



**MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN QUÍMICA APLICADA**

---

**MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE  
MÁSTER**

---

**CURSO ACADÉMICO:**

**CONVOCATORIA  
(fecha):**

**UNIVERSIDAD:**

**TÍTULO DEL TRABAJO:**

Encapsulación de vacuna frente al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico)

**ESTUDIANTE:**

Milagros Buffa

**TUTOR(es):**

Juan José Giner Casares, Jaime Gómez Laguna

**Fecha:**

**VºBº Tutor(es)**

Fdo: Juan Jose Giner Casares,  
Jaime Gomez Laguna

**El Estudiante**

Fdo: Milagros Buffa





## RESUMEN

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) afecta a las granjas de producción porcina a nivel mundial, causando anorexia, fiebre y dificultad respiratoria en cerdos en crecimiento; mientras que en cerdas adultas se caracteriza por la disfunción reproductiva y abortos. Las vacunas comerciales disponibles actualmente sólo son capaces de proporcionar una protección parcial frente al virus del PRRS (PRRSV) debido a su capacidad de mutación y la amplia variedad de cepas existente. Por ello se ha planteado la administración de vacunas encapsuladas en nanopartículas (NPs) que puedan favorecer su aplicación por vía mucosal consiguiendo así potenciar la respuesta inmune en el hospedador. El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un copolímero ampliamente utilizado para la síntesis NPs poliméricas con aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. En este trabajo se encapsuló una vacuna viva atenuada frente al PRRSV en NPs de PLGA mediante el método de coprecipitación. Las NPs fueron caracterizadas por diversas técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM), dispersión de luz dinámica (DLS) y espectroscopía ultravioleta-visible. Debido a que la célula diana del virus es el macrófago alveolar pulmonar, para realizar los experimentos *in vitro* se aislaron monocitos de sangre periférica para su posterior diferenciación a macrófagos. Estas células fueron infectadas con NPs y con virus vacunal. Los resultados mostraron una eficiencia de encapsulación del virus cercana al 70%. Se obtuvieron NPs de tamaño en el rango de 100 a 450 nm que permitieron la encapsulación del virus y su posterior fagocitosis por los macrófagos. Aunque se confirmó que las NPs eran exitosamente fagocitadas por los macrófagos derivados de monocitos utilizando NPs cargadas con el colorante Rojo de Nilo, mediante citometría de flujo se observó un porcentaje de infección bajo a partir de las NPs cargadas con el virus vacunal, probablemente asociado al uso de un virus atenuado. Asimismo, se caracterizaron las propiedades citotóxicas de las NPs en la aplicación en cultivo celular.



## ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an economically important viral disease for the pig industry worldwide. In growing pigs it causes anorexia, fever, respiratory distress, while in pregnant sows it is characterized by reproductive dysfunction and abortions. Current vaccines fail to completely prevent PRRS outbreaks since new variants are constantly emerging. Microencapsulation of vaccine agents is seen as an attractive alternative as it allows its mucosal administration as well as to enhance the host immune response. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a copolymer widely used for the synthesis of polymeric NPs with biomedical applications as it is biocompatible and biodegradable. In the present work, we entrapped attenuated PRRSV within PLGA nanoparticles by the coprecipitation technique. The NPs were characterized by a number of techniques, including scanning electron microscope (SEM), dynamic light scattering (DLS) and ultraviolet-visible spectroscopy. For *in vitro* studies, monocytes were isolated from porcine peripheral blood for further differentiation into macrophages. The vaccine virus, either encapsulated in NPs or unencapsulated, was inoculated into macrophages. The results showed that the entrapment efficiency of PRRSV loaded NPs was about 70% with NPs presenting a size that allows the virus to be encapsulated and phagocytosed by macrophages. Although NPs were confirmed to be successfully phagocytosed by using Nile Red dye loaded NPs, a low infection rate was observed by flow cytometry using vaccine virus loaded NPs, probably associated to the use of an attenuated virus. Furthermore, toxicity of the NPs was detected in cell culture.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de figuras .....	1
Índice de tablas .....	3
1. Introducción.....	4
1.1 Nanociencia .....	4
1.2 Nanopartículas poliméricas .....	5
1.2.1 Nanopartículas de PLGA.....	7
1.3 Virus .....	7
1.3.1 Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV).....	9
1.4 Vacunas .....	11
1.4.1 Vacunas veterinarias.....	12
1.4.2 Vacunas frente al PRRSV.....	13
1.5 Nanoencapsulación como estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas frente al PRRSV.....	15
2. Objetivos.....	16
3. Materiales y Métodos .....	16
3.1 Reactivos .....	16
3.2 Técnicas.....	18
3.2.1 DLS.....	18
3.2.2 Espectroscopía de Absorción UV-Visible.....	18
3.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	18
3.2.4 Clasificación celular activada magnéticamente (MACS).....	18
3.2.5 Citometría de flujo.....	19
3.2.6 RT-qPCR.....	19
3.3 Métodos .....	20



3.3.1 Síntesis de nanopartículas por emulsión simple-evaporación del disolvente.....	20
3.3.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	20
3.3.3 Perfil de difusión del contenido de las nanopartículas .....	21
3.3.4 Aislamiento de monocitos y diferenciación a macrófagos.....	21
3.3.5 Inoculación de macrófagos.....	25
3.3.6 Análisis por citometría de flujo .....	26
3.3.7 Análisis de toxicidad del PLGA .....	27
4. Resultados y discusión.....	28
4.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas .....	28
4.2 Aislamiento de monocitos y diferenciación a macrófagos.....	35
4.4 Análisis de carga viral en NPs mediante RT-qPCR .....	37
4.5 Análisis por citometría de flujo de macrófagos inoculados .....	39
4.5.1 Estrategia de portales ( <i>gating</i> ).....	39
4.5.2 Selección del anticuerpo primario frente a la proteína N del virus .....	40
4.5.3 Determinación de macrófagos y virus por citometría de flujo .....	41
4.5.4 Análisis de toxicidad de las NPs por citometría de flujo.....	44
5. Conclusiones.....	47
5. Conclusions .....	48
6. Bibliografía.....	49



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representación de la nanoescala con elementos biológicos y químicos adaptada de Apolinário, Cassone-Salata, Bianco, Fukumori, 2020.....	4
<b>Figura 2 -</b> Representación de nanocápsulas y manosferas adaptada de Steichen, Caldonera-Moore, Peppas 2013. ....	6
<b>Figura 3 -</b> Esquema del proceso de obtención de NPs por coprecipitación. Adaptada de Ahlawat, Henriquez, Narayan, 2018 .....	6
<b>Figura 4 –</b> Estructura química del PLGA .....	7
<b>Figura 5 –</b> (a) Virus bacteriófago T4, sin envoltura (b) Partículas envueltas del virus de la estomatitis vesicular; (c) Partículas icosaédricas no envueltas del rotavirus humano, obtenidas de Flint, 2015 <sup>[9]</sup> (d) Virus SARS-CoV-2 en cultivos de células Vero, obtenida de Drefs, 2021. <sup>[10]</sup> (e) Partículas extracelulares de PRRSV, obtenidas de Snijder, 2013. <sup>[11]</sup> .....	8
<b>Figura 6 -</b> Microscopía electrónica del PRRSV. (a) Partículas del PRRSV purificadas con CsCl, contrastadas negativamente con acetato de uranilo. (b) Crio-EM de partículas de PRRSV en hielo vítreo. La flecha blanca señala una partícula con un núcleo rectangular. Las flechas negras indican rasgos sobresalientes que se cree que corresponden a complejos de las proteínas menores de la envoltura. En el recuadro, vista ampliada de una partícula típica del PRRSV con las dimensiones indicadas. <sup>[20]</sup> (c) Modelización actual del PRRSV adaptada de Fenner,2016 <sup>[21]</sup> . Se observa en el interior el ARN junto a la proteína N formando la nucleocápside, en la superficie se observan en azul, rojo y amarillo a GP2, GP3 y GP4, que junto a la proteína E (rosa) forman un complejo esencial para la fijación del virus. La proteína M (verde) y GP5(violeta) son indispensables para la formación del virus y la proteína ORF5(gris) es esencial para el tropismo celular y la replicación del virus. La flecha señala la envoltura. <sup>[22]</sup> .....	10
<b>Figura 7 -</b> Esquema del aislamiento de PBMCs a partir de sangre porcina. Creado con herramientas de BioRender. ....	22
<b>Figura 8 –</b> Esquema de marcaje de monocitos con el anticuerpo primario mouse anti-CD172a seguido del anticuerpo secundario anti-mouse IgG1 con perlas magnéticas. Creado con herramientas de BioRender. ....	23



**Figura 9** – Esquema de aislamiento de monocitos previamente marcados con anti-CD172a y anti-mouse IgG1 con perlas magnéticas. Creado con herramientas de BioRender..... 24

**Figura 10** – Esquema de posibles diferenciaciones de monocitos. Creado con herramientas de BioRender. M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IL-4: interleuquina 4. .... 25

**Figura 11** - Esquema del marcaje con anticuerpos específicos de marcadores de superficie de macrófagos y frente al virus. Creado con herramientas de BioRender..... 26

**Figura 12** - Esquema de la combinación de anticuerpos seleccionados para el marcaje de CD163 y la proteína N del PRRSV. Creado con herramientas de BioRender. .... 27

**Figura 13** – Esquema del proceso de coprecipitación para obtener NPs de PLGA cargadas con virus vacunal. Adaptada de Pancani, et al., 2018.<sup>[37]</sup> ..... 28

**Figura 14** – NPs de PLGA en suspensión a una concentración 1,5 mg/mL (a) vacías, (b) con vacuna, (c) con rojo de Nilo y (d) con Azul de Metileno ..... 29

**Figura 15** – Morfología de NPs (a) que contienen rojo de Nilo (a), vacuna (b y c), y vacías (d). Imagen tomada con Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 6300. Soluciones de NPs de concentración 1 mg/mL..... 30

**Figura 16** – (a) Curva de calibración de BSA midiendo su absorbancia a 280 nm. (b) Espectros de absorción UV-visible de soluciones patrones de BSA. Se indica su concentración en µg/mL dentro de la gráfica. (c) Espectros de absorbancia UV-visible de muestras de NPs degradadas mediante tratamiento con NaOH. .... 32

**Figura 17** – (a) Curva de calibración de Azul de Metileno midiendo su absorbancia a 664 nm. (b) Espectros de absorción UV-visible de soluciones patrones de Azul de Metileno de concentraciones de 1 a 6µg/mL. (c) Espectros de absorción UV-visible de muestras centrifugadas a distintos tiempos y rotas. (d) Perfil de difusión del sistema. (e) Perfil de difusión acumulada. .... 34

**Figura 18** – Fotografía ampliada del microscopio aumento 10x del conteo de PBMCs en cámara de Neubauer, donde se puede observar claramente las células brillantes. .... 35

**Figura 19** – (a) Izquierda: fotografía del microscopio aumento 10x de la placa donde se sembraron los monocitos. Derecha: ampliación de la primera imagen, donde se puede



observar la morfología esférica de los monocitos. (b) Izquierda: fotografía del microscopio aumento 10x de la placa donde se encuentran los macrófagos ya diferenciados. Derecha: ampliación de la primera imagen, donde se puede observar el mayor tamaño y la morfología esférica con protuberancias de los macrófagos..... 37

**Figura 20** – Curvas de amplificación del virus PRRS obtenidas por RT-qPCR. .... 38

**Figura 21** – Estrategia de gating y selección de población de macrófagos vivos. .... 39

**Figura 22** – Gráficos de contornos obtenidos tras analizar los resultados de citometría de flujo utilizando cada uno de los distintos anticuerpos monoclonales ensayados frente el virus PRRS..... 41

**Figura 23** - Gráficos de contornos obtenidos por citometría de flujo representativos de las condiciones estudiadas (a) Control. (b) Virus vacunal MOI 0.1. (c) NPs x1 a 240  $\mu$ L. (d) NPs con Rojo de Nilo a 40  $\mu$ L..... 42

**Figura 24** – Gráficos de Barras expresando los resultados de la frecuencia de células frente a cada uno de los marcajes utilizados en citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos para la determinación de CD163 y SR30. .... 43

**Figura 25** - Gráficos de contornos obtenidos por citometría de flujo representativos de las condiciones estudiadas, donde en el primer cuadrante Q1 se observan las células positivas al virus y negativas al Live/Dead, en el cuadrante Q2 se muestran las células positivas a ambos marcajes, en el cuadrante Q3 se encuentran las células negativas al virus pero positivas al Live/Dead y en el Q4 están las células negativas a ambos marcajes. (a) NPs x1 a 80  $\mu$ L. (b) NPs x2 a 160  $\mu$ L. (c) NPs vacías a 400  $\mu$ L..... 45

**Figura 26** – Mortalidad de macrófagos en porcentaje en función de los volúmenes de nanopartículas, en soluciones de 1 mg/mL..... 46

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** - Clasificación de los principales tipos de vacunas, ventajas, desventajas y vacunas autorizadas que utilizan esta tecnología<sup>[22,26,27]</sup> ..... 12

**Tabla 2** – Tamaño de NPs vacías y con vacuna con diferentes relaciones PLGA:PVA obtenido mediante DLS..... 30

**Tabla 3** – Análisis cuantitativo del colorante en sobrenadante por difusión ..... 34

**Tabla 4** – Resultados de los Cq's obtenidos para las distintas muestras estudiadas por RT-qPCR..... 38

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Nanociencia

El término "nano" hace referencia al prefijo griego que simboliza algo muy pequeño y representa la milmillonésima parte de un metro ( $10^{-9}$  m). Es la nanociencia el área encargada del estudio de estructuras y moléculas cuyo tamaño se encuentra en la escala de nanómetros (fig 1). En las últimas décadas se ha producido un gran desarrollo de esta área de la ciencia ya que se demostró la influencia de las dimensiones y los tamaños de los nanomateriales en sus propiedades, abriendo un nuevo mundo de oportunidades.<sup>[1,2]</sup> Los nanomateriales presentan propiedades físicas y químicas exclusivas del tamaño nanométrico.

La nanociencia ha revolucionado múltiples áreas (energía y materiales, entre otras). Además, una gran cantidad de estudios han manifestado el enorme potencial que tienen la nanotecnología en biomedicina para el diagnóstico y la terapia de muchas enfermedades, siendo la bionanotecnología uno de los campos de aplicación más prometedores de la nanociencia. Un claro ejemplo de estas aplicaciones es la administración de fármacos, las nanopartículas (NPs) poseen una capacidad extraordinaria para llevarlos eficazmente al lugar de destino, aumentando el efecto terapéutico y minimiza los efectos secundarios.<sup>[2,3]</sup>

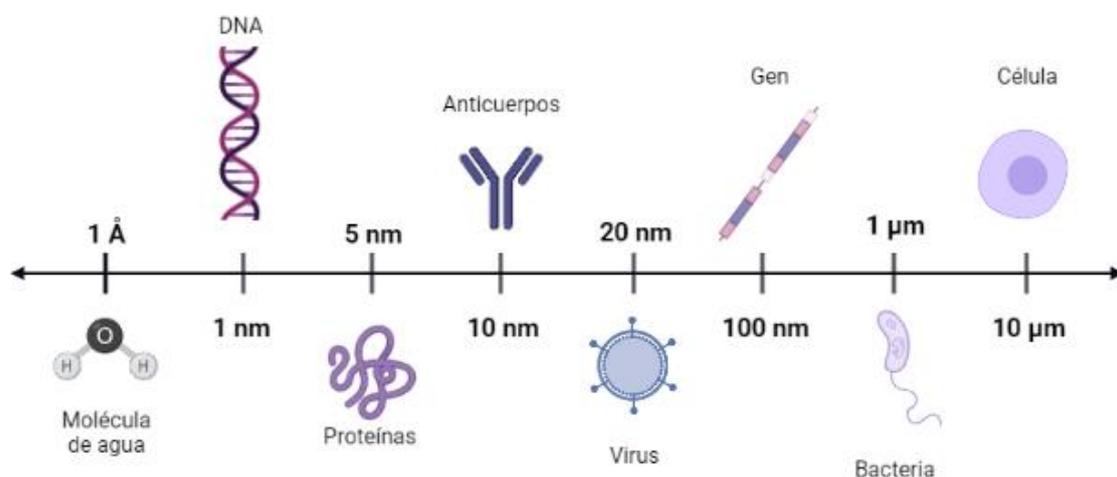


Figura 1- Representación de la nanoescala con elementos biológicos y químicos adaptada de Apolinário, Cassone-Salata, Bianco, Fukumori, 2020.<sup>[4]</sup>



## 1.2 Nanopartículas poliméricas

En las últimas décadas ha crecido considerablemente el interés en el desarrollo de NPs biodegradables como dispositivos eficaces de administración de fármacos y se ha demostrado que, gracias a sus características favorables en términos de elaboración y diseño, biocompatibilidad y una amplia variedad de estructuras, los polímeros son el material más indicado para su desarrollo.<sup>[5]</sup> También pueden utilizarse otras NPs para estas aplicaciones como liposomas, nanotubos de carbono y vesículas extracelulares. Sin embargo, las NPs constituidas por polímeros generan por lo general mejores resultados, dado que al tratarse de moléculas de gran tamaño se pueden obtener NPs con un control preciso sobre la arquitectura, la forma, el tamaño y la carga superficial, asegurando obtener un producto estable en el medio fisiológico.<sup>[6]</sup>

Existen polímeros de origen natural y de origen sintético, siendo ambos tipos ampliamente utilizados para este fin. Los polímeros naturales más utilizados para aplicaciones biomédicas son el alginato de sodio, la albúmina y el quitosano, mientras que dentro de los sintéticos pueden mencionarse los derivados del ácido láctico (PLA), de los ácidos láctico y glicólico (PLGA), los poliglicoles (PGA), las poliacrilamidas (PAM) y los derivados del polietilenglicol (PEG), entre otros.<sup>[5,7]</sup> Es primordial que aquellos polímeros seleccionados para la obtención de NPs cumplan con la propiedad de ser biocompatibles, es decir que generen una respuesta biológica aceptable, y biodegradables, o sea que tras cumplir su propósito se degraden generando residuos inocuos para el organismo.<sup>[1]</sup>

Las NPs poliméricas también pueden ser clasificadas en función de su estructura, existen las nanocápsulas y las nanoesferas. Por un lado, las nanocápsulas están compuestas por una superficie polimérica y son huecas en su interior, el fármaco entonces puede ser adsorbido en la superficie o encapsulado en el núcleo. A diferencia de estas, en las nanoesferas, tanto el núcleo como la superficie están compuestos por material polimérico y el fármaco está retenido o adsorbido en la matriz polimérica (fig 2).<sup>[7]</sup>

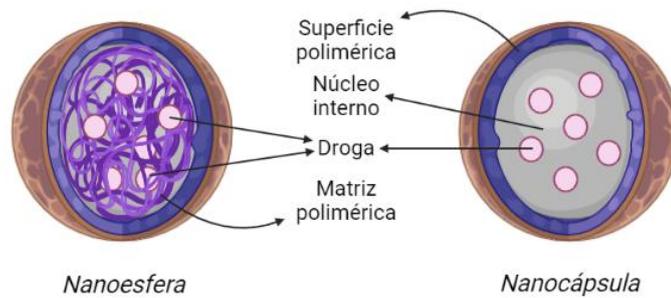


Figura 2 - Representación de nanoesferas y nanocápsulas adaptada de Steichen, Caldonera-Moore, Peppas 2013. [8]

Existen diversos métodos para sintetizar NPs poliméricas dentro de los cuales pueden destacarse el de emulsión simple seguida por evaporación del disolvente, el método *salting-out*, donde la adición de una sal para aumentar la fuerza iónica provoca la precipitación de las NPs, el de emulsión seguida por difusión del disolvente y la nanoprecipitación. En este trabajo se utilizará el último método mencionado (fig 3), el cual consiste en disolver el polímero junto a la sustancia a encapsular en un disolvente orgánico e inyectar lentamente esta mezcla sobre una solución acuosa de surfactante en constante agitación. El surfactante se utiliza con el objetivo de aumentar la estabilidad de la emulsión generada y obtener NPs de tamaño bien definido y una distribución de tamaño estrecha. Por último, utilizando métodos físicos, como el aumento de la temperatura, la presión o la agitación continua, el disolvente orgánico se evapora y se obtienen las NPs. [7,9]

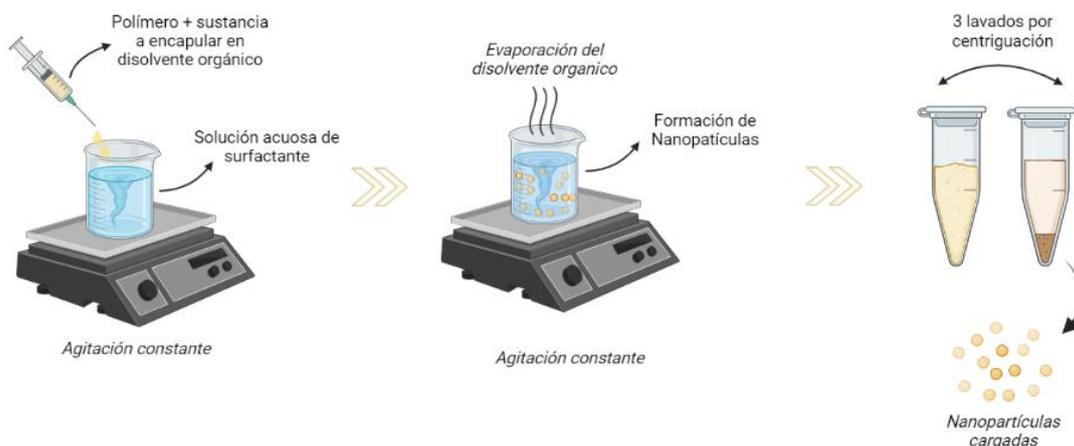


Figura 3 - Esquema del proceso de obtención de NPs por coprecipitación. Adaptada de Ahlawat, Henriquez, Narayan, 2018. [7]

### 1.2.1 Nanopartículas de PLGA

El PLGA (fig 4) es un copolímero sintético compuesto por monómeros de ácido glicólico y ácido láctico, el cual puede obtenerse por varios métodos, siendo los principales las reacciones de policondensación seguidas por apertura de anillo. Es importante la síntesis seleccionada ya que define la secuencia de monómeros obtenida en la estructura y a su vez esto afecta directamente la tasa de degradación. Por ejemplo, el PLGA aleatorio muestra una rápida degradación en comparación con el PLGA periódico. Por ello, para su aplicación en administración de fármacos se trabaja con PLGA periódico ya que la cinética de liberación de los mismos es más controlada. <sup>[10]</sup>

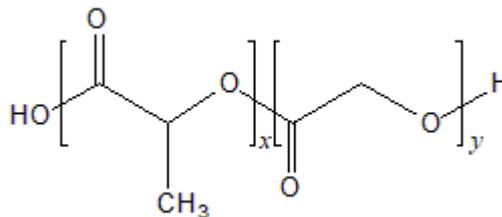


Figura 4 – Estructura química del PLGA

El PLGA posee las propiedades y características requeridas para su uso en NPs poliméricas con aplicaciones biomédicas, ya que es biocompatible y biodegradable, y cuenta con la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para los sistemas de administración de fármacos. <sup>[11]</sup> Además, permite encapsular sustancias de distinta naturaleza, ya sea desde moléculas pequeñas a macromoléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, aportándole a su vez protección a estas sustancias de una degradación prematura en el medio biológico. Por último, las NPs de PLGA pueden modificarse en la superficie con facilidad para así dirigir la misma a órganos o células específicas. <sup>[10,12]</sup>

### 1.3 Virus

Se denomina virus a los microorganismos acelulares compuestos de material genético, ADN o ARN, rodeados de una capa de proteínas llamada cápside, y que necesitan de la maquinaria de otras células para poder replicarse. Se trata de estructuras con tamaño comprendido en el rango de 10 nm a 1  $\mu\text{m}$  y de morfología diversa, pero en general la

mayoría tienen una estructura mucho más simple que la de cualquier organismo celular (fig 4)<sup>[13]</sup>. A pesar de su relativamente simple conformación, son los causantes de enfermedades graves tanto en humanos como en animales y plantas. Esto se debe a que como se ha comentado previamente, los virus son parásitos intracelulares obligados. Es decir, poseen una absoluta dependencia del hospedador para reproducirse. Normalmente, es durante el proceso de replicación denominado ciclo replicativo, que el virus puede dañar o matar a la célula del hospedador, lo que se conoce como efecto citopático.<sup>[13]</sup>

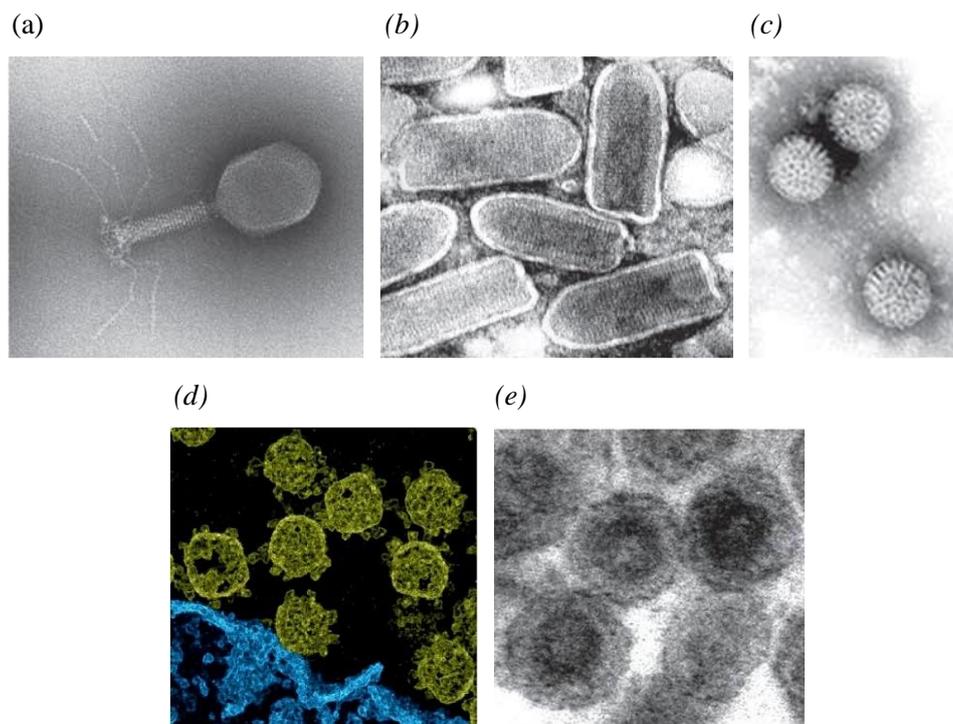


Figura 5 – (a) Virus bacteriófago T4, sin envoltura (b) Partículas envueltas del virus de la estomatitis vesicular; (c) Partículas icosaédricas no envueltas del rotavirus humano, obtenidas de Flint, 2015<sup>[13]</sup> (d) Virus SARS-CoV-2 en cultivos de células Vero, obtenida de Drefs, 2021.<sup>[14]</sup> (e) Partículas extracelulares de PRRSV, obtenidas de Snijder, 2013.<sup>[15]</sup>

Aunque los virus suelen tener hospedadores específicos, pueden producirse eventos de salto de especies. A medida que la población humana sigue expandiéndose y alterando la naturaleza, las infecciones entre especies afectan a los seres humanos con mayor frecuencia (zoonosis). Son ejemplo de infecciones de origen zoonótico la fiebre hemorrágica del Ébola, el síndrome respiratorio agudo grave (SARS) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), producida por el virus VIH. El virus SARS-CoV-2



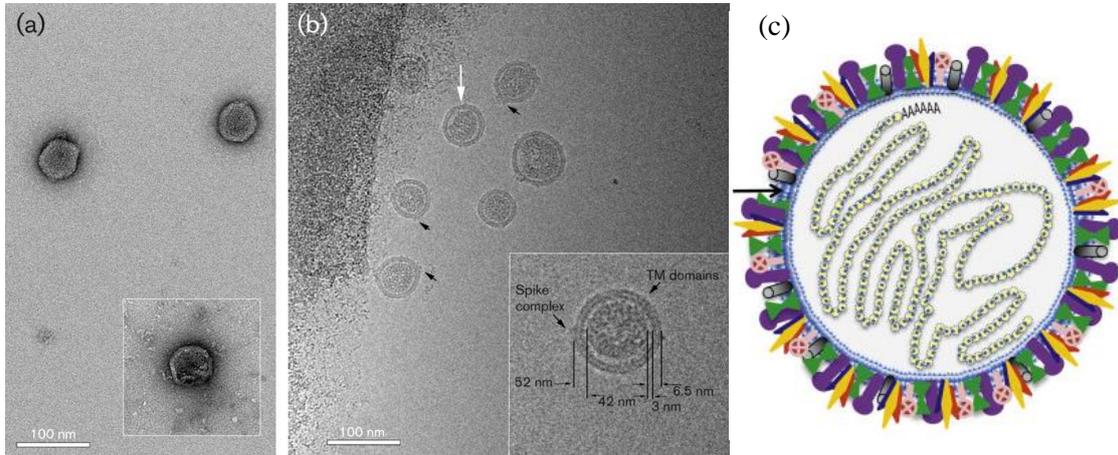
causante de la actual pandemia también se trata de un virus zoonótico, ya que la secuencia del genoma completo de este tiene un 96,2% de similitud con la de un coronavirus relacionado con el SARS de murciélago (SARSr-CoV; RaTG13) recogido en la provincia de Yunnan, China<sup>[13,16]</sup>, aunque todavía no está claro cómo se ha producido el salto a la especie humana.

El motivo por el que es muy complejo controlar las enfermedades contagiosas generadas por virus y por lo que se llegan a generar estas pandemias, está relacionado con sus mecanismos de replicación y las tasas de mutación y/o recombinación, los cuales suelen estar asociados a elevadas tasas de contagio, morbilidad y mortalidad. De esta forma, cuanto mayor sea la tasa de replicación de un virus, y mayor sea su tasa de mutación, mayor será la generación de nuevas cepas, lo que implica la dificultad en el control de la diseminación de los virus.<sup>[13,17]</sup>

### **1.3.1 Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV)**

Los primeros brotes de cuadros respiratorios y reproductivos asociados a este virus se describieron a finales de los años 80 en EE.UU. y Canadá<sup>[18]</sup>, no siendo hasta el año 1991 cuando se logró aislar por primera vez en Europa el virus causante de estos cuadros, recibiendo entonces el nombre de virus “Lelystad”, hoy en día considerado como el prototipo del PRRSV-1. Un año más tarde, se aisló en EE.UU. otra cepa del virus que se denominó VR-2332, prototipo del PRRSV-2<sup>[19]</sup>. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae*, género *Betaarterivirus*. El virus PRRSV consiste en un virus ARN, monocatenario, de sentido positivo y encapsulado en una vesícula proteica (fig 6), que presenta una elevada tasa de mutación. Debido a esa elevada tasa de mutación, y a pesar de contar con características clínicas, epidemiológicas y ecológicas similares, estos dos genotipos iniciales del virus, PRRSV-1 y PRRSV-2, sólo comparten un 55-70% de identidad nucleotídica<sup>[20,21]</sup> por lo que a día de hoy se les considera como dos virus independientes, *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2*, respectivamente<sup>[22]</sup>. La elevada

variabilidad genética presentada por ambos virus complica en gran medida la eficacia de las medidas de control. [23]



*Figura 6 - Microscopía electrónica del PRRSV. (a) Partículas del PRRSV purificadas con CsCl, contrastadas negativamente con acetato de uranilo. (b) Crio-EM de partículas de PRRSV en hielo vítreo. La flecha blanca señala una partícula con un núcleo rectangular. Las flechas negras indican rasgos sobresalientes que se cree que corresponden a complejos de las proteínas menores de la envoltura. En el recuadro, vista ampliada de una partícula típica del PRRSV con las dimensiones indicadas.<sup>[24]</sup> (c) Modelización actual del PRRSV adaptada de Fenner, 2016. Se observa en el interior el ARN junto a la proteína N formando la nucleocápside, en la superficie se observan en azul, rojo y amarillo a GP2, GP3 y GP4, que junto a la proteína E (rosa) forman un complejo esencial para la fijación del virus. La proteína M (verde) y GP5 (violeta) son indispensables para la formación del virus y la proteína ORF5 (gris) es esencial para el tropismo celular y la replicación del virus. La flecha señala la envoltura. [25]*

El PRRS afecta a las granjas de producción porcina a nivel mundial y es altamente devastador; se calcula que causa pérdidas económicas estimadas en 664 millones de dólares anuales en EE.UU., lo que se traduce en pérdidas de 1,8 millones de dólares al día<sup>[26]</sup>. En cerdos en crecimiento este virus causa anorexia, fiebre, dificultad respiratoria y una mayor susceptibilidad a las infecciones microbianas secundarias; mientras que en cerdas adultas se caracteriza por la disfunción reproductiva y los abortos. [12]

La célula diana del virus es el macrófago alveolar pulmonar, aunque el virus también es capaz de replicarse en macrófagos intersticiales pulmonares y macrófagos intravasculares así como en otras poblaciones de macrófagos tisulares.<sup>[27]</sup> Una vez



infectados, los macrófagos generan una respuesta inmunitaria innata pobre, en la que si bien algunas cepas del PRRSV inducen un aumento de la citotoxicidad en células *natural killer* (NK), encargadas de destruir células infectadas, por lo general la producción de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) es baja, y además se regulan al alza mediadores inmunosupresores desde los primeros días posteriores a la infección. El resultado es una respuesta inmunitaria adaptativa deficiente en la que además hay una respuesta de anticuerpos neutralizantes frente al virus retrasada o débil, lo que conlleva a la persistencia del PRRSV. [12,28]

Hasta la actualidad, se han desarrollado varias vacunas comerciales para controlar este virus, sin embargo, la amplia variedad de cepas del PRRSV dificulta su prevención y erradicación. Es por esto que gran parte de los esfuerzos de científicos de todo el mundo se centran en desarrollar nuevas tecnologías que permitan controlar este virus.

## 1.4 Vacunas

Las vacunas son las encargadas de prevenir enfermedades causadas por un gran número de virus y bacterias, y actualmente se están desarrollando también para la prevención de infecciones por parásitos. Se tratan de un producto biológico que puede utilizarse para inducir de forma segura una respuesta inmunitaria que confiera protección frente a la infección y/o la enfermedad en una exposición futura a un patógeno. Para lograrlo, la vacuna debe contener antígenos derivados del patógeno o producidos sintéticamente para representar componentes del mismo. El componente esencial de la mayoría de las vacunas es uno o más antígenos de naturaleza proteica que inducen respuestas inmunitarias que proporcionan la protección. [29,30]

Las vacunas utilizadas en la actualidad incluyen las basadas en ácidos nucleicos (ARNm, ADN), las vacunas de vectores virales, las partículas similares a los virus (VLP, del inglés, *virus-like particles*) y las vacunas de proteínas recombinante (tabla 1). [30] En general las vacunas se clasifican como vacunas vivas atenuadas y vacunas muertas o inactivadas, las primeras contienen cepas atenuadas del organismo patógeno, pero que mantienen cierta capacidad de replicación, mientras que las últimas sólo contienen componentes de un patógeno u organismos enteros pero muertos, sin capacidad de replicación. [29]

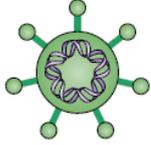
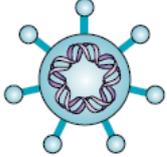
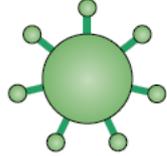
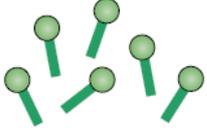
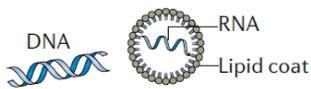
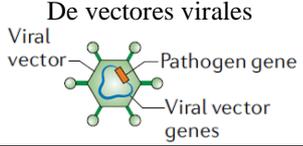
Tipo de vacuna	Ventajas	Desventajas	Vacunas autorizadas que utilizan esta tecnología
<p>Vivas atenuadas</p> 	<p>Eficaces. Baja dependencia de adyuvantes, Generalmente no requieren de segundas dosis. Relativamente económicas.</p>	<p>Poco estables. No pueden aplicarse a individuos inmunodeprimidos o gestantes por riesgo a desarrollar la enfermedad. Riesgo de reversión a cepas virulentas.</p>	<p>Fiebre amarilla, BCG, varicela, influenza, rubéola  PRRSV</p>
<p>Inactivadas, organismo entero</p> 	<p>Son estables. Seguras. Sin riesgo de reversión.</p>	<p>Requieren de adyuvantes. Más costosas. La respuesta inmune generada puede ser limitada.</p>	<p>Hepatitis A, rabia, polio, tos ferina  PRRSV</p>
<p>Partículas similares a virus</p> 	<p>Seguras. Efectivas. Carecen de toda patogenicidad.</p>	<p>Complejas de diseñar y sintetizar.</p>	<p>Papiloma humano</p>
<p>De proteína recombinante</p> 	<p>Seguras. Carecen de toda patogenicidad.</p>	<p>Inmunogenicidad pobre. Requiere de múltiples dosis y/o adyuvantes.</p>	<p>Hepatitis A, Hepatitis B, influenza,</p>
<p>Basadas en ácidos nucleicos</p> 	<p>Seguras. Generan inmunidad de anticuerpos y mediada por células. Potencial de producción sencillo.</p>	<p>Riesgo de integración del genoma. Pueden generar reacciones inmunes adversas.</p>	<p>SARS-CoV-2 (Moderna, Pfizer)</p>
<p>De vectores virales</p> 	<p>Seguras. Generan una fuerte respuesta inmune celular sin necesidad de adyuvantes.</p>	<p>Su uso puede verse limitado por inmunidad preexistente contra el vector utilizado.</p>	<p>Ébola SARS-CoV-2 (AstraZeneca, Janssen, Sputnik V)</p>

Tabla 1 - Clasificación de los principales tipos de vacunas, ventajas, desventajas y vacunas autorizadas que utilizan esta tecnología<sup>[29-31]</sup>

### 1.4.1 Vacunas veterinarias

Las vacunas representan en la actualidad la herramienta principal para prevenir, gestionar o erradicar las enfermedades infecciosas en veterinaria. El impacto de las



enfermedades no es sólo financiero, sino que algunas generan preocupación adicional debido a su potencial zoonótico, su capacidad de ser transportadas más allá de fronteras geográficas, su capacidad de evadir las defensas inmunológicas del hospedador, así como de generar variantes más virulentas.<sup>[32,33]</sup>

En el pasado, el desarrollo de vacunas ha permitido la erradicación de enfermedades como la peste bovina, la reducción en gran medida de la rabia en algunos continentes y la disminución del impacto de la coccidiosis bovina, enfermedad causada por el protozoo parasitario *Eimeria* y una de las enfermedades ganaderas de mayor importancia económica del mundo.<sup>[32]</sup> En la actualidad, la gran mayoría de las vacunas veterinarias autorizadas son vacunas de microorganismos vivos atenuados, inactivadas, de toxoides, de virus vectorizados o basadas en ácidos nucleicos. Las vacunas vivas atenuadas generalmente son muy eficaces ya que inducen respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, aunque poseen el riesgo de reversión del microorganismo, así como de recombinarse con las cepas de campo dando lugar a nuevas cepas más virulentas. Por otro lado, las vacunas inactivadas generan respuestas inmunitarias pobres y las basadas en toxoides son complejas de obtener.<sup>[33,34]</sup> Es por eso que la vacunología moderna busca nuevos enfoques para desarrollar vacunas con mayor inmunogenicidad y con menores efectos secundarios.<sup>[34]</sup>

Los análisis genómicos de los patógenos y la mejor comprensión de los mecanismos de patogénesis han permitido el desarrollo de vacunas veterinarias recombinantes y son muy prometedoras para la salud animal. Existe una clara necesidad de desarrollar vacunas más eficientes y más seguras, en las que se combinen diferentes antígenos, permitiendo el desarrollo de vacunas frente a cepas heterólogas. Las vacunas recombinantes cumplen con estos requisitos y por ello se las considera el futuro de la vacunología.<sup>[33]</sup>

#### **1.4.2 Vacunas frente al PRRSV**

En la actualidad se han desarrollado más de 25 vacunas comerciales frente al PRRSV, siendo la gran mayoría vacunas vivas atenuadas y el resto vacunas inactivadas, en ambos casos algunas se derivan del PRRSV-1 y otras del PRRSV-2. Las vacunas atenuadas o de virus vivo modificado (MLV, del inglés *Modified Live Virus*) fueron las primeras en



desarrollarse tras el descubrimiento de PRRSV-1 y PRRSV-2, y hoy en día siguen siendo las más utilizadas.<sup>[32]</sup>

Las vacunas MLV son las que mejor protección generan en los cerdos frente a futuras infecciones. Sin embargo, se trata de una protección eficaz sólo frente a cepas genéticamente homólogas del PRRSV de campo, mientras que frente a cepas heterólogas confieren sólo una protección parcial o nula.<sup>[35]</sup> Otra de las grandes preocupaciones asociadas al uso de estas vacunas está relacionado con su seguridad. Se ha demostrado que cerdos vacunados con MLV pueden desarrollar viremia hasta 4 semanas después de la inmunización, generando la propagación del virus vacunal a animales no inmunizados. Se cree que éste puede ser el motivo de que las cepas norteamericanas y europeas circulen hoy en múltiples territorios del mundo.<sup>[32,35]</sup> Aunque esta situación se puede dar en distintos territorios, lo más común es que predominen los casos asociados a uno de los dos virus, PRRSV-1 o PRRSV-2. No obstante, teniendo en cuenta la elevada variabilidad de cada uno de estos virus, que da lugar a la diferenciación de distintos serotipos o linajes, respectivamente, el desarrollo de una vacuna comercial que sea capaz de generar protección frente a un reto heterólogo representa el gran reto para la ciencia en este campo a día de hoy.<sup>[36]</sup>

Respecto a las vacunas inactivadas, aunque han sido autorizadas en todo el mundo debido a su mayor seguridad, países como Estados Unidos han dejado de utilizarlas debido a su escasa efectividad. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la administración intramuscular de la vacuna inactivada es capaz de conferir algunos beneficios en animales previamente infectados por el virus y en cerdas seropositivas potenciando la inmunidad anti-PRRSV e induciendo una mejora significativa en el rendimiento reproductivo. Asimismo, también se ha registrado una buena protección en cerdos a los que se le aplicó por vía intranasal una vacuna inactivada previamente encapsulada en NPs de PLGA.<sup>[35]</sup>

La continua evolución del virus del PRRS y la aparición de cepas más virulentas obligan a continuar la búsqueda de nuevas vacunas que mejoren la seguridad y la eficacia frente a cepas heterólogas. Se están aplicando distintas biotecnologías para el desarrollo de vacunas de otra naturaleza, como de vectores virales, de proteínas recombinantes o basadas en ácidos nucleicos, pero a pesar de ello los niveles de protección obtenidos hasta



el momento no son suficientes, por lo que las MLV basadas en una sola cepa siguen siendo la mejor opción para controlar los brotes de PRRSV en la actualidad. [35,36]

### ***1.5 Nanoencapsulación como estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas frente al PRRSV***

Dado que el PRRSV ingresa en el hospedador principalmente a través de las mucosas respiratorias y genitales, la administración de la vacuna por la vía intranasal podría resultar de interés para estimular la inmunidad de mucosas. En este sentido, la estimulación del sistema inmunitario de las mucosas proporciona una inmunidad tanto a nivel local en las mucosas como a nivel sistémico, por lo que logra una respuesta protectora en el sitio de entrada del patógeno y además activa la respuesta inmune sistémica. [23,37]

Hasta ahora, la respuesta específica al PRRSV inducida por las vacunas administradas por vía parenteral no ha logrado proteger completamente a los cerdos frente a las infecciones causadas por cepas de campo heterólogas y las reinfecciones [37]. De este modo, la administración intranasal de vacunas basadas en NP podría inducir una respuesta mayor y más prolongada de anticuerpos IgG e IgA en comparación con otras vías de inmunización. Además, la administración por vía intranasal permite un acceso de la vacuna más eficiente a los MAPs, lo que es importante como principal célula diana del PRRSV y como tejido diana de esta enfermedad. [37]

La encapsulación de la vacuna permitiría aplicarla por vía intranasal utilizando distintos dispositivos, como sprays, lo que aumentaría la eficacia de la administración y además, el PLGA al actuar como adyuvante, ayudaría a la liberación sostenida de la vacuna atrapada [37,38]

Hasta ahora la administración intranasal en cerdos se ha realizado utilizando dispositivos de atomización de la mucosa, la instilación intratraqueal y la administración de aerosoles mediante nebulizador, aplicándose así dos estrategias distintas de inmunización de las vías respiratorias: aerosoles nasales locales y aerosoles dirigidos al pulmón. La importancia de que un candidato vacunal se pueda dirigir a diferentes regiones del tracto respiratorio para inducir una protección óptima va a venir marcado



principalmente por las células diana del patógeno, el tropismo del mismo y la patogenia de la enfermedad.<sup>[39]</sup>

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue valorar la viabilidad de encapsular un virus vacunal frente al PRRSV en nanocápsulas de PLGA y su captación por macrófagos derivados de monocitos. Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Sintetizar NPs de PLGA por método de coprecipitación tanto vacías como con distintas sustancias encapsuladas, y su posterior caracterización por diversas técnicas experimentales.
- ✓ Aislar monocitos a partir de sangre periférica de porcino y diferenciar los monocitos a macrófagos.
- ✓ Analizar las diferencias generadas por la inoculación de macrófagos derivados de monocitos con un virus atenuado del PRRS y NPs cargadas con el virus en su interior mediante citometría de flujo.
- ✓ Determinar la toxicidad de las NPs de PLGA en cultivos celulares de macrófagos derivados de monocitos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos

Para la síntesis y tratamientos de las NPs se hizo uso de los siguientes reactivos:

- ✓ Ácido poli(láctico-co-glicólico),  $P_M$  38,000-54,000 g/mol, SIGMA-ALDRICH
- ✓ Acetona, para HPLC,  $\geq 99.8\%$ , SIGMA-ALDRICH
- ✓ Alcohol polivinílico, 87-90% hidrolizado,  $P_M$  30,000 – 70,000, SIGMA-ALDRICH
- ✓ PORCILIS PRRS liofilizado, Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L.
- ✓ Hidróxido de Sodio,  $\geq 98\%$ , SIGMA-ALDRICH
- ✓ SDS para análisis, ACS, PanReac AppliChem



- ✓ Albúmina de suero bovino, fracción de choque térmico, pH 7.0,  $\geq 98\%$ , SIGMA-ALDRICH
- ✓ Rojo de Nilo, SIGMA-ALDRICH
- ✓ Azul de Metileno, SIGMA-ALDRICH

Para el tratamiento de la sangre y los estudios *in vitro* se utilizaron los reactivos mencionados a continuación:

- ✓ Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, sin Magnesio, sin Calcio, filtrado, estéril, Biowest.
- ✓ Lymphoprep, Serumwerk Bernburg
- ✓ EDTA – Solución pH 8.0 (0.5 M) para biología molecular, PanReac AppliChem
- ✓ DMED alto nivel de Glucosa, con Glutamina estable, con 25mM de HEPES, sin Piruvato de Sodio, filtrado estéril, Biowest
- ✓ Penicilina Estreptomina, 10,000 U/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomina, VWR chemicals
- ✓ Suero Normal Porcino (PNS), Sigma Chemicals
- ✓ Anticuerpos primarios: CD172a (IgG1, inhouse INIA), CD163 (IgG1, inhouse INIA), CD163 (IgG2a, inhouse INIA), 1CH5 (IgG2b, INGENASA), SDOW17 (IgG1, Rural Technologies), SR30 (IgG1, Rural Technologies), CD14 MicroBead (humano, Miltenyi Biotec)
- ✓ Anticuerpos secundarios: Anti-Mouse IgG1 MicroBeads, Alexa Fluor™ 647 (anti-mouse IgG1, Invitrogen™), Alexa Fluor™ 488 (anti-mouse, IgG2a, Invitrogen™), Alexa Fluor™ 488 (anti-mouse, IgG2b, Invitrogen™).
- ✓ NucleoSpin® RNA virus, Macherey-Nagel
- ✓ TRIzol, Reactivos para aislamiento de ARN, Thermo Fisher Scientific
- ✓ kit VetMAX™ PRRSV EU/NA 2.0, Thermo Fisher Scientific
- ✓ Accutase, Sterile Filtered, Biowest
- ✓ Kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD™ Fixable Aqua, Thermo Fisher

A lo largo del trabajo experimental se empleó agua ultrapura producida por el equipo Milipore MilliQ que consta de un sistema de ósmosis inversa ( $>18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ).



## **3.2 Técnicas**

### **3.2.1 DLS**

Con el objetivo de determinar el tamaño de las NPs y su distribución se realizaron medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS). Para ello se utilizó el equipo Zetasizer-Nano ZSP (Malvern Instruments) del Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN) de la Universidad de Córdoba. El equipo permite determinar el radio hidrodinámico de las nanopartículas y trabaja a una longitud de onda de 632 nm.

### **3.2.2 Espectroscopía de Absorción UV-Visible**

Los espectros de absorción se realizaron utilizando un espectrofotómetro Cary 100Bio UV-visible. Las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo Cary o de plástico desechables según el rango de longitud de onda de análisis, cuyo paso óptico en ambos casos fue de 1 cm.

### **3.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Con el objetivo de conocer la morfología de las NPs, se tomaron imágenes SEM utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 6300 presente en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Se trabajó con un voltaje de aceleración de 5.0 kV. Las NPs para ser visualizadas por SEM fueron previamente dispersadas en agua, a una concentración de 1 mg/mL y se colocó una gota de 35  $\mu$ L de la misma en soportes ITO (del inglés *Indium-Tin oxide*) previamente lavados con disolución jabonosa, isopropanol y acetona. Se aplicó un paso de sonicado durante 15 minutos entre cada lavado.

### **3.2.4 Clasificación celular activada magnéticamente (MACS)**

Con el fin de aislar los monocitos de las demás células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se utilizaron columnas LS de Miltenyi Biotec, las cuales están diseñadas para realizar la separación magnética de células previamente marcadas con nanopartículas magnéticas. Para ello, tras el aislamiento de los PBMCs a partir de



muestras de sangre completa, éstos se incubaron con el anticuerpo anti-CD172a, marcador específico de células de origen mielóide como los monocitos, a una proporción de  $40 \mu\text{l}/10^6$  PBMCs. A continuación, se incubaron las células con un anticuerpo secundario anti-IgG1 de ratón asociado a nanopartículas magnéticas. Para realizar la separación se utilizó un imán adaptado a las columnas, el MidiMACS Separator de Miltenyi Biotec, facilitado por el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

### 3.2.5 Citometría de flujo

Los análisis correspondientes a la citometría de flujo se realizaron en un equipo LSR Fortessa SORP el cual se encuentra en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). El citómetro de flujo consta de 4 láseres (405 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm), lo que permite el análisis simultáneo de 20 parámetros y 18 intensidades de fluorescencia más los parámetros de dispersión FSC y SSC. Esta técnica se utilizó para determinar la frecuencia de CD163 (marcador de activación y maduración macrofágica) y de la proteína N del PRRSV en los macrófagos derivados de monocitos. Asimismo, se determinó la frecuencia de células vivas/muertas mediante el Kit LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain (Thermo Fisher).

### 3.2.6 RT-qPCR

La PCR a tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR) se utilizó como método complementario para confirmar la infección por el PRRSV de los macrófagos derivados de monocitos (MDMs) expuestos directamente al virus y la carga de la NPs previamente rotas según el protocolo indicado. Para llevar a cabo la RT-qPCR, primero se realizó el aislamiento del ARN utilizando en algunas muestras el kit NucleoSpin® RNA virus (Macherey-Nagel) y en otras el reactivo TRIzol, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. A continuación, se utilizó el kit VetMAX™ PRRSV EU/NA 2.0 de Thermo Fisher Scientific, el cual contienen en un solo pocillo los cebadores, las sondas, la solución tampón y las enzimas necesarias para la detección del virus PRRS. Las amplificaciones se realizaron utilizando un equipo MyiQ™ 2 Two Color Real-Time PCR



Detection System (BioRad), disponible en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología de la Facultad de Veterinaria (UCO). El programa de temperatura utilizado fue de 5 min a 50 °C, 10 min a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 3 s a 95 °C y 30 s a 60 °C.

### **3.3 Métodos**

#### **3.3.1 Síntesis de nanopartículas por emulsión simple-evaporación del disolvente**

Las NPs se prepararon mediante el método de emulsión simple seguida por evaporación del disolvente. La relación entre masa y volumen de disolución del polímero PLGA, la vacuna a encapsular y el surfactante fue estudiada hasta llegar a las condiciones óptimas, las cuales se presentan a continuación. Se tomaron 100 mg PLGA y aproximadamente 5 mg de vacuna pesados exactamente (relación 1:20 en peso). El virus se disolvió en 200 µL del disolvente comercial (véase sección anterior) y el PLGA en 4.8 mL de acetona, logrando un volumen final de 5 mL. A continuación, la disolución del polímero junto al virus se inyectó lentamente, gota a gota, sobre 100 mL de solución de PVA al 0.5% con agitación magnética. Se dejó agitando durante 6 horas hasta la evaporación total del disolvente. Finalizado el proceso se procedió a lavar 3 veces las NPs utilizando agua MilliQ, mediante lavados por centrifugación de 40 minutos a 12000 rpm. Por último, las NPs se suspendieron en agua MilliQ hasta una concentración final aproximada de 1 mg/mL y se conservaron a 4°C hasta su uso. <sup>[40]</sup>

Aplicando el mismo procedimiento se realizaron NPs vacías y NPs con colorante como Azul de Metileno o Rojo de Nilo. Aquellas NPs que contenían colorantes fueron utilizadas en experimentos para caracterización de las mismas, mientras que las vacías fueron utilizadas como blanco.

#### **3.3.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación**

Para cuantificar la eficiencia de encapsulación se tomó entre 8 a 10 mg de NPs y se las colocó en solución 0.1 M de NaOH con SDS al 5% en agitación por 24 horas, asegurando una ruptura total de las NPs. A continuación, se centrifugó la muestra a 12000 rpm por



30 minutos para eliminar restos del polímero y se midió la absorbancia a 280 nm, máximo de absorbancia presentan en la mayoría de las proteínas. Previamente se realizó una curva de calibración utilizando BSA como sustancia patrón de proteínas y NaOH 0.1 M como solvente. La eficacia de encapsulación se calculó considerando la masa inicial de virus pesada para la generación de las NPs. [38]

### **3.3.3 Perfil de difusión del contenido de las nanopartículas**

Con el fin de determinar la cantidad de contenido encapsulado en las NPs que se pierde por difusión desde el interior de las NPs al medio cuando éstas se encuentran en suspensión, se sintetizaron NPs con Azul de Metileno en su interior, procediendo según el protocolo desarrollado en el punto 3.3.1.

Una vez finalizado el proceso de síntesis, se tomaron alícuotas de 1 mL de la suspensión de las NPs y las mismas fueron centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos luego de distintos tiempos en suspensión, para luego medir la absorbancia del sobrenadante. Previamente se realizó una curva de calibración del Azul de Metileno mediante espectroscopía UV-visible.

### **3.3.4 Aislamiento de monocitos y diferenciación a macrófagos**

Para el aislamiento de los monocitos, se partió en cada caso de aproximadamente 80 mL de sangre porcina suministrado por el Servicio de Animales de Experimentación (SAEX) de la UCO. Una vez en el laboratorio, la sangre se dividió en dos volúmenes iguales en dos tubos de 50 mL y se centrifugó 20 minutos a 1000 g a temperatura ambiente sin freno, para lograr una separación de los componentes de la sangre. Una vez finalizada la centrifugación, se tomó utilizando una pipeta de 10 mL la capa de leucocitos y se diluyó 1:1 con PBS/EDTA en nuevos tubos de 50 mL. A continuación, se realizó una dilución 1:2 con el volumen correspondiente de Lymphoprep, un medio de gradiente de densidad para el aislamiento de células mononucleares, colocando inicialmente el volumen necesario de Lymphoprep y añadiendo lentamente sobre el mismo la fracción de leucocitos diluida en PBS/EDTA para evitar la mezcla de ambos líquidos. Se centrifugó

nuevamente por 25 minutos a temperatura ambiente y sin freno, para lograr la separación de las PBMCs, las cuales se retiraron haciendo uso de una pipeta. Las células entonces se lavaron tres veces por centrifugación utilizando PBS/EDTA (figura 7).

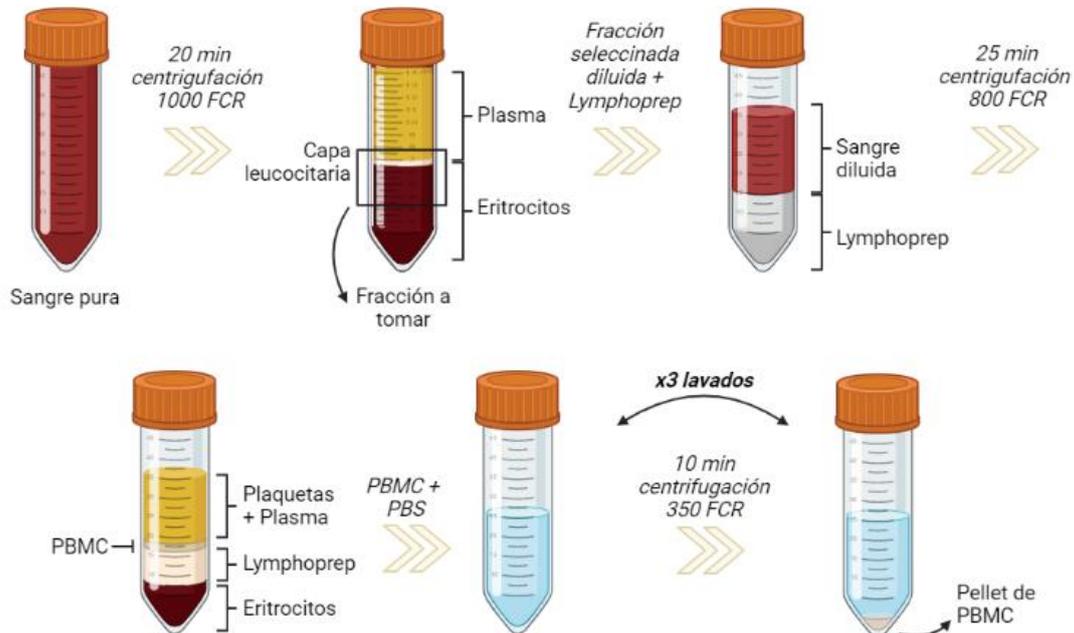


Figura 7 - Esquema del aislamiento de PBMCs a partir de sangre porcina. Creado con herramientas de BioRender.

Al finalizar, el pellet obtenido se resuspendió en 5 mL de PBS/EDTA y se cuantificaron las células aisladas con una cámara de Neubauer. Para esto, se realizó una tinción de vitalidad aplicando una dilución 1:10 o 1:100, según fuera conveniente, en azul de tripano para recuento de leucocitos, determinando la cantidad de células vivas al microscopio.

Para el aislamiento de los monocitos del resto de las células mononucleares, se trabajó con dos metodologías:

- Por adherencia: los monocitos poseen la particularidad de adherirse a la superficie. Para desarrollar este método se sembraron las PBMCs aisladas en el paso anterior a razón de  $5 \times 10^6$  PBMCs por pocillo en placas de 24 pocillos. Este cálculo se hizo estimando que aproximadamente el 10% de las PBMCs se corresponden con monocitos, por lo que finalmente tendríamos

aproximadamente  $5 \times 10^5$  monocitos/pocillo. Sembradas las PBMCs se incubaron 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y atmósfera controlada de 5%  $\text{CO}_2$ , finalizado el tiempo, se lavaron los pocillos utilizando PBS/EDTA a temperatura ambiente para eliminar aquellas células no adheridas permaneciendo en el pocillo únicamente los monocitos adheridos a la superficie.

- Utilizando columnas LS: Las PBMCs obtenidas se centrifugaron nuevamente 5 minutos a 500 g para pelletizarlas y resuspenderlas en 600  $\mu\text{L}$  de buffer MACS (contiene PBS con EDTA y FBS). A continuación, una alícuota de las células se incubó con el anticuerpo mouse anti-CD172a (isotipo IgG1) por 20 minutos en hielo, se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente. Seguidamente, se incubaron las células con las perlas magnéticas ligadas con el anticuerpo secundario, anti-mouse IgG1, y se procedió de la misma forma (fig 8). La otra alícuota, con el mismo número total de células, se incubó con el anticuerpo humano anti-CD14 ya ligado a perlas magnéticas, por 20 minutos en hielo, se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente. Una vez finalizada la preparación de las muestras se las colocó en las columnas LS, previamente equilibrada con buffer MACS y colocadas en el imán *MidiMACS Separator*. Se realizaron 3 lavados y la elución se realizó con el mismo buffer, simplemente eliminando el contacto entre la columna y el soporte imantado (fig 9).

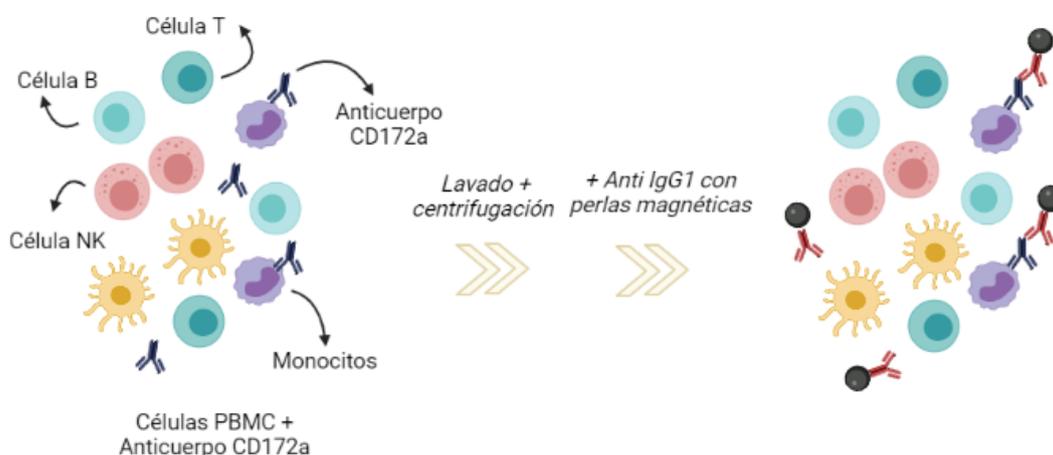


Figura 8 – Esquema de marcaje de monocitos con el anticuerpo primario mouse anti-CD172a seguido del anticuerpo secundario anti-mouse IgG1 con perlas magnéticas. Creado con herramientas de BioRender.

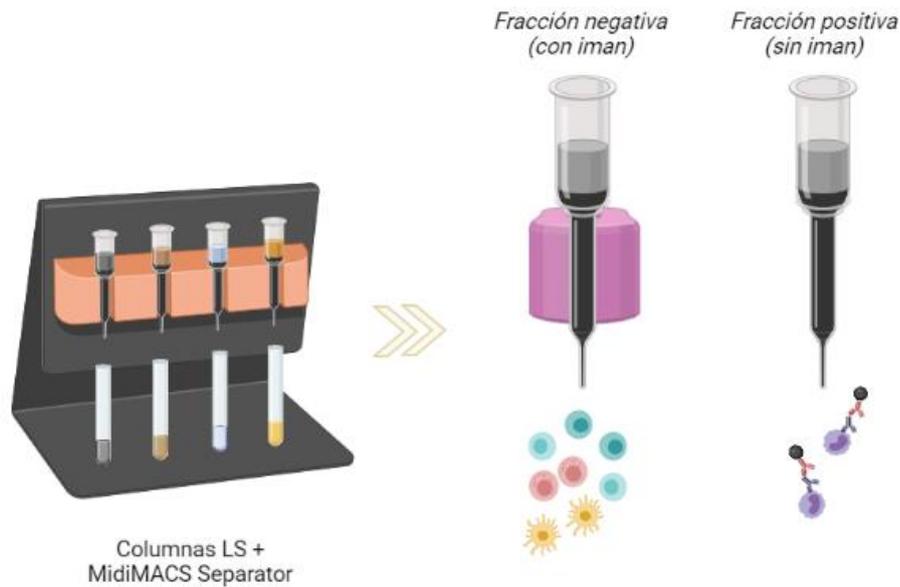


Figura 9 – Esquema de aislamiento de monocitos previamente marcados con anti-CD172a y anti-mouse IgG1 con perlas magnéticas. Creado con herramientas de BioRender.

Una vez aislados los monocitos, estos deben diferenciarse a macrófagos. Para ello se los incubó de 3 a 5 días a 37°C y atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>, en medio DMEM con un 30% de PNS y 2% de antibiótico Penicilina Estreptomina. Para definir el porcentaje de PNS utilizado, primero se estudiaron diferentes concentraciones 5, 10, 20 y 30%. El PNS aporta la citoquina denominada factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) lo que permite a los monocitos diferenciarse a macrófagos (fig 10). La expresión de superficie de CD163, analizado mediante citometría de flujo, permitió confirmar la maduración de monocitos a macrófagos pasado el periodo de incubación indicado.

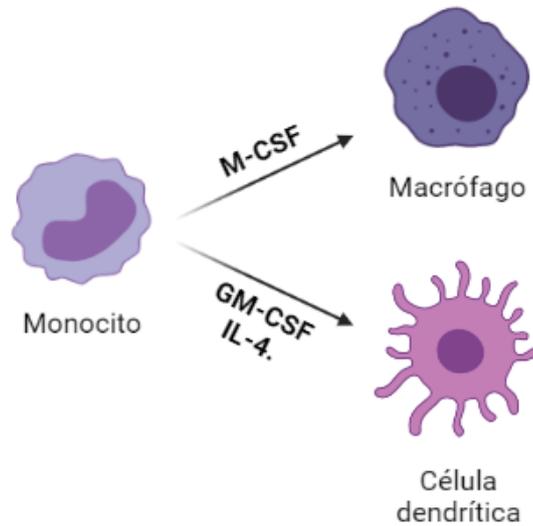


Figura 10 – Esquema de posibles diferenciaciones de monocitos. Creado con herramientas de BioRender. M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IL-4: interleuquina 4.

### 3.3.5 Inoculación de macrófagos

Finalizada la diferenciación de monocitos a macrófagos se procedió a realizar la inoculación de los mismos. De cada estudio se llevaron a cabo al menos un par de réplicas, cada una de ellas contando con un triplicado de cada tratamiento. Para ello se seleccionó el virus vacunal sin encapsular como control positivo, eligiéndose una multiplicidad de infección (MOI, relación entre células y partículas víricas) de 0.1. Las NPs con virus se añadieron en un rango de 3 a 8  $\mu\text{g}$  de virus y en la misma cantidad se colocaron NPs cargadas con el colorante Rojo de Nilo en su interior. Por último, también se colocaron NPs de PLGA vacías como control negativo. La inoculación se realizó en todos los casos mediante incubación de 90 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizado ese tiempo se procedió a lavar las células con PBS por duplicado y se les colocó medio nuevamente, pero ahora con solo un 2% de PNS.

En los experimentos desarrollados en este estudio se trabajó con la vacuna denominada Porcilis PRRS, la cual contiene la cepa DV del virus PRRS viva atenuada, con una dosis infectiva del 50% de las células en cultivos de tejidos (TCID<sub>50</sub>) de 10<sup>4.0</sup> – 10<sup>6.3</sup>. El objetivo final en las vacunas vivas es que el patógeno vacunal ingresado al organismo a través de las mismas se replique lo suficiente como para producir una fuerte respuesta inmunitaria,

pero no tanto como para causar manifestaciones significativas de la enfermedad. Es decir, se da un equilibrio entre la replicación suficiente del patógeno para inducir la respuesta inmunitaria y la atenuación suficiente del patógeno para evitar la enfermedad sintomática [29,30]

### 3.3.6 Análisis por citometría de flujo

Para realizar la tinción y posterior estudio de las células por citometría de flujo, primero se aplicaron 200  $\mu$ L de la enzima *Accutase* para levantar las células de las paredes de la placa y se incubaron 15 minutos en frío. A continuación, con 1 mL de PBS frío por pocillo y con ayuda de una pipeta automática se aspiró y expulsó el líquido sobre la superficie de la placa hasta levantar por completo las células y trasvasarlas a tubos. Una vez en los tubos, se lavaron, y se procedió a realizar el marcaje con los anticuerpos primarios seleccionados (figura 11). Primero se añadió el anticuerpo primario frente a CD163, marcador de superficie específico de macrófagos maduros, para lo que se incubaron las células 20 minutos en hielo, para luego lavar con PBS y centrifugar. A continuación, se incubó el anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 488 anti-mouse y se procedió de la misma forma.

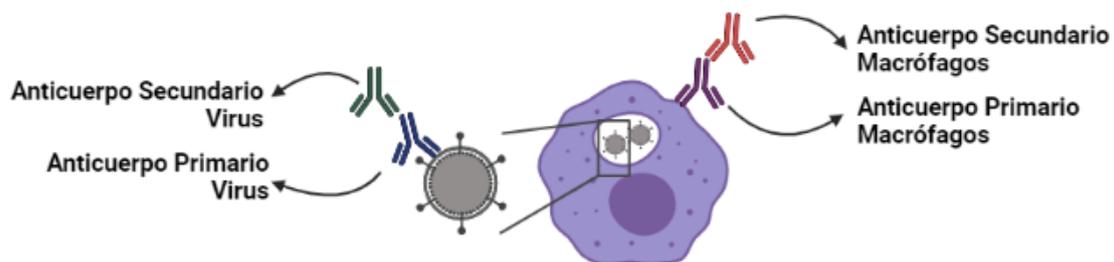


Figura 11 - Esquema del marcaje con anticuerpos específicos de marcadores de superficie de macrófagos y frente al virus. Creado con herramientas de BioRender.

Tras realizar esta primera tinción, en aquellos pocillos en los que las células fueron infectadas con el virus o con NPs que contenían el virus se procedió a fijar y permeabilizar las células. Para ello primero se añadió el agente fijador, solución de PFA al 4%, y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células, se

centrifugaron y se procedió a añadir el anticuerpo primario frente al virus PRRS. Se analizó el rendimiento de 3 anticuerpos distintos: SR30 (IgG1), SDOW17 (IgG1) y 1CH5 (IgG2b). Para aquellos donde el anticuerpo primario era IgG1 se utilizó de anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 647, mientras que para el 1CH5 al tratarse de IgG2b se utilizó Alexa Fluor™ 448 (fig 12). El Rojo de Nilo se midió directamente, sin necesidad de utilizar anticuerpos.

Se realizaron controles negativos utilizando los anticuerpos secundarios solos, sin añadir anticuerpo primario, para analizar si había unión inespecífica de los anticuerpos secundarios así como la fluorescencia propia de los anticuerpos.

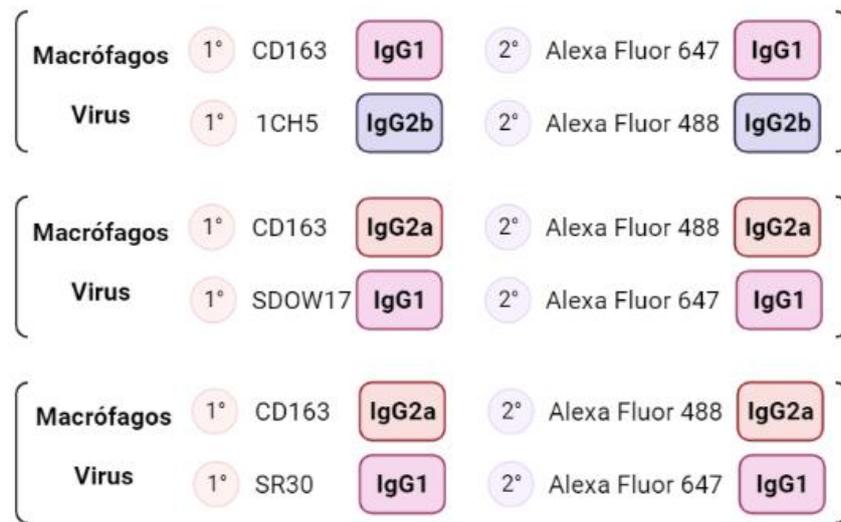


Figura 12 - Esquema de la combinación de anticuerpos seleccionados para el marcaje de CD163 y la proteína N del PRRSV. Creado con herramientas de BioRender.

### 3.3.7 Análisis de toxicidad del PLGA

Con el objetivo de determinar si las nanopartículas constituidas por PLGA poseen propiedades tóxicas se incubaron los macrófagos con distintas cantidades de NPs con virus encapsulado, colocándose 40, 120, 160, 200, 240, 320 y 400  $\mu$ L de soluciones 1 mg/mL de NPs por pocillo. Para ello se realizó un ensayo específico de viabilidad utilizando el kit *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain* que permite una determinación fácil y sensible de la viabilidad celular, la vitalidad celular y la citotoxicidad de los compuestos. La incubación con este kit se realizó de manera

simultánea a la incubación con el anticuerpo secundario específico frente a CD163 (sección 3.3.6). Finalmente, la medición se efectuó por citometría de flujo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas fueron sintetizadas por el método de coprecipitación con cuatro contenidos: vacías, conteniendo el virus vacunal (fig 13), Rojo de Nilo y Azul de Metileno, las últimas dos con el fin de ser utilizadas en experimentos subsiguientes.

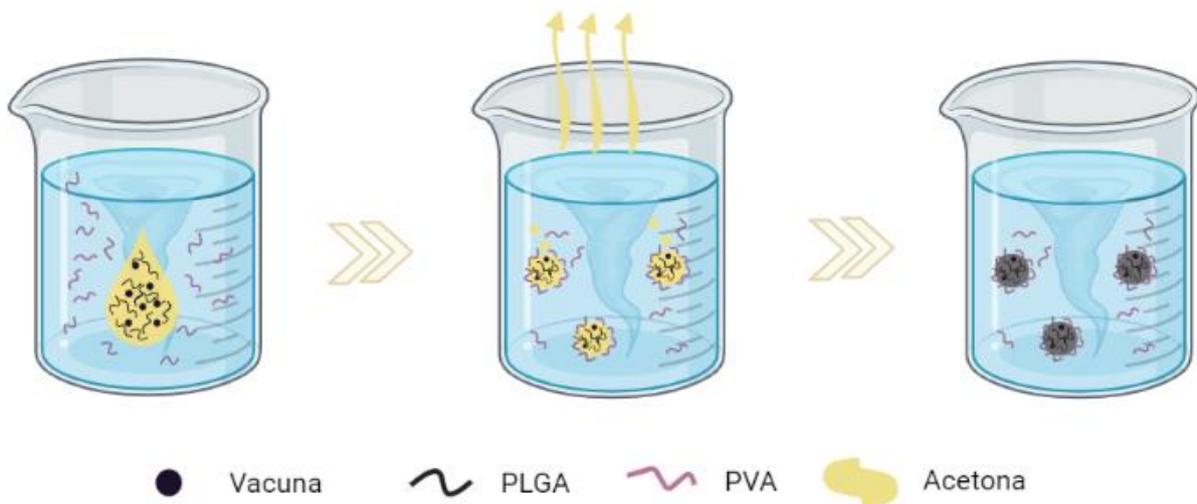
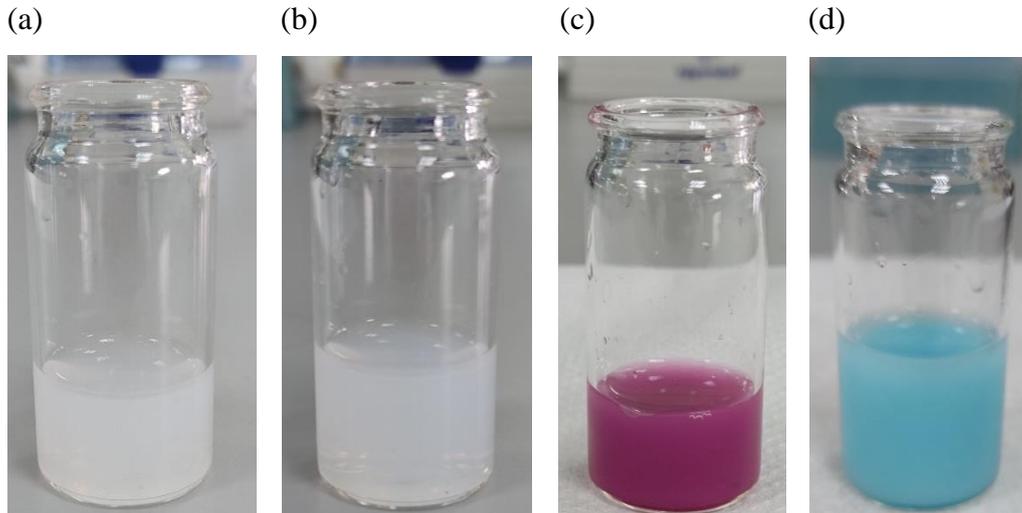


Figura 13 – Esquema del proceso de coprecipitación para obtener NPs de PLGA cargadas con virus vacunal. Adaptada de Pancani, et al., 2018.<sup>[41]</sup>

Las que se encontraban vacías y aquellas que contenían virus formaron suspensiones turbias de color blanquecino y al ser centrifugadas generaron pellets también blancos (fig 14a, b). En el caso de las NPs que contenían Rojo de Nilo se observó que cuando la solución de polímero y colorante entraba en contacto con la solución del surfactante se producía un cambio de color de rojo a violáceo, producto de la encapsulación y agregación del colorante (fig 14c). El mismo color violáceo se observó en el pellet, siendo el sobrenadante obtenido prácticamente incoloro. Sin embargo, al encapsular Azul de Metileno el sobrenadante obtenido fue de una coloración azul intensa (fig 14d). Esto no

resulta inesperado, ya que el Azul de Metileno es un colorante de naturaleza hidrofílica y por ende esta técnica no resulta tan eficiente para su encapsulación.



*Figura 14 – NPs de PLGA en suspensión a una concentración 1,5 mg/mL (a) vacías, (b) con vacuna, (c) con rojo de Nilo y (d) con Azul de Metileno*

Las imágenes obtenidas por SEM muestran la morfología esférica de las NPs sintetizadas (fig 15). También puede observarse una distribución de tamaños coherente con los datos obtenidos por medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS). Los resultados de DLS mostraron diámetros variables entre 100 y 500 nm, siendo las más abundantes las de valores cercanos a 200 nm.

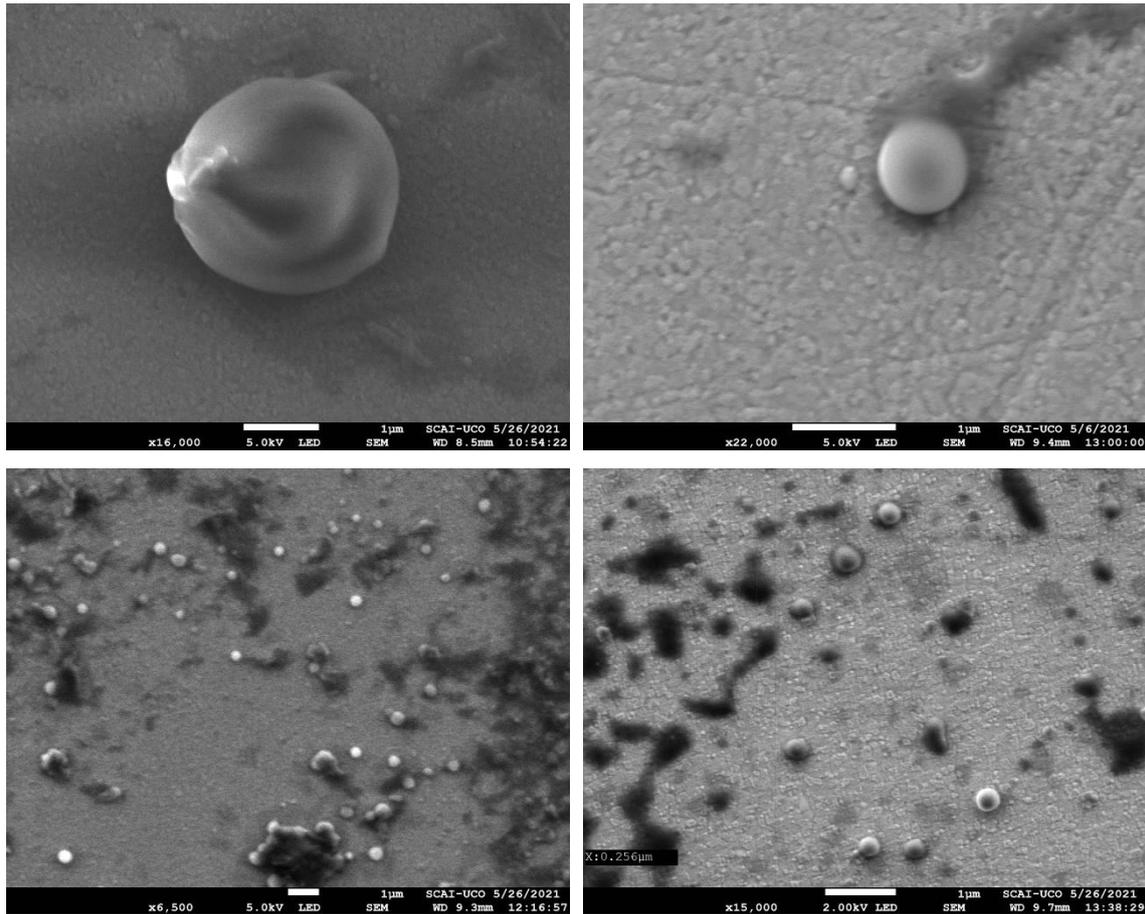


Figura 15 – Morfología de NPs (a) que contienen rojo de Nilo (a), vacuna (b y c), y vacías (d). Imagen tomada con Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 6300. Soluciones de NPs de concentración 1 mg/mL.

Tanto las NPs vacías como las de vacuna se sintetizaron en 3 relaciones en peso/volumen de PLGA:PVA. Se usó como condición de partida 100 mg de PLGA y 100 mL de PVA 0.5%. En aquellas NPs que contenían vacuna se mantuvo la relación vacuna:PLGA en 1:20. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos por DLS:

	NPs vacías (nm)	NPs con vacuna (nm)
100 mg PLGA – 100 mL PVA 0.5%	232 ± 2	253 ± 3
50 mg PLGA – 100 mL PVA 0.5%	236 ± 2	227 ± 2
100 mg PLGA – 50 mL PVA 0.5%	238 ± 2	225 ± 2

Tabla 2 – Tamaño de NPs vacías y con vacuna con diferentes relaciones PLGA:PVA obtenido mediante DLS.



Al no observarse diferencia en los tamaños de las NPs obtenidas se decidió continuar con el protocolo definido inicialmente en la bibliografía.<sup>[40]</sup> Las NPs que contenían los colorantes resultaron ser de tamaño similar a estas. El tamaño de las NPs se considera adecuado a los objetivos planteados en este trabajo de acuerdo a dos variables. En primer lugar, el tamaño del virus a encapsular que es de 54 nm, lo que indica que es factible que se encapsule en la nanopartícula polimérica.<sup>[42]</sup> Además, el proceso de fagocitosis en macrófagos presenta una máxima internalización de la partícula blanco en un rango de tamaño de 1-3  $\mu\text{m}$ , de forma que las NPs sintetizadas se encuentran dentro del mismo<sup>[43]</sup>.

Se determinó cuantitativamente la cantidad de virus que se encontraba encapsulado en las NPs. Para ello primero se realizó una curva de calibración utilizando soluciones patrones de BSA en NaOH 0.1 M y SDS 5%, que corresponde al protocolo de ruptura de las NPs. La curva resultante presentó la siguiente regresión lineal:

$$\text{Abs}_{280} = 9,819 \cdot 10^{-4} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)^{-1} C + 0,0026$$

y arrojó un coeficiente de regresión  $r^2$  de 0.999 (figura 16a). Los espectros obtenidos para cada una de las soluciones patrones en rango de longitud de interés se muestra en la figura 13 b. Se tomaron dos partidas de NPs que contenían virus y se les aplicó el proceso de ruptura con NaOH 0.1 M y SDS 5% con agitación por 24 horas, se centrifugó la solución resultante para eliminar los restos de polímeros de forma tal que no afecten la medida (figura 16 c). El contenido medio de proteína en las NPs fue de 3.3 – 3.8 % (p/p), lo que representa una eficiencia de encapsulación del 63 y 73%. Estos valores de eficiencia de encapsulación son comparables a los presentados en bibliografía, donde rondan el 50-55%.<sup>[12]</sup>

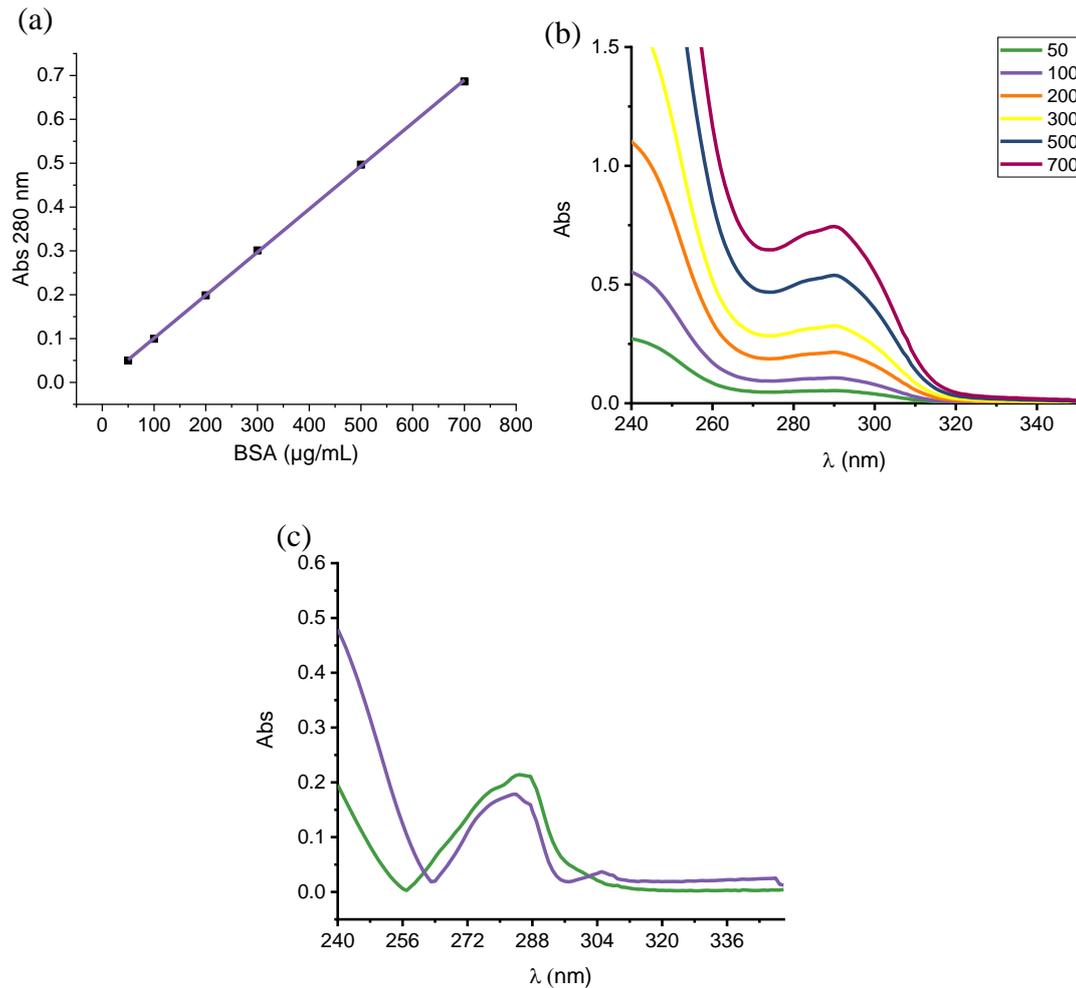


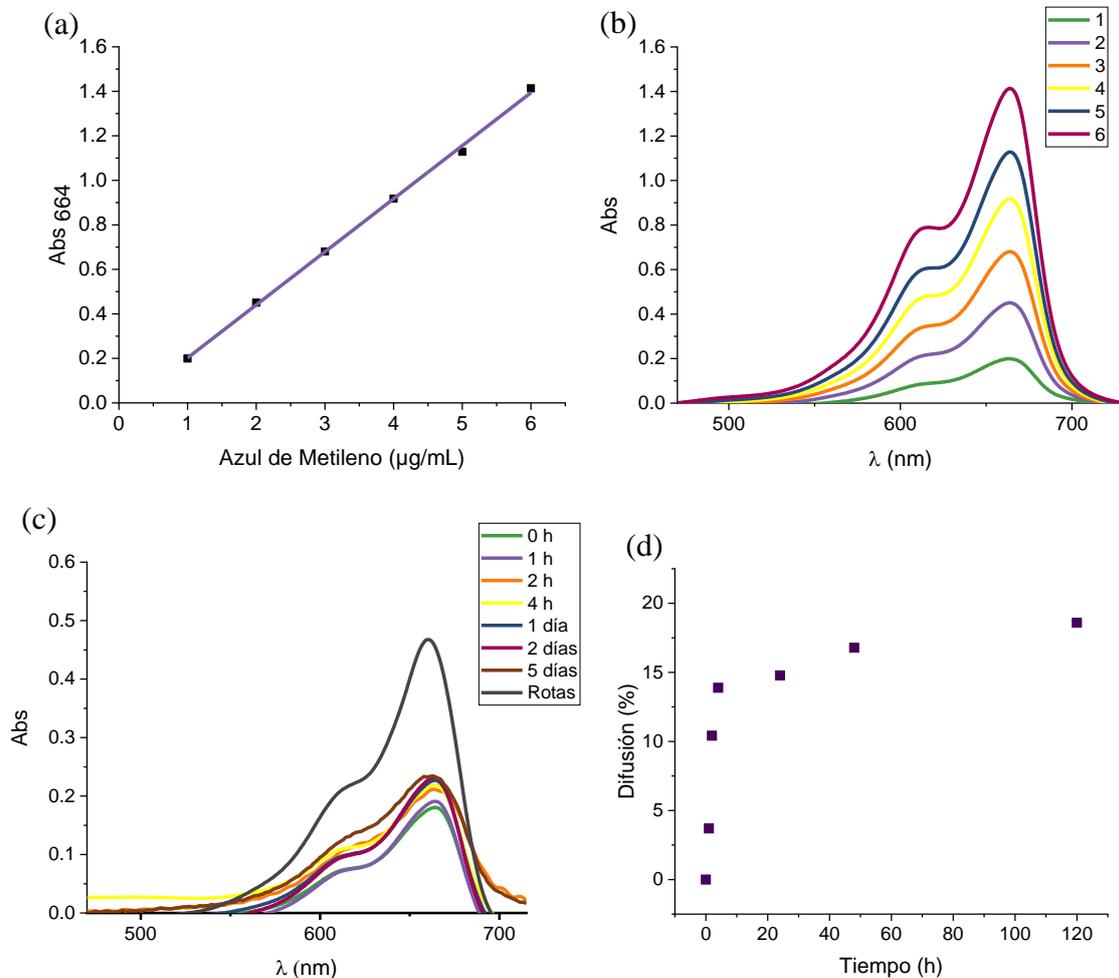
Figura 16 – (a) Curva de calibración de BSA midiendo su absorbancia a 280 nm. (b) Espectros de absorción UV-visible de soluciones patrones de BSA. Se indica su concentración en  $\mu\text{g/mL}$  dentro de la gráfica. (c) Espectros de absorción UV-visible de muestras de NPs degradadas mediante tratamiento con NaOH.

Para corroborar que el análisis realizado era correcto, se tomó una alícuota de virus (1.78 mg) y se realizó el mismo tratamiento que a las NPs: se suspendió la alícuota en solución NaOH 0.1 M y SDS al 5% y se dejó en agitación por 24 horas. A continuación, se realizó una dilución 1:10 (concentración final 178  $\mu\text{g/mL}$ ) y se midió su absorbancia en UV-visible. El valor de absorbancia obtenido fue de 0.173, correspondiente a una concentración de virus de 170.4  $\mu\text{g/mL}$ . El resultado permite concluir que es correcto utilizar BSA como sustancia patrón para la cuantificación del virus.

Se estudió el perfil de difusión del contenido de las NPs utilizando Azul de Metileno debido a su alto coeficiente de extinción molar. Para ello primero se realizó una curva de calibración (figura 17a), la cual presentó la siguiente regresión lineal:

$$\text{Abs}_{664} = 0,2385 \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)^{-1} C - 0,0361$$

y arrojó un coeficiente de regresión  $r^2$  de 0.999. Se presentan también los espectros de las soluciones patrones en las longitudes de onda de interés (figura 17b) y de las muestras tratadas para el análisis de difusión (figura 17c). Considerando como 100% la carga total de las NPs una vez rotas utilizando el tratamiento descrito en la sección 3.3.2 y como 0% al valor obtenido a tiempo 0 horas del experimento, se obtuvo un perfil de difusión característico de las NPs (figura 17d, tabla 3).



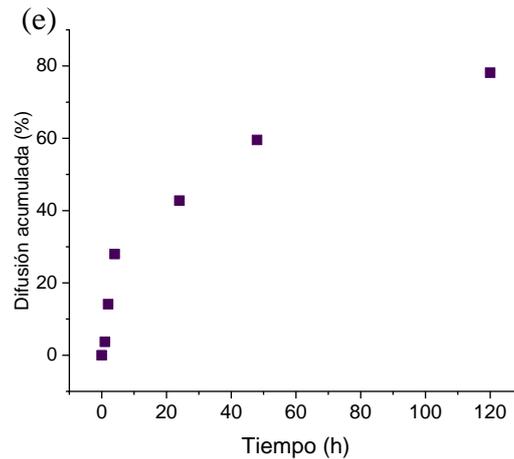


Figura 17 – (a) Curva de calibración de Azul de Metileno midiendo su absorbancia a 664 nm. (b) Espectros de absorción UV-visible de soluciones patrones de Azul de Metileno de concentraciones de 1 a 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (c) Espectros de absorción UV-visible de muestras centrifugadas a distintos tiempos y rotas. (d) Perfil de difusión del sistema. (e) Perfil de difusión acumulada.

	0 h	1 h	2 h	4 h	1 día	2 días	5 días	Rotas
<b>Absorbancia 664 nm</b>	0.181	0.191	0.211	0.219	0.227	0.232	0.233	0.456
<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0.909	0.952	1.037	1.069	1.103	1.124	1.129	2.064
<b>Volumen (mL)</b>	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Masa colorante (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	0.909	0.952	1.037	1.069	1.103	1.124	1.129	2.064
<b>Diferencia masa (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	0.000	0.043	0.128	0.160	0.194	0.215	0.220	1.155
<b>Porcentaje (%)</b>	0.0	3.7	10.4	13.9	14.8	16.8	18.6	-
<b>Difusión acumulada (%)</b>	0.0	3.7	14.1	28.0	42.8	59.6	78.1	-

Tabla 3 – Análisis cuantitativo del colorante en sobrenadante por difusión

Estos resultados nos indican que las NPs pierden hasta una quinta parte de su contenido por difusión en 5 días cuando se encuentran en suspensión. Teniendo en cuenta estos resultados los ensayos biológicos subsiguientes se realizaron con partículas realizadas dentro de un periodo de tiempo de 2 horas.

## 4.2 Aislamiento de monocitos y diferenciación a macrófagos

Tras realizar el aislamiento de los PBMCs se obtuvo un pellet con dos fases, una inferior de color rojo, correspondiente a los eritrocitos, y una superior blanquecina, donde se encontraban los propios PBMCs. El conteo de las células se llevó a cabo según lo descrito en la sección 3.3.4 (fig 19), obteniendo un rendimiento máximo de hasta  $7.38 \cdot 10^8$  células partiendo de 100 mL de sangre.

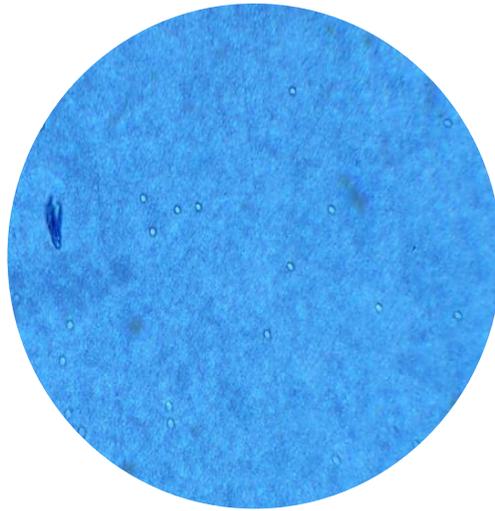


Figura 18 – Fotografía ampliada del microscopio aumento 10x del conteo de PBMCs en cámara de Neubauer, donde se puede observar claramente las células brillantes.

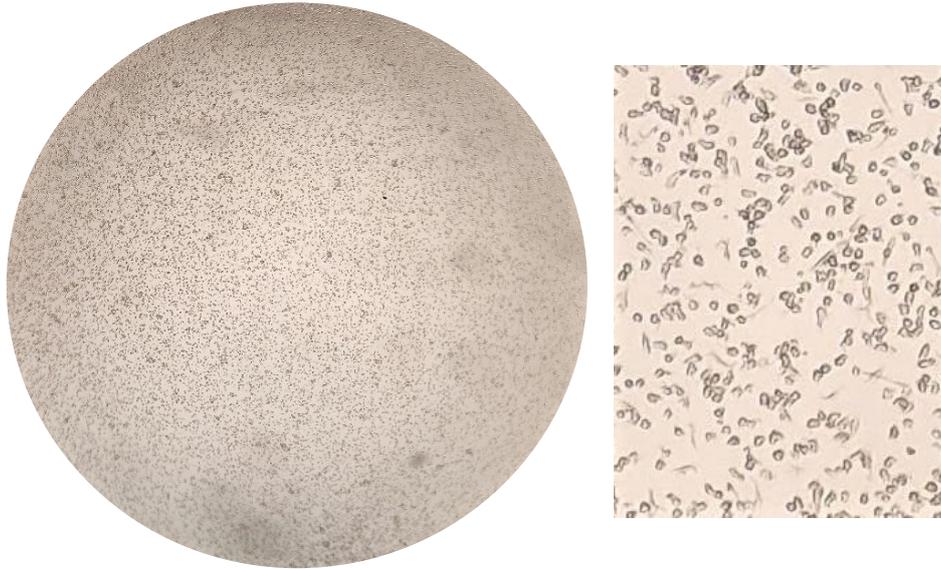
De las técnicas aplicadas para la selección positiva de monocitos a partir de PBMCs, se consideró considerablemente más eficiente la metodología de clasificación celular activada magnéticamente (MACs) utilizando columnas LS, obteniendo un rendimiento de un 95%. En la técnica de aislamiento por adherencia no fue posible cuantificar los monocitos obtenidos ya que una vez adheridos en las placas se continuó con el procedimiento *in situ* en la placa. No obstante, la diferencia en la cantidad de células obtenidas mediante ambos métodos se observaba fácilmente al microscopio así como por citometría de flujo. Además, en el caso de MACS junto a las columnas LS se trabajó con dos anticuerpos distintos específicos de monocitos, el mouse antiipig-CD172a y el mouse antihuman-CD14. El rendimiento obtenido con ambos anticuerpos fue similar, sin embargo, por cuestiones de disponibilidad y coste económico, se prefirió trabajar con el anticuerpo mouse antiipig-CD172a.

Los monocitos se dejaron madurar durante 4 días, observando como durante este periodo de tiempo las células, inicialmente monocitos (fig 19a), fueron progresivamente adquiriendo morfología compatible con macrófagos, células de mayor tamaño y complejidad que presentaban multitud de gránulos en el citoplasma celular, y en algunos casos, se pudo observar presencia de pseudópodos (fig 19b). Para conseguir la derivación de monocito a macrófago se utilizaron diferentes concentraciones de PNS, el cual contiene factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), citoquina que estimula la maduración macrofágica. Así, de las diferentes concentraciones utilizadas, se observó que suplementando con un 30% de PNS, obteníamos un mayor número de células compatibles con macrófagos, y por ende se continuó trabajando con dicha concentración. Estos resultados están a su vez avalados por estudios previos realizados por otros autores con similares resultados.<sup>[44]</sup>

(a)



(b)



*Figura 19 – (a) Izquierda: fotografía del microscopio aumento 10x de la placa donde se sembraron los monocitos. Derecha: ampliación de la primera imagen, donde se puede observar la morfología esférica de los monocitos. (b) Izquierda: fotografía del microscopio aumento 10x de la placa donde se encuentran los macrófagos ya diferenciados. Derecha: ampliación de la primera imagen, donde se puede observar el mayor tamaño y la morfología esférica con protuberancias de los macrófagos.*

#### ***4.4 Análisis de carga viral en NPs mediante RT-qPCR***

La RT-qPCR se utiliza cuando el objetivo es amplificar ARN a partir de muestras problema, como sería en nuestro caso al tratarse el PRRSV de un virus ARN. De esta forma, el objetivo en este caso es detectar la presencia del ARN vírico, para lo que utilizamos una one-step RT-qPCR, la cual combina en un solo paso una fase inicial de transcripción inversa y posteriormente una fase de amplificación. Este tipo de qPCR permite, además, realizar una semi cuantificación de la cantidad de virus presente en las células a partir del valor de Cq (Cq, del inglés *quantification cycle*). El valor de Cq hace referencia al número mínimo de ciclos necesarios para que la fluorescencia generada por la amplificación supere la intensidad de fluorescencia generada por el ruido de fondo.<sup>[45]</sup> Por tanto, el valor de Cq está inversamente relacionado con la cantidad de ARN vírico

presente en las células, es decir, a mayor cantidad de ARN vírico menor será el valor de Cq obtenido.

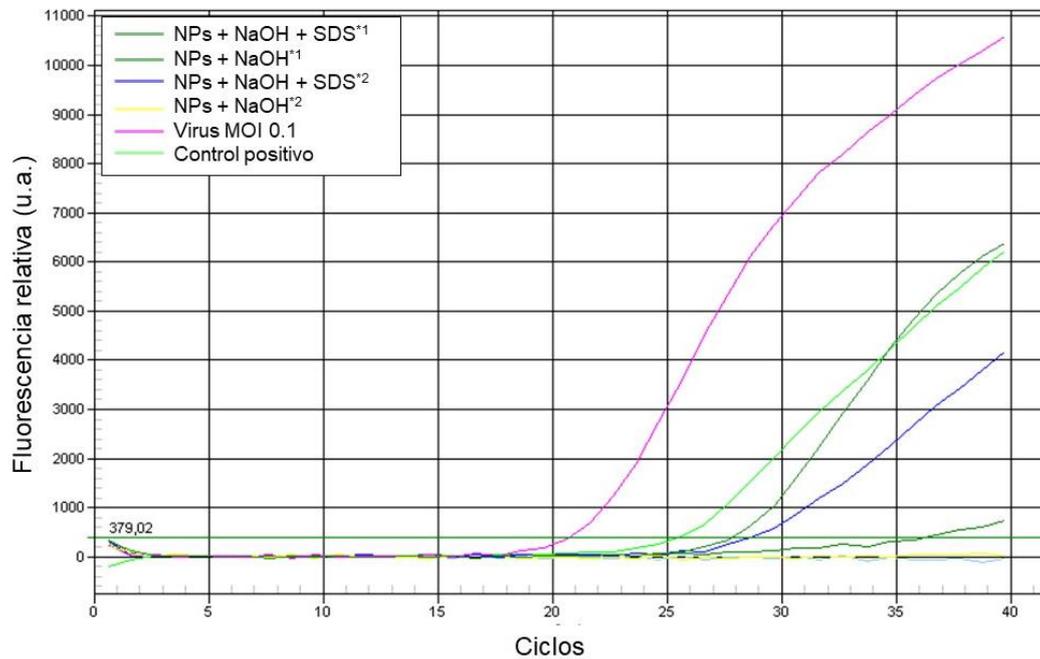


Figura 20 – Curvas de amplificación del virus PRRS obtenidas por RT-qPCR.

Muestra	NPs + NaOH + SDS <sup>1</sup>	NPs + NaOH <sup>1</sup>	NPs + NaOH + SDS <sup>2</sup>	NPs + NaOH <sup>2</sup>	Virus MOI 0.1 <sup>1</sup>	Control positivo
Cq	25	37	29	-	21	24

<sup>1</sup>: Extracción realizada con NucleoSpin® RNA virus (Macherey-Nagel)

<sup>2</sup>: Extracción realizada con TRIzol

Tabla 4 – Resultados de los Cq's obtenidos para las distintas muestras estudiadas por RT-qPCR.

En este sentido, como se observa en la tabla 4 y en la figura 20, las NPs cumplieron el objetivo de encapsular el virus vacunal, obteniendo una concentración suficiente para ser detectado mediante RT-qPCR. Sin embargo, algunas consideraciones deberían hacerse al respecto. Por un lado, los valores de Cq obtenidos para las NPs variaron en función de dos parámetros, el método de extracción de ARN empleado, obteniéndose un mayor rendimiento utilizando el kit de NucleoSpin® RNA virus (Macherey-Nagel), y también

según el método de ruptura utilizado, siendo más efectiva la ruptura con NaOH y SDS. En este sentido, como observamos en la figura 16, los valores de Cq disminuyeron cuando la NPs se rompieron con NaOH y SDS, demostrando que la ruptura sólo con NaOH es incompleta, afectando así a los resultados de la RT-qPCR.

Respecto al aumento del valor de Cq de las NPs en comparación con el virus vivo, probablemente, varios factores podrían estar implicados como la degradación parcial del ARN vírico durante el proceso de encapsulación, así como el tratamiento para la ruptura de las NPs, factores que podrían haber afectado a la integridad del ARN.

## 4.5 Análisis por citometría de flujo de macrófagos inoculados

### 4.5.1 Estrategia de portales (*gating*)

Para comenzar el análisis de los resultados de citometría de flujo, se requiere primero definir manualmente la población celular de estudio. Para ellos se excluyeron como se muestra en la figura 21 las células muertas, para así identificar las células vivas en función de su tamaño (FSC, desviación frontal de la luz) y su complejidad interna, como la granulosidad (SSC, dispersión lateral). El valor generado por el software *FlowJo* al seleccionar la población indica que, en este caso, el 74.9% de las células presentes en la muestra corresponde a macrófagos, que en nuestro caso consisten en macrófagos derivados de monocitos (MDMs).

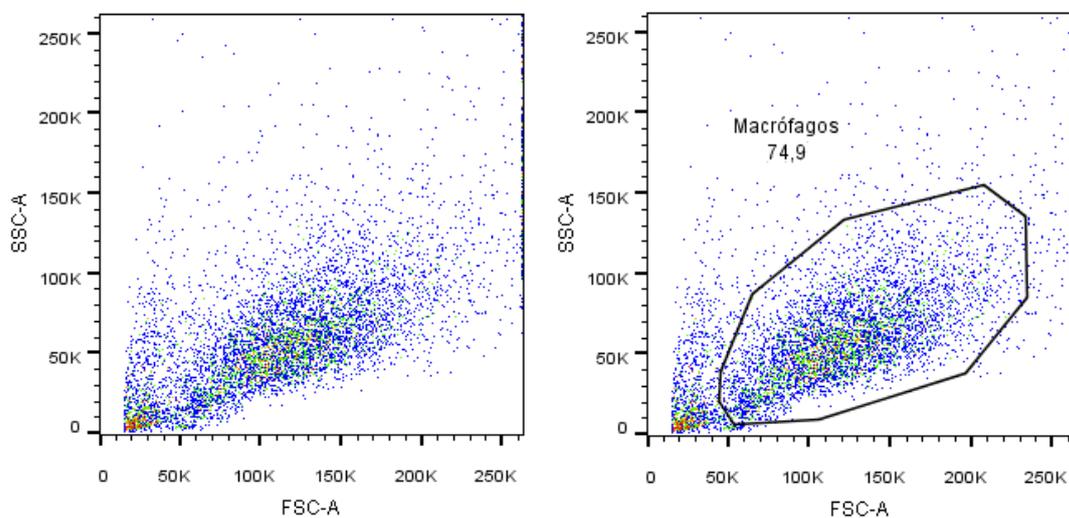
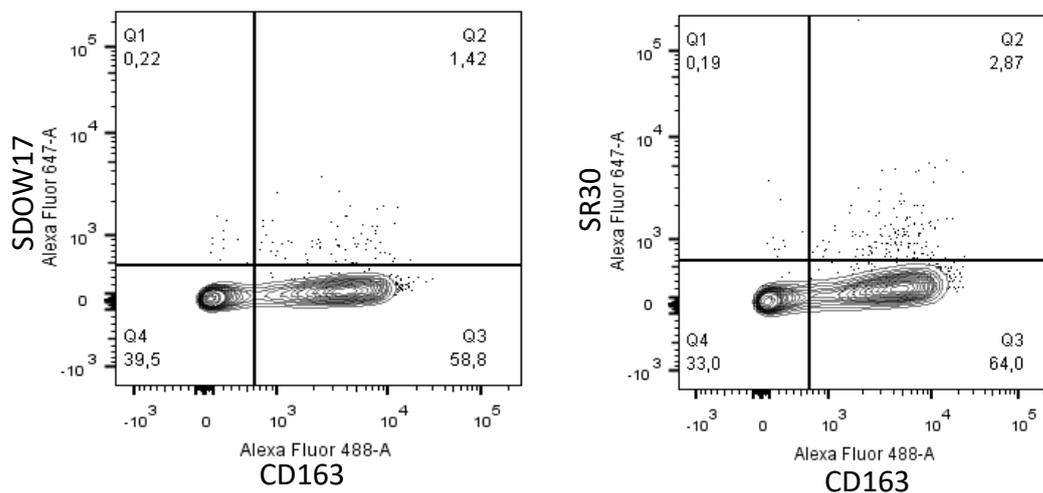


Figura 21 – Estrategia de *gating* y selección de población de macrófagos vivos.

#### 4.5.2 Selección del anticuerpo primario frente a la proteína N del virus

Con el objetivo de obtener la mayor sensibilidad para detectar el virus mediante citometría de flujo, se utilizaron 3 anticuerpos primarios diferentes para detectar células infectadas por PRRSV. Así, de los 3 anticuerpos monoclonales estudiados, el clon anti-SR30 presentó una mayor sensibilidad comparado con el clon anti-SDOW17, y el clon anti-C1H5, el cual fue incapaz de detectar células infectadas (Fig 22). En el primer cuadrante Q1 se observan las células positivas al virus y negativas a CD163, por lo que no se observa señal, ya que esta molécula se considera el receptor esencial para la infección por el PRRSV<sup>[46]</sup>. En el segundo cuadrante Q2 se muestran las células de interés, positivas al virus y al CD163, observando el rendimiento de cada anticuerpo (en % de células infectadas). Por último, en los cuadrantes Q3 y Q4 se observan las células positivas a CD163 y negativas para el virus, y células negativas para ambos marcajes, respectivamente.



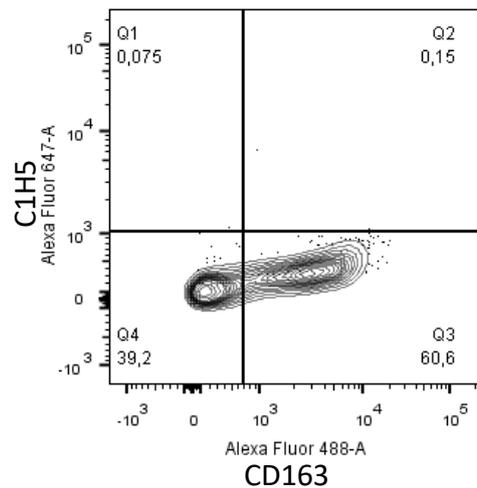


Figura 22 – Gráficos de contornos obtenidos tras analizar los resultados de citometría de flujo utilizando cada uno de los distintos anticuerpos monoclonales ensayados frente el virus PPRS.

A raíz de los resultados obtenidos, se decidió proceder los siguientes análisis para detectar la infección de macrófagos con virus y con NPs con virus utilizando el anticuerpo anti-SR30. Estudios anteriores coinciden con los resultados aquí presentados pero también ponen de relieve que la detección del virus con un único anticuerpo puede conllevar a una falta de reproducibilidad en los resultados.<sup>[47]</sup>

#### 4.5.3 Determinación de macrófagos y virus por citometría de flujo

Con el objetivo de determinar si los MDMs eran capaces de fagocitar las NPs, los macrófagos fueron enfrentados a NPs que en su interior contenían el fluorocromo Rojo de Nilo. Otros pocillos con macrófagos, fueron enfrentados directamente con el virus como control positivo así como NPs cargadas con virus. Se trabajó con dos lotes de NPs cargadas con virus, las denominadas NPs x1 y las NPs x2, ambas están sintetizadas de la misma forma, sólo se diferencian en que al producir las segundas se partió del doble de cantidad de virus a encapsular (5 vs 10 mg). Como controles negativos se utilizaron MDMs a las que sólo se le añadieron NPs vacías así como otros pocillos con MDMs que se trataron únicamente con medio de cultivo estéril y sirvieron como blanco celular. Todas las combinaciones de los distintos pocillos fueron analizadas mediante citometría de flujo llevando a cabo un marcaje doble, el correspondiente a macrófagos activados

(CD163, Alexa Fluor™ 488) y el correspondiente a la proteína N del virus PRRS (SR30, Alexa Fluor™ 647), además del marcaje frente al fluorocromo Rojo de Nilo previamente mencionado.

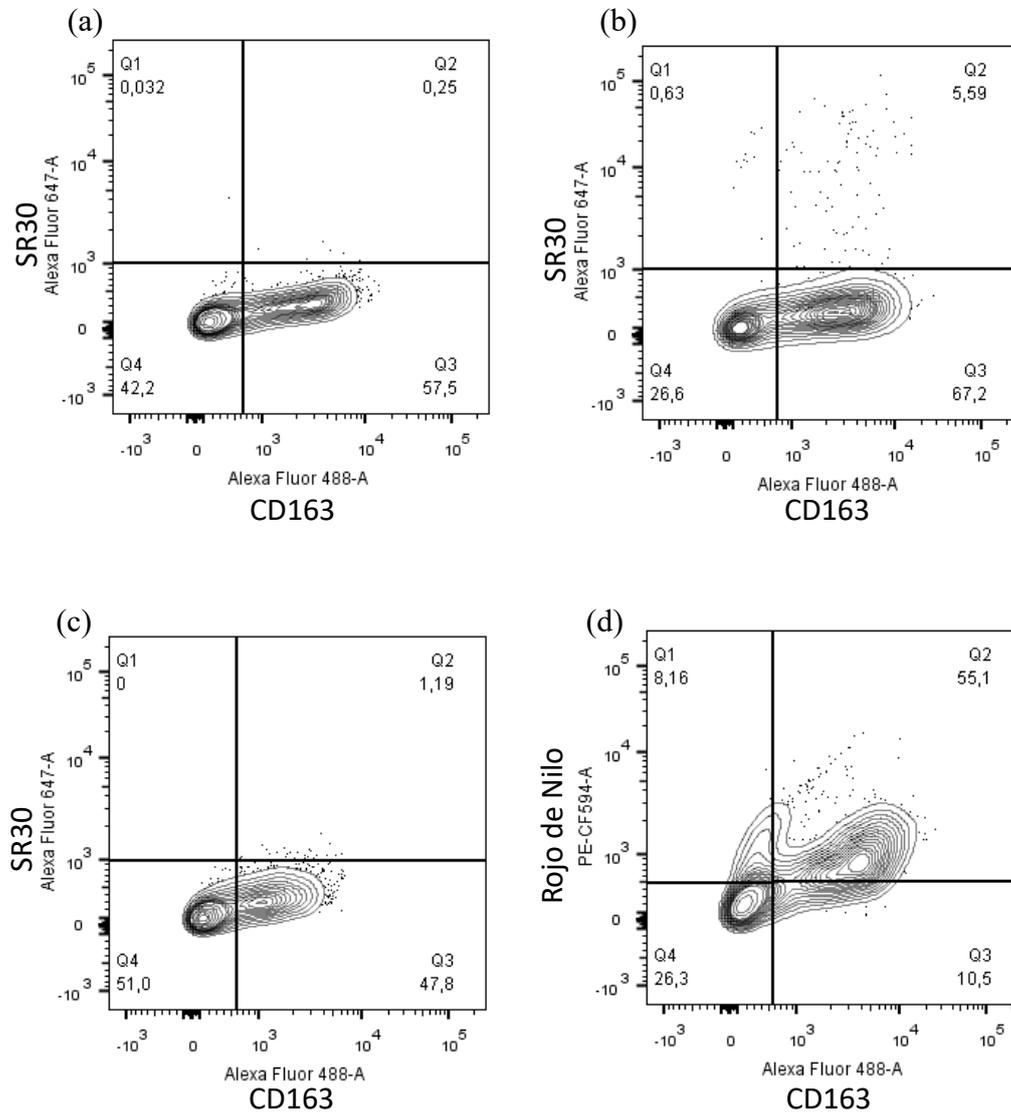


Figura 23 - Gráficos de contornos obtenidos por citometría de flujo representativos de las condiciones estudiadas (a) Control. (b) Virus vacunal MOI 0.1. (c) NPs x1 a 240 µL. (d) NPs con Rojo de Nilo a 40 µL.

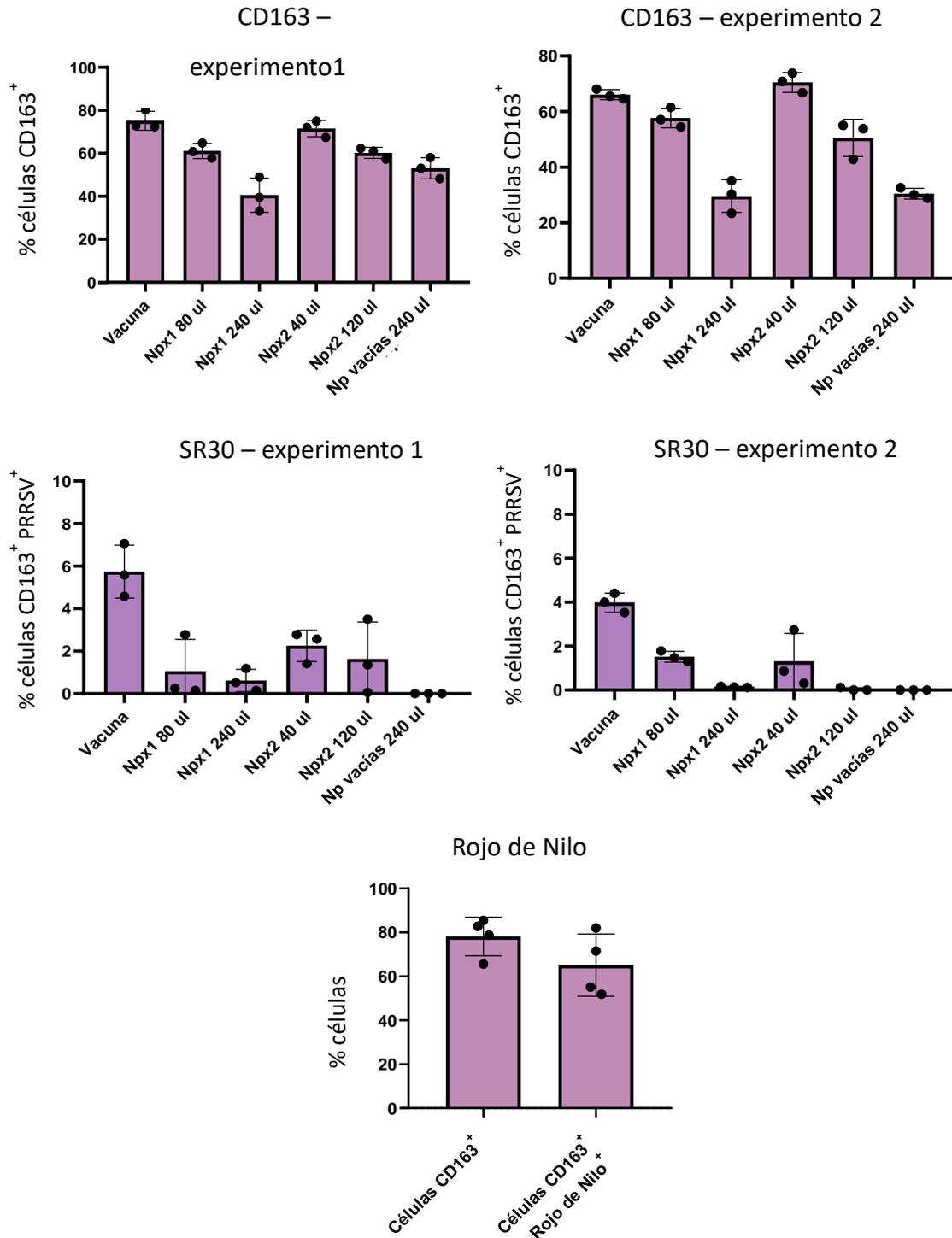


Figura 24 – Gráficos de Barras expresando los resultados de la frecuencia de células frente a cada uno de los marcajes utilizados en citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos para la determinación de CD163 y SR30.



Los resultados obtenidos demuestran que en promedio las muestras presentan entorno a un 70% de población celular marcada frente a CD163, pero siendo menor este marcaje cuando las muestras han sido tratadas con NPs. La frecuencia de células CD163<sup>+</sup> es similar a la descrita previamente por otros autores<sup>[48]</sup>. No obstante, la disminución del marcaje en las células tratadas con NPs indica que éstas afectan de alguna forma a la población de MDMs dando lugar a una disminución en la expresión de CD163.

Respecto al virus, aquellas células inoculadas con virus vacunal no encapsulado a una MOI 0.1, presentaron un porcentaje de infección promedio del 5%. Este porcentaje de infección es relativamente bajo, sin embargo, puede deberse a que se trata de un virus vacunal atenuado cuya capacidad de replicación es baja.

Los porcentajes de infección logrados por las NPs x1 y las NP x2 fueron bajos y variables, y además al aumentar la cantidad de NPs colocadas se presenta un menor porcentaje de infección, contrario a lo esperado. Varios factores podrían estar implicados en los bajos valores de infección obtenidos. Como se mencionó anteriormente, uno puede ser la degradación parcial del ARN vírico durante el proceso de encapsulación, para corroborar esta hipótesis podría realizarse a futuro el mismo experimento trabajando con un virus ADN, ya que el ADN es más estable y resistente. A su vez, también se observó que las NPs afectan a la población de macrófagos, esto también podría alterar la capacidad de captación de las NPs y la posterior replicación del virus.

Por último, los macrófagos enfrentados a NPs que contenían en su interior Rojo de Nilo presentaron una frecuencia promedio del 65% sobre el total de células CD163<sup>+</sup>, lo que indica que los MDMs son capaces de fagocitar las NPs cargadas.

#### **4.5.4 Análisis de toxicidad de las NPs por citometría de flujo**

Con el objetivo de conocer si las NPs poseían propiedades tóxicas frente a las células, se trató los MDMs con distintas cantidades de NPs y se les añadió un marcador de viabilidad para ser estudiadas por citometría de flujo. Se trabajó con las mismas cantidades de NPs cargadas con virus que en el estudio de inoculación (sección 4.5.3) y además con dos volúmenes mayores (figura 26).

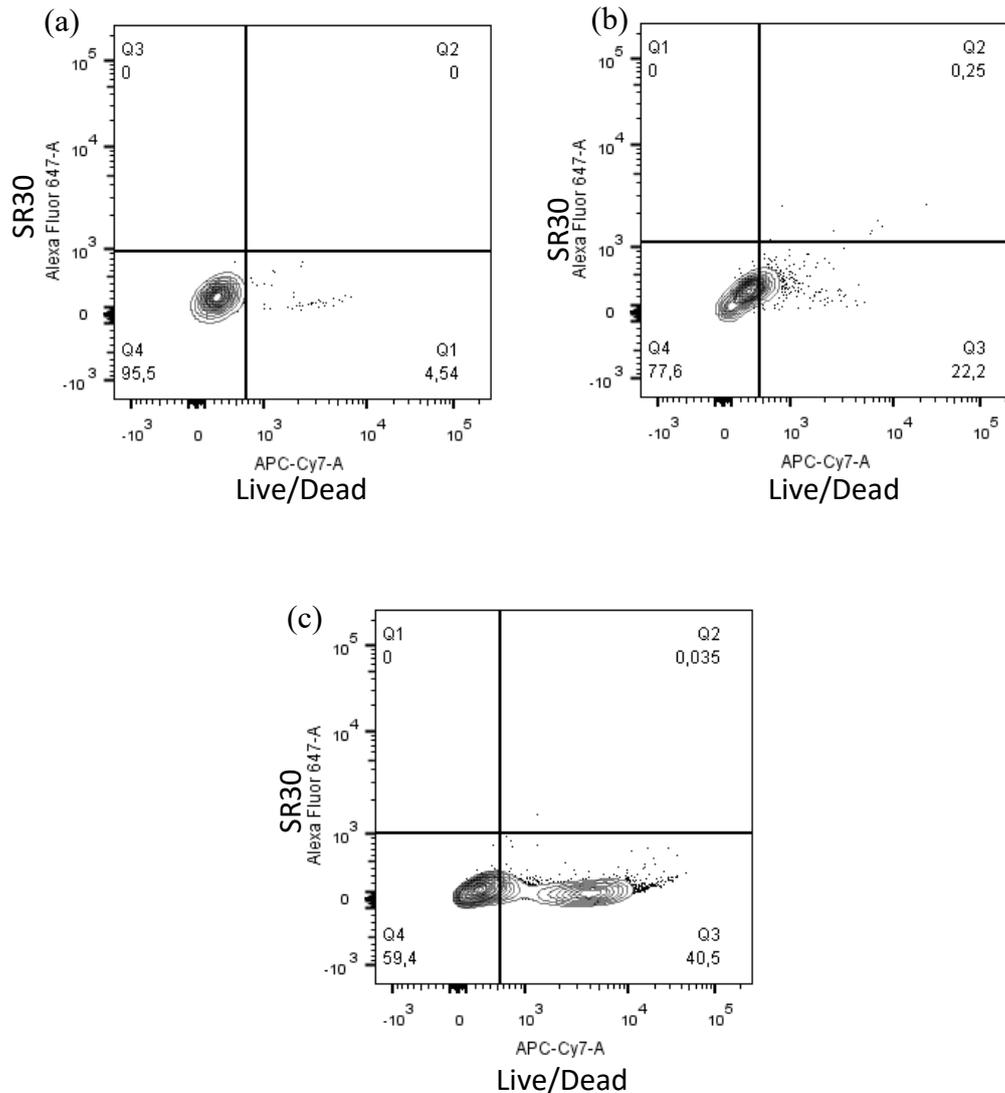


Figura 25 - Gráficos de contornos obtenidos por citometría de flujo representativos de las condiciones estudiadas, donde en el primer cuadrante Q1 se observan las células positivas al virus y negativas al Live/Dead, en el cuadrante Q2 se muestran las células positivas a ambos marcajes, en el cuadrante Q3 se encuentran las células negativas al virus pero positivas al Live/Dead y en el Q4 están las células negativas a ambos marcajes. (a) NPs x1 a 80  $\mu$ L. (b) NPs x2 a 160  $\mu$ L. (c) NPs vacías a 400  $\mu$ L.

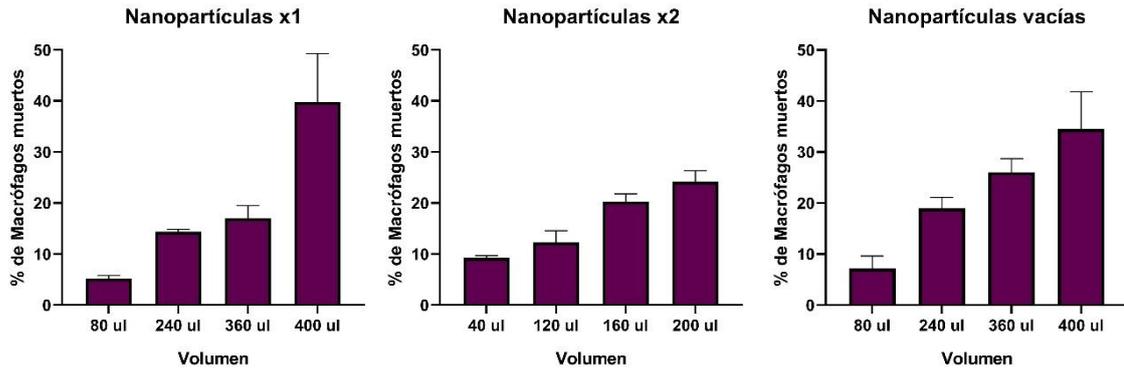


Figura 26 – Mortalidad de macrófagos en porcentaje en función de los volúmenes de nanopartículas, en soluciones de 1 mg/mL.

El experimento realizado arrojó una tendencia general en la que al aumentar la cantidad de NPs colocadas se observa un aumento en el porcentaje de MDMs muertos. Las gráficas correspondientes a NPs x1 y las NPs vacías presentaron resultados similares, mientras que en aquellas células inoculadas con NPs x2 se observaron valores de mortalidad ligeramente menores, sobre todo para la mayor cantidad de NPs. Estos resultados son predecibles ya que en el último caso se trabaja con una cantidad de NPs menores al encapsular con la doble cantidad de virus. Sin embargo, estos porcentajes de muerte son altos en relación a las cantidades de NPs añadidas, por lo que puede deducirse que aunque las NPs contengan características tóxicas por sí mismas, el hecho de que contengan mayor cantidad de virus también afecta a la viabilidad de estas.

Conviene tener en cuenta que en este estudio se ha trabajado con MDMs, una población celular que se ha descrito como de interés para estudios de la patogenia del PRRSV.<sup>[49]</sup> Sin embargo, la célula diana del virus en una infección natural es el macrófago alveolar pulmonar (MAP), por lo que sería interesante llevar a cabo un estudio similar utilizando MAPs para determinar tanto la toxicidad de las NPs como la interacción de éstas con la célula diana del virus.



## 5. CONCLUSIONES

Este trabajo ha tenido como eje conductor la encapsulación del virus vacunal PRRS en NPs de PLGA. Se ha demostrado que la síntesis de estas NPs por método de coprecipitación es un método simple y efectivo, con una eficiencia cercana al 70%. También, se ha probado que la relación entre el PLGA y el PVA no afecta el tamaño de las NPs obtenidas y que hasta una quinta parte del contenido de las NPs es eliminado por difusión en 5 días cuando las mismas se encuentran en suspensión.

Se han aislado primero las PBMCs de sangre periférica porcina para luego proceder a la selección positiva de monocitos por la metodología de separación magnética (MACS), obteniendo un elevado rendimiento del 95%. Los monocitos han sido derivados a macrófagos utilizando el porcentaje óptimo de PNS del 30%, determinado también en este trabajo.

A través de la RT-qPCR se ha confirmado que las NPs se encontraban cargadas con el PRRSV. También se observó un valor de Cq elevado, el cual puede deberse a la degradación parcial del ARN vírico durante el proceso de encapsulación o al tratamiento para la ruptura de las NPs.

Los estudios realizados por citometría de flujo se han realizado utilizando el anticuerpo SR30 para el marcaje de la proteína N del virus, que fue el anticuerpo que mostró la mejor eficiencia, así como el anticuerpo anti-CD163, como marcador de maduración y activación de macrófagos. Se observó que la inoculación con las NPs afectaba la expresión de superficie del CD163. Asimismo, la infección lograda con las NPs cargadas con virus atenuada era baja. Se observó que al aumentar la cantidad de NPs cargadas con virus la infección disminuyó, así como el porcentaje de muerte de las células lo que podría explicar este resultado. La infección obtenida por el virus vacunal PRRS sin encapsular fue cercana a un 5%, probablemente asociada a que se trata de un virus atenuado. Por último, analizando un marcaje de células vivas/muertas se han cuantificado la citotoxicidad de las NPs, observándose un efecto tóxico proporcional a la cantidad de NPs utilizadas, independientemente de que estas estuvieran o no cargadas con virus PRRS atenuado.



## 5. CONCLUSIONS

The main aim of the present work was the encapsulation of PRRS vaccine virus in PLGA NPs. We have demonstrated that the synthesis of NPs by coprecipitation technique is a relatively simple and effective process, with an efficiency close to 70%. Also, it has been proved that the ratio between PLGA and PVA does not affect the size of the obtained NPs and that up to 20% of the NPs content is eliminated by diffusion in 5 days.

PBMCs were isolated from porcine peripheral blood, and then monocytes were positively selected by magnetic separation (MACS), obtaining a high yield of 95%. The monocytes were derived to macrophages using the optimal PNS percentage of 30%, also determined in this study.

RT-qPCR confirmed that the NPs were loaded with PRRSV but also showed an elevated C<sub>q</sub> value, which may be due to the partial degradation of the viral RNA during the encapsulation process or the treatment to disrupt the NPs.

Flow cytometry studies were performed using the SR30 antibody for labelling the protein N of the virus, as it showed the best performance, and anti-CD163 antibody, for macrophage maturation and activation labelling. A downregulation in CD163 was observed in those cells with NPs and a low infection was achieved by virus-loaded NPs. Unencapsulated PRRS vaccine virus was able to infect close to 5% of the cells, probably due to the use of attenuated live virus. Finally, by using the LIVE/DEAD™ kit which determinates the viability of cells, a proportional toxicity effect was observed according to the volume of NPs in use, independently of being empty or virus-loaded NPs.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, F. Rizzolio, *Molecules* **2020**, *25*, 1–15.
- [2] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12*, 908–931.
- [3] J. Behari, *Indian Journal of Experimental*, **2010**, *48*, 1008-1019.
- [4] A. C. Apolinário, G. C. Salata, A. F. R. Bianco, C. Fukumori, L. B. Lopes, *Química Nova* **2020**, *43*, 212–225.
- [5] K. M. El-Say, H. S. El-Sawy, *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *528*, 675–691.
- [6] M. Elsabahy, K. L. Wooley, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2545–2561.
- [7] J. Ahlawat, G. Henriquez, M. Narayan, *Molecules* **2018**, *23*, 1–20.
- [8] S. D. Steichen, M. Caldorera-Moore, N. A. Peppas, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *48*, 416–427.
- [9] A. Zielińska, F. Carreiró, A. M. Oliveira, A. Neves, B. Pires, D. N. Venkatesh, A. Durazzo, M. Lucarini, P. Eder, A. M. Silva, A. Santini, E. B. Souto, *Molecules* **2020**, *25* (16), 3731.
- [10] M. Mir, N. Ahmed, A. ur Rehman, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231.
- [11] S. Sharma, A. Parmar, S. Kori, R. Sandhir, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 30–40.
- [12] V. Dwivedi, C. Manickam, B. Binjawadagi, D. Joyappa, G. J. Renukaradhya, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51794.
- [13] L. W. E. S. Jane Flint, Vincent R. Racaniello, Glenn F. Rall, Anna Marie Skalka, *Principles of Virology*, **2015**, John Wiley & Sons.
- [14] J. Drefs, S. Salwig, J. Lücke, *bioRxiv* **2021**, n.pag.
- [15] E. J. Snijder, M. Kikkert, Y. Fang, *Journal of General Virology* **2013**, *94*, 2141–2163.
- [16] X. Tang, C. Wu, X. Li, Y. Song, X. Yao, X. Wu, Y. Duan, H. Zhang, Y. Wang, Z. Qian, J. Cui, J. Lu, *National Science Review* **2020**, *7*, 1012–1023.



- [17] B. Raffaella Pagani, *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **2020**, 86, 189–214.
- [18] R. W. Wills, J. J. Zimmerman, K. J. Yoon, S. L. Swenson, L. J. Huffman, M. J. McGinley, H. T. Hill, K. B. Platt, *Veterinary Microbiology* **1997**, 57, 69–81.
- [19] J. E. Collins, D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw, S. M. Goyal, S. McCullough, R. B. Morrison, H. S. Joo, D. Gorcyca, D. Chladek, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **1992**, 4, 117–126.
- [20] M. P. Murtaugh, M. R. Elam, L. T. Kakach, *Archives of virology*, **1995**, 140, 1451–1460.
- [21] S. McCullough, D. Gorcyca, D. Chladek, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **1992**, 4, 117–126.
- [22] D. Faaberg, K.S., Balasuriya, U.B., Brinton, M.A., Gorbalenya, A.E., Leung, F.C-C., Nauwynck, H., Snijder, E.J., Stadejek, T., Yang, H. and Yoo, “Arteriviridae - Virus Taxonomy (2020) - Positive Sense RNA Viruses - ICTV,” can be found under [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/220/arteriviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/220/arteriviridae), **n.d.**
- [23] J. Ruggeri, G. Ferlazzo, M. B. Boniotti, L. Capucci, F. Guarneri, I. Barbieri, G. L. Alborali, M. Amadori, *PLoS ONE* **2020**, 15, e0229065.
- [24] M. S. Spilman, C. Welbon, E. Nelson, T. Dokland, *Journal of General Virology* **2009**, 90, 527–535.
- [25] F. Fenner, P. A. Bachmann, E. P. J. Gibbs, *Fenner’s Veterinary Virology - 5th Edition*, **2016**.
- [26] C. Cunningham, *Pork Checkoff Study: PRRS Costs Industry \$664 Million Annually*, **2011**.
- [27] J. Gómez-Laguna, F. J. Salguero, F. J. Pallarés, L. Carrasco, *Veterinary Journal* **2013**, 195, 148–155.
- [28] E. Crisci, L. Fraile, M. Montoya, *Veterinary Sciences* **2019**, 6, 26.
- [29] A. J. Pollard, E. M. Bijker, *Nature Reviews Immunology* **2021**, 21, 83–100.
- [30] A. Iwasaki, S. B. Omer, *Cell* **2020**, 183, 290–295.
- [31] M. A. Kappes, K. S. Faaberg, *Virology* **2015**, 479–480, 475–486.
- [32] S. T. Lankenau, *Vaccine Design*, **2016**, Springer New York.



- [33] S. Jorge, O. A. Dellagostin, *Biotechnology Research and Innovation* **2017**, *1*, 6–13.
- [34] T. v Meenambigai, K. Anbukumar, M. Madhanmohan, **2021**, *10*, 170–174.
- [35] Y. Nan, C. Wu, G. Gu, W. Sun, Y. J. Zhang, E. M. Zhou, *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 1–17.
- [36] C. Chae, *Vaccines* **2021**, *9*, 1–16.
- [37] B. Binjawadagi, V. Dwivedi, C. Manickam, K. Ouyang, Y. Wu, L. J. Lee, J. B. Torrelles, G. J. Renukaradhya, *International Journal of Nanomedicine* **2014**, *9*, 679–694.
- [38] V. Dwivedi, C. Manickam, B. Binjawadagi, G. J. Renukaradhya, *Veterinary Microbiology* **2013**, *166*, 47–58.
- [39] V. Martini, M. Hinchcliffe, E. Blackshaw, M. Joyce, A. McNee, P. Beverley, A. Townsend, R. MacLoughlin, E. Tchilian, *Frontiers in Immunology* **2020**, *11*, 2798.
- [40] C. Jiang, M. A. Cano-Vega, F. Yue, L. Kuang, N. Narayanan, G. Uzunalli, M. P. Merkel, S. Kuang, M. Deng, *Molecular Therapy* **2017**, *25*, 1718–1729.
- [41] E. Pancani, M. Menendez-Miranda, A. Pastor, F. Brisset, M. F. Bernet-Camard, D. Desmaële, R. Gref, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8*, 420–431.
- [42] P. Ii, T. Positive, S. Single, S. Rna, *Virus Taxonomy* **2012**, 796–805.
- [43] C. Debjani, Paul; Sarra, Achouri; Young-Zoon, Yoon; Jurgen, Herre; Clare E., Bryant; Pietro, **n.d.**
- [44] G. Franzoni, P. Bonelli, S.P. Graham, A.G. Anfossi, S. Dei Giudici, G. Pilo, M. Pittau, P. Nicolussi, A. Oggiano, *Veterinary immunology and immunopathology* **2017**, *187*, 80–88.
- [45] T. D. Schmittgen, K. J. Livak, *Nature Protocols* **2008**, *3*, 1101–1108.
- [46] H. van Gorp, W. van Breedam, J. van Doorsselaere, P. L. Delputte, H. J. Nauwynck, *Journal of Virology* **2010**, *84*, 3101–3105.
- [47] J. C. F. Rappe, O. García-Nicolás, F. Flückiger, B. Thür, M. A. Hofmann, A. Summerfield, N. Ruggli, *Veterinary Research* **2016**, *47*, 1–17.
- [48] G. Franzoni, S. P. Graham, S. D. Giudici, P. Bonelli, G. Pilo, A. G. Anfossi, M. Pittau, P. S. Nicolussi, A. Laddomada, A. Oggiano, *Veterinary Microbiology* **2017**, *198*, 88–98.



- [49] O. García-Nicolás, A. Baumann, N. J. Vielle, J. Gómez-Laguna, J. J. Quereda, F. J. Pallarés, G. Ramis, L. Carrasco, A. Summerfield, *Virus Research* **2014**, *179*, 204–211.