de ZnO en la nanoemulsión de CNZ (Figura 3d).

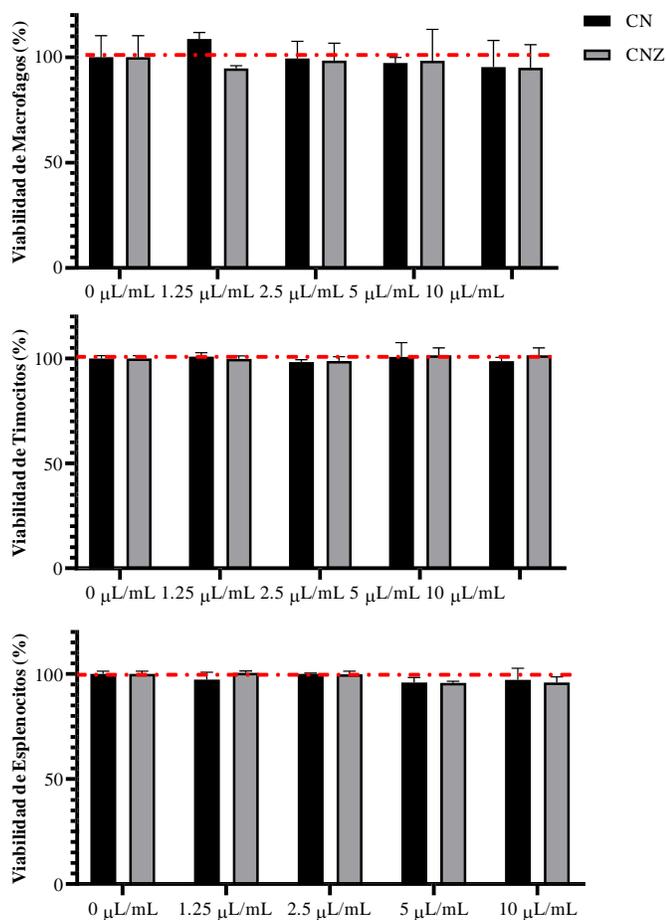
La Figura 3e representa la comparación de espectros FTIR de nanoemulsiones CN, CNZ y aceite de semilla de algodón, y la Tabla 3 muestra los principales grupos funcionales de los precursores.

**Tabla 3. Grupos funcionales de aceite de semilla de algodón,  $\alpha$ -tocoferol y nanoemulsión CN y CNZ.**

<b>Espectro FTIR de las nanoemulsiones</b>	
<b>Grupo Funcional</b>	<b>Logitud de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>Aceite de semilla de algodón</b>	
C-H	2922
COOH	2856
C=O	1744
C-H	1465
C-O	1156
<b><math>\alpha</math>- Tocoferol</b>	
CH <sub>2</sub>	2927
CH <sub>3</sub>	2867
C=C	1758
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1461
CH <sub>3</sub>	1365
C-O	1203
C=O	1076
<b>CN</b>	
Interacción con el grupo CH <sub>2</sub> ( $\alpha$ - Tocoferol)	2925
Interacción con el grupo CH <sub>3</sub> ( $\alpha$ - Tocoferol)	2852
Interacción con el grupo C=O (Aceite de semilla de algodón)	1745
Interacción con el grupo C-H (Aceite de semilla de algodón)	1436
Interacción con el grupo C-O ( $\alpha$ - Tocoferol)	1014
Interacción con el grupo C=O ( $\alpha$ - Tocoferol)	950
<b>CNZ</b>	
Interacción con el grupo CH <sub>2</sub> ( $\alpha$ - Tocoferol)	2921
Interacción con el grupo CH <sub>3</sub> ( $\alpha$ - Tocoferol)	2855
Interacción con el grupo C=O (Aceite de semilla de algodón)	1742
Interacción con el grupo C-H (Aceite de semilla de algodón)	1439
Interacción con el grupo C-O ( $\alpha$ - Tocoferol)	1018
Interacción con el grupo C=O ( $\alpha$ - Tocoferol)	951
ZnO	670

## 7.2.- Efecto de las nanoemulsiones sobre la función de las células inmunitarias

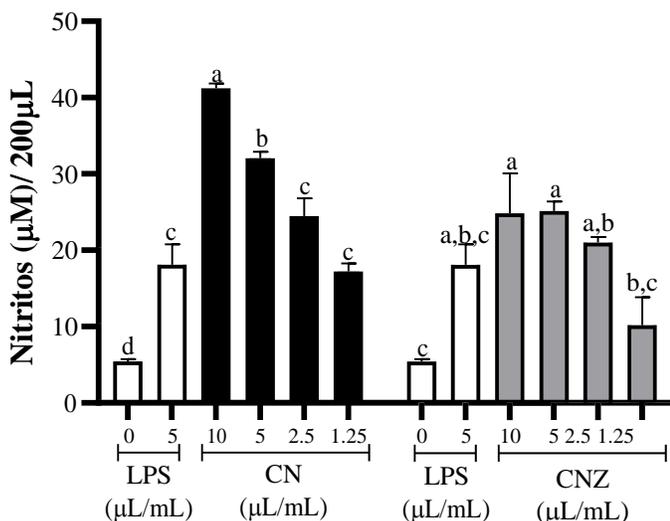
Las nanoemulsiones de CN y CNZ en concentraciones de 1.25 a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  no tuvieron efecto sobre la viabilidad de macrófagos ( $p=0.108$ ), esplenocitos ( $p= 0.413$ ) y timocitos ( $p= 0.923$ ) in vitro (Figura 4).



**Figura 4. Efecto de las nanoemulsiones sobre la viabilidad celular.** Las nanoemulsiones (CN y CNZ) a concentraciones de 1.25 a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  no afectaron la viabilidad de los macrófagos, esplenocitos y timocitos evaluados por MTT. Los valores se expresan como media  $\pm$  EE. El análisis se realizó mediante una prueba de ANOVA con una significación de  $P < 0.05$ .

Todas las dosis ensayadas de CN y CNZ indujeron la producción de ON de manera dependiente de la dosis en comparación con el control (0  $\mu\text{L}$ ). El CN indujo una

producción similar de ON a dosis de 1.25 ( $p= 0.998$ ) y 2.5 ( $p= 0.112$ )  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y mayor a dosis de 5 y 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p= 0.0001$ ) cuando se comparó con el control positivo (LPS). No se encontraron diferencias ( $p=0.935$ ) en la producción de óxido nítrico en todas las dosis probadas de CNZ en comparación con LPS (Figura 5).

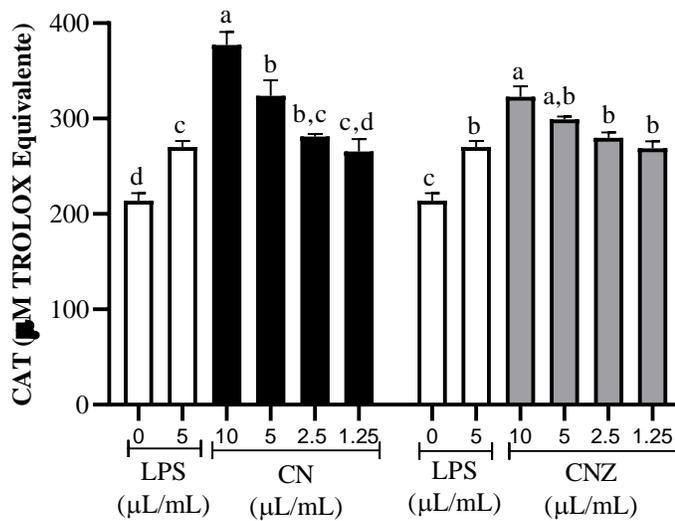


**Figura 5. Producción de RNS en macrófagos peritoneales murinos.** Se estimularon macrófagos peritoneales murinos con diferentes dosis de nanoemulsiones (CN y CNZ). Se utilizó LPS 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como control (+) y células sin tratamiento como Control (-). El RNS se determinó como nitrito. Se realizó un ANOVA ( $p < 0.05$ ) para comparar el efecto de las diferentes dosis. Para determinar la diferencia entre tratamientos, Tukey realizó una comparación de medias.

### 7.3.- Capacidad antioxidante

Todas las dosis de CN y CNZ probadas tuvieron la capacidad de inducir la producción de antioxidantes de manera dosis dependiente en comparación con el control ( $p= 0.0001$ ). Las dosis de 5-10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de CN indujeron una mayor producción de antioxidantes ( $p=0.0001$ ) que LPS y las dosis de 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p=0.979$ ) / 1.25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p=1.0$ ) indujeron niveles de producción similares. El tratamiento con CNZ a dosis de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p=0.002$ ) indujo una mayor producción total de antioxidantes que LPS, pero a dosis menores de 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p= 0.115$ ), 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p=0.925$ ) y 1.25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $p= 1.0$ ) no se encontró diferencia (Figura 6). Existe una fuerte correlación entre la producción de óxido nítrico y

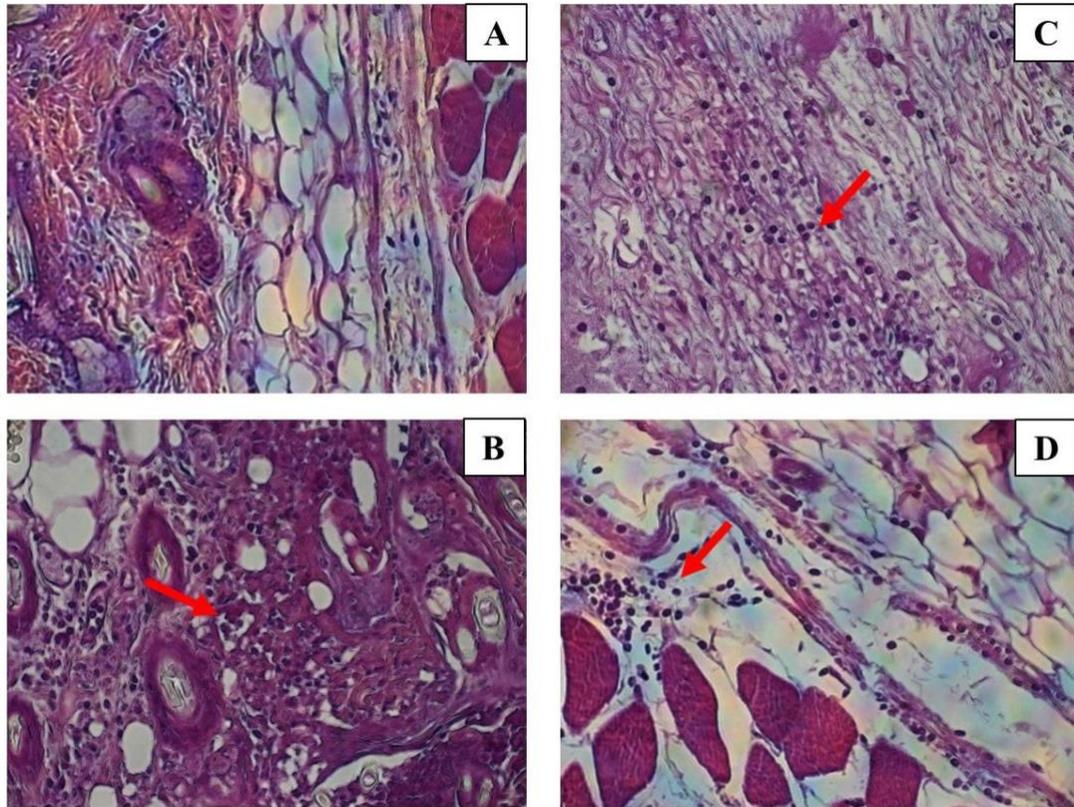
antioxidantes en los macrófagos tratados con CN ( $r= 0.905$ ,  $p= 0.0001$ ) como en los tratados con CNZ ( $r= 0.804$ ,  $p= 0.002$ ).



**Figura 6. Capacidad antioxidante total (CAT) en macrófagos peritoneales murinos.** Macrófagos peritoneales murinos estimulados con diferentes dosis de nanoemulsiones (CN y CNZ). Se utilizó LPS 5 µg/ml como control (+) y células sin tratamiento como Control (-). Se realizó un ANOVA ( $p < 0.05$ ) para comparar el efecto de las diferentes dosis. Para determinar la diferencia entre tratamientos, Tukey realizó una comparación de medias.

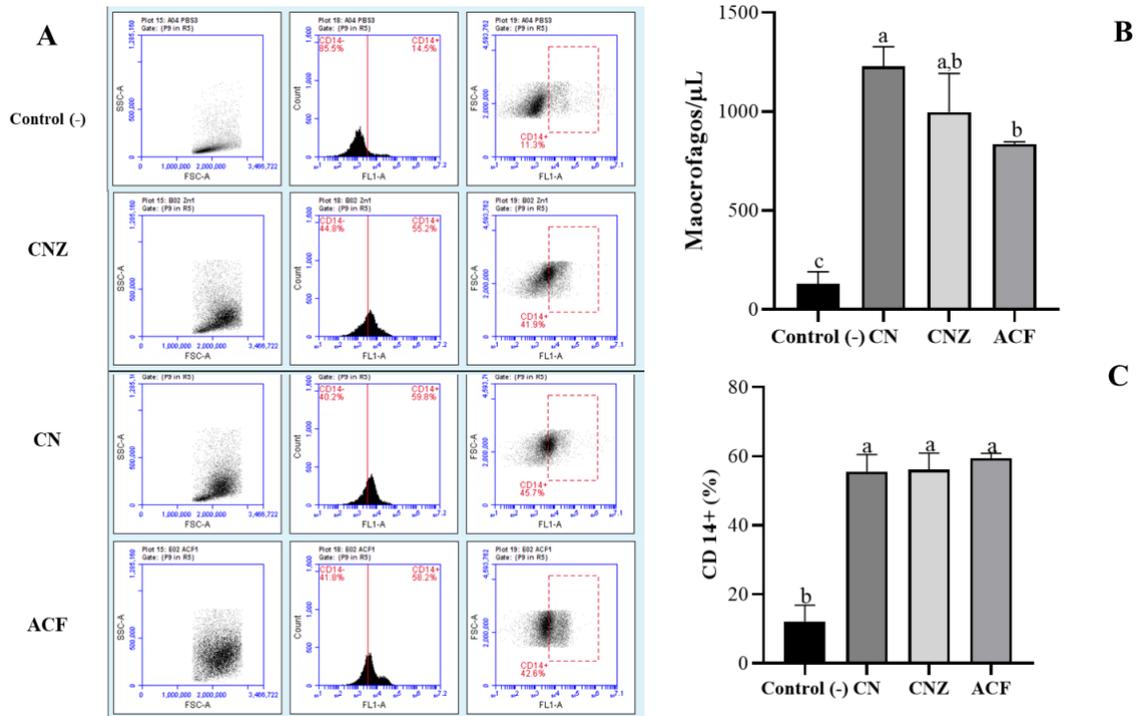
#### 7.4.- Reclutamiento leucocitario

La evaluación histológica del tejido en el sitio de inoculación (tejido subcutáneo en el área femoral) con CN o CNZ con ovoalbúmina mostró inflamación con mayor infiltración de leucocitos en comparación con ACF (Figura 7).



**Figura 7. Migración de leucocitos al sitio de inoculación de las nanoemulsiones.** Imágenes histológicas teñidas con H&E a 40X de la s.c. sitio de inoculación. de tratamientos A) Control sin adyuvante, B) ACF, C) CN y D) CNZ usando Ovoalbúmina como antígeno. Se observa inflamación e infiltración leucocitaria (↔) en los tratamientos B) ACF, C) CN y D) CNZ.

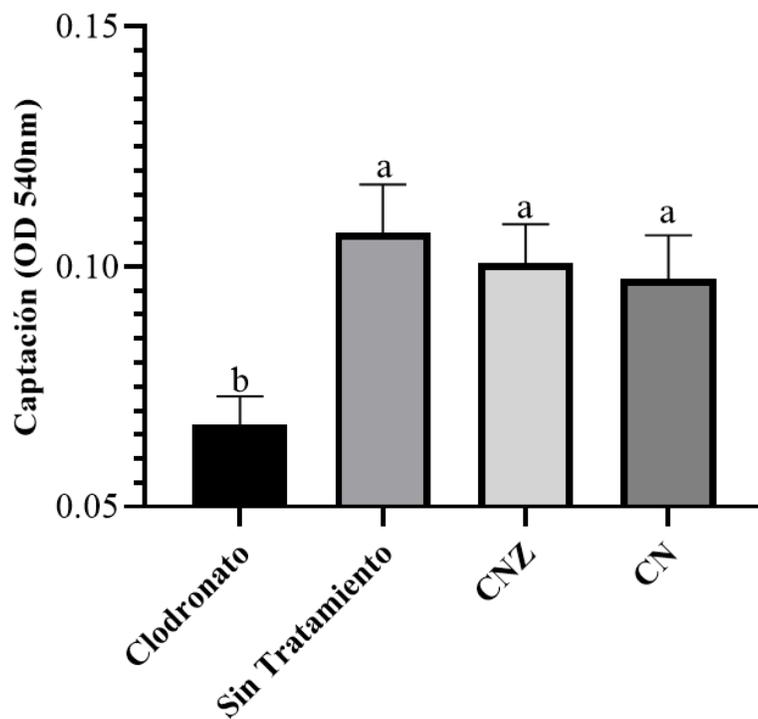
La inoculación intraperitoneal con CN, nanoemulsión de CNZ y ACF mostró un alto reclutamiento de células intraperitoneales totales con fenotipo CD14+, después de 24 h de inoculación en comparación con el control ( $p=0.0001$ ), sin embargo, no se encontró diferencia entre CN, CNZ y ACF (Figura 8).



**Figura 8. Cuantificación de macrófagos reclutados al sitio de inoculación.** Los macrófagos intraperitoneales reclutados se determinaron mediante citometría de flujo. (A) Selección de puerta (población de macrófagos) por tamaño y granularidad, y lectura por el canal FL 1 del receptor CD14+. (B) Estimación de la cantidad (macrófagos/ $\mu$ L) por tamaño y granularidad en macrófagos peritoneales murinos estimulados in situ (en peritoneo). (C) Expresión de CD14+ en macrófagos peritoneales murinos estimulados in situ durante 24 h. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA, determinando diferencias ( $p < 0.05$ ) mediante un análisis de Tukey.

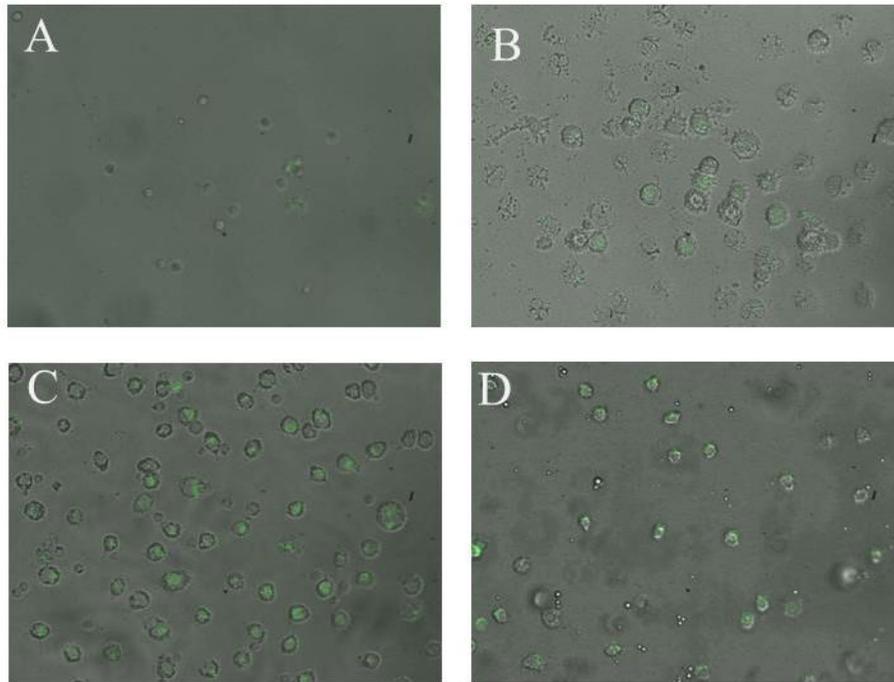
### 7.5.- Captación celular y fagocitosis de macrófagos

Las nanoemulsiones de CN ( $p = 0.158$ ) y CNZ ( $p = 0.495$ ) evaluadas mediante el ensayo de rojo neutro no afectaron la actividad de absorción de los macrófagos en comparación con los macrófagos no tratados (Figura 9).



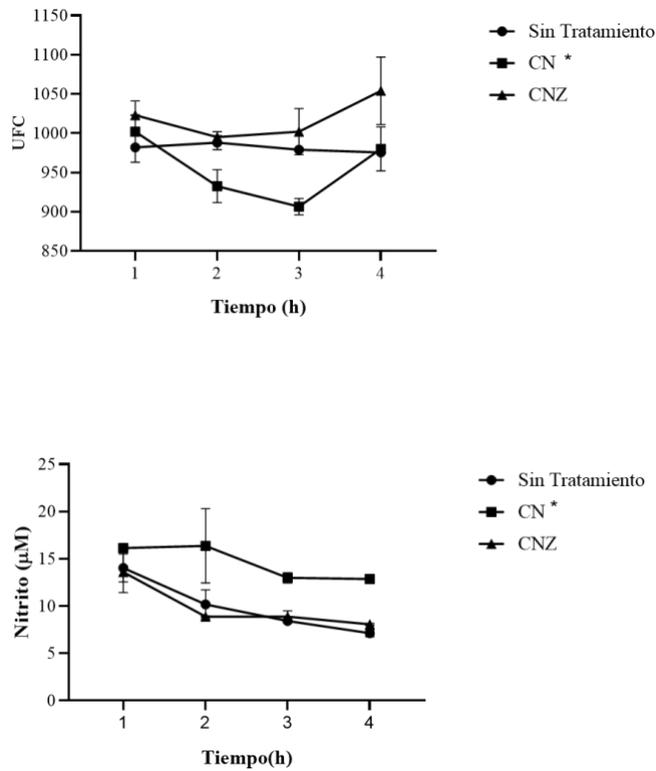
**Figura 9. Actividad de captación de macrófagos estimulados con las nanoemulsiones.** Los macrófagos se estimularon con las nanoemulsiones CN, CNZ o control negativo durante 2 h. Se utilizó clodronato disódico (0.6 mg/mL) como no fagocítico (Control -). Se realizó un ANOVA ( $p < 0.05$ ) para comparar el efecto de los diferentes tratamientos. Para determinar la diferencia entre tratamientos, Tukey realizó una comparación de medias.

Sin embargo, en el ensayo de macrófagos *C.albicans* -fagocitosis, las nanoemulsiones de CN y CNZ aumentaron la capacidad fagocitaria con respecto a los macrófagos no tratados (Figura 10).



**Figura 10. Evaluación cualitativa de la actividad fagocítica de los macrófagos.** La actividad fagocítica se evaluó mediante microscopía de fluorescencia 100X en macrófagos tratados con a) clodronato disódico (0.6 mg/mL) como (Control -) de no fagocitosis, b) sin tratamiento, c) CN (10 µL/mL) y d) CNZ (10 µL/mL).

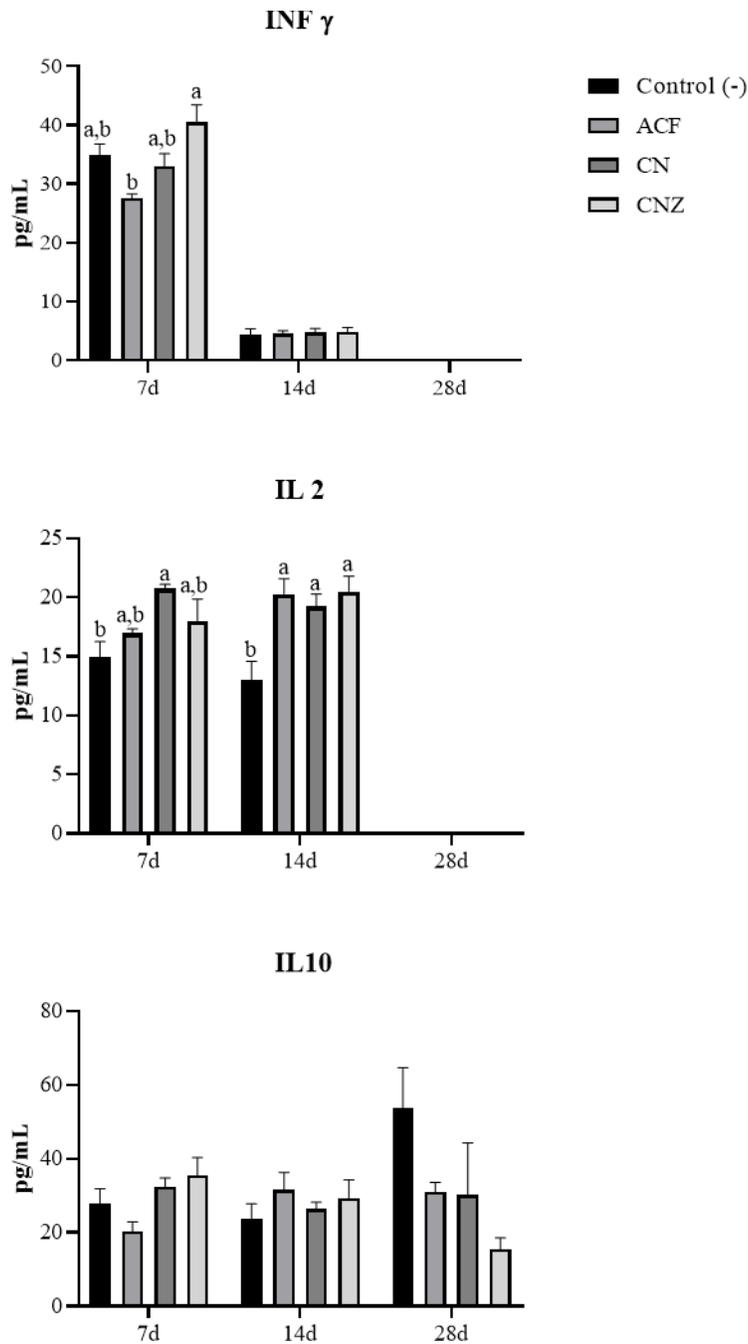
A continuación, la evaluación de las unidades formadoras de colonias residuales indicó que solo CN disminuyó significativamente ( $p=0.004$ ) este valor respecto a CNZ., pero a las 4 h. no se encontró diferencia con respecto a los macrófagos no tratados (Figura 11a). Por otro lado, solo la nanoemulsión de CN incrementó ( $p=0.002$ ) la producción de óxido nítrico en todos los tiempos evaluados (Figura 11b).



**Figura 11. Actividad fagocítica de macrófagos co-cultivados con *C. albicans*.** Los co-cultivados fueron tratados con nanoemulsiones (CN o CNZ). (A) Unidades formadoras de colonias residuales (UFC) después de diferentes tiempos en co-cultivo. (B) producción de óxido de nitrito (ON) medida en forma de nitrito inducida por el cocultivo. Los valores se expresan como la media ( $\pm$  EE). Se realizó un ANOVA ( $p < 0.05$ ) para comparar el efecto de las diferentes dosis. Para determinar la diferencia entre tratamientos, Tukey realizó una comparación de medias.

## 7.6.- Evaluación del perfil de citocinas

En comparación con ACF el día 7 ( $p=0.0001$ ), esta diferencia no se observó el día 14 ( $p=1.0$ ) (Figura 12). Se observó una mayor secreción de IL-2 a los días 7 ( $p=0.027$ ) y 14 ( $p=0.007$ ), estimulados con las nanoemulsiones CN y CNZ (Figura 12). Sin embargo, la IL-10 no se vio afectada (Figura 12).



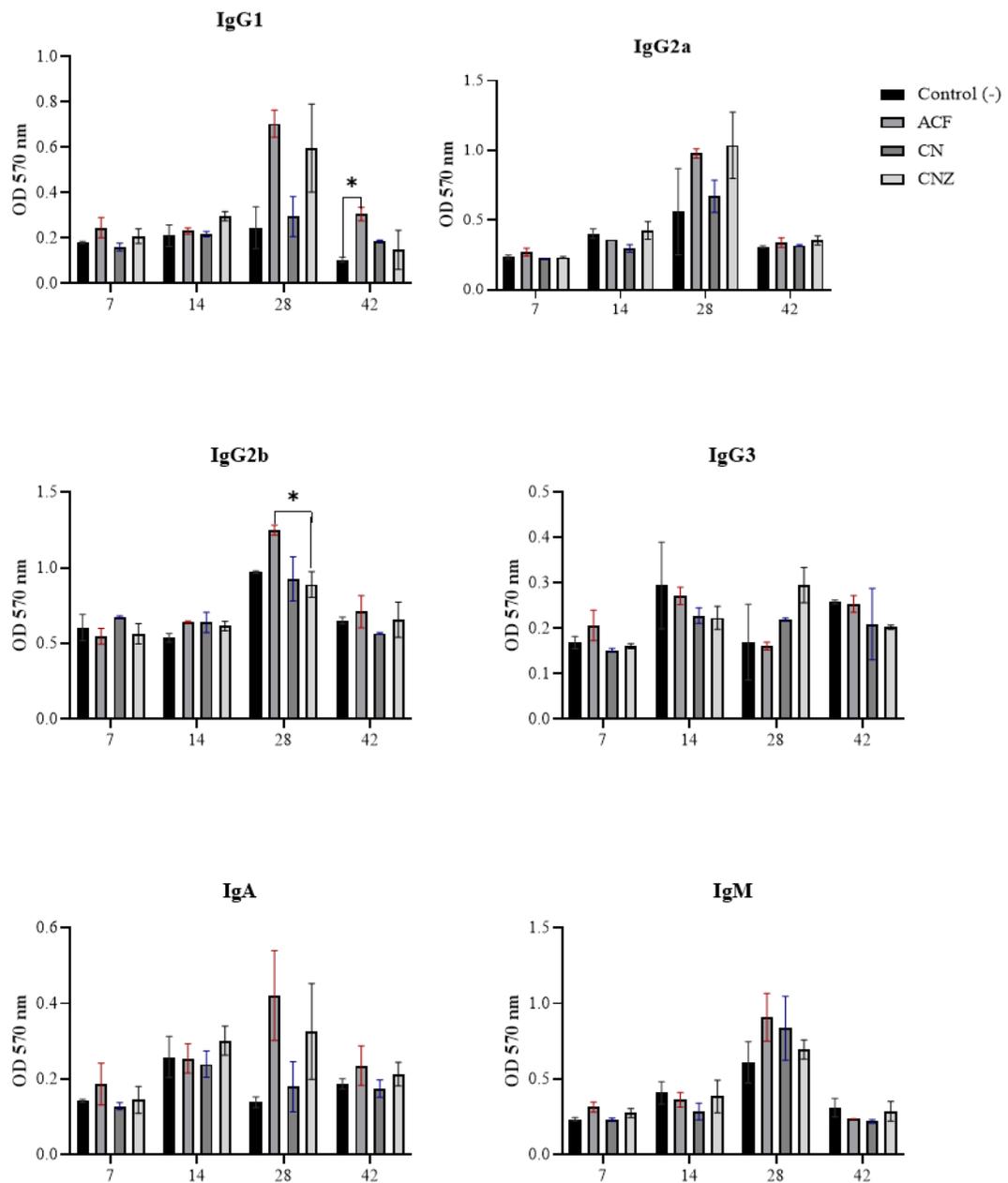
**Figura 12. Efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de citoquinas en un modelo murino.**

Niveles séricos (Pg/mL) de citocinas (INF $\gamma$ , IL2 e IL 10) en ratones Balb/C inoculados s.c. con los 50  $\mu$ l de nanoemulsiones (CN y CNZ), control positivo AFC o control negativo un antígeno (ovoalbúmina sin adyuvante) los días 0 y 14 del protocolo. A los 7, 14 y 28 días después de la primera inoculación. En todos

los tratamientos se utilizó ovoalbúmina (OVA) como antígeno. Los valores se expresan como media  $\pm$  EE. Cuando se observó una diferencia ( $p > 0.05$ ), se realizó una prueba de Tukey para determinar diferencias.

### **7.7.- Evaluación de isotipos de conmutación**

Las nanoemulsiones de CN y CNZ no afectaron la producción de IgG1. Sin embargo, el ACF estimuló una mayor producción de IgG1 el día 42 en comparación con los ratones no tratados ( $p=0.044$ ) (Figura 13).



### Días post inmunización

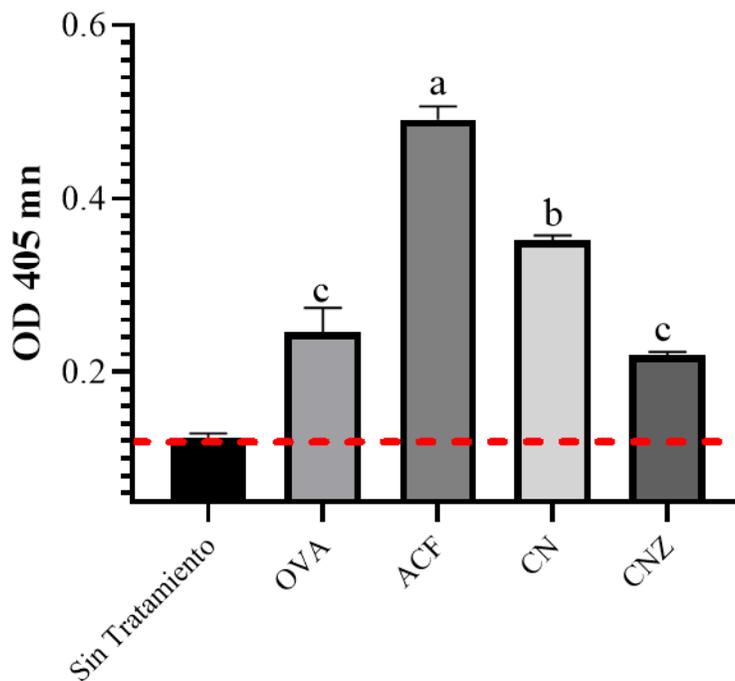
**Figura 13. Efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de isotipos de anticuerpos en un modelo murino.** Los Isotipos de anticuerpos (niveles séricos de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM) en ratones Balb/C inoculados s.c. con 50µl de nanoemulsiones (CN y CNZ), control positivo (FCA) o control negativo (ovoalbúmina sin adyuvante) los días 0 y 14 del protocolo. En todos los tratamientos se utilizó ovoalbúmina

(OVA) como antígeno. Los valores se expresan como media  $\pm$  EE. Cuando se observó una diferencia ( $p > 0.05$ ), se realizó una prueba de Tukey para determinar diferencias.

Las nanoemulsiones de CN y CNZ no afectaron la producción de IgG2b en todos los tiempos evaluados, solo se encontró diferencia significativa ( $p= 0.044$ ) con FCA al día 28 (Figura 13). Por último, las nanoemulsiones no afectaron la producción de isotipos de anticuerpos (IgG1, IgG2a, IgG3, IgA e IgM) en los días 7, 14, 28 y 42.

### 7.8.- IgG específica anti-OVA

La nanoemulsión de CN indujo una producción significativa de IgG anti-OVA, pero menor que ACF. La nanoemulsión de CNZ no afectó esto, en comparación con el tratamiento con OVA ( $p= 0.0001$ ) (Figura 14).



**Figura 14. Efecto de las nanoemulsiones sobre la producción de anticuerpos específicos en un modelo murino.** Anticuerpos específicos contra OVA (IgG) 45 días después de la última inmunización (antígeno + adyuvante). Los ratones se expusieron al antígeno (OVA) el día 42 después de la vacunación. Los valores

se expresan como media  $\pm$  EE. Cuando se observó una diferencia ( $p > 0.05$ ), se realizó una prueba de Tukey para determinar diferencias.

## 8.- DISCUSIÓN

El término “nanoemulsión” se refiere a una dispersión fina de aceite/agua o agua/aceite con un rango de tamaño de gota de 20 a 600 nm que puede actuar como transportador de moléculas (Jaiswal *et al.*, 2014). El tamaño de partícula obtenido de la formulación CN (543.1 nm) y CNZ (320 nm) permite clasificarlas como nanoemulsiones. Además, el potencial zeta (-26.6 mV para CN y -28.1 mV para CNZ) y los valores de PDI (0.074 para CN y 0.449 para CNZ) indican una emulsión monodispersa con una mayor fuerza repulsiva de moléculas lo que aumenta su estabilidad (Malik *et al.*, 2016).

Los resultados de los espectros FTIR confirmaron la síntesis de nanopartículas de ZnO con un pico a 576  $\text{cm}^{-1}$ , característico del modo de estiramiento ZnO (Del Buono *et al.*, 2022; Nagaraju *et al.*, 2017), y las imágenes por SEM demostraron aglomerados con una morfología esférica (Vasile *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2016).

De manera similar, los espectros FTIR confirmaron la naturaleza de los precursores del aceite de semilla de algodón (carboxilo a 2856  $\text{cm}^{-1}$  y cetona a 1744  $\text{cm}^{-1}$ ) (Bajaj *et al.*, 2015) y  $\alpha$ -tocoferol (alqueno a 1758  $\text{cm}^{-1}$ , fenilo en 1461  $\text{cm}^{-1}$ , metilo en 1365  $\text{cm}^{-1}$  y metileno en 1203  $\text{cm}^{-1}$ ) (Lucarini *et al.*, 2020).

En nuestro estudio la estimulación con nanoemulsiones de CN y CNZ podría activar la producción de óxido nítrico en macrófagos, esta molécula se utiliza como marcador de activación de macrófagos. Se ha demostrado que los macrófagos desafiantes con antígenos, adyuvantes o vacunas responden a través de PRR, la producción de óxido nítrico y su capacidad para inducir la fagocitosis mediada por el receptor FC aumenta la respuesta inmune (Van den Biggelaar, *et al.*, 2020). La producción de ON inducida por las nanoemulsiones de CNZ y CN trae resultados interesantes, ya que las especies oxígeno reactiva (ROS) intermediarios que tienen una gran influencia en las respuestas inmunes al activar o inhibir la acción de ciertos factores de transcripción o citoquinas y al modificar vías de muerte celular programada (Arruda, *et al.*, 2004).

Por esta razón, se estudió la capacidad de producción total de antioxidantes, determinando que ambas nanoemulsiones tienen la capacidad de inducir niveles más altos de antioxidantes, lo que se puede correlacionar con la promoción de la biogénesis

mitocondrial aumentando la expresión génica de enzimas antioxidantes, disminuyendo la exacerbación de citoquinas proinflamatorias. y bloqueando o eliminando la respuesta excesiva de ROS y RSN, que en cantidades más altas pueden afectar una respuesta inmune saludable (Maldonado, *et al.*, 2021). Es importante mencionar que el aceite de semilla de algodón puede contener antioxidantes que pueden actuar como fuentes antioxidantes exógenas, sin embargo, es posible que los antioxidantes puedan sintetizarse a través de diferentes mecanismos intracelulares.

Los resultados, como la infiltración de leucocitos después de la inyección subcutánea y el aumento del reclutamiento de células intraperitoneales, predominantemente CD14+ después de la inyección de nanoemulsiones intraperitoneales, son similares a los de MF59, que es una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno (4.3 %) en tampón de ácido cítrico con tensioactivos no iónicos estabilizadores Tween 80 (0.5%) y Span 85 (0.5%) utilizados como adyuvantes en vacunas (Ko y Kang, 2018). Siendo el MF59 capaz de crear un entorno inmunocompetente en el lugar de la inyección mediante el reclutamiento de células inmunitarias como neutrófilos, macrófagos, granulocitos, monocitos y otras células inmunitarias que captan el antígeno (Shah *et al.*, 2015). Además, la CN y la CNZ promueven en los macrófagos la capacidad fagocítica, resultados similares se demuestran con MF59, donde los antígenos y MF59 son fagocitados por neutrófilos y monocitos, y luego por las células dendríticas (DC) y las células B que luego se trasladan a los ganglios linfáticos de drenaje (Ko y Kang, 2018). La nanoemulsión de CN indujo la producción de óxido nítrico, probablemente CFA en ratones donde se observó una alta producción de óxido nítrico en suero (Khan *et al.*, 2001). El óxido nítrico se considera una molécula dual en relación con su beneficio sobre el sistema inmunológico; a baja concentración, juega un papel saludable en el sistema inmunológico, pero a niveles más altos se induce la inmunosupresión (Shreshtha, *et al.*, 2018). Este estudio no está diseñado para determinar el papel del óxido nítrico; sin embargo, por los datos obtenidos, asumimos que la nanoemulsión de CN o CNZ puede activar respuestas inmunitarias saludables.

Hay estudios que informan que el IFN- $\gamma$  derivado de células inmunitarias innatas mejora las respuestas Th1 antiparasitarias protectoras y la protección contra la malaria después del uso del adyuvante AS01 (que contiene dos inmunoestimulantes [ligando TLR4 3-O-

desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL) y la saponina purificada QS-21] en una formulación a base de liposomas) o ASO3 (que contiene  $\alpha$ -tocoferol y escualeno en una emulsión de aceite en agua (O/W)). Además, la producción de IFN- $\gamma$  podría estar mediada por la IL-2 producida por las células T de memoria efectoras inducidas por la vacuna (Burny, *et al.*, 2017). En nuestro estudio se encontró aumento en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 con el tratamiento de nanoemulsiones de CN o CNZ.

Solo la nanoemulsión de CN indujo una producción significativa de IgG específica de OVA, sin embargo, no se observó cambio de isotipo de anticuerpos IgG. Esto puede sugerir la falta de dependencia de las células T CD4+ (Ko y Kang, 2018). Sin embargo, para definir estos resultados es necesario el uso de nanoemulsión de CN combinada con OVA en ratones deficientes en CD4+, y establecer la dependencia de Th1 o Th2.

La detección de IgG en el día 42 puede sugerir una inmunidad adaptativa madura inducida por la nanoemulsión de CN. La causa de encontrar una concentración más alta de IgG inducida por CFA que la nanoemulsión de CN puede deberse a la formación de depósitos por parte de CFA en el sitio de inyección, lo que induce la formación tardía del centro germinal, pero promueve respuestas de anticuerpos más altas que un adyuvante que no induce depósitos. como la emulsión de escualeno como MF59® y AddaVax® después de una sola inmunización (Pedersen, *et al.*, 2020). Estos resultados indican que la nanoemulsión de CN es un adyuvante que no induce depósito.

Nuestra formulación tiene mecanismos de acción similares a la emulsión de escualeno como MF59® y AddaVax®. Los aceites como el de oliva, salvado de arroz, maíz, cacahuete, colza, girasol y semilla de algodón contienen de 0.1 a 4 g/kg (He y Corke, 2003) o de 1.3 a 3.1 g/kg de escualeno (Kalogeropoulos y Andrikopoulos, 2004). Los adyuvantes comerciales como MF59® y AS03® contienen 0.0975 g y 0.1069 g por dosis, respectivamente (Shah *et al.*, 2015). Si se comparan las dosis de escualeno de los adyuvantes comerciales con el contenido máximo de escualeno contenido en los aceites vegetales, es necesario utilizar 2.43–2.67 g. de aceite por dosis. Esta dosis es perfectamente factible para animales de granja y humanos. Los aceites vegetales pueden ser adyuvantes alternativos a la emulsión a base de escualeno para la vacunación, debido

a que estos contienen una gran variedad de sustancias activas que pueden afectar el sistema inmunológico (Fox *et al.*, 2011).

## **9.- CONCLUSIONES**

En este estudio se logró sintetizar dos nuevas nanoemulsiones con capacidad adyuvante y antioxidante, capaces de generar infiltración leucocitaria y aumentar la producción de citocinas y anticuerpos. Por otro lado, es necesario realizar evaluaciones para determinar su efecto sobre el sistema inmunológico con diversos antígenos y especies.

## **10.- PERSPECTIVAS**

Es importante considerar enfocar la investigación de emulsiones basadas en aceite vegetal como adyuvantes para mejorar la respuesta a tratamientos profilácticos o curativos para distintas enfermedades causadas por patógenos o cáncer

Por los resultados obtenidos en el presente estudio es pertinente considerar evaluar las nanoemulsiones formuladas con tintitos antígenos, así como en modelos animales de mayor complejidad.

De igual forma, enfocar las investigaciones en dilucidar el mecanismo de acción de estas nanoemulsiones para poder proponer las modificaciones pertinentes para mejorar sus efectos.

## 11.- REFERENCES

- Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. 2004. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: Involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-KB. *The Journal of Immunology*, 173: 2023–2030 DOI: 10.4049/jimmunol.173.3.2023
- Bajaj SD, Tekade PV, Manoja K. 2015. Soxhlet Extraction and FTIR Characterization of Biodiesel from Oil Seeds. *International Journal of Researches in Biosciences Agriculture and Technology* 210-216.
- Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR, Shi J. 2018. Adjuvants for animal vaccines. *Viral immunology*, 31, 11-22 DOI: 10.1089/vim.2017.0049
- Burny W, Callegaro A, Bechtold V, Clement F, Delhay S, Fissette L, Janssens M, Leroux-Roels G, Marchant A, van den Berg RA, Garçon N, van der Most R, Didierlaurent A M. 2017. Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. *Frontiers in Immunology* 14: 8-943 DOI: 10.3389/fimmu.2017.00943
- Dardenne M. 2002. Zinc and immune function. *European journal of clinical nutrition* 56: S20-S23 DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601479
- Del Buono D, Luzi F, Tolisano C, Puglia D, Di Michele A. 2022. Synthesis of a lignin/zinc oxide hybrid nanoparticles system and its application by nano-priming in Maize. *Nanomaterials* 12: 568 DOI: 10.3390/nano12030568
- El-Mallah MH, El-Shami SM, Hassanien MMM, Abdel-Razek AG. 2011. Effect of chemical refining steps on the minor and major components of cottonseed oil. *Agriculture and Biology Journal of North America* 2: 341-349.
- Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. 2011. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine* 29: 9563–9572 DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.089

- Grilo EC, Costa PN, Gurgel CSS, Beserra AFDL, Almeida FNDS, Dimenstein R. 2014. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology* 34: 379-385 DOI: 10.1590/S0101-20612014005000031
- He HP, Corke H. 2003. Oil and Squalene in Amaranth Grain and Leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7913–7920 DOI: 10.1021/jf030489q
- Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. 2014. Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* 5: 123–127 DOI: 10.1007/s13205-014-0214-0
- Kahn DA, Archer DC, Gold DP, Kelly CJ. 2001. Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine* 193: 1261–1268 DOI: 10.1084/jem.193.11.1261
- Kalogeropoulos N, Andrikopoulos, NK. 2004. Squalene in oils and fats from domestic and commercial fryings of potatoes. *International journal of food sciences and nutrition* 55: 125-129 DOI: 10.1080/09637480410001666531
- Ko EJ, Kang SM. 2018. Immunology and efficacy of mf59-adjuvanted vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 14: 3041–3045 DOI: 10.1080/21645515.2018.1495301
- Lee GY, Han SN. 2018. The role of vitamin E in immunity. *Nutrients* 10: 1614 DOI: 10.3390/nu10111614
- Lucarini M, Zuorro A, Di Lena G, Lavecchia R, Durazzo A, Benedetti B, Lombardi-Boccia G. 2020. Sustainable management of secondary raw materials from the Marine Food-Chain: A case-study perspective. *Sustainability* 12: 8997 DOI: 10.3390/su12218997
- Maldonado E, Rojas DA, Urbina F, Solari A. 2021. The use of antioxidants as potential co-adjuvants to treat chronic chagas disease. *Antioxidants* 10: 1022 DOI: 10.3390/antiox10071022

- Malik P, Ameta RK, Singh M. 2016. Physicochemical study of curcumin in oil driven nanoemulsions with surfactants. *Journal of Molecular Liquids* 220: 604–622 DOI: 10.1016/j.molliq.2016.04.126
- Nagaraju G, Prashanth SA, Shastri M, Yathish KV, Anupama C, Rangappa D. 2017. Electrochemical heavy metal detection, photocatalytic, photoluminescence, biodiesel production and antibacterial activities of Ag–ZnO nanomaterial. *Materials Research Bulletin* 94: 54-63. DOI: 10.1016/j.materresbull.2017.05.043
- Pedersen GK, Wørzner K, Andersen P, Christensen D. 2020. Vaccine adjuvants differentially affect kinetics of antibody and germinal center responses. *Frontiers in Immunology* 11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.579761
- Shah RR, Brito LA, O’Hagan DT, Amiji MM. 2015. Emulsions as Vaccine Adjuvants. In: Foged C, Rades T, Perrie Y, Hook S. *Subunit Vaccine Delivery. Advances in Delivery Science and Technology*. Springer, New York, NY DOI: 10.1007/978-1-4939-1417-3\_4
- Shah SN, Ali SI, Ali SR, Naeem M, Bibi Y, Ali SR, Raza SM, Khan Y, Sherwani SK. 2016. Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles for Antibacterial Applications. *Journal of Basic and Applied Sciences* 12: 205–210 DOI: 10.6000/1927-5129.2016.12.31
- Shahbazi S, Bolhassani A. 2016. Immunostimulants: types and functions. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases* 4: 45-51.
- Shreshtha S, Sharma P, Kumar P, Sharma R, Singh SP. 2018. Nitric oxide: It’s role in immunity. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* DOI: 10.7860/jcdr/2018/31817.11764
- Thommen Maciel Sartor I, Moleta Colodel E, Albuquerque D. 2011. Adjuvant activity of rice oil on the immune response to ovalbumin. *Vaccinmonitor* 20: 1-5

Van den Biggelaar R, van Eden W, Rutten V, Jansen C. 2020. Nitric oxide production and Fc receptor-mediated phagocytosis as functional readouts of macrophage activity upon stimulation with inactivated poultry vaccines in vitro. *Vaccines* 8: 332 DOI: 10.3390/vaccines8020332

Vasile OR, Serdaru I, Andronescu E, Trușcă R, Surdu VA, Oprea O, Ilie A, Vasile BS. 2015. Influence of the size and the morphology of zno nanoparticles on cell viability. *Comptes Rendus Chimie* 18: 1335–1343 DOI: 10.1016/j.crci.2015.08.005