



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Defain Tesoriero, María Victoria

Nanoadyuvantes para ruta mucosa a partir de fuentes sustentables de lípidos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Defain Tesoriero, M. V. (2016). *Nanoadyuvantes para ruta mucosa a partir de fuentes sustentables de lípidos.* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/188>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Nanoadyuvantes para ruta mucosa a partir de fuentes sustentables de lípidos

TESIS DOCTORAL

María Victoria Defain Tesoriero

vickydefain@yahoo.com.ar

Resumen

Este trabajo de Tesis Doctoral describe el diseño y caracterización de liposomas preparados con lípidos aislados de arqueobacterias (ARQ) para generar respuestas inmunes antígeno-dependientes por la ruta oral en modelos animales de laboratorio.

Para ello, se comenzó con el aislamiento y la amplificación en medio salino (3,5 M) de arqueobacterias a partir de muestras de suelo de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina). Las mismas se identificaron como *H. tebenquichense*. Los lípidos polares totales (LPT) se extrajeron y caracterizaron por cromatografía en capa delgada mono y bidimensional (TLC-1D y 2D) y espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). La mezcla de LPT estaba compuesta por: los fosfolípidos arqueales 2,3-di-O-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerofosfato metil éster (PGP-Me) y 2,3-di-O-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerol (PG); la cardiolipina *sn*-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-*sn*-di-O-fitanilglicerol (BPG); el sulfoglicolípido, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol (S-DGD-5) y la cardiolipina glicosilada (S-DGD-5-PA). Con los LPT aislados se planteó una primera aproximación para evaluar la factibilidad de obtención de arqueosomas (ARQ) empleando homogeneización de alta presión (HPH) aplicando un DoE multivariado. Los resultados demostraron que los ARQ ofrecieron una gran resistencia a la disminución del tamaño por HPH. Esto podría deberse a la hidrofobicidad de los arqueolípidos y la presencia de cardiolipinas arqueales que conferirían una mayor rigidez a la membrana. Y por último, se prepararon ARQ con ovoalbúmina (OVA), como proteína modelo, a escala laboratorio para evaluar métodos de caracterización estructural de las vesículas obtenidas utilizando propilenglicol (Pg) para aumentar la incorporación de la proteína. Los ARQ obtenidos tuvieron un tamaño menor a 200 nm (Z_{Ave}) y su Pdl fue menor a 0,300. El potencial Z fue menor a -30 mV, lo que justificaría la estabilidad física en suspensión de estas vesículas. En todos los casos las T_m y pre-T_m fueron menores a -20°C. La incorporación de proteína no mejoró con el uso de Pg y la relación proteína/lípido fue de $\approx 0,100$ mg/mg.

Luego, se utilizaron técnicas para el análisis de la captura y tráfico intracelular de ARQ, en células J774A.1, como modelo de macrófago y en células Caco-2, como modelo de enterocito. Para lo cual se utilizaron inhibidores de las diferentes rutas endocíticas y se cuantificó la internalización de los ARQ fluorescentes a través de la citometría de flujo. Estos estudios fueron complementados por microscopía confocal láser de barrido (MCLB) para determinar la co-localización con Lysotracker®, marcador de organelas ácidas. Los resultados revelaron que aparentemente, las células Caco-2 capturarían ARQ mediante

endocitosis mediada por caveolina y macropinocitosis. Además, se halló que las células J774A.1, capturaron ARQ no sólo mediante la clásica fagocitosis, sino también por endocitosis mediada por clatrina y por caveolina. Los LPT utilizados para la preparación de estos ARQ no poseen arqueotiliserina en su composición pero fueron ávidamente capturados por las células J774A.1. De un modo alternativo se podría postular la manosa terminal de los arqueolípidos SDGD-5 y SDGD-5-PA que interactuaría con receptores específicos presentes en APC para favorecer su captura. Este trabajo es el primero que muestra estudios *in vitro* sistemáticos sobre las vías de internalización y tráfico intracelular de ARQ en líneas celulares no fagocíticas.

También se realizó un estudio comparativo de la capacidad de unión a células M de los ARQ preparados exclusivamente con arqueoles aislados de *H. tebenquichense*, respecto a liposomas de fosfatidilcolina de soja/colesterol, mediante un modelo *in vitro* de barrera epitelial mucosa utilizando dispositivos Transwell®. La fluorescencia, luego de 1 y 2 horas de incubación con ARQ marcados en el interior acuoso con un colorante piranínico fluorescente (HPTS) y la bicapa lipídica con RhPE, fue 4 veces mayor que la observada con liposomas marcados del mismo modo. Además, con muestras de ARQ, el 15% de RhPE y 13% de HPTS se encontraron en el compartimiento basolateral de los Transwell®, espacio equivalente al bolsillo basolateral de las células M. Por el contrario, no se detectó fluorescencia con los liposomas. Estos hallazgos revelarían una mayor velocidad de transcitosis de los ARQ comparado con los liposomas. Los resultados *in vitro* fueron sustentados por los hallazgos *in vivo*, donde se determinó la biodistribución del radiofármaco hidrosoluble ^{99m}Tc -DTPA incorporado a ARQ versus liposomas después de la administración oral en ratas Wistar. Luego de 4 horas, los ARQ fueron los responsables del 22,3 % (3,5 veces mayor que los liposomas) del ^{99m}Tc -DTPA, hallado en circulación. Esta importante cantidad de marcador radiactivo en sangre podría ser consecuencia de la gran captura de los ARQ por las células M *in vivo*, probablemente favorecida por las características hidrofóbicas de estas vesículas. En suma, estos resultados sugerirían que los ARQ, con una capacidad adyuvante probada por vía parenteral y biocompatibilidad demostrada, podrían ser un adecuado material nanoparticulado para utilizarse como adyuvante por la ruta oral.

Y por último, se propuso la incorporación de antígenos solubles de *T. cruzi* a ARQ (ARQ-Tc) con el objeto de realizar ensayos de inmunización por ruta oral en un modelo de animales de laboratorio. Ratones hembra C3H/HeN se inmunizaron vía oral con una dosis de aproximadamente 200 µg de proteína y/o 2 mg de lípidos en un volumen máximo de 200 µl. El esquema de inmunización fue 0-14-21-63 días. La respuesta humoral se determinó a través del dosaje de anticuerpos clase IgG anti-*T. cruzi* por ensayo inmunoenzimático (ELISA, del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*) en fase sólida en muestras de suero. Para evaluar la respuesta inmune a nivel de mucosas se tomaron muestras de saliva y materia fecal y se cuantificó el título de IgA por ELISA.

Las vesículas obtenidas (ARQ-Tc y ARQ) tuvieron un tamaño menor a 200 nm y el Pdl fue menor a 0,400. El potencial Z fue menor a -30 mV.

En los experimentos de digestión *in vitro* desarrollados se demostró que los ARQ protegerían la proteína incorporada. Además, a través del análisis por ESI-MS, los arqueolípidos evidenciaron una resistencia estructural al ambiente hostil del tracto gastrointestinal en experimentos *in vitro*, con lo cual los restos de manosa, a quienes se asigna la capacidad adyuvante, no se perderían. Sin embargo, los resultados del ensayo de inmunización mostraron solamente un ratón, perteneciente al grupo que recibió ARQ-Tc, con títulos elevados de IgG sérica (>6400) a partir de la quinta semana (14 dpi). Este título se

mantuvo luego de 14 días de la cuarta dosis. En ningún caso se detectaron títulos de IgA en muestras de saliva. En este contexto, se discuten estrategias para encarar futuros abordajes experimentales.

Directora: Prof. Dra. Eder Lilia Romero

Co-Directora: Prof. Dra. María José Morilla

Índice

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN: Adyuvancia por vía mucosa y Arqueobacterias

- 1.1 El sistema inmune
- 1.2 Inmunidad de mucosas
- 1.3 La interconexión de la inmunidad de mucosas
- 1.4 Diferencias entre las superficies mucosas
- 1.5 Arquitectura de las mucosas, el mucus
- 1.6 Medición de la inmunidad de mucosas
- 1.7 Los adyuvantes
- 1.8 Diseño de vacunas para administración por ruta mucosa
 - 1.8.1 Aspectos críticos para el diseño de vacunas por rutas mucosas
 - 1.8.1.1. Capacidad de atravesar mucosas
 - 1.8.1.2. Biodistribución y acceso a las células presentadoras de antígeno
 - 1.8.1.3. Mejoramiento de la estabilidad y liberación controlada del antígeno
- 1.9 Las Arqueobacterias
 - 1.9.1 Los arqueolípidos
 - 1.9.2 Arqueosomas, vesículas lipídicas con propiedades adyuvantes
 - 1.9.3 Aislamiento de arqueobacterias Halorubrum tebenquichense en la Patagonia argentina
- 1.10 Métodos de preparación de arqueosomas
 - 1.10.1 Escala laboratorio
 - 1.10.2 Escala industrial
- 1.11 Tamaño de partícula y Potencial Z para la caracterización de material particulado
 - 1.11.1 Tamaño de partícula
 - 1.11.2 Potencial Z

Objetivos de esta Tesis doctoral

Capítulo 2

ARQUEOSOMAS: Preparación y caracterización

Introducción

Materiales

Métodos

- 2.1 Aislamiento y cultivo de arqueobacterias
- 2.2 Extracción, cuantificación y caracterización de arqueolípidos
 - 2.2.1 Extracción de lípidos polares totales (LPT)
 - 2.2.2 Cuantificación de fosfolípidos
 - 2.2.3 Cromatografía en capa delgada monodimensional y bidimensional
 - 2.2.4 Espectrometría de masas de ionización por electrospray
- 2.3 Preparación de arqueosomas por homogeneización de alta presión (HPH)
- 2.4 Diseño experimental aplicado a HPH de arqueosomas
- 2.5 Preparación de arqueosomas con OVA a escala laboratorio. Separación de fracción libre de OVA. Disolución de arqueosomas y cuantificación de OVA
 - 2.5.1 Preparación de arqueosomas conteniendo OVA a escala laboratorio
 - 2.5.2 Separación de OVA libre por cromatografía de exclusión molecular
 - 2.5.3 Separación de OVA libre por centrifugación de dispositivos filtrantes
 - 2.5.4 Disolución de arqueosomas para cuantificación de proteínas
 - 2.5.5 Cuantificación de proteínas
- 2.6 Caracterización estructural de arqueosomas conteniendo OVA: distribución de tamaño de partícula, potencial Z, calorimetría diferencial de barrido
- 2.7 Análisis estadístico

Resultados

- 2.8 Crecimiento de arqueobacterias
- 2.9 Extracción, cuantificación y caracterización de LPT
 - 2.9.1 Cuantificación de fosfolípidos
 - 2.9.2 Cromatografía en capa delgada monodimensional y bidimensional
 - 2.9.3 Espectrometría de masas de ionización por electrospray de LPT de H. tebenquichense
- 2.10 Aplicación de DoE a la preparación de arqueosomas por HPH
- 2.11 Preparación de arqueosomas conteniendo OVA a escala laboratorio

2.11.1 Separación de proteína libre

2.11.2 Disolución de arqueosomas para cuantificación de OVA

2.12 Caracterización fisicoquímica de arqueosomas conteniendo OVA

Discusión

Capítulo 3

Captura y tráfico intracelular de ARQUEOSOMAS

Introducción

Materiales

Métodos

3.1 Aislamiento y cultivo de arqueobacterias

3.2 Extracción, cuantificación y caracterización de LPT

3.3 Preparación de ARQ

3.3.1 ARQ marcados con Rodamina

3.3.2 ARQ marcados con HPTS

3.4 Determinación de tamaño, potencial Z y fosfolípidos de ARQ y L

3.5 Cultivo celular

3.5.1 Citotoxicidad de ARQ

3.5.2 Cinética de captura de ARQ y L

3.5.3 Citotoxicidad de inhibidores de endocitosis y de ARQ

3.5.4 Captura de ARQ en presencia de inhibidores de endocitosis

3.5.5 Marcadores de endocitosis

3.5.5.1. Captura de TFR (marcador de CME)

3.5.5.2. Captura de LacCer (marcador de CvME)

3.5.5.3. Captura de DEX (marcador de macropinocitosis)

3.5.6 Estudios de colocalización de LysoTracker® con ARQ y L

3.6 Análisis estadísticos

Resultados

3.7 Caracterización de ARQ y L

3.8 Cinética de captura de ARQ y L

3.9 Citotoxicidad de ARQ e inhibidores de endocitosis

3.10 Captura en presencia de inhibidores de la endocitosis

3.10.1 Efecto de los inhibidores sobre células J774A.1

3.10.2 Efecto de los inhibidores sobre células Caco-2

3.11 Estudios de captura de ARQ y L por microscopía confocal láser de barrido (MCLB)

3.12 Colocalización de ARQ con LysoTracker®

Discusión

Capítulo 4

Modelo in vitro de barrera epitelial mucosa

Administración oral de ARQUEOSOMAS

Introducción

Materiales

Métodos

4.1 Crecimiento de arqueobacterias y aislamiento de LPT

4.2 Preparación de ARQ y caracterización fisicoquímica

4.3 Citotoxicidad

4.4 Preparación de co-cultivos Caco2/Raji

4.5 Estudios de unión y transporte de ARQ y L in vitro

4.6 Estudio de digestión in vitro de homogenato de T. cruzi incorporado a ARQ y L

4.7 Evaluación de la resistencia química de los arqueolípidos a fluidos gastrointestinales simulados

4.8 Radiomarcación de vesículas

4.9 Administración oral y biodistribución

4.10 Análisis estadístico

Resultados

4.11 Caracterización estructural de ARQ y de L

4.12 Citotoxicidad en células Caco-2

4.13 Estudios de unión y transporte

4.14 Digestión in vitro

4.15 Administración oral y biodistribución

Discusión

Capítulo 5

Inmunización por ruta oral con ARQUEOSOMAS

Introducción

Materiales

Métodos

- 5.1 Crecimiento de arqueobacterias
- 5.2 Extracción y caracterización de lípidos polares totales
- 5.3 Obtención de antígenos solubles de *T. cruzi* (Tc)
- 5.4 Preparación de ARQ con antígenos solubles de Tc (ARQ-Tc)
- 5.5 Grado de incorporación de proteínas a ARQ
- 5.6 Esquema de inmunización
- 5.7 ELISA
- 5.8 Análisis estadístico

Resultados

- 5.9 Caracterización de muestras
- 5.10 Inmunización

Discusión

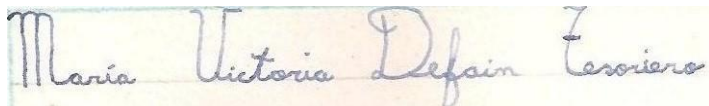
Capítulo 6

CONCLUSIONES

Bibliografía

Agradecimientos

Cuando estaba en primer grado, escribí por primera vez mi largo nombre en letra cursiva y con tinta azul:

A photograph of a handwritten signature in blue ink on lined paper. The signature reads "María Victoria Defain Esquivero" in a cursive script.

Al corregir mi cuaderno, la Srta. María Luisa anotó “Lo hice solita” y me enorgullecí tanto... Muchos años después escribí esta tesis y no lo hice solita. Para lograrla conté con la ayuda de muchas personas, cientos de personas, sin las cuales hubiera sido imposible su concreción. ¡¡Y me enorgullece tanto!!! A todos ellos quiero expresarles mi profundo agradecimiento.

Pido disculpas de antemano, si entre esos cientos, me olvido de alguien. Es altamente probable.

Eder Romero, mi querida directora de tesis, directora con todas las letras... Esto de mi diálogo interior hace que tengan que interpretarme qué es lo que quise decir en lugar de decir lo que quiero, y que no haya necesidad de interpretaciones (what?). Por eso, fue fundamental su labor, tanto en el diseño y seguimiento del trabajo experimental como en la redacción de estos capítulos. Pasaron de ser un torbellino de ideas a un “tratado” medianamente ordenado y coherente. Gracias a su creatividad, rigurosidad científica y su cariño es que este trabajo tuvo un final feliz. Además, desestructurar una personalidad como la mía no es tarea fácil, y ella hizo mucho para ello, supongo que la vida se encargará del resto.

María José Morilla, la Colo, con quien discutí los resultados meticulosamente. Una persona brillante. Ella leyó TODAS las versiones de estos 6 capítulos con absoluta dedicación sin mediar obligación. Sus observaciones y cuestionamientos siempre me ayudaron a pensar y reflexionar sobre lo escrito con más detenimiento. Además de sus valiosos aportes durante todo este tiempo de experimentos y escritura, en concreto, el capítulo 4 lo elaboré gracias a su trabajo. No en vano terminó siendo la co-directora de esta tesis.

Y con ellas, viene adjunto el Programa de Nanomedicinas, del que he formado parte. Mis compañeras de laboratorio de la UNQ en estos años. Un grupo maravilloso, con capacidades complementarias, comprometido con su trabajo y sobre todo, buena gente. Esas características no se encuentran fácilmente en *tandem* en un grupo de trabajo y menos en el ambiente de la investigación. Es una de las cosas que valoro de mi tesis, haberlas conocido y poder trabajar con ellas. Por todo lo compartido, que va más allá del laboratorio. Priscila Schilrreff, con quien trabajé en cultivos celulares cuando recién me iniciaba en la tesis y ella terminaba su carrera de grado. Y con esa energía que la caracteriza, compartimos

horas en el flujo laminar al son de nuestra canción “*You can cry, you can seed, having the time of your life uhuhuhuh.... See these girls, watch that scene, we are the Caco Queens*”. Leticia Higa, con una capacidad de trabajo increíble, todo a la vez y sin equivocarse. Con esa filosofía oriental, donde no existen los obstáculos, sólo la perseverancia para lograr los objetivos. Todo sazonado con una gran calidez. Ana Paula Pérez, tan generosa, contenedora y sensata. Los experimentos *in vivo* sólo se pudieron llevar a cabo gracias a ella. Además, su experiencia en captura y tráfico intracelular me ahorraron tiempo de aprendizaje. Y por supuesto agradezco a las nuevas generaciones y visitantes: Julia, Silvina, Romina, Carlos —y tantos que se sumaron y se irán sumando— por colaborar en el trabajo diario siempre con una sonrisa.

Diana Roncaglia fue quien más sobrenombres me puso —me animo a decir, en la vida— Percolation, Vicky Bikini, Vicuña, Victorious, Vickyta, Vicus... Quizás eso sea reflejo de su creatividad que hace que los picos del ESI-MS tengan un encanto especial. Gracias a ella y Lety pudimos desenmarañar esa estrambótica mezcla de lípidos que las arqueobacterias se empecinan en fabricar.

Jorge Wagner, quien junto a Andrés Márquez, realizó los termogramas de los ARQ. Gracias por estar atento a mis preguntas y responderlas sin demora.

En esta lista no puede faltar Bruno, el muro de los lamentos. Quién en todo el departamento no recurre a él con sus quejas y penares cuando se corta la luz, cuando no anda un equipo, cuando hay que instalar algo nuevo... Quiero agradecerle su disponibilidad y buen humor para resolver todos los problemas e imprevistos junto a (Er)Néstor, su inseparable amigo.

Y quien trajo la inquietud con la que empecé a zambullirme en esto de la inmunidad de mucosas fue Gustavo Zielinski de la EEA Marcos Juárez del INTA. La queratoconjuntivitis infecciosa bovina fue el punto de partida. Y comenzando con micropartículas de PLGA y pasando por nanopartículas de quitosano, realizamos ensayos a campo. Fue una experiencia muy enriquecedora. Tengo que agradecerle a él su honestidad y su gran generosidad cuando le propuse embarcarme en una tesis con este tema.

Los aportes del Dr. David Brayden para los experimentos con Transwell® fueron fundamentales. Todavía guardo sus anotaciones y dibujos que usó para explicarnos. Agradezco su desinterés para ofrecer su ayuda y el protocolo de cultivo celular en estos dispositivos. Gracias a eso pudimos “domar” a las Caco-2.

Ramón Barnadas, con quien realizamos el DoE de HPH en la Universidad Autónoma de Barcelona. No sólo intervino en el trabajo duro sino también en el análisis de los resultados mediante el intercambio de mails y por Skype para que esos datos de HPH nos dijeran algo. ¡Y lo dijeron!!! Gracias por tu dedicación y por alegrarte con mis logros. Gracias también a Eulàlia y a mi amigo Eduard.

Y si tengo que agradecer mi corta estancia en Barcelona para este trabajo es a Luis y Marisa que una vez más me abrieron la puerta de su casa con esa generosidad y nobleza que los caracteriza y me hacen sentirlos familia.

No sé por qué extraña razón mi vínculo con el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez se sostiene en el tiempo. Volví allí para realizar los ensayos de inmunización. Me reencontré con amigos de la época de la Residencia y conocí a gente macanuda del laboratorio de Chagas y EBV. Tuve el agrado de trabajar con Patricia Petray, a quien agradezco sus aportes científicos y su ánimo cuando las cosas no salían como esperábamos. Compartí también esos días de trabajo intenso con la cálida Romina Cutrullis y vía mail con Marcela Restelli, quien me asesoró detalladamente sobre los ELISA-IgA en secreciones mucosas. Agradezco especialmente al Grupo EBV por bancarme en la mesada.

Y ahora les toca el turno a mis “amiguitos” del INTI...

Sandra Jung, por enseñarme que “los datos no se tiran”, y colaborar codo a codo conmigo en el análisis de los resultados del DoE aplicado a HPH.

Cristina Inocenti por ayudarme con la redacción e interpretación de los resultados de DSC, por brindarme su tiempo.

Laura Mathos, de los tiempos de las NPQ, por prestarme la centrífuga *high speed*. Del mismo modo, agradezco a Marta Almirón de la UNSAM que también colaboró en este sentido, sin miedo a que le rompiera su Sorvall.

Al grupo NanoINTI, “*Branca Branca Branca Leone Leone Leone*”... En especial, a Liliana Fraigi, Carlos Moina y Patricia Eisenberg a quienes admiro profundamente por su claridad y empuje más allá de las circunstancias. Y por supuesto a Gaby, Laurita Malatto, Paulina Lloret, Gabriela Munizza, Cecilia Lorenzo... Por compartir anhelos, por preocuparse y alentarme.

También quiero agradecer a quienes “en el principio de los tiempos” consulté y me animaron para tomar la decisión de comenzar esta tesis en el INTI: Alejandra Tonina, Geraldine Charreau y Rubén Félix.

En el Centro de Química debo nombrar a Liliana Valiente quien, ya antes de ser directora, con sus consejos hizo crecer en mí la convicción de seguir adelante con este proyecto. Y ahora que es la directora del Centro, sigue apostando por la formación de los recursos humanos, con todo lo que eso implica.

No puedo olvidarme del grupo “Soporte Técnico Integral” liderado por el Pollo, perdón SR. Pollo, alias Lic. Eduardo A. López, con su calma y precisión para arreglar cualquier cosa, al igual que Andrés Elizondo, gracias por estar siempre al pie. A Laurita, Roxana y Adela, por su prolijo trabajo.

Rodrigo Álvarez, Sandra Amore que me dieron asilo en su silenciosa oficina para poder concentrarme hasta que con gran pena tuvieron que “desalojarme”. Y también a Mabel Puelles con quien compartimos tantos momentos.

Laura Mantel, que velaba por los viáticos de mis viajes a Bernal (i/v). Y Pilar Orsini, quien me imprimió los borradores en color en épocas en que un cartucho de tinta se cuidaba más que a la propia vida.

Tantos compañeros de INTI Química que me alentaron y ayudaron: Cecilia Alberti, Julieta Comin, Lucía Gandolfi, Agustina Pereyro, Estela Planes, Paula Samter, a los chicos de la Planta Piloto y la CTNPP, a Marina Santos que sin conocerme tuvo los resultados del AdDP en 24 horas, cuando pensábamos que no funcionaba. Ahora que nos conocimos nos damos cuenta de lo bien que nos llevamos.

A las chichis, Marta D'Orío y Sofía Frangie, por estar siempre...

Gracias también a mis queridos compañeros de nuestro Laboratorio de SLC, que me apoyaron y me permitieron entrar en sus vidas durante estos años. Por orden de aparición, César (que se nos fue del INTI), María Miró (que se nos fue a Textiles), pero continúa trabajando con nosotros, Laura Herrera (que se nos fue a Alemania) y desde Freiburg siguió animándome mediante sus fascinantes y largos mails. Y los que llegaron justo para la etapa más intensa y ardua de mi tesis, Gabriela Gallardo, Valeria Zannoni (Mua!! Mua!!), Leticia Guida, Juan Arata, Ramiro Iturralde y Daiana Topollan. Gracias por la paciencia. Estoy realmente orgullosa por el grupo que vamos construyendo con los años.

Y un párrafo especial es para Regina Peter Gauna, Regi... Una pieza fundamental para llevar adelante la mayoría de los experimentos de esta tesis. Fue mi mano derecha e izquierda... Hasta llegó a ser mis ojos. Con su gran capacidad y organización creo que hicimos un buen equipo. Espero que también le haya sacado provecho a este trabajo. Gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntas y por contagiarme tu alegría y tu optimismo. Todo siempre puede mejorar.

Y otro párrafo está dedicado a Laura Hermida. ¿Qué tendría para decirle? Tantas cosas que escribiría otro capítulo más de esta tesis... Nooooooo... jajajaj... Ya nos conocemos hace muchos años, ¡más de diez!!! Y desde el primer momento parecía que nos conocíamos de chicas. Y desde un principio nos gustó trabajar juntas. Y hasta compartimos nuestra veta artística —y otros vicios— que nos ayudaron a construir nuestra amistad. Pienso que por eso nada nos detuvo. Y hoy estamos acá. Cuando terminaste tu tesis te preguntabas si podrías estar cuando te necesite. Te aseguro que fue así y más, tanto en mis muchos fracasos como en mis pocos éxitos en este trabajo. Sobre todo con tus palabras de aliento, tu risa franca y esa mirada crítica y constructiva. Gracias por confiar en mí y propiciar el ambiente afable, imprescindible para gustar del día a día laboral.

Un agradecimiento preferencial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A mis amigos que supieron comprenderme en esta etapa de ostracismo Marta, Celina, Javier, Ricardo, Josefina, Laura, Adrián, Rubencho, Claudio, Pato, Maru, me estoy olvidando de muchos....

A mis amigas de “Las 9 y cuarto”—Andre, Adri, Lu, Anabell, Zulma, Ceci L., Chechu, Ceci R.— por lo lindo compartido, esas horas de ensayo y creación que me hacían volar. Por entenderme y perdonar mis enojos. A Ana y Carina. Y a mis maestros, Carlos Gianni y Mariano Moruja que con su arte extraordinario y las rutinas de bancarse el error para salir de él, me ayudaron a entrenar este aspecto fundamental en todo trabajo de investigación.

A mis amigos del río que casualmente conocí cuando comencé esta tesis y por lo tanto me acompañaron durante todo su desarrollo. Esas cosas de la vida que hicieron coincidir el descubrimiento de mi gusto por remar, y sentir patente lo que es ir a favor y en contra de la corriente, física e intelectualmente. Gracias por su interés y por su aliento, pero sobre todo por disfrutar conmigo esta hermosa actividad. A Minoca, Juan, Adrián, Ruben, Paulinka, el capitán Sergio, Esteban, Diego, Lucas, Mauri, Eloy, Analía, Jimena, Dany, Laura, Luis, el Loco Ricardo, María, el Negro, Karina, Sergio, Renzo, Alfred, Gaby...

A mis amigotas —Ro, Mele, Colo, Lili, Lauri, Móni, Emi— por todos esos aquelarres que hemos disfrutado juntas, donde compartimos nuestros sueños y proyectos y nos alegramos cada vez que se cumple alguno. Quiero mencionar especialmente a Emi, a quien le debo lo bello de esta tesis. Todos los dibujos fueron obra de sus manos. Supo interpretar mis bocetos y meticulosas indicaciones al vuelo. Espero que no tenga pesadillas con las bolitas cargadas que tanto trabajo le dieron.

A mis sabias amigas que me acompañaron todo este tiempo y me contuvieron, especialmente en este tramo final. A Ro, por sus consejos y su apoyo. A Adri por su capacidad de escucha y por cuidar mi salud física y mi alma, es sabido que “*mens sana in corpore sano*”. A Móni que siguió este último momento minuto a minuto, ella sintió mis angustias y llantos por no llegar con los tiempos, y hasta se ofreció a tipear para hacer más rápido. A Caro, que no sólo me alentó a terminar este trabajo sino que me ayudó a hacerlo, cargando TODA la biblioteca del EndNote. Sin ese aporte, esta tesis no hubiera concluido en tiempo y forma.

A mi gran familia, tíos y primos, Defain y Tesoriero, que siempre preguntaron cómo va esa tesis y esos experimentos eternos... Y en este último tiempo de redacción, el ánimo de Beatrice que me llegaba del otro lado del río. Laura, que continuamente se interesa por los pasos de su ahijada. Mariana, siempre presente con su estímulo constante. Juan Martín y Marcelo, gracias a su asesoramiento informático esta escritura se hizo más ágil y llevadera.

A mis papás, Juanita y Rodolfo, quienes hicieron todo en la vida para que pudiéramos desarrollarnos plenamente y lograr nuestros sueños, por motivarnos y enseñarnos el valor de la excelencia y del trabajo en equipo, por acompañarme también en esto, de forma incondicional. Gracias por quererme y cuidarme tanto. Además, ellos me enseñaron a ser agradecida. Si les resultó larga esta Sección, aquí están los responsables :)

A mi hermana Mechi, que como tantas veces estuvo a mi lado, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Con su aguda mirada siempre me ayudó

a relativizar las “catástrofes” y a gustar más de las “frivolidades”. Y junto a Andrés me regalaron lo más entrañable que tienen. Gracias por el gran regalo de mis sobrinos Juan Pedro, Francisco y Bernardo por quienes siento el amor más puro y noble del que soy capaz. Ellos me conectan con la vitalidad y me ayudan a ver dónde están las cosas importantes.

Y claro, gracias a Dios pude cumplir con esta ardua etapa de mi vida profesional que involucró toda mi persona. Gracias por esos ángeles que me enviaste en los tiempos de desazón, entre ellos a Santy.

Abreviaturas, siglas y símbolos

A

$\alpha 4\beta 1$	integrina, molécula de adhesión de linfocitos B dirigidos a sitios no mucosos
$\alpha 4\beta 7$	integrina, molécula de adhesión de linfocitos B dirigidos a sitios mucosos
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-Etilbenziazolina-6-ácido sulfónico)
Ac	anticuerpo/s
AdDP	dipéptido adamantilamido
Ag	antígeno/s
Amil	amiloride
AN	apertura numérica
APC	célula presentadora de Ag (del inglés <i>antigen presenting cell</i>)
ARQ	arqueosoma/s
ARQ-HPTS	ARQ marcados con HPTS
ARQ-HPTS&Rh-PE	ARQ con doble marca fluorescente, HPTS y RhPE ARQ M ARQ multilamelares
ARQ-OVA	OVA incorporada en ARQ
ARQ-Pg	ARQ preparados con arqueolípidos y propilenglicol
ARQ-Pg-OVA	OVA incorporada en ARQ-Pg
ARQ-RhPE	ARQ marcados con Rh-PE
ARQ-Tc	Ag de <i>Trypanosoma cruzi</i> incorporado en ARQ
ARQ- ^{99m} Tc-DTPA	ARQ marcados con radioisótopos (ácido dietilentriamino pentacético marcado con ^{99m} Tecnecio)

B

BAL	lavado broncoalveolar (del inglés <i>bronchoalveolar lavage</i>) BCA ácido bicinónico (del inglés <i>bicinchoninic acid</i>)
BN	estrato barro negro
BPG	arqueolípido, <i>sn-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-sn-di-O-fitanilglicerol</i>
BSA	albúmina sérica bovina (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)

C

CCR9/10	receptor de quimiocinas de linfocitos B dirigidos a sitios mucosos
CCV	vesículas recubiertas de clatrina (del inglés <i>clathrin coated vesicles</i>)
CCvIE	endocitosis independiente de clatrina y caveolina (del inglés <i>clathrin-and caveolae-independent endocytosis</i>)

CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (del inglés <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CEM	cromatografía de exclusión molecular
CG	estrato cristales grises
CIE	endocitosis independiente de clatrina (del inglés <i>clathrin-independent endocytosis</i>)
Cit D	citocalasina D
CLIC	transportador independiente de clatrina (del inglés <i>clathrin-independent carrier</i>)
CME	endocitosis mediada por clatrina (del inglés <i>clathrin-mediated endocytosis</i>)
CQ	cloroquina difosfato
CR	estrato cristales rojizos
CSR	recombinación para el <i>switch</i> a clase IgA (del inglés <i>class-switch recombination</i>)
CT	enterotoxina ADP-ribosilada de <i>Vibrio cholerae</i> termolábil
CvME	endocitosis mediada por caveolina (del inglés <i>caveolae-mediated endocytosis</i>)
CXCR3/4	receptor de quimiocinas de linfocitos B dirigidos a sitios no mucosos
CZ	clorpromazina
D	
DAMP	patrón molecular asociado a daño (del inglés <i>damage-associated molecular pattern</i>)
DC	célula/s dendrítica/s (del inglés <i>dendritic cell</i>)
DEX	dextran
DGD	manosil-glucosil-difitanilglicerol
DIC	contraste de interferencia diferencial (del inglés <i>differential interference contrast</i>)
DLS	dispersión dinámica de la luz (del inglés <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>) DO densidad óptica
DoE	diseño de experimentos (del inglés <i>Design of Experiments</i>)
dpi	días post-inmunización

DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina (del inglés <i>dipalmitoylphosphatidylcholine</i>)
DSC	calorimetría diferencial de barrido (del inglés <i>differential scanning calorimetry</i>)
DTPA	ácido dietilentriamino pentacético
E	
EDTA	ácido trietilendiaminotetracético
ELISA	ensayo inmunoenzimático (del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESI-MS	espectrometría de masas de ionización por electrospray (del inglés <i>Electro Spray Ionization Mass Spectrometry</i>)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
F	
FAE	epitelio asociado a folículo (del inglés <i>follicle associated epithelium</i>)
FAL	fosfatasa alcalina
FDC	célula dendrítica folicular (del inglés <i>follicular dendritic cell</i>)
FGS	fluido gástrico simulado
FIS	fluido intestinal simulado
FM	manto folicular (del inglés <i>follicular mantle</i>)
FPE	endocitosis en fase fluida (del inglés <i>fluid phase endocytosis</i>).
FR α	receptor de glicosilfosfatidilinositol
Fsed	sedimento de agua dulce (del inglés <i>freshwater sediment</i>) Fwc agua dulce (del inglés, <i>freshwater column</i>)
G	
G-1-P	<i>sn</i> -glicerol-1-fosfato
GALT	tejido linfoide asociado a intestino (del inglés, <i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GC	centro/s germinal/es (del inglés <i>germinal centre</i>)
GEEC	compartimiento enriquecido con proteína unida a GPI (del inglés <i>GPI-anchored protein-enriched compartment</i>)
Genis	genisteína
GPI	glicofosfatidilinositol (del inglés <i>glycophosphatidylinositol</i>).
H	
Hdv	Fuente hidrotermal (del inglés <i>hydrothermal vent</i>)
HEV	células endoteliales cuboidales de las vénulas (del inglés <i>high endothelial venule</i>)
HPH	homogeneización de alta presión (del inglés, <i>High-Pressure Homogenization</i>)

HPLC	cromatografía líquida de alta presión (del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPTS	sal trisódica del ácido 8-Hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico
Hsal	Hipersalino (del inglés <i>hypersaline</i>)
I	
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina/s
IgA-ASC	linfocito B secretor de Ac IgA (del inglés <i>IgA-antibody-secreting B cell</i>)
IgG-ASC	linfocito B secretor de Ac IgG (del inglés <i>IgG-antibody-secreting B cell</i>)
IL	interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintetasa inducible (del inglés <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IP	índice de polidispersión (en detección heterodina, ver Sección 2.3)
ISCOMS	del inglés <i>immune stimulating complexes</i>
L	
L	liposoma/s
LacCer	glicoesfingolípidido lactosil ceramida; BODIPY® FL C5-lactosilceramida
LDE	microelectroforesis de efecto Doppler (del inglés <i>Laser Doppler Electrophoresis</i>)
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de baja densidad
LDV	velocimetría láser Doppler (del inglés <i>Laser Doppler Velocimetry</i>)
HPTS	liposomas marcados con HPTS
L-HPTS&RhPE	liposomas con doble marca fluorescente, HPTS y RhPE
LPS	lipopolisacáridos
LPT	lípidos polares totales
L-RhPE	liposomas marcados con RhPE
LT	enterotoxina ADP-ribosilada de <i>Escherichia coli</i> termolábil
L-Tc	Ag de <i>Trypanosoma cruzi</i> incorporado en liposomas
L- ^{99m} Tc-DTPA	liposomas marcados con radioisótopos (ácido dietilentriamino pentacético marcado con ^{99m} Tecnecio)
LUV	del inglés, <i>large unilamellar vesicles</i>
M	
Mac	macrófago
MALT	tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés <i>mucosal-associated lymphoid tissues</i>)

MβCD	metil-β- ciclodextrina
MCLB	microscopía confocal láser de barrido
MDP	dipéptido muramilo
MDR	resistente a múltiples drogas (del inglés, <i>multi-drug resistant</i>) MEK metiletilcetona
MEM-NEEA	medio Eagle modificado con aminoácidos no esenciales
MHC-I	complejo mayor de histocompatibilidad clase I (del inglés <i>major hystocompatibility complex class I</i>)
MHC-II	complejo mayor de histocompatibilidad clase II (del inglés <i>major hystocompatibility complex class II</i>)
MLN	ganglios linfáticos de la mucosa (del inglés <i>mucosal lymph nodes</i>)
MLV	vesículas multilamelares (del inglés <i>multilamellar vesicles</i>)
Mo	monocito
Msed	sedimento marino (del inglés <i>marine sediment</i>);
MTT	bromuro de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mwc	agua marina (del inglés <i>marine water column</i>)
N	
NK	linfocito <i>natural killer</i>
NLC	transportadores lipídicos nanoestructurados (del inglés, <i>nanostructured lipid carriers</i>)
Noc	nocodazol
O	
OVA	ovoalbúmina
P	
P	pellet
PACA	poli(alquilcianoacrilato)
PALS	análisis de fase de <i>scattering</i> de luz (del inglés <i>phase analysis light scattering</i>)
PAMP	patrón molecular asociado a patógeno (del inglés, <i>pathogen- associated molecular pattern</i>)
PBS	buffer fosfato salino
PdI	índice de polidispersidad (en detección homodina, ver Sección 1.11.1)
PEG	polietilenglicol
Pg	propilenglicol
PG	arqueolípido, 2,3-di- <i>O</i> -fitanil- <i>sn</i> -fosfatidilglicerol
PGP-Me	arqueolípido, 2,3-di- <i>O</i> -fitanil- <i>sn</i> -fosfatidilglicerofosfato metil éster
PGS	PG sulfatado

plgR	receptor polimérico de Ig (del inglés <i>polymeric Ig receptor</i>). PL fosfolípidos
PLGA	ácido poli-láctico-co-glicólico
PLS	espectroscopía de correlación fotónica (del inglés <i>Photon Correlation Spectroscopy</i>)
PP	placa/s de Peyer
pre-Tm	temperatura de pre-transición de fase
PRR	receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>pattern recognition receptors</i>)
PS	fosfatidilserina
Q	
QbD	Calidad por Diseño (del inglés <i>Quality by Design</i>)
QELS	dispersión cuasi-elástica de la luz (del inglés <i>Quasi Elastic Light Scattering</i>)
R	
RA	ácido retinoico (del inglés <i>retinoic acid</i>) RE retículo endoplásmico
Rf	factor de retención (del inglés <i>retention factor</i>)
RhPE	Lissamine™ Rodamina B 1,2-Dihexadecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina, sal trietilamónica
RME	endocitosis mediada por receptores (del inglés <i>receptor mediated endocytosis</i>)
RNA	ácido ribonucleico (del inglés <i>ribonucleic acid</i>)
RNAr	RNA ribosomal
Rr	coeficiente de correlación de Pearson
S	
S	Suelo (del inglés <i>soil</i>)
S-DGD	diglicosil difitanilglicerol diéter sulfatado
S-DGD-5	arqueolípido, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO ₃ H)-1'→2']- α -D-glucosa]-2,3-di-O- fitanil- <i>sn</i> -glicerol
S-DGD-5-PA	arqueolípido, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO ₃ H)-1'→2']- α -D-glucosa]-2,3-di-O- fitanil-ácido fosfatídico- <i>sn</i> -glicerol
SDS	dodecil sulfato de sodio (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i>) SED domo subepitelial (del inglés <i>subepithelial dome</i>)
SFB	suero fetal bovino
SHM	hipermutación somática (del inglés <i>somatic hypermutation</i>)
slgA	IgA secretoria (del inglés, <i>secreted IgA</i>)

SLN	nanopartículas lipídicas sólidas (del inglés <i>solid lipid nanoparticles</i>) SN sobrenadante
SNad	estrato sobrenadante
SPC	fosfatidilcolina de soja (del inglés <i>soy phosphatidylcholine</i>) SUV del inglés, <i>small unilamellar vesicles</i>
T	
TAP	del inglés, <i>Transporter Associated with antigen Processing</i>
Tc	antígenos solubles del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEER	resistencia eléctrica transepitelial (del inglés <i>transepithelial electrical resistance</i>)
TFH	linfocito T helper folicular
TFR	transferrina
TGF- β	factor de crecimiento tumoral β (del inglés <i>tumor growth factor-β</i>)
TGI	tracto gastrointestinal
Th	linfocito T helper
tiDC	célula dendrídica productora de TNF y óxido nítrico sintetasa inducible
TLC-1D	cromatografía en capa delgada monodimensional
TLC-2D	cromatografía en capa delgada bidimensional
TLR	del inglés, <i>toll-like receptor</i>
Tm	temperatura de transición de fase
TNF	factor de necrosis tumoral (del inglés <i>tumour-necrosis factor</i>) Treg linfocito T regulatorio
W	
Wort	Wortmanina
Z	
ZAve	tamaño de partícula promedio

Publicaciones asociadas con la presente tesis doctoral

Este trabajo de tesis doctoral dio lugar a los siguientes artículos científicos de revistas internacionales con referato que fueron publicados, enviados para su evaluación o se encuentran en preparación.

Capítulo 2

Archaeosomes made of *Halorubrum tebenquichense* total polar lipids: a new source of adjuvancy. González RO, Higa LH, Cutrullis RA, Bilén M, Morelli I, Roncaglia DI, Corral RS, Morilla MJ, Petray PB y Romero EL. BMC Biotechnol (2009), 9; 71-83.

Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. Dolores C. Carrer, Leticia H. Higa, María Victoria Defain Tesoriero, María José Morilla, Diana I. Roncaglia y Eder L. Romero. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, en prensa.

Capítulo 3

Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of a hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids-containing liposomes. A. P. Pérez A. Casasco, M.V. Defain Tesoriero, L. Dumpelmann, L.H. Higa, M. J. Morilla, P. Petray, E.L. Romero. International Journal of Nanomedicine; 2013, en prensa.

The intracellular traffic of archaeosomes made of *Halorubrum tebenquichense* lipids in epithelial cell lines. Defain MV, Peter Gauna R, Higa L, Morilla MJ, Romero EL. Manuscrito en preparación.

Capítulo 4

M cells prefer archaeosomes: an *in vitro/in vivo* snapshot upon oral gavage in rats. María José Morilla, Diego Mengual Gómez, Pablo Cabral, Mirel Cabrera, Henia Balter, María Victoria Defain Tesoriero, Leticia Higa, Diana Roncaglia, Eder L Romero. Current Drug Delivery. 8 (3), pp. 320-329, 2011.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Adyuvancia por vía mucosa y Arqueobacterias

*La vida no merece que nos preocupemos tanto.
La vida no es fácil para ninguno de nosotros.
Pero... ¡Qué importa!
Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo.
Hay que sentirse con talento para lograr alguna cosa y
que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste. (Marie Curie)*

1.1 El sistema inmune

Una característica a destacar del sistema inmune es su capacidad de reconocer material extraño con una exquisita especificidad dada la plasticidad para montar una respuesta que es diseñada a medida (Look et al., 2010).

Por lejos, el material extraño más importante que necesita ser reconocido, procesado y eliminado está en relación con los agentes patógenos, y así la maquinaria del sistema inmune comienza a funcionar ni bien ellos ingresan en el organismo. Sin embargo, debe recordarse que la primera línea de defensa reside en mantenerlos fuera, y para ello el organismo posee una serie de mecanismos inespecíficos. La presencia de una piel intacta y de mucosas íntegras constituye una importante barrera natural contra el ingreso de microorganismos patógenos. Además, existen secreciones en piel y mucosas, como el sudor o las lágrimas, que poseen componentes con propiedades antimicrobianas: ácidos grasos, lisozima, lactoferrina, péptidos antimicrobianos y peroxidasa, entre otros. Defensas más especializadas incluyen la acidez extrema del estómago, el activo movimiento ciliar del epitelio respiratorio o digestivo y el mucus que contribuyen a impedir la colonización bacteriana. Sin embargo, muchos patógenos consiguen evadir esta línea de defensa y causan infección.

El sistema inmune es una compleja red contra material no propio, como los agentes infecciosos, mientras mantiene la tolerancia a lo propio, los autoantígenos. La respuesta inmune está compuesta por dos brazos interrelacionados: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Los mecanismos adaptativos, evolutivamente nuevos, se acoplan con aquellos más antiguos innatos, para desplegar una respuesta eficiente (Look et al., 2010).

La inmunidad innata se gatilla frente al desafío de los patógenos a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño y/o patógeno (DAMP y/o PAMP del inglés, *damage- y/o pathogen-associated molecular patterns*, respectivamente) por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*) que se encuentran en la célula huésped. Los PAMP son arreglos moleculares conservados que son expresados comúnmente por microorganismos, e incluyen moléculas

como la flagelina, lipopolisacáridos (LPS) o ácido ribonucleico (RNA, del inglés *ribonucleic acid*) doble cadena. Los PRR son receptores de reconocimiento conservados que se encuentran a nivel de las células germinales. La unión de PRR con su correspondiente PAMP inicia la clarificación innata de las células a través de un número limitado de mecanismos como la fagocitosis por los macrófagos y los neutrófilos, liberación de interferones antivirales o compuestos naturales antimicrobianos. Los mecanismos partícipes de la inmunidad innata son exactamente los mismos que actúan en la inflamación tisular provocada por la injuria inespecífica (Meeusen, 2011; Mogensen, 2009).

En coordinación con la respuesta innata, la inmunidad adaptativa sirve como última línea de defensa contra los patógenos. Ésta culmina en la generación de respuesta de memoria antígeno (Ag) específica vía el reconocimiento molecular por los receptores de los linfocitos T y B. A diferencia de los PRR la especificidad de Ag de estos receptores se genera aleatoriamente para producir un extenso repertorio con gran diversidad. La respuesta de los linfocitos T y B llevan a la generación específica de respuestas mediada por anticuerpos (Ac), ataque citolítico de células infectadas, y aumento generalizado de respuesta contra patógeno. La inmunidad adaptativa, a diferencia de la innata, genera memoria específica de linfocitos T y B prolongada, la cual se activa rápidamente para eliminar patógenos frente a futuras infecciones (Look et al., 2010).

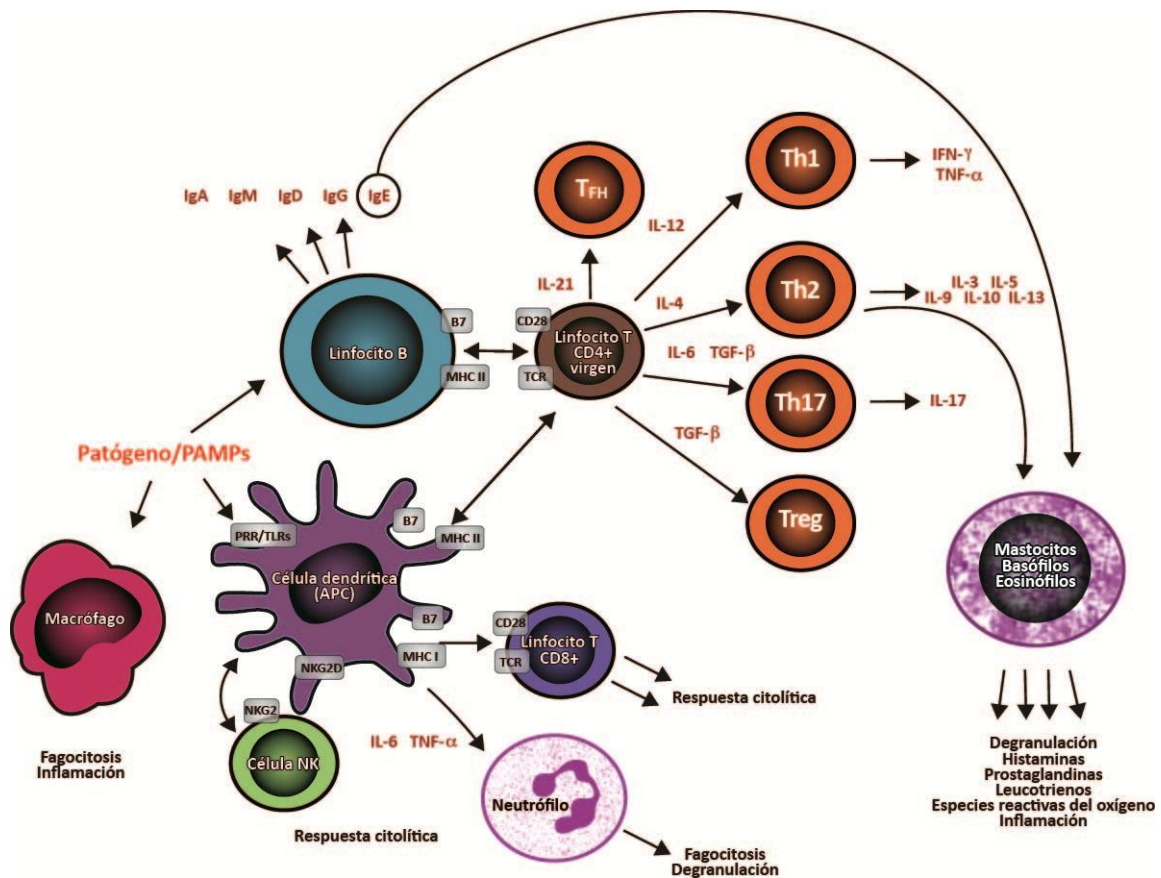


Fig. 1.1 Interacciones del sistema inmune Adaptado de (Look et al., 2010).

El eslabón principal de la cooperación entre la respuesta adaptativa e innata es la participación de las células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*). La presentación de Ag es el proceso en el cual los patógenos se capturan y procesan por una célula presentadora de Ag (APC, del inglés *antigen presenting cell*) para la estimulación específica de los linfocitos T. De las diferentes APC (linfocitos B, macrófagos y DC) las DC son las más efectivas (Look et al., 2010).

Como se esquematiza en la Fig. 1.1, de un modo particular, las DC pueden activar linfocitos T CD4+ naïve o vírgenes. Esta activación puede dirigir la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia los fenotipos Th1, Th2, Th17, Treg (regulatorio) o TFH (*helper follicular*). Los Th1 pueden producir las citoquinas IFN- γ y TNF- α , que median la protección contra los patógenos intracelulares. Mientras que los Th2 producen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 que son importantes en la generación de respuesta inmune extracelular y contra infecciones helmínticas. Los Th17 se caracterizan por producir la citoquina pro-inflamatoria IL-17, mientras que los Treg están involucrados en mantener la tolerancia contra los Ag propios. Los TFH interactúan con linfocitos B en los ganglios linfáticos y el bazo y los estimulan para la producción de Ac. El compromiso de los linfocitos T para diferenciarse en alguna de estas subpoblaciones está influenciado por señales inflamatorias que proporcionan las DC y el ambiente del tejido local. De la misma manera los linfocitos T CD8+ y los linfocitos B tienen una diversidad análoga en el perfil de citoquinas y tropismo fenotípico (Look et al., 2010).

En efecto, la respuesta inmune se gatilla luego de que las APC capturan y procesan los Ag por diferentes rutas intracelulares. Los Ag procesados vía citoplasma son expresados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I, del inglés *major histocompatibility complex*). Mientras que los procesados a través del sistema endolisosomal se expresan en el marco del MHC-II. La interacción entre el MHC-I y las moléculas co-estimulantes de las APC con los linfocitos T CD8+ genera linfocitos T citotóxicos y células de memoria. Mientras que la interacción entre el MHC-II y las moléculas co-estimulantes de las APC con los linfocitos T CD4+ genera linfocitos T helper y linfocitos B productores de anticuerpos. La respuesta inmune adaptativa está favorecida bajo contextos inflamatorios inducidos por células de la inmunidad innata. La ruta intramuscular no es óptima para la llegada del Ag a las APC. El contenido de APC del músculo es pobre y la expresión de MHC-II y moléculas co-estimulantes en miocitos está ausente, con lo cual no se pueden sensibilizar linfocitos T de manera directa (Romero y Morilla, 2011).

1.2 Inmunidad de mucosas

La inmunidad a nivel de mucosas es central para la homeostasis inmune y la protección contra la gran mayoría de los patógenos que invaden el organismo vía superficies mucosas (Meeusen, 2011).

El sistema inmune de mucosas es único: tiene una exposición continua a una gran variedad y cantidad de antígenos, desarrolla una elevada actividad inmunológica y mantiene una fina regulación que repercute tanto a nivel local como sistémico. Estas propiedades particulares se desarrollaron bajo una gran presión evolutiva (Cerutti, 2008; Macpherson et al., 2008)

El sistema inmune está dividido en sitios inductivos y efectores. En los primeros, la captura de Ag dirige la activación inicial del sistema inmune, mientras que en los últimos, los Ac y células efectoras del sistema inmune, una vez activadas, cumplen con su función específica. Los sitios inductivos de las mucosas son regiones específicas del tejido linfóide que están rodeados de ganglios linfáticos regionales, compuestos de folículos de linfocitos B, APC y linfocitos T, conocidos como tejido linfóide asociado a mucosa (MALT, del inglés *mucosal-associated lymphoid tissues*). El mismo está organizado de manera similar en todas las mucosas, con un epitelio asociado a folículo (FAE, del inglés *follicle associated epithelium*) que contiene las células M (del inglés *microfold*), células especializadas en capturar y transportar Ag particulados y microorganismos, desde el lumen hacia las APC ubicadas en los folículos, a través de la barrera epitelial (transcitosis). La vacunación vía mucosas necesita ser dirigida a estos sitios inductivos inmunes. El MALT está cubierto por dichas células M especializadas en endocitar preferentemente antígenos particulados, y recibe el nombre de GALT (del inglés, *gut-associated lymphoid tissue*) en el intestino (ver Introducción del Capítulo 4). Por su reducida cantidad de vellosidades y mucus, las células M son más susceptibles a la invasión de patógenos. Aunque esta “atracción” de patógenos parezca una paradoja, actualmente se sabe que los microorganismos comensales, imprescindibles para la digestión, utilizan este mecanismo para “educar” al sistema inmune local. Esta relación mutualista lleva a la creación de una barrera inmune o tolerancia a través de la producción de IgA que induce una débil respuesta inflamatoria y carece de la respuesta IgG sistémica (extramucosa) producida frente a los patógenos (Cerutti, 2010; Hapfelmeier et al., 2010). Esto permite a la mucosa intestinal impedir la entrada de estos microorganismos. De un modo dinámico, los mismos quedan excluidos de los ambientes estériles del organismo. Los patógenos o sus antígenos tienen que cruzar la barrera epitelial. Así, los Ag se transportan al drenaje de los ganglios linfáticos de la mucosa (MLN, del inglés *mucosal lymph nodes*) donde se genera la respuesta inmune. Los MLN no se consideran parte del MALT ya que no captan el antígeno directamente del tejido.

El sello distintivo de la inmunidad de mucosa sigue siendo la producción y presencia de IgA secretoria (sIgA, del inglés *secreted IgA*) en la superficie luminal de las mucosas. La producción de esta inmunoglobulina se basa en el *switching* a clase IgA de los linfocitos B activados en los centros germinales (GC, del inglés *germinal centre*) de los tejidos mucosos y ganglios linfáticos y su diseminación vía los conductos linfáticos eferentes desde el torrente sanguíneo a los tejidos mucosos (Fig. 1.2). Dentro de la lámina propia del tejido mucoso, los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas que secretan IgA dimérica, la sIgA, unidas

por la cadena J, que es transportada por las células epiteliales desde la superficie apical a la luminal vía su receptor polimérico de Ig (pIgR, del inglés *polymeric Ig receptor*). La sIgA retiene una porción del pIgR (el componente secretor) y posee propiedades únicas respecto a las otras inmunoglobulinas como la resistencia ácida y a proteasas y las interacciones con el mucus y los leucocitos efectores (Cerutti, 2008; Strugnell y Wijburg, 2010). Estas propiedades, sumado a la incapacidad de fijar complemento, hacen que la respuesta inmune sea no inflamatoria lo cual limita el daño del delicado tejido mucoso (Cerutti, 2010).

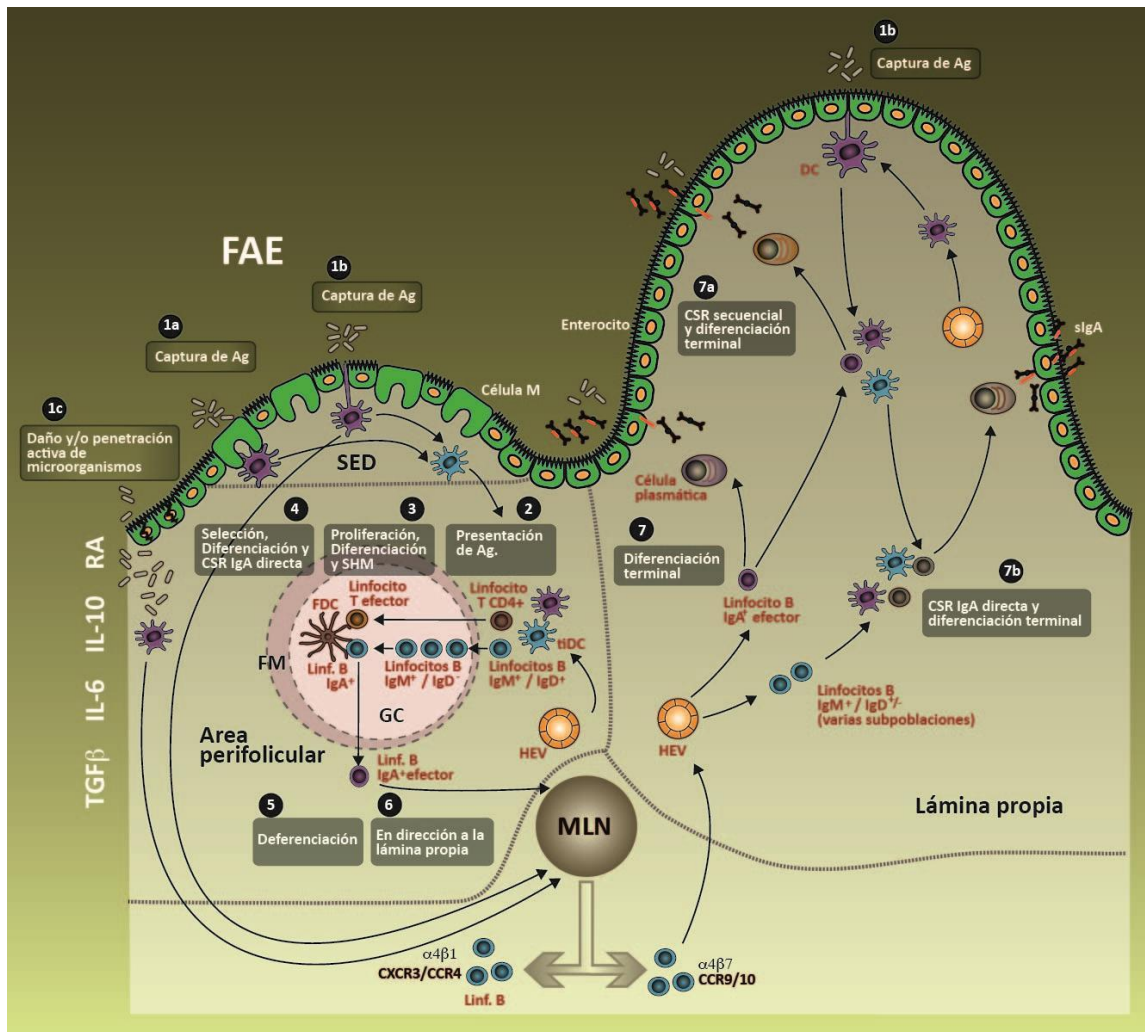


Fig. 1.2 Vías de inducción y diseminación de la respuesta de mucosa a IgA

Adaptado de (Cerutti, 2008; Meeusen, 2011; Mowat, 2003).

Referencias: antígeno (Ag); célula dendrítica (DC, del inglés *dendritic cell*); domo subepitelial (SED, del inglés *subepithelial dome*); células M (del inglés *microfold*); célula dendrítica productora de TNF y óxido nítrico sintetasa inducible (tiDC, ver texto); célula dendrítica folicular (FDC, del inglés *follicular dendritic cell*); centros germinales (GC, del inglés *germinal centre*); hipermutación somática (SHM, del inglés *somatic hypermutation*); recombinación para el switch a clase IgA (CSR, del inglés *class-switch recombination*); epitelio asociado a folículo (FAE, del inglés *follicle-associated epithelium*); manto folicular (FM, del inglés *follicular mantle*); células endoteliales cuboidales de las vénulas (HEV, del inglés *high endothelial venule*); IgA secretoria (sIgA, del inglés *secreted IgA*); ganglios linfáticos de la mucosa (MLN, del inglés *mucosal lymph nodes*); factor de crecimiento tumoral β (TGF-β, del inglés *tumor growth factor-β*); ácido retinoico (RA, del inglés *retinoic acid*).

La superficie mucosa más estudiada es la del tracto intestinal y es así como se

convierte en el punto de referencia del resto de las superficies mucosas y la inmunidad asociada a las mismas. Tal es el caso de los acontecimientos que se suceden en la mucosa intestinal para dar lugar a la producción de IgA (Fig. 1.2). Las DC en el domo subepitelial (SED, del inglés *subepithelial dome*) de las placas de Peyer (PP) capturan Ag por interacción con las células M (1.a en la Fig. 1.2) o por extensión transepitelial de proyecciones en el lumen (1.b en la Fig. 1.2). Este proceso induce la expresión en las DC de factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumour-necrosis factor*) y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS, del inglés inducible *nitric oxide synthase*) y por ende se las denomina tiDC, las cuales presentan el Ag a los linfocitos T CD4+, y de este modo se los induce a diferenciarse en linfocitos T efectores que inducen citoquinas liberadoras de IgA. Los linfocitos T también interactúan con linfocitos B naïve o vírgenes Ag específicas IgM+IgD+. Junto con células dendríticas foliculares (FDC, del inglés *follicular dendritic cells*), esta interacción promueve la reacción de los centros germinales que incluye dos fenómenos, la hipermutación somática (SHM, del inglés *somatic hypermutation*) y la recombinación para el *switch* a clase IgA (CSR, del inglés *class-switch recombination*). Los linfocitos B IgA+ efectores resultantes se dirigen, vía los MLN, a la lámina propia del intestino donde se diferencian a células plasmáticas que secretan IgA de alta afinidad. Por otro lado, las DC activadas llevarán los Ag al drenaje de los MLN donde se generará la respuesta inmune específica. El microambiente del tejido mucoso y los ganglios linfáticos son ricos en mediadores que promueven el *switching* a IgA y su secreción. Éstos son el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β , del inglés *tumor growth factor- β*), las interleuquinas 6 (IL-6) y 10 (IL-10), el óxido nítrico y el ácido retinoico (RA, del inglés *retinoic acid*). Este último induce la expresión de moléculas de adhesión ($\alpha 4\beta 7$) y receptores de quimiocinas (CCR9/10) en los linfocitos B-IgA los cuales promueven su migración distal vía sanguínea y/o linfática a los sitios de tejido mucoso. Los linfocitos B no productores de IgA pueden adquirir diferentes receptores de superficie que los dirigirán a sitios de tejido no mucoso, por ejemplo, linfocitos B secretores de Ac IgG (IgG-ASCs, del inglés *IgG-antibody-secreting B cells*) circulantes expresan $\alpha 4\beta 1$ y CXCR3/4 (Cerutti, 2008; Meeusen, 2011).

Finalmente, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas de la mucosa que secretan IgA dimérica unida por la cadena J que es transportada a través del epitelio vía el pIgR. La molécula final de sIgA retiene el fragmento pIgR y puede ejercer su función efectora en la superficie luminal. Además, en humanos, los linfocitos B IgA1+ efectores pueden experimentar una CSR secuencial al recibir señales T independientes de células epiteliales activadas por bacterias, DC y tiDC. Señales similares gatillan CSR IgA directa en varias subpoblaciones de linfocitos B, incluyendo linfocitos B-1 sin mutación IgM+IgD+B-1 del peritoneo y linfocitos B efectores mutados IgM+IgD- de las PP. Estos eventos locales de CSR generan células plasmáticas que generan IgA de alta o baja afinidad (Cerutti, 2008; Meeusen, 2011).

En ausencia de estímulo innato, estas rutas pueden llevar a la tolerancia mediada por

IgA o mecanismos de exclusión que pueden carecer de las clásicas características de memoria inmunológica (Hapfelmeier et al., 2010). Los microorganismos patogénicos pueden dañar o penetrar activamente el epitelio mucoso (1.c en la Fig. 1.2) que generalmente dan como resultado la estimulación innata de las DC de la lámina propia a través de los PRR que reconocen DAMP y PAMP.

En base a todo lo expuesto, la inmunización a través de mucosas sería la única manera conocida para inducir un efectivo switching de los linfocitos B para la producción de IgA (Lamm, 1997), tanto en la mucosa local como distal (Neutra, 1999). También se induciría IgA e IgG séricas antígeno específica y se favorecería la respuesta inmune mediada por células (Kunkel y Butcher, 2003).

Además, la vacunación por las vías mucosa y transcutánea son una alternativa que ofrece mayores ventajas que la administración parenteral ya que se evitarían los problemas asociados al uso de agujas que requieren material descartable y personal calificado y sería factible la autoadministración que brinda mayor aceptación de los pacientes (Giudice y Campbell, 2006).

1.3 La interconexión de la inmunidad de mucosas

Dado que la infección o inmunización a nivel de mucosas en un sitio tisular puede proporcionar la protección o la producción de sIgA en otra superficie mucosa distante, se creó el concepto de un “sistema inmune común de mucosas” interconectado. Más recientemente, este concepto se ha perfeccionado y se habla de un sistema inmune de mucosas “compartimentalizado” o “integrado” ya que no todas las superficies mucosas parecen estar interconectadas. Una vacunación nasal puede ofrecer protección vaginal pero no induce inmunidad en intestino delgado, mientras que la inmunización a través del epitelio respiratorio puede conferir inmunidad al intestino (Meeusen, 2011). Esto puede deberse a las diferencias anatómicas de las distintas superficies mucosas que se discutirán en la Sección 1.4.

La interconexión entre las diferentes superficies mucosas se piensa que se debe al hecho de que los linfocitos preparados en la mucosa, convertidos en linfocitos B y T de memoria/efectores, migran desde el MALT y MLN vía los ganglios linfáticos eferentes y sangre periférica a los sitios efectores de mucosa por extravasación. Este proceso es dirigido por el perfil de moléculas de adhesión y quimiocinas expresadas en la microvasculatura, las células endoteliales ejercen un rol de “conserje” de la inmunidad de mucosas (Brandtzaeg, 2007). La base molecular de esta migración tejido específica es, como se discutió en la Sección 1.2, la existencia de receptores de quimiocinas ($\alpha 4\beta 7$ y CCR9) que unen ligandos complementarios presentes sólo en tejidos mucosos y ganglios linfáticos mucosos. La presencia de ácido retinoico, metabolito de la Vitamina A, ha demostrado un aumento en la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 (Cerutti, 2008; Cyster, 2003). Es así como los patrones de

migración están dados más bien por el fenotipo funcional que por el lugar de preparación de los linfocitos (Brandtzaeg, 2007). (Fig. 1.2)

Para enfatizar la interconexión entre mucosas, ya hemos visto que TGF- β es el principal factor implicado en el switching de los linfocitos B a isotipo IgA, con ácido retinoico, IL-4, IL-10 e IL-6 como co-factores de importancia para la diferenciación a células plasmáticas y la potenciación de la secreción de IgA (Cerutti, 2008; Strugnell y Wijburg, 2010) Estos factores están presentes en abundancia en la mayoría de las mucosas y son producidos por células endoteliales, células del estroma, y linfocitos de la mucosa (Pasetti et al., 2011) (Fig. 1.2). Además, se expresan diferencialmente en mucosas a comparación con los ganglios linfáticos periféricos. Las CDs aisladas de mucosa y ganglios linfáticos asociados también juegan un papel distintivo en el perfil de citoquinas de la mucosa y preferentemente inducen el switching a IgA y la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 *in vitro* (Meeusen, 2011). Sin embargo, el estímulo inicial de la inmunidad innata seguido de la invasión del patógeno o un fuerte adyuvante hace probable que se induzca una proporción de células tipo 1 (linfocitos Th1 y IgG-ASCs) activadas que migren a ambientes periféricos y contribuyan a la respuesta sistémica inmune. (Fig.1.2). Para prevenir una patología en esta sensible superficie, la naturaleza anti-inflamatoria del sistema inmune de la mucosa debe poner en juego mecanismos de disminución de la respuesta inflamatoria inicial para que no se desarrolle una enfermedad crónica.

1.4 Diferencias entre las superficies mucosas

El tracto gastrointestinal (TGI), desde el estómago hasta el recto, está constituido por un epitelio columnar simple cubierto por mucus secretado por las células caliciformes y/o glándulas secretorias. El mucus intestinal cumple un rol crítico en la inmunidad innata. Sus cambios producidos según las condiciones fisiológicas, como es la secreción de (gal)lectinas o péptidos antimicrobianos, forman parte de la respuesta inmune adquirida (Dunphy et al., 2000; McGuckin et al., 2011).

Por otro lado, no todas las mucosas producen mucus y esto no correlaciona con la producción de IgA. Es así como el epitelio simple no estratificado, mamario o uterino, que no producen mucus, retienen la capacidad de producción de IgA (Meeusen, 2011).

Hay epitelios mucosos estratificados escamosos como la mucosa oral, el esófago y el tracto genital inferior. Estos epitelios poseen glándulas productoras de mucus sin el sistema de transporte de IgA. Como ejemplo, la IgA del lumen vaginal tiene origen en el cérvix, y los anticuerpos vaginales provienen de la difusión paracelular de IgG a través del epitelio estratificado. La pared vaginal contiene células de Langerhans, CDs asociadas típicamente con la piel, lo cual refleja su posición transicional entre la mucosa y la piel (Iwasaki, 2010)

Los conductos aéreos (nasofaringe, tráquea, bronquios y bronquiolos) culminan en una gran red ramificada en humanos y grandes animales, más reducida en roedores. Está

compuesto, en general, por un epitelio simple pseudoestratificado con mayor actividad ciliar que el epitelio intestinal. También posee inmunidad de mucosa, incluyendo la producción de IgA (Holt et al., 2008; Ugwoke et al., 2005). Esta red termina en los alveolos cubiertos por células planas (tipo I) especializadas en el intercambio gaseoso, intercaladas con células cúbicas (tipo II) que secretan el fluido surfactante que evita el colapso alveolar. El fluido alveolar también es medio propicio para la actividad de los macrófagos los cuales secretan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 y TNF- α , luego de su activación. El parénquima pulmonar no posee células plasmáticas y los anticuerpos allí presentes derivan de la sangre (Holt et al., 2008).

La vacunación pulmonar generalmente provoca la llegada del Ag tanto a vías aéreas como parénquima. En el lavado broncoalveolar (BAL, del inglés *bronchoalveolar lavage*) se encuentra la IgA que proviene del tejido mucoso de los conductos aéreos. La llegada del Ag al parénquima promueve una fuerte respuesta sistémica de tipo IgG (Sou et al., 2011).

1.5 Arquitectura de las mucosas, el mucus

Como se mencionó anteriormente, el acceso al epitelio mucoso, imprescindible tanto para la absorción de moléculas terapéuticas como para la vacunación, está impedido por una primera barrera estructural y dinámica: el mucus. El mucus minimiza el tiempo de permanencia en la superficie mucosa e impide la absorción tanto de moléculas como de material particulado. Posee entre 40-50 μm a 300 μm de espesor y está constituido por un 95-99 % p/p de agua mientras que el resto son mucinas. Las mucinas son glicoproteínas aniónicas de alto PM, entre 0,5-50 MDa, con elevada proporción de carbohidratos (70-80 % carbohidratos, 12-25 % proteína y \cong 5 % éster sulfatos). Las mismas están compuestas de unidades repetitivas (\cong 400-500 kDa) o dominios T, en arreglos lineales, unidas por regiones con muy poca o nada de glicosilación que pueden digerirse con tripsina. Cada tres o cuatro dominios T, hay un puente disulfuro que puede sufrir ruptura reductiva; estos productos de reducción (entre 1,5 y 2,5 MDa) son las subunidades (Harding, 2006).

En la administración oral, aparte de la dilución en un ambiente de degradación química y enzimática, el status alimentario y las uniones estrechas epiteliales, la entrega de los Ag particulados está principalmente impedida por la capa de mucus. El mucus es un coloide viscoso que contiene enzimas antisépticas como la lisozima, proteínas como la lactoferrina y las mucinas. El mismo cubre las mucosas del TGI, tracto respiratorio y aparato urogenital y está especializado en envolver las partículas dificultando su contacto con el epitelio (Lai et al., 2009a). La capa luminal se clarifica en minutos a horas y la capa basal está más adherida y se clarifica más lentamente en horas a días. Una capa de 500 μm de mucus sobre el borde apical de los enterocitos que disminuye considerablemente a unos 30 μm en la superficie de las células M funciona como una barrera física adicional. Teóricamente, ningún material

particulado podría difundir a través del mucus, ni virus ni pequeñas moléculas hidrofílicas (Cone, 1999).

En el ambiente menos destructivo de las vías aéreas superiores las partículas atrapadas en el mucus se remueven hacia la nasofaringe o el estómago por el *clearance* mucociliar a 10-100 $\mu\text{m/s}$ (Karchev y Kabakchiev, 1984).

Debido a la barrera física del mucus, sólo los agentes infecciosos que penetran el mucus microorganismos atenuados o salvajes, llegan a la superficie del epitelio y estimulan la mucosa. Pero éstos conllevan el peligro de reactivarse, especialmente en personas inmunocomprometidas. Por lo tanto, para evitar el *clearance* rápido mucociliar y llegar a la superficie mucosa, las partículas deberían atravesar rápidamente al menos la capa superior de mucus que se remueve a mayor velocidad (Cone, 1999).

En definitiva, la arquitectura de los sitios inductivos en mucosa interpone mayores restricciones físicas para la entrega de partículas a las APC que para Ag solubles. Las partículas hasta 500 nm de diámetro pueden ingresar rápidamente y cruzar el mucus humano, con tasas de difusividad no mayor al 25% de su tasa en agua pura (Lai et al., 2009b). Una de las razones que permitirían el desplazamiento de nanopartículas es la apertura de canales acuosos de baja viscosidad, causado por la agregación de las fibras de mucinas como cables. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se podría proponer que para llegar a la célula M, las partículas necesitan tener propiedades mucopenetrantes más que mucoadhesivas (Cone, 1999). Las partículas entre 35 y 75 nm poseen el diámetro óptimo para transitar dentro de dichos canales acuosos. El rol del potencial Z es más complejo. La mucoadhesividad de las partículas catiónicas como las preparadas a base de polietiliminina, quitosano o polilisina se debe a los múltiples contactos establecidos con las mucinas cargadas negativamente. De este modo, las partículas con baja densidad de carga catiónica se pegan a la capa luminal del mucus y rápidamente son removidas. Por consiguiente, múltiples interacciones iónicas pueden ser inútiles para garantizar la penetración de las partículas. Sin embargo, las partículas con alta densidad de carga catiónica superficial o cubiertas de quitosano en alta concentración pueden inducir el colapso de los cables de mucinas con lo cual se incrementarían sus posibilidades de penetración (Peppas y Carr, 2009). Por otro lado, la superficie con carga negativa del mucus repele las partículas aniónicas, lo que trae aparejado una menor probabilidad de penetración a través de los canales de baja viscosidad (Ugwoke et al., 2005). Las partículas con un número de carga catiónica/aniónica similar con sitios hidrofóbicos relativamente escondidos tienen la máxima chance de penetrar. Finalmente, las partículas altamente hidrofóbicas, como las preparadas a base de poli-láctico-co-glicólico (PLGA) y polianhidridos también establecen múltiples puntos de contacto con el core de las mucinas y su velocidad de penetración es baja. Las partículas hidrofóbicas que establecen mínimos puntos de contacto tendrían mayor probabilidad de penetrar (Romero y Morilla, 2011).

1.6 Medición de la inmunidad de mucosas

Los niveles de IgA sérica no siempre correlacionan con la respuesta inmune de mucosa o pueden no ser lo suficientemente sensibles para detectar la producción local de IgA (Macpherson et al., 2008; Premier et al., 2004). Para superar esta limitación, frecuentemente se considera la medida en secreciones de mucosa, pero la recolección de muestra es laboriosa y es difícil de estandarizar la medida. De un modo particular, la compleja relación entre la IgA y la flora intestinal está bien ejemplificada en el hecho de que la respuesta IgA es altamente dependiente de la colonización intestinal por los microorganismos comensales. Más aún, el número de los linfocitos B secretores de Ac IgA (IgA-ASCs, del inglés *IgA-antibody-secreting B cells*) se ve drásticamente reducido en el intestino de animales libres de gérmenes y estas células están virtualmente ausentes en neonatos antes de su exposición a bacterias (Cerutti, 2008).

Además, el sistema inmune de mucosa, como se describió anteriormente, no está interconectado como se pensaba y las IgA-ASCs no se distribuirían en todas las superficies mucosas luego de la inmunización a través de mucosas (Meeusen, 2011).

Un método alternativo es detectar las IgA-ASCs Ag específico en la población de células mononucleares de sangre periférica, a través de la técnica de ELISPOT. El número de IgA-ASCs luego de la infección o vacunación vía mucosa muestran una buena correlación con la protección e inmunidad de mucosa local. También se demostró que la gran mayoría de las IgA-ASCs circulantes llevan la integrina de mucosa $\alpha 4\beta 7$ que confirma su migración preferencial a superficies mucosas (Quiding-Jarbrink et al., 1997).

El intenso trabajo que requiere el ensayo de ELISPOT Ag específico podría reducirse a través de la medición de los Ac secretados en medio de cultivo luego de la incubación de linfocitos circulantes, a través de la técnica de ELISA (Sedgmen et al., 2003).

1.7 Los adyuvantes

Los importantes logros conseguidos en materia de vacunación han dependido del uso de vacunas a patógeno atenuado o patógenos enteros muertos. Los dos ejemplos emblemáticos de vacunas de este tipo son la vacuna Sabin contra el virus de la poliomielitis y la vacuna contra la viruela. Sin embargo, estos tipos de vacuna son intrínsecamente lábiles al ambiente y requieren refrigeración, haciendo dificultoso el envío de las mismas a sitios alejados, especialmente en áreas rurales y de bajos recursos. Además, como ya se ha comentado, pueden ser peligrosas y causar la muerte si el patógeno atenuado revierte a una mayor actividad, esto es especialmente delicado en pacientes inmunocomprometidos. Para evitar estos inconvenientes, las investigaciones en nuestros días se focalizan en el uso de subunidades. Esto se debe a su mayor pureza, seguridad, facilidad de producción respecto de las vacunas clásicas (Peek et al., 2008). Desafortunadamente, la elevada pureza conlleva

frecuentemente una baja potencia inmunogénica. De este modo, requieren más de una dosis de administración o dosis de refuerzo (en inglés, *booster*). Además, si evocan sólo respuesta humoral, tienen eficacia limitada contra patógenos que requieran respuesta celular y humoral (Correia-Pinto et al., 2013; Look et al., 2010). En consecuencia, dependen del uso de adyuvantes adecuados para generar una respuesta inmune efectiva.

Un adyuvante es por definición una molécula, estructura macromolecular o sistema capaz de amplificar la respuesta inmune contra un antígeno específico (Wack y Rappuoli, 2005). Para esta respuesta son fundamentales las APC, en especial las DC. Estas células capturan el Ag, lo procesan y modulan la respuesta inmune celular y humoral. Mientras que los títulos de Ac séricos han sido el parámetro clásico para evaluar la relevancia de un adyuvante, en los últimos años existe un gran interés en lograr una fuerte respuesta inmune celular para combatir parásitos intracelulares o desarrollar vacunas terapéuticas efectivas contra células tumorales (Reed et al., 2009).

De acuerdo a la definición anterior, los adyuvantes son un grupo grande y heterogéneo, que pueden clasificarse en inmunoestimuladores y sistemas de *delivery*. (Reed et al., 2009; Wack y Rappuoli, 2005). La primera categoría estimula el sistema inmune por interacción con receptores específicos, mientras que los segundos lo hacen por múltiples mecanismos dependiendo de las características del sistema de *delivery* (Basith et al., 2011).

Además de su potencial como adyuvantes hay un cúmulo de evidencias que sustenta la relevancia de los sistemas de *delivery* de Ag para la aplicación de dosis única y estrategias de vacunas sin aguja. Tanto la Organización Mundial de la Salud como el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, del inglés *Center for Disease Control and Prevention*) reclaman la necesidad de invertir en esfuerzos en la investigación para el desarrollo de tecnologías de *delivery* de avanzada, lo cual simplificaría el calendario de vacunación (Correia-Pinto et al., 2013; Giudice y Campbell, 2006).

En las infecciones no es el patógeno sino sus interacciones con el sitio particular de los tejidos los que determinan si la respuesta inmune generada será sistémica o de mucosas. Lo mismo sucede con los adyuvantes. Los adyuvantes de mucosa prototípicos son las enterotoxinas ADP-ribosiladas de *Escherichia coli* termolábil (LT) y de *Vibrio cholerae* (CT), ya que promueven la respuesta de tipo sIgA de modo reproducible y significativo contra los Ag co-administrados, cuando se liberan en superficies mucosas (Becker et al., 2001; Premier et al., 2004; Strugnell y Wijburg, 2010). Estas toxinas son responsables de la pérdida fulminante de agua y electrolitos que acompaña a la infección clínica y se unen a los receptores gangliósidos GM1 presentes en enterocitos, DC, macrófagos, linfocitos B y T. Cuando se las coadministra con Ag soluble se inducen linfocitos T citotóxicos, producción de sIgA e IgG sérica Ag específica y memoria inmunológica a largo plazo. La actividad adyuvante de estas toxinas proviene tanto del aumento de su captura como de la inducción de secreción de ciertas citoquinas (Cox et al., 2006). Estos mismos adyuvantes pueden provocar respuesta inmune sistémica si se los administra en tejidos periféricos y por ello no

serían tejido mucoso específicos (Meeusen, 2011). Los adyuvantes administrados vía oral a altas dosis en ratones deben suministrarse junto con bicarbonato para prevenir la degradación intragástrica. En humanos, tanto la CT como la LT se asociaron con diarrea a dosis tan bajas como 5 µg (Jackson et al., 1993; Michetti et al., 1999) y neurotoxicidad (Couch, 2004; Mutsch et al., 2004). Hasta hace unos años ninguna toxina o sus derivados estaban aprobados para uso humano (Glueck, 2001; Holmgren y Czerkinsky, 2005; Hooke et al., 1985; Kenney y Edelman, 2003). En estos días encontramos en el mercado Dukoral®, una vacuna oral para humanos compuesta de células enteras y la subunidad CTB recombinante contra el cólera, la cual también posee protección cruzada contra *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Meeusen, 2011). Su uso está indicado para prevenir la diarrea del viajero (European Medicines Agency (EMA), 2014).

Otro poderoso adyuvante de mucosa es el CpG-DNA, un dinucleótido CpG no metilado sintético que es ligando de los TLR-9 (TLR, del inglés *toll-like receptor*) en células de la inmunidad innata, y el lípido A monofosforilado, un derivado no tóxico del lipopolisacárido de la *Salmonella minnesota*, que es ligando del TLR-4. En modelos animales, ambos adyuvantes llevaron a la liberación de varias citoquinas proinflamatorias que pueden influir en la inmunidad adaptativa y activación de los linfocitos B (Holmgren y Czerkinsky, 2005; Joseph et al., 2002; Romero y Morilla, 2011)

El dipéptido muramilo (MDP) es un inmunomodulador cuya estructura es la mínima esencial para actuar como adyuvante bacteriano y viral. Sin embargo, su uso clínico fue pirogénico y artrtogénico. El dipéptido adamantilamido (AdDP) es un compuesto que se obtuvo por unión de amantadina al residuo L-alanina-D-isoglutamina del MDP. Como exhibió propiedades adecuadas de seguridad se lo utilizó como adyuvante mucoso, tanto por vía oral como nasal en pruebas preclínicas. En el caso de la administración oral en ratones, el AdDP se suministró junto con bicarbonato para prevenir la degradación intragástrica (Becker et al., 2001; Becker et al., 2007; Bertot et al., 2007).

Algunos sistemas de *delivery* poseen actividad adyuvante inherente como los ISCOMS (del inglés *immune stimulating complexes*, estructuras esféricas que se forman por la combinación de colesterol, fosfolípidos y saponinas de *Quillaja*) y nanopartículas de quitosano, pero el conocimiento de su acción precisa todavía no queda claro (Correia- Pinto et al., 2013).

1.8 Diseño de vacunas para administración por ruta mucosa

La mayoría de las vacunas para ruta mucosa licenciadas son a patógeno vivo atenuado de administración oral que cumple con la entrega de todos los antígenos y las señales innatas requeridas. El principal propósito de una estrategia de vacunación vía mucosa es que los antígenos de la vacuna lleguen al tejido mucoso. El desafío será entonces que los antígenos atraviesen tanto el mucus como la barrera epitelial (Pasetti et al., 2011).

Además, la entrega de antígenos por vía oral en grandes animales y humanos posee enormes limitaciones respecto a la estabilidad del mismo y la dilución que sufre a través del TGI (Meeusen, 2011).

Las vacunas por vía mucosa basadas en Ag purificado serían seguras, pero como ya se mencionó, dichos Ag son poco inmunogénicos per sé, por lo que sería necesario el uso de adyuvantes y/o sistemas de *delivery*. Es así como muchos investigadores se encuentran avocados al desarrollo de adyuvantes de mucosa (Patel y Chen, 2010).

En general, la vacunación vía mucosa (rectal, nasal, oral, sublingual y vaginal) necesita de grandes cantidades de antígeno y la co-administración de adyuvantes como las enterotoxinas. Tanto CT como LT se unen al receptor GM1 de los enterocitos que facilitan su transporte a través del epitelio intestinal. La ruta intrarectal poco atractiva para humanos podría ser interesante para grandes animales ya que de esta manera se evitan los problemas de la administración oral y la digestión (Premier et al., 2004).

La administración pulmonar de péptidos y proteínas es un área en expansión en el campo farmacéutico. El diseño de vacunas se beneficiaría con los avances de las vacunas en aerosol ingenierizadas que podrían inducir respuesta inmune mucosa y/o sistémica (Sou et al., 2011). En este sentido, debe prestarse suma atención en no provocar una respuesta inflamatoria desmedida para no comprometer la vital función respiratoria.

Especialmente en la ruta nasal se debe demostrar la ausencia de neurotoxicidad (Clark et al., 2001).

La inmunidad de mucosa se caracteriza por la presencia de IgA además de los linfocitos efectores de memoria local. Para los patógenos que ingresan al organismo por piel o sangre, la respuesta inmune predominante es de tipo IgG y los linfocitos de memoria se diseminan a través de los órganos linfáticos periféricos. Estas diferencias pueden tener un impacto directo en lograr protección inmunológica y en consecuencia, una vacuna exitosa. El sitio inicial de desafío del Ag puede modular el tropismo y efectividad de la inmunidad adaptativa y la localización de los linfocitos de memoria (Hansen et al., 2009).

1.8.1 Aspectos críticos para el diseño de vacunas por rutas mucosas

La vehiculización de Ag en sistemas de *delivery* no sólo ofrece la posibilidad de su captura por células inmunocompetentes y la liberación controlada del Ag, sino también su capacidad de vencer barreras mucosas.

Dos siglos transcurrieron desde que Jenner descubrió la vacuna antivariólica en 1796 hasta la erradicación de la viruela en 1980. Desde entonces y hasta nuestros días, las vacunas permitieron el control de varias enfermedades infecciosas. Su uso no se limita sólo al tratamiento profiláctico, sino que también se han comenzado a aplicar las vacunas exitosamente como agentes terapéuticos en alergia, tratamiento autoinmune y terapia contra el cáncer (Gonzalez et al., 2009; Lake y Robinson, 2005; Larché y Wraith, 2005). Por este

motivo, cobran importancia todos los esfuerzos por avanzar en este promisorio campo de investigación.

1.8.1.1 Capacidad de atravesar mucosas

En vacunación oral, el tamaño de los sistemas de *delivery* es un aspecto fundamental para una adecuada estimulación inmune. Hace más de dos décadas que es bien conocida la mayor eficacia de los sistemas particulados de menor tamaño para la inmunización oral (Eldridge et al., 1991; Igartua et al., 1998). Sin embargo, el tamaño óptimo todavía es tema de controversia. El grupo de Gutierrez observó una mayor capacidad inmunoestimulante de microesferas cargadas con BSA de 1 μm que de 0,2-0,5 μm . Con un Ag sintético de la malaria (SPf66) encapsulado en microesferas de PLGA de 1 μm , el mismo grupo observó una fuerte respuesta inmune comparable a la obtenida con alúmina como adyuvante. Los autores atribuyeron estos resultados a su captura preferencial por las PP (Gutierrez et al., 2002). La tendencia observada en estos últimos años es que a menor tamaño mayor capacidad para transportar Ag a través de la barrera mucosa (Gomez et al., 2007; Oyewumi et al., 2010). De esta manera, podemos decir que el tamaño ideal para los sistemas de *delivery* para vacunas orales se encontraría en el rango nanométrico, aunque la captura también se vería afectada por otras características como las propiedades de superficie y la liberación del Ag.

La ruta nasal es otra prometedora vía de administración parenteral que evitaría el uso de agujas. Tan es así, que a pesar del *clearance* mucociliar asociado, es atractiva para el *delivery* de Ag. Específicamente, posee una actividad enzimática limitada y un epitelio relativamente permeable con células M que capturan Ag de la mucosa y lo entregan a los ganglios linfáticos de la mucosa (Csaba et al., 2009). El tamaño y la hidrofobicidad superficial de las partículas cobran gran importancia en la capacidad de entregar eficientemente el Ag a través de la ruta nasal. Tanto el tamaño de partícula como el grado de PEGilación influyó en la captura de la mucosa nasal y la subsiguiente biodistribución del Ag asociado (Vila et al., 2004). Esta mejora en el transporte sería la explicación para la importante y prolongada respuesta inmune obtenida. Por otro lado, liposomas recubiertos con polímeros mucoadhesivos por vía nasal resultaron inútiles para aumentar la respuesta inmune en conejos (Amin et al., 2009).

En el futuro, se deben ingenierizar los sistemas de *delivery* de modo que sean mucopenetrantes para permitir el crecimiento del escaso número de vacunas por rutas mucosas existentes en el mercado (Dietrich et al., 2003).

En la mayoría de los artículos científicos, las estrategias para la inmunización de mucosas no se focalizan en el diseño de la matriz sino en el ligando adecuado unido al sistema de *delivery* para aumentar (1) la unión y consiguiente captura por las células M de las PP (2) la unión a los enterocitos y/o (3) la interacción con las APC. Sin embargo, la

presencia de ligandos no garantiza la unión a células y posterior transcitosis. El diseño de sistemas de *delivery* penetrantes es primordial para conseguir un *targeting* pasivo y llegar a las células deseadas. Además, las características estructurales de las partículas mucopenetrantes son coincidentes con las características empíricas necesarias para aumentar su captura por las células M, a saber, un tamaño menor a 1 μm , con carga negativa o neutra y con una relativamente baja hidrofobicidad de superficie (Florence, 1997).

1.8.1.2 Biodistribución y acceso a las APC

Como se detalló en la Sección 1.1, los Ag exógenos que son internalizados por las APC generalmente son presentados en el contexto del MHC-II, lo cual estimula típicamente la respuesta humoral T CD4+. Para que ocurra la presentación cruzada el Ag debe escapar del compartimiento endosomal al espacio citosólico y reticular endoplásmico, donde ocurre el procesamiento MHC-I (Look et al., 2010).

Las APC capturan Ag particulados más eficientemente que Ag soluble. Los Ag particulados inducen respuestas inmunes más fuertes que los Ag solubles, independientemente de la ruta de administración. (Clark et al., 2001; Friede y Aguado, 2005).

En general, los Ag solubles son inadecuados para generar inmunidad protectora luego de la administración oral o nasal y en algunos casos hasta puede inducir tolerancia (Foster y Hirst, 2005). Grandes dosis de Ag vía oral o nasal pueden llevar a la producción de IgA de vida media corta sin la inducción de respuesta sérica de anticuerpos. En trabajos publicados se observó que dosis 100 veces más elevada de Ag administrados vía oral indujeron respuesta inmune 100 veces más débil, respecto de la administración subcutánea (Brayden y Baird, 2001; Csaba et al., 2006; Mann et al., 2009a). Para sortear este problema se necesita la co-administración de poderosos adyuvantes.

Cuando partículas de 20-100 nm se administran por vía intramuscular o subcutánea, las mismas pueden penetrar a la matriz extracelular y entrar directamente en los vasos linfáticos. Una vez en la linfa, las partículas viajan a los ganglios linfáticos donde son capturadas por la gran población de células inmunes, en especial DC y generan una respuesta inmune efectiva (Swartz, 2001). Varios autores coinciden en que las partículas poliméricas mayores a 100 nm, son principalmente confinadas en el punto de administración y no pueden pasar al espacio extracelular y llegar así a los ganglios linfáticos (De Temmerman et al., 2011; Moghimi et al., 1994; Swartz, 2001). Estas partículas podrían iniciar una efectiva respuesta inmune si son capturadas por las DC periféricas, conocidas como *scavengers*. Luego estas células migran a los ganglios linfáticos e inician la respuesta inmune sistémica (Fifis et al., 2004). Las partículas menores a 20 nm drenarán principalmente por los capilares sanguíneos y sufren la eliminación del organismo aunque una fracción podría llegar a los ganglios linfáticos (Manolova et al., 2008; Swartz, 2001).

Además del rol crítico del tamaño de partícula, la captura por macrófagos y DC *in vitro*

de nanopartículas de poliestireno se pudo mejorar fuertemente con una superficie catiónica (Foged et al., 2005; Thiele et al., 2003).

No caben dudas de que la asociación de Ag a micro o nanotransportadores facilitan la captura por las DC (Bachmann y Jennings, 2010). Una explicación posible podría encontrarse en la semejanza entre las partículas y las bacterias y virus que las APC han sido programadas para capturar (Fifis et al., 2004). Además, se ha sugerido que los Ag particulados no sólo facilitan su captura por las células inmunes sino que también inducen su activación y pueden así participar del llamado fenómeno de presentación cruzada (Scheerlinck y Greenwood, 2008). Como resultado, los Ag particulados no sólo estimulan la respuesta inmune humoral sino también la celular.

La activación de respuesta inmune citolítica que elimina células huésped infectadas es un área clave de investigación para mejorar la eficacia de la vacunación. Esta respuesta está mediada por linfocitos T CD8+, CD4+ Th1 y T *natural killer* (NK). Estas células citolíticas pueden mediar la destrucción directa de células infectadas vía el reconocimiento de los Ag derivados del patógeno en el contexto del MHC-I o del complejo de presentación CD1, este último presenta Ag lipídicos para provocar inmunidad mediada por linfocitos T (Hava et al., 2005; Odyniec et al., 2010). Luego del reconocimiento específico de las células infectadas, las células inmunes efectoras liberan agentes citolíticos que destruyen directamente dichas células y pueden inducir reacciones inflamatorias, las cuales facilitan el *clearance* por parte de las células de la inmunidad innata como también la respuesta humoral. Para generar inmunidad a linfocito T CD8+, las investigaciones se focalizan en mejorar la presentación cruzada, en la cual el Ag exógeno es presentado en el contexto del MHC-I, para promover una fuerte respuesta citolítica e inflamatoria Th1 (Look et al., 2010).

La estrategia de *targeting* a DC, células especializadas en la presentación cruzada, fue utilizada para generar inmunidad celular. Ejemplo de ello es la síntesis de nanopartículas con polímeros de respuesta al pH que facilitan el escape del sistema endolisosomal al citosol (Flanary et al., 2009; Kwon et al., 2005) o nanopartículas para *delivery* de DNA plasmídico que permiten la producción de Ag en el contexto del MHC-I (Minigo et al., 2007).

La manosa mejoró la entrega de los sistemas de *delivery* a las células de Langerhans, subpoblación de DC ubicadas en la epidermis. El uso de nanopartículas funcionalizadas con manosa generaron inmunidad tanto celular como humoral en primates no humanos sin señales de toxicidad local ni sistémica (Lori et al., 2005).

1.8.1.3 Mejoramiento de la estabilidad y liberación controlada del Ag

La idea de usar tecnologías de liberación controlada para simplificar el calendario de vacunación fue propuesta por primera vez por Langer y Preis en 1979 (Preis y Langer, 1979).

Una ventaja de los sistemas de *delivery* es su capacidad de proteger el Ag asociado de las condiciones fisiológicas adversas como la degradación enzimática o las interacciones no

específicas con otras moléculas en la matriz extracelular y proveer un perfil de liberación prolongada, muy similar a la infección real.

La composición de los sistemas de *delivery* por vía oral es concebida para proteger la estructura del Ag durante el tránsito gastrointestinal. Con este objetivo se reportó la incorporación de Ag a MLV, liposomas en fase gel, bilosomas (sin uniones ésteres hidrolizables) o niosomas (Jain et al., 2005; Mann et al., 2006; Mann et al., 2009b; Minato et al., 2003; Shukla et al., 2010; Venkatesan y Vyas, 2000; Zhao et al., 2007).

Los sistemas de *delivery* para vacunas pueden ser diseñados para ofrecer una mayor protección del Ag. Tal el caso de nanopartículas de polianhidrido conteniendo ovoalbúmina (OVA) administradas por la vía oral, cuyo efecto sobrepasó el obtenido con fuertes inmunoestimulantes como los LPS. Los autores postularon que el éxito de las mismas se debió a la liberación lenta que protegió al Ag de la degradación en el intestino (Gomez et al., 2007).

Las condiciones de formulación son de importancia crítica ya que el uso de solventes orgánicos, las temperaturas extremas o elevados aportes de energía pueden degradar o agregar el Ag proteico. Además, los materiales que constituyen los sistemas de *delivery* o sus productos de degradación pueden ser una importante fuente del deterioro de la proteína (Blanco y Alonso, 1997; Tobío y Alonso, 1998).

Otra ventaja adicional que ofrecen estos sistemas es que se pueden encapsular junto con agentes inmunoestimulantes potenciando el efecto sobre el sistema inmune (Pashine et al., 2005).

1.9 Las Arqueobacterias

Todos los organismos de la tierra están clasificados en tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*. Esta clasificación se basa en la secuenciación de la subunidad 16S del RNA ribosomal (RNAr 16S) (Woese et al., 1990). Además, la misma está bien fundamentada por numerosas características bioquímicas, de las cuales, las más distintivas son las propiedades de los lípidos de membrana, que incluyen sus estructuras, sus vías y enzimas biosintéticas y sus genes. Casi todos los autores concuerdan en que la distinción más crítica entre los lípidos de membrana arqueal y bacteriana es la diferencia estereoquímica de los esqueletos glicerofosfato de los fosfolípidos. El esqueleto arqueal es *sn*-glicerol-1-fosfato (G-1-P) y el bacteriano es *sn*-glicerol-3- fosfato (G-3-P), y ambos son enantiómeros. En general, en las *Archaea* dos cadenas isoprenoides se unen a las posiciones *sn*-2 y *sn*-3 del G-1-P a través de una unión éter. Mientras que en *Bacteria* y *Eucarya*, dos cadenas de ácidos grasos se unen en posición *sn*-1 y *sn*-2 del esqueleto G-3-P con una unión de tipo éster. Esta diferencia se designa como división lipídica (Koga, 2011).

Los lípidos de *Archaea* (arqueolípidos) representan una adaptación específica a los ambientes hostiles, en particular ambientes extremos de temperatura y acidez, bajo los

cuales se desarrollan estos microorganismos. Las membranas compuestas por arqueolípidos resultan más resistentes que las compuestas por glicerofosfatos comunes. Es más, bacterias (hiper)termófilas también muestran este tipo de adaptación a las altas temperaturas (Schouten et al., 2013).

El estudio de la biología y ecología de *Archaea* se encuentra dentro de lo más interesante y dinámico de los tópicos de la ecología microbiana. En menos de dos décadas el status de estos enigmáticos microorganismos ha cambiado completamente. Con la introducción y popularización de las técnicas de secuenciación de RNAr 16S se ha revolucionado la percepción sesgada de la biología y la ecología (Auguet et al., 2009). El primer árbol filogenético derivado de técnicas de cultivo de laboratorio (hipertermófilas, halófilas y metanógenas) estaba compuesto de dos filos principales, *Crenarcheota* y *Euryarcheota* y contenía unas pocas ramificaciones. Sin embargo, las técnicas de análisis por PCR de RNAr 16S expandieron rápidamente el árbol arqueal con el descubrimiento de nuevos linajes (Fig. 1.3).

Las arqueobacterias termófilas e hipertermófilas se encuentran en ambientes con muy altas temperaturas, las metanógenas en ambientes anóxicos y elevadas temperaturas, mientras que las halófilas o hiperhalófilas se encuentran en aguas con alta concentración de sal, sistemas hipersalinos, como lagos alcalinos salitrosos y salinas (Corcelli y Lobasso, 2006; Chong et al., 2012).

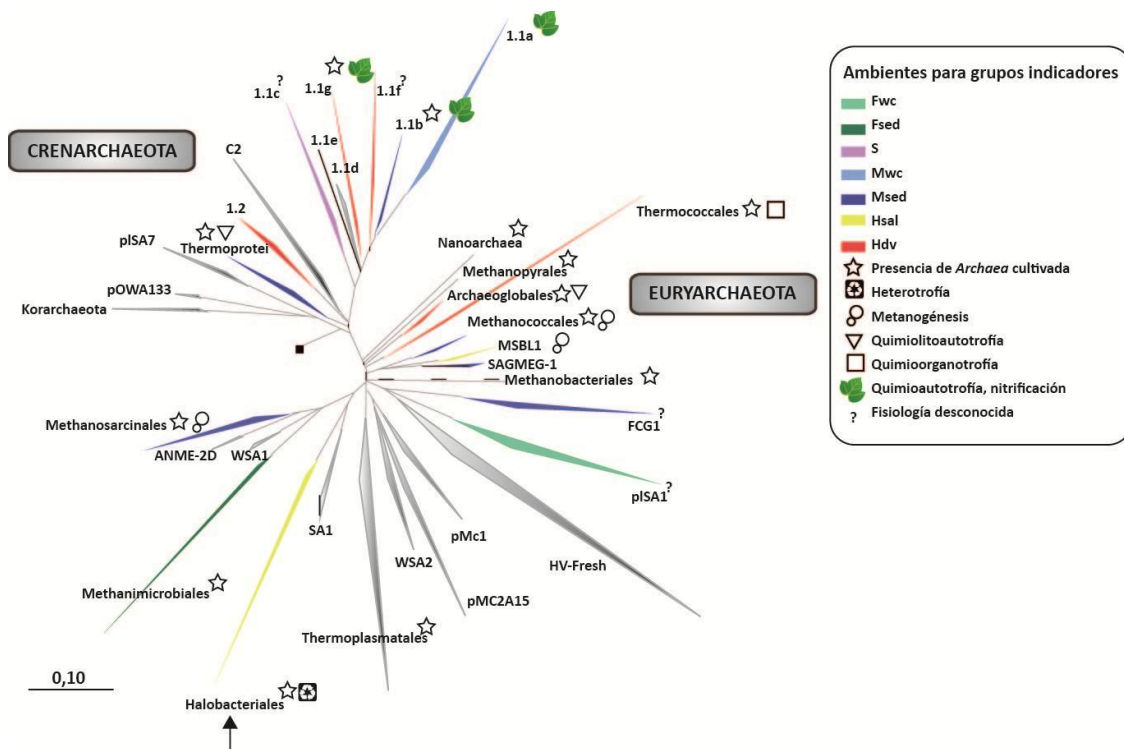


Fig. 1.3 Filogenia de *Archaea* basado en el análisis secuencial de RNAr 16S

Adaptado de (Auguet et al., 2009; Schouten et al., 2013)

Referencias: Agua dulce (Fwc, del inglés *freshwater column*); Sedimento de agua dulce (Fsed, del inglés *freshwater sediment*); Suelo (S, del inglés *soil*); Agua marina (Mwc, del inglés *marine water column*); Sedimento marino (Msed, del inglés *marine sediment*); Hipersalino (Hsal, del inglés *hypersaline*) y Fuente hidrotermal (Hdv, del inglés *hydrothermal*)

vent). El cuadrado negro indica el punto de contacto con el dominio Bacteria. La flecha indica el orden al cual pertenece la especie *Halorubrum tebenquichense* de la familia *Halobacteriaceae*.

Hacia el año 1972 Helge Larsen describía las halobacterias como una confusión para la biología (Oren, 2012) y sólo dos o tres especies eran reconocidas en esta familia (Gibbons, 1974). En ese entonces, ya estaba claro que las halobacterias eran fundamentalmente diferentes del resto de los procariotes por la falta de pared de peptidoglicano, por la alta concentración de sal requerida para su crecimiento y estabilidad estructural y por su pigmentación inusual (Larsen, 1973). Estos microorganismos arqueales halófilos se agrupan en la familia *Halobacteriaceae* (Fig. 1.3). Muchos miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de pigmentos rojo-anaranjados, llamados bacterioruberinas, en la membrana plasmática, los cuales ayudan a filtrar la radiación UV y a proteger a las células de los efectos dañinos de la luz solar (Corcelli y Lobasso, 2006). Los primeros aislamientos de la familia *Halobacteriaceae* datan de cien años atrás y a nuestros días está compuesta por 36 géneros con 129 especies, tal lo reportado en el año 2012 en el artículo de Oren. Excelente revisión donde se muestra el impacto que han hecho los métodos de caracterización fenotípica, taxonomía numérica, quimiotaxonomía (especialmente el análisis de lípidos polares), análisis secuencial comparativo del gen de RNAr 16S y genómica comparativa, sobre su clasificación (Oren, 2012).

1.9.1 Los arqueolípidos

Los lípidos polares de arqueobacterias poseen esqueletos hidrocarbonados y cabezas polares radicalmente diferentes a los lípidos polares de organismos de los otros dos dominios, *Eukarya* y *Bacteria*. Los esqueletos hidrocarbonados de los lípidos de arqueobacterias son éteres de cadenas isoprenoides, en su mayoría fitanilos (20 C) y bifitanilos (40 C), llamados arqueoles o lípido diéter (2,3-di-*O*-difitanil-*sn*-glicerol) y caldarqueoles o lípido tetraéter (2,2'-3,3'-tetra-*O*-dibifitanil-*sn*-diglicerol) respectivamente, unidos en una configuración *sn*-2,3 al glicerol (Kates, 1978; 1992; Sprott, 1992). Por el contrario, los lípidos de los dominios *Eukarya* y *Bacteria* son ésteres de cadenas de ácidos grasos lineales unidos en configuración *sn*-1,2 al glicerol y se denominan glicerofosfolípidos (Kates, 1993a).

Los diferentes hábitats de las arqueobacterias definen la composición principal de sus lípidos, por ejemplo las termófilas sintetizan casi exclusivamente caldarqueoles (Kamekura y Kates, 1999). Ellos forman monocapas en lugar de bicapas. Usualmente, variaciones adicionales dependen del género y especie.

La estructura química de los arqueolípidos les confiere características particulares. Los lípidos polares de arqueobacterias son más estables que los glicerofosfolípidos, las uniones

éteres son más resistentes a la hidrólisis en un amplio rango de pH respecto a las uniones ésteres de los fosfolípidos convencionales, las cadenas isoprenoides son altamente resistentes a la oxidación. En tanto la configuración *sn*-2,3 otorga resistencia a hidrólisis por fosfolipasas esteroespecíficas (Schouten et al., 2013; Sprott et al., 1996).

1.9.2 Arqueosomas, vesículas lipídicas con propiedades adyuvantes

El grupo de Sprott investigó ampliamente las propiedades de los arqueolípidos, lípidos polares aislados de arqueobacterias, para la preparación de sistemas de *delivery* con actividad adyuvante. En este sentido, su primer trabajo publicado demostró que la administración parenteral de vesículas denominadas arqueosomas (ARQ) provocaba una intensa respuesta inmune humoral en ratones (Sprott et al., 1997). Los ARQ son vesículas con actividad inmunomoduladora preparadas con lípidos polares extraídos de arqueobacterias, microorganismos del dominio *Archaea* (Madigan y Oren, 1999). La mayoría de estos microorganismos son extremófilos, es decir están adaptados a condiciones ambientales extremas. Las arqueobacterias son microorganismos no patógenos (Cavicchioli et al., 2003) que no poseen polisacáridos (Eckburg et al., 2003), ni mureína (Kandler y König, 1998) y que presumiblemente carecen de PAMP conocidos (Pulendran et al., 2001)

Los lípidos arqueales están constituidos exclusivamente cadenas isoprenoides unidas por uniones éteres a un esqueleto de glicerofosfato. Las estructuras base son el arqueol y el caldarqueol (Patel y Chen, 2010). Además, las diversas cabezas polares de estos glicerolípidos tienen una importancia crucial en las interacciones inmunoestimulantes con APC, como fue demostrado con glicoarqueoles sintéticos (Whitfield et al., 2008).

Al igual que los liposomas, los ARQ pueden prepararse por autoensamblaje de lípidos arqueales en medios acuosos tras un pequeño aporte de energía. Sin embargo, más allá de esta similitud, la superficie de los ARQ es altamente entrópica con valores de tensión superficial que son la mitad de los de liposomas (Kitano et al., 2003; Yamauchi et al., 1997). Gracias a a este desorden no presentan transición de fase o la misma se encuentra por debajo de 0°C (Kitano et al., 2003). Por otro lado, la permeabilidad de los ARQ a protones y a sodio es aproximadamente tres veces menor que la determinada para liposomas; la presencia de los macrocíclicos arqueoles o caldarqueoles en ARQ disminuye su permeabilidad al agua y pequeños solutos (Mathai et al., 2001; van de Vossenberg et al., 1999).

Estas particularidades estructurales hacen que los ARQ tengan la capacidad de establecer interacciones únicas con los ambientes biológicos, específicamente se ha demostrado su potente adyuvancia luego de su administración subcutánea en modelos preclínicos, con una fuerte respuesta inmune tanto humoral como celular, junto con una memoria inmunológica sostenida, comparado con liposomas convencionales y alúmina (Krishnan et al., 2000a; Patel y Chen, 2010). Una característica clave de los ARQ es la

capacidad dual de dirigir el Ag para la presentación cruzada vía el MHC-I mientras que a la vez activan la coestimulación de las APC y producción de citoquinas (Krishnan y Sprott, 2008). De hecho, los ARQ aumentan el reclutamiento y activación de APC como DC y macrófagos (Krishnan et al., 2001; Tolson et al., 1996), inducen la expresión de moléculas co-estimuladoras (Krishnan et al., 2001) y generan respuestas de linfocitos citotóxicos T CD8+ aún en ausencia de linfocitos T CD4+ (Krishnan et al., 2000b). Dado que en un modelo murino de listeriosis, se observó protección frente al desafío intravenoso con *Listeria monocytogenes* en ratones inmunizados con ARQ vía subcutánea (Conlan et al., 2001), éstos se muestran con grandes chances para ser utilizados como adyuvantes.

Los adyuvantes deben ser biodegradables, baratos, disponibles a partir de fuentes sustentables, no tóxicos e idealmente no provocar inflamación clínicamente relevante. Los ARQ reúnen estas ventajas y se ha comprobado que evocan memoria inmunológica en ausencia de inflamación visible. Así, por ejemplo, ARQ preparados con lípidos polares totales (LPT) de *Haloferax volcanii* y *Methanobrevibacter smithii* activaron DC en ausencia de producción de IL-12, relacionada con la respuesta inflamatoria inicial (Sprott et al., 2004a). Además, no se ha hallado toxicidad luego de la administración oral, endovenosa o subcutánea de ARQ, ya sea en monodosis o múltiples dosis en modelos murinos (Omri et al., 2003; Patel et al., 2002).

Aunque todavía se desconoce el mecanismo por el cual estos ARQ son tan buenos adyuvantes, se ha postulado que son capturados por las APC a través de receptores específicos de fosfatidilserina presentes en la superficie celular. De los varios tipos de ARQ, los preparados con LPT de *M. smithii* (40 % (mol) de caldarqueoles y 30 % (mol) de arquetidilserina) son potentes inductores de adyuvancia debido a su particular interacción con las APC (Krishnan et al., 2001). Asimismo, estos ARQ inducen la expresión de moléculas co-estimuladoras en APC, lo que conduce a la regulación del aumento de citoquinas y otros reguladores inmunológicos (Krishnan y Sprott, 2008; Sprott et al., 2008).

Los ARQ también generaron adyuvancia luego de su administración intranasal en ratones. La respuesta Ag específica de tipo IgA se vio aumentada en sueros, heces, bilis y muestras de lavado nasal y vaginal. También se indujeron las respuestas de tipo IgG, y específicamente IgG1 e IgG2a, en suero como la respuesta de tipo linfocito T citotóxicos (Patel et al., 2007). En este caso, los ARQ fueron preparados con LPT extraídos de *M. smithii*, *H. salinarum* y *T. acidophilum* o bien, con 2,3-di-O-difitanil-*sn*- glicerofosfato-O-metilo en presencia de Ca²⁺, con OVA como Ag, y se obtuvieron estructuras agregadas denominadas AMVAD, del inglés *archael lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery*. El éxito de los AMVAD se podría deber a su matriz especial de glicoarqueolípidos junto con la mucopenetración, una combinación capaz de inducir respuesta inmune en ausencia de *targeting* luego de la administración nasal (Patel y Chen, 2010). Además, ARQ preparados con lípidos polares totales de *Sulfolobus acidocaldarius* cargados con OVA evocaron respuesta sistémica IgG y mucosa IgA luego de la administración oral en ratones (Li et al.,

2011).

1.9.3 Aislamiento de arqueobacterias *Halorubrum tebenquichense* en la Patagonia argentina

Dada la capacidad adyuvante de los arqueolípidos se consideró de relevancia la exploración de las propiedades adyuvantes de LPT extraídos de otras especies de arqueobacterias. Así, se estudió la adyuvancia generada por lípidos aislados de cepas de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina). Las mismas fueron tipificadas como *Halorubrum tebenquichense*. Las arqueobacterias halófilas extremas del género *Halorubrum* se encuentran distribuidas mundialmente (Franzmann et al., 1988; Kamekura et al., 1997; Kamekura et al., 1996; Kharroub et al., 2006; Lizama et al., 2002; McGenity y Grant, 1995; Oren y Ventosa, 1996; Tomlinson y Hochstein, 1976), tanto a elevada altitud como bajo el nivel del mar (Fan et al., 2004; Lizama et al., 2002; McGenity y Grant, 1995). La única especie descrita en Sudamérica es la *Halorubrum tebenquichense*, cepa ALT6-92 aislada en la Laguna Tebenquiche en el Salar de Atacama (20° 30' S, 68° 15' W), al norte de Chile. Su localización en el desierto de Atacama a 2300 m sobre el nivel del mar convierte a esta laguna en un ambiente único (Lizama et al., 2002). En el año 2011 se reportó el hallazgo de la cepa *H. tebenquichense* no alcalifílica en salinas del litoral de la Patagonia Argentina, Salina Chica, en Península de Valdés (42° 32' S, 63° 59' W), provincia de Chubut. Cabe señalar que Salina Chica está separada de la Laguna Tebenquiche por la cadena montañosa más alta (7000 m) y más reciente (70 millones de años) de América, la cordillera de los Andes. Además, se encuentra 2500 km al sudeste, a 40 metros sobre el nivel del mar y en una zona de clima templado (Gonzalez et al., 2009).

De este modo, nuestro grupo fue el primero en reportar que ARQ preparados con LPT aislados de esta cepa patagónica de arqueobacterias, también inducían respuesta inmune sistémica humoral específica y de memoria (Gonzalez et al., 2009). Es de destacar que esta capacidad adyuvante fue obtenida a pesar de su franca diferencia estructural con los ARQ reportados con capacidad adyuvante, compuestos de caldarqueoles y de arqueolípidos con grupos cabeza serina, inositol y etanolamina (Kates, 1993a; Sprott et al., 2004b; Tenchov et al., 2006).

Luego de la inmunización subcutánea de ratones C3H/HeN con ARQ preparados con LPT de *H. tebenquichense* conteniendo albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) se evocó una fuerte y sostenida respuesta primaria de Ac similar a la obtenida con albúmina como adyuvante. También generaron memoria inmunológica, demostrada por la respuesta humoral luego del *boosting* con BSA libre. El análisis de los isotipos de IgG reveló que se generaron tanto IgG1 como IgG2a Ag específicas, lo que sugeriría la inducción de una respuesta mixta Th1/Th2 (Gonzalez et al., 2009).

En consonancia con los hallazgos anteriores, demostramos por primera vez que

ratones C3H/HeN inmunizados vía subcutánea con Ag de *Trypanosoma cruzi* incorporado en estos ARQ (ARQ-Tc) generaron rápidamente altos niveles de Ac circulantes anti-*T. cruzi*. La respuesta inmune generada presentó un perfil de isotipos dominante de IgG2a, usualmente asociado a la inmunidad de tipo Th1 y a la resistencia contra la infección por *T. cruzi*. Es de destacar que los ratones inmunizados con los ARQ-Tc, exhibieron una reducción de la parasitemia durante la infección aguda y fueron totalmente protegidos contra un desafío mortal con la cepa Tulahuén del *T. cruzi*, altamente virulenta. Estos hallazgos sugieren que ARQ preparados con los LPT de *H. tebenquichense* poseen un gran potencial para el desarrollo de una vacuna segura y eficiente contra este patógeno humano de gran relevancia (Higa et al., 2013).

1.10 Métodos de preparación de arqueosomas

Los arqueosomas pueden prepararse aplicando los métodos habitualmente utilizados para la preparación de liposomas.

1.10.1 Escala laboratorio

El método más sencillo y más ampliamente empleado es la preparación de un film de fosfolípidos (en este caso arqueolípidos) y la posterior hidratación con un medio acuoso seguido de agitación mecánica. Los lípidos se disuelven en un solvente adecuado, como cloroformo o mezclas cloroformo: metanol, luego se evapora el solvente de modo tal de obtener una película delgada y homogénea. Las trazas de solvente residual pueden eliminarse con corriente de nitrógeno o liofilización. Por último se agrega una solución acuosa y se agita enérgicamente, provocando la hidratación e hinchamiento de los arqueolípidos hasta que se despegan de la superficie y forman los arqueosomas. El resultado es una mezcla de vesículas multilamelares con una distribución de tamaño heterogénea (MLV, del inglés *multilamellar vesicles*), que suele emplearse como punto de partida para obtener otras suspensiones (New, 1990).

La sustancia a incorporar a los MLV se agrega en el medio acuoso, si se trata de un compuesto hidrosoluble, o bien se disuelve en el solvente de disolución de los lípidos, si se trata de un compuesto liposoluble.

A partir de los MLV, el tamaño y el número de lamelas pueden modificarse mediante sonicación y/ o extrusión, entre otros métodos.

La sonicación consiste en impartir energía ultrasónica a la suspensión para reducir el tamaño de las vesículas, pudiendo obtenerse bajo determinadas condiciones, SUV (del inglés, *small unilamellar vesicles*). Éstos resultan unilamelares debido a las restricciones estéricas que tienen lugar cuando la curvatura de la bicapa es muy pronunciada. El tamaño está dado por la composición lipídica, la fuerza iónica del medio y la temperatura, entre otros

factores. La técnica de sonicación es efectiva pero no escalable (New, 1990).

La extrusión de MLV consiste en forzar el pasaje de la suspensión a través de membranas de poro definido (Krishnan et al., 2000a; Krishnan et al., 2000b; Olson et al., 1979). Es así como se obtienen vesículas de diámetro medio del tamaño nominal del poro con oligo o unilamellaridad. Existen extrusores manuales o neumáticos.

La obtención de LUV (del inglés, *large unilamellar vesicles*) puede realizarse aplicando el método de evaporación en fase reversa (Omri et al., 2000; Szoka y Papahadjopoulos, 1978). Los LUV son vesículas de gran tamaño pero compuestas por una sola bicapa o lamela. Suelen emplearse cuando se pretende maximizar el volumen acuoso interno. La adición de un pequeño volumen de fase acuosa sobre la solución de fosfolípidos en éter etílico en una relación 1:3 (fase acuosa/fase orgánica) y posterior sonicación, produce una suspensión de micelas invertidas o emulsión w/o. La eliminación del éter a presión reducida (300 mm Hg; 0,4 bar) provoca al mismo tiempo la agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel semisólido, la cual colapsa al aumentar el grado de vacío para dar lugar a la formación de LUVs, con la completa eliminación del disolvente orgánico. La fuerza iónica de la solución acuosa determina la capacidad de encapsulación que van a tener las vesículas, a menor fuerza iónica mayor eficacia de encapsulación (Szoka y Papahadjopoulos, 1980; Torres y Seijo, 2009). La gran desventaja de esta técnica es su baja factibilidad para el escalado.

1.10.2 Escala industrial

El método industrial por excelencia para preparación de liposomas es la homogeneización de alta presión (HPH, del inglés *High-Pressure Homogenization*). El principio de estos homogeneizadores se basa en aplicar una gran cantidad de energía a la muestra que provoca la ruptura de las macro estructuras presentes y posterior ensamblaje, reduciéndose así su tamaño. La ventaja fundamental frente a otros métodos radica en que los modelos de homogeneizadores más pequeños (volumen de muestra de 5-10 ml) tienen sus equivalentes a escalas mayores (hasta 1.000 l/h), con lo cual los resultados pueden ser transferidos del laboratorio a la industria.

El proceso ocurre en una cámara especial de homogeneización, cuyo diseño es el corazón del equipo homogeneizador y es objeto de propiedad industrial. Es más, una dada presión de homogeneización puede producir diferentes efectos, según el diseño del equipo (Loveday et al., 2013).

En los sistemas de HPH están involucrados simultáneamente fenómenos de cavitación, cizalla y turbulencia, y es muy difícil clasificarlos en orden de importancia.

La cavitación es un efecto hidrodinámico que se produce por un aumento local en la velocidad, provocado por el pasaje del fluido a través de un estrecho orificio, y de acuerdo al principio de Bernoulli, se produce una disminución de la presión hidrostática. Si la presión

local cae debajo de la presión de vapor del fluido se producen finas burbujas de vapor. Estas burbujas empiezan a colapsarse cuando se mueven a las regiones donde la presión es mayor que la presión de vapor. Cuando las burbujas implosionan, las partículas de alrededor, se aceleran a través del centro de la burbuja que colapsó. Esto provoca la disminución en el tamaño de partícula o la ruptura de las estructuras.

En términos de la dinámica de fluidos, la turbulencia es un movimiento irregular que se observa en los líquidos cuando fluyen a gran velocidad. Está caracterizado por alta convección y cambios espacio-temporales rápidos de presión y velocidad. El movimiento del fluido se da en forma caótica, en otras palabras, el movimiento principal es perturbado por otros movimientos desordenados que se mezclan con aquél. Las moléculas, en lugar de seguir trayectorias paralelas (flujo laminar) describen caminos irregulares y forman torbellinos o remolinos (Dubbel, 1955).

En tanto, la fuerza de cizallamiento produce un corte transversal debido al deslizamiento en sentidos opuestos de dos planos tangenciales generados por el movimiento del fluido, como una tijera (Dubbel, 1955).

Diferentes tecnologías se han desarrollado para el diseño de homogeneizadores de alta presión. Las primeras aplicaciones de estos equipos fueron farmacéuticas y biotecnológicas (Paquin, 1999).

En los homogeneizadores a válvula de alta presión o a dos etapas (Panda®, Gea Niro Soavi, Italia; APV-Rannie® y APV-Gaulin®, SPX, E.U.A.), el fluido es introducido axialmente a través del asiento de la válvula. Luego, se acelera radialmente en la pequeña región comprendida entre la válvula y el asiento. Una vez que el fluido deja este espacio (10-30 μm), impacta contra el cabezal de la válvula, saliendo del homogeneizador a presión atmosférica (Floury et al., 2004). La presión alcanzada puede llegar a 150 MPa (Fig. 1.4 A).

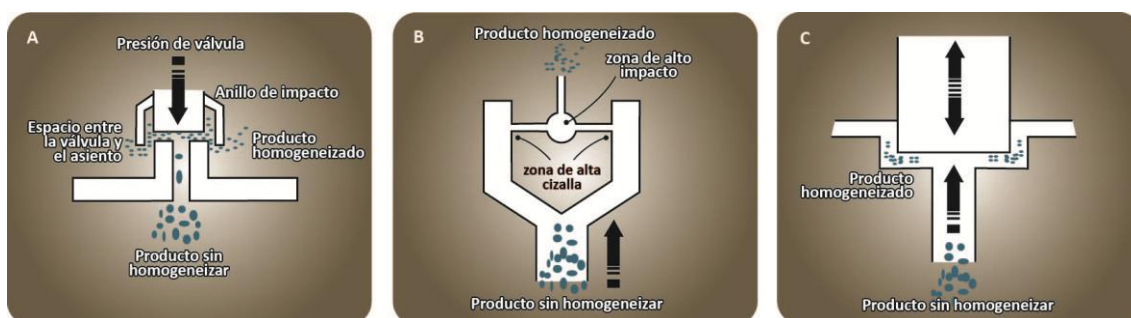


Fig. 1.4 Esquemas del diseño de cámara de homogeneizadores
(A) Panda®, (B) Microfluidics® (C) Emulsiflex®.

La tecnología Microfluidizer (Fig. 1.4 B) puede generar sistemas (vesículas, partículas, gotas, etc.) con menor tamaño por la colisión frontal de dos corrientes de fluidos bajo presiones superiores a 1.700 bar (170 MPa) (Bruno y McIlwrick, 2001). Esto produce colisiones, fuerzas de corte y de cavitación (Tunick et al., 2001). Estos fenómenos se pueden

lograr con los homogeneizadores tipo *jet* como los microfluidificadores (Microfluidizer®, Microfluidics, E.U.A.). Estos equipos contienen una bomba intensificadora que provee alta presión para forzar el producto a pasar por una cámara de interacción formada por dos microcanales que harán que el producto se divida en dos corrientes al entrar a la cámara. Dichas corrientes se acelerarán y terminarán colisionando entre sí desde sentidos opuestos. El líquido se acelera dentro de la cámara debido a la disminución en el diámetro del tubo, a la liberación de presión y a los cambios abruptos en la dirección, que conducen a golpes contra las paredes, causando estos fenómenos la ruptura de partículas en otras más pequeñas. La cámara de colisión puede estar diseñada con dos formas, la tipo Y y la tipo Z (Junghanns y Muller, 2008). Los canales tienen una dimensión en el rango de 50-300 μm , donde la muestra adquiere una velocidad de flujo de hasta 400 m/s. Normalmente, a la salida de la cámara de interacción se coloca un intercambiador de calor para enfriar rápidamente el producto tratado (Perrier-Cornet et al., 2005).

Los homogeneizadores Emulsiflex® (Avestin, Canada) pueden alcanzar presiones hasta 200 MPa (Fig. 1.4 C). El fluido pasa a alta presión a través de una estrecha abertura que provoca un aumento local en la velocidad con la consecuente disminución de la presión. Y como se describió, pueden formarse burbujas que al implosionar aceleran las partículas de alrededor, como las bicapas lipídicas, y se producen estructuras de menor tamaño. Este fenómeno de cavitación, se cree que es la principal causa de la reducción del tamaño, pero aún es una hipótesis. Además, están involucrados fenómenos de colisión, turbulencia y fuerzas de cizallamiento (Junghanns y Muller, 2008).

Cabe destacar que existen homogeneizadores de alta presión que se proveen con extrusores antes del colector de la muestra lo que permite obtener vesículas con tamaño definido.

Los factores que regulan las características de las vesículas obtenidas por homogeneización de alta presión pueden ser del equipo o de la muestra. En el primer caso, se incluye el número de ciclos o bien el tiempo de recirculación y la presión de homogeneización. En equipos que incluyan extrusores a la salida de la muestra, también deberá contemplarse como variable el tamaño de poro de la membrana utilizada. Respecto a los factores de la muestra, se pueden mencionar, la concentración y composición lipídica, la temperatura de la muestra, la fuerza iónica, viscosidad del medio, entre otras (Barnadas Rodriguez y Sabes Xamani, 2003). Además, la elevada temperatura alcanzada en la cámara es otro parámetro que puede afectar los componentes del producto, aunque el calor producido tiene un corto tiempo de contacto con la muestra (Paquin, 1999).

1.11 Tamaño de partícula y Potencial Z para la caracterización de material particulado

Para caracterizar cualquier material particulado es fundamental medir el tamaño y el potencial Z ya que son importantes propiedades que determinarán el tipo de interacciones

con el medio y los sistemas biológicos y, en definitiva, tendrán influencia tanto en el *clearance* como la biodistribución de las partículas.

1.11.1 Tamaño de partícula

En esta sección sólo se describirán en detalle los fundamentos del equipo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd, 2014a) ya que fue el utilizado en la determinación del tamaño de partícula de todos los sistemas estudiados, excepto los obtenidos en la Sección 2.3.

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) también conocida como espectroscopía de correlación fotónica (PLS, del inglés *Photon Correlation Spectroscopy*) o dispersión cuasi-elástica de la luz (QELS, del inglés *Quasi Elastic Light Scattering*) sirve para medir el tamaño de partícula en el rango submicrónica.

El DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de la partícula.

El movimiento browniano es un movimiento al azar de las partículas debido al “golpeteo” de las moléculas del solvente alrededor de ellas. Entonces, esta determinación puede realizarse sobre partículas en suspensión líquida. A mayor tamaño, menor movimiento. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional. El DLS calcula el diámetro hidrodinámico y se rige por la ecuación de Stokes-Einstein, a saber:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde,

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico k = constante de Boltzman

T = temperatura absoluta

η = viscosidad del medio dispersante

D = coeficiente de difusión traslacional

De la Ec. 1.1 se desprende que se necesita una temperatura precisa y constante ya que el $d(H)$ es función de la misma y además, para mantener la viscosidad del medio constante (Banerjee et al., 2002).

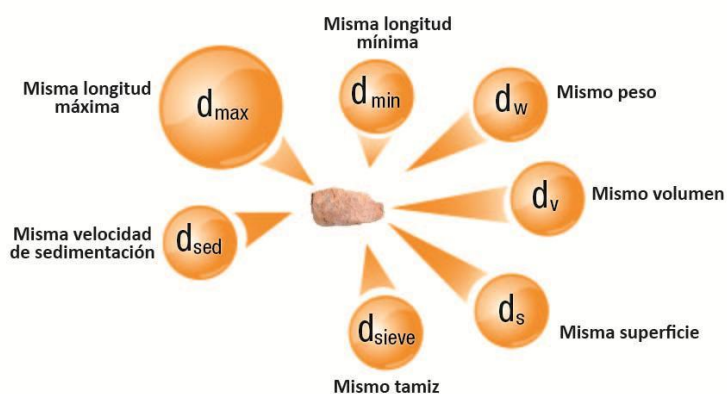


Fig. 1.5 Esfera equivalente

El diámetro obtenido es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula. Esto da lugar al concepto de esfera equivalente (Fig. 1.5). La esfera es el único objeto cuyo tamaño puede ser unívocamente definido con un solo número. Entonces, a partir del coeficiente de difusión se obtiene el diámetro de la esfera.

Para una mayor comprensión del tema se introducirán algunos conceptos de las teorías de dispersión o *scattering* de la luz (Keck y Müller, 2008).

Cuando un haz de luz láser polarizada incide sobre una partícula, no sólo se creará un patrón de difracción sino que la luz se esparcirá en todas las direcciones con un patrón más complejo. Todos estos fenómenos en conjunto son conocidos como *scattering*. Y se habla del patrón de *scattering* de la partícula. La forma de este patrón depende del tamaño de partícula y para ser más precisos de la relación entre el tamaño de la partícula y la longitud de onda (λ) de la luz incidente.

Según esta relación, se pueden distinguir tres formas de patrones de *scattering*:

- Fraunhofer, cuando la partícula es mucho mayor que la longitud de onda incidente (5-6 veces). Está caracterizado por un fuerte *scattering* hacia adelante y un débil *scattering* hacia atrás.
- Rayleigh, si la partícula es mucho menor que la longitud de onda incidente, donde la intensidad de luz del *scattering* es similar en todas las direcciones, es decir isotrópico.
- Mie, para las partículas de tamaño intermedio.

El láser del equipo Nanosizer ZS es de He/Ne con una $\lambda=633$ nm, por lo tanto, en el orden nanométrico sólo se registrarán patrones de Rayleigh y Mie.

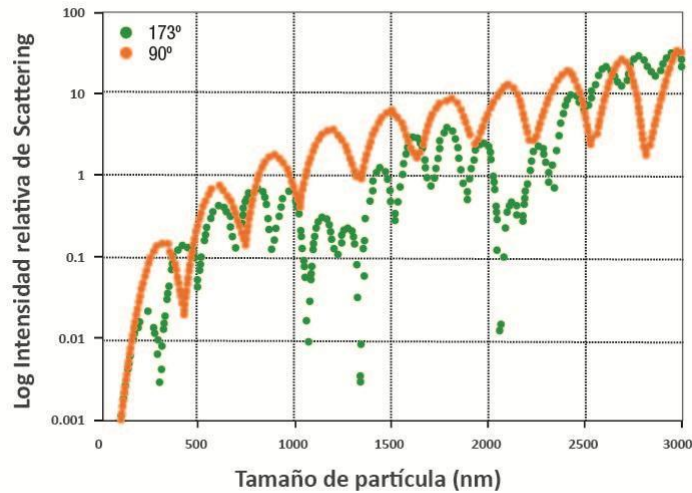


Fig. 1.6 Gráfico teórico del log de la intensidad relativa del scattering vs el tamaño de partícula

Gráfico para los ángulos de detección de 173° y 90°, según la teoría de Mie, asumiendo que la longitud de onda del haz de luz láser es 633 nm, el índice de refracción real es 1,59 y el coeficiente de extinción o índice de refracción imaginario es 0,001 (Malvern Instruments Ltd, 2014a).

La aproximación de Rayleigh nos dice que $I \propto d^6$ y también que $I \propto 1/\lambda^4$, donde I = intensidad de *scattering*, d = diámetro de la partícula y λ = longitud de onda del láser.

El término d^6 implica que una partícula de 50 nm producirá un *scattering* con una intensidad un millón de veces mayor que la producida por una partícula de 5 nm. En consecuencia, se corre el riesgo de que la intensidad de *scattering* de las partículas grandes solapen la de las más pequeñas. De este modo, se hace difícil medir por DLS las muestras con mezcla de partículas muy grandes y muy pequeñas (p. ej. agregados o emulsiones desestabilizadas) ya que la contribución de la intensidad del *scattering* de las partículas pequeñas es baja. El término $1/\lambda^4$ implica que la intensidad del *scattering* será mayor a menor λ del haz de luz láser incidente (Keck y Müller, 2008).

Cuando el tamaño de la partícula es prácticamente equivalente a la longitud de onda de la luz láser incidente, se observa una función compleja de máximos y mínimos de intensidad respecto del ángulo de incidencia. La teoría de Mie es la única que explica correctamente los máximos y mínimos del gráfico de intensidad en todos los ángulos y da el resultado para todos los tamaños, longitudes de onda y ángulos (Fig. 1.6). Más adelante veremos que esta es la teoría que aplica el software para transformar los gráficos de distribución en intensidad en distribución en volumen. Para lo cual es necesario conocer el índice de refracción y el coeficiente de extinción de la partícula.

El DLS mide la velocidad del movimiento browniano de las partículas a través de la medida de la velocidad a la cual la intensidad de la luz del *scattering* fluctúa.

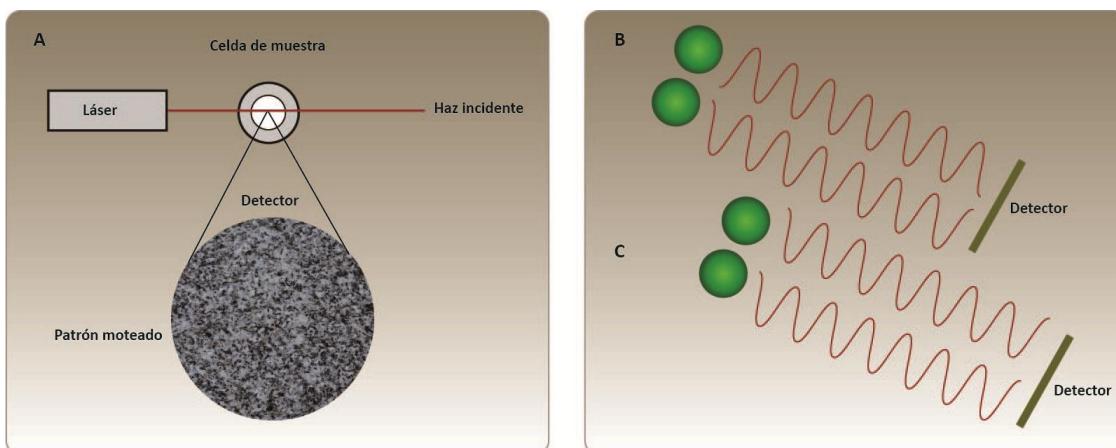


Fig. 1.7 (A) Representación esquemática del patrón moteado

La señal observada depende de la interferencia de fase de la luz de *scattering* que llega al detector.

(B) **Destructiva**: dos ondas interfieren y se cancelan mutuamente y resultando en una disminución de la intensidad detectada.

(C) **Constructiva**: dos ondas interfieren y sinergizan mutuamente resultando en un aumento de la intensidad detectada (Malvern Instruments Ltd, 2014a).

Para explicar cómo ocurren estas fluctuaciones de intensidad imaginemos que usamos una cubeta con una suspensión que se ilumina con luz láser y se usa un vidrio traslúcido para examinar la celda (Fig. 1.7 A). Veremos un patrón moteado donde los puntos oscuros corresponden a la luz de *scattering* donde la adición de fase es destructiva y las intensidades se cancelan mutuamente (Fig. 1.7 B). Por el contrario, los puntos brillantes corresponden a la interferencia constructiva, donde las ondas llegan desde las partículas en la misma fase (Fig. 1.7 C).

El movimiento browniano de las partículas hará que estos puntos brillantes y oscuros cambien de posición constantemente. La velocidad de estas fluctuaciones en la intensidad en cada punto depende del tamaño de partícula. Las partículas pequeñas hacen fluctuar la intensidad más rápidamente que las partículas grandes (Fig. 1.8 A y B).

Los instrumentos de análisis se fundamentan en dos tipos de detección de estas fluctuaciones:

- Detección homodina: análisis de la radiación dispersada, utilizada en el equipo Nanosizer ZS (Malvern®, Reino Unido).
- Detección heterodina: análisis de la radiación incidente y dispersada, utilizada en el equipo Microtrac UPA 150 (Pennsylvania, E.U.A.).

La mejor manera de medir estas fluctuaciones en la detección homodina es a través de una herramienta llamada correlador digital, en inglés *digital autocorrelator*. Básicamente es un comparador de señales y mide el grado de similitud entre dos señales o cómo varía en el tiempo una señal respecto de sí misma.

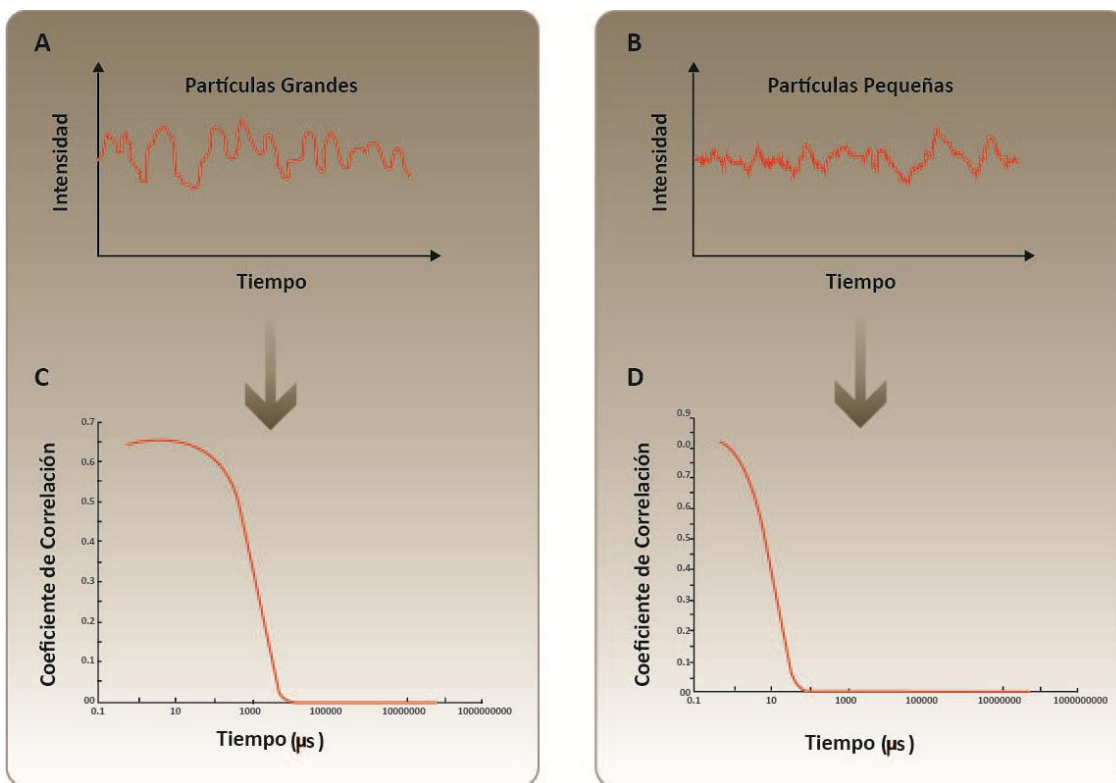


Fig. 1.8 Típicas fluctuaciones de la intensidad (A) de partículas grandes y (B) pequeñas con sus correspondientes correlogramas, donde la señal (C) toma largo tiempo en decaer con partículas grandes y (D) decae rápidamente con partículas pequeñas (Malvern Instruments Ltd, 2014a).

Si la intensidad de una señal es comparada consigo misma en un punto del tiempo y un punto más tarde, para una señal que fluctúa aleatoriamente, es evidente que las intensidades no van a estar relacionadas en ningún sentido. Si se conoce la intensidad inicial de una señal que fluctúa aleatoriamente no se puede predecir el valor que tendrá a tiempo infinito. En definitiva, no existe ninguna función que pueda predecir el valor de la intensidad a un tiempo determinado.

Sin embargo, si la intensidad de la señal a tiempo t es comparada con la intensidad a un Δt muy pequeño, existirá una fuerte relación o correlación entre las intensidades de estas dos señales. El período de tiempo Δt es del orden de los nano o microsegundos y se denomina “tiempo muestral del correlador” (en inglés, *sample time of the correlator*). Y el Δt estaría en el orden de los milisegundos o decenas de milisegundos. La correlación perfecta se indica como 1 y la no correlación como 0. Si las partículas son grandes la señal irá cambiando lentamente y la correlación persistirá por un largo tiempo (Fig. 1.8 C). Si las partículas son pequeñas se mueven más rápidamente y la correlación se reducirá más rápidamente (Fig. 1.8 D).

Si observamos el correlograma se puede extraer gran información acerca de la muestra. Por un lado, el tiempo en el cual la correlación comienza a decaer es un indicador del tamaño medio de la muestra. Luego, cuanto más abrupta es la caída más monodispersa es la muestra. Y contrariamente, si el decaimiento es más suave, mayor es la

polidispersidad.

Como vimos, el movimiento browniano aleatorio de las partículas hace que la intensidad de la luz de *scattering* fluctúe en función del tiempo. El correlador del equipo construirá la función de correlación $G(\tau)$ de la intensidad del *scattering*

$$G(\tau) = \langle I(t).I(t + \tau) \rangle$$

donde τ es la diferencia de tiempo (tiempo muestral) del correlador.

La función de correlación es una función de decaimiento exponencial y tiene la siguiente expresión:

$$G(\tau) = A[1 + Be^{-2\Gamma\tau}] \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde,

A = línea de base de la función de correlación

B = intercepto de la función de correlación

$$\Gamma = Dq^2$$

donde,

D = coeficiente de difusión traslacional

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda_o}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

donde,

n = índice de refracción del dispersante

λ_o = longitud de onda del láser

θ = ángulo de *scattering*

Para las muestras polidispersas, la ecuación será:

$$G(\tau) = A[1 + Bg_1(\tau)^2] \quad (\text{Ec. 1.3})$$

donde,

$g_1(\tau)^2 =$ sumatoria de todos los decaimientos exponenciales contenidos en la función de correlación.

Para transformar la función de correlación en tamaño el equipo utiliza varios algoritmos.

Existen dos aproximaciones:

- Por un lado ajustar una función exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (Z_{Ave}) y un estimado del ancho de la distribución de tamaño (PDI, índice de polidispersidad). Esta aproximación se conoce como Cumulant Analysis.
- Por otro lado se puede ajustar una función exponencial múltiple a la función de correlación, para obtener la distribución de tamaño de partícula, tal como cuadrados mínimos no negativos (en inglés NNLS, *non-negative least squares*) o CONTIN.

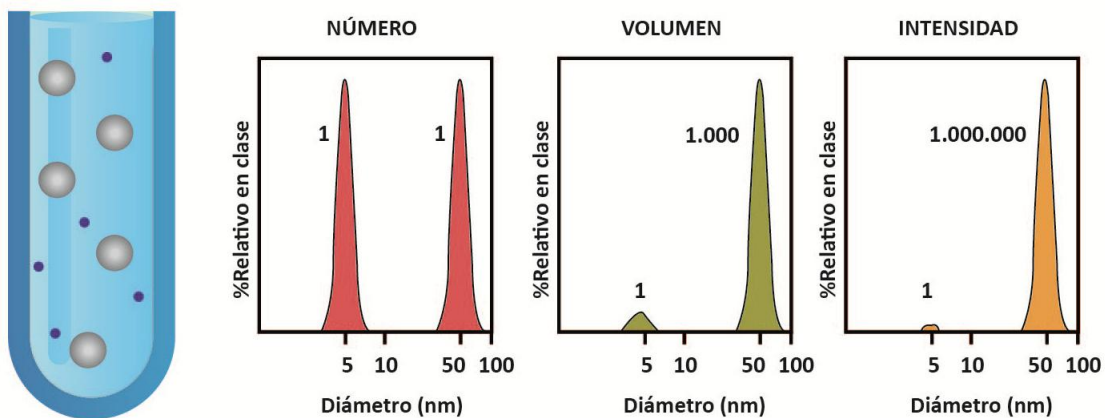


Fig. 1.9 Distribución en número, volumen e intensidad

La representación corresponde a una mezcla de partículas de 5nm y 50nm presentes en igual número.

La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de intensidad relativa de la luz dispersada por las partículas respecto al tamaño y se lo conoce como distribución de tamaño en intensidad (dato crudo). Este reporte puede transformarse en una distribución de tamaño de partícula en volumen o en número. En general, se observa que $\text{Diam} (\% \text{Int}) > \text{Diam} (\% \text{Vol}) > \text{Diam} (\% \text{Num})$. Y esta diferencia es más evidente cuanto más polidispersa es la muestra. Una manera simple de explicar esta diferencia es a través del siguiente ejemplo (Fig.1.9).

Consideremos dos poblaciones de partículas esféricas de 5 nm y 50 nm de diámetro en igual número. Obtendremos una distribución en número con dos picos, uno en 5 nm y otro en 50 nm con una relación de áreas igual 1:1. Si se convierte a una distribución en volumen, aplicando la teoría de Mie, la relación de picos será 1:1000, ya que el volumen de una esfera es $\frac{4}{3}\pi(d/2)^3$. Y para ello es necesario conocer el índice de refracción y coeficiente de extinción de la partícula, tal como se describió anteriormente. El diámetro expresado en % Vol es representativo para considerar el material encapsulado en el medio acuoso, es decir, cobra especial importancia cuando se encapsulan sustancias hidrosolubles. La distribución en intensidad tendrá una relación entre picos de 1:1.000.000, ya que, como se explicó, la intensidad del *scattering* es proporcional a d^6 .

1.11.2 Potencial Z

El potencial Z es una propiedad física que exhibe cualquier partícula cargada en suspensión.

Prácticamente todas las partículas coloidales adquieren carga superficial cuando son suspendidas en un medio polar como el agua. La carga tiene su origen en diferentes mecanismos entre los que se cuenta la disociación de las moléculas superficiales, la diferente adsorción de iones disueltos en el medio, la desigual disolución de dichos iones, defectos en la red cristalina de la partícula, o adsorción de tensioactivos iónicos. Cualquiera sea el mecanismo, sobre la superficie de la partícula se encuentran las cargas responsables de su carga superficial. Al potencial en ese plano se lo denomina potencial superficial (Delgado et al., 2005).

Una partícula cargada, altera la distribución de iones del medio que la rodea. Según la teoría de Gouy-Chapman-Stern, el campo eléctrico producido por esta carga atrae iones de signo opuesto (contraiones) del medio, los cuales forman una fina capa compacta, cerca de la superficie de la partícula. Esta capa fija o capa de Stern está rodeada por una más gruesa denominada capa difusa y tiene un exceso de contraiones y un déficit de iones de igual signo que la superficie de la partícula (coiones), que se distribuyen en la solución como resultado de las fuerzas electrostáticas y de la agitación térmica. El conjunto forma lo que se conoce como doble capa eléctrica. Y el potencial en el plano que separa la capa fija de la difusa es el potencial de Stern (Delgado et al., 2007; Estelrich y Gallardo, 2000).

En la capa difusa existe un límite hipotético, cercano al potencial de Stern, donde cualquier ion dentro de ese límite se moverá con la partícula cuando ésta se mueva en el seno del líquido, pero cualquier ion que se encuentre por fuera de este límite quedará donde se encontraba originariamente. Este límite que separa la zona móvil de la inmóvil se conoce como plano de deslizamiento (*slipping plane*). El potencial en el plano de deslizamiento es llamado potencial Z o potencial electrocinético (Delgado et al., 2007) (Fig. 1.10).

El movimiento de una superficie cargada respecto de una fase líquida adyacente es el principio básico de los fenómenos electrocinéticos. Éstos son la electroforesis, la electroósmosis, el potencial de sedimentación y el potencial de corriente. Cualquiera de estos fenómenos puede servir para la determinación del potencial Z. La mayoría de los instrumentos se basan en la electroforesis.

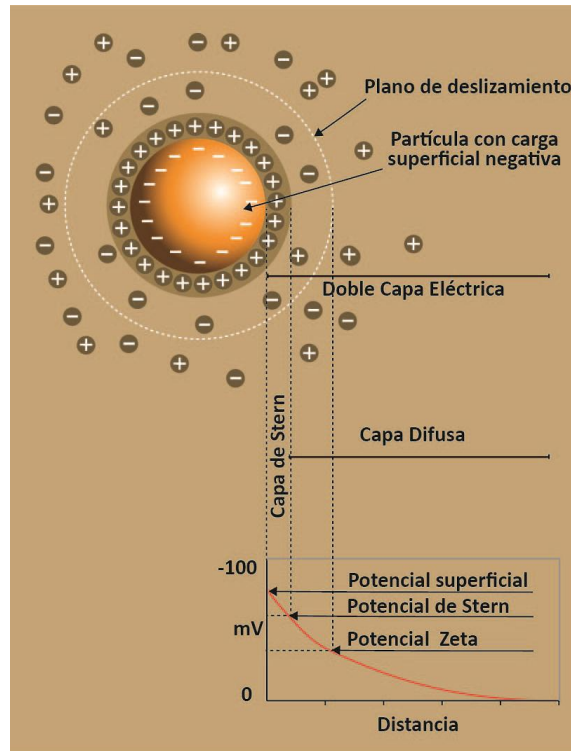


Fig. 1.10 Representación esquemática del potencial Z

La electroforesis es el movimiento que experimentan las partículas cargadas suspendidas en un electrolito hacia el electrodo de carga opuesta cuando se aplica un campo eléctrico a través del electrolito. Las fuerzas de viscosidad tienden a oponerse a este movimiento. Cuando se llega al equilibrio entre la atracción eléctrica y la resistencia debida a la viscosidad, la partícula se mueve a velocidad constante. La velocidad es dependiente de la fuerza del campo eléctrico o gradiente de voltaje, la constante dieléctrica del medio, la viscosidad del medio y el potencial Z. Y la velocidad de una partícula en un campo eléctrico se conoce como movilidad electroforética que se relaciona con el potencial Z a través de la ecuación de Henry:

$$\mu = \frac{\varepsilon z f(\kappa a)}{6\pi\eta} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

donde,

- μ = movilidad electroforética
- z = potencial Z
- ε = constante dieléctrica
- η = viscosidad
- $f(\kappa a)$ = función de Henry

El valor recíproco del parámetro de Debye-Hückel (κ^{-1}) es una medida del grosor de la doble capa eléctrica difusa y se conoce como la longitud de Debye. Mientras que el parámetro a , corresponde al radio de la partícula. En consecuencia, ka mide la relación del radio de la partícula y el grosor de la doble capa eléctrica (Fig. 1.11). Las determinaciones de potencial Z se realizan en su mayoría en medio acuoso con una moderada concentración electrolítica. En este caso $f(ka)$ es 1,5 y se conoce como aproximación de Smoluchowski.

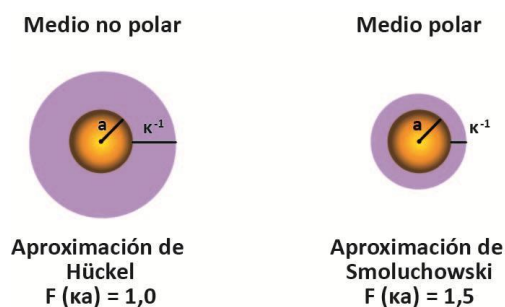


Fig. 1.11 Esquema de las aproximaciones de Hückel y Smoluchowski usadas para la conversión de la movilidad electroforética a potencial Z .

De este modo, el cálculo del potencial Z a partir de la movilidad electroforética es directo para sistemas que ajustan al modelo de Smoluchowski, por ejemplo partículas mayores que $0,2 \mu\text{m}$ dispersas en electrolitos con una concentración salina mayor a 10^{-3} M . Para partículas pequeñas dispersas en un medio con baja constante dieléctrica (no acuosos), $f(ka)$ se aproxima a 1 y permite un cálculo igualmente simple. Ésta se conoce como aproximación de Hückel (Malvern Instruments Ltd, 2014b).

Los equipos Zetasizer, serie Nano, utilizan una combinación de dos técnicas, el análisis de fase de *scattering* de luz (PALS, del inglés *phase analysis light scattering*), con una técnica patentada llamada M3 PALS y la velocimetría láser Doppler (LDV, del inglés *Laser Doppler Velocimetry*), denominada en algunos casos microelectroforesis de efecto Doppler (LDE, del inglés *Laser Doppler Electrophoresis*) (Malvern Instruments Ltd, 2014b). La base física de la microelectroforesis de efecto Doppler es, en principio, muy sencilla. La radiación que proviene de un láser es dispersada por las partículas y llega al detector. Si la partícula estuviera estacionaria, la radiación dispersada tendría la misma frecuencia que la radiación incidente (ν_0). Si la partícula se mueve, la frecuencia de la radiación dispersada (ν) experimenta un pequeño desplazamiento debido al efecto Doppler. Si la partícula se mueve hacia el detector con una velocidad V , la frecuencia de la radiación dispersada aumenta, mientras que si la partícula se aleja del detector la frecuencia disminuye:

$$\nu = \nu_0 (1 \pm V/c)$$

(Ec. 1.5)

siendo c la velocidad de la luz.

La variación de la frecuencia es muy pequeña, del orden de 100-1000 Hz, mientras que la frecuencia de un láser He-Ne es de 5×10^{14} Hz. La única forma de que este desplazamiento pueda medirse es por medio de la mezcla de la radiación dispersada y no dispersada. Este tipo de mezcla se conoce como heterodina. En estas condiciones se genera una diferencia de frecuencias, que aunque es de tan sólo unos cientos de Hz es lo suficientemente grande para que pueda ser detectada por los dispositivos electrónicos convencionales (Estelrich y Gallardo, 2000).

A fin de medir la variación de frecuencia, se debe medir el espectro de frecuencias de la señal que llega al detector. Esto se lleva a cabo a partir de la medida de la función de autocorrelación. Esta medida proporcionará el espectro de frecuencias y de aquí se obtendrá la velocidad de las partículas. Conocido el campo eléctrico aplicado se determina la movilidad electroforética y aplicando la ecuación de Henry se obtiene el potencial Z.

El software del Zetasizer utiliza dos modos de medición para determinar la media y la distribución del potencial Z (Malvern Instruments Ltd, 2014b).

- Fast Field reversal mode (FFR), donde el campo eléctrico aplicado a la muestra cambia la polaridad rápidamente de tal manera que sólo las partículas en suspensión se mueven en el campo aplicado y se obtiene un valor medio de potencial Z. Es el caso de suspensiones con alta conductividad.
- Slow field reversal (SFR), donde la polaridad del campo eléctrico se cambia lentamente y se observa también el movimiento del dispersante (electroendosmosis). Este modo permite la determinación de la distribución del potencial Z y se aplica en muestras con baja conductividad.

El potencial Z puede ser negativo o positivo, según la carga neta de la partícula y depende del pH y la conductividad dada por la concentración de iones del medio. En consecuencia, para interpretar un valor de potencial Z deben estar definidas las condiciones en las que fue adquirido.

Desde hace tiempo se ha reconocido que el potencial Z es un muy buen índice de la interacción entre partículas coloidales. Es así como la medida del potencial Z se usa comúnmente para evaluar la estabilidad física de estos sistemas. Empíricamente se comprobó que los sistemas coloidales con potencial entre +30 mV y -30 mV no son estables físicamente, es decir, se agregan.

Objetivos de esta Tesis doctoral

La falta de una adecuada medicina profiláctica y terapéutica de enfermedades infecciosas en países en vías de desarrollo podría atribuirse a las barreras socioeconómicas que limitan el acceso a la terapia a la población afectada y por otro lado a la escasez tecnológica de terapias disponibles y efectivas para prevenir o aliviar la progresión de la

enfermedad. El vacío tecnológico es especialmente evidente cuando se compara con los avances en nuevas terapias para enfermedades endémicas de países desarrollados. Claramente, hay una necesidad urgente de trasladar estos nuevos conocimientos a tecnologías seguras, estables y efectivas que puedan ser aplicadas mundialmente.

En este sentido, la vacunación por vía oral, es altamente conveniente. En primer lugar, porque induce no sólo inmunidad sistémica sino también inmunidad de mucosas, la cual es la primera línea de defensa como portal de entrada de la mayoría de los patógenos. Por el contrario, las vacunas parenterales muestran una eficiencia limitada y además es necesario el uso de material descartable y personal entrenado para su administración. Finalmente, la vacunación por vía oral ofrece una gran superficie de absorción, tiempo de residencia prolongado y mayor aceptación de los pacientes.

Por este motivo, el objetivo general de este trabajo fue estudiar la potencialidad de los arqueosomas como adyuvantes vía oral para la vacunación contra el *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico del mal de Chagas.

Para ello, los objetivos específicos fueron:

- 1) Preparar cultivos de arqueobacterias halófilas del género *Halorubrum tebenquichense*, para extraer sus lípidos polares totales (LPT) de un modo reproducible.
- 2) Determinar la composición de los LPT por metodologías simples para control de proceso.
- 3) Preparar ARQ a escala laboratorio y estudiar la incorporación de ovoalbúmina como proteína modelo.
- 4) Caracterizar los ARQ obtenidos (distribución de tamaño de partícula, potencial Z, incorporación de proteína).
- 5) Evaluar la homogeneización de alta presión (HPH) como método de producción a escala industrial a través del diseño estadístico de experimentos.
- 6) Estudiar la toxicidad de los ARQ en líneas celulares implicadas en la vía oral, Caco-2 como modelo de enterocitos y J774A.1 como modelo de macrófagos.
- 7) Profundizar la comprensión de la interacción de los ARQ y las células, para su captura y tráfico intracelular en células Caco-2 y J774A.1
- 8) Estimar la unión y transcitosis de los ARQ y liposomas en fase gel, utilizando un modelo *in vitro* de células simil-M (co-cultivos Caco-2/Raji).
- 9) Determinar la biodistribución del radiofármaco hidrosoluble ^{99m}Tc -DTPA incorporado a ARQ y liposomas luego de la administración oral en ratas.
- 10) Incorporar proteínas de *T. cruzi* a ARQ y evaluar la respuesta inmune generada, una vez administrados por vía oral.

Capítulo 2

ARQUEOSOMAS

Preparación y caracterización

*Después de todo he comprendido Que lo que el árbol tiene de florido Vive de lo que
tiene sepultado
(Soneto, Francisco Luis Bernárdez)*

En el Capítulo 2 se muestra el aislamiento y la amplificación en medio salino (3,5 M) de arqueobacterias a partir de muestras de suelo de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina). Las mismas se identificaron como *H. tebenquichense*. Los lípidos polares totales (LPT) se extrajeron y caracterizaron por cromatografía en capa delgada mono y bidimensional (TLC-1D y 2D) y espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). La mezcla de LPT estaba compuesta por: los fosfolípidos arqueales 2,3-di-O-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerofosfato metil éster (PGP-Me) y 2,3-di-O-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerol (PG); la cardiolipina *sn*-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-*sn*-di-O-fitanilglicerol (BPG); el sulfoglicolípido, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol (S-DGD-5) y la cardiolipina glicosilada (S-DGD-5-PA). Con los LPT aislados se planteó una primera aproximación para evaluar la factibilidad de obtención de arqueosomas (ARQ) empleando homogeneización de alta presión (HPH). Para este fin se utilizó un DoE multivariado. Los resultados demostraron que los ARQ ofrecieron una gran resistencia a la disminución del tamaño por HPH. Esto podría deberse a la hidrofobicidad de los arqueolípidos y la presencia de cardiolipinas arqueales que conferirían una mayor rigidez a la membrana. Y por último, se prepararon ARQ con ovoalbúmina (OVA), como proteína modelo, a escala laboratorio para evaluar métodos de caracterización estructural de las vesículas obtenidas utilizando propilenglicol (Pg) para aumentar la incorporación de la proteína. Los ARQ obtenidos tuvieron un tamaño menor a 200 nm (Z_{Ave}) y su Pdl fue menor a 0,300. El potencial Z fue menor a -30 mV, lo que justificaría la estabilidad física de estas vesículas. En todos los casos las T_m y pre-T_m fueron menores a -20°C. La incorporación de proteína no mejoró con el uso de Pg y la relación proteína/lípido fue de $\approx 0,100$ mg/mg.

Introducción

Los arqueosomas son liposomas preparados a base de lípidos polares totales de membrana de arqueobacterias. Desde los primeros reportes sobre la preparación de arqueosomas, como agentes adyuvantes (Sprott et al., 1996) no se ha abordado el estudio de métodos escalables para su producción industrial. La fabricación de sistemas estables de rango nanométrico es difícil y la mayoría de los métodos disponibles son factibles a escala laboratorio. El uso de homogeneización de alta presión (HPH) podría sortear estos inconvenientes debido a su reproducibilidad y su posibilidad de escalado bajo normas GMP (Blasi et al., 2011).

De hecho, la HPH se ha utilizado en la industria alimenticia por más de una centuria para procesar productos de alto contenido graso (Pandolfe, 1982). Además, hace tres décadas que la producción de liposomas a escala piloto e industrial ha empleado esta tecnología (Mayhew et al., 1984), cuya aplicación también ha sido investigada para la obtención de otros productos en el rango nanométrico como las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, del inglés *solid lipid nanoparticles*), los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, del inglés, *nanostructured lipid carriers*), los nanocristales o las emulsiones (Blasi et al., 2011; Constantinides et al., 2008; Driscoll, 2006; Hippalgaonkar et al., 2010; Junghanns y Muller, 2008; Martins et al., 2012b).

Para estudiar este proceso, una estrategia para minimizar el número de experimentos es utilizar los diseños factoriales como herramienta estadística. Durante los últimos años el concepto de “Calidad por Diseño” (QbD, del inglés *Quality by Design*) se ha ido implementando en el desarrollo farmacéutico. El foco de este concepto es que la calidad de un producto implica un meticuloso conocimiento del mismo y también de su proceso de obtención para así evidenciar los puntos críticos de la fabricación. El diseño de experimentos (DoE, del inglés *Design of Experiments*) es un modo racional de evaluar el efecto sobre el producto de numerosas variables de una formulación y variables de proceso con un número limitado de experimentos. A través del DoE es posible encontrar los efectos significativos principales, sus interacciones y el modelo matemático para caracterizar los factores que afectan el proceso. Las superficies de respuesta son usadas frecuentemente para visualizar la manera en que un modelo matemático describe el sistema (Martins et al., 2012b).

Existen varios reportes donde se ha demostrado que vesículas preparadas a base de arqueolípidos poseen efectos inmunoadyuvantes y pueden ser empleadas en el diseño de vacunas ya que promueven respuesta inmune humoral y celular contra los antígenos encapsulados. La mayoría de los estudios utilizan formulaciones inyectables de arqueosomas (Conlan et al., 2001; Higa et al., 2013; Krishnan et al., 2000b; Sprott et al., 1999) aunque existen reportes que los utilizan vía mucosa o tópica (Li et al., 2011; Patel et al., 2007). Para incrementar la incorporación de sustancias hidrofílicas y de alto peso molecular a vesículas lipídicas se ha utilizado el método de dilución con polioles, el cual utiliza propilenglicol (Pg) en

la formulación. (Manconi et al., 2009; Pavelic et al., 2005).

En este contexto, los objetivos del siguiente trabajo fueron el aislamiento, cuantificación e identificación de arqueolípidos a partir de cultivos de *Halorubrum tebenquichense*. Dado el gran interés en la potencial aplicación de los arqueosomas como adyuvantes por vía oral sería importante contar con un método escalable de preparación de arqueosomas. Entonces, se planteó una primera aproximación para evaluar la factibilidad de obtención de arqueosomas empleando HPH. Para este fin se utilizó un DoE multivariado para reducir el número de experimentos y construir un modelo de predicción a través de superficies de respuesta. Y por último, se llevó a cabo la preparación a escala laboratorio de arqueosomas con ovoalbúmina (OVA), como proteína modelo, para evaluar métodos de caracterización estructural de las vesículas obtenidas utilizando Pg para aumentar la incorporación de la proteína.

Materiales

La fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC, del inglés *hydrogenated soy phosphatidylcholine*; Phospholipon 90 G, pureza >90%) fue un obsequio de Phospholipid/Natterman (Colonia, Alemania).

El Sephadex G-50 medium, óxido de molibdeno, cloruro de N', N'-dimetilfenotiazin-5- io-3,7-diamino (Azure A), 5 metilbenceno-1,3 diol (orcinol) y la ovoalbúmina (grado V; Pureza>98%; Peso molecular 45KDa) fueron provistos por Sigma-Aldrich, (Buenos Aires, Argentina).

El extracto de levadura y el agar-agar fueron de Britania (Buenos Aires, Argentina). La peptona de caseína se adquirió en Neolab (Buenos Aires, Argentina).

El Tritón X-100 fue provisto por Biopack (Buenos Aires, Argentina).

El dodecil sulfato de sodio (SDS, del inglés *sodium dodecyl sulfate*) fue de ICN Biomedicals (Irvine, CA, EUA).

Los solventes como, metanol, ácido acético, propilenglicol y las sales utilizadas tales como, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, bicarbonato de sodio, bromuro de potasio y demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron en Anedra (Buenos Aires, Argentina).

Métodos

2.1 Aislamiento y cultivo de arqueobacterias

Con el fin de aislar arqueobacterias, se tomaron muestras de suelo de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina). Las mismas se clasificaron según el estrato de origen en sobrenadante (SNad), cristales rojizos (CR), cristales grises (CG) y barro negro

(BN). Posteriormente, de cada estrato se aislaron e identificaron microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*, género *Halorubrum* y especie *tebenquichense*, cepa no alcalifílica (Gonzalez et al., 2009). Para el aislamiento de las arqueobacterias se tomaron 100 µl de cada estrato que se estiraron sobre medio de aislamiento sólido en placas de Petri dentro de una cabina de flujo laminar (Nuair Biological Safety Cavi Net). Las placas se incubaron en estufa a 37°C. Las colonias resultantes se inocularon en 150 ml de medio líquido para cultivo de arqueobacterias y se incubaron a 37°C con agitación orbital a 200 rpm (agitador Sontec). Luego, el inóculo obtenido se amplificó a 37°C en 2 l de medio líquido para cultivo de arqueobacterias (Ihara et al., 1997). Los lotes de biomasa producidos fueron de un volumen total de 8 l. El crecimiento en medio líquido fue monitoreado por densidad óptica (DO) a 660 nm y al llegar a fase estacionaria tardía de crecimiento se cosechó la biomasa por centrifugación, la cual fue utilizada como fuente de arqueolípidos (Fig. 2.1).

El medio líquido para cultivo de arqueobacterias se preparó con medio basal según la Tabla 2.1 suplementado con extracto de levadura (5 g/l); dextrosa (3 g/l) y peptona de caseína (15 g/l). El medio de aislamiento sólido se preparó del mismo modo con el agregado de agar-agar (16 g/l).

El crecimiento en medio líquido se realizó en un volumen de 2 litros con agitación magnética vigorosa. Los cultivos se mantuvieron en un ambiente semi-cerrado a una temperatura de 37°C ± 1 °C, mediante 4 lámparas de 100 watt y 3 lámparas fluorescentes de 18 watt cuyo encendido y apagado se controló con un termostato.

Tabla 2.1 Medio basal para cultivo de arqueobacterias.

Componentes	Concentración (g/l)
Cloruro de sodio	200
Cloruro de potasio	4
Sulfato de magnesio	20
Cloruro de magnesio	1
Cloruro de calcio	0,2
Bicarbonato de sodio	0,2
Bromuro de potasio	0,5

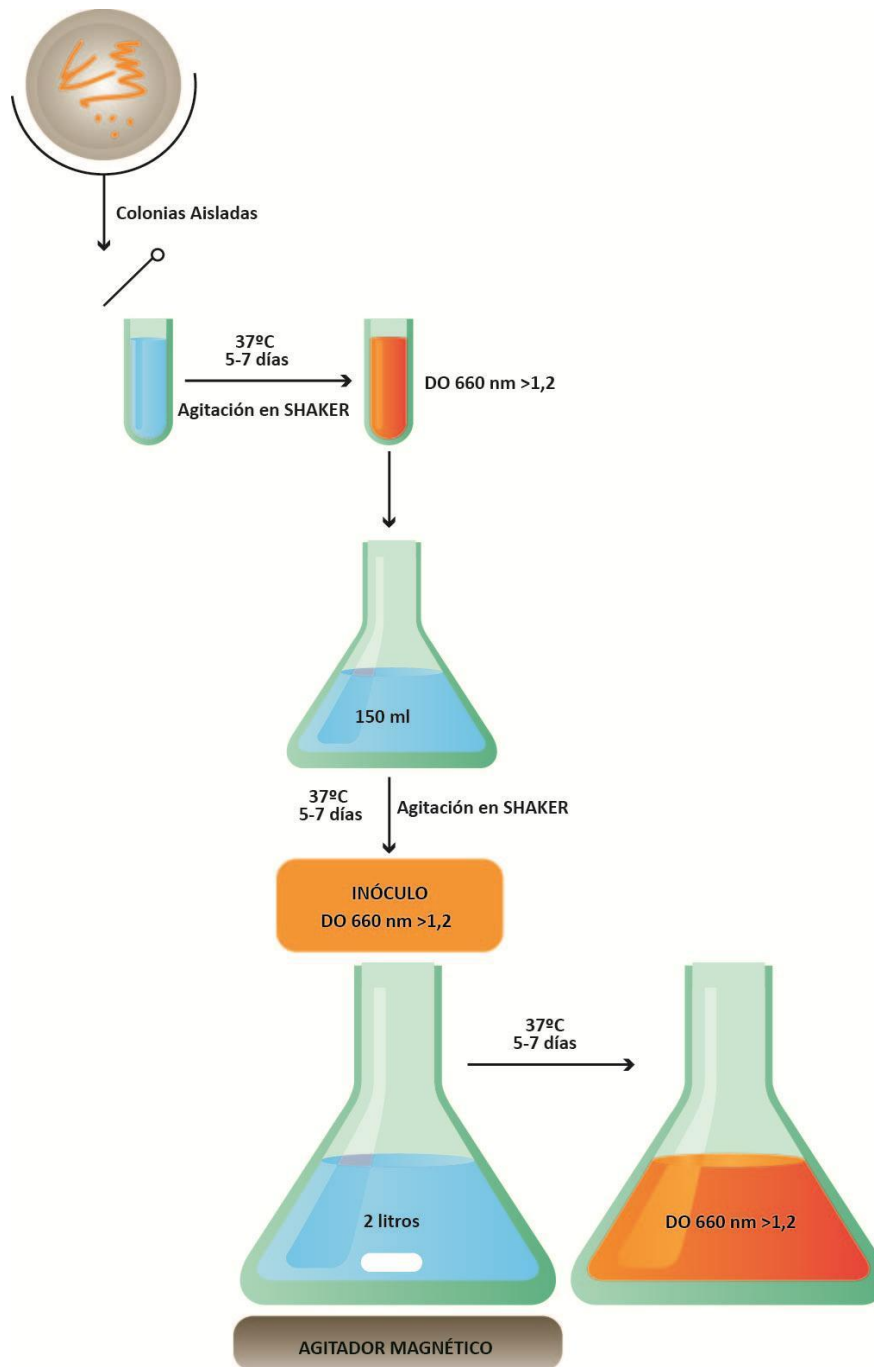


Fig. 2.1 Esquema del cultivo de arqueobacterias

2.2 Extracción, cuantificación y caracterización de arqueolípidos

2.2.1 Extracción de lípidos polares totales (LPT)

Los LPT se extrajeron a partir de inóculos de arqueobacterias según el método de Bligh y Dyer modificado para halófilas extremas. El método consiste en una serie de extracciones con solvente, cloroformo/metanol en diferentes proporciones. Finalmente, se obtiene la

fracción de LPT por precipitación con acetona fría (Kates, 1992).



Fig. 2.2 Diagrama de la extracción de lípidos polares totales

Brevemente, la biomasa obtenida por cultivo en medio líquido (8 l) se separó por centrifugación (10.000 g; 10 minutos; 4°C). Luego, la pasta celular obtenida (masa húmeda, aproximadamente 50 g) se disolvió en 80 ml de medio basal y se agregaron 300 ml de cloroformo/metanol (1:2 v/v). La mezcla se agitó magnéticamente por 2 h a temperatura ambiente para lisar las células. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 600 g por 5 minutos a 4°C y se descartaron los restos celulares. El sobrenadante se colocó en una ampolla de decantación y se agregó agua destilada (30 ml) para promover la separación de fases. En los casos necesarios, se realizaron sucesivas extracciones con cloroformo metanol (1:2 v/v) hasta la desaparición del color naranja de la fase acuosa superior. El solvente de la fase orgánica inferior se evaporó en un evaporador rotatorio. El film resultante se disolvió en cloroformo/metanol (1:1). Los productos insolubles se separaron por centrifugación (700 x g; 3 minutos; temperatura ambiente) y se descartaron. En estas condiciones, los LPT quedaron en el sobrenadante. Los LPT se precipitaron de la fase orgánica con acetona fría, se secaron en desecador al vacío hasta peso constante y almacenaron a -20 °C hasta su uso (Fig. 2.2).

2.2.2 Cuantificación de fosfolípidos

El método de Bötcher (Böttcher et al., 1961) consiste en una hidrólisis ácida de los fosfolípidos con ácido perclórico concentrado (70 % p/v) a 180°C. Posteriormente, los grupos fosfatos generados reaccionan a 100 °C con una solución de molibdato de amonio (0,22% p/v en una solución 1,4% v/v ácido sulfúrico concentrado en agua destilada) en presencia del agente reductor ácido ascórbico (10% p/v), para dar un complejo coloreado verde azulado, cuya absorbancia se determina a 818 nm. La curva de calibración se preparó con una solución de fosfato ácido de sodio en el rango de 0 a 50 nmoles como patrón de fosfatos inorgánicos.

Este método se basa en la detección del ion fosfato, para lo cual se debe transformar todo el fósforo presente en la muestra mediante una digestión ácida oxidante con ácido perclórico. El molibdato reacciona con los iones fosfatos para dar heteropoliácidos. La estructura de estos últimos es compleja, con los tetraedros fosfatos en el centro de una estructura formada por doce octaedros de MoO₆ que se unen al átomo de fósforo por puentes oxígeno. En medio ácido fuerte y en presencia de iones amonio, forma el molibdofosfato de amonio, de fórmula aproximada (NH₄)₃PMo₁₂O₄₀. Por la acción reductora del ácido ascórbico, el Mo del anión molibdofosfato se reduce de +6 a +5, originando compuestos de intensa coloración azul (azul de molibdeno).

2.2.3 Cromatografía en capa delgada monodimensional y bidimensional

Con el fin de determinar la composición cualitativa de los LPT, los mismos se sembraron en placas de silicagel 60 (Merck F-254, 12 x 3 cm; espesor 0.2 mm) para cromatografía en capa delgada (TLC, del inglés, *thin layer chromatography*) monodimensional (TLC-1D) y bidimensional (TLC-2D). Para la TLC-1D, se empleó cloroformo/metanol/ácido acético/agua (65:4:31,5:3,5 v/v) como solvente de desarrollo. Previo a la siembra, se realizó una corrida con solvente de desarrollo en ausencia de analitos para remover lípidos u otros compuestos contaminantes preexistentes. Luego se secaron en corriente de aire caliente. Las alícuotas de LPT se sembraron disueltas en cloroformo/metanol (1:1 v/v) a 1 cm de la base de la placa, con capilares de vidrio. La masa de LPT sembrada fue de aproximadamente 25 µg. Los lípidos se revelaron con los siguientes reactivos:

- (a) vapores de yodo, como revelador universal, para lípidos totales (Hamilton, 1966).
- (b) ácido sulfúrico en etanol para lípidos totales (ácido sulfúrico 5% v/v en etanol 96, seguido de calentamiento a 120°C) (Hamilton, 1966; Kates, 1978).
- (c) azul de molibdeno para fosfolípidos (1,3% óxido de molibdeno en ácido sulfúrico 4,2 M) (Corcelli et al., 2000).
- (d) orcinol en ácido sulfúrico para glicolípidos (100 mg orcinol, 25 ml agua, 375 ml metanol y 50 ml de ácido sulfúrico 0,15 mM; seguido de calentamiento a 120°C) (Svennerholm, 1956).
- (e) α-naftol para glicolípidos (α-naftol 0,5% v/v en metanol/agua 1:1 v/v) (Siakotos y Rouser, 1965).
- (f) Azure A en ácido sulfúrico para sulfoglicolípidos (Azure A (2 g % p/v) en ácido sulfúrico 1 mM; seguido de 4 lavados (metanol/ácido sulfúrico (0,02 M), 1:3 v/v, con agitación) (Kean, 1968; Murakami-Murofushi et al., 1997).
- (g) ninhidrina para aminolípidos (ninhidrina 0,2% p/v en etanol) (Marinetti, 1965).

Los factores de retención (R_f , del inglés *retention factor*) de los arqueolípidos (manchas) se calcularon como el cociente entre la distancia recorrida por la mancha y la distancia recorrida por el frente de solvente.

Para determinar la existencia de otros compuestos no resueltos en TLC-1D, se llevó a cabo la TLC-2D (8 x 8 cm, espesor 0,2 mm). La mezcla de LPT se sembró en la esquina izquierda inferior de la placa, y se corrió con cloroformo/metanol/agua (65:25:4 v/v) como solvente de desarrollo de la primera dimensión. Luego se secó con corriente de aire caliente y en otra cuba previamente saturada se corrió con cloroformo/metanol/ácido acético/agua (80:12:15:4 v/v) como solvente de desarrollo, en la segunda dimensión (Lizama et al., 2002). Los lípidos totales se revelaron con ácido sulfúrico en etanol (5% v/v).

2.2.4. Espectrometría de masas de ionización por electrospray

La relación masa/carga (m/z) de: a) los componentes de los LPT en solvente orgánico y b) cada mancha de las TLC-1D, reveladas con vapores de yodo se determinaron por espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS, del inglés *Electro Spray Ionization Mass Spectrometry*). Brevemente, cada mancha de la TLC-1D fue levantada por raspado y disuelta en 10 ml cloroformo/metanol (1:1, v/v). La silicagel fue eliminada por centrifugación a 600 g por 10 minutos; el sobrenadante se evaporó en rotaevaporador Heidolph para concentrar cada componente. La película formada se disolvió en 1 ml cloroformo/metanol (1:1, v/v) y se filtró a través de filtros de nylon de 0,22 μm para su análisis por espectrometría de masa. Los espectros se obtuvieron con un Thermo Finnigan LCQ Ion Max equipado con una fuente de ionización por electrospray. Las muestras se pasaron en forma continua por inyección directa en el espectrómetro a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las condiciones de interfase fueron: gas nebulizador (aire) 12 l/min, gas de cono (nitrógeno), voltaje de la aguja 1,2 l/min, -5.0 kV (iones negativos) y rango de masa 50-2000 uma.

En la técnica ESI-MS como en toda espectrometría de masas, se registra la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa. Debido a que se trata de una técnica de ionización suave (energía empleada ≤ 1 eV), prácticamente, no se produce ninguna fragmentación de la molécula. De este modo, resulta un método óptimo de ionización/vaporización para un amplio rango de biomoléculas. Conceptualmente, el electrospray es una forma sencilla de ionización/vaporización de moléculas polares. La muestra de interés se disuelve en un solvente o mezcla en el que en cierta proporción se encuentre ionizada en la forma $[\text{M-H}]^+1$ o $[\text{M-H}]^-1$ (Fenn et al., 1989).

En una inyección directa convencional, la muestra en solución se hace pasar a través de un capilar (diámetro interno 0,1- 0,2 mm) al que se aplica un alto potencial eléctrico (positivo o negativo). A la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se fragmentan en gotas más pequeñas y se desolvatan rápidamente bien por un proceso de desorción debido al campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando las moléculas ionizadas a la fase gaseosa. Todo el proceso de ionización se realiza a presión atmosférica. Luego, los iones viajan a través de un gradiente negativo de presión y potencial (cono de muestra) hacia la entrada del sistema de alto vacío del espectrómetro de masas. Existen diferentes modelos para explicar el mecanismo de formación del ión por electrospray y aún es tema de debate. Cualquiera sea este mecanismo, el resultado es un haz de iones de la muestra que podrá ser analizado de acuerdo a su relación m/z (Voyksner, 1997).

Las principales ventajas provistas por la técnica ESI-MS son: alta precisión, sensibilidad, reproducibilidad y la posibilidad de aplicación a soluciones de mezclas complejas sin necesidad de derivatizar.

La identificación de lípidos por ESI-MS está basada en la habilidad de cada clase de molécula en adquirir carga positiva o negativa. Los lípidos que no poseen partes ionizables

per se (por ej. diacilgliceroles) sin embargo, pueden ionizarse bajo ciertas condiciones si poseen un momento dipolar suficientemente grande como para interaccionar con un contra ión. Así, pueden detectarse las especies moleculares directamente en una sola medida a partir de un extracto lipídico total.

La muestra se analiza tanto en modo positivo como negativo para determinar los componentes presentes en el extracto. En el caso de los fosfolípidos, la detección de cada lípido en uno u otro modo dependerá de la carga que adquiera la cabeza polar al aplicarle el potencial positivo o negativo (Tabla 2.2). La identificación de lípidos individuales debe acompañarse por medidas de “*tandem mass spectrometry*” o espectrometría de masas en *tandem* (ESI-MS/MS) en donde cada relación m/z (o pico) de interés es sometido a una colisión que induce disociación. Los iones producidos permitirán identificar la molécula original de acuerdo a mecanismos de ruptura conocidos (Postle et al., 2007).

Tabla 2.2 Detección en modo de ionización positivo o negativo de fosfolípidos

Positivo	Negativo
Fosfatidilcolina	Fosfatidilinositol
Fosfatidiletanolamina	Fosfatidilserina
Fosfatidilserina	Fosfatidilglicerol
Esfingomielina	Ácido fosfatídico
	Fosfatidiletanolamina
	Fosfatidilcolina-Cl (aducto)
	Arqueolípidos

Los grupos de Rütters, Zink y Sturt desarrollaron métodos de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) en fase normal con detección ESI-MS que permite el análisis de arqueolípidos en sedimentos de muestras ambientales (Rutters et al., 2002; Sturt et al., 2004; Zink et al., 2003). La separación de los lípidos intactos se basa principalmente en la diferente polaridad de las cabezas polares, mientras que el MS permite la identificación de los core lipídicos. Sin embargo, la cuantificación es dificultosa por las grandes diferencias en la eficiencia de ionización, la eficiencia de los métodos de extracción y la adherencia de los lípidos polares al material de vidrio, en particular los fosfolípidos (Schouten et al., 2013).

2.3 Preparación de arqueosomas por HPH

La obtención de vesículas multilamelares (MLV) fue el paso previo a la preparación de arqueosomas por HPH.

Una masa de 300 mg de LPT se resuspendió en cloroformo/metanol (1:1 v/v) y se filtró por filtro de Teflon de 0,2 µm (Millipore®, Billerica, Massachusetts, E.U.A.). El filtrado se recogió en un balón de 200 ml y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a 40°C, 200

rpm, 100 mbares, hasta eliminar el solvente orgánico. Las trazas de solventes remanentes se eliminaron con una corriente suave de nitrógeno. Posteriormente, la película lipídica obtenida se hidrató con agitación energética. Para ello se agregaron 60 ml de buffer ácido acético 0,1 M/NaCl 0.9% p/v (Ac/NaCl), con agitación mecánica con buzo magnético y perlas de vidrio (700 rpm) en baño de 40°C hasta la desaparición total de la película y obtención de una suspensión homogénea.

Las suspensiones de MLV obtenidas (concentración de fosfolípidos 5 mg/ml) fueron procesadas en un homogeneizador de alta presión (Microfluidizer 110S, Newton, E.U.A.).

En el Capítulo 1 fue ampliamente discutida la importancia del tamaño nanométrico para una adecuada estimulación del sistema inmune. Para hallar las condiciones para la preparación por HPH de arqueosomas con una distribución de tamaño de partícula conveniente para tal fin y obtener la mayor información sobre el proceso con un número mínimo de ensayos, se aplicó diseño experimental. Las variables independientes seleccionadas (pares x,y) fueron el número de ciclos y la presión de entrada. La respuesta (z) o variable dependiente fue el tamaño de partícula, expresado como diámetro medio en %Volumen (Diam (%Vol) y en %Número (Diam (%Num), y el índice de polidispersión (IP), como estimación de la dispersión. El IP se calculó como el cociente entre el std y el diámetro medio, donde std o anchura de pico es el intervalo de tamaño que comprende el 68% de la población, teniendo como centro el diámetro medio obtenido.

El número de ciclos se varió entre 1 y 9 y la presión de entrada entre 0,8 y 4 bar, y se seleccionaron los niveles de cada variable según un diseño de “cuadrado+estrella” (ver Sección 2.4)

Luego, el método de HPH se comparó con el método a escala laboratorio de la película delgada con extrusión, a través de la medida del tamaño medio y el IP. Del mismo modo, se evaluó la estabilidad del tamaño de estos arqueosomas preparados a escala laboratorio al cabo de 4 semanas almacenados en heladera, tanto en buffer Ac/NaCl como en solución de sacarosa 10 mg/ml con agregado de NaCl 0,9 % p/v (sac/NaCl).

El tamaño de partícula de las muestras obtenidas fue determinado en un analizador de partículas Microtrac UPA 150. Este equipo mide distribución de tamaño de partícula por DLS con detección heterodina. El único modelo matemático de los datos crudos asume que la velocidad del movimiento browniano la origina el tamaño de la partícula. La distribución de tamaño se calcula a partir del espectro que se obtiene a partir del desplazamiento Doppler que tiene la luz dispersada por las partículas. Esto explica por qué el análisis realizado con el UPA no incluye ningún parámetro que estime la precisión de la medida de distribución de tamaño, como es el caso del Pdl en los equipos basados en PCS con detección homodina como el Zetasizer NanoZS (Malvern®, Reino Unido). Los parámetros de adquisición de datos se fijaron como se detalla a continuación. El tiempo de adquisición de datos fue de 10 minutos, el índice de refracción de las partículas fue 1,49, la densidad de las lamelas fue de 1,01 g/cm³ y el tipo de partículas esféricas (Barnadas-Rodriguez y Sabes, 2001).

2.4 Diseño experimental aplicado a HPH de arqueosomas

En todo problema experimental existen dos aspectos a considerar, por un lado, el diseño del experimento en sí y por otro, el análisis estadístico de los resultados obtenidos. Ambos aspectos deben tenerse en cuenta antes de la realización del experimento, ya que el análisis estadístico dependerá del tipo de diseño utilizado.

Los diseños factoriales son una clase de diseños experimentales que frecuentemente se usan para estudiar superficies de respuesta multifactor. La palabra factorial se refiere a que varios factores se modifican simultáneamente de manera sistemática. Luego, mediante un análisis matemático se obtienen los parámetros que mejor se ajustan a los datos experimentales, para obtener las ecuaciones que caracterizan al sistema (Deming y Morgan, 1987). Una de las mayores ventajas es que los diseños factoriales se pueden usar para evidenciar la existencia de interacción entre factores.

Las ecuaciones que predicen el comportamiento de los sistemas son polinomios compuestos por términos aditivos que incluyen constantes y variables. Uno de los polinomios más empleados para describir un sistema de dos variables (x e y) es el correspondiente al polinomio de segundo orden que se muestra en la siguiente ecuación:

$$z = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 y + \beta_3 x^2 + \beta_4 y^2 + \beta_5 xy + \varepsilon \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde, z es la respuesta (variable dependiente), x e y los dos factores investigados (variables independientes) y β_i los coeficientes de regresión múltiple que representan los efectos principales e interacciones. En particular, $\beta_0 - \beta_2$ representan los efectos principales, $\beta_3 - \beta_5$ las interacciones de dos factores, y ε el error residual de la ecuación, que incluye tanto el error experimental como la falta de ajuste.

El empleo de este polinomio implica una simplificación, se asume que el sistema puede describirse como una combinación de los siguientes tipos de función:

- Lineal, o interacción de primer orden representada por la siguiente ecuación:

$$z = \beta_0 + \beta_1 x \quad \text{ó} \quad z = \beta_0 + \beta_2 y$$

- Cuadrática o interacción de segundo orden representada por la siguiente ecuación:

$$z = \beta_3 x^2 \quad \text{ó} \quad z = \beta_4 y^2$$

- Cruzada, representada por la siguiente ecuación:

$$z = \beta_5 xy$$

La resolución de la Ec. 2.1 se obtendrá al realizarse n experimentos con diferentes combinaciones de niveles de cada factor, donde los coeficientes β_i son las incógnitas. Tanto los valores de β_i como el ajuste o no del modelo se obtienen a través de programas

estadísticos.

Cada diseño factorial se caracteriza por un número mínimo de experimentos independientes, que consisten en combinaciones entre las variables a distintos niveles. Para minimizar los errores y aumentar la precisión, los niveles se fijan en forma equidistante y centrados en el origen. El rango en el cual se mueve cada variable lo fija el investigador, según su conocimiento sobre el sistema, y luego los niveles se toman en puntos equidistantes distribuidos en ese rango (Deming y Morgan, 1987).

Ahora bien, para un diseño factorial completo, donde se realizan todas las combinaciones posibles, a medida que se incrementa el número de factores, el número de combinaciones aumenta exponencialmente. Entonces, se trata de restringir las combinaciones para llevar a cabo el mínimo número de experimentos. Las combinaciones de niveles y factores dependen de la cantidad de coeficientes a evaluar. Para el caso de dos factores, los diseños más empleados para sistemas de dos variables o factores son el de dos niveles o "cuadrado" (Fig. 2.3 A), el de tres niveles o "estrella" (Fig. 2.3 B) y el compuesto "cuadrado+estrella" (Fig. 2.3 C) (Deming y Morgan, 1987).

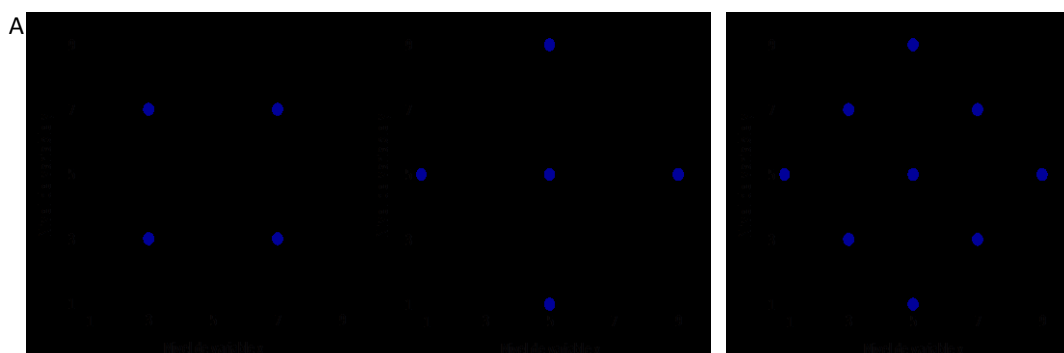


Fig. 2.3 Diseños para sistema de dos variables
Combinación de dos variables para (A) un diseño cuadrado a dos niveles; (B) un diseño estrella a tres niveles y (C) un diseño compuesto central "cuadrado+estrella".

En el diseño de 2 niveles el número mínimo de experimentos (f) para obtener la solución del sistema de ecuaciones está dado por la relación $f = mk$, donde m es el número de niveles y k el número de variables involucradas. Por lo tanto f será $2 \cdot 2 = 4$. Y permite la estimación de los efectos de primer orden (β_1 ; β_2 ; β_5).

Para estimar los efectos de segundo orden en sistemas con k variables se emplean los diseños en estrella, que proporcionan $f=2k+1$ combinaciones de variables. Para el caso de dos variables $f= 2 \cdot 2 + 1 = 5$. Pero no permite estimar los coeficientes de interacción (β_5).

La yuxtaposición del diseño factorial para dos niveles (cuadrado) con el diseño estrella puede ser usado para estimar todos los coeficientes β_i en un modelo completo polinomial de segundo orden. Este diseño compuesto (cuadrado+estrella) es eficiente para un pequeño número de factores o variables. En el caso en que los centros del cuadrado y la estrella coinciden se denomina compuesto centrado. Si no coinciden, se denomina compuesto no centrado. El número mínimo de experimentos, en este caso, está dado por la relación $f =$

$2k+2k+1$, por lo tanto, para $k = 2$, serán 9 experimentos.

Frecuentemente, se incluyen replicados en los diseños compuestos centrales. Si la superficie de respuesta se piensa que será homocedástica, sólo se replica el punto central. De no ser así, los replicados se reparten entre los puntos del diseño para obtener un “promedio” de incertidumbre. Un modelo estadístico presenta homocedasticidad cuando la varianza del error de la respuesta (z) o variable dependiente se mantiene a lo largo de los niveles de los factores (x,y) o variables independientes (Deming y Morgan, 1987).

Luego de realizados los experimentos se debe evaluar en qué grado las variables o factores estudiados influyen sobre la respuesta, es decir, si la superficie de respuesta calculada ajusta. Y por otro lado, cabe preguntar si el modelo matemático elegido es el más adecuado, de manera que sus predicciones no se alejen demasiado de los resultados experimentales.

La primera cuestión se evalúa mediante el coeficiente de determinación múltiple (R^2) y/o su raíz cuadrada, el coeficiente de correlación múltiple (R). R^2 , cuyo valor varía entre 0 y 1, cuantifica la influencia de las variables incluidas en el modelo matemático en las respuestas experimentales observadas. Cuanto más cercano a 1 es el valor de R^2 , puede afirmarse que las variables del modelo explican mejor la respuesta (Deming y Morgan, 1987).

Para evaluar el modelo deben observarse los valores de probabilidad (p) con los que se estimaron los coeficientes del polinomio (Ec. 2.1). Si los valores de p son menores a 0,05, podemos decir que ese valor es estadísticamente significativo (Deming y Morgan, 1987).

Para la obtención de ARQ por HPH se realizó un diseño experimental compuesto “cuadrado+estrella”. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Minitab. Para graficar respuesta vs. niveles de factores se utilizó la metodología de superficie de respuesta.

2.5 Preparación de arqueosomas con OVA a escala laboratorio. Separación de fracción libre de OVA. Disolución de arqueosomas y cuantificación de OVA

2.5.1 Preparación de arqueosomas conteniendo OVA a escala laboratorio

Los arqueosomas se prepararon por hidratación de films de LPT con buffer filtrado por membrana de 0,22 μm . Brevemente, se disolvieron 20 mg de LPT en cloroformo/metanol, relación 1:1 v/v y se filtraron por membranas de PTFE 0,22 μm . Luego, se evaporó el solvente en un rotaevaporador y con corriente de nitrógeno se eliminaron las trazas de solvente residual. Las películas obtenidas se almacenaron en desecador hasta su uso. Con el objeto de aumentar la incorporación de OVA en arqueosomas se testeó el uso de propilenglicol (Pg) para la preparación, como se describe a continuación. Al momento de ser utilizadas, las películas se hidrataron con 2 ml de buffer (Tris/NaCl, Tris 10 mM, NaCl 0.9% p/v, pH 7,4 ó Pg/Tris/NaCl, 10 mg/ml propilenglicol en buffer Tris/NaCl) filtrado por membrana de 0,22 μm , con o sin OVA en una concentración de 5 mg/ml, según la Tabla 2.3. La

hidratación se llevó a cabo con agitación mecánica con buzo magnético y perlas de vidrio (600-700 rpm) durante 1 hora a 40°C. La suspensión resultante se sonicó durante 1 hora en sonicador de baño (80 W, 40 KHz) con el fin de disminuir el tamaño medio y la lamellaridad de la población vesicular. Los arqueosomas multilamelares resultantes se extruyeron 20 veces de manera sucesiva a través de membranas de policarbonato de poro definido de 0,8; 0,4; 0,2 y 0,1 μm (NucleoporeTM). Dicha extrusión se realizó con un extrusor manual Miniextruder[®] (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, E.U.A.).

Tabla 2.3 Composición de vesículas.

Muestras	Conc. OVA (mg/ml)	Rel OVA/LPT mg (p/p)	Rel Pg/LPT mg (p/p)	Buffer
ARQ	-	-	-	Tris/NaCl
ARQ-OVA	5	1:2	-	Tris/NaCl
ARQ-Pg	-	-	1:1	Pg/Tris/NaCl
ARQ-Pg-OVA	5	1:2	1:1	Pg/Tris/NaCl

Tris/NaCl (10 mM Tris+0,9%p/v NaCl pH 7,4)
Pg/Tris/NaCl (10 mg/ml Pg en buffer Tris/NaCl)

2.5.2 Separación de OVA libre por cromatografía de exclusión molecular

La OVA no incorporada (OVA libre) a las vesículas, se separó por cromatografía de exclusión molecular (CEM). Para ello, se testearon los lechos de Sephadex G-75 y Sephadex G-100. El rango de pesos moleculares de fraccionamiento para proteínas globulares es 3.000-80.000 Da para G-75 y 4.000-150.000 Da para G-100. Los geles se hidrataron con el buffer de elución según las recomendaciones del fabricante: 24 horas a temperatura ambiente o 5 horas a 90°C. Las columnas empleadas fueron del tipo PD-10, de diámetro interno 1,5 cm y se rellenaron hasta una altura de 8 cm. El volumen de siembra de las muestras fue de hasta 10% del volumen de la columna. La elución del buffer se realizó por gravedad. El buffer utilizado fue Tris/NaCl. La concentración de fosfolípidos de las fracciones eluidas se cuantificó por el método de Bötcher (Böttcher et al., 1961), descrito en la Sección 2.2.2. La proteína se cuantificó por el método del ácido bicínico (Micro-BCATM PierceTM, Rockford, E.U.A.), descrito en la Sección 2.5.5.

2.5.3 Separación de OVA libre por centrifugación de dispositivos filtrantes

Los dispositivos filtrantes por centrifugación consisten en un tubo con un filtro removible que permite una rápida ultrafiltración. La aplicación más extendida es la concentración y el desalado de macromoléculas, como proteínas y DNA. Estos dispositivos retienen moléculas

por encima del peso molecular especificado (límite nominal). Debido a que estas membranas son utilizadas en otros dispositivos comerciales para la filtración de mayores volúmenes, el escalado sería sencillo.

En este trabajo se utilizaron dispositivos Microcon®, con un límite de 100 KDa. De este modo, la OVA (45 KDa) eluiría a través de la membrana (eluído) y los ARQ-OVA o ARQ- Pg-OVA quedarían retenidos en el filtro (retentato). Para ello se colocaron 250 µl de la muestra a separar en los dispositivos y se sometió a una centrifugación (14.000 g; 12 minutos; temperatura ambiente). Luego, el eluído se separó y el filtro se invirtió sobre otro tubo. El mismo se centrifugó nuevamente (1000 g; 3 minutos; temperatura ambiente) y se recuperó el retentato (ARQ-OVA o ARQ-Pg-OVA).

2.5.4 Disolución de arqueosomas para cuantificación de proteínas

Para cuantificar la proteína incorporada a los arqueosomas se deben disolver los mismos. Con este fin, se testearon dos solubilizantes de lípidos: Triton X-100 y SDS. La concentración de detergente se ajustó para producir una disminución de la absorbancia a menos del 2% de la absorbancia inicial, o bien hasta obtener una lectura menor al límite de detección del espectrofotómetro ($\leq 0,001$).

Previamente, se estudió la interferencia de los detergentes en la determinación de proteínas por el método Micro-BCATM (Pierce™, Rockford, E.U.A.). Luego, se evaluó la eficiencia de disolución sobre los ARQ de ambos detergentes en las concentraciones seleccionadas que no interferieron en dicho método. Las muestras se procesaron según la Tabla 2.4 y 2.5 y se midió la disminución de la absorbancia a diferentes longitudes de onda, luego de 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 2.4 Protocolo de disolución de ARQ con Triton X-100.

	ARQ	ARQ + Triton X-100	Triton X-100 (Blanco)
Buffer Tris/NaCl (µl)	900	850	950
ARQ (µl)	100	100	-
Triton X-100 ⁽¹⁾ (µl)	-	50	50

⁽¹⁾ La concentración de Triton X-100 que no produjo interferencia en el método Micro-BCA™ fue 10% p/v, en agua destilada

Tabla 2.5 Protocolo de disolución de ARQ con SDS

	ARQ	ARQ + SDS	SDS (Blanco)
Buffer Tris/NaCl (µl)	900	-	100
ARQ (µl)	100	100	-
SDS ⁽¹⁾ (µl)	-	900	900

⁽¹⁾ Las concentraciones de SDS que no produjeron interferencia en el método Micro-BCA™ fueron 1% p/v; 5% p/v; 10% p/v y 20% p/v, en agua destilada.

2.5.5 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Micro-BCATM (Pierce™, Rockford, E.U.A.). Este método utiliza el ácido bicínico (BCA, del inglés *bicinchoninic acid*) como reactivo detector para el Cu¹⁺, el cual se produce cuando el Cu²⁺ es reducido por los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino. El producto de la reacción se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con una de ion cuproso Cu¹⁺. Este complejo hidrosoluble exhibe un máximo de absorción a 562 nm (Smith et al., 1985). El micrométodo desarrollado es altamente sensible y presenta una linealidad para concentraciones de proteínas entre 0,5 µg/ml y 20 µg/ml en tubos ampliando el rango hasta 40 µg/ml en microplaca. En general, se ha observado que el método Micro-BCATM es más tolerante que el método de Lowry a las interferencias, como por ejemplo las causadas por tensioactivos.

2.6 Caracterización estructural de arqueosomas conteniendo OVA: distribución de tamaño de partícula, potencial Z, calorimetría diferencial de barrido

Los fosfolípidos de ARQ; ARQ-OVA, ARQ-Pg y ARQ-Pg-OVA se cuantificaron según el método de Böttcher (Böttcher et al., 1961), en tanto las proteínas de ARQ-OVA y ARQ-Pg-OVA se determinaron mediante el método del ácido bicínico (Micro-BCA Pierce™, Rockford, E.U.A.), empleando como blanco ARQ y ARQ-Pg, respectivamente. Luego, se calculó la relación proteína/lípido.

También se determinó la distribución de tamaño de partícula (Z_{Ave} y P_{dI}) por DLS en un equipo Zetasizer NanoZS (Malvern®, Reino Unido) a 25°C en buffer Tris/NaCl. El potencial Z se midió en el mismo equipo a 25°C en agua destilada.

Finalmente, el análisis térmico de las vesículas se realizó por calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *differential scanning calorimetry*). Para tal fin se empleó un calorímetro DSC Q 200 (TA Instruments, New Castle, DE, E.U.A.), equipado con un sistema de enfriamiento con nitrógeno líquido. La atmósfera inerte en la celda de DSC se consiguió por una purga de nitrógeno a un flujo de 50 cm³/minuto. Previo al calentamiento, las muestras se equilibraron a -50°C en cápsulas de aluminio de bajo peso no herméticas con tapa (Tzero®). En todos los casos la rampa de calentamiento fue desde -50°C a 20°C con una velocidad de 5°C/minuto con un volumen de muestra de 10 µl.

2.7 Análisis estadístico

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros estudiados se aplicó el test *t* de Student.

Resultados

2.8 Crecimiento de arqueobacterias

Las arqueobacterias aisladas de los diferentes estratos se identificaron como *Halorubrum tebenquichense*, cepa no alcalifílica, a través de pruebas bioquímicas y la secuenciación del RNAr 16S (Gonzalez et al., 2009).

En base a los resultados sobre los rendimientos en el cultivo de los diferentes estratos (SNad, CR, CG y BN) de *H.tebenquichense* (Higa, 2012) se seleccionó la cepa aislada del estrato BN para este trabajo.

El crecimiento en placa, dio lugar a las típicas colonias de coloración naranja (Fig.2.4).

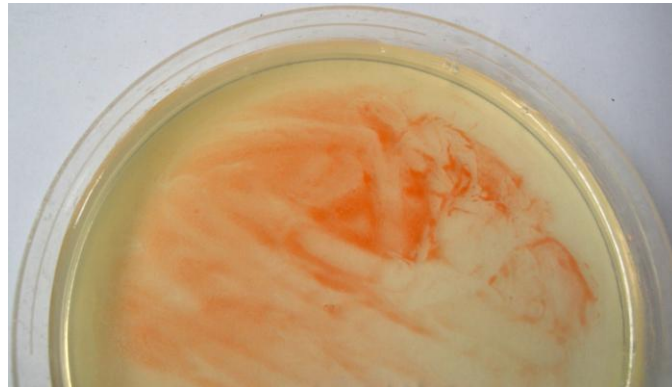


Fig. 2.4 Colonias de *H. tebenquichense*

La fase estacionaria de crecimiento en medio líquido se obtuvo a los 5 días (Fig. 2.5 A) con el intenso color naranja, característico de estas arqueobacterias halófilas (Fig.2.5 B). Una vez en fase estacionaria, las células se recolectaron por centrifugación, con un rendimiento de entre 50-80 g de biomasa húmeda a partir lotes de 8 litros de cultivo. La masa obtenida de LPT fue de 90-120 mg.

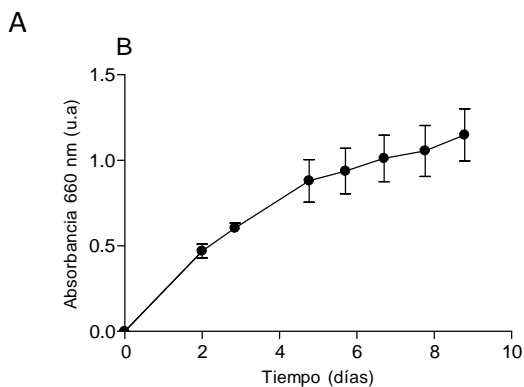


Fig. 2.5 Cultivo de arqueobacterias (A) Curva de crecimiento y (B) cultivo en medio líquido.

2.9 Extracción, cuantificación y caracterización de LPT

El primer paso en cualquier análisis de lípidos es aislar los mismos del sistema biológico mediante la extracción con solventes orgánicos y la posterior remoción de los componentes no lipídicos. Los métodos típicos para extraer fosfolípidos de mezclas complejas son Bloor, Bligh y Dyer, Folch y Nichols (Veenstra et al., 1998a). El utilizado en este trabajo fue el método de Bligh y Dyer modificado para halófilas extremas.

Una técnica de screening para la caracterización de lípidos es la cromatografía en capa delgada, ampliamente utilizada por microbiólogos para caracterizar lípidos extraídos de microorganismos (Schouten et al., 2013). La misma es una técnica versátil empleada en la resolución inicial de mezclas lipídicas, que permite aplicar tinciones diferenciales para detectar diferentes tipos de lípidos. Adicionalmente, el desarrollo de la TLC-2D incrementa la resolución de la TLC-1D sin necesidad de equipamiento especializado y en relativamente poco tiempo.

Luego, se pueden utilizar técnicas de identificación como la espectrometría de masas. Gracias a la aparición de las técnicas de ionización “*Soff*” como ESI o MALDI (del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization*) la espectrometría de masas comenzó a utilizarse para el análisis de lípidos, ya que los mismos no son fragmentados durante el proceso (Veenstra et al., 1998b). El peso molecular de la mayoría de estos compuestos se encuentra en el rango de detección de ESI.

2.9.1 Cuantificación de fosfolípidos

El género *Halorubrum* posee un alto contenido de fosfo-arqueolípidos (Kates, 1978). La cuantificación de LPT se llevo a cabo indirectamente, a partir de la determinación de su contenido de fosfatos por el método de Bötcher (Böttcher et al., 1961). Sólo se utilizaron los lotes de arqueolípidos con contenido de fosfolípidos mayor a 90% p/p.

2.9.2 Cromatografía en capa delgada monodimensional y bidimensional

En la Fig. 2.6 se muestran imágenes representativas de las TLC-1D teñidas con los diferentes reveladores. Tanto los vapores de yodo como el ácido sulfúrico revelaron cinco manchas (Fig. 2.6 A y B). Cuatro de ellas se identificaron con el revelador azul de molibdeno como fosfolípidos (Fig. 2.6 C). Tanto el orcinol como el α -naftol revelaron dos glicolípidos (Fig. 2.6 D y E) que fueron identificados como sulfoglicolípidos con el revelador Azure A (Fig. 2.6 F). La ninhidrina no reveló aminolípidos.

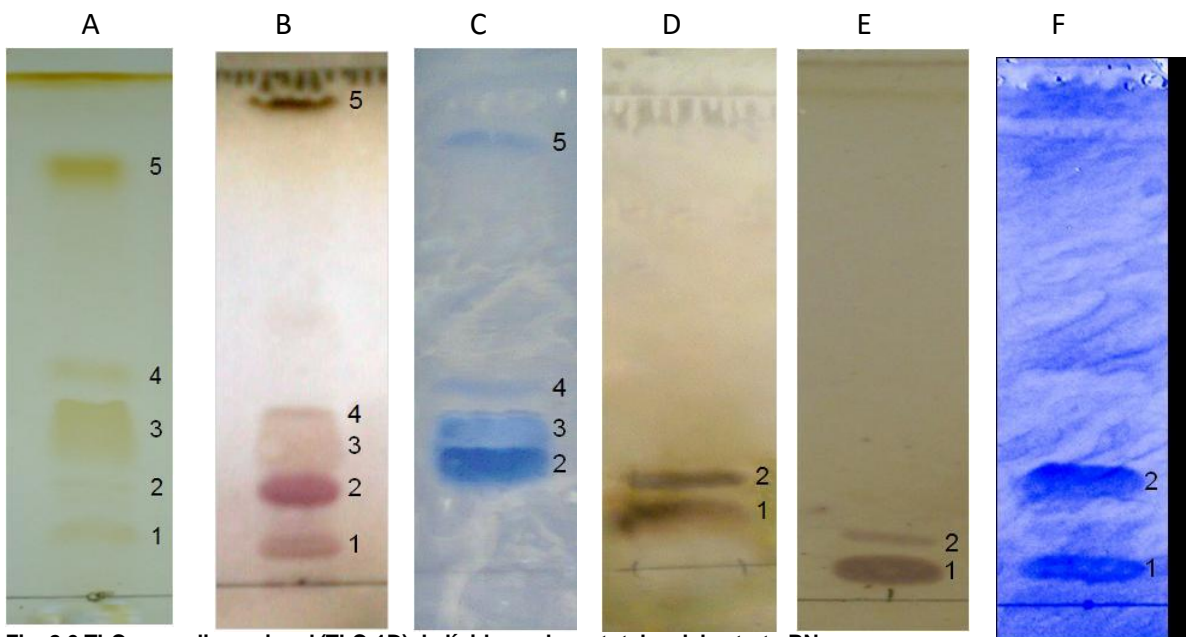


Fig. 2.6 TLC monodimensional (TLC-1D) de lípidos polares totales del estrato BN
 Los reveladores utilizados fueron (A) vapores de yodo, (B) ácido sulfúrico, (C) azul de molibdeno, (D) orcinol, (E) α -naftol y (F) Azure A.
 Ref.: (1) S-DGD-5 (2) S-DGD-5-PA (3) PGP-Me (4) PG (5) BPG.

Puede observarse un resumen de los Rf de las manchas y el comportamiento frente a las diferentes tinciones en la Tabla 2.6.

La TLC-2D revelada con ácido sulfúrico confirmó la presencia de cinco compuestos (Fig. 2.7).

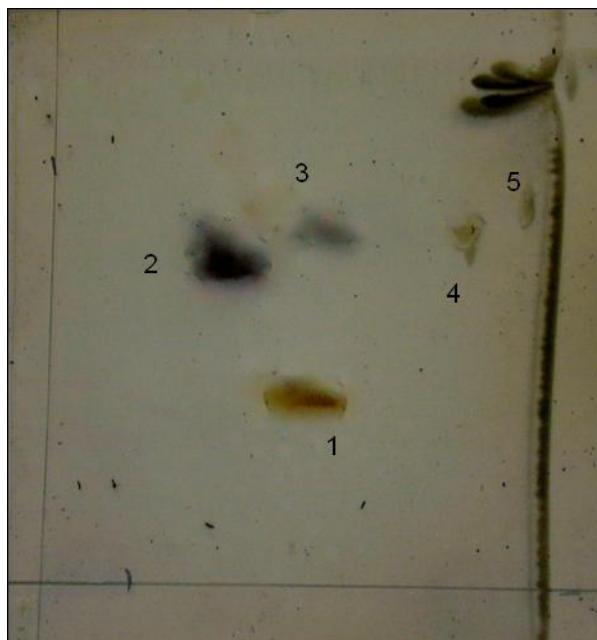


Fig. 2.7 TLC bidimensional (TLC-2D)
 Ref.: (1) S-DGD-5 (2) S-DGD-5-PA (3) PGP-Me (4) PG (5) BPG.

Tabla 2.6 Rf, patrón de tinción y relación m/z por ESI-MS de cada arqueolípido identificado de los LPT de *H. tebenquichense* estrato BN.

N°	Lípido	Rf	Reveladores						ESI-MS		
			Iodo	H ₂ SO ₄	Azul de Molibdeno	Orcinol	α-naftol	Azure A	m/z M-H ⁻¹	m/z M-H ⁻²	Aducto
5	BPG	0,82±0,16	+	+	+	-	-	-	1521	-	-
4	PG	0,46±0,06	+	+	+	-	-	-	805	-	-
3	PGP-Me	0,34±0,04	+	+	+	-	-	-	899	-	922
2	S-DGD-5-PA	0,16±0,06	+	+	+	+	+	+	1770	885 ⁽¹⁾	-
1	S-DGD-5	0,08±0,03	+	+	-	+	+	+	1055	-	1113

⁽¹⁾ Pico presente en condiciones ácidas (ver Sección 4.14, Fig. 4.7)

2.9.3 Espectrometría de masas de ionización por electrospray de LPT de *H. tebenquichense*

Para completar la caracterización de los lípidos revelados por TLC se procedió a analizar los LPT por ESI-MS. Los LPT disueltos en cloroformo/metanol (1:1) se analizaron por inyección directa. Las señales se registraron exclusivamente en modo negativo y se identificaron los m/z 805; 899; 1055; 1521 y 1770 (Fig. 2.8). Debido a la presencia de sodio en el medio, también se registró un pico de m/z 1113, asociado a m/z 1055, y un pico m/z 922, asociado a m/z 899, correspondientes a los respectivos aductos con cloruro de sodio y sodio.

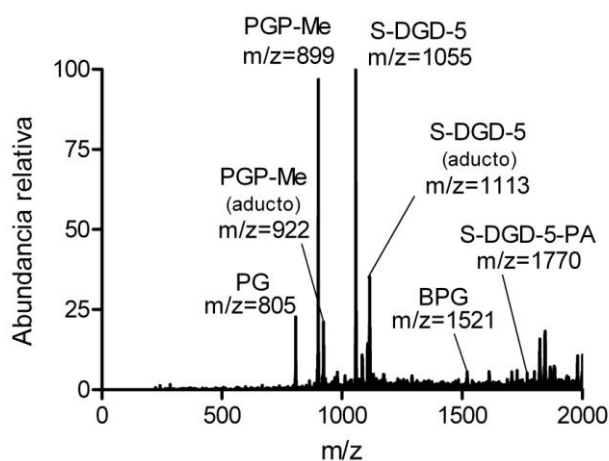


Fig. 2.8 Espectro ESI-MS en modo negativo de los LPT extraídos de *H. tebenquichense* del estrato BN

Para facilitar la asignación de cada señal al lípido correspondiente, se extrajo de la placa de silicagel cada mancha revelada con vapores de yodo en la TLC-1D y se realizó la inyección directa en ESI-MS. Los datos se adquirieron en modo negativo. Los espectros de cada mancha de la TLC-1D de *H. tebenquichense* del estrato BN se muestran en la Fig. 2.9.

En la Tabla 2.6 pueden observarse los valores m/z de los arqueolípidos aislados, donde se señalan los iones mono (M-H-1) y bicargados (M-H-2) y los aductos.

En definitiva, a partir de las tinciones diferenciales en TLC-1D y los resultados de ESI-MS de cada mancha, junto con los datos bibliográficos de composición lipídica de arqueobacterias halófilas extremas (Corcelli y Lobasso, 2006), la mezcla de LPT estaría compuesta por los siguientes lípidos, cuyas estructuras se muestran en la Fig. 2.10:

- a. El sulfoglicolípido, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil- *sn*-glicerol, S-DGD-5 (m/z=1055 como ión monocargado y m/z=1113 correspondiente al S-DGD-5 aducto con cloruro de sodio; Rf=0,08).
- b. La cardiolipina glicosilada, S-DGD-5-PA (m/z=1770 como ión monocargado; Rf=0,16).
- c. El fosfolípido arqueal 2,3-di-O-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerofosfato metil éster, PGP-Me (m/z=899 como ión monocargado y m/z=922 correspondiente al PGP-Me aducto con sodio; Rf=0,34).
- d. El fosfolípido arqueal 2,3-di-O-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerol, PG (m/z=805 como ión monocargado; Rf=0,46).
- e. La cardiolipina *sn*-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-*sn*-di-O-fitanilglicerol, BPG (m/z=1521 como ión monocargado; Rf=0,82).

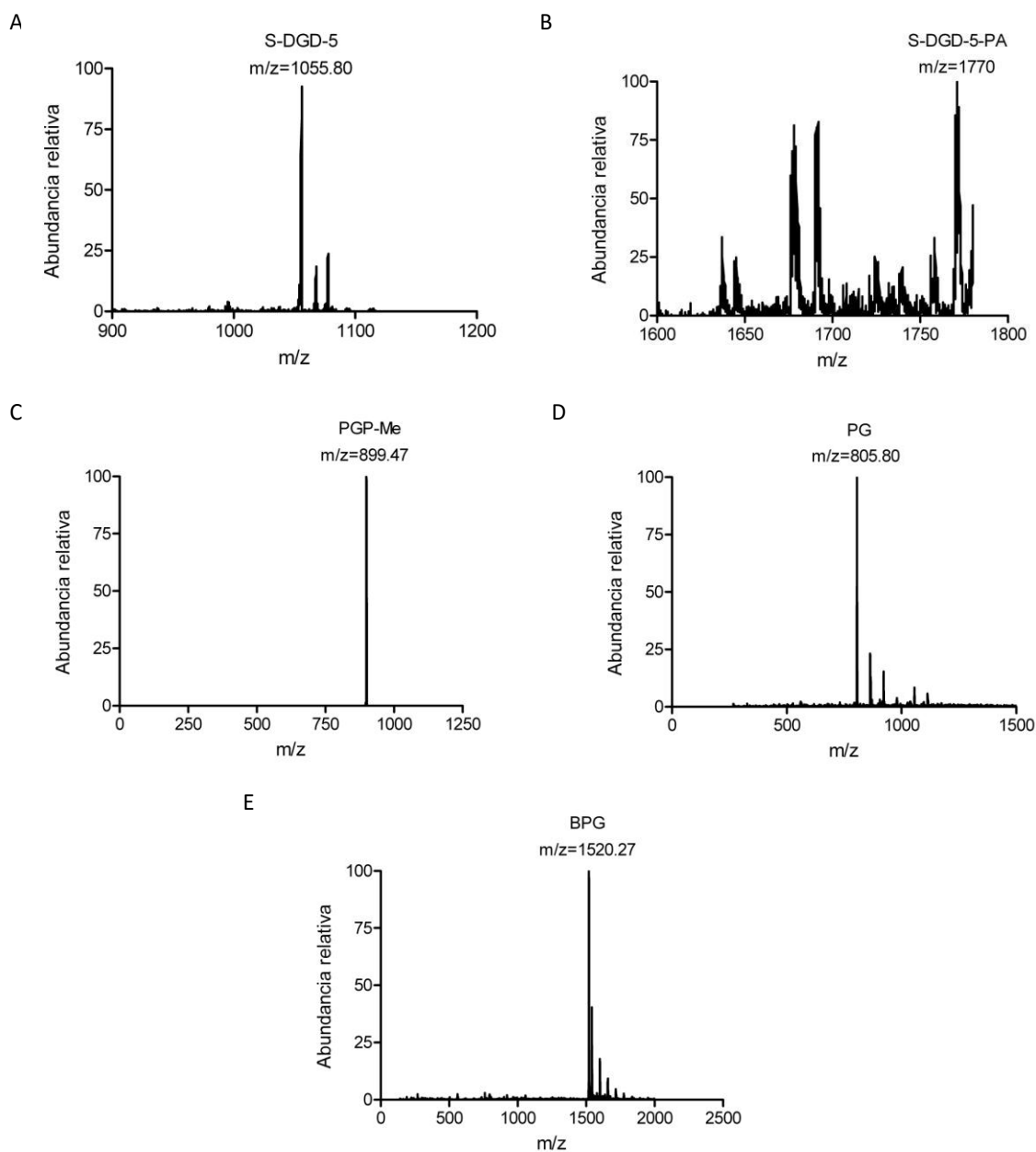
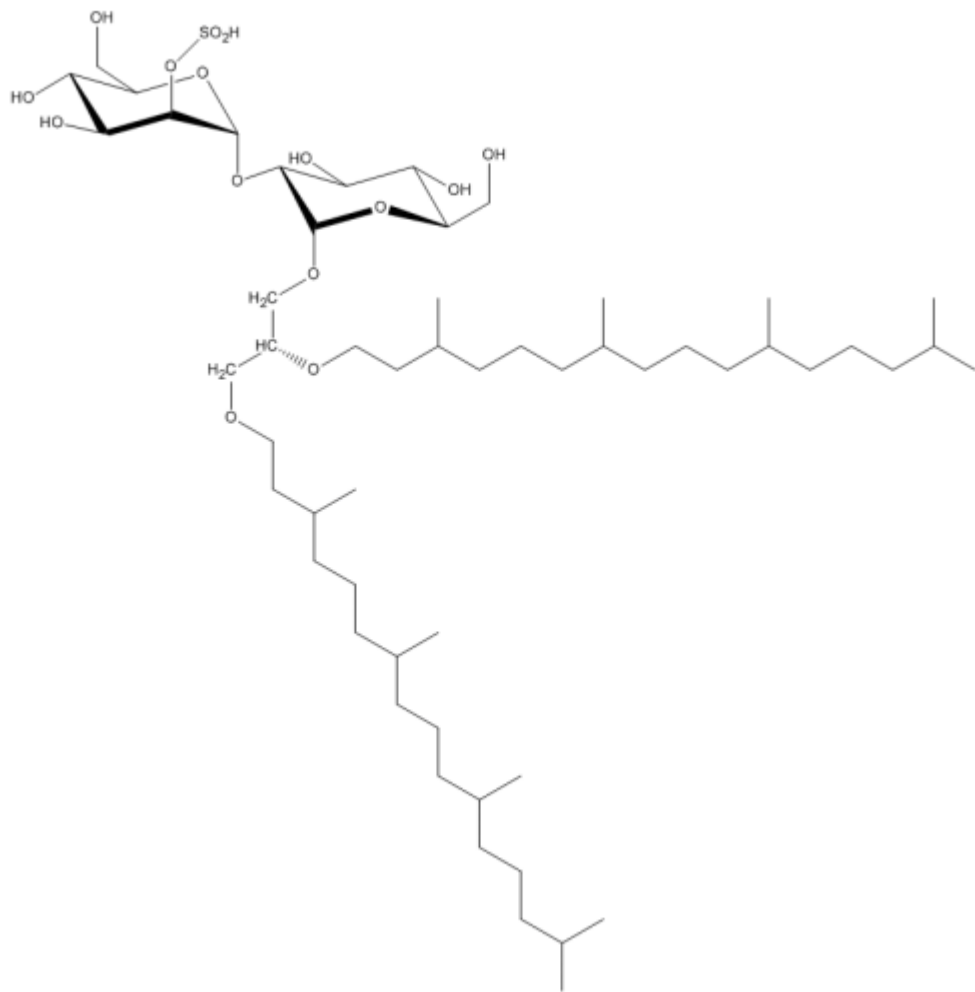


Fig. 2.9 Espectros representativos de ESI-MS en modo negativo de cada mancha aislada de la CCD-1D (A) Mancha 1 (S-DGD-5); (B) Mancha 2 (S-DGD-5-PA); (C) Mancha 3 (PGP-Me); (D) Mancha 4 (PG); (E) Mancha 5 (BPG).

S-DGD-5



S-DGD-5-PA

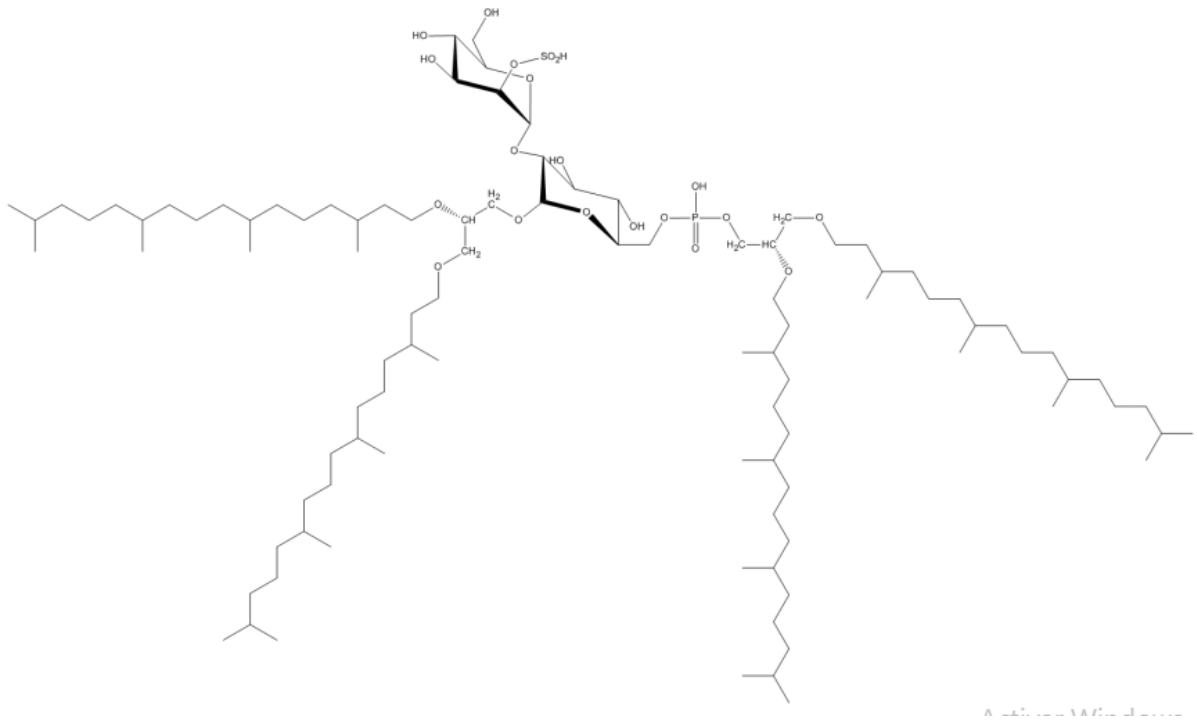


Fig. 2.10 Estructura de los lípidos polares totales extraídos de *H. tebenquichense*

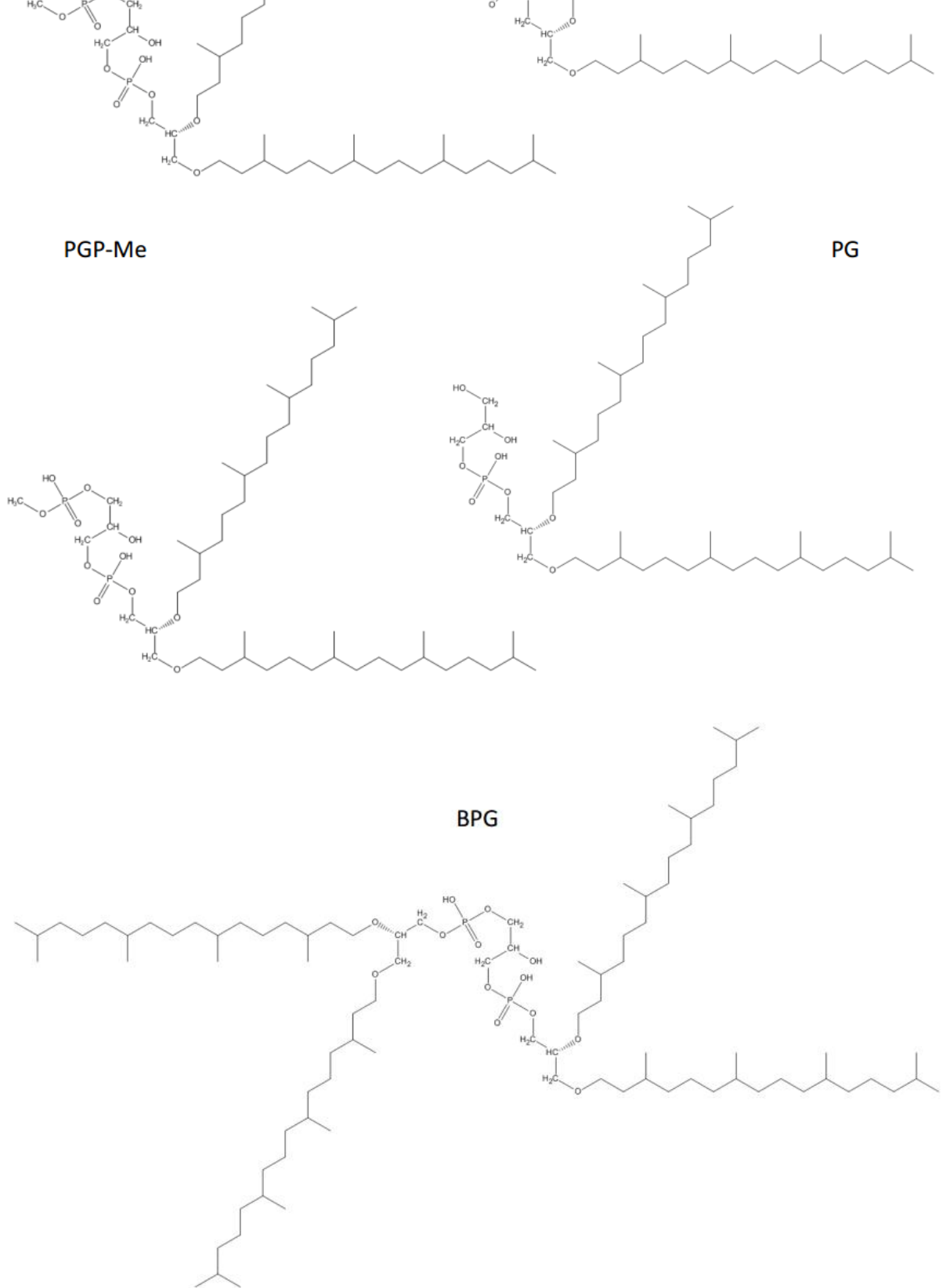


Fig. 2.10 (cont.) Estructura de los lípidos polares totales extraídos de *H. tebenquichense*

2.10 Aplicación de DoE a la preparación de ARQ por HPH

Los experimentos realizados del diseño cuadrado+estrella se muestran en la Fig. 2.11, donde en 6 de las 9 combinaciones de niveles se realizaron replicados, de manera que se pudo evaluar el error experimental. Dado que se contaba con muestra suficiente, se pudieron agregar puntos fuera del diseño, de modo de aumentar el número de observaciones. Estos puntos fueron los pares (0,8;1); (0,8;9); (4;1) y (4;9), que corresponden a combinaciones de los factores en los extremos de los rangos estudiados.

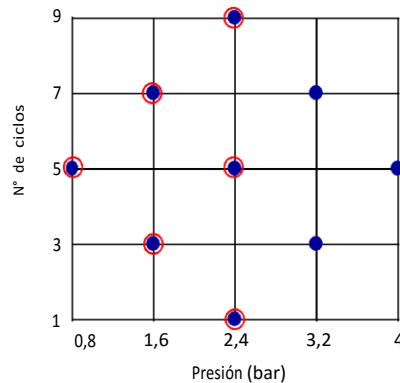


Fig. 2.11 Diseño cuadrado+estrella

Los puntos azules señalan las combinaciones “número de ciclos-presión” realizadas. Los puntos marcados con rojo muestran los replicados realizados.

Inicialmente se propuso como modelo de ajuste el polinomio de segundo orden completo, según la Ec. 2.1 de la Sección 2.4:

$$z = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 y + \beta_3 x^2 + \beta_4 y^2 + \beta_5 xy + \varepsilon$$

donde z es Diam (%Vol) o Diam (%Num); x es el número de ciclos e y es la presión de homogeneización.

Para el Diam (%Vol) no se encontraron modelos de ajuste significativos. Las MLV con un Diam (%Vol) de 1.730 ± 1.429 nm se disminuyeron a un Diam (%Vol) de aproximadamente 750 ± 750 nm. Esto se logró a presiones mayores que 2,4 bar y con un procesamiento entre 5 y 7 ciclos.

Para el Diam (%Num) el polinomio de segundo orden completo (Ec. 2.1) no ajustó. Por consiguiente, se fueron descartando progresivamente los términos no significativos, comenzando por los de significación menor. El proceso se realizó hasta llegar al polinomio de mejor ajuste, donde se obtuvieron los coeficientes que tuvieron una probabilidad estadísticamente significativa. También debe indicarse que se excluyó una observación que el programa señaló como inusual. Una observación inusual (en inglés, *outlier*) es aquella que parece desviarse marcadamente respecto a los otros miembros de la población. Los coeficientes obtenidos fueron β_0 ($p < 0,0001$); β_2 ($p < 0,0001$) y β_4 ($p < 0,01$) y se muestran en la Tabla 2.7. Es decir, que el diámetro medio, expresado como Diam (%Num), fue dependiente

sólo de la presión de homogeneización con un modelo cuadrático y lineal. No fue dependiente del número de ciclos y no existieron interacciones entre los factores (presión y número de ciclos).

Tabla 2.7 Ajuste para Diam (%Num) vs Presión y número de ciclos.

R	R ²
0,9399	0,8834

	Coefficiente	Error St	t	p
β_0	107,4	4,4	24,202	<0,0001
β_2	-24,7	5,5	-5,498	<0,0001
β_4	3,1	1,0	3,288	0,004

Entonces, la ecuación que describiría el comportamiento del sistema sería: Diam (%Num) = 107,4 – 24,7 P + 3,1 P² + ε

donde P es la presión de entrada del homogeneizador.

En la Fig. 2.12 puede observarse la superficie de respuesta, donde se aprecia que el diámetro tiene una fuerte dependencia con la presión de entrada, debida a la combinación entre el término lineal (P) y el cuadrático (P²).

En cuanto al grado de ajuste del modelo se obtuvieron valores de R y R² aceptables.

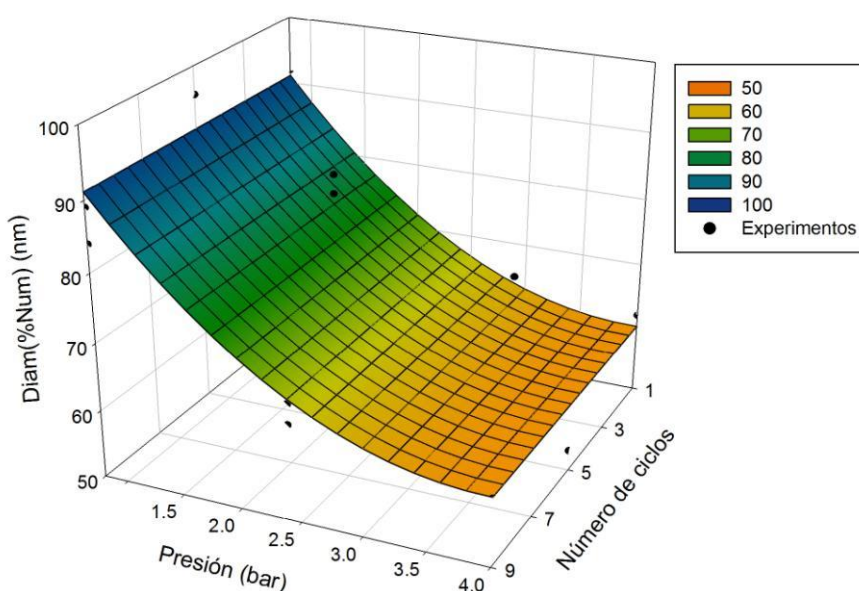


Fig. 2.12 Superficie de respuesta Diám (%Num) vs Presión vs. Número de ciclos

En el caso de IP, no ajustó ningún modelo, tanto para IP (Vol) como IP (Num). Sin embargo, para el IP (Num), el programa estadístico señaló dos resultados como observaciones inusuales. Al descartarse los valores señalados en la Fig. 2.13 A, el IP (Num) fue dependiente de la presión, con un modelo lineal. Esto no ocurrió con el número de ciclos, donde IP (Num) no dependería del número de ciclos (Fig. 2.13 B).

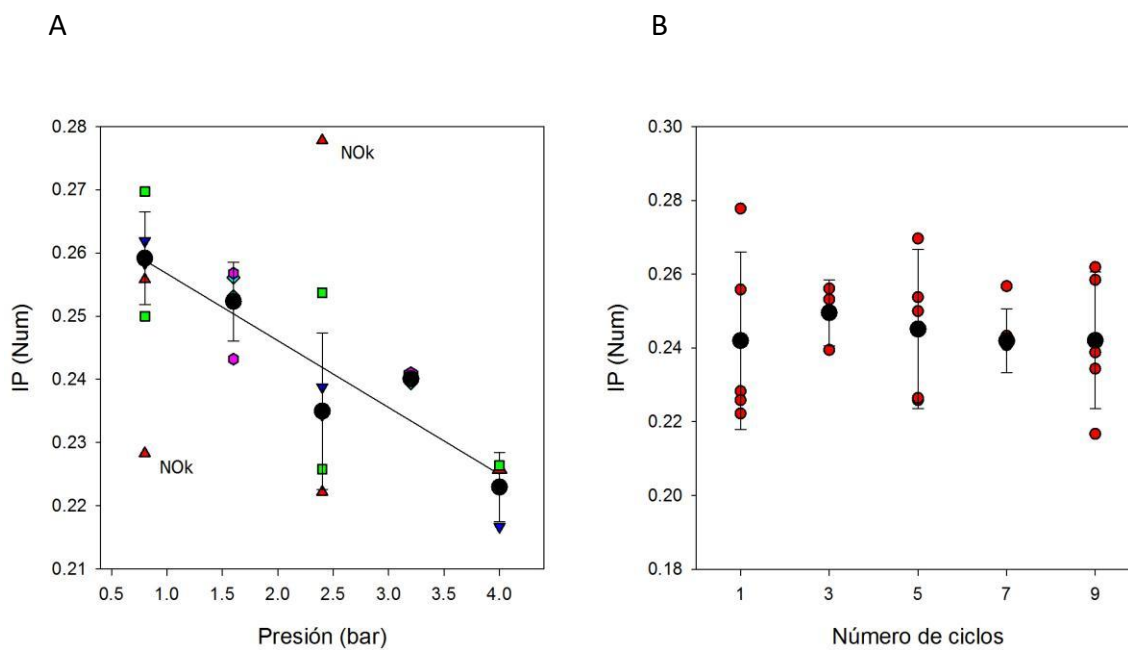


Fig. 2.13 Gráficos de IP (Num) vs (A) Presión y vs (B) número de ciclos

En la Tabla 2.8 se muestran los coeficientes obtenidos ($p < 0,0001$).

Tabla 2.8 Ajuste para IP (Num) vs Presión y número de ciclos.

R	R ²			
0,8253	0,6812			
	Coefficiente	Error St	t	p
β_0	0,267	0,004	60,078	<0,0001
β_2	-0,011	0,002	-6,027	<0,0001

De este modo la ecuación que describiría el sistema sería: $IP (Num) = 0,267 - 0,011 P + \epsilon$

El Diam (%Num) que predijo la ecuación a la máxima presión estudiada (4 bar) fue 58,2 nm y el IP (Num) fue 0,223. Estos valores fueron menores a los obtenidos por extrusión manual (Tabla 2.9). Como no se hallaron modelos de ajuste para Diam (%Vol) ni para IP (Vol), se compararon los valores de Diam (%Vol) e IP (Vol) experimentales que fueron ampliamente mayores a los obtenidos por extrusión manual.

El tamaño de partícula de los ARQ preparados por extrusión manual fue evaluado durante un mes y se observó que tanto el diámetro medio como el IP se mantuvieron durante

por lo menos 4 semanas almacenados en heladera en dos medios estudiados, Ac/NaCl y sac/NaCl (Tabla 2.9).

Tabla.2.9 Tamaño de partícula de ARQ en diferentes medios.

Medio	Tiempo (semanas)	Diam (%Vol) (nm)	IP (Vol)	Diam (%Num) (nm)	IP (Num)
Ac/NaCl	0	174±8	0,400±0,028	106±13	0,364±0,020
	4	177±13	0,407±0,047	97±11	0,397±0,051
Sac/NaCl	0	173±8	0,401±0,029	106±15	0,354±0,047
	4	174±7	0,396±0,022	106±3	0,368±0,025

Los valores representan el diámetro medio±desvío estándar.

2.11 Preparación de arqueosomas conteniendo OVA a escala laboratorio

Una vez preparados los arqueosomas con OVA a escala laboratorio, por el método de hidratación del film con extrusión, se procedió a separar la OVA libre de la incorporada en las vesículas.

2.11.1 Separación de proteína libre

Para separar la OVA libre, no incorporada a los arqueosomas, se utilizaron dos métodos: cromatografía de exclusión molecular (Sephadex) y centrifugación con dispositivos filtrantes comerciales (Microcon®).

La Fig. 2.14 muestra los perfiles de elución en Sephadex G-75 y G-100, obtenidos para la OVA libre, los ARQ, los ARQ-Pg y la OVA incorporada a dichas vesículas.

Respecto a la CEM podemos decir que el Sephadex G-75 no mostró una buena capacidad separativa, tanto para ARQ como para ARQ-Pg (Fig. 2.14 A y C). Por el contrario, puede observarse que en Sephadex G-100 (Fig. 2.14 B y D), tanto para ARQ como para ARQ-Pg, se produjo una buena separación de las vesículas y la proteína libre no incorporada. En consecuencia, el gel más adecuado para la separación fue el Sephadex G-100.

No fue posible realizar la separación de la OVA libre por centrifugación con dispositivos filtrantes Microcon® ya que en las condiciones recomendadas por el fabricante, los filtros se obstruyeron con los ARQ.

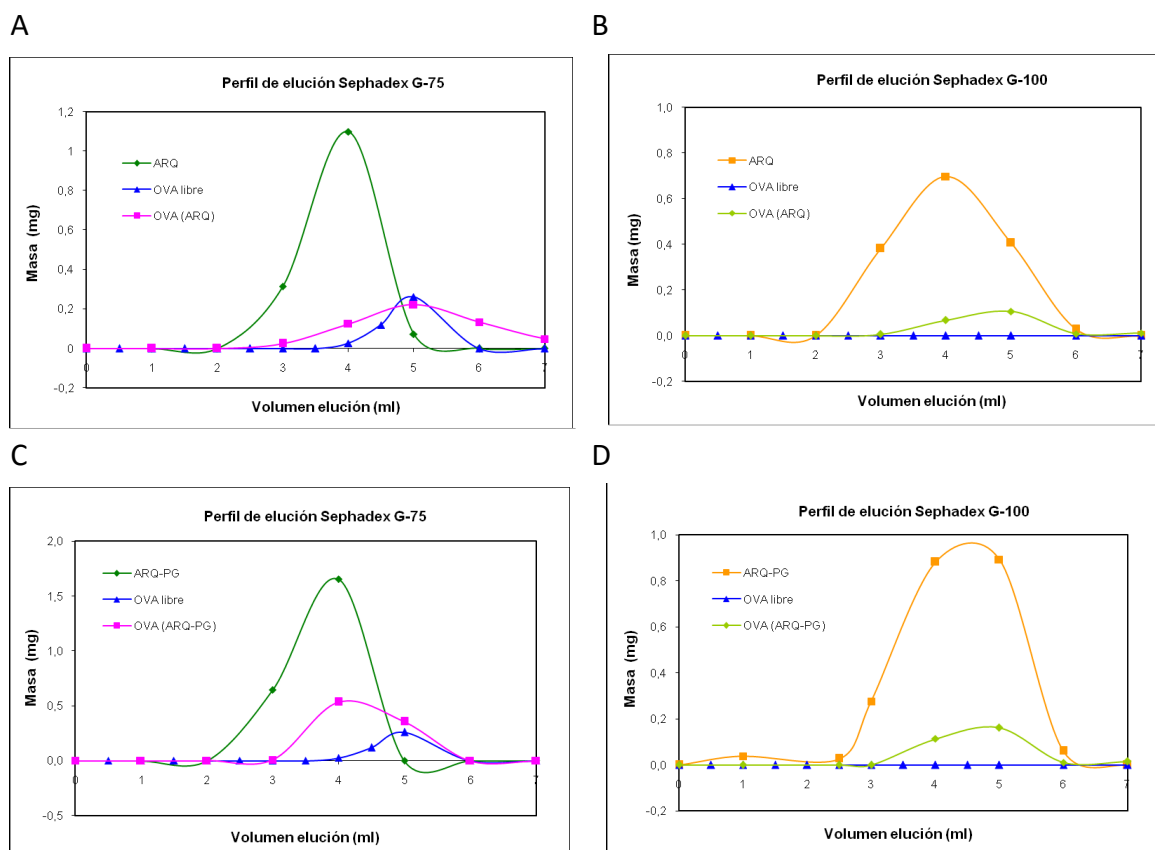


Fig. 2.14 Perfil de elución de vesículas en Sephadex

La CEM de las muestras de ARQ (A y B), ARQ-Pg (C y D), OVA libre y encapsulada en ARQ (A y B) y ARQ-Pg (C y D) se realizó en minicolumnas de Sephadex G-75 (A y C) y G-100 (B y D).

2.11.2 Disolución de arqueosomas para cuantificación de OVA

Para cuantificar la OVA incorporada a los ARQ fue necesario disolverlos con tensioactivos. Previamente, se testeó si los mismos (Tritón X-100 y SDS) interferían en el método de cuantificación de proteínas utilizado.

El proceso de disolución de liposomas con tensioactivos ha sido objeto de un número considerable de investigaciones. El término “disolución” describe la transformación de las bicapas lipídicas en micelas mixtas, mediada por tensioactivos o detergentes. Por este motivo este proceso también se conoce como “micelización”. La técnica más difundida para su estudio es la turbidimetría, que consiste en monitorear la densidad óptica de las suspensiones de liposomas a medida que se transforman en micelas (Hermida, 2006). Es un método simple y rápido, que emplea como único equipamiento un espectrofotómetro.

En el caso del Tritón X-100 se comprobó que interfería en la reacción del ácido bicínico (Micro-BCATM, PierceTM, Rockford, E.U.A.), método utilizado para la determinación de proteínas. Así es como se pudieron utilizar hasta 0,2 mg de este detergente en el tubo de reacción, lo que correspondió a una concentración de 10% p/v. A dicha concentración de Tritón X-100 y un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente no se logró la disolución total de ARQ ya que, como puede observarse en la Fig. 2.15 A, se evidenció turbidez remanente

en el espectro visible.

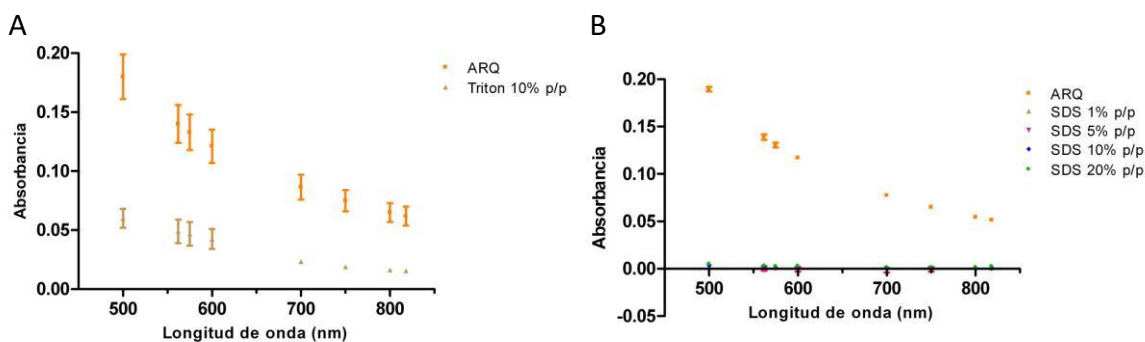


Fig. 2.15 Disolución de ARQ con tensioactivos
Cambios en la absorbancia de ARQ con (A) Tritón X-100 y (B) SDS a diferentes longitudes de onda. Las barras representan el desvío estándar del valor medio.

En la Tabla 2.10 puede apreciarse que la absorbancia de los ARQ disueltos con Triton X-100 fue mayor que el 2% del valor de absorbancia inicial (sin detergente). Dicho valor tampoco disminuyó a las 24 h.

Tabla 2.10 Disolución de ARQ con Tritón X-100.

Longitud de onda (nm)	500	562	575	600	700	750	800	818
ARQ	0,180	0,140	0,133	0,121	0,087	0,075	0,065	0,062
2% Abs. inicial ARQ	0,004	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001
ARQ +Triton X-100 (10% v/v)	0,060	0,049	0,047	0,043	0,024	0,019	0,017	0,016

Los valores representan el valor medio de absorbancia a longitudes de onda entre 500 y 850 nm; n=2. En negrita se resalta el valor límite calculado de 2% de absorbancia inicial (ARQ sin Triton X-100).

Según pudo comprobarse, el SDS, en todas las concentraciones testeadas, no interfirió en la reacción de Micro-BCATM. En la Fig. 2.15 B se muestra la disminución de la turbidez en el espectro visible con el agregado de SDS. De este modo, se seleccionó el SDS 5% con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Dicha concentración fue la mínima necesaria para solubilizar completamente los ARQ a una determinada concentración de lípidos (hasta 20 mg/ml) y temperatura ambiente (Tabla 2.11), según el criterio descripto.

Tabla 2.11 Disolución de ARQ con SDS.

Longitud de onda (nm)	500	562	575	600	700	750	800	818
ARQ	0,190	0,139	0,131	0,117	0,078	0,065	0,055	0,052
2% Abs. inicial ARQ	0,004	0,003	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001
ARQ+SDS 1% (p/v)	0,006	0,004	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,001
ARQ+SDS 5% (p/v)	0,003	0,001	0,000	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	0,000
ARQ+SDS 10% (p/v)	0,004	0,002	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001
ARQ+SDS 20% (p/v)	0,005	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003

Los valores representan el valor medio de absorbancia a longitudes de onda entre 500 y 850 nm; n=2. En negrita se resalta el valor límite calculado de 2% de absorbancia inicial (ARQ sin SDS).

2.12 Caracterización fisicoquímica de arqueosomas conteniendo OVA

La caracterización de ARQ-OVA y ARQ-Pg-OVA se realizó una vez que fueron separados de la OVA no incorporada. Como puede observarse en la Tabla 2.12, las vesículas obtenidas tuvieron un tamaño menor a 200 nm (Z_{Ave}) y su Pdl fue menor a 0,300.

Los ARQ-Pg-OVA mostraron un tamaño mayor al resto de las vesículas, pero esta diferencia no fue significativa. No se observó diferencia significativa entre el potencial Z de ARQ-Pg-OVA y ARQ-Pg. Mientras que el potencial Z de los ARQ-OVA fue mayor que el de las vesículas vacías correspondientes, ARQ ($p < 0,01$).

La relación proteína/lípido fue la misma para ARQ-OVA y ARQ-Pg-OVA.

En función de la temperatura, las bicapas fosfolípicas hidratadas pueden encontrarse en dos estados o fases diferentes: gel, estado altamente ordenado, y cristal líquido, estado de menor organización y mayor fluidez, donde las moléculas de fosfolípidos pueden moverse con mayor libertad. El cristal líquido constituye un estado de agregación de la materia que comparte con los líquidos la fluidez y con los sólidos cristalinos el orden de largo alcance. La temperatura a la cual se produce el paso de un estado a otro es la temperatura de transición de fase (T_m); a valores por debajo de la T_m, la bicapa se encuentra en el estado gel y a valores superiores pasa a cristal líquido. Esta transición puede detectarse mediante técnicas instrumentales como la calorimetría diferencial de barrido. En ciertos casos, como algunos fosfolípidos, la transición de estado gel a estado cristal líquido ocurre en etapas e involucra dos transiciones: la principal (T_m) y la pre-transición (pre-T_m).

En los termogramas de DSC se observaron endotermas de transición de fase en las vesículas ARQ, ARQ-OVA y ARQ-Pg-OVA. Los resultados de las T_m y las pre-T_m de las vesículas fueron en todos los casos menores a -20°C. En el único caso que no se verificó T_m fue en la muestra ARQ-Pg. La incorporación de OVA a los ARQ no mostró una diferencia de comportamiento térmico en T_m y pre-T_m. Al incorporar Pg a los ARQ se perdió la organización de las cadenas hidrocarbonadas que maximizaba su interacción, esto se tradujo en la desaparición de la T_m y además, se observó un cambio de pre-T_m. La T_m volvió a evidenciarse al agregar OVA (ARQ-Pg-OVA). En la Tabla 2.12 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 2.12 Tamaño de partícula, potencial Z, relación proteína/lípido, Pre-T_m y T_m.

	Z Ave (nm)	Pdl	Pot Z (mV)	Rel Prot/LPT (mg/mg)	Pre-T _m (°C)	T _m (°C)
ARQ	136±12	0,213±0,078	-58±4	-	-32	-23
ARQ-OVA	137±25	0,238±0,109	-38±19	0,094±0,013	-34	-22
ARQ-Pg	131±20	0,166±0,100	-66±13	-	-25	ND
ARQ-Pg-OVA	162±44	0,260±0,096	-51±36	0,097±0,013	-33	-22

n=2, excepto pre-T_m ARQ ya que no se detectó pre-T_m en una de las muestras.

ND: no detectable. Pre-T_m: temperatura de pre-transición. T_m: temperatura de transición de fase gel a fase líquido cristalina

Discusión

La membrana plasmática de las halófilas extremas, como la *H. tebenquichense*, posee características únicas que varían levemente dentro del mismo género (Kamekura y Kates, 1999). El core lipídico diéter que es la base de la estructura de la mayoría de los lípidos polares presentes en la familia *Halobacteriaceae* es el 2,3-di-O-fitanil-*sn*- glicerol o arqueol. Una gran variedad de lípidos polares se encuentran en las especies de esta familia e incluyen fosfolípidos, sulfolípidos y glicolípidos (Corcelli y Lobasso, 2006). En todas las halófilas extremas, predominan fosfolípidos específicos, a saber,

50-80% p/p de arquetidilglicerometilfosfato (PGP-Me), el análogo arqueal del metil éster de fosfatidilglicerolfosfato (Kates et al., 1993). Algunas cepas poseen cantidades menores de arquetidil-fosfatidilglicerol (PG), fosfoglicolípidos sulfatados y cardiolipinas arqueales. Ningún fosfolípido posee etanolamina, inositol ni serina en sus cabezas polares. Esto último es característico de las halófilas extremas, en contraste con las *Archaea* metanogénicas y termofílicas (Kates, 1993b; Kates, 1996; Sprott et al., 2004a; Tenchov et al., 2006). Con respecto al género *Halorubrum*, es un grupo heterogéneo que contiene especies no-alcalifílicas, alcalifílicas facultativas y alcalifílicas obligadas con pequeñas diferencias en su composición de lípidos polares. Los miembros no alcalifílicos contienen diglicosil difitanilglicerol diéter sulfatado (S-DGD), PG sulfatado (PGS) en lugar de PG y PGP-Me, las alcalifílicas facultativas poseen S-DGD además de PG y PGP-Me y las obligadas sólo contienen PG y PGP-Me (Fan et al., 2004). Con algunas excepciones, todas contienen la cardiolipina arqueal bifosfatidilglicerol (BPG) y la glicocardiolipina (S-DGD-5PA) (Fan et al., 2004; Lizama et al., 2002).

El análisis de espectros de ESI-MS de los LPT de los aislamientos de *H. tebenquichense* estrato BN, por comparación con los datos de referencia (Corcelli y Lobasso, 2006; Noguchi et al., 2004; Sprott et al., 2003a) sugirieron que los principales fosfolípidos de los extractos fueron: fosfatidilglicerol (PG) y metil éster de fosfatidilglicerolfosfato (PGP-Me). Además, se constató la presencia del glicolípidosulfodiglicosil difitanilglicerol diéter (S-DGD-5), representativo del género *Halorubrum*, junto con la ausencia de aminolípidos, corroborada en esta cepa (Corcelli et al., 2004). También se encontraron dos cardiolipinas arqueales, el S-DGD-5-PA y el BPG.

El PGP-Me contribuye a mantener la estabilidad de la membrana en medios hipersalinos y es muy abundante en halófilas extremas (Kates, 1993b). No existen lípidos similares al PGP-Me en arqueobacterias no halófilas o moderadamente halófilas, de menor tolerancia a la sal. El gran volumen de la cabeza polar del PGP-Me es responsable de la estabilización de la membrana, causando repulsión estérica entre bicapas adyacentes y evitando la agregación. Los ARQ preparados con LPT de arqueobacterias hiperhalófilas, con un alto contenido en PGP-Me, forman fases desordenadas, compuestas de bicapas no correlacionadas y separadas (Tenchov et al., 2006).

Los glicolípidos se convirtieron en marcadores útiles para la clasificación de las arqueobacterias halófilas. Cada género tendría glicolípidos característicos cuya estructura derivaría del manosil-glucosil-difitanilglicerol (DGD), con sustitución de los grupos sulfato o azúcar en la posición 3 o 6 del residuo de manosa. En la cepa estudiada en este trabajo se identificaron el S-DGD-5 y S-DGD-5-PA (Corcelli y Lobasso, 2006). La identidad estructural entre el S-DGD-5 y una porción del S-DGD-5-PA sugeriría un precursor común durante la biosíntesis del S-DGD-5-PA en *H. tebenquichense*. Estos sulfoglicolípidos podrían exhibir propiedades de otros sulfoglicolípidos que inducen fagocitosis por unión a receptores de manosa y allí radicaría su potencial adyuvante (Sprott et al., 2003b).

Otra interesante clase de fosfolípidos, también presentes en esta cepa, son los fosfolípidos diméricos que poseen cuatro cadenas en su cola hidrofóbica, similar a las cardiolipinas de *Bacteria* y *Eukarya*. Las cardiolipinas arqueales, como el BPG y el S-DGD-5PA, afectarían el espesor de la bicapa y la fluidez de los ARQ (Corcelli y Lobasso, 2006). Los reportes del hallazgo de estos lípidos en arqueobacterias son escasos y no necesariamente estarían asociados a la presencia de pigmentos (Corcelli et al., 2000; Sprott et al., 2003a).

Con esta compleja mezcla de lípidos se procedió a preparar ARQ mediante HPH para conseguir vesículas de tamaño nanométrico. Para minimizar el número de experimentos, lo que conlleva un ahorro de materias primas y tiempo, se aplicó un diseño experimental "cuadrado+estrella". En general, cuando se disminuye el tamaño de partícula de liposomas convencionales por HPH, la variación del Diam (%Num) es menos significativa que para Diam (%Vol) (Barnadas-Rodríguez y Sabes, 2001; Hermida et al., 2009). Sorprendentemente, en el caso de los ARQ obtenidos por HPH, la variación que se produjo en Diam (%Vol) no fue significativa. La cantidad de ARQ de gran tamaño que fueron afectados por la HPH en los rangos estudiados de presión y número de ciclos sería pequeña. De este modo, no se detectaron variaciones significativas del Diam (%Vol). Mientras que los cambios significativos observados en el Diam (%Num) pueden explicarse por la ruptura de esos pocos ARQ de gran tamaño que causarían la producción de grandes cantidades de ARQ pequeños. En otras palabras, pequeños cambios en el número de partículas grandes provocaron grandes cambios en el Diam (%Num) porque se produce un gran número de partículas pequeñas.

A partir de los polinomios resultantes para Diam (%Num) e IP (Num) se constató que la variación del tamaño de los ARQ depende únicamente del valor de la presión de homogeneización. En definitiva, el procesamiento de la muestra con sólo un ciclo permitió alcanzar el diámetro e IP mínimos en todo el rango de presiones. Esto se comprueba de forma evidente en la superficie de respuesta de Diam (%Num) y gráficos de IP (Num).

Los resultados también demuestran que los ARQ ofrecieron una gran resistencia a la disminución del tamaño por HPH. Esto podría deberse a la hidrofobicidad de los arqueolípidos y la presencia de cardiolipinas arqueales que conferirían una mayor rigidez a la membrana. Claramente, esta metodología no permitió la obtención de ARQ tan pequeños y

homogéneos como los obtenidos por extrusión a escala laboratorio. A pesar de encontrar modelos que explicaron el comportamiento del sistema para Diam (%Num) e IP (%Num), no continuamos la investigación hasta hallar las condiciones óptimas porque los valores de Diam (%Vol) e IP (%Vol) obtenidos por HPH mostraron que la población de ARQ obtenida fue muy polidispersa y poco homogénea. Para optimizar el proceso y lograr una población con menor diámetro medio y menor polidispersión deberían estudiarse otras variables de proceso, como pH, fuerza iónica o formulaciones con fosfolípidos convencionales (Barnadas Rodriguez y Sabes Xamani, 2003). Otros parámetros a tener en cuenta serían el volumen incorporado y la incorporación de activos, en este caso, proteínas. De todas maneras, podemos afirmar que a través de la metodología del diseño multivariado de experimentos y el análisis de superficies de respuesta sería posible establecer las mejores condiciones de obtención de una formulación con un número limitado de experimentos. Esto supone ventajas económicas como el ahorro de tiempo para el desarrollo de estos sistemas.

Al igual que otras especies de arqueobacterias (Corcelli y Lobasso, 2006; Koga, 2011; Sprott, 1992), en particular las halófilas extremas, los LPT de *H. tebenquichense*, están cargados negativamente debido al predominio de arqueolípidos con cabezas polares de carga negativa. Tal es el caso de la cepa aislada en este trabajo. Esto se tradujo en la obtención de ARQ cuyo potencial Z fue francamente negativo, lo que otorgó una prolongada estabilidad en suspensión. En particular, se demostró que el tamaño de los ARQ preparados se mantuvo durante 4 semanas en medios acuosos como Ac/NaCl y sac/NaCl. Hay varios reportes que mostraron gran estabilidad y retención de los activos encapsulados en ARQ elaborados con arqueolípidos aislados de otras especies. Por ejemplo, más del 92 % de la sacarosa marcada con ^{14}C se retuvo en ARQ almacenados a 4°C durante dos semanas (Kitano et al., 2003). Más aún, se han reportado ARQ que no perdían OVA encapsulada y no presentaban agregación ni fusión por lo menos durante un año de almacenamiento en heladera (Patel et al., 2007).

Dado que aún no se cuenta con un alto rendimiento en la producción de arqueolípidos, la preparación de los ARQ conteniendo OVA se realizó a escala laboratorio. La OVA se utilizó como proteína modelo para poner a punto, métodos separativos y de caracterización estructural de los ARQ.

Existen varios métodos para separar principios activos no asociados a los arqueosomas. La ultracentrifugación ha sido ampliamente utilizada para tal fin (Conlan et al., 2001; Krishnan et al., 2001; Patel et al., 2007; Sprott et al., 1999). No obstante, es un método poco escalable y engorroso. Por este motivo, en el presente trabajo se evaluó la CEM como método separativo dado su uso con liposomas convencionales y se logró la separación de la OVA asociada a ARQ de la no encapsulada, con columnas de Sephadex G-100. Sin embargo, deben tenerse en cuenta algunas limitaciones del mismo, como la falta de resolución en el caso de utilizar compuestos de alto peso molecular como sustancias a incorporar. Y además, considerar que para fines preparativos como la separación del material

no encapsulado de las vesículas cargadas, se debe minimizar la pérdida de lípidos por la posible retención de los mismos en la columna. Este es un tema que debe ser resuelto en futuros abordajes experimentales (Ruyschaert et al., 2005).

Por otro lado, la centrifugación de dispositivos filtrantes es un método que ha demostrado un buen desempeño para separar el activo libre del encapsulado en otros sistemas como las nanocápsulas (Bernardi et al., 2013; Oliveira et al., 2013). Sin embargo, no fue posible el uso de la misma ya que los filtros se obturaban con las muestras de ARQ en las condiciones recomendadas por el fabricante. Dicha técnica es sencilla y rápida y especialmente presenta la gran ventaja de ser fácilmente escalable, debido a que estas membranas son utilizadas en otros dispositivos comerciales para la filtración de mayores volúmenes. Por este motivo, sería interesante profundizar el estudio de las condiciones de separación utilizando estos dispositivos.

La relación proteína/lípido de OVA incorporada a ARQ preparados con LPT de diferentes especies de arqueobacterias, como *Methanobrevibacter smithii*, *Haloferax volcanii*, *Halobacterium salinarum*, estuvo en el rango de 0,015-0,070 (mg/mg) (Gurnani et al., 2004; Krishnan et al., 2000b; Krishnan et al., 2001; Patel et al., 2007; Sprott et al., 2004a). La incorporación de OVA a ARQ preparados con LPT de *H. tebenquichense* se evaluó en presencia y ausencia de Pg. El Pg se ha utilizado para incrementar la incorporación de sustancias hidrofílicas y de alto peso molecular a vesículas lipídicas y para aumentar su elasticidad (Manconi et al., 2009; Pavelic et al., 2005). En las condiciones estudiadas, la utilización de Pg en la formulación no aumentó la incorporación de proteína a las vesículas, como puede observarse en la relación proteína/lípido obtenida ($\approx 0,100$ mg/mg) que resultó mayor a las reportadas para ARQ preparados con LPT de otras especies de arqueobacterias. La diferencia entre el potencial Z de las vesículas con OVA y las vacías en presencia de Pg, probablemente se debió a que el Pg solubilizaría la proteína (Manconi et al., 2009). El Z_{ave} de los ARQ- Pg-OVA fue mayor que los ARQ-Pg. Esta diferencia no se observó entre los ARQ-OVA y los ARQ. Esto podría deberse a que el Pg, en presencia de la proteína, podría producir la desestabilización de las lamelas con la cosecuente agregación y fusión de las vesículas y aumento de la multilamellaridad (Manconi et al., 2009; Pavelic et al., 2001).

La T_m de los ARQ fue menor a -20°C como se reporta en bibliografía (Kitano et al., 2003). Es así como las cadenas ramificadas de isoprenoides asegurarían que los arqueolípidos de membrana de las arqueobacterias se encuentren en fase líquido cristalina en un amplio rango de temperatura (Corcelli y Lobasso, 2006). Esto sugeriría que aunque la movilidad molecular de las cadenas de fitanilo de las lamelas de estas vesículas estaría restringida por los metilos laterales, el empaquetamiento es menos ordenado en comparación con ácidos grasos de cadena larga análogos de los fosfolípidos convencionales. De hecho, el valor de T_m para el fosfolípido simétrico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, del inglés *dipalmitoylphosphatidylcholine*) con dos cadenas de ácidos grasos saturados de 16 carbonos es de 41,3°C (Biltonen y Lichtenberg, 1993). La incorporación de Pg a los arqueolípidos

evidenció la imposibilidad de formación de fase gel con la desaparición de la T_m . Esto podría deberse al mayor desorden que provocaría la presencia de Pg en la bicapa de los ARQ. Cuando se incorpora OVA a los ARQ-Pg, se vuelve a evidenciar la formación de fase gel. Probablemente, el Pg se asociaría a la proteína a través de enlaces de segundo orden como puente hidrógeno, pero esto no mejoró la incorporación de la misma a la vesícula.

Por último, los ensayos de solubilización con tensioactivos se realizaron con el objeto de obtener soluciones transparentes y liberar el principio activo encapsulado, en este caso, la proteína OVA. De esta manera, se buscó que el tensioactivo no interfiera en las determinaciones cuantitativas de la sustancia incorporada. Además de alcanzar el objetivo con la menor concentración de tensioactivo y con un tiempo de incubación razonable. A través de un ensayo sencillo donde se miden los cambios en la absorbancia con el agregado del tensioactivo a una suspensión de ARQ se logró seleccionar la concentración y el tensioactivo adecuados que garantizaran la disolución de las vesículas. Cuando la concentración de tensioactivo es suficiente, la absorbancia disminuye por la formación de estructuras más pequeñas que los ARQ, como las micelas mixtas. En este caso, el tensioactivo elegido fue SDS a una concentración de 5% p/v. El Tritón X-100 no mostró un adecuado desempeño para el objetivo planteado contrariamente a lo observado con liposomas convencionales. La menor susceptibilidad a la solubilización podría predecir la resistencia a la acción de tensioactivos naturales, como las sales biliares (Hermida, 2006). Este sería un importante punto a considerar a la hora de postular a los arqueosomas como adyuvantes orales.

Capítulo 3

Captura y tráfico intracelular de ARQUEOSOMAS

Sobre todo creo que no todo está perdido Tanta lágrima, tanta lágrima y yo, soy un vaso vacío Oigo una voz que me llama casi un suspiro Rema, rema, rema... Rema, rema, rema... En esta orilla del mundo lo que no es presa, es baldío Creo que he visto una luz al otro lado del río

(Al otro lado del río, Jorge Drexler)

En el Capítulo 3 se presentan técnicas para el análisis de la captura y tráfico intracelular de ARQ, en células J774A.1, como modelo de macrófago y en células Caco-2, como modelo de enterocito. Para lo cual se utilizaron inhibidores de las diferentes rutas endocíticas y se cuantificó la internalización de los ARQ fluorescentes a través de la citometría de flujo. Estos estudios fueron complementados por microscopía confocal láser de barrido (MCLB) para determinar la co-localización con Lysotracker®, marcador de organelas ácidas. Los LPT utilizados para la preparación de estos ARQ no poseen arquetidilserina en su composición pero fueron ávidamente capturados por las células J774A.1. De un modo alternativo se podría postular la manosa terminal de los arqueolípidos SDGD-5 y SDGD-5-PA que interactuaría con receptores específicos presentes en APC para favorecer su captura. Los resultados obtenidos mostraron la reducción de la internalización de ARQ en presencia de CZ, Genis, M β CD y Cit D. Esto probaría que, en células J774A.1, los mecanismos de endocitosis de ARQ serían la CME, CvME y la fagocitosis. Es decir que los ARQ emplearían múltiples vías para ingresar a estas células. Los ARQ colocalizaron con Lysotracker®, lo cual revela que serían procesados por una vía degradativa. Además, el tratamiento con Noc tuvo un gran impacto sobre la captura de los ARQ por esta línea celular lo que indicaría la participación de los microtúbulos. La internalización también se redujo significativamente en presencia de CQ lo que demuestra que el incremento del pH en lisosomas y endosomas afectaría el tráfico intracelular de los ARQ en células J774A.1. Por otro lado, en células Caco-2, se observó una disminución significativa en la captura de ARQ con Genis y Amil. En consecuencia, los ARQ ingresarían a través de CvME y macropinocitosis, no pudiendo descartar la CME ya que CZ tampoco inhibió la captura de TFR, marcador específico de esta vía. Este trabajo es el primero que muestra estudios *in vitro* sistemáticos sobre las vías de internalización y tráfico intracelular de ARQ en líneas celulares no fagocíticas.

Introducción

La célula está rodeada por la membrana plasmática que se comporta como una verdadera “pared”. Ninguna sustancia atraviesa la membrana por difusión, excepto los gases y pequeñas moléculas como el agua. Si existe alguna sustancia o material particulado que tenga que entrar o salir de la célula lo hará por un mecanismo específico.

La investigación y el desarrollo de nuevos nanomateriales para mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades es un área en constante expansión. Micelas poliméricas, quantum dots, liposomas, conjugados droga-polímero, dendrímeros, nanopartículas biodegradables, nanopartículas de sílice, entre otros, son algunos ejemplos de materiales nanoparticulados que son objeto de investigaciones y estudios preclínicos y clínicos. Estos nanomateriales diagnósticos y terapéuticos, englobados bajo el término de “nanomedicinas”, frecuentemente requieren sitios específicos para ingresar a la célula y liberar su contenido en compartimientos intracelulares.

Los mecanismos celulares que utilizan las sustancias para ingresar a las células son la difusión pasiva, el transporte activo y la endocitosis. Estos mecanismos se resumen en la Tabla 3.1 (Bareford y Swaan, 2007).

Tabla 3.1 Mecanismos celulares de internalización.

	Características	Ejemplos
Difusión pasiva	Mecanismo pasivo Fuerza impulsora: diferencia de concentración	Oxígeno, dióxido de carbono, agua, pequeñas moléculas (menores a 1KDa)
Transporte activo	Mecanismo activo Transporte de sustancias en contra de la concentración	Bomba Na/K
Endocitosis	Mecanismo activo	Macromoléculas, virus, material particulado (p.ej. nanomedicinas)

Las nanomedicinas y en general cualquier material particulado, atraviesan la membrana a través de un proceso llamado endocitosis que involucra las siguientes etapas:

1. El material es englobado en las invaginaciones que presenta la membrana, que se estrangulan y forman las vesículas llamadas endosomas. Hay una gran población de endosomas de diferente composición que se origina en sectores precisos de la membrana.
2. Estas vesículas especializadas transportan el cargo (material que la célula internaliza por endocitosis) a varias estructuras vesiculares especializadas.

3. Finalmente, el cargo es dirigido a diferentes compartimientos intracelulares, se recicla hacia el medio extracelular o se entrega a otras células, proceso conocido como “transcitosis” en células polarizadas.

El tráfico intracelular y la localización sub-celular de las nanomedicinas depende de la vía endocítica involucrada. El entendimiento de los mecanismos endocíticos es entonces crucial para el desarrollo de nanomateriales para terapias clínicas (Martins et al., 2012a). La mayoría de los sistemas particulados serían capturados por múltiples rutas (Sahay et al., 2010). Además, el mecanismo endocítico por el que un material particulado accede al interior celular depende del tipo celular en cuestión (Lai et al., 2007; Thurn et al., 2011).

La célula posee una organización interna establecida por una serie de filamentos proteicos que forman un entramado dinámico que se extiende a través del citoplasma, denominado citoesqueleto. Hay tres grandes tipos de filamentos: los filamentos de actina o microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Los dos primeros intervienen activamente en los procesos endocíticos y el tráfico intracelular. Tanto los microtúbulos como los filamentos de actina, contribuyen notablemente con la movilidad de vesículas y organelas. Los microtúbulos sirven de pista por donde se deslizan las proteínas motoras dineína y kinesina. Los microtúbulos están polarizados con su extremo terminal (-) localizado frecuentemente en el centrosoma, cerca del núcleo y el extremo (+) presente en la periferia celular. Así, la dineína, proteína motora que dirige el extremo (-), está implicada en la movilidad hacia el interior de la célula, mientras que la familia de proteínas motoras del extremo (+), kinesinas, frecuentemente media el movimiento hacia la superficie celular. La actina contribuye al movimiento de diferentes maneras. Primero, se asocia con la miosina para producirlo. Segundo, la polimerización de actina *per sé* puede propulsar vesículas. Un tema emergente es que el cargo, directa o mediante interacciones con proteínas del endosoma es capaz de influir en la dinámica del citoesqueleto y la función de las proteínas motoras. Así, la composición del cargo ayudaría directamente a su movilidad y *targeting* intracelular (Hehnlly y Stamnes, 2007).

En general, la endocitosis se divide en dos grandes categorías: fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis es el proceso involucrado en la captura de grandes partículas (hasta 20 μm) y la pinocitosis permite la internalización de fluidos, solutos y pequeñas partículas.

La fagocitosis es llevada a cabo por células especializadas o profesionales, como macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas. Por el contrario, la pinocitosis está presente en todos los tipos celulares y varía según el origen y función celular.

Existen diversas clasificaciones de la pinocitosis. La más reciente está basada en las proteínas involucradas en las diferentes vías endocíticas. En este abordaje, la pinocitosis se clasifica en endocitosis mediada por clatrina (CME, del inglés *clathrin-mediated endocytosis*) y endocitosis independiente de clatrina (CIE, del inglés *clathrin-independent endocytosis*). A su vez se clasifica en: endocitosis mediada por caveolina (CvME, del inglés *caveolae-*

mediated endocytosis), endocitosis independiente de clatrina y caveolina (CCvIE, del inglés *clathrin- and caveolae-independent endocytosis*) y macropinocitosis. La CCvIE es subclasificada como dependiente de Arf6, de flotilina, de Rho A o de Cdc42 (Sahay et al., 2010).

Hay otra clasificación de la pinocitosis que la divide en endocitosis mediada por receptores (RME, del inglés *receptor mediated endocytosis*) y endocitosis en fase fluida (FPE, del inglés *fluid phase endocytosis*). En esta última existe una unión inespecífica por carga o interacciones hidrofóbicas. La gran diferencia es la velocidad de captura. La FPE es más lenta ya que la RME tiene a favor la elevada constante de afinidad, dada por los receptores. Esta clasificación es menos precisa y lleva a confusión, especialmente con la CME (Bareford y Swaan, 2007).

Por este motivo, es altamente recomendable utilizar la clasificación basada en las proteínas involucradas en la vía endocítica. Dicha clasificación se está investigando activamente y emergió recientemente en el campo de estudio de la endocitosis.

En la Fig. 3.1 se resume de un modo claro y esquemático los mecanismos endocíticos mencionados. En general, todos los mecanismos convergen al lisosoma, pero algunos ofrecen la posibilidad de escapar del sistema endolisosomal.

Como se mencionó anteriormente, la fagocitosis captura grandes partículas, sirve para eliminar partículas exógenas y la llevan a cabo células especializadas. Entre ellas podemos nombrar los macrófagos tisulares, ubicados en diferentes tejidos, como el hígado (células de Kupffer), la piel, el pulmón, el bazo y los nódulos linfáticos. Estas células, a su vez, pueden ser blanco en el tratamiento de enfermedades que involucran inflamación e infección.

Para que se produzca la fagocitosis es necesaria la opsonización del material particulado en el torrente sanguíneo. Este proceso consiste en la adsorción de proteínas como las inmunoglobulinas (IgG, IgM), los factores del complemento (C3, C4 y C5) y otras proteínas séricas (laminina, fibronectina) que se depositan sobre las micro/nanopartículas. De esta manera, son etiquetadas y los macrófagos las reconocen como material exógeno. Así, se produce la adhesión de las partículas opsonizadas a la membrana del macrófago, a través de receptores específicos, como el receptor del Fc de las inmunoglobulinas o los receptores del complemento. Otros receptores son el de manosa/fructosa o el *scavenger* (Sahay et al., 2010).

La interacción partícula/receptor lleva a una cascada de señales mediada por GTPasas de la familia Rho que provoca el rearrreglo de actina. Así se forman extensiones en la superficie celular (pseudópodos) que se cierran en forma de cremallera alrededor de la partícula y la internalizan. Esto resulta en la formación del fagosoma. Luego, se produce la maduración por una serie de fusiones y fisiones lo cual lleva a la transferencia del material fagocitado a los endosomas tardíos y por último a los lisosomas para formar el fagolisosoma (Hillaireau y Couvreur, 2009)

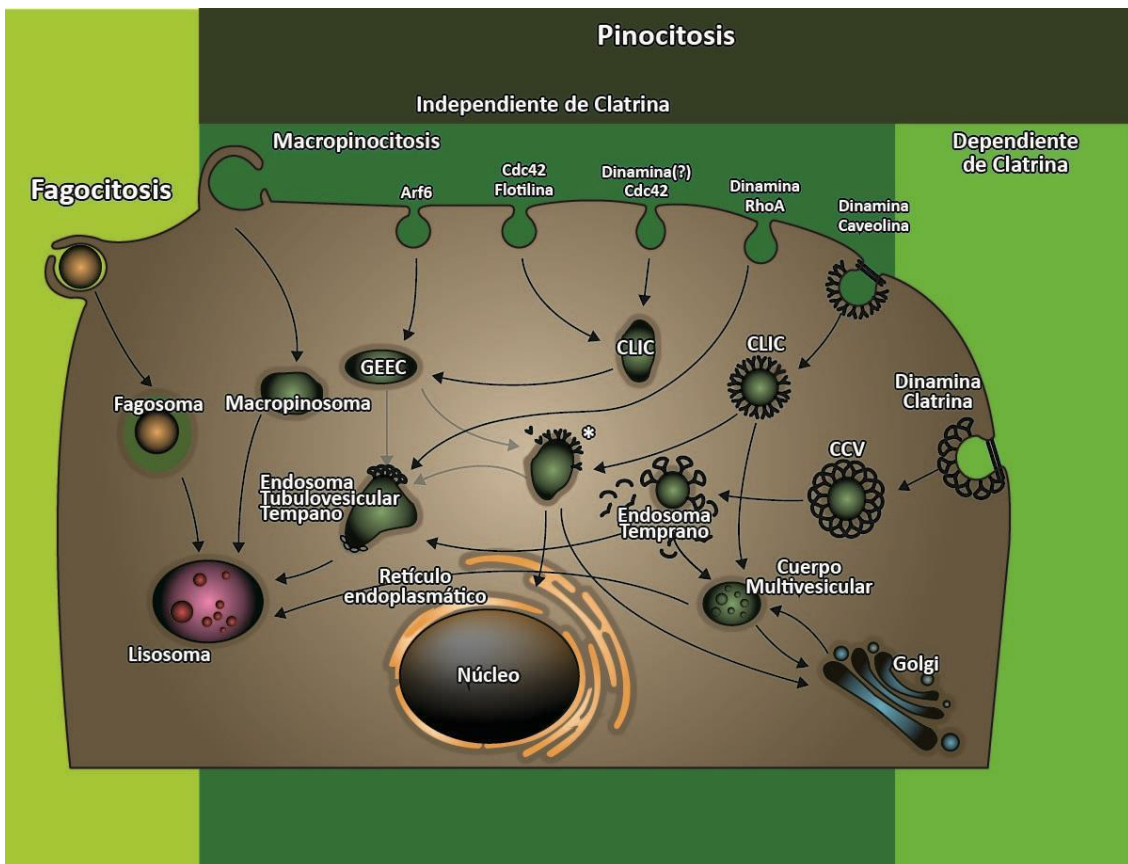


Fig. 3.1 Diferentes vías de endocitosis Adaptado de (Sahay et al., 2010).

Representación simplificada de los complejos mecanismos de endocitosis y tráfico intracelular.

Abreviaturas: Vesículas recubiertas de clatrina (CCV, del inglés *clathrin coated vesicles*), transportador independiente de clatrina (CLIC, del inglés *clathrin-independent carriers*); compartimento enriquecido con proteína unida a GPI (GEEC, del inglés *GPI-anchored protein-enriched compartment*); glicofosfatidilinositol (GPI, del inglés *glycophosphatidylinositol*).

(*) Vesícula sin identificación. La existencia de una única organela se ha cuestionado (Hayer et al., 2010).

El tiempo en que se producen estos eventos depende de propiedades de superficie de la partícula, pero típicamente es de treinta minutos a varias horas.

El fagolisosoma se acidifica gracias a la acción de la bomba ATPasa vacuolar de protones localizada en la membrana. También adquiere algunas enzimas hidrolíticas, incluyendo esterazas y catepsinas. Esto crea un ambiente hostil que lleva a la degradación del cargo. Por este motivo este mecanismo se clasifica como degradativo.

En la Tabla 3.2 se muestran algunos ejemplos de nanomedicinas que entran a la célula por fagocitosis.

La CME es la “ruta clásica” de entrada a la célula y una de las más caracterizadas.

Este mecanismo está presente en todas las células de mamíferos. Sus funciones son:

- La captura de nutrientes, como el colesterol, vía el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) o el hierro, vía el receptor de la transferrina (TFR).
- La regulación en baja de la señalización por la internalización y degradación de los receptores.
- El mantenimiento de la homeostasis celular.

La membrana celular posee 1-2 % de su superficie enriquecida en clatrina, una proteína cuyo monómero está formado por tres cadenas pesadas y tres cadenas livianas dispuestas en una estructura llamada *triskelion*. Ésta se ensambla en un entramado poliédrico en la superficie citosólica de la membrana celular, lo que ayuda a deformar la misma en un hoyo recubierto de ≈ 150 nm. Como la red de clatrina continúa formándose con la participación de otras proteínas, como AP180 y AP2, los hoyos se vuelven profundamente invaginados hasta que ocurre la fisión de la vesícula, dando lugar a vesículas recubiertas de clatrina (CCV, del inglés *clathrin coated vesicles*) (Conner y Schmid, 2003). Este paso requiere de la participación de la GTPasa dinamina. La vesícula resultante tiene un diámetro de 100-120 nm y su formación es rápida, entre uno y dos minutos.

Tabla 3.2 Vías de internalización de nanomedicinas (Hillaireau y Couvreur, 2009; Sahay et al., 2010).

Nanocarrier	Tipo celular	Principal vía de internalización	Principio activo	Tratamiento	Fase clínica	Producto
Liposomas SUV	Mac, Langerhans	Fagocitosis	Anfotericina B	Leishmaniasis Infecciones fúngicas	mercado	Ambisome®
<i>Ribbon-like lipidic structure</i>	Mac	Fagocitosis	Anfotericina B	Leishmaniasis Infecciones fúngicas	mercado	Abelcet®
Discos lipídicos	Mac	Fagocitosis	Anfotericina B	Leishmaniasis Infecciones fúngicas	mercado	Amphotec®
Nanopartículas de PACA	células cancerosas MDR	Fagocitosis	Doxorubicina	Hepatocarcinoma	II/III	Transdrug®
Nanopartículas de PACA	Mo/Mac humanos	Fagocitosis	AZT y forma trifosfato	HIV	modelo animal	-
PLGA-PEG-TFR	Células cancerosas MCF-7	CME (mediada por receptor TFR)	Paclitaxel	Tumor sólido	modelo animal	-
Nanopartículas de quitosano	Caco-2, MTX-E12, A-549	CME	Proteínas	Transmucosa	modelo animal	-
Liposomas PEGilados	células epiteliales cancerosas	CvME	Doxorrubicina	cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple	mercado	Doxil®
Nanopartículas de albúmina	Células endoteliales	CvME	Paclitaxel	Cáncer	mercado	Abraxane®

PACA poli(alquilcianoacrilato); PLGA poliláctico-co-glicólico; TFR transferrina; PEG polietilenglicol; MDR resistente a múltiples drogas (del inglés, *multi-drug resistant*); Mac macrófago; Mo monocito

Existen proteínas como la anfisina, Eps 15 e intersectina que funcionan como andamios para conectar la maquinaria endocítica con el citoesqueleto de actina. La actina define una regulación espacial y el movimiento de las vesículas hacia el interior de la célula. Luego, la vesícula se deshace de la clatrina que se recicla hacia la membrana. La vesícula resultante se fusiona con el endosoma temprano (o de clasificación). Esta etapa transcurre en 5 a 10 minutos. El pH disminuye a un valor de 5,5-6,0 a través de la bomba de protones ATP dependiente. Algunos receptores y ligandos se disocian en esta etapa y se reciclan para cumplir con otra ronda de endocitosis (Hillaireau y Couvreur, 2009; Sahay et al., 2010).

Finalmente, los endosomas maduran a endosomas tardíos con un pH final de 5,0, los cuales luego de fusionarse con los pre-lisosomas que contienen hidrolasas generan un

ambiente hostil propicio para la degradación del cargo internalizado (Bareford y Swaan, 2007). Así también, este mecanismo es clasificado como degradativo.

En la Tabla 3.2 se muestran algunos ejemplos de nanomedicinas que utilizan este mecanismo de internalización.

Las caveolas son abundantes en células musculares, endoteliales, fibroblastos y adipocitos. Y están ausentes en neuronas y leucocitos. Están formadas por balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*) ricas en colesterol y esfingolípidos. La característica fundamental es la presencia de una proteína integral de membrana en forma de horquilla cuyos dominios terminales C y N son citoplasmáticos, la caveolina-1 (caveolina-3, en células musculares). La caveolina es esencial para la formación y la estabilización de las caveolas, que son particularmente abundantes en células endoteliales, donde constituyen un 10-20% de la superficie de la membrana. Debido a esta proteína, las caveolas adoptan su forma distintiva de botella. Además de estar involucrada en la captura de ácido fólico, albúmina y colesterol, la caveolina es una proteína inespecífica que secuestra múltiples ligandos responsables de la señalización celular como receptores de factores de crecimiento y familia de los SRC tirosinasa (Sahay et al., 2010).

Las caveolas son invaginaciones que tienen generalmente un diámetro entre 50 y 80 nm. Constituyen el portal de entrada de varios virus, entre ellos el SV40, que permitió estudiar esta vía. También, se estudió esta vía a través de la internalización de glicosilfosfatidilinositol-GFP (GPI-GFP) y el glicosfingolípidido lactosil ceramida (LacCer), la subunidad B de la toxina colérica (CT), la albúmina y el ácido fólico. Sin embargo, el tema es algo más complicado debido a que los tres últimos ligandos se internalizan también por CME y entonces, se pueden encontrar en endosomas (Pelkmans y Helenius, 2002).

A diferencia de la CME, la endocitosis mediada por caveola está altamente regulada e involucra una compleja señalización, como la fosforilación de residuos de tirosina, que puede ser inducida por la misma partícula (Bareford y Swaan, 2007). Luego de unirse el cargo a la superficie celular, la partícula se mueve a través de la membrana plasmática hasta encontrarse con las caveolas con quienes interaccionan. Intervienen también proteínas como la filamina y actina. Luego, la invaginación formada se escinde por la GTPasa dinamina formando una vesícula de un tamaño entre 50 y 100 nm que carece de enzimas. La actina juega un rol fundamental en la formación y el tráfico de la vesícula, lo que contrasta con la internalización mediada por clatrina que no es estrictamente dependiente del citoesqueleto de actina (Pelkmans y Helenius, 2002). Desde las vesículas formadas, las partículas pueden dirigirse así hacia el retículo endoplásmico (RE) o al Golgi o transitar, en células polarizadas.

Es un transporte más lento que la CME pero, al evadir el sistema lisosomal, no degrada el cargo, lo cual lo transforma en una atractiva vía para tener en cuenta a la hora de diseñar nanomedicinas.

En la Tabla 3.2 se muestran algunos ejemplos de nanomedicinas que utilizan este

mecanismo de internalización.

Otra vía de internalización es la endocitosis independiente de clatrina y caveola (CCVIE). Estos procesos son los menos conocidos y por lo tanto su participación en la captura de las nanomedicinas es un tema incipiente. Están presentes en células con poca expresión de clatrina y caveolina.

En general, se forman vesículas con diámetro aproximado de 90 nm para internalizar por ejemplo SV40, toxina colérica, glicosilfosfatidilinositol unido a proteína, IL-2, que entran por múltiples vías reguladas por múltiples efectores.

En base a estos efectores es que se clasifican en dependientes de: Arf6, flotilina, Rho A y Cdc42.

Todas estas vías parecen requerir composiciones lipídicas específicas, son dependientes de colesterol y la mayoría independientes de dinamina.

Los estados tardíos de las vesículas no están claramente identificados pero se sabe que eluden el endosoma temprano. Hay pocos nanomateriales documentados que utilizan estas vías. Uno de ellos son las nanopartículas funcionalizadas con folato que se unen al receptor de glicosilfosfatidilinositol (FR α) que se sobreexpresaría en ciertos tipos de tumores en estados avanzados (Sahay et al., 2010).

Cabe mencionar que las proteínas del MHC-I, críticas para la presentación de Ag y la respuesta inmune, utilizarían la vía dependiente del Arf-6 para su internalización (Sahay et al., 2010)

Por último, la macropinocitosis es un mecanismo que utilizan las células no fagocíticas para internalizar grandes partículas. Es independiente de clatrina, caveolina y dinamina. La misma se inicia por activación del receptor tirosinquinasa por factores de crecimiento. Esto genera una serie de señales que cambian la conformación de la actina generando una protrusión en la membrana que envuelve el cargo y se une por su extremo a la membrana plasmática. Así se forma el macropinosoma de un tamaño entre 0,5 μ m y 10 μ m.

El destino de estas vesículas depende del tipo celular. En macrófagos y riñón entran al sistema endolisosomal con lo cual se degrada el cargo. En otras células se recicla o puede llegar al citoplasma sin degradación (Hillaireau y Couvreur, 2009).

A partir de los resultados del Capítulo 2, donde se logró la incorporación de proteínas a arqueosomas (ARQ) y dadas las particularidades estructurales encontradas en estas vesículas, se planteó su potencial como adyuvantes orales. Previamente, entonces, se profundizó la comprensión de la interacción de los ARQ y las células, y su posterior internalización. En este trabajo se describen técnicas para el análisis de la captura y tráfico intracelular de ARQ, en células J774A.1, como modelo de macrófago y en células Caco-2, como modelo de células intestinales. Para ello se utilizaron inhibidores de las diferentes rutas endocíticas y se cuantificó la internalización de los ARQ fluorescentes a través de la citometría de flujo. Estos estudios fueron complementados por microscopía confocal láser de barrido (MCLB) para determinar la co-localización con Lysotracker®, marcador de organelas

ácidas.

Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC, del inglés *soy phosphatidylcholine*); Phospholipon 90 G, purity >90%) fue un obsequio de Phospholipid/Natterman (Colonia, Alemania).

El medio Eagle modificado con aminoácidos no esenciales (MEM-NEEA), fue adquirido en Gibco (Buenos Aires, Argentina).

El suero fetal bovino inactivado (SFB); la glutamina (200 mM); la solución antibiótico-antimicótico (10.000 U/ml penicilina G sódica, 10.000 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 25 mg/ml de anfotericina B como Fungizone); el piruvato y la tripsina/ácido trietilendiaminotetracético (EDTA) fueron provistos por PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria).

La sal trisódica del ácido 8-Hidroxi-pireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS); la cloroquina difosfato (CQ); la citocalasina D de *Zygosporium mansonii* (Cit D); la genisteína (Genis); el 5-(N-Etil-N-isopropil) amiloride (Amil); la wortmanina (Wort) de *Penicillium funiculosum*; el bromuro de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la albúmina sérica bovina (BSA) desgrasada fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

El nocodazol (Noc) y la metil- β - ciclodextrina (M β CD) fueron suministrados por Fluka (Buenos Aires, Argentina).

La clorpromazina (CZ) fue un obsequio de Laboratorios Ceballos (Buenos Aires Argentina).

La Lissamine™ Rodamina B 1,2-Dihexadecanoil-*sn*-glicero-3- fosfoetanolamina, sal trietilamónica (RhPE); la Transferrina (TFR) -Alexa Fluor 633; el BODIPY® FL C5-lactosilceramide (LacCer) complejado a BSA; el Dextran (DEX) -Alexa Fluor 647 (PM 10.000) y el LysoTracker® Red DND-99 se compraron a Life Technologies Invitrogen (Buenos Aires, Argentina).

Las células Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano) fueron gentilmente provistas por el Dr. Osvaldo Zabal (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Buenos Aires, Argentina), y las células J774A.1 (macrófagos murinos) fueron obtenidas de la Colección de Cultivo Celular de nuestro laboratorio.

Todos los otros químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Métodos

3.1 Aislamiento y cultivo de arqueobacterias

Las arqueobacterias de la especie *Halorubrum tebenquichense* fueron aisladas de

muestras de suelo de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina) como fue descrito en la Sección 2.1 (Gonzalez et al., 2009).

3.2 Extracción, cuantificación y caracterización de LPT

La extracción de LPT se realizó a partir de inóculos de arqueobacterias por el método de Bligh y Dyer modificado para halófilas extremas según se describió en la Sección 2.2.1. Los fosfolípidos (PL) de los LPT se cuantificaron por el método de Bötcher (Böttcher et al., 1961), según Sección 2.2.2. Cada lote de LPT se caracterizó por TLC-1D y los lípidos fueron revelados con solución etanólica de ácido sulfúrico, según la Sección 2.2.3. Sólo se utilizaron los lotes con contenido de fosfolípidos mayor a 90% p/p y perfil característico de TLC-1D, según Sección 2.9.2.

3.3 Preparación de ARQ

Los ARQ fueron preparados de acuerdo al método de hidratación de la película delgada. Una masa de 20 mg de LPT se resuspendió en cloroformo/methanol (1:1 v/v) y se filtró por filtro de Teflon de 0,2 µm (Millipore®, Billerica, Massachusetts, E.U.A.). El filtrado se recogió en un balón de 25 ml y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a 40°C, 200 rpm, 100 mbares, hasta eliminar el solvente orgánico. Las trazas de solventes remanentes se eliminaron con una corriente suave de nitrógeno. Posteriormente, la delgada película lipídica obtenida se hidrató con buffer Tris 10 mM, NaCl 0.9% p/v, pH 7,4 (Tris/NaCl), con agitación mecánica con buzo magnético y perlas de vidrio (700 rpm) en baño de 40°C durante 1 h. Para reducir el tamaño medio y la lamellaridad de la población vesicular, la suspensión se sonicó en sonicador de baño durante 1 h a potencia ultrasónica de 80 W y frecuencia de 40 Khz. Los arqueosomas multilamelares resultantes (ARQ M) se extruyeron 20 veces de manera sucesiva a través de membranas de policarbonato de poro definido de 0,8; 0,4; 0,2 y 0,1 µm (Nucleopore™). Dicha extrusión se realizó con un extrusor manual Miniextruder® (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, E.U.A.).

3.3.1 ARQ marcados con Rodamina

La preparación de ARQ para los estudios de citometría de flujo se realizó como se describió en la Sección 3.3 con las modificaciones que se describen a continuación. La película delgada se preparó con 20 mg de LPT y RhPE, relación LPT/RhPE 200:1 p/p y se obtuvieron ARQ marcados con rodamina (ARQ-RhPE).

Para estos estudios se utilizaron también, como sistema comparativo, liposomas de SPC marcados con RhPE (L-RhPE) que se prepararon de la misma manera.

3.3.2 ARQ marcados con HPTS

La preparación de ARQ para los estudios de microscopía confocal láser de barrido (MCLB) se realizó como se describió en la Sección 3.3 con las modificaciones que se describen a continuación. La película delgada se preparó con 20 mg de LPT. La película lipídica obtenida se hidrató con una solución de HPTS 35 mM en buffer Tris/NaCl. La fracción libre de HPTS se separó por cromatografía de exclusión molecular. La separación se realizó por centrifugación en mini-columnas de Sephadex G-50 medium. Las columnas se prepararon en jeringas de 3 ml en buffer Tris/NaCl. El volumen sembrado de ARQ-HPTS fue del 10% del volumen de la columna. Luego se realizó la elución con buffer Tris/NaCl. Las condiciones de centrifugación fueron 600 x g durante 2 minutos a 20°C (Presvac). En cada fracción eluida se cuantificaron los fosfolípidos por el método de Bötcher (Böttcher et al., 1961) (Sección 2.2.2) y el HPTS se cuantificó por espectrofotometría (λ Abs 454 nm). De este modo se obtuvieron arqueosomas marcados con HPTS (ARQ-HPTS).

Para estos estudios se utilizaron también, como sistema comparativo, liposomas de SPC marcados con HPTS (L-HPTS) que se prepararon de la misma manera.

3.4 Determinación de tamaño, potencial Z y fosfolípidos de ARQ y L

El tamaño medio (Z_{Ave}) e índice de polidispersidad (Pdl) de las suspensiones se determinaron por dispersión dinámica de luz (DLS), mientras que el potencial Z se determinó por análisis en fase de *scattering* de luz (PALS, del inglés *phase analysis light scattering*), utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern®, Reino Unido) a 25°C en buffer Tris/NaCl.

La concentración de fosfolípidos de las vesículas, tanto ARQ como L, se determinó a través del método de Bötcher (Böttcher et al., 1961) (Sección 2.2.2).

3.5 Cultivo celular

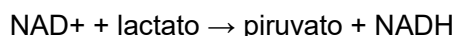
Las células Caco-2 se mantuvieron en MEM-NEAA suplementado con 10 % SFB, 1 % de glutamina, 1% antibiótico-antimicótico y 1% de piruvato, en una estufa de incubación humidificada (Heraeus Hera Cell incubator) a 37°C bajo atmósfera al 5% CO₂. El medio se cambió cada 2 o 3 días y las células fueron subcultivadas cuando alcanzaban una confluencia de 80-90 %, usando tripsina.

Las células J774A.1 se cultivaron de la misma manera sin suplementar con piruvato.

3.5.1 Citotoxicidad de ARQ

La citotoxicidad de los ARQ, se determinó a través de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivo y el ensayo de MTT que mide la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, empleando una sal de tetrazolio, sobre células J774A.1 y Caco-2.

El ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH se fundamenta en la determinación de la actividad de esta enzima citosólica que se libera por lisis celular. La reacción química involucrada es:



El ensayo de MTT determina viabilidad celular en base a la actividad mitocondrial de las células vivas. La succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas cliva el anillo de tetrazolium y forma cristales de formazán color púrpura, insolubles en medio acuoso. Los cristales son disueltos en DMSO y se mide la absorbancia de la solución púrpura. A mayor absorbancia, mayor viabilidad.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano con una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Luego de 24 h y 48 h, para J774A.1 y Caco-2 respectivamente, el medio de cultivo de las células se reemplazó por 100 μl de medio sin SFB que contenía LPT a una concentración de 0,1; 0,25; 0,5 y 1 mM. Luego de 24 h a 37°C, los sobrenadantes fueron transferidos a una placa de 96 pocillos con fondo en V, se centrifugaron a 250 x g durante 5 minutos, y se midió el contenido de LDH con un kit de lactato deshidrogenasa, CytoTox (Promega, Madison, Wisconsin, E.U.A.). La liberación de LDH se expresó como porcentaje de liberación respecto a un control de lisis total de las células con Triton X-100. El límite de toxicidad se fijó en una liberación de LDH de 10% (Fischer et al., 2003). Por otro lado, las células adheridas a las placas se procesaron para el análisis de MTT. Las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 y luego se añadieron 110 μl de solución de MTT 0,45 mg/ml en MEM. Después de 3 h de incubación, la solución de MTT se eliminó, los cristales insolubles de formazán se disolvieron con 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) y la absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Dynex Technologies, tc MRX). La viabilidad de las células se expresó como porcentaje de la viabilidad relativa a las células cultivadas en medio de cultivo.

3.5.2 Cinética de captura de ARQ y L

La tasa de captura celular de ARQ y L se estudió mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACSCalibur, San Jose, CA). Las células J774A.1 y Caco-2 se sembraron con una densidad de 2×10^5 células por pocillo, en placas de 6 pocillos y se dejó que crezcan durante 24 h y 48 h respectivamente. Posteriormente, se reemplazó el medio con medio

fresco sin SFB y se agregaron ARQ-RhPE o L-RhPE a una concentración final de 0,5 mM. Las células se incubaron durante 1, 2, 3 y 5 h a 37°C y 5% CO₂. Luego de cada tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se levantaron con Tripsina/EDTA. Una vez que se inactivó la tripsina con SFB, y lavaron las células con PBS frío tres veces, las mismas se fijaron en frío con una solución de formaldehído en PBS (1% v/v) y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Por último, las células se lavaron, se suspendieron en PBS y se analizaron utilizando un citómetro BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, E.U.A.). Un total de 10.000 células se analizaron por citometría de flujo. En todos los casos, se cuantificó la fluorescencia emitida por las células sobre el nivel de autofluorescencia de las células control (sin marca fluorescente). Los detritos celulares se descartaron para el análisis, basados en los *forward-* y *side-scattering* característicos de la población celular. Los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.9.

3.5.3 Citotoxicidad de inhibidores de endocitosis y de ARQ

La viabilidad de las células luego del tratamiento con inhibidores de la endocitosis y la mayor concentración no tóxica de ARQ se realizó tanto en células J774A.1 como Caco-2 en placas de 96 pocillos de fondo plano. Las células se sembraron con una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Luego de 24 h y 48 h, para J774A.1 y Caco-2 respectivamente, el medio de cultivo de las células se reemplazó por 100 µl de medio sin SFB que contenía los diferentes inhibidores. Los rangos de concentraciones evaluados fueron: 0,05 µg/ml - 10 µg/ml para CZ; 50 µM - 300 µM para Genis; 0,05 mM - 10 mM para MβCD; 50 µM - 250 µM para CQ; 1 µM - 30 µM para Noc; 0,5 µM - 10 µM para Cit D; 1 µM - 100 µM para Amil y 1×10^6 nM - 100 nM para Wort. Luego de transcurrida 1 h de incubación a 37°C, se agregaron los ARQ (concentración final: 0,5 mM) y las células se incubaron por 3 h más. La LDH se determinó en los sobrenadantes y el ensayo de MTT se realizó sobre las células adheridas, tal como se describió anteriormente (Sección 3.5.1).

3.5.4 Captura de ARQ en presencia de inhibidores de endocitosis

El estudio de las rutas de endocitosis y tráfico intracelular se realizó con inhibidores de endocitosis. Las células J774A.1 y Caco-2 se sembraron en placas de 6 pocillos como se describió anteriormente (Sección 3.5.2). El medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo sin SFB conteniendo los inhibidores a la mayor concentración no tóxica obtenida por los estudios de citotoxicidad (Tabla 3.3). Las células se cultivaron 1 h a 37°C. Luego se agregaron los ARQ-RhPE (concentración final 0,5 mM) y las células se incubaron durante 3 h más. Luego, el medio se eliminó y las células se lavaron dos veces con PBS y se levantaron con tripsina y fueron procesadas para el análisis por citometría de flujo como se

describió anteriormente. El porcentaje de internalización celular fue calculado en base a la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (Gm), de la siguiente manera: $(G_{\text{mobs}} / G_{\text{mcontrol}}) \times 100$, donde G_{mobs} es la Gm de las células después del tratamiento con inhibidores y ARQ, y G_{mcontrol} es la Gm de las células tratadas sólo con ARQ.

Tabla 3.3 Mecanismos de inhibidores de endocitosis y concentraciones utilizadas en ensayos de captura.

Inhibidor	Mecanismo	Concentración no tóxica	
		J774A.1	Caco-2
M β CD	Inhibición general de endocitosis	0,15 mM	10 mM
CZ	Inhibición de endocitosis mediada por clatrina (CME)	2 μ g/ml	2 μ g/ml
Genis	Inhibición de endocitosis mediada por caveola (CvME)	75 μ M	200 μ M
CQ	Alteración de endosomas y lisosomas	100 μ M	100 μ M
Noc	Alteración de microtúbulos	30 μ M	10 μ M
Cit D	Despolimerización de los filamentos de actina. Inhibición de Fagocitosis / Macropinocitosis	2 μ M	10 μ M
Amil	Inhibición de Macropinocitosis	50 μ M	50 μ M
Wort	Inhibición de Macropinocitosis	0,001 nM	50 nM

3.5.5 Marcadores de endocitosis

Para evaluar si la concentración seleccionada de inhibidores es suficiente para inhibir las rutas de endocitosis, se analizó la captura de marcadores específicos de endocitosis a través de la citometría de flujo. Los marcadores de CME, CvME y macropinocitosis fueron TFR-Alexa Fluor 633; BODIPY® FL-LacCer y DEX-Alexa Fluor 647, respectivamente.

Tabla 3.4 Inhibidores evaluados con cada marcador de endocitosis.

	TFR	LacCer	DEX
	CME	CvME	Macropinocitosis
M β CD	X	X	
CZ	X		
Genis		X	
CQ	X		
Noc	X	X	
Cit D		X	X
Amil			X
Wort			X

Las células, tanto J774A.1 como Caco-2, se incubaron durante 1 h con los inhibidores de endocitosis indicados en la Tabla 3.4 a la concentración referida en la Tabla 3.3 previamente a agregar los marcadores. Cada marcador se lavó con un procedimiento especial según se detalla más abajo. Luego de los lavados las células se levantaron con tripsina/EDTA y se procesaron para ser analizadas por citometría de flujo, como se describió anteriormente.

3.5.5.1 Captura de TFR (marcador de CME)

Luego de la incubación con TFR (concentración final 25 μ g/ml) durante 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS frío, seguido de un lavado ácido en frío durante 1 minuto (0,2 M ácido acético/0,2 M NaCl). Finalmente, las células se volvieron a lavar rápidamente con PBS frío (Thurn et al., 2011; Vercauteren et al., 2010).

3.5.5.2 Captura de LacCer (marcador de CvME)

Después de la incubación con LacCer (concentración final 0,81 μ M) durante 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS frío. Luego, se lavaron seis veces con PBS suplementado con 5% de BSA desgrasada durante 10 minutos en frío. De esta manera los lípidos fluorescentes asociados a la superficie son extraídos de la membrana plásmática (*back exchange*). Una vez que se removió el marcador fluorescente no internalizado, las células se lavaron dos veces con PBS frío (Thurn et al., 2011; Vercauteren et al., 2010).

3.5.5.3 Captura de DEX (marcador de macropinocitosis)

Luego del agregado de DEX (concentración final 250 μ g/ml) las células se incubaron durante 2 h y se realizaron cinco lavados con PBS frío (O' Neill et al., 2011; Thurn et al.,

2011).

3.5.6 Estudios de colocación de Lysotracker® con ARQ y L

Tanto las células J774A.1 como Caco-2 se cultivaron sobre cubreobjetos redondos de vidrio en placas de 24 pocillos. Las células se sembraron con una densidad de 5×10^4 células por pocillo y se dejaron crecer durante 24 h (J774A.1) o 48 h (Caco-2). Luego de descartar el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS, se agregó medio de cultivo sin SFB con ARQ-HPTS o L-HPTS (concentración final 0,5 mM) y se incubaron durante 1 h, 3 h y 5 h. Treinta minutos antes de cada tiempo de incubación se agregaron 5 μ l de Lysotracker® (concentración final 75 nM). Una vez cumplidos los tiempos de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron durante 25 minutos a 4°C con una solución de formaldehído en PBS (4% v/v) para su observación por MCLB.

Por último, las células se lavaron dos veces con PBS y se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con 3 μ l de solución de montaje (1% 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO) en 90% glicerol). Las muestras se conservaron a 4°C hasta su observación utilizando un Microscopio Confocal Nikon con objetivos Plan APO 60X de apertura numérica (AN) 1,4 oil, Plan APO 40X AN 0,95 y Plan APO 20X AN 0,4. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Mac Biophotonics MBF- Image J (disponible en <http://www.macbiophotonics.ca/imagej/>).

La colocación se determinó calculando el coeficiente de correlación de Pearson (R_r) cuya fórmula se observa en la Ec. 3.1, donde S_1 representa la intensidad de la señal de los píxeles en el canal 1 (rojo) y S_2 representa la intensidad de la señal de los píxeles en el canal 2 (verde); S_{1prom} y S_{2prom} muestran las intensidades promedio de estos canales respectivos (Zinchuk y Zinchuk, 2008). Este coeficiente describe la correlación de la distribución de intensidades entre los canales, es independiente de la intensidad de las señales y sus valores varían entre -1 y 1. El mismo se calculó utilizando el programa Mac Biophotonics MBF- Image J.

$$R_r = \frac{\sum_{i=0}^n (S1_i - S1_{prom}) \cdot (S2_i - S2_{prom})}{\sqrt{\sum_{i=0}^n (S1_i - S1_{prom})^2 \cdot \sum_{i=0}^n (S2_i - S2_{prom})^2}} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Sobre la base de un gran número de resultados de coeficientes obtenidos en el análisis de colocación de diversos antígenos en el cerebro, corazón, hígado, riñón, músculo y sangre marcados con diferentes fluoróforos como FITC, Texas Red y Alexas se determinó que los valores del coeficiente de Pearson que indican colocación se encuentran entre 0,5 y 1, mientras que valores entre -1 y 0,5 indican ausencia de colocación (Zinchuk y

Zinchuk, 2008).

3.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una entrada, seguido del test de Dunnett utilizando el software Prisma 4.0 (Graphpad Software Corporation, San Diego, California, EE.UU.). Los niveles de significación se indican en las leyendas de las figuras.

Resultados

3.7 Caracterización de ARQ y L

El tamaño de partícula (Z_{Ave} y P_{dI}) y potencial Z de las vesículas se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Tamaño de partícula y potencial Z.

Muestra	Z Ave (nm)	PdI	Pot Z (mV)
ARQ-RhPE	127±16	0,178±0,039	- 39,1±3,1
L-RhPE	115±9	0,077±0,011	- 4,8±1,9
ARQ-HPTS	138±2	0,192±0,037	- 40,4±0,7
L-HPTS	133±5	0,069±0,010	- 4,0±2,0
ARQ sin marcar ⁽¹⁾	121±14	0,172±0,041	- 39,8±3,8

⁽¹⁾ Utilizados para los ensayos de citotoxicidad (Sección 3.5.1 y 3.5.3)

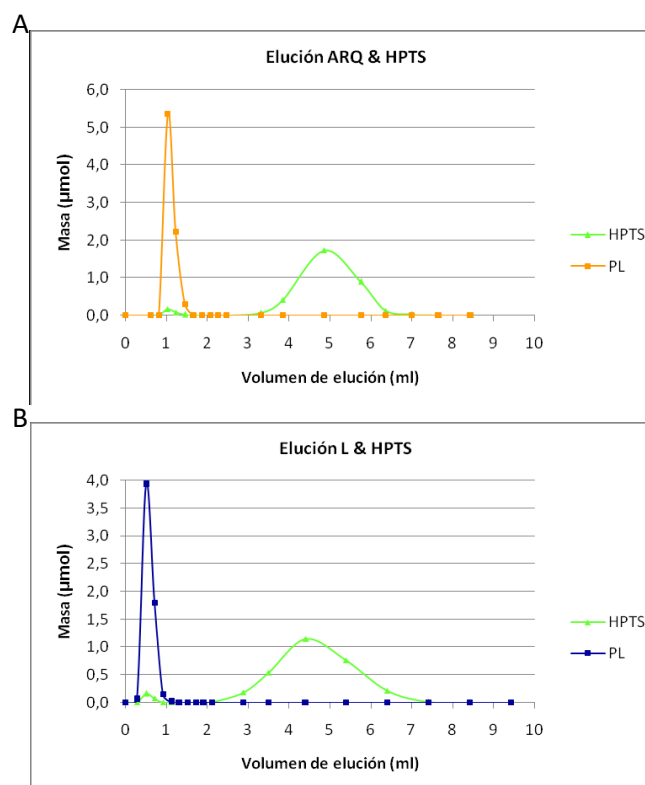


Fig. 3.2 Separación de HPTS libre

Curvas de elución de (A) ARQ-HPTS y (B) L-HPTS luego de la centrifugación de mini-columnas de exclusión molecular (Sephadex G-50). PL: fosfolípidos

El potencial Z de los ARQ resultó francamente negativo, lo cual confiere una alta estabilidad en solución. En cambio, los L presentaron un potencial Z negativo débil. No hubo diferencia significativa entre el diámetro promedio de los ARQ-RhPE y L-RhPE, como de los ARQ-HPTS y L-HPTS. Los ARQ fueron más polidispersos que los L, tanto marcados con RhPE como con HPTS, como lo demuestra el mayor Pdl ($p < 0,01$). Para los ensayos de citotoxicidad (Sección 3.5.1 y 3.5.3) se prepararon ARQ sin marcar.

Las vesículas utilizadas para MCLB se marcaron con HPTS. Para separar el HPTS libre, no incorporado a las vesículas, se utilizó la técnica de centrifugación de mini-columnas de Sephadex. La Fig. 3.2 muestra los perfiles de elución de ARQ-HPTS y L-HPTS, donde se puede observar la coelución de HPTS y ARQ o L en las primeras fracciones, cuyo volumen de elución fue de 1,5 y 1 ml, respectivamente. El HPTS libre eluyó a partir de los 3 ml. Esto muestra una eficiente separación de este fluoróforo hidrofílico utilizado como sonda de marcación fluorescente del compartimiento acuoso interno de vesículas lipídicas. La relación molar de PL/HPTS resultante fue de 35: 1 para ARQ y de 25: 1 para L.

3.8 Cinética de captura de ARQ y L

La captura de ARQ y L marcados con el análogo lipídico RhPE, como marca de las lamelas lipídicas, se siguió a lo largo de 5 h por citometría de flujo en células J774A.1 y Caco-2.

Los ARQ-RhPE fueron internalizados por la célula con una cinética que responde a una función hiperbólica, tanto en células J774A.1 como en células Caco-2. La ecuación que rige dicha cinética es $y = B_{\text{máx}} x / K_d + x$ y los valores de las constantes para cada tipo celular se muestran en la Tabla 3.6. No se observaron diferencias significativas entre los ARQ M y los ARQ extruídos por membranas de 100 nm (Fig. 3.3). Por el contrario, la captura de L-RhPE no fue detectada por esta técnica, tal como lo muestra la curva de la Fig. 3.3.

Tabla 3.6 Constantes de curvas de cinética de captura de ARQ (100nm); ARQ M y L.

		$B_{\text{máx}}$	K_d	R^2
J774A.1	ARQ (100 nm)	11,3±1,4	2,50±0,71	0,9289
	ARQ M	8,0±1,3	1,06±0,54	0,7453
	L	n.a.	n.a.	n.a.
Caco-2	ARQ (100 nm)	5,83±0,38	0,68±0,19	0,9448
	ARQ M	5,64±0,33	0,51±0,16	0,9473
	L	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. no aplicable

En base a los datos obtenidos se definió un tiempo de incubación de 3 h de modo de obtener una captura suficiente para posteriores cuantificaciones (Huth et al., 2006; Manunta et al., 2004).

Para garantizar la reproducibilidad de los experimentos, se utilizaron ARQ extruídos por membranas de 100 nm en los estudios de citotoxicidad de ARQ con inhibidores, los estudios del efecto de los inhibidores sobre la captura de ARQ y los estudios de colocalización por MCLB.

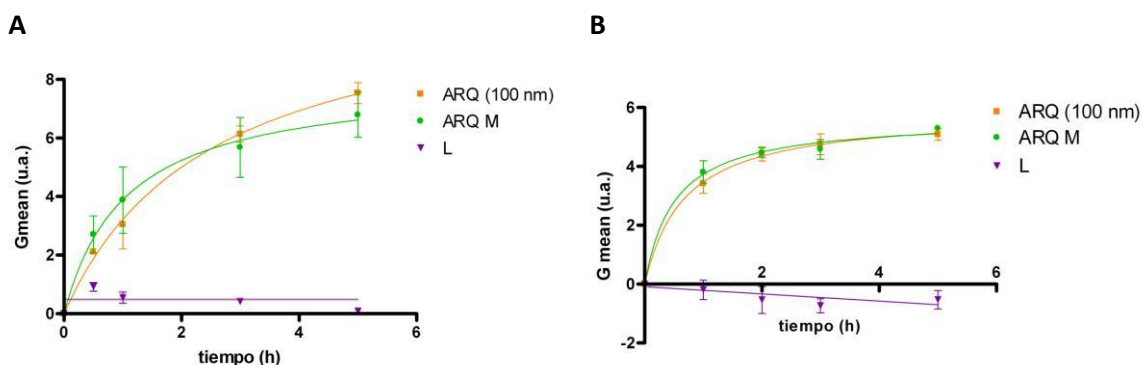


Fig. 3.3 Cinética de captura de ARQ y L en células (A) J774 y (B) Caco-2.

3.9 Citotoxicidad de ARQ e inhibidores de endocitosis

En base a los resultados de citotoxicidad utilizando la técnica del MTT y la liberación de LDH, se seleccionó la mayor concentración no citotóxica de ARQ que fue de 0,5 mM tanto en J774A.1 como en Caco-2. El tiempo de incubación estudiado fue de 24 h.

Por otra parte, el empleo de inhibidores debe ser optimizado mediante el uso de concentraciones que no afecten la viabilidad celular. Para ello, las células se pre-incubaron con distintas concentraciones de inhibidores durante 1 h, luego se agregaron ARQ (concentración final 0,5 mM) y la incubación continuó por 3 h.

Finalmente, la viabilidad celular se determinó utilizando los ensayos de MTT y LDH. A través de estos estudios de citotoxicidad se seleccionaron las concentraciones no citotóxicas de inhibidores de endocitosis a emplearse en los experimentos de captura en presencia de inhibidores (Tabla 3.3).

3.10 Captura de ARQ en presencia de inhibidores de la endocitosis

El mecanismo de captura y procesamiento intracelular ARQ se estudió en células J774A.1 y Caco-2 por citometría de flujo, en presencia de los inhibidores de endocitosis de la Tabla 3.3. Para estos estudios se utilizaron los ARQ marcados con la sonda lipofílica RhPE (ARQ-RhPE).

Para evaluar la especificidad y concentración de los inhibidores de las diferentes rutas endocíticas se utilizaron marcadores específicos de endocitosis, unidos a un fluoróforo. La

TFR a Alexa Fluor 633 (Exc 632 nm Em 647 nm); el LacCer, complejado con BSA, a BODIPY® FL (Exc 505 nm / Em 511 nm) y el DEX a Alexa Fluor 647 (Exc 650 nm / Em 668 nm).

TFR es una glicoproteína sérica monomérica que une dos iones de Fe⁺³. Su unión al metal induce un cambio conformacional que aumenta la afinidad por su receptor (receptor de TFR) en la membrana celular; luego de unirse a éste se internaliza específicamente por endocitosis mediada por clatrina. Una vez en los endosomas, el descenso de pH induce otro cambio conformacional que permite la liberación del Fe⁺³ en el compartimiento endosomal, seguido por el reciclado de la TFR a la superficie celular, donde la baja afinidad del receptor por esa conformación de la proteína al pH extracelular causa su liberación (Widera et al., 2003). Es por eso que TFR fue utilizado para evaluar la inhibición con M β CD, CZ, CQ y Noc (Tabla 3.4).

LacCer es una glicoproteína que se aloja preferentemente en los dominios lipídicos y su captura es clatrina independiente pero dependiente de dinamina y caveolina-1 (Marks et al., 2005; Puri et al., 2001; Singh et al., 2003). Esta glicoproteína se usó como marcador de endocitosis mediada por caveolina. No obstante, como existen evidencias de que la caveolina-1 no sería necesaria para la endocitosis del LacCer, algunos autores prefieren definirla como marcador de endocitosis independiente de clatrina (CIE) (Vercauteren et al., 2010). Así, los inhibidores evaluados con LacCer fueron M β CD, Genis, CQ y Noc (Tabla 3.4).

Como marcador de macropinocitosis y fagocitosis se utilizó DEX, un polisacárido hidrofílico sintetizado por la bacteria *Leuconostoc* caracterizado por su alto peso molecular, su buena solubilidad en agua, su baja toxicidad y por ser prácticamente inerte. Los inhibidores evaluados con este marcador fueron: Cit D, Amil y Wort (Tabla 3.4).

Los inhibidores de las distintas vías endocíticas se enumeran en la Tabla 3.3 y a continuación se detallan sus mecanismos de acción.

La Metil β ciclodextrina (M β CD) es un oligómero cíclico de glucopiranosido hidrosoluble que, sin incorporarse en la membrana celular, extrae y forma complejos de inclusión con el colesterol de la membrana plasmática (Lakkaraju et al., 2002; Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999). Esto produce la destrucción de los microdominios de colesterol que están involucrados tanto en mecanismos de endocitosis mediados por clatrina como aquellos independientes de ésta. Por este motivo la M β CD se utilizó en este trabajo como un inhibidor general de la endocitosis.

Clorpromazina (CZ) es una molécula catiónica anfipática que inhibe la endocitosis mediada por clatrina por interferencia en el ensamblaje-desensamblaje de la clatrina (Oddone et al., 2013). En otras palabras CZ inhibe la formación de los hoyos recubiertos de clatrina mediante el ensamble reversible de la clatrina y sus proteínas adaptadoras desde la membrana plasmática a vesículas intracelulares (Wang et al., 1993).

Genistéina (Genis) es un inhibidor de tirosina quinasa. Esto causa el desordenamiento local del citoesqueleto de actina y evita el reclutamiento de la dinamina II, ambos indispensables para la endocitosis mediada por caveolina (Aoki et al., 1999)

Citocalasina D (CitD) es un inhibidor de la polimerización del citoesqueleto de actina, lo que interfiere principalmente en los mecanismos de macropinocitosis y fagocitosis, aunque también puede tener un efecto en la endocitosis mediada por caveolina (Sahay et al., 2010; Thomsen et al., 2002; Torgersen et al., 2001)

Amiloride (Amil) y sus derivados inhiben la proteína de membrana de intercambio Na⁺/H⁺, lo que causa un aumento del pH en las vecindades de los pseudópodos afectando la polimerización de la actina (Koivusalo et al., 2010) y se demostró que al menos en células dendríticas bloquea la macropinocitosis (Hewlett et al., 1994; West et al., 1989). La macropinocitosis es un mecanismo actina dependiente (Thurn et al., 2011).

Tabla 3.7. Captura de ARQ y marcadores de endocitosis en presencia de inhibidores.

Tipo celular	MβCD	CZ	Genis	CQ	Noc	Cit D	Amil	Wort
J774A.1	ARQ	↓ (p<0,05)	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,01)	NO	NO
	TFR	NO	↓ (p<0,05)	-	↓ (p<0,01)	-	-	-
	LacCer	NO	-	↓ (p<0,05)	-	NO	↑ (p<0,01)	-
	DEX	-	-	-	-	-	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,01)
Caco-2	ARQ	↑ (p<0,05)	NO	↓ (p<0,01)	NO	NO	↓ (p<0,01)	NO
	TFR	↓ (p<0,01)	NO	-	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,01)	-	-
	LacCer	↓ (p<0,01)	-	↓ (p<0,01)	-	NO	↓ (p<0,01)	-
	DEX	-	-	-	-	-	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,01)

↓: disminución; ↑ aumento; NO: sin cambio

Wortmanina (Wort) es un inhibidor de la enzima fosfatidil inositol-3-quinasa que regula la disposición de los filamentos de actina. Wort no interfiere con la extensión de la actina en los pseudópodos, sino que impide la fusión de la membrana evitando la formación de la vesícula en el interior celular, inhibe específicamente tanto la macropinocitosis como la fagocitosis (Araki et al., 1996).

Cloroquina (CQ) es una base débil que incrementa el pH endosomal y lisosomal hasta valores cercanos a 6,3 lo que evita la degradación ácida del material endocitado. Esto produce cambios en la distribución intracelular del mismo y una disminución de los procesos endocíticos degradativos (Pless y Wellner, 1996).

Nocodazol (Noc) produce la despolimerización de los microtúbulos del citoesqueleto, lo que evita la fusión de las vesículas endocíticas con los pre-lisosomas (o endosomas tardíos), evitando la degradación lisosomal (Kelly, 1990).

En la Tabla 3.7 se muestra un resumen del efecto de los inhibidores sobre la internalización de ARQ y los marcadores específicos de endocitosis utilizados.

3.10.1 Efecto de los inhibidores sobre células J774A.1

Según puede observarse en la Tabla 3.7 y la Fig. 3.4 A, en células J774A.1 el tratamiento con M \square CD no modificó la captura de TFR ni de LacCer pero produjo una leve aunque significativa disminución de la captura de ARQ-RhPE (20%, $p < 0,05$).

Para evaluar la CME se utilizó CZ que disminuyó tanto la captura de TFR como de ARQ-RhPE (26%, $p < 0,01$).

La Genis, inhibidor de la CvME, disminuyó la captura de LacCer y ARQ-RhPE (40%, $p < 0,01$).

Al estudiar los mecanismos de fagocitosis y macropinocitosis, pudo observarse que sorpresivamente, el tratamiento con CitD sobre células J774A.1 mostró un elevado nivel de captura de LacCer. Sin embargo, disminuyó significativamente la captura tanto de DEX como de ARQ-RhPE (68%, $p < 0,01$). Amil provocó una disminución de la captura de DEX sobre estas células pero no produjo modificaciones en el nivel de captura de ARQ-RhPE. El tratamiento con Wort no afectó significativamente la captura de DEX ni de ARQ-RhPE en este tipo celular.

Respecto a los inhibidores utilizados para evaluar el tráfico intracelular, el tratamiento con CQ sobre células J774A.1 causó una disminución tanto de la captura de TFR como de ARQ-RhPE (37%, $p < 0,01$). Y el uso de Noc no modificó significativamente la captura de los marcadores TFR y LacCer. Sin embargo, tuvo un gran impacto sobre la captura de ARQ-RhPE (48%, $p < 0,01$).

3.10.2 Efecto de los inhibidores sobre células Caco-2

En la Tabla 3.7 y la Fig. 3.4 B se muestra que en las células Caco-2, M \square CD causó una disminución de la captura de TFR y LacCer pero aumentó la captura de ARQ-RhPE (35%, $p < 0,05$).

CZ, como inhibidor de la CME, no modificó ni la captura de TFR ni la de los ARQ-RhPE. Y la CvME fue evaluada con Genis que provocó la disminución de la captura tanto del LacCer como de los ARQ-RhPE (41%, $p < 0,01$).

Respecto a los inhibidores de la fagocitosis y macropinocitosis, el tratamiento con Cit D, disminuyó la captura de los marcadores LacCer y DEX pero no modificó la captura de ARQ-RhPE. El tratamiento con Amil disminuyó la captura tanto de DEX como de ARQ-RhPE. Y Wort no afectó significativamente la captura de DEX ni de ARQ-RhPE.

Con el uso de inhibidores que afectan el tráfico intracelular se observó que, en células Caco-2, CQ produjo una disminución de la captura de TFR pero no modificó la captura de ARQ-RhPE. Y en presencia de Noc sólo se observó una disminución de la captura de TFR. Tanto LacCer como ARQ-RhPE no modificaron su porcentaje de captura.

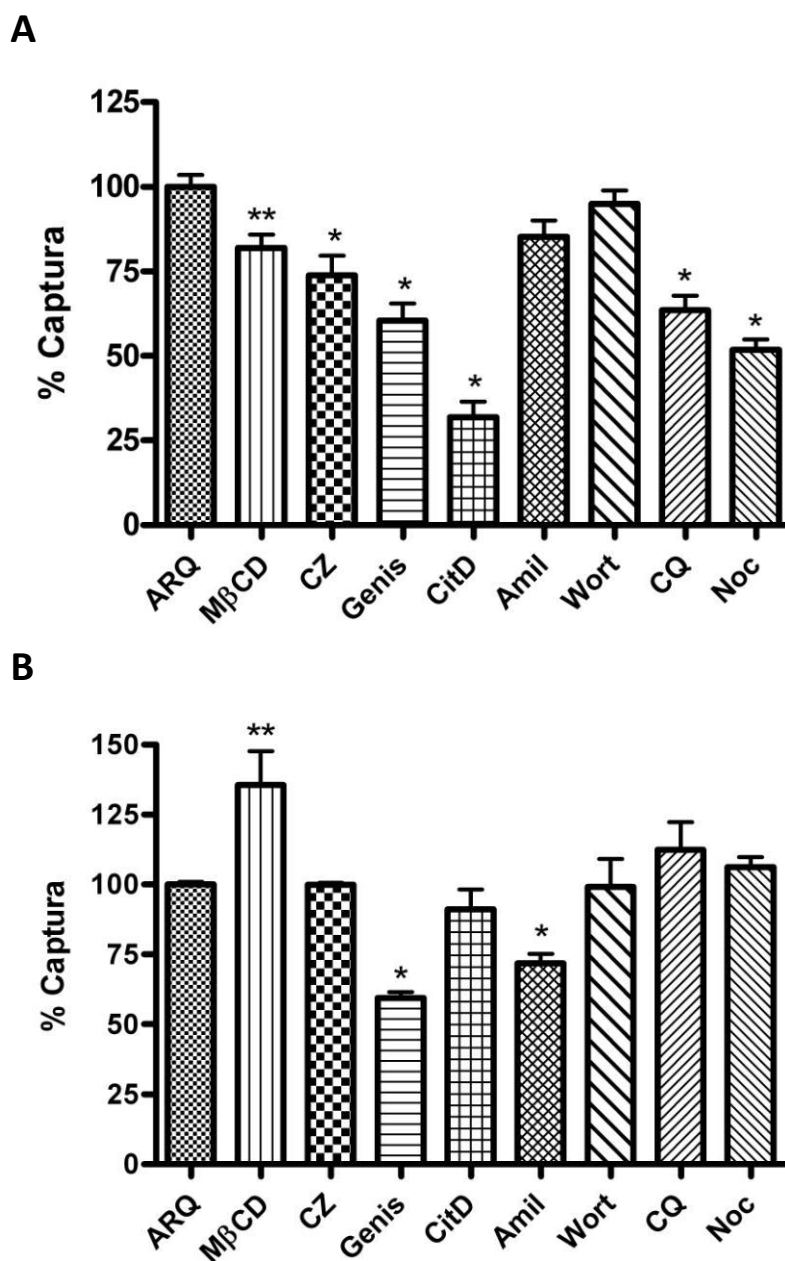


Fig. 3.4 Efecto de los inhibidores sobre la internalización de ARQ en células

(A) J774A.1 y (B) Caco-2.

* $p < 0,01$ ** $p < 0,05$

3.11 Estudios de captura de ARQ y L por microscopía confocal láser de barrido (MCLB)

Para convalidar los resultados de la captura de ARQ y L en células J774A.1 y Caco-2 obtenidos por citometría de flujo, se incubaron dichas líneas celulares con ARQ-HPTS y L-HPTS y se observaron por MCLB a diferentes tiempos.

La captura de ARQ se incrementó a lo largo del tiempo de incubación. A mayor tiempo de incubación mayor intensidad de fluorescencia en ambos tipos celulares (Fig. 3.5 y Fig. 3.6). En la superposición de las imágenes de fluorescencia a las 5 horas de incubación y las imágenes por contraste de interferencia diferencial (DIC, del inglés *differential interference contrast*) puede observarse que los ARQ-HPTS se encuentran en el interior celular. La DIC es una técnica de iluminación de microscopía óptica utilizada para magnificar el contraste de muestras transparentes.

Por el contrario, los L fueron pobremente capturados por ambas líneas celulares estudiadas. Más aún, en la Fig. 3.5 puede observarse la presencia de *clusters* de vesículas fluorescentes fuera de las células J774A.1, incubadas con L. Estos hallazgos fueron coincidentes con los resultados de cinética de captura evaluados por citometría de flujo (Fig. 3.3). Por este motivo, los estudios de colocalización con LysoTracker®, sólo se efectuaron con ARQ.

3.12 Colocalización de ARQ con LysoTracker®

El LysoTracker® es una sonda fluorescente acidotrópica para la marcación y seguimiento de organelas ácidas como los lisosomas. Por este motivo, se evaluó la colocalización de los ARQ marcados con la sonda fluorescente HPTS (verde) con el marcador de lisosomas LysoTracker® Red. Para estudiar la dinámica de este proceso se realizó un seguimiento por 1 h, 3 h y 5 h de incubación y se calculó el coeficiente de Pearson (Rr). Los resultados se muestran en la Tabla 3.8.

En células J774A.1 se observó un alto grado de colocalización, acorde con valores de Rr mayor a 0,5, en todos los tiempos (Fig.3.7). En cambio, en células Caco-2 el Rr fue moderadamente superior a 0,5 a partir de las 3 h de incubación (Fig.3.8).

Tabla 3.8 Coeficiente de Pearson de estudios de colocalización ARQ/LysoTracker®.

Línea celular	Tiempo de incubación (h)	Coefficiente de Pearson (media±SEM)
J774A.1	1	0,693 ± 0,126
	3	0,766 ± 0,033
	5	0,727 ± 0,075
Caco-2	1	0,401 ± 0,063
	3	0,547 ± 0,041
	5	0,531 ± 0,024

SEM error standard de la media

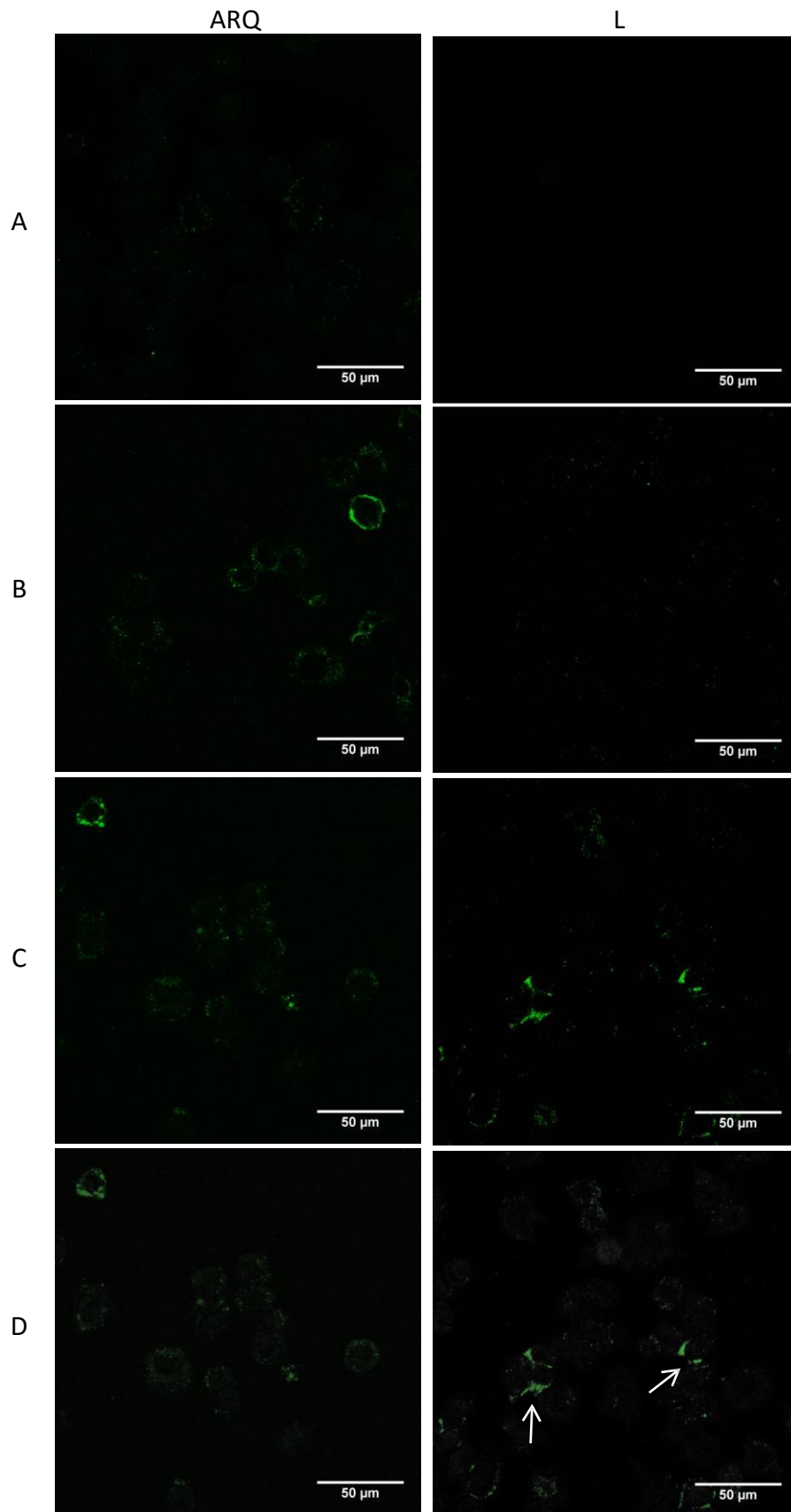


Fig. 3.5 Imágenes de MCLB de células J774A.1

Incubación con ARQ y L marcados con HPTS a (A) 1 h (B) 3 h (C) 5 h. En (D) se muestra la superposición de la imagen a 5h de incubación con la imagen transparente (DIC). Las flechas señalan *clusters* de liposomas fuera de las células.

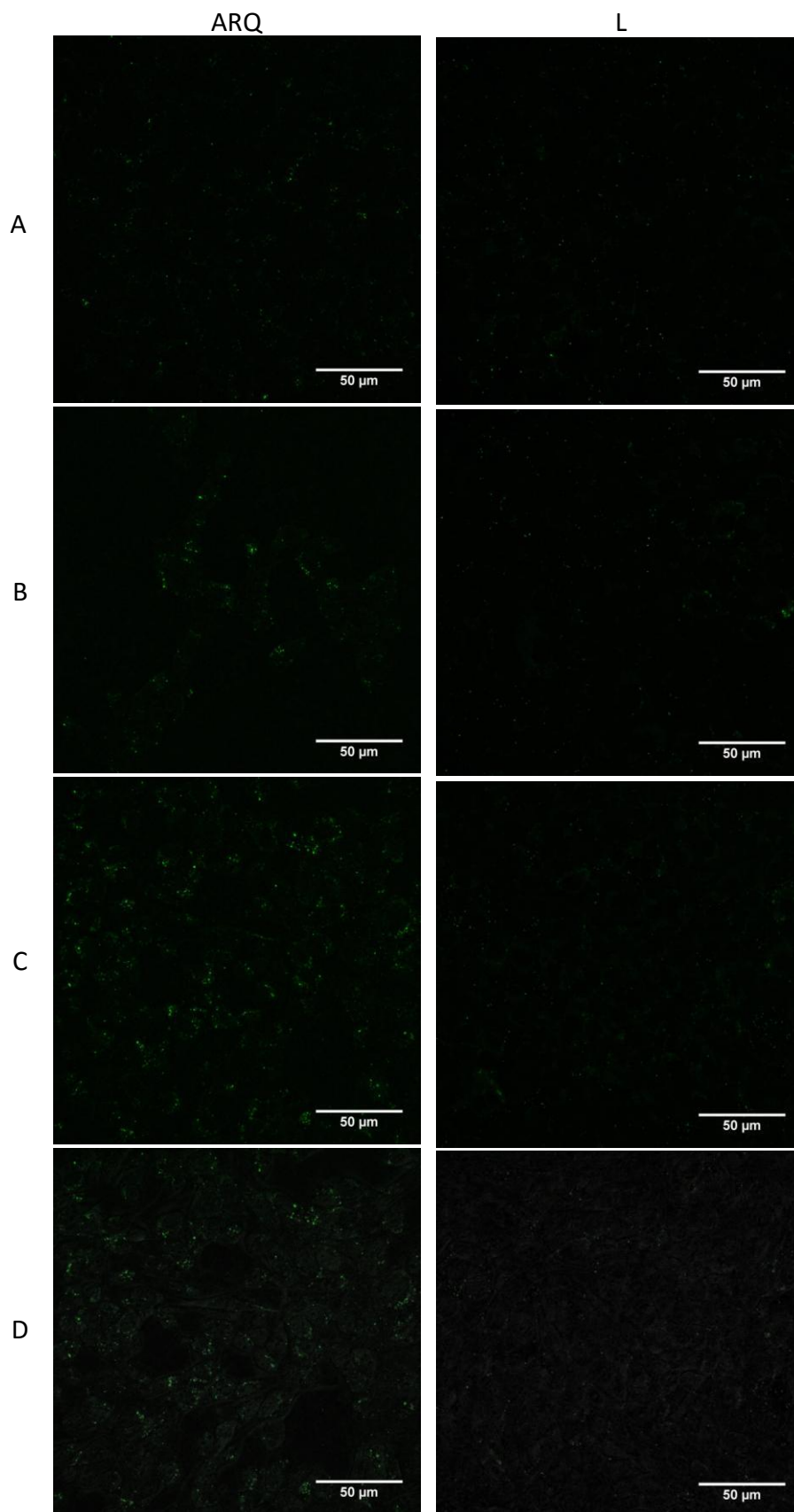


Fig. 3.6 Imágenes de MCLB de células Caco-2
 Incubación con ARQ y L marcados con HPTS a (A) 1 h (B) 3 h (C) 5 h. En (D) se muestra la superposición de la imagen a 5h de incubación con la imagen transparente (DIC).

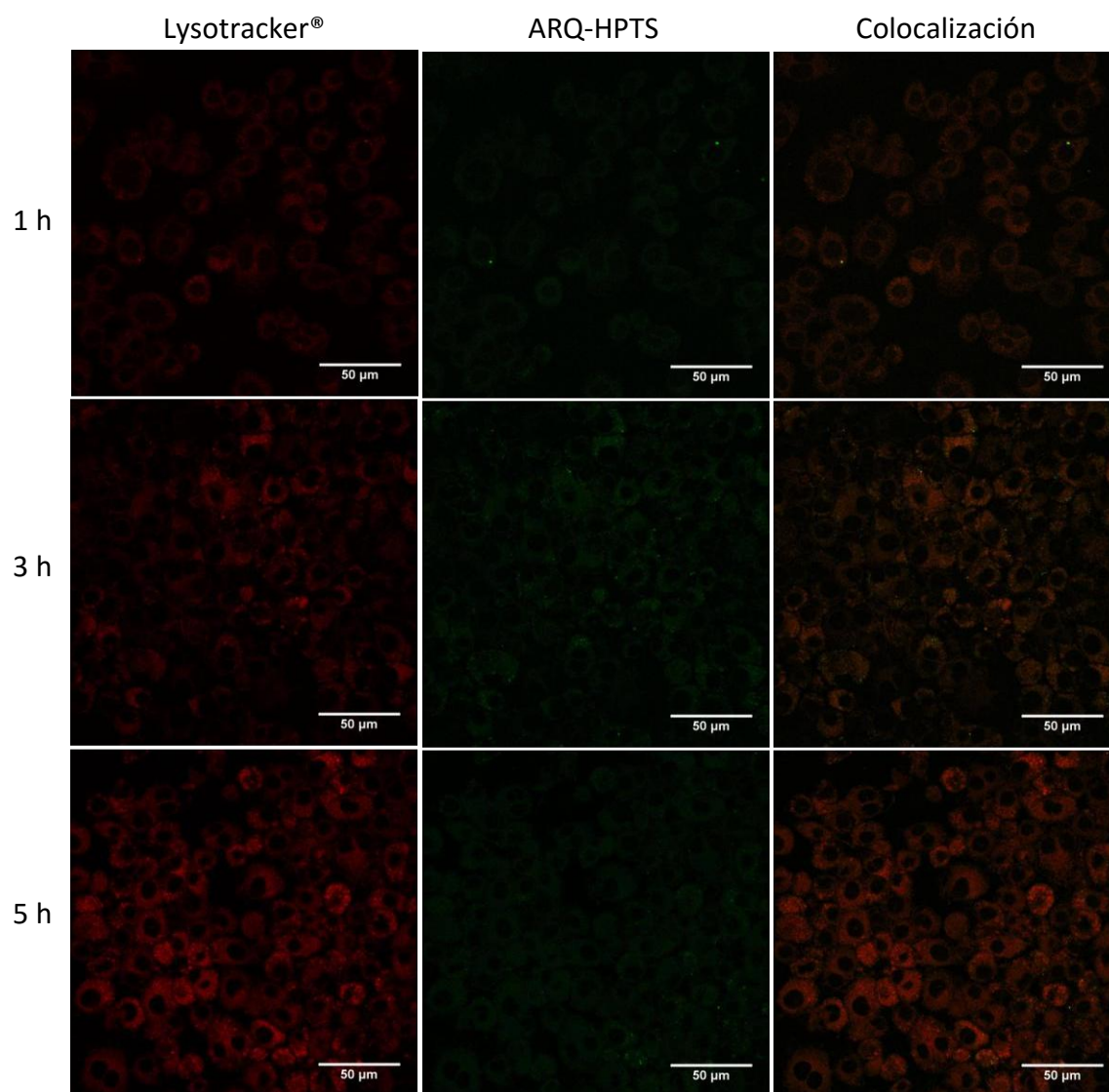


Fig. 3.7 Imágenes de MCLB de células J774A.1
 Incubación con Lysotracker® y ARQ-HPTS a diferentes tiempos.

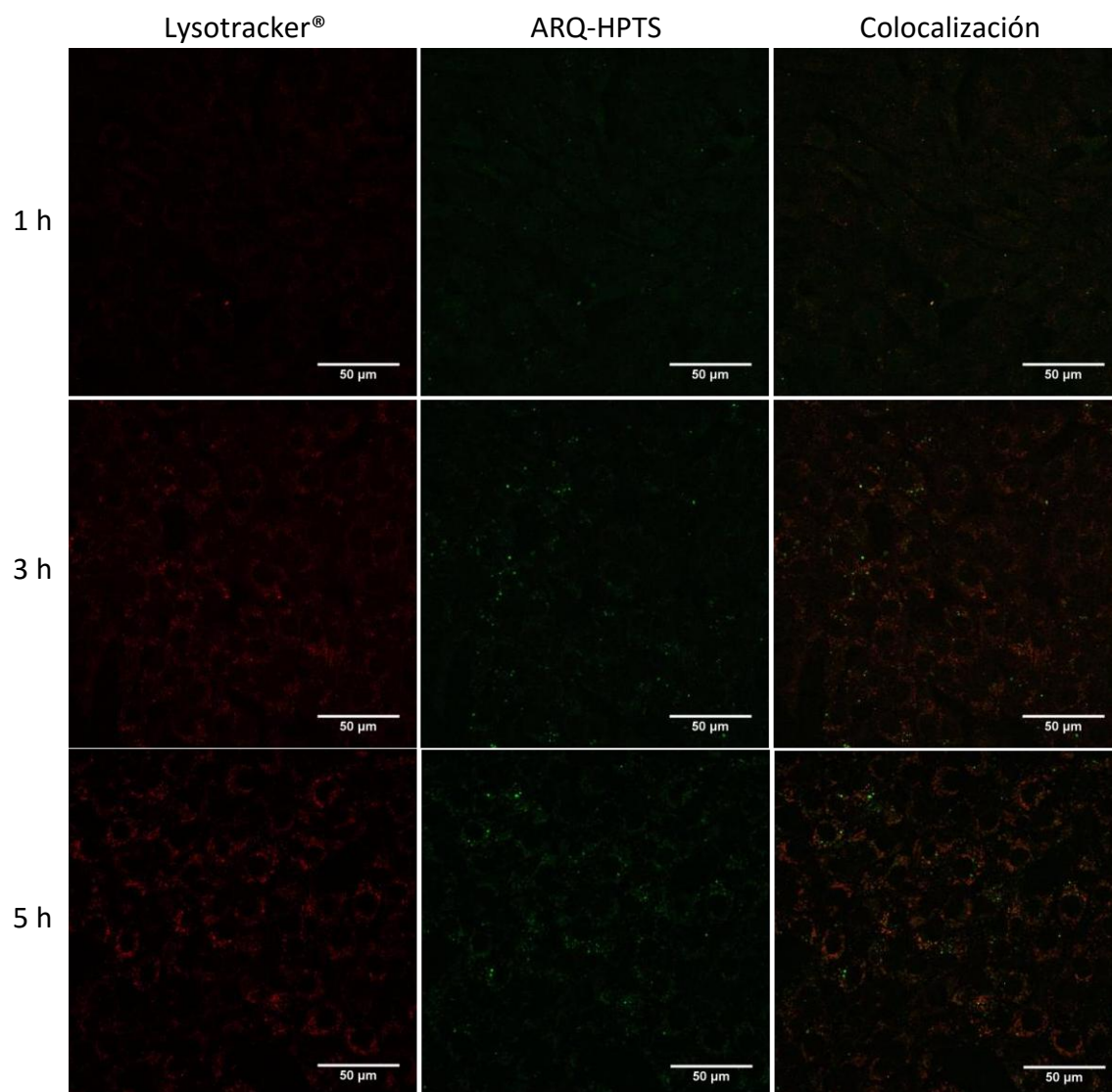


Fig. 3.8 Imágenes de MCLB de células Caco-2
Incubación con Lysotracker® y ARQ-HPTS a diferentes tiempos.

Discusión

En líneas generales, la endocitosis de material particulado depende del tamaño, la forma y las propiedades de superficie (carga, hidrofobicidad, grupos químicos, etc.) de las partículas en estudio, pero especialmente depende del tipo celular (Lai et al., 2007; Sahay et al., 2010; Thurn et al., 2011; Vercauteren et al., 2010).

Hasta el momento no se han reportado estudios *in vitro* sistemáticos sobre las vías de internalización de ARQ y tampoco respecto al tráfico intracelular en líneas celulares no fagocíticas.

El grupo de Sprott ha estudiado el mecanismo de internalización en líneas celulares fagocíticas como la J774 y la IC21. Todos los ARQ fueron fagocitados en mayor medida que los liposomas de diferente composición. Las diferencias sobre la capacidad de los diversos ARQ para ser capturados por macrófagos se atribuyeron a la variabilidad en la estructura lipídica que altera las características de superficie de las vesículas (Sprott et al., 1999). Esta captura se inhibió con Cit D, lo cual excluyó la fusión a la membrana plasmática como mecanismo de ingreso directo al citosol (Gurnani et al., 2004; Tolson et al., 1996). De todos los tipos de ARQ, los mejor caracterizados por su interacción con APC fueron los preparados con LPT de arqueobacterias *Methanobrevibacter smithii*. La presencia de 40% (mol) de caldarqueoles confiere una alta estabilidad de estas vesículas y además se caracterizan por la presencia de un 30% (mol) de arquetidilserina que forma ARQ con grupos fosfoerina expuestos en su superficie (Sprott et al., 1999). De este modo, los autores postularon que estos ARQ se capturaron a través de endocitosis mediada por receptor debido a su única interacción con receptores de fosfatidilserina (PS) presentes en la superficie de APC (Gurnani et al.,

2004). La PS se expone hacia el exterior de la membrana plasmática de las células mamíferas apoptóticas. Las células fagocíticas utilizan esta señal para la remoción de estas células. Los grupos de arquetidilserina de estos ARQ explotarían este mecanismo para entrar a la célula. Basados en la inhibición de presentación de Ag por inhibidores de la acidificación endosomal (CQ) y en ausencia de inhibidores de proteasas lisosomales, demostraron que una vez en los fagosomas, el escape del Ag desde los ARQ parece ocurrir en el citosol por un mecanismo dependiente del pH ácido de los fagolisosomas. Posteriormente, el Ag pasaría al citosol y se procesaría a través del proteasoma y del TAP (del inglés, *Transporter Associated with antigen Processing*) (Gurnani et al., 2004) llegando así a la presentación de antígeno en el MHC-I por la vía clásica citosólica. A través del uso de Brefeldina A, un inhibidor que bloquea el transporte del complejo Ag-MHC-I desde el retículo endotelial a la membrana, se comprobó que los ARQ preparados con LPT extraídos de la cepa metanógena *Methanobrevibacter smithii*, utilizarían esta vía de procesamiento y presentación (Krishnan et al., 2000b).

En el presente trabajo de investigación no sólo se estudió la captura en la línea celular J774A.1 como modelo de macrófago sino también en células Caco-2, como modelo de epitelio intestinal. A través de los estudios realizados, se pudo constatar que los ARQ, tanto uni como multilamelares, fueron capturados por células J774A.1 y Caco-2 siguiendo una cinética de tipo hiperbólica. La curva responde a una cinética característica de mecanismos saturables. En otras palabras, la cinética de captura celular de este tipo se debería a la saturación de los sitios de unión de la membrana. Esto sería característico de endocitosis adsorptivas (Huang et al., 2002). Por el contrario, en las condiciones de cultivo estudiadas, tanto J774A.1 como Caco-2 no internalizaron los liposomas de SPC.

La estrategia de determinar la vía de internalización de ARQ, como de cualquier nanomedicina o cargo, empleando distintos inhibidores, requiere de una cuidadosa interpretación de los resultados. Por ejemplo, recientemente, ha sido cuestionada la especificidad de los marcadores y los inhibidores, ya que dependerían del tipo celular utilizado (Vercauteren et al., 2010).

De hecho, se esperaba que los inhibidores chequeados (Tabla 3.4) inhibieran la captura de los marcadores específicos de las distintas vías de endocitosis, pero no fue así (Tabla 3.7). Para el caso de TFR, utilizado como marcador de CME, su captura se vio disminuida en células J774A.1 tanto con CZ como con CQ, pero no se modificó con M β CD ni con Noc. En tanto, la captura de TFR por células Caco-2 disminuyó con los tratamientos de M β CD, CQ y Noc, pero no modificó su captura con CZ. El marcador de CvME, LacCer, sólo se vio afectado por Genis que provocó una menor tasa de captura en células J774A.1. Tanto M β CD como Noc no modificaron la internalización de este marcador de CvME y sorprendentemente la CitD provocó un considerable incremento en su captura. Por otro lado, en células Caco-2 tanto Genis, M β CD como CitD causaron la disminución de la captura del LacCer y no se observó ninguna modificación en la captura del mismo con Noc. Por último, el DEX, marcador de macropinocitosis y fagocitosis, disminuyó claramente su internalización con Cit D en ambas líneas celulares. Amil, como marcador de macropinocitosis, sólo disminuyó su captura en células Caco-2. Y Wort, otro marcador de macropinocitosis, no modificó la captura de DEX tanto en J774A.1 como Caco-2.

En esta misma línea, Vercauteren et al., demostraron que el efecto de CZ sobre la internalización de TFR fue dependiente de la línea celular utilizada. Sólo en una de las cinco líneas celulares testeadas se observó la disminución de la internalización esperada. Este tratamiento causó incluso un aumento en la captura del marcador de endocitosis independiente de clatrina LacCer. Dicho efecto se atribuyó al incremento de la internalización por otras vías, resultante de la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina causada por CZ (Vercauteren et al., 2010). De acuerdo a Ivanov et al durante el corto tiempo en que ocurrirían estos mecanismos de compensación, la molécula anfipática CZ podría afectar la fluidez de membrana de forma tal que se facilitara la endocitosis (Ivanov, 2008).

En base a lo expuesto podemos inferir que:

1. Para que la disminución de la captura de un marcador sea efectiva en presencia de un dado inhibidor deben coexistir dos fenómenos. El primero es que el inhibidor debe apagar la ruta de internalización utilizada por ese marcador y el segundo es que en esa línea celular no se active otra ruta de captura que compense la inhibición de la captura de ese marcador.
2. La activación de rutas alternativas puede ser responsable de la falta de inhibición completa o más aún, del aumento de la captura del marcador.
3. La ausencia de inhibición no necesariamente implica que la ruta involucrada no haya sido afectada, sino que puede deberse a la compensación producida por la estimulación de otras vías endocíticas.

Otro asunto importante a tener en cuenta es que el porcentaje de inhibición obtenido depende del tipo celular, el tiempo y las condiciones de incubación y la concentración del inhibidor utilizada. Por lo tanto, sería erróneo realizar una comparación cuantitativa de los resultados obtenidos. De este modo, la interpretación de los efectos de los inhibidores debe realizarse en forma cualitativa (Huth et al., 2006).

Como se muestra en la Fig. 3.4 (A), el tratamiento con CZ como con Genis sobre células J774A.1, lleva a una reducción significativa de la captura de ARQ lo que implica un posible rol de CME y CvME. Esto se corrobora con el uso de M β CD, inhibidor general de la endocitosis ya que inhibe tanto la CME como la CvME y hasta puede inhibir la macropinocitosis (O' Neill et al., 2011).

El tratamiento con Cit D resultó en una significativa caída en el nivel de captura de ARQ. Resultados similares fueron reportados por Tolson y Gurnani (Gurnani et al., 2004; Tolson et al., 1996). Esto indicaría que la fagocitosis o la macropinocitosis pueden estar involucradas en la captura de ARQ en células J774A.1 (Fig 3.4 (A)). El uso de Amil no mostró un descenso significativo en el porcentaje de captura de ARQ (Fig. 3.4 (A)), lo cual descartaría la macropinocitosis como posible mecanismo. Aunque esto último no pudo ser confirmado con el uso del inhibidor Wort que resultó muy tóxico para las células J774A.1. Por lo tanto, la concentración no tóxica utilizada probablemente no haya sido suficiente para producir la inhibición de este mecanismo (Fig. 3.4 (A)).

Para evaluar el tránsito intracelular en células J774A.1, se utilizaron como inhibidores CQ y Noc. La captura de ARQ fue reducida significativamente con el uso de CQ (Fig. 3.4 (A)), con lo cual la internalización estaría afectada a través del tráfico intracelular alterado debido al incremento del pH en endosomas y lisosomas, en concordancia con los resultados obtenidos por Gurnani et al en fagocitos (Gurnani et al., 2004). El tratamiento con Noc tuvo un gran impacto en la captura de ARQ (Fig. 3.4 (A)), indicando la participación de los microtúbulos en el tráfico intracelular de estas vesículas que afectarían su internalización en células J774A.1.

En definitiva, nuestros resultados probarían que, en células J774A.1 como modelo de macrófago, los mecanismos involucrados para la captura de ARQ serían la endocitosis mediada por clatrina y caveola y la fagocitosis. Es decir que los ARQ emplean múltiples vías para ingresar a la célula y fueron procesados por una vía degradativa. Esto fue confirmado por el hecho de que por 5 h los ARQ colocalizaron con Lysotracker®. Deberían realizarse futuros estudios para evaluar el escape del sistema endolisosomal descrito para ARQ preparados con otros LPT (Gurnani et al., 2004). Además, los LPT utilizados para la preparación de estos ARQ no poseen arquetidilserina en su composición pero son ávidamente capturados por las células J774A.1. De un modo alternativo se podría postular la manosa terminal de los arqueolípidos SDGD y SDGD-5PA que interactuarían con receptores de manosa presentes en APC para favorecer la fagocitosis (Lori et al., 2005).

Este simple panel experimental permite destacar dos propiedades de la interacción de los ARQ con fagocitos. Al marcar el compartimiento interno con un colorante piranínico fluorescente (HPTS) y la bicapa lipídica con RhPE, en principio, pudo determinarse que la tasa de captura de los ARQ en las células fagocíticas es mayor que la de liposomas convencionales preparados con fosfatidilcolina. En segundo lugar, se encontró que los ARQ pueden ingresar a la célula fagocítica por vías pinocíticas aparte de la fagocitosis. Estos hallazgos inesperados sugieren, en otras palabras, que los ARQ podrían ofrecer una entrega rápida y masiva de moléculas hidrofílicas a células fagocíticas. Esta conclusión cobra suma importancia en el campo de la terapéutica y liberación de fármacos para macrófagos, células clave involucradas en procesos vitales, tales como, el inicio y resolución de la inflamación, la remodelación de tejidos y la cicatrización.

En células Caco-2 no se puede asegurar que los ARQ no se internalizaron a través de CME porque la CZ tampoco inhibió la captura de TFR, marcador específico de esta vía (Fig. 3.4 (B)). Resultados contradictorios de la endocitosis mediada por clatrina son presentados por O'Neill et al para la captura de complejos de ciclodextrinas en células Caco-2 (O' Neill et al., 2011).

La CvME sería una ruta involucrada para la captura de ARQ en Caco-2 dado que el tratamiento con Genis muestra una disminución en la captura de los mismos (Fig. 3.4 (B)).

Aunque el tratamiento con Cit D no mostró una modificación de la captura de ARQ por células Caco-2, Amil disminuyó dicha captura. De modo que la macropinocitosis tendría un rol en la internalización de estas vesículas en células Caco-2. Sorpresivamente, no se pudo confirmar esta vía con el uso de Wort (Fig. 3.4 (B)) que tampoco inhibió la captura de DEX, a pesar de utilizarse a la concentración (50 nM) que fue efectiva para células Caco-2 en bibliografía (O' Neill et al., 2011).

A partir de lo expuesto, en células Caco-2 como modelo de células intestinales, los ARQ ingresarían a través de CvME y macropinocitosis, no pudiendo descartar la CME.

Pocos son los trabajos que estudiaron la internalización de vesículas lipídicas en Caco-2. Liposomas preparados con HSPC/colesterol mostraron una discreta captura en esta línea

celular respecto a la mayor internalización de liposomas recubiertos con quitosano (Hermida et al., 2011). A través del uso de inhibidores se observó una fuerte relación entre el tamaño de partícula y el mecanismo de captura de liposomas PEGilados altamente monodispersos preparados por flujo hidrodinámico microfluídico focalizado (en inglés, *microfluidic hydrodynamic flow focusing*). Los de mayor tamaño ingresaban a la célula preferentemente a través de CME y los de menor diámetro (≈ 40 nm) por vías dependientes de dinamina, mientras que los de tamaño medio (≈ 70 nm) lo hacían a través de todas las vías investigadas (Andar et al., 2014). De un modo particular, un trabajo reciente mostró la internalización de ARQ preparados con LPT de arqueobacterias *Aeropyrum pernix* por células Caco-2 por medio de MCLB pero los mecanismos de captura todavía deben ser investigados (Napotnik et al., 2013).

El hecho de obtener un coeficiente de Pearson que permaneció en valores levemente superiores a 0,5 podría indicar una preferencia en el tráfico intracelular por las vías no degradativas. Sin embargo, sería necesario profundizar el estudio de colocalización con otros marcadores.

Como los efectos inhibitorios son altamente dependientes de la línea celular es importante aplicar estas técnicas en varios tipos celulares (Vercauteren et al., 2010).

Finalmente, aunque la interpretación de los resultados no es un tema trivial y exige un abordaje integral, las técnicas usadas en este estudio son herramientas que pueden esclarecer los complejos mecanismos de captura celular de nanomedicinas de una manera simple y moderna respecto a otras técnicas más laboriosas como el uso de mutantes o la inmunofluorescencia.

Capítulo 4

Modelo *in vitro* de barrera epitelial mucosa. Administración oral de ARQUEOSOMAS

*Debes amar el tiempo de los intentos Debes
amar la hora que nunca brilla Y si no, no
pretendas tocar lo cierto*

(Sólo el amor, Silvio Rodríguez)

En el Capítulo 4 se comparó la capacidad de unión a células M de los ARQ preparados exclusivamente con arqueoles aislados de *H. tebenquichense*, respecto a liposomas de fosfatidilcolina de soja/colesterol, mediante un modelo *in vitro* de barrera epitelial mucosa utilizando dispositivos Transwell®. La fluorescencia, luego de 1 y 2 horas de incubación con ARQ marcados en el interior acuoso con un colorante piranínico fluorescente (HPTS) y la bicapa lipídica con RhPE, fue 4 veces mayor que la observada con liposomas marcados del mismo modo. Además, con muestras de ARQ, el 15% de RhPE y 13% de HPTS se encontraron en el compartimiento basolateral de los Transwell®, espacio equivalente al bolsillo basolateral de las células M. Por el contrario, no se detectó fluorescencia con los liposomas. Estos hallazgos revelarían una mayor velocidad de transcitosis de los ARQ comparado con los liposomas. También se determinó la biodistribución del radiofármaco hidrosoluble ^{99m}Tc-DTPA incorporado en ARQ versus liposomas después de la administración oral en ratas Wistar. Luego de 4 horas, los ARQ fueron los responsables del 22,3 % (3,5 veces mayor que los liposomas) del ^{99m}Tc-DTPA, hallado en circulación. Esta importante cantidad de marcador radiactivo en sangre podría ser consecuencia de la gran captura de los ARQ por las células M *in vivo*, probablemente favorecida por las características hidrofóbicas de estas vesículas. En suma, estos resultados sugerirían que los ARQ, con una capacidad adyuvante probada por vía parenteral y biocompatibilidad demostrada, podría ser un adecuado material nanoparticulado para utilizarse como adyuvante por la ruta oral.

Introducción

En la última década, la intervención de la Nanotecnología en el campo de la Inmunología ha dado nuevas posibilidades a materiales nanoparticulados innovadores capaces de inducir adyuvancia Ag específica, particularmente a través de vías no parenterales (Csaba et al., 2009; Garinot et al., 2007; Kumari et al., 2010; Peek et al., 2008; Slütter et al., 2009). Hasta el momento es bien conocido que la vía oral es la ruta de administración más amigable, tanto para pacientes como para personal de la salud. Ahora

bien, por esta ruta sólo se puede obtener una respuesta inmune protectora y de memoria satisfactoria mediante microorganismos atenuados (Harandi et al., 2010; Holmgren y Czerkinsky, 2005). Entre ellas, podemos mencionar la vacuna a virus atenuado de la polio, vacuna Sabin, y las recientes contra rotavirus, Rota Teq® (Merck) y Rotarix® (GlaxoSmithKline) que generan inmunidad por esta ruta debido a su capacidad de proteger al Ag y hacer blanco en las células efectoras. Las vacunas a microorganismos muertos, como la vacuna contra el cólera, compuesta por una mezcla de bacterias muertas y toxina colérica B purificada, tienen una eficiencia limitada (Brayden, 2001).

La importancia de contar con vacunas por vía mucosa radica especialmente en que generan reacciones no sólo a nivel local sino también sistémico, con adecuadas respuestas celulares y de memoria. Pero es muy difícil conseguir respuestas protectoras a través de esta vía.

La generación de respuesta inmune de tipo IgA secretora (sIgA) en el sitio de inoculación luego de la inmunización oral con material particulado inerte, permanece como un desafío, sobre todo en países en vías de desarrollo (Chadwick et al., 2010; Salamanca-Buentello et al., 2005).

En el Capítulo 1 se describió la inmunidad asociada a mucosa y en particular se profundizaron conceptos acerca de la organización del GALT, el cual se compone de una serie de sitios necesarios para la captura, procesamiento y presentación de Ag para la inducción de la respuesta inmune de mucosas conocidos como sitios inductivos (Gebert et al., 1996; Makala et al., 2002; Owen y Jones, 1974).

En el intestino de los mamíferos el gran sitio inductivo está constituido por las placas de Peyer (PP). En humanos, las PP son agregados linfoides macroscópicos que pueden ser observados a ojo desnudo en la cara serosa del intestino delgado, siendo el íleon el sector con la mayor densidad encontrada. Estas zonas del epitelio intestinal, carente de vellosidades, fueron descritas por primera vez en el siglo XVII por el anatomista Hans Peyer, que observó engrosamientos en el epitelio del íleon, de unos pocos centímetros de longitud. Desde ese entonces se conocieron con el nombre de placas de Peyer (Brandtzaeg, 2007; Corthesy, 2007; Peyer, 1677).

Las PP contienen una región subepitelial en forma de domo y subyacentes, se encuentran los folículos linfoides que contienen linfocitos B *naïve* o vírgenes, linfocitos B activados y regiones interfoliculares ricas en linfocitos T (Fig. 4.1). La superficie del domo está cubierta por un epitelio asociado a folículo (FAE, del inglés *follicle-associated epithelium*) donde se encuentran las células M (del inglés *microfold*) especializadas en capturar Ag particulados para transportarlo desde el lumen del intestino al domo subepitelial poblado además, de células dendríticas mieloides inmaduras que son células presentadoras de Ag (APC, del inglés *antigen presenting cells*) (Kraehenbuhl y Neutra, 2000). Las células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*) epiteliales maduras también contribuyen en forma directa con el transporte para o transcelular del material particulado desde el lumen

(Rescigno et al., 2001).

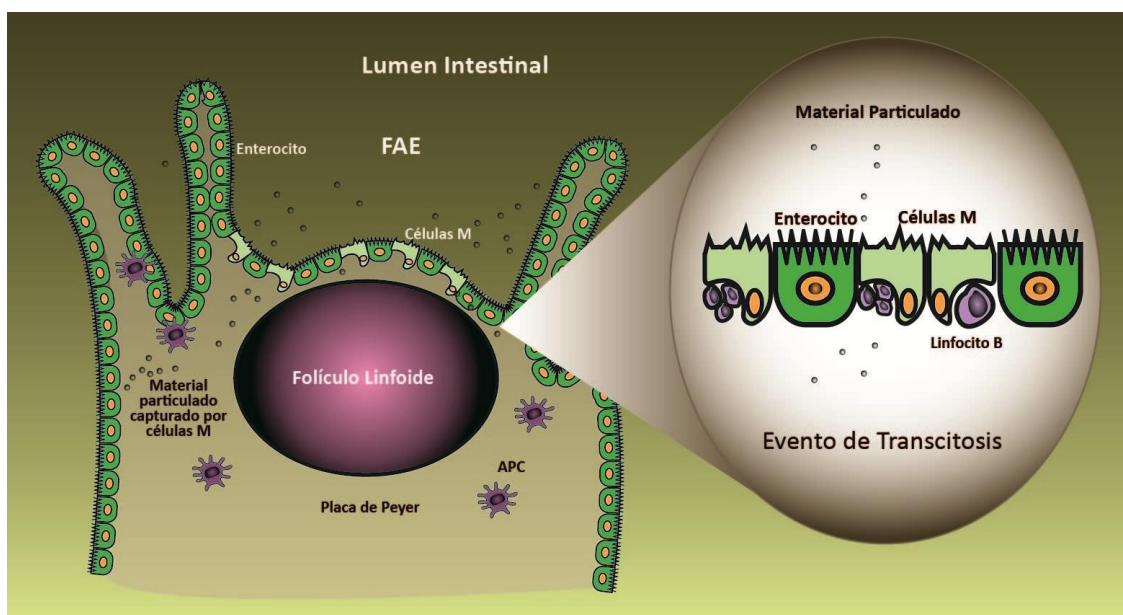


Fig. 4.1 Esquema simplificado del epitelio intestinal asociado a folículo

El tracto gastrointestinal se presenta como un ambiente sumamente hostil, con sectorización de zonas de pH extremo, desde pH 1-2 en el estómago hasta pH 9-10 en el colon, con actividad enzimática altamente degradativa y capacidad liposoluble. De este modo, no es fácil que un Ag desnudo llegue al sitio de inducción intacto y sea procesado por las células especializadas del GALT. Como ocurre con los microorganismos patógenos, la unión y subsiguiente transcitosis del material particulado a través de las células M para así alcanzar intacto el bolsillo basolateral donde pueda ser capturado por las APC localizadas en el folículo, son etapas clave para evocar una respuesta inmune efectiva por la vía oral (Brayden et al., 2005; Gebert et al., 2004; Neutra y Kraehenbuhl, 2005). Por lo tanto, las características estructurales del material particulado que lleven a aumentar la tasa de captura de las células M, presentes en muy baja densidad en el intestino, podrían contribuir a mejorar la respuesta inmune potencial luego de la administración oral (des Rieux et al., 2006). Si bien se desconocen marcadores específicos de células M humanas activadas por el material particulado, se demostró la sobreexpresión de β 1 integrinas en la superficie apical de células M humanas (Garinot et al., 2007; Gullberg et al., 2000). El uso de ligandos peptídicos y no peptídicos permitiría dirigir el material particulado hacia dichas células. Por ejemplo, nanopartículas de poli-láctico-co-glicólico (PLGA) con ligandos peptídicos (Arg-Gly-Asp), que contenían ovoalbúmina (OVA) mostraron efectividad de captura por células M en un modelo *in vitro* como también adecuada respuesta inmune luego de la administración duodenal en ratones (Fievez et al., 2009). Sin embargo, también es posible favorecer la unión inespecífica a células M por la presencia de cargas positivas y superficies hidrofóbicas (Jepson et al., 1993).

Desafortunadamente, varios estudios clínicos que usaron material particulado dirigido a células M resultaron poco reproducibles (Katz et al., 2003; Tacket et al., 1994). Varias razones contribuyeron a disminuir las expectativas actuales para el uso de material particulado como adyuvante oral. Entre otras, la captura por parte de los enterocitos o las células M de las PP es tamaño dependiente, mayor para las partículas de menor tamaño, un hecho que limita la cantidad de Ag incorporado (Brayden et al., 2005; Florence, 1997). También el tamaño influye sobre el tipo de respuesta inmune. Las grandes partículas quedarían retenidas en el tejido linfoide de las PP para generar respuestas locales acotadas a mucosas. En cambio, las partículas pequeñas (por debajo de los 100 nm de diámetro) serían capaces de desplazarse por las vías linfáticas hasta ganglios cercanos provocando así, una respuesta sistémica (Ermak y Giannasca, 1998).

Los liposomas convencionales son pobremente absorbidos, en el orden del 2% del total de la dosis, mientras que los liposomas polimerizados son absorbidos por encima del 6% (Okada et al., 1995). En este contexto, cobra relevancia contar con nuevos materiales con características estructurales a medida que permitan una dirección pasiva para que sean capturados por células M.

Como se describió en los Capítulos 1 y 2, los arqueosomas (ARQ) son vesículas compuestas por lípidos polares totales (LPT) extraídos de microorganismos que pertenecen al dominio de vida *Archaea*, los cuales crecen en ambientes extremos (Fujiwara, 2002). El core de la estructura de los lípidos polares de las arqueobacterias consta de un arqueol o lípido diéter (2,3-di-*O*-difitanil-*sn*-glicerol) el cual contiene 20 carbonos por cadena isoprenoide, o de un caldarqueol o lípidos tetraéter (2,2'-3,3'- tetra-*O*-difitanil-*sn*-diglicerol) que contiene 40 carbonos por cadena isoprenoide, y los derivados de esta estructura (Kates, 1978; 1992; Sprott, 1992). Los diferentes hábitats de las arqueobacterias (termófilas extremas, halófilas extremas, sulfoacidófilas, metanógenas (anaeróbicas) y psicrófilas) definirán la principal composición de sus LPT (Kamekura y Kates, 1999). De un modo particular, los lípidos polares totales de la especie *H. tebenquichense* utilizados en este trabajo fueron: PG, PGP-Me, S-DGD-5, SDGD-5-PA y BPG. Su aislamiento y caracterización fueron detallados en la Sección 2.9. Las características fisicoquímicas de los ARQ hacen que estas vesículas puedan ser postuladas como candidatos para generar una respuesta inmune adecuada luego de su administración vía oral.

En el Capítulo 3 se demostró que los ARQ fueron capturados por macrófagos y células del epitelio intestinal en experimentos *in vitro*. Pero además, es necesario conocer si los ARQ atraviesan las células, en particular las células M. Una vez efectuada la captura se inicia el proceso de transcitosis (Fig. 4.1), las células M internalizan los antígenos luminales y los transportan a través del citoplasma hacia la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular. El estudio de la transcitosis a través de las células M y sus propiedades se ha realizado a través de co-cultivos como modelo *in vitro* de células M.

El modelo *in vitro* de células M (des Rieux et al., 2006; Liang et al., 2001) podría utilizarse:

- para el estudio sistemático del transporte macromolecular y de partículas a través del tracto gastrointestinal
- para establecer una correlación confiable *in vitro-in vivo* de la captura de macromoléculas y de partículas por el tejido linfoide asociado a mucosa intestinal.
- para el análisis de la relación estructura/interacción de las macromoléculas y partículas con las células M.
- como dispositivo de clasificación de Ag o sustancias que evocan o suprimen ciertas respuestas inmunes *in vitro*

La conversión fenotípica de un cultivo de enterocitos maduros en células símil-M (en inglés, *M-cell-like*), se basa en evidencias que sugieren que los linfocitos B maduros estarían involucrados en la ontogenia de células M *in vivo* (Niedergang y Kraehenbuhl, 2000).

Para los estudios del transporte transcelular se han utilizado dispositivos que constan de un soporte que contiene un filtro con un tamaño de poro determinado que se coloca sobre un pocillo de una placa de policarbonato (Transwell®). De esta manera se compartimentaliza la siembra de las células y se permite el estudio del pasaje de sustancias en células polarizadas.

Las células Caco-2 son consideradas un modelo de epitelio intestinal. Esta línea celular fue establecida en 1977 por Fogh y colaboradores a partir de un adenocarcinoma de colon humano. En cultivo, estas células crecen adheridas al sustrato y forman una monocapa. Si se cultivan sobre un soporte semipermeable microporoso, una vez que alcanzan la confluencia, se diferencian adquiriendo características morfológicas y funcionales compatibles con enterocitos maduros. Así, las células se polarizan desarrollando un borde en cepillo en la cara apical y uniones estrechas intercelulares. Y además, la diferenciación se caracteriza por el aumento de enzimas asociadas a la membrana del borde en cepillo, entre ellas, la fosfatasa alcalina (FAL).

Existen tres configuraciones descriptas de células Caco-2 y linfocitos para el desarrollo de modelos *in vitro* de células símil M.

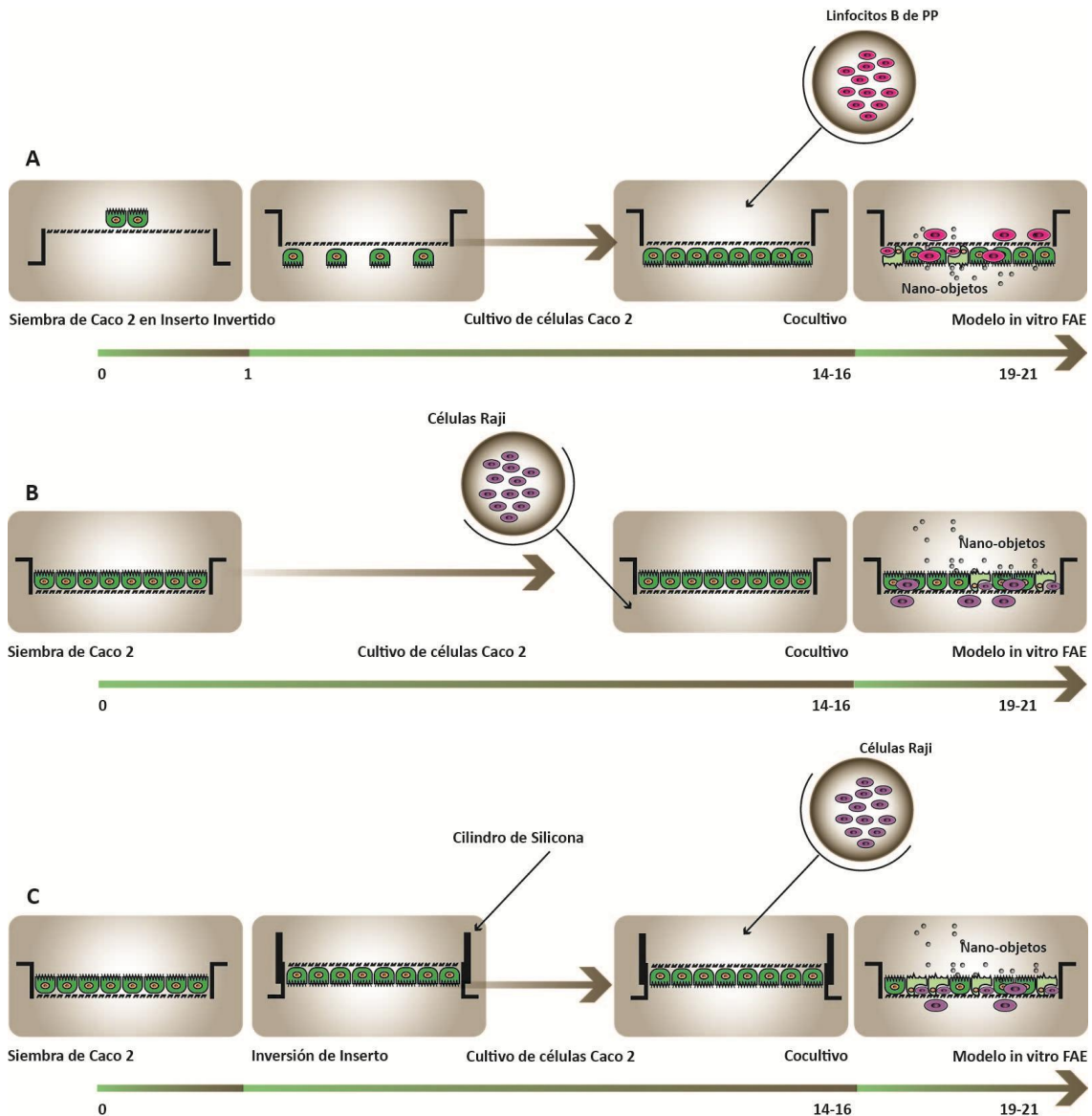


Fig. 4.2 Protocolo de desarrollo de modelo FAE
(A) Modelo de Kernéis (B) Modelo de Gullberg (C) Modelo de des Rieux.

Por un lado, el modelo de Kernéis que utiliza el pocillo invertido (Kerneis et al., 2000). En este modelo, las células Caco-2 se cultivan sobre el lado externo (Fig. 4.2 A) de filtros semipermeables Transwell® durante 21-28 días para permitir la diferenciación a enterocitos maduros. Luego se exponen a linfocitos B derivados de PP que se colocan dentro de los soportes semipermeables, de modo que las células B se intercalen en la monocapa. Luego de 3-7 días el borde en cepillo de las células parece perder las microvellosidades y se reduce la expresión de las enzimas isomaltasa sacarosa, vilina y fundamentalmente FAL, consistente con la transformación a células M. A pesar de esta discrepancia existe suficiente evidencia que sostiene la conversión de la monocapa Caco-2 al fenotipo M en los tres modelos. Esta transformación se caracteriza en la práctica por la diferencia en: las enzimas y moléculas asociadas a la membrana; la morfología apical de las células y el pasaje de partículas.

El modelo de Gullberg sortea el problema de trabajar con linfocitos aislados de PP de ratón (Gullberg et al., 2000) y los inconvenientes de utilizar un cultivo primario. En este modelo, las células Caco-2 se co-cultivan con linfocitos Raji B humanos sobre Transwell® orientados normalmente (Fig 4.2 B). Existen trabajos en los que se describe, para este sistema, la infiltración de los linfocitos en la monocapa a través del filtro, tomando contacto directo con las células Caco-2 (Fig. 4.3) (Niedergang y Kraehenbuhl, 2000).

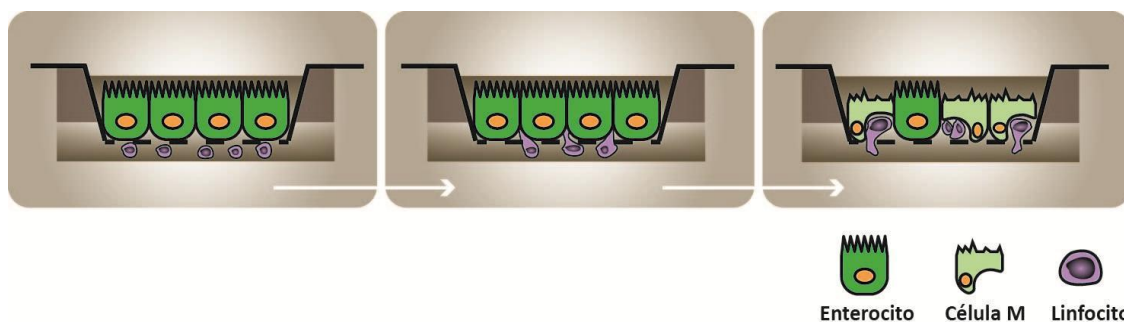


Fig. 4.3 Esquema del co-cultivo Caco-2/Raji Transformación a células simil-M (modelo de Gullberg).

La línea celular Raji fue establecida por Pulvertaft en 1963 a partir de un linfoma de Burkitt humano. Las células son linfocitos B con morfología linfoblatoide y crecen en suspensión.

Y por último, el modelo mejorado descrito por des Rieux (des Rieux et al., 2007), donde también se usan los pocillos invertidos (Fig. 4.2 C). Allí se postula que no sería imprescindible un contacto estrecho para obtener un modelo funcional de epitelio mucoso. Pero se necesitaría un contacto directo entre las células Caco-2 y la células Raji, como también una concentración adecuada de células Raji, para inducir un modelo *in vitro* más funcional y reproducible. En la Tabla 4.1 se resumen las características de enterocitos maduros y células simil-M.

Tabla 4.1 Comparación entre enterocitos maduros y células simil-M en co-cultivos.

	Enterocitos	Simil-M
Actividad de FAL	↑↑↑	↓↓↓
β1integrina	↓	↑
Borde en cepillo	↑↑↑	↓↓↓
Transporte de partículas	NO	SÍ

↑elevado ↓reducido

La conversión a células simil-M por agregado de linfocitos no comprometería la integridad de la monocapa (Liang et al., 2001). Por lo cual, el pasaje de partículas al compartimiento basal está relacionado a la mayor transcitosis. Una vez diferenciadas los enterocitos a células simil-M se incuban los co-cultivos con las nanopartículas para cuantificar su captura.

El objetivo de este trabajo fue estimar la unión y transcitosis de los ARQ y liposomas en fase gel, utilizando un modelo *in vitro* de células simil-M (co-cultivos Caco-2/Raji). Por otro

lado, se evaluó la degradación de proteínas de homogenato de *Trypanosoma cruzi* incorporadas a ARQ y la resistencia química de los arqueolípidos en medios gastrointestinales. Además, se determinó la biodistribución del radiofármaco hidrosoluble ^{99m}Tc-DTPA incorporado a ARQ y liposomas luego de la administración oral en ratas.

Materiales

La fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC, del inglés *hydrogenated soy phosphatidylcholine*) se obtuvo de Northern Lipids (Vancouver, Canada).

El colesterol, N,N-dimetilformamida; la pepsina; el extracto biliar porcino; la pancreatina de páncreas porcino; el formaldehído; el Tritón X-100; el fosfato de naftol AS-MX; la sal de Fast Red TR y el bromuro de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) fueron provistos por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

La Lissamine™ Rodamina B 1,2-Dihexadecanoil-*sn*-glicero-3- fosfoetanolamina, sal trietilamónica (RhPE) se compró a Life Technologies Invitrogen (Buenos Aires, Argentina).

El fluoróforo como sal trisódica del ácido 8-Hidroxipyreno-1,3,6-trisulfónico (HPTS) fue de Molecular Probes (Eugene, OR, EUA).

La acrilamida, la *bis*-acrilamida y la glicina fueron de ICN Biomedicals (Irvine, CA, EUA). Los medios de cultivo celular, Eagle modificado con aminoácidos no esenciales (MEM-NEEA) y RPMI 1640, fueron adquiridos en Life Technologies Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EUA).

El suero fetal bovino inactivado (SFB); la glutamina (200 mM); la solución antibiótico-antimicótico (10.000 U/ml penicilina G sódica, 10.000 mg/ml de sulfato de estreptomina y 25 mg/ml de anfotericina B como Fungizone); el piruvato y la tripsina/ácido trietilendiaminotetracético (EDTA) fueron provistos por PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria).

El homogenato de proteínas de *Trypanosoma cruzi* fue gentilmente provisto por la Dra. Patricia Petray del Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina.

Las células Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano) fueron gentilmente provistas por el Dr. Osvaldo Zabal (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Buenos Aires, Argentina), y las células Raji (linfocitos B de linfoma humano de Burkitt) fueron obtenidas de la Colección de Cultivo Celular de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC).

Todos los otros químicos y reactivos de grado analítico utilizados fueron de Anedra (Buenos Aires, Argentina).

Métodos

4.1 Crecimiento de arqueobacterias y aislamiento de LPT

Las arqueobacterias de la especie *Halorubrum tebenquichense* fueron aisladas de muestras de suelo de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina) como fue descrito en la Sección 2.1 (Gonzalez et al., 2009).

La extracción de LPT se realizó a partir de inóculos de arqueobacterias por el método de Bligh y Dyer modificado para halófilas extremas según se describió en la Sección 2.2.1. Los fosfolípidos (PL) de los LPT se cuantificaron por el método de Böttcher (Böttcher et al., 1961), según Sección 2.2.2. Cada lote de LPT se caracterizó por TLC-1D y los lípidos fueron revelados con solución etanólica de ácido sulfúrico, según la Sección 2.2.3. Sólo se utilizaron los lotes con contenido de fosfolípidos mayor a 90% p/p y perfil característico de TLC-1D, según Sección 2.9.2.

4.2 Preparación de ARQ y caracterización fisicoquímica

Los arqueosomas con doble marca fluorescente, HPTS y RhPE (ARQ-HPTS&Rh-PE) se prepararon de acuerdo al método clásico de hidratación de la película delgada. Brevemente, una solución de 20 mg de LPT en cloroformo/metanol (1:1 v/v) se mezclaron con 5×10^{-5} mol de Rh-PE en cloroformo, e inmediatamente se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a 40°C, 200 rpm, 100 mbares, hasta eliminar el solvente orgánico. Las trazas de solventes remanentes se eliminaron con una corriente suave de nitrógeno. Posteriormente, la delgada película lipídica obtenida se hidrató con 1 ml de HPTS (35 mM) en buffer Tris 10 mM, NaCl 0.9% p/v, pH 7,5 (buffer Tris/NaCl), con agitación mecánica con buzo magnético y perlas de vidrio (700 rpm) en baño de 40°C durante 1 h. La suspensión resultante se sonicó durante 20 minutos en sonicador de baño a potencia ultrasónica de 80 W y frecuencia de 40 KHz. Inmediatamente, se sometió a 5 ciclos de congelamiento (-80°C)/descongelamiento (37°C). Las sondas fluorescentes no incorporadas se eliminaron por centrifugación seguida de 3 lavados con buffer Tris/NaCl (10.000 x g/20 minutos/t.a.). Del mismo modo se prepararon liposomas (L-HPTS&RhPE) de HSPC/colesterol (1:1 mol/mol).

La concentración de fosfolípidos de las vesículas marcadas, tanto ARQ como L, se determinó a través de un microensayo colorimétrico de cuantificación de fosfatos (Böttcher et al., 1961). La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro PTI, Timemaster C-70, usando λ_{exc} 550 nm - λ_{em} 590 nm para rodamina, y λ_{exc} 413 nm - λ_{em} 510 nm para HPTS. El diámetro promedio fue determinado por DLS en un analizador de tamaño de partícula 90 Plus Particle (Brookhaven Instruments). El potencial Z se determinó por PALS, utilizando un Zetasizer4 (Malvern, Reino Unido) a 25°C en buffer Tris/NaCl.

4.3 Citotoxicidad

La viabilidad celular de las células Caco-2, luego de la incubación con ARQ y L, se midió a través de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial empleando una sal de tetrazolium (MTT). Las células Caco-2 se sembraron con una densidad de 4×10^4 células/pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano y se dejaron crecer durante 24 h. El medio de cultivo de la capa celular confluyente se reemplazó por 100 μ l de medio con 10; 100; 500 o 1000 μ g/ml de lípidos. Luego de 24 h a 37°C, se retiró el medio y se reemplazó por medio RPMI fresco con 0,5 mg/ml de MTT. Luego de 3 h de incubación se removió la solución de MTT, se disolvieron los cristales insolubles de formazán en DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas.

4.4 Preparación de co-cultivos Caco-2/Raji

Las células Caco-2 se mantuvieron en MEM-NEAA suplementado con 10 % SFB, 1 mM de glutamina, 1% antibiótico-antimicótico y 1% de piruvato, en una estufa de incubación (Heraeus Hera Cell incubator) a 37°C bajo atmósfera al 5% CO₂ y 95% de humedad. El medio se cambió cada 2 o 3 días y las células fueron subcultivadas cuando alcanzaban una confluencia de 80-90 %, usando tripsina.

Las células Raji se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB, 1 mM de glutamina, 1% antibiótico-antimicótico en las mismas condiciones de incubación que las células Caco-2. Las células fueron subcultivadas dos veces por semana con una dilución 1/10, luego de concentrar las células por centrifugación.

Las células Caco-2/Raji se co-cultivaron siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (Gullberg et al., 2000). Brevemente, las células Caco-2 se sembraron con una densidad de 3×10^5 células/inserto de poliéster de placas de 24 pocillos (3 μ m poro, ThinCert™, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). El medio de cultivo se renovó cada 2-3 días tanto en el compartimiento apical como en el basolateral. Las células crecieron durante 14-16 días hasta alcanzar 100% de confluencia.

Luego, se sembraron las células Raji en el compartimiento basolateral con una densidad de 3×10^5 células/pocillo. El co-cultivo se mantuvo durante 4-5 días más (Fig. 4.2 B). El medio del compartimiento superior se cambió día por medio. Como control se utilizaron células Caco-2 cultivadas como se describió más arriba sin la presencia de células Raji.

La integridad de la monocapa se evaluó a través de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, del inglés *transepithelial electrical resistance*) usando un sistema de resistencia eléctrica Millicell (Millipore Corp., Bedford, MA) conectado a un par de electrodos.

A su vez, la integridad de la monocapa se evaluó también por exclusión de rojo fenol el día previo al agregado de las células Raji (Maznah, 1999). En pocas palabras, se descartó el medio de cultivo de ambos compartimientos; las células se lavaron 3 veces con buffer HBSS, luego se agregaron 600 μ l de buffer HBSS con rojo fenol (42 μ M) al compartimiento superior y 700 μ l de buffer HBSS libre de rojo fenol al compartimiento inferior. Las placas se incubaron

durante 2 h a 37°C para permitir la difusión del rojo fenol. Cumplido dicho tiempo, se tomaron alícuotas del compartimiento superior e inferior, se ajustó el pH a 11 con NaOH 1M y se midió la absorbancia a 588 nm. El porcentaje de difusión fue calculado tomando como control de 100% de difusión un inserto sin células.

Para demostrar la diferenciación de células Caco-2 a células simil-M se evaluó la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, 1 o 2 controles por placa (Tabla 4.1). Resumiendo, se descartó el medio de cultivo de ambos compartimientos y las células se lavaron 3 veces con PBS. Las células se fijaron con 1 % de formaldehído y se incubaron con Tritón X-100 0,2% p/v durante 15 segundos. Luego, las células se lavaron y se incubaron 15 minutos con reactivo (5 mg de fosfato de naftol AS-MX, 250 µl de N,N dimetilformamida y 10 mg de Fast Red en 10 ml de buffer Tris 0,1 M, pH 8,9). Las membranas de los insertos se cortaron y se montaron con medio de montaje. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Alphaphot 2 YS2. El área total de los insertos se dividió en cuatro zonas y se tomó una microfotografía de cada una, usando un objetivo de 4x. La intensidad de fluorescencia se cuantificó con el software ImagePro Plus.

4.5 Estudios de unión y transporte de ARQ y L *in vitro*

El medio del compartimiento superior de las células Caco-2 y el co-cultivo Caco-2/Raji se reemplazó por 150 µl de medio fresco con ARQ-HPTS&RhPE o L- HPTS&RhPE (50 µg de lípidos). Las células se incubaron por 1 y 2 h a 37°C, y luego el medio de los compartimientos apical y basal se quitó y almacenó para medir fluorescencia. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 1% de formaldehído. Las membranas de los insertos se cortaron y se montaron con medio de montaje. Las muestras se estudiaron por microscopía confocal láser de barrido (MCLB) a través de un microscopio de fluorescencia Olympus FV300 equipado con un láser de Ar (488 nm para la excitación de HPTS) y un láser de He-Ne (544 nm para la excitación de RhPE).

4.6 Estudio de digestión *in vitro* de homogenato de *T. cruzi* incorporado a ARQ y L

El homogenato de Tc se incorporó tanto a ARQ como L (ARQ-Tc y L-Tc, respectivamente). Resumiendo, se prepararon películas de lípidos que se hidrataron con 3 mg/ml de proteínas de *T. cruzi* en buffer PBS. Luego de sonicar y someter a ciclos de congelación/descongelación las proteínas no incorporadas fueron descartadas por centrifugación. Los ARQ-Tc y L-Tc resultantes se lavaron con PBS (3 veces a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C). El contenido de proteínas se midió por el método de Bradford (Bradford, 1976).

El ensayo de digestión *in vitro* se aplicó sobre las muestras de ARQ-Tc y L-Tc, según los métodos descriptos con modificaciones (Jovani et al., 2001; Patel et al., 2000).

Brevemente, 500 µl de las muestras (ARQ-Tc y L-Tc, 0,5 mg de proteínas) se incubaron con 2 ml de pepsina (1,5 mg/ml en buffer Tris pH 2) durante 30 minutos a 37°C. Luego, se incrementó el pH de las mezclas hasta 6,5 con el agregado de bicarbonato de sodio (1M) y 100 µl de extracto biliar y solución de pancreatina (60 y 9 mg/ml, respectivamente) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se incrementó el pH hasta 7,4 con bicarbonato de sodio (1M) y se centrifugaron las muestras (10.000 x g; 30 minutos, 4°C). Las proteínas de los pellets obtenidos se recuperaron y analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) y las proteínas se revelaron con tinción de plata (Wessel y Flugge, 1984).

4.7 Evaluación de la resistencia química de los arqueolípidos a fluidos gastrointestinales simulados

Tanto el fluido gástrico simulado (FGS) como el fluido intestinal simulado (FIS) se prepararon según la USP (USP, 2011). El FGS consistió en una solución de ácido clorhídrico (pH 1,2) y pepsina (3,2 mg/ml). El FIS estuvo compuesto de pancreatina (10 mg/ml) a un pH de 6,8. La resistencia de los arqueolípidos durante la incubación con los diferentes fluidos gastrointestinales a 37°C se evaluó por ESI-MS. ARQ preparados en agua MiliQ según el método de hidratación de la película delgada, se mezclaron con los fluidos, precalentados a 37°C, en una dilución 1/10 y se incubaron con agitación en un equipo rotatorio a 100 rpm (Alycar). A los tiempos preestablecidos (1h; 2h y 4h) las diferentes muestras se almacenaron a 4°C. Una vez frías, las muestras se centrifugaron (40.000 x g ; 30min; 4°C), se separó el pellet (P) y el sobrenadante (SN). El P se resuspendió en un volumen pequeño de cloroformo/metanol (1:1). Tanto P como SN se analizaron por ESI-MS. Los espectros se obtuvieron con un Thermo Finnigan LCQ Ion Max equipado con una fuente de ionización por electrospray. Las muestras fueron continuamente introducidas en el espectrómetro a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Las condiciones de interfase fueron: gas nebulizador (aire) 12 l/min, gas de cono (nitrógeno), voltaje de la aguja 1,2 l/min, -5.0 kV (iones negativos) y rango de masa 50-2000 uma. Como referencia, se tomaron los arqueolípidos originales.

4.8 Radiomarcación de vesículas

Las muestras de ARQ marcadas con radioisótopos (ARQ-99mTc-DTPA) se prepararon con el protocolo que se describe a continuación. Primero, el 99mTc-pertecnetato de sodio (Na99mTcO4) se eluyó del generador a partir de Molibdeno-Tecnecio. (Tecnonuclear, Buenos Aires, Argentina) con solución fisiológica, y se complejó con ácido dietilentriamino pentacético (DTPA) usando un kit para 99mTc-DTPA, con 5 mg de DTPA y 0,25 mg de cloruro estañoso. Luego, se hidrató una delgada película de arqueolípidos con 11-12 mCi de 99mTc-DTPA con agitación mecánica y posterior sonicación. El 99mTc- DTPA no

incorporado se separó por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-25 PD-10 (GE Healthcare). La actividad de las fracciones se midió por contador de centelleo sólido. (Packard). Los liposomas de HSPC/colesterol (1:1 mol/mol) se marcaron de la misma manera (L-^{99m}Tc-DTPA).

La pureza radioquímica y la eficiencia de marcado se determinó por cromatografía en capa delgada (TLC) en placas de 2x20 cm, por medio de tres análisis diferentes:

- 1) iTLC-SG usando NaCl 0,9% como solvente, con lo cual el L/ARQ-^{99m}Tc-DTPA y el ^{99m}Tc reducido/hidrolizado permanecen en el punto de siembra, el ^{99m}Tc-DTPA libre migra con el frente de corrida.
- 2) iTLC-SG usando piridina:ácido acético:agua (3:5:1,5 v/v) como solvente, L/ARQ-^{99m}Tc-DTPA y ^{99m}Tc-DTPA libre migra con el frente de corrida, mientras que el ^{99m}Tc reducido/hidrolizado permanece en el punto de siembra.
- 3) Whatman N°1 usando metiletilcetona (MEK) como solvente, L/ARQ-^{99m}Tc-DTPA y ^{99m}Tc reducido/hidrolizado permanece en el punto de siembra, mientras que el ^{99m}Tc-DTPA libre tiene un Rf de 0,1.

4.9 Administración oral y biodistribución

Ratas Wistar con 24 horas de ayuno (180-250 g de peso corporal) recibieron 500 µl de una única dosis de ARQ-^{99m}Tc-DTPA ó L-^{99m}Tc-DTPA o ^{99m}Tc-DTPA libre a través de una cánula por vía oral. Los animales se mantuvieron en cajas metabólicas separadas para la colección de muestras urinarias. Transcurridas 4 h de la administración, se tomaron muestras de sangre de los animales, se sacrificaron y se separaron los órganos. Los mismos se lavaron y se pesaron. La actividad radiactiva de los órganos se midió con un contador de centelleo sólido.

4.10 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test *t* de Student para evaluar la diferencia significativa entre los valores medios de los parámetros estudiados.

Resultados

4.11 Caracterización estructural de ARQ y de L

El tamaño de partícula (diámetro medio y Pdl) y potencial Z (Pot Z) de las vesículas se muestran en la Tabla 4.2. Allí puede observarse que no existe diferencia significativa de los diámetros medio y PI entre ARQ y L. Por el contrario, los ARQ son francamente negativos, lo que les otorga una elevada estabilidad en suspensión.

Tabla 4.2 Tamaño de partícula y potencial Z.

Muestra	Diámetro medio (n ^o)	PdI	Pot Z (mV)
ARQ	570	0,40	- 49
L	530	0,36	- 11

PI índice de polidispersión; n=3

4.12 Citotoxicidad en células Caco-2

Ni los ARQ ni los L redujeron significativamente la viabilidad de las células Caco-2 hasta una concentración de 1 mg/ml, transcurridas 24 h de incubación (Fig. 4.4).

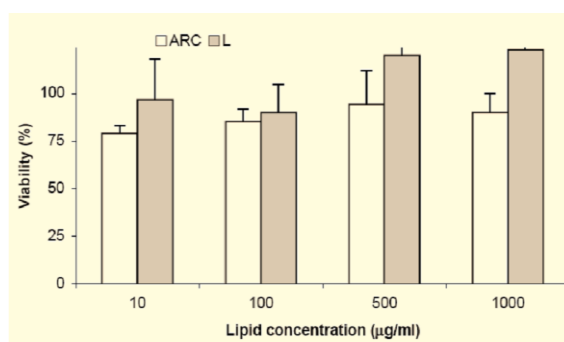


Fig. 4.4 Viabilidad de células Caco-2

Incubación con ARQ o L durante 24 h, en función de la concentración; n=3.

4.13 Estudios de unión y transporte

Los valores de TEER fueron de aproximadamente 400 Ω .cm² y 300 Ω .cm² para los mono y co-cultivos, respectivamente (los pocillos con valores de TEER menores a 165 Ω .cm² se excluyeron de los experimentos). El porcentaje de rojo fenol difundido del compartimiento apical al basal fue de 5,8% luego de 2 h de incubación (el valor aceptable es menor a 6% en células Caco-2 confluentes) (Halleux y Schneider, 1991). Por otro lado la actividad de la enzima FAL disminuyó un 66% en los co-cultivos Caco-2/Raji respecto a mono-cultivos de células Caco-2 (Fig. 4.5). Esta caída es representativa para considerar un cambio de fenotipo, de enterocitos maduros (Caco-2) a células simil M (Gullberg et al., 2000).

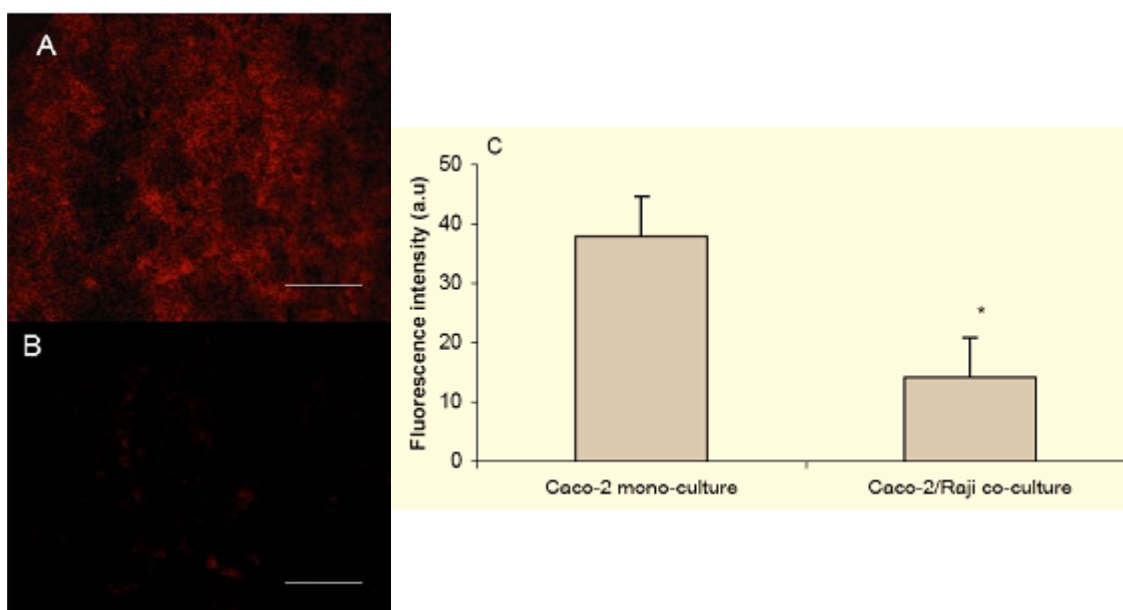


Fig. 4.5 Distribución de FAL y cuantificación de la expresión de FAL

Distribución apical de FAL en (A) mono-cultivos de Caco-2 y (B) co-cultivo Caco-2/Raji. La barra representa 500 μm . (C) Cuantificación de la expresión de FAL, la intensidad de fluorescencia se determinó con el software Image Pro. * $p < 0,01$.

Los mono-cultivos de Caco-2 y co-cultivos de Caco-2/Raji se incubaron con ARQ-HPTS&RhPE y L- HPTS&RhPE a la misma concentración de lípidos. Como ambas vesículas tuvieron el mismo diámetro promedio y distribución de tamaño de partícula, podríamos asumir que el número de vesículas fue el mismo para ambos tipos de vesículas.

No se observó fluorescencia en los mono-cultivos de Caco-2 luego de la incubación con ARQ-HPTS&RhPE y L-HPTS&RhPE. Mientras que se detectó diferente grado de fluorescencia en los co-cultivos de Caco-2/Raji. La intensidad de fluorescencia de la sonda hidrófoba RhPE y la sonda hidrófila HPTS en co-cultivos de Caco-2/Raji luego de la primer hora de incubación con ARQ-HPTS&RhPE fue 4 veces mayor que la correspondiente fluorescencia luego de la incubación con L-HPTS&RhPE (Fig. 4.6). Una vez transcurrida 1 h más de incubación (2 h totales), la intensidad de fluorescencia de RhPE aumentó 2,5 veces tanto con ARQ como con L, mientras que la intensidad de fluorescencia del HPTS permaneció sin cambios. A su vez, a las 2 h de incubación se halló cerca de un 15% de RhPE y un 13% de HPTS en el compartimiento basal de los co- cultivos Caco-2/Raji incubados con ARQ-HPTS&RhP. Por el contrario, en el compartimiento basal de los co-cultivos Caco-2/Raji incubados con L-HPTS&RhPE no se detectó fluorescencia.

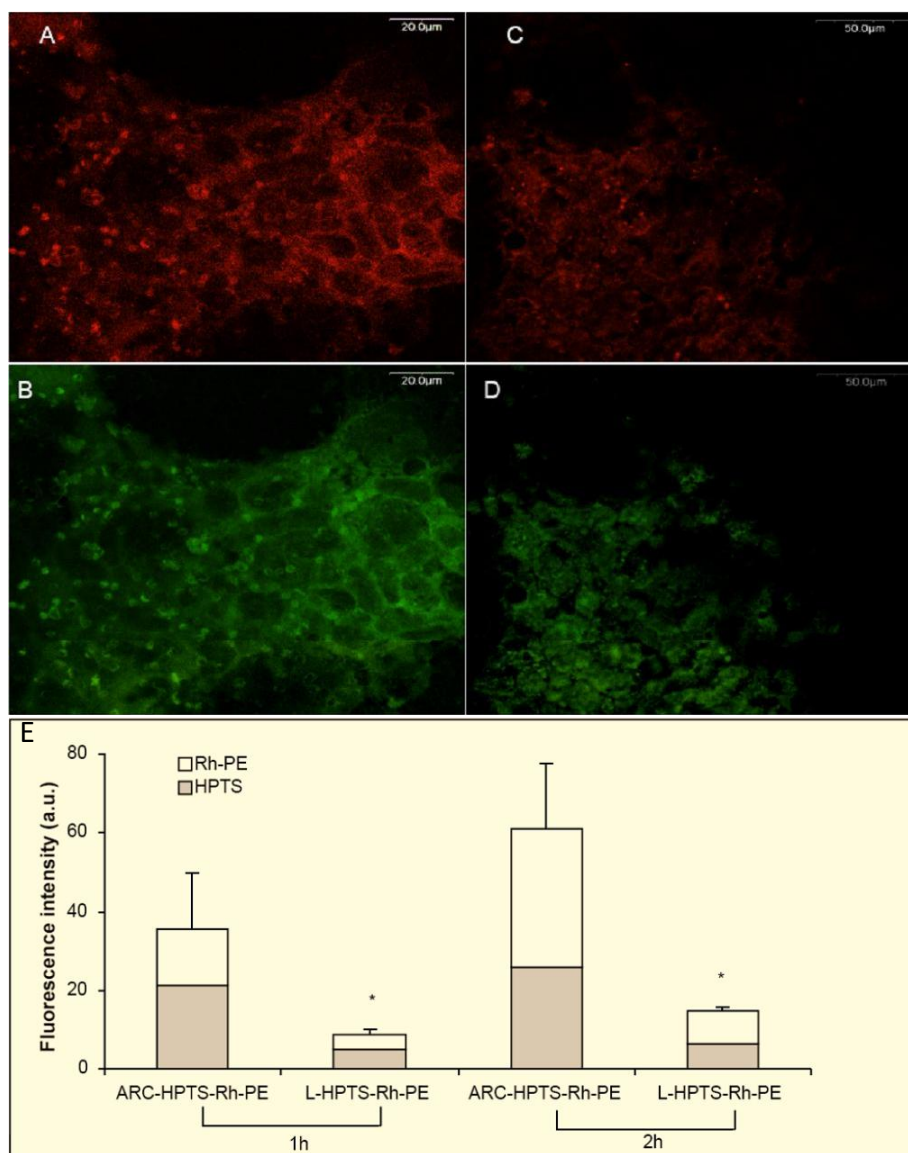


Fig. 4.6 Imágenes de MCLB de co-cultivos de Caco-2/Raji y cuantificación de fluorescencia
 Incubación durante 1 h con ARQ-HPTS&RhPE (A y B) y L-HPTS&RhPE (C y D). Señales roja (A y C) y verde (B y D) de RhPE y HPTS, respectivamente. (E) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia roja y verde con el software ImagePro. * $p < 0,01$.

4.14 Digestión *in vitro*

Luego de 1 h de digestión, tanto la proteína total de homogenato de Tc sin encapsular como la incorporada en los L-Tc fue digerida completamente. En cambio, en los ARQ-Tc se observaron varias bandas correspondientes al control de homogenato de Tc sin digerir (datos no mostrados).

Para evaluar la resistencia química de los arqueolípidos se los incubó con fluidos gastrointestinales simulados, según USP. Luego de 1; 2 y 4 horas de incubación no se hallaron evidencias de degradación de los arqueolípidos tanto en el pellet como en el sobrenadante, separados por centrifugación.

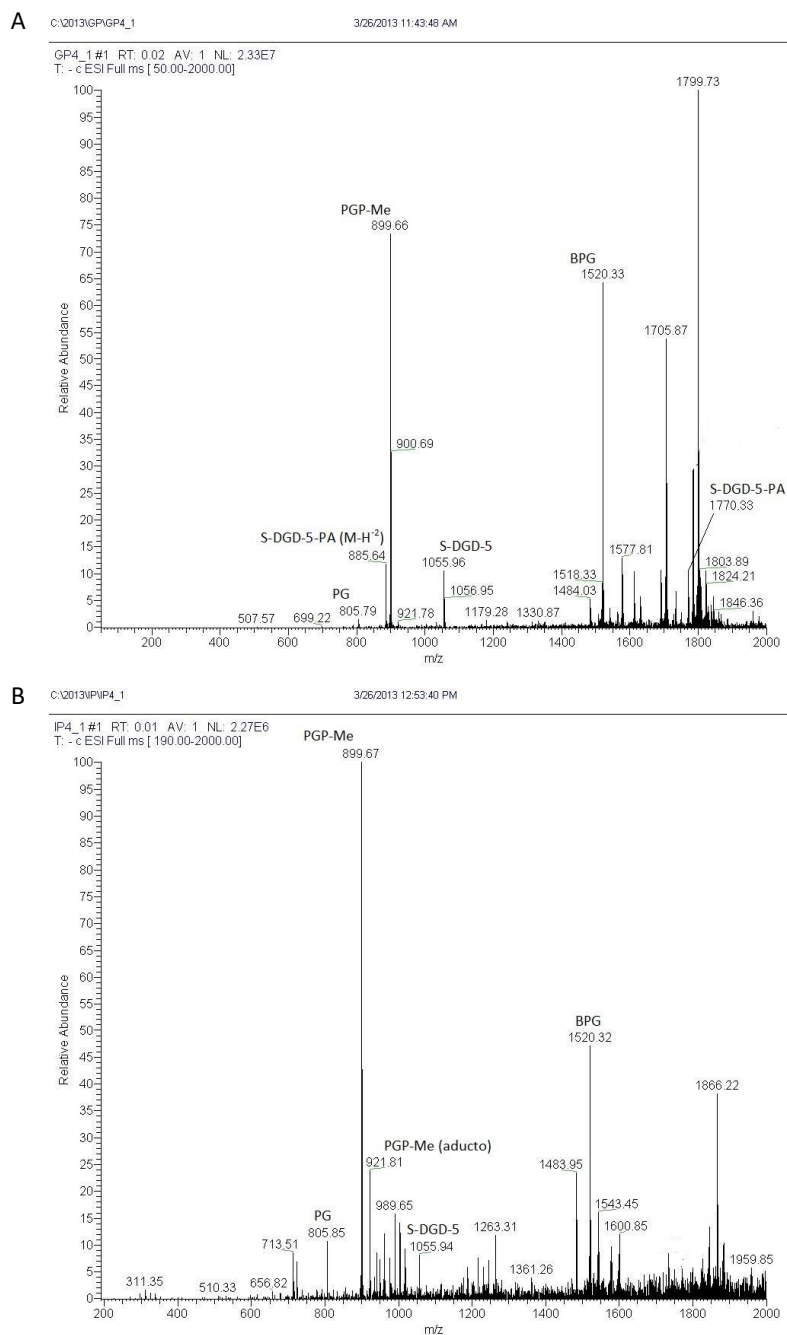


Fig. 4.7 ESI-MS de LPT de *H. tebenquichense*
 Luego de 4 h de incubación en (A) FGS y (B) FIS.

Como puede observarse en la Fig. 4.7, la estructura química de los arqueolípidos se mantuvo luego de 4 horas de incubación, tanto en fluido gástrico (Fig. 4.7 (A)), como fluido intestinal (Fig. 4.7 (B)). En el pellet del fluido gástrico se observaron los picos característicos correspondientes a los arqueolípidos aislados de *H. tebenquichense* estrato BN (ver Sección 2.9.3): BPG m/z 1521; PG m/z 805; PGP-Me m/z 899; SDGD-5 m/z 1055 y SDGD-5-PA (m/z 1770 y su ión bicargado m/z 885). Y no se detectaron picos con m/z compatibles con el disacárido o el PA, productos posibles debido a la degradación de los glicolípidos SDGD-5 y SDGD-5-PA. Lo mismo sucede con el pellet del fluido intestinal, donde además se detectó el aducto del PGP-Me (m/z 922). Aunque no se observa el pico de m/z 1770 atribuible a SDGD-

5PA no se encuentran picos atribuibles a fragmentaciones del mismo.

4.15 Administración oral y biodistribución

La eficiencia de marcación fue de 50% y 40% para ARQ y L respectivamente.

Luego de 4 h de administrado el ^{99m}Tc -DTPA libre, el mayor porcentaje de la dosis (93%) se encontró en el TGI (estómago e intestino delgado y grueso) mientras que la menor proporción ($2,9 \pm 0,9$ %) se encontró en orina y vejiga pero no se detectó actividad radiactiva en las muestras de sangre (Fig 4.8 (A)).

Para L- ^{99m}Tc -DTPA se obtuvo una biodistribución similar, cerca del 75% de la dosis administrada se encontró en el TGI, $2 \pm 1,5$ % en orina y vejiga, pero 6 ± 2 % se encontró en sangre. Además, $2 \pm 1,8$ % se halló en pulmones y $2,2 \pm 1,3$ % en músculos (Fig. 4.8 (B)).

Al contrario, luego de la administración de ARQ- ^{99m}Tc -DTPA, sólo el 23% se encontró en TGI, 21 ± 2 % en orina y vejiga, y notablemente 22 ± 3 % se encontró en sangre. También, se encontró $6,9 \pm 2,7$ % y $1,6 \pm 0,1$ % en músculos y pulmones, respectivamente (Fig. 4.8 (B)).

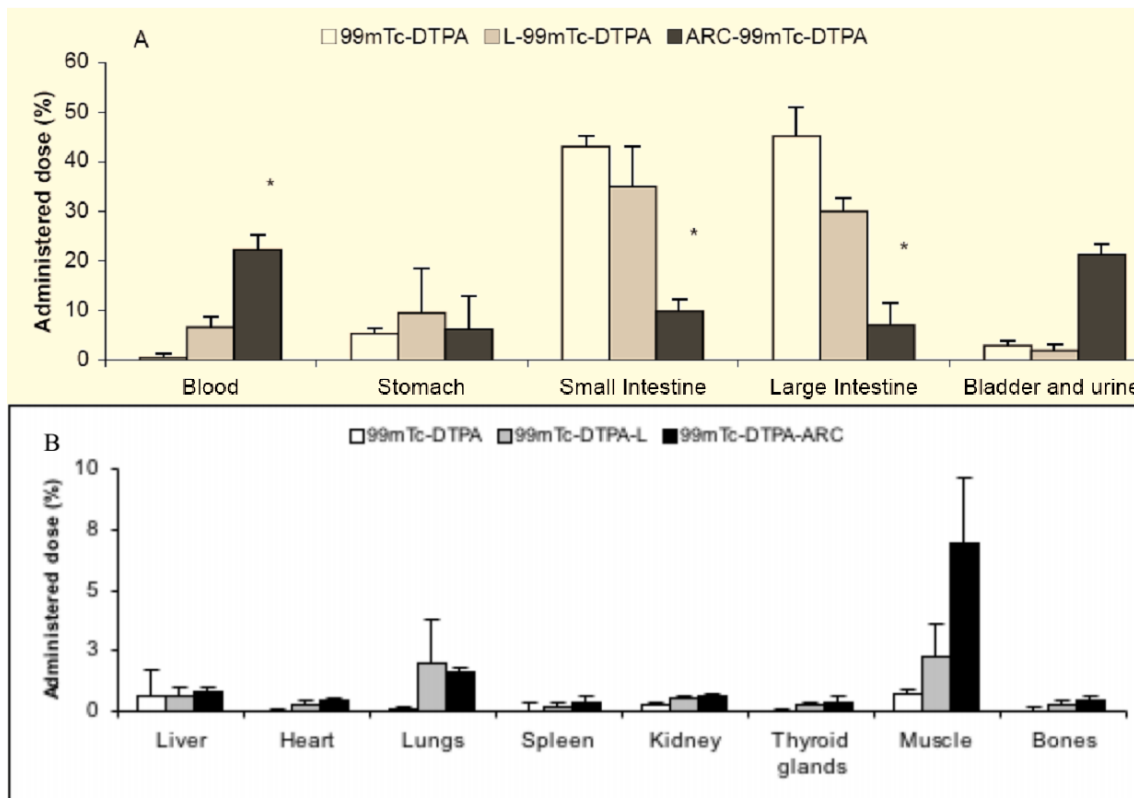


Fig 4.8 Biodistribución de ^{99m}Tc -DTPA libre ; ARQ- ^{99m}Tc -DTPA y L- ^{99m}Tc -DTPA Luego de la administración oral en ratas; n=4; *p<0,01.

Discusión

Los liposomas convencionales son adyuvantes débiles si se los usa como depósitos para una liberación lenta de Ag o cuando los Ag son procesados vía el MHC-II, una vez que los liposomas son fagocitados por las APC. La pobre adyuvancia de los liposomas puede incrementarse incorporando agentes inmunomoduladores, como el lípido A monofosforilglicolípido (MPL®). Éste es el primer ligando para receptor *Toll-like* (TLR 4) y adyuvante biológico aprobado para uso humano, por ejemplo en la vacuna Fendrix® contra la hepatitis B. Otro inmunomodulador es el muramil-dipéptido, la unidad mínima de la pared celular de las micobacterias del adyuvante completo de Freund (Altin y Parish, 2006; Jain et al., 2009). No obstante, la inclusión de material exógeno a la matriz lipídica es una de las principales preocupaciones en el desarrollo de vacunas desde el punto de vista de la producción de liposomas a escala industrial y de los asuntos regulatorios (Felnerova et al., 2004).

Las arqueobacterias son microorganismos no patógenos (Cavicchioli et al., 2003), que no poseen polisacáridos (Eckburg et al., 2003) ni mureína (Kandler y König, 1998) y que presumiblemente no tendrían ningún patrón molecular asociado a patogenicidad para servir como señal peligrosa que despierte el sistema inmune innato (Pulendran et al., 2001). Los ARQ sólo sirven como depósitos y/o median la presentación de Ag exógenos vía el MHC-II. Sin embargo, a diferencia de los liposomas con agentes inmunomoduladores incorporados, los ARQ no poseen la capacidad de activar los TLR-2 (Krishnan et al., 2007). De todas maneras, los ARQ constituyen potentes adyuvantes para la inducción de las respuestas Th1, Th2 y células T CD8+ (Krishnan y Sprott, 2008) en mayor magnitud que otros sistemas vesiculares, como los liposomas convencionales (Krishnan et al., 2000a; Sprott et al., 2004a; Sprott et al., 2004b) y comparable o superior a la vacunación con vectores vivos bacterianos como *L. monocytogenes*, luego de la administración parenteral en ratones (Conlan et al., 2001; Krishnan et al., 2007). Además, investigaciones pioneras llevadas adelante por el grupo de Sprott durante los 15 últimos años, mostraron que los ARQ preparados con LPT extraídos de la cepa metanógena *Methanobrevibacter smithii* (40 % (mol) caldarqueoles y 30% (mol) arquetidilserina) (Krishnan et al., 2000a) son potentes inductores de adyuvancia debido a su particular interacción con las APC, como las células dendríticas o macrófagos (Krishnan et al., 2001). Estos ARQ se unirían a los receptores específicos de fosfatidilserina presentes en la superficie celular de las APC (Gurnani et al., 2004), lo que resulta en la presentación cruzada MHC-I de Ag exógenos solubles. La expresión de moléculas co-estimuladoras en las APC se induce, probablemente mediada por receptores. Esto lleva al incremento de la expresión de citoquinas y otros reguladores inmunológicos (Krishnan y Sprott, 2008; Sprott et al., 2008). Existen varios estudios pre-clínicos prometedores donde la administración parenteral de ARQ indicaría que este nuevo tipo de vesículas se comportaría como adyuvante ideal (Marciani, 2003).

En este trabajo, se preparó un nuevo tipo de ARQ a partir de LPT extraídos de *H. tebenquichense* halófilas extremas no alcalifílicas aisladas de la Patagonia Argentina. Los lípidos polares de las *Archaea* halófilas extremas están comprendidos por arqueoles y poseen varias características particulares que varían levemente dentro del género específico (Corcelli y Lobasso, 2006; Kamekura y Kates, 1999). Entre el 50 y 80 mol% de los LPT corresponde al metiléster del fosfatidilglicerofosfato (PGP-Me), un fosfolípido diacídico que mantiene la estructura de bicapa de la membrana celular a altas concentraciones de cloruro de sodio (Tenchov et al., 2006). Los fosfolípidos con colina, etanolamina, inositol y serina, como cabeza polar están ausentes. En particular, el género *Halorubrum* es rico en fosfolípidos fosfatidilglicerol y posee manosil-glucosil- difitanilglicerol (DGD), un lípido derivado de un diglicosilarqueol básico por sustitución de azúcar o grupos sulfato en diferentes posiciones del residuo de manosa, como el SDGD-5 (Tindall, 1990). Además de los lípidos característicos, estas cepas de *H. tebenquichense* contienen PG, BPG y SDGD-5-PA. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que los ARQ preparados con LPT, sin caldarqueoles y serina, extraídos de esta cepa halófila no alcalifílica conteniendo OVA, evocaron una fuerte y sostenida respuesta primaria de anticuerpos, como así también mejoró la inmunidad humoral específica, luego del estímulo con Ag desnudo. En la respuesta inmune de memoria a largo plazo (200 días) se pudo demostrar un aumento de los títulos de anticuerpo, tanto de tipo IgG1 como IgG2a. Esto sugiere una respuesta mixta Th1/Th2 luego de la administración subcutánea en ratones (Gonzalez et al., 2009).

El TGI constituye un medio química y enzimáticamente hostil para proteínas y ácidos nucleicos y es responsable de mantener un balance entre la inmunidad y la tolerancia (Luongo et al., 2009). Un adyuvante oral particulado ideal debe evocar una reacción inmune apropiada luego de la interacción con APC después de su captura y transcitosis por las células M, pero también debe proteger la estructura del Ag transportado (De Magistris, 2006). La mayor estabilidad de los ARQ por sobre los liposomas se puede resumir como sigue:

- a) Los ARQ tienen la misma permeabilidad a agua y amoníaco que los liposomas en fase cristalina líquida, pero la presencia de enlaces éteres reduce tres veces su permeabilidad a protones (Mathai et al., 2001).
- b) Las uniones éteres son resistentes a la hidrólisis ácida y básica.
- c) La configuración estereoquímica de tipo *sn*-2,3 en lugar de *sn*-1,2 de los glicerofosfolípidos de los dominios *Bacteria* y *Eukarya* (Kates, 1993b) protegen los ARQ de las fosfolipasas estereoespecíficas (Krishnan et al., 2000a)
- d) El grupo fitanilo (3,7,11,15-tetrametilhexadecil) es una cadena poliisoprenoide saturada estable al aire que no requiere condiciones especiales de almacenamiento.

En esta primera aproximación, se pudo observar que sólo cuando las proteínas de Tc se incorporan en ARQ, el patrón de bandas en SDS-PAGE era comparable al patrón de bandas de homogenato Tc sin digerir. En el mismo sentido, los arqueolípidos no sufrieron cambios estructurales según se pudo demostrar por el análisis de los espectros ESI-MS luego de la incubación con fluidos gastrointestinales simulados. Por consiguiente, los ARQ se presentan como un promisorio sistema para el desarrollo de vacunas.

Existen dos estudios que demuestran la ausencia de toxicidad de los ARQ luego de la administración oral hasta 550 mg/kg/día por diez días consecutivos en ratones (Omri et al., 2003; Patel et al., 2000). Sin embargo, la interacción de ARQ con células M o la biodistribución luego de la administración oral hasta el momento, se encontraban inexploradas.

En este trabajo, se demostró que únicamente luego de la incubación en co-cultivos Caco-2/Raji —pero no en monocultivos Caco 2— la fluorescencia RhPE y HPTS de ARQ permanecía asociada a las células. Dicha intensidad de fluorescencia fue más débil cuando las incubaciones se hicieron con liposomas. Esto indicaría la unión preferencial de los ARQ a las células simil-M.

Los ARQ se encuentran en estado fluido entre -40°C y 80°C (Strobl et al., 1985). Esto quiere decir que las cadenas de fitanilo se encuentran en un estado desordenado en un amplio rango de temperatura o un estado de elevada entropía, en la interfase agua-aire (Yamauchi et al., 1997). Ciertamente, las bicapas de los ARQ poseen una menor energía de superficie (32-37 mN/m) respecto a los liposomas compuestos por cadenas ordenadas de lípidos (54-56 mN/m) La baja tensión superficial podría surgir del único modo de empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas altamente ramificadas según lo estimado de la gran área ocupada por los arqueoles con cadenas de fitanilo ($92-125 \text{ \AA}^2$) la cual es aproximadamente dos veces la ocupada por los glicerofosfolípidos convencionales. Además, los poliisoprenoides saturados como las cadenas de fitanilo son considerados materiales altamente hidrofóbicos (Kitano et al., 2003). Por otro lado, se sabe que las células M tienen mayor afinidad por las partículas hidrofóbicas (poliestireno, polimetilmetacrilato, polihidroxibutirato, policaprolactona) que por las hidrofílicas (PLGA, triacetato de etilcelulosa, acetato de celulosa hidrogeno ftalato) (Eldridge et al., 1989; Jepson et al., 1993; Mathiowitz et al., 2000). No hay suficientes pruebas para afirmar si la presencia de trazas de lípidos no polares en los extractos de LPT, o de los azúcares sulfatados, podría influir en la afinidad/especificidad de la unión. Sin embargo, la inusual hidrofobicidad de los ARQ podría explicar el elevado nivel de captura por parte de las células M respecto a los liposomas. El hallazgo de fluorescencia RhPE y HPTS en el compartimiento inferior de los Transwell®, sólo en los pocillos incubados con ARQ y no así, en los incubados con liposomas, podría deberse al pasaje transcelular de los ARQ. Este compartimiento inferior del Transwell® sería el equivalente al bolsillo basolateral de las células simil-M. De este modo, los ARQ tendrían mayores chances que los liposomas de

acceder *in vivo* a las APC localizadas debajo del domo de las PP.

Finalmente, el radiofármaco hidrosoluble ^{99m}Tc -DTPA fue incorporado a ARQ y liposomas. Dicho radiofármaco es un marcador de vaciado gástrico que luego de la administración oral no es ni adsorbido ni absorbido a través de la mucosa (Chaudhuri, 1974; Wilding et al., 2001). Los hallazgos de $22\pm 3\%$ de ^{99m}Tc -DTPA (cerca de 3,5 veces más que los liposomas) en sangre 4 h después de la administración oral en ratas, sugerirían que los ARQ estuvieron involucrados en un notable transporte del impermeable ^{99m}Tc -DTPA desde el lumen hasta la circulación sistémica. *In vivo*, el material particulado capturado por las células M se encuentra en la extensa red linfática debajo de las microvellosidades epiteliales (Hussain et al., 2001). Si los ARQ fueron “transcitados” por las células M, un drenaje potencial de ^{99m}Tc -DTPA durante o al final del tráfico intracelular, a nivel del bolsillo basolateral, podría explicar la presencia de ^{99m}Tc -DTPA en la circulación sanguínea. El drenaje no ocurriría en la pared luminal, de otra manera el ^{99m}Tc -DTPA no se absorbería. Una evidencia del transporte del ^{99m}Tc -DTPA libre es la ausencia de radioactividad en el hígado, ya que si permanecía encapsulado en ARQ, las células de Kupffer lo hubieran capturado.

Estos resultados obtenidos en roedores, donde las PP están compuestas por al menos un 10% de células M, no pueden ser estrictamente extrapolados a humanos, que poseen menos del 5% de células M entre otras diferencias (Buda et al., 2005; des Rieux et al., 2007). Sin embargo, tomando en conjunto estas primeras aproximaciones se puede sugerir que las células simil-M tendrían mayor afinidad por los ARQ que por los liposomas. Más aún, los ARQ serían los responsables del transporte de una considerable cantidad de material hidrosoluble a la circulación sanguínea. Estudios más profundos se requieren para revelar el destino de la matriz lipídica de los ARQ y su potencial como adyuvante oral, como la mayor captura del material particulado que podría vencer la tolerancia normal evocada luego de la administración oral de pequeñas dosis repetidas de Ag solubles (Corthesy, 2007; Chen et al., 1995; Chen et al., 1997).

Capítulo 5

Inmunización por ruta oral con ARQUEOSOMAS

*Tarda en llegar. Y al
final, al final... Hay
recompensa.*

(Zona de promesas, Gustavo Ceratti)

En el Capítulo 5 se describen la preparación y la caracterización de ARQ con antígenos solubles de *T. cruzi* (ARQ-Tc) con el objeto de realizar ensayos de inmunización por ruta oral en un modelo de animales de laboratorio. Ratones hembra C3H/HeN se inmunizaron vía oral con una dosis de 200 µg de proteína/ratón y/o 2 mg de lípidos/ratón en un volumen máximo de 200 µl. El esquema de inmunización fue 0-14-21-63 días. La respuesta humoral se determinó a través del dosaje de anticuerpos clase IgG anti-*T. cruzi* por ensayo inmunoenzimático (ELISA, del inglés Enzyme-linked immunosorbent assay) en fase sólida en muestras de suero. Para evaluar la respuesta inmune a nivel de mucosas se tomaron muestras de saliva y materia fecal y se cuantificó el título de IgA por ELISA.

Las vesículas obtenidas (ARQ-Tc y ARQ) tuvieron un tamaño menor a 200 nm y el Pdl fue menor a 0,400. El potencial Z fue menor a -30 mV.

En los experimentos de digestión *in vitro* desarrollados en el Capítulo 4 se demostró que los ARQ protegerían la proteína incorporada. Además, a través del análisis por ESI- MS, los arqueolípidos evidenciaron una resistencia estructural al ambiente hostil del tracto gastrointestinal en experimentos *in vitro*, con lo cual los restos de manosa, a quienes se asigna la capacidad adyuvante, no se perderían.

Sin embargo, los resultados del ensayo de inmunización mostraron solamente un ratón, perteneciente al grupo que recibió ARQ-Tc, con títulos elevados de IgG sérica (>6400) a partir de la quinta semana (14 dpi). Este título se mantuvo luego de 14 días de la cuarta dosis. En ningún caso se detectaron títulos de IgA en muestras de saliva. En este contexto, se discuten estrategias para encarar futuros abordajes experimentales.

Introducción

A lo largo del recorrido histórico de las enfermedades de importancia epidemiológica, para reconocer una patología como tal, generalmente se comienza por la descripción de los síntomas, que precede la identificación del agente etiológico, y por último, se descubre el ciclo biológico que incluye la infección en los humanos. En el caso de la enfermedad de Chagas, no se verificó este orden ya que la descripción del agente etiológico, la identificación del vector y el conjunto de síntomas propuestos fueron realizados por Carlos Chagas en

1909. En virtud de los aportes realizados por Salvador Mazza dieron en llamarla Enfermedad de Chagas-Mazza (Zabala, 2010).

La enfermedad de Chagas-Mazza o Tripanosomiasis americana es un gran problema de salud pública que afecta a más de 10 millones de personas, en especial en Latinoamérica, donde es endémica. Según el Ministerio de Salud de la Nación, en la Argentina, se calcula que los afectados por esta enfermedad son aproximadamente un millón y medio de personas, es decir el 4% de la población del país. Frecuentemente, se asocia con la pobreza, la escasez de información y la falta de acceso a servicios sanitarios básicos en zonas rurales, pero se está expandiendo a zonas suburbanas y urbanas más ricas. Esta enfermedad se presenta tanto en humanos como en mamíferos domésticos y silvestres (Ceballos et al., 2006). El agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido principalmente en forma vectorial por contaminación con la materia fecal de insectos hematófagos de la familia *Triatominae*, comúnmente conocidos como vinchuca, barbeiro, chinche negra o chipo. En el hospedador humano *T. cruzi* se multiplica dentro de las células, particularmente del corazón y músculo liso (Fig. 5.1). Otras rutas descritas de transmisión incluyen la transfusión de sangre y trasplante de órganos, de creciente importancia en países desarrollados, la transmisión materno-fetal, la lactancia y ocasionalmente la ingesta de alimentos o líquidos contaminados con el *T. cruzi* (brotes orales) (Quijano-Hernandez y Dumonteil, 2011).

La enfermedad comienza con una etapa aguda que dura pocas semanas y se caracteriza por una elevada parasitemia asociada con fiebre, dolor de cabeza, náuseas, que raramente es letal. Luego sigue una fase crónica que permanece asintomática por varios años. El diagnóstico se basa en pruebas serológicas ya que es poco frecuente la observación de parásitos circulantes. Entre el 20 y 40% de los pacientes desarrollan síntomas en la fase crónica caracterizada por la miocardiopatía chagásica progresiva y debilitante o los megasíndromes (megaesófago y megacolon). Las arritmias de severidad creciente llevan a la falla cardíaca congestiva y finalmente a la muerte del paciente (Rassi et al., 2010).

A pesar de las intervenciones en el control de vectores, que redujeron la incidencia y prevalencia de la enfermedad, no sería posible la eliminación de la transmisión vectorial dada la dificultad para el control de algunas especies de triatominos. En este contexto, una vacuna sería clave para el control del Chagas. Recientemente, Lee y col resaltaron la buena relación costo/beneficio que podría tener una vacuna contra esta enfermedad, aún donde la transmisión a humanos y prevalencia de la infección sean bajas y aunque presente una eficacia protectora moderada (Lee et al., 2010). Por otro lado, una vacuna terapéutica administrada sola o en combinación con la farmacoterapia habitual mejoraría el pronóstico de los pacientes chagásicos por el aumento de la eficacia del tratamiento, ya que disminuiría su duración y costo, o al menos retrasaría la progresión a los estados avanzados como la falla cardíaca y en caso de mujeres embarazadas, podría prevenir potencialmente el Chagas congénito (Dumonteil et al., 2012).

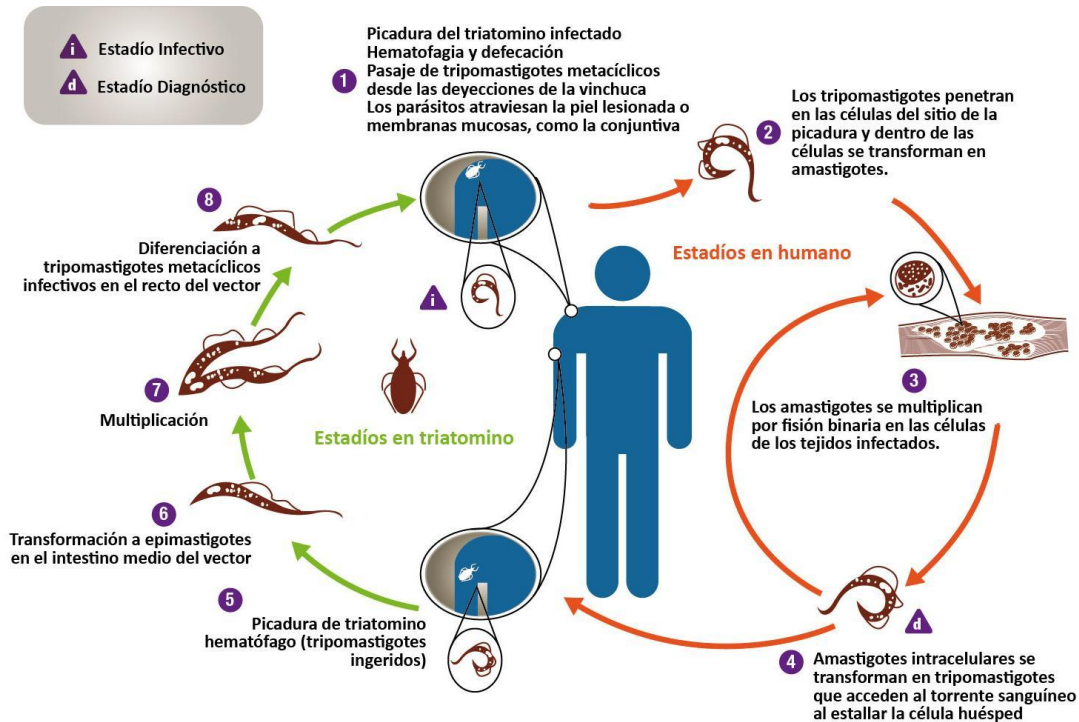


Fig. 5.1 Ciclo de vida del *Tripanosoma cruzi*

Adaptado de CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Como en todas las parasitosis, el *T. cruzi* rara vez desencadena la muerte del huésped y en general establece con éste una relación de equilibrio que resulta en la cronicidad. Esta permanencia prolongada del parásito, cuya consecuencia es la exposición progresiva del huésped a sus diferentes estímulos antigénicos, conduce a una respuesta inmune que en general limita la infección, aunque no la erradica. El hecho de que el parásito sobreviva en el huésped y a sus expensas, a pesar de la respuesta inmune, señala la existencia de mecanismos que le permiten evadir *in vivo* la acción de los anticuerpos y de las células sensibilizadas (González Cappa et al., 1996).

Para un diseño racional de una vacuna contra *T. cruzi* es necesaria la comprensión de las interacciones entre el parásito y el sistema inmune. En el estadio inicial de la invasión de *T. cruzi*, la inmunidad innata actúa como la primer barrera, las células del sistema inmune innato (macrófagos, células NK, células dendríticas) producen citoquinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) y moléculas efectoras (intermediarios de nitrógeno reactivo, GTPasas inducibles por IFN) que controlan la replicación del parásito. De un modo particular, las células dendríticas, hacen de puente entre la inmunidad innata y adquirida, produciendo citoquinas necesarias para la diferenciación y expansión clonal de los linfocitos Th1 CD4+ como T citotóxicos CD8+ y células plasmáticas B, (Junqueira et al., 2010), como se describió en la Sección 1.1.

El IFN- γ , producido por los linfocitos T CD4+ y CD8+, juega un rol fundamental durante la infección de *T. cruzi*, incrementando la producción de óxido nítrico por los macrófagos, el

cual inhibe el desarrollo de las formas intracelulares del parásito (Álvarez et al., 2011). Es así como los linfocitos Th1 CD4+, que producen IL-2, junto con el IFN- γ , produce un efecto sinérgico sobre la expansión de linfocitos T citotóxicos CD8+, y serían centrales en la protección sistémica contra la infección (Padilla et al., 2009; Parodi et al., 2009). Los linfocitos CD8+ ejercen una acción directa mediante la producción de perforina y su concomitante actividad citotóxica que destruye las células que contienen amastigotes intracelulares (de Alencar et al., 2009). El IFN- γ también participaría a nivel hepático en la eliminación de los tripomastigotes (Sardinha et al., 2010). Los Ac producidos por las células plasmáticas B lisan los tripomastigotes extracelulares o facilitan su fagocitosis mediante la opsonización (Junqueira et al., 2010).

A pesar de esta respuesta inmunológica del huésped, los parásitos sobreviven. El *T. cruzi* posee varios mecanismos de evasión del sistema inmune como la supresión de linfocitos T, la activación policlonal de linfocitos B no específicos contra el parásito y el *capping* que redistribuye los complejos Ag-Ac en la superficie del parásito, formando un casquete que impide la adecuada fijación del complemento (Bermejo et al., 2011; González Cappa et al., 1996; Minoprio et al., 1988; Minoprio et al., 1986; Rodrigues et al., 2009).

Existe un creciente consenso respecto a que una respuesta inmune protectora contra *T. cruzi* requiere la activación de un perfil inmune de tipo Th1, con la estimulación de linfocitos T CD8+, mientras que los Ac jugarían un rol bastante secundario. Además, para que una vacuna sea eficientemente distribuida en áreas remotas rurales con infraestructura limitada de salud, contar con una formulación muy estable sería una ventaja clave (Quijano-Hernandez y Dumonteil, 2011).

Recientes revisiones han resumido exhaustivamente los esfuerzos por desarrollar vacunas antichagásicas (Cazorla et al., 2009; Quijano-Hernandez y Dumonteil, 2011; Rodrigues et al., 2009; Vazquez-Chagoyan et al., 2011). Una amplia variedad de vacunas profilácticas y terapéuticas se evaluaron en modelos murinos, desde el uso de parásitos enteros a proteínas recombinantes purificadas, como también la utilización de vectores virales, vacunas a DNA y estrategias de vacunación con refuerzo heterólogo.

El uso de parásitos vivos conlleva los problemas comúnmente asociados a toda vacuna a microorganismo vivo, por ejemplo la seguridad y los peligros asociados con su producción a gran escala y distribución. Las proteínas recombinantes de *T. cruzi* investigadas fueron: cruzipain y GP82 y varias proteínas de la superfamilia transialidasa como ASP-2 y TS. Varios de estos Ag se han formulado con vacunas recombinantes de vectores virales como también vacunas a DNA, estas últimas formulaciones serían más efectivas que las proteínas recombinantes para inducir respuesta inmune Th1 con linfocitos T CD8+ citotóxicos (Crampton y Vanniasinkam, 2007; Dumonteil, 2007).

Un factor limitante de las proteínas recombinantes es que en general, son inmunogénicamente débiles y requieren la inclusión de adyuvantes para mejorar la respuesta inmune resultante. El hidróxido o fosfatos de aluminio son los únicos adyuvantes aprobados

para su uso por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*). Sin embargo, aunque la alúmina tiene una larga trayectoria de seguridad, sólo mejora la inducción de respuesta inmune humoral y no ayuda a la respuesta inmune mediada por células (Oyewumi et al., 2010).

Para inducir inmunidad contra enfermedades infecciosas, la vacunación a través de mucosas representa uno de los grandes desafíos en el campo de la salud humana. Durante décadas, varias rutas mucosas que incluyen la nasal, la oral y la rectal, se han explorado preclínicamente, pero la ruta oral genera mayor conformidad entre los pacientes, permite la vacunación masiva y evita los costos vinculados al uso de procesos de manufactura estéril y al personal calificado para la administración de la vacuna. La apropiada estimulación de la respuesta inmune celular y humoral es vital para una protección efectiva a nivel de superficies mucosas contra la invasión de agentes infecciosos. Además, las vacunas orales poseen la gran ventaja de generar respuesta inmune a nivel de mucosas, largamente reconocida como primera barrera de defensa frente a infecciones (Borges et al., 2005). Sin embargo, el mucus y el ambiente hostil del TGI, con zonas de pH extremo y la presencia de enzimas, hacen que sea difícil obtener respuestas elevadas y reproducibles mediante la vacunación oral. La eficacia de las vacunas orales se ve disminuida por la degradación del Ag en el TGI y la pobre captación por las placas de Peyer (PP), que están principalmente localizadas en el íleon (van der Lubben et al., 2001). Para salvar este inconveniente se ha diseñado un considerable número de sistemas micro y nanoparticulados, destinados a aumentar su captura por las PP. En los últimos años, se han estudiado preclínicamente varios sistemas como liposomas, niosomas, bilosomas, virosomas, ISCOMS, arqueosomas, cocleatos, micro y nanopartículas y dendrímeros, para aumentar el *targeting* de Ag por la ruta gastrointestinal (Arora et al., 2010; Correia- Pinto et al., 2013; Romero y Morilla, 2011). Por otro lado, estos sistemas de *delivery* pueden funcionar también como inmunoestimulantes (Borges et al., 2005; Correia- Pinto et al., 2013).

Como se detalló en el Capítulo 1, los sistemas de *delivery* de Ag nanoparticulados pueden mejorar y/o facilitar la captura de Ag por las APC, como las células dendríticas o los macrófagos; pueden servir como un *depot* de liberación controlada de Ag; tienen la capacidad de proteger la integridad de los Ag contra la degradación hasta ser capturados por las APC; y potencialmente, pueden propiciar la presentación cruzada de Ag (mecanismo por el cual un Ag exógeno se procesa en el contexto del MHC-I) para generar linfocitos T citotóxicos contra patógenos intracelulares (Correia-Pinto et al., 2013; Look et al., 2010; Romero y Morilla, 2011).

De este modo, nuestro grupo demostró que los ARQ conteniendo proteínas solubles de *T. cruzi* utilizados para inmunizar ratones C3H/HeN por vía subcutánea, indujeron una mayor respuesta inmune Ag-específica que los Ag libres o incorporados a liposomas convencionales (Higa et al., 2013). En consecuencia, estos hallazgos evidenciarían la adyuvancia de los ARQ preparados con LPT de *H. tebenquichense* y su potencial uso para

una vacuna segura contra este relevante patógeno humano.

Como se discutió en los Capítulos 3 y 4, tanto *in vitro* como *in vivo*, los ARQ se internalizan más ávidamente en células M (modelo *in vitro*), macrófagos y APC que los liposomas (Krishnan et al., 2001; Sprott et al., 2003b). Y en el Capítulo 2 se describió la estructura de los arqueolípidos aislados de *H. tebenquichense*, que confieren ventajas en cuanto a la resistencia a ambientes hostiles como a las propiedades adyuvantes de los ARQ.

En base a estos antecedentes, en este capítulo nos propusimos incorporar proteínas de *T. cruzi* a ARQ y evaluar la respuesta inmune generada, una vez administrados por la ruta oral.

Materiales

Los epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén fueron gentilmente provistos por la Dra. Mónica Esteva (Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén, Buenos Aires, Argentina)

El extracto de levadura y el agar-agar fueron de Britania (Buenos Aires, Argentina). La peptona de caseína se adquirió en Neolab (Buenos Aires, Argentina).

El dipéptido de adamantilamida (AdDP) se sintetizó en Bachem (Bubendorf, Switzerland), bajo normas de buenas prácticas de producción (GMP), previamente descriptas (Flegel et al., 1986).

Los anticuerpos de cabra anti IgG de ratón conjugados con HRP fueron de Chemicon International, Millipore #AP124P (California, E.U.A.).

Los anticuerpos de cabra anti IgA de ratón conjugados con HRP fueron de Pierce Biotechnology Rockford #sc-3791 (Illinois, E.U.A.)

El 2,2'-Azino-bis (3-Etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) listo para usar, fue provisto por Sigma-Aldrich, (Buenos Aires, Argentina).

Todos los otros químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Métodos

5.1 Crecimiento de arqueobacterias

Las arqueobacterias de la especie *Halorubrum tebenquichense* fueron aisladas de muestras de suelo de Salina Chica (Península de Valdez, Chubut, Argentina) como fue descripto en la Sección 2.1 (Gonzalez et al., 2009).

5.2 Extracción y caracterización de lípidos polares totales (LPT)

La extracción de LPT se realizó a partir de inóculos de arqueobacterias por el método de

Bligh y Dyer modificado para halófilas extremas según se describió en la Sección 2.2.1. Los fosfolípidos (PL) de los LPT se cuantificaron por el método de Bötcher (Böttcher et al., 1961), según Sección 2.2.2.

Cada lote de LPT se caracterizó por TLC-1D y los lípidos fueron revelados con solución etanólica de ácido sulfúrico, según la Sección 2.2.3. Sólo se utilizaron los lotes con contenido de fosfolípidos mayor a 90% p/p y perfil característico de TLC-1D, según Sección 2.9.2.

5.3 Obtención de antígenos solubles de *T. cruzi* (Tc)

La masa total de parásitos de *T. cruzi* se resuspendió en buffer Tris 10 mM, NaCl 0.9% p/v, pH 7,4 (Tris/NaCl), la suspensión se dividió en dos y se centrifugó a 3000 g; 10 min; 4°C. Cada pellet se lavó dos veces con Tris/NaCl o buffer fosfato salino, pH 7,4 (PBS), y se resuspendieron en los respectivos buffers. Luego, se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación a cada una de las suspensiones. Para completar la disrupción celular las muestras se sometieron a tres ciclos de sonicación. Por último, se centrifugaron a 15.000 g; 30 min; 4°C y se separó el sobrenadante con los antígenos solubles del parásito (Tc). Los antígenos en Tris/NaCl (Tc-Tris/NaCl) se utilizaron para preparar ARQ y los antígenos en PBS (Tc-PBS) para sensibilizar las placas de ELISA para la determinación de anticuerpos (Sección 5.7). La concentración de proteínas de ambos sobrenadantes se determinó por el método de Micro-BCATM (Pierce™, Rockford, E.U.A.) (Sección 2.5.5).

5.4 Preparación de ARQ con antígenos solubles de Tc (ARQ-Tc)

Los arqueosomas se prepararon por hidratación de films de LPT con buffer filtrado por membrana de 0,22 µm. Brevemente, se disolvieron 20 mg de LPT en cloroformo/metanol, relación 1:1 v/v y se filtraron por membranas de PTFE 0,22 µm. Luego, se evaporó el solvente en un rotaevaporador y con corriente de nitrógeno se eliminaron las trazas de solvente residual. Las películas obtenidas se almacenaron en desecador hasta su uso. Al momento de ser utilizadas, las películas se hidrataron con 2 ml de buffer (Tris/NaCl) filtrado por membrana de 0,22 µm (ARQ), o con Tc-Tris/NaCl con una concentración proteica de 1,2 mg/ml (ARQ-Tc). La hidratación se llevó a cabo con agitación energética durante 1 hora a 40°C. Luego, los ARQ y ARQ-Tc obtenidos se sometieron a cinco ciclos de congelación y descongelación para aumentar la incorporación de proteína. La suspensión resultante se sonicó durante 1 hora en sonicador de baño (80 W, 40 KHz) con el fin de disminuir el tamaño medio y la lamelaridad de la población vesicular. Los arqueosomas multilamelares resultantes se extruyeron 20 veces de manera sucesiva a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro definido de 0,8 y 0,4 µm (Nucleopore™). Dicha extrusión se realizó con un extrusor manual Miniextruder® (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, E.U.A.).

El Grupo I recibió Tc incorporado a arqueosomas (ARQ-Tc). El Grupo II recibió el Tc en Tris/NaCl (Tc-Tris/NaCl). El Grupo III (control positivo) recibió Tc-Tris/NaCl con AdDP (dosis AdDP: 1 mg/ratón), suplementado con 3% de CO₃Na₂. El AdDP (ver Sección 1.7) se utilizó como adyuvante por vía oral (Becker et al., 2001). El Grupo IV (control negativo) recibió ARQ vacíos. Y el Grupo V, que recibió Tris/NaCl, se utilizaría como control de infección en las pruebas de desafíos con parásitos de *T. cruzi* (Tabla 5.1).

Como control preinmune se tomaron muestras de suero, heces y saliva, previo a la primera inoculación.

Para evaluar la respuesta humoral se tomaron muestras de suero una semana post segunda inoculación; dos semanas post tercera inoculación y dos semanas post cuarta inoculación (Fig.5.2). Para ello se realizó la extracción de sangre de la vena coccígea, luego se incubó la sangre a 37°C durante 30 min, para favorecer la coagulación. La sangre se centrifugó a 350g; 10 min; t.a. para minimizar la hemólisis, se separó el sobrenadante y luego se volvió a centrifugar a 3.500 g; 10 min; t.a. El suero se separó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para evaluar la respuesta inmune a nivel de mucosas se tomaron muestras de saliva y materia fecal dos semanas post tercera inoculación. Y luego, muestras de materia fecal dos semanas post cuarta inoculación y muestras de saliva tres semanas post cuarta inoculación (Fig.5.2). Las muestras de materia fecal se tomaron al acecho. Las heces recolectadas se disgregaron con una solución de azida sódica (0,1% p/v en PBS). Por cada 0,1 g de heces se agregó 1 ml de la solución y se agitaron con vortex por 10 minutos. Luego de la centrifugación (3000g; 5min; t.a.), se separó el sobrenadante y se almacenó a -20°C, hasta su uso. Las muestras de saliva se obtuvieron luego de la administración de pilocarpina (1 mg/ml en PBS estéril, 100 µl) vía intraperitoneal y se almacenaron a -20°C.

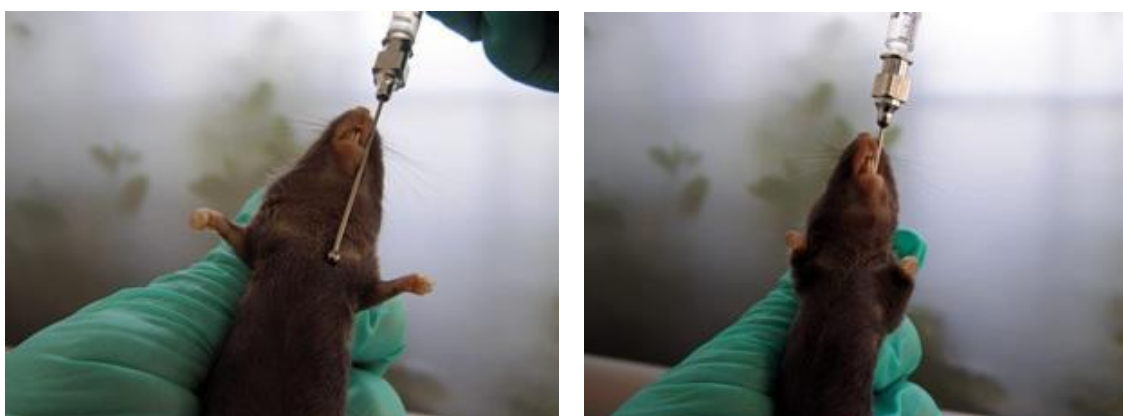


Fig. 5.3 Inoculación por ruta oral con sonda rígida

5.7 ELISA

La respuesta humoral se determinó a través del dosaje de anticuerpos clase IgG anti-*T*.

cruzi por ensayo inmunoenzimático (ELISA, del inglés Enzyme-linked immunosorbent assay) en fase sólida. Brevemente, microplacas de 96 pocillos de fondo plano de alta unión (Costar® #3590, Corning Life Sciences, E.U.A) se sensibilizaron con Tc-PBS diluido en buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 (concentración final de proteína, 200 µg/ml) a 4°C durante toda la noche. Las microplacas se lavaron cinco veces con PBS suplementado con Tween 20 (0,05% v/v; PBST). A continuación, las placas se bloquearon con PBST suplementado con BSA (1 % p/v, PBST-BSA) durante 1 h a 37°C. Luego de lavar la placa 5 veces con PBST, se agregaron 100 µl de muestra (control positivo: suero de ratones inmunizados; control negativo: suero de ratones previo a la primera inoculación) en diluciones seriadas al medio a partir de 1/200 con PBST-BSA. Después de una incubación de 1 h a 37°C, las placas se lavaron cinco veces con PBST, las microplacas se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:5.000 en PBST-BSA por 1 h a 37°C. Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios, las placas se lavaron con PBST- BSA y se incubaron con 100 µl del sustrato ABTS por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la densidad óptica se midió a 405 nm usando un lector de microplacas (Multiskan Ex, Thermo 83 Labsystems, Vantaa, Finlandia). Los títulos de anticuerpos se representaron como la mayor dilución de punto final con absorbancia superior al punto de corte. El punto de corte para definir un positivo se calculó como la absorbancia media + 3 desvíos estándares de los sueros preinmunes de ratones.

Para determinar IgA en saliva se procedió de igual forma, pero las placas se incubaron con anticuerpo anti- IgA de ratón producido en cabra conjugado con peroxidasa de rábano diluido con PBST-BSA 1:5.000. Las muestras de saliva se diluyeron con PBST- BSA al medio y en forma seriada (1/2-1/64).

5.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test *t* de Student para evaluar la diferencia significativa entre los valores medios de los parámetros estudiados.

Resultados

5.9 Caracterización de muestras

En la Tabla 5.1 se muestran los valores de las cuatro muestras inoculadas a cada Grupo como la media ± desvío estándar. Como puede observarse, las vesículas obtenidas (ARQ-Tc y ARQ) tuvieron un tamaño menor a 200 nm y el Pdl fue menor a 0,400. El potencial Z promedio de las vesículas cargadas con proteína fue mayor al de las vesículas vacías (menos negativo), pero esta diferencia no fue significativa.

Tabla 5.1 Caracterización de muestras inoculadas

Grupo	I	II	III	IV	V
Muestra	ARQ-Tc	Tc-Tris/NaCl	Tc-AdDP	ARQ	Tris/NaCl
[Proteína] mg/ml	1,08±0,05	1,18±0,05	1,18±0,05	-	-
[Lípidos] mg/ml	12,9±1,4	0	0	10,1±1,6	0
Dosis proteína (µg)	185±13	200±9	200±9	0	0
Dosis lípidos (mg)	2,20±0,23	0	0	2,03±0,48	0
Relación Prot/Lip (mg/mg)	0,128±0,115	-	-	-	-
Z Ave (nm)	183±46	-	-	169±19	-
Pdl	0,380±0,050	-	-	0,357±0,112	-
Potencial Z (mV)	-35,4±4,5	-	-	-38,6±4,4	-

La relación proteína/lípido para los ARQ-Tc mostró una elevada dispersión.

5.10 Inmunización

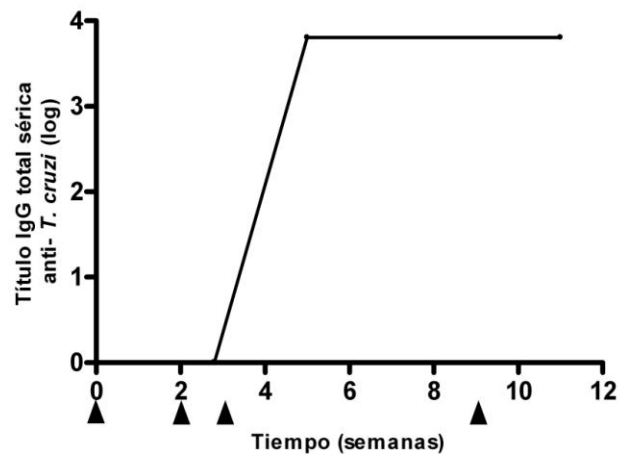


Fig.5.4 Título de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* (IgG total sérica) del ratón que respondió a la inmunización con ARQ-Tc. Los triángulos negros indican las inmunizaciones primaria (día 0) y secundarias (días 14; 21 y 63) por ruta oral.

De los 15 animales que se inocularon con Tc (grupos I; II y III) sólo uno, perteneciente al grupo I (ARQ-Tc), tuvo títulos elevados de IgG sérica (≥ 6400) a partir de la quinta semana (14 dpi). Como se muestra en la Fig.5.4, este título se mantuvo luego de 14 días de la cuarta dosis (semana 11).

Ningún ratón mostró títulos positivos de IgA en saliva.

El AdDP se utilizó como adyuvante por vía mucosa. De este modo, se lo utilizó como control positivo de la inmunización (Becker et al., 2001; Becker et al., 2007; Bertot et al., 2007). Dado que no se obtuvo seroconversión con este adyuvante de mucosas, se evaluó la capacidad adyuvante del AdDP por vía intraperitoneal tanto con BSA como con Tc. Como se observa en la Fig.5.5, se obtuvieron títulos elevados en cada caso, compatibles con el efecto adyuvante del AdDP.

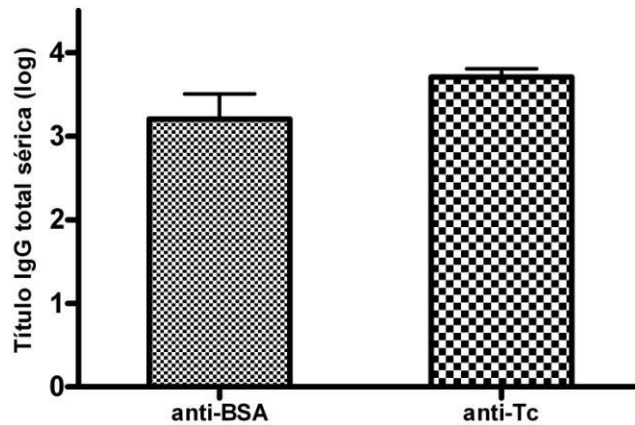


Fig.5.5 Inmunización intraperitoneal con AdDP

Discusión

La inmunización por ruta oral es uno de los objetivos más buscados del campo de la adyuvancia inmunológica. Sin embargo y a pesar del peligro de reversión asociado hasta el momento, muy pocas aproximaciones experimentales han rendido el éxito obtenido mediante el empleo del virus atenuado de la poliomielitis (vacuna Sabin). Mas aún, como ya se discutió extensamente, los muy pocos poderosos adyuvantes experimentales aptos para la ruta oral, tienden a desencadenar incómodas reacciones secundarias (diarrea, fiebre, etc.), motivo de su descarte en la vacunación profiláctica de pacientes humanos sanos. En nuestro caso, hemos intentado demostrar que los ARQ, carentes de actividad tóxica o de toda estructura que pudiera funcionar como ligando de TLR, pueden emplearse como adyuvantes para la ruta oral. Los resultados de esta primera aproximación han sido poco alentadores. Sin embargo, vale la pena resaltar los siguientes hechos:

1. En nuestros experimentos detectamos una falta de respuesta del grupo control positivo (Tc-AdDP), lo que nos hizo sospechar que la bien probada capacidad adyuvante para la ruta oral del AdDP, estuviera disminuida. Sin embargo, cuando empleamos el mismo batch de AdDP para inmunizar intraperitonealmente ratones, hallamos un sustancial aumento de títulos de IgG total sérica específica tanto contra Tc como contra BSA.
2. Los experimentos *in vitro* desarrollados en la Sección 4.14 mostraron que los ARQ protegerían el antígeno (Tc) frente al pasaje por el tracto gastrointestinal. Tampoco los arqueolípidos fueron degradados cuando se incubaron en similares condiciones. En consecuencia, la falta de respuesta inmunológica no podría adjudicarse a la pérdida de la estabilidad química de antígeno ni de adyuvante.
3. En cuanto a la dosis de antígeno administrada, que fue del orden de los 200 µg proteína/ratón, estaba en el rango de lo reportado en estudios previos, donde se inmunizó por ruta oral con OVA (50 µg proteína/ratón) y AdDP (Becker et al., 2001)

y fue menor que la dosis de OVA incorporada a ARQ, administrada oralmente a ratones (1 mg proteína/ratón (Li et al., 2011).

4. Nuestros resultados mostraron una respuesta inmune errática, en coincidencia con resultados preliminares no publicados de nuestro grupo. Luego de administrar, a un número pequeño de animales, ARQ-Tc conteniendo diferentes dosis (15 y 150 µg proteína/ratón), tanto ratones del grupo inmunizado con Tc-AdDP (2 de 2 ratones) como con ARQ-Tc (2 de 3 ratones) presentaron títulos elevados de IgG total sérica anti-*T. cruzi*, aunque no se sostuvieron en el tiempo (Fig. 5.6).

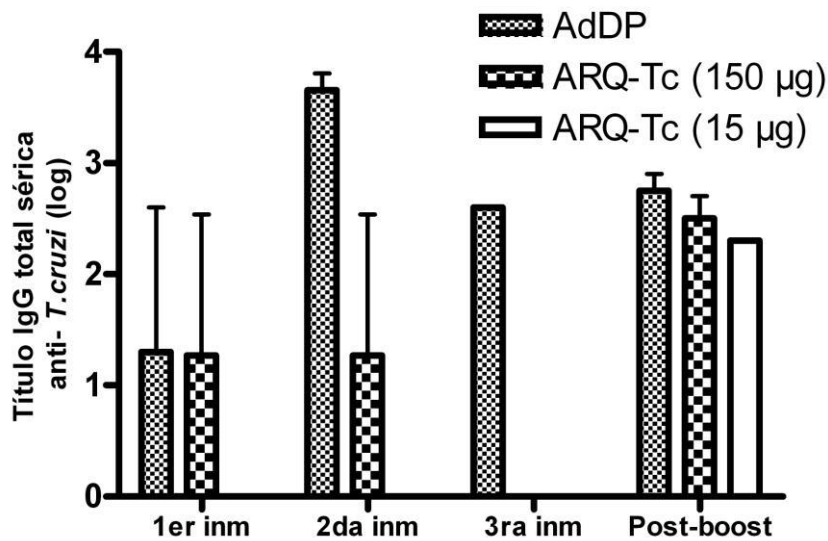


Fig. 5.6 Títulos de Ac específicos anti-*T. cruzi* (IgG sérica)
Resultados preliminares no publicados.

Estos hechos no explican por sí mismos los resultados obtenidos. Los ARQ, que *in vitro* fueron ampliamente capturadas por células M en comparación con liposomas de fosfatidilcolina, y que *in vivo* generaron una intensa respuesta inmunológica sistémica, luego de la administración subcutánea a ratones (Higa et al., 2013), en efecto, generaron una respuesta inmune luego de su administración oral, aunque fue positiva únicamente en uno de cinco ratones. Llamativamente además, ninguno de los ratones inmunizados oralmente con AdDP manifestó reacción alguna, aunque el AdDP mantenía intacta su capacidad adyuvante para la vía oral. Una potencial explicación a estas cuestiones podría darlas el diseño experimental de este trabajo. Específicamente, se trata de la interferencia del material ingerido con el potencial *binding* con las células M de los adyuvantes orales. En nuestro caso, notamos que si bien los animales fueron sometidos a un ayuno previo, no existió control posterior de la ingesta de alimento. Más aún, existen pocos reportes donde se discuta la relación entre la absorción de material particulado y la ingesta de alimento. En la bibliografía sólo se señalan las condiciones de ayuno y nada se dice sobre el efecto de la ingesta de alimento posterior a la inmunización por ruta oral. En este sentido, las diferencias interindividuales en la composición, el pH y el espesor de la capa de mucus, en la flora

gastrointestinal y en el tiempo de residencia complican los experimentos *in vivo* (Frohlich y Roblegg, 2012) ya que estas variables afectarían la absorción del material particulado administrado por la ruta oral (Sugihara et al., 2012). Nosotros especulamos que los resultados erráticos se debieron a la ausencia de control del acceso al alimento post inmunización. Esto no ocurrió en los experimentos de administración oral de ARQ a ratas, mostrados en el Capítulo 4, ya que los animales fueron privados de alimento varias horas antes de la administración y continuaron sin alimentarse las subsiguientes 4 horas, hasta que fueron sacrificados. En tales condiciones, llegamos a observar la llegada a la sangre del material particulado.

La influencia del alimento sobre las condiciones gastrointestinales se debería considerar al evaluar una formulación oral (Sugihara et al., 2012). Las variaciones en la absorción del material particulado se puede deber a varios efectos diferentes. En primer lugar, correspondería tenerse en cuenta el efecto del alimento en el vaciado gástrico, ya que las variaciones en la velocidad en que el alimento es presentado al intestino delgado influirán sobre la absorción de las partículas. En segundo lugar, el material particulado podría interactuar con el alimento en el lumen intestinal, adhiriéndose o absorbiéndose con él (Washington N., 2001). Las interacciones pueden clasificarse en cinco categorías: aquellas que causan reducción, retardo, aumento y absorción acelerada y aquellas que no tienen efecto (Welling, 1996). La presencia de comida en el estómago altera la motilidad gástrica a un patrón típico postprandial, durante el cual la secreción gástrica y el tiempo de residencia aumentan. La duración de la fase postprandial varía con el volumen, estructura física y composición del quimo (Winstanley y Orme, 1989). La presencia de un quimo viscoso podría actuar como una barrera física y así reducir el acceso de las partículas al epitelio intestinal para ser capturadas por las células M (Washington N., 2001).

En nuestro caso, consideramos que la respuesta de uno cada cinco animales inmunizados con ARQ y la falta de respuesta de los inmunizados con AdDP es la consecuencia del acceso inmediato al alimento que tuvieron los ratones al finalizar la inmunización, más allá de que los roedores pueden no ser modelos experimentales ideales. Aunque los humanos y los roedores son omnívoros, la fisiología (p.ej. la región de absorción de los alimentos) y morfología del TGI (p.ej. ausencia de vesícula en ratas) muestran considerables diferencias (Kararli, 1995).

Por otro lado, la medida de IgA en secreciones de mucosa tiene algunas limitaciones, como la laboriosa recolección de muestra y la dificultosa estandarización de su medida que pueden traer aparejada la falta de detección (Macpherson et al., 2008). Esto podría ser otra explicación de los títulos negativos en saliva de Ac IgA anti-*T. cruzi* presentados en este trabajo. Una alternativa posible sería la medición de los Ac específicos secretados en medio de cultivo luego de la incubación de linfocitos circulantes, a través de la técnica de ELISA (Sedgmen et al., 2003).

Finalmente, para evaluar la efectividad de una vacuna antichagásica se deben realizar desafíos *in vivo* con parásitos de *T. cruzi*. Dada la limitada eficacia protectora reportada con el uso de *cocktails* de proteínas, se debe poner especial atención en la selección de antígenos candidatos para futuros abordajes experimentales (Bhatia y Garg, 2008).

Capítulo 6

CONCLUSIONES

La ciencia es un proceso que nos permite descorrer los múltiples velos que cubren la verdad. Cuando los científicos levantan un velo, a menudo, terminan por encontrar uno nuevo. Sin embargo, cuando uno de ellos es afortunado, al quitar un velo a veces puede entrever la verdad. Pero es preciso ser consciente de que cada velo que se descubre es igualmente importante, por lo que no es justo que sólo el afortunado sea reconocido

(Shinya Yamanaka)

En este trabajo de Tesis doctoral hemos abordado el desafío de emplear un producto natural (lípidos polares totales (LPT) de membrana plasmática de arqueobacterias) para preparar vesículas liposomales (arqueosomas, ARQ). Nuestro grupo de trabajo, en particular a lo largo de la Tesis doctoral de la Lic. Leticia H. Higa en el año 2012, ya había resuelto aceptablemente el problema de cosechar una masa suficientemente importante de LPT, como para llevar a cabo experimentos de incubación *in vitro* y también administrar ARQ a ratones por ruta parenteral. En este contexto, en el Capítulo 2 se aplicó por primera vez el diseño factorial experimental para preparar ARQ mediante el método de homogeneización de alta presión (HPH). En dicho capítulo se incluye la descripción de la preparación de ARQ conteniendo ovoalbúmina (ARQ- OVA) a escala de laboratorio. Los mismos se emplearían más tarde en la determinación de la capacidad de ARQ-OVA para penetrar la piel intacta (Carrer et al., 2014). En definitiva, la importancia de este capítulo radica en haber aplicado exitosamente la técnica de HPH —una de las pocas que permite obtener vesículas lipídicas a gran escala— para la preparación de ARQ. En la sección inicial de esta Tesis por lo tanto, mostramos que los ARQ podrían ser producidos industrialmente, requisito imprescindible para preparar cualquier producto factible de patentarse.

En el Capítulo 3 se muestran los resultados del estudio de los mecanismos de captura y tráfico intracelular de ARQ por parte de células Caco-2, empleando inhibidores endocíticos y marcadores de tráfico intracelular. Estos resultados son parte de un manuscrito en preparación, donde mostramos que aparentemente, las células Caco-2 capturarían ARQ mediante endocitosis mediada por caveolina y macropinocitosis. Hallamos además que las células J774A.1, empleadas como modelo de macrófago, capturan ARQ no sólo mediante la clásica fagocitosis, sino también por endocitosis mediada por clatrina y por caveolina. Curiosamente, observamos que la fagocitosis se desplegó para capturar ARQ que por su tamaño —alrededor de 100 nm de diámetro— deberían ser endocitados por vías pinocíticas, que además resultaron ser varias. Estos

resultados explicarían por qué los ARQ son ampliamente capturados por células J774A.1, ya que revelan que además de fagocitosis, intervienen otros mecanismos de captura. Un tipo particular de endocitosis mediada por clatrina, la dependiente del receptor de manosa, expresado basalmente por la línea J774A.1 (Fiani et al., 1998), sería responsable de la veloz captura de material manosilado, como son algunos de los LPT de ARQ (Gazi y Martinez-Pomares, 2009). Observamos también que la intervención de múltiples rutas endocíticas dificulta enormemente el seguimiento del tráfico intracelular de los ARQ en J774A.1. Respecto de los enterocitos, que a diferencia de J774A.1, no capturan extensamente ARQ. Así, en células Caco-2 encontramos tanto intervención de macropinocitosis como de endocitosis mediada por caveolina. Este último mecanismo estaría asociado a procesos de transcitosis, como ocurre por parte de células endoteliales vasculares y cardíacas (Frank et al., 2009). Estos estudios sin embargo, no fueron llevados a cabo sobre verdaderos modelos de barrera epitelial intestinal, como son los co-cultivos de enterocitos y linfocitos que permiten la diferenciación en células símil M. Por lo tanto, si bien tenemos indicios de los mecanismos intervinientes en la captura de ARQ por enterocitos, los desconocemos para células M. Estas últimas estarían involucradas en los procesos de transcitosis de material particulado, que sería capturado en el lado luminal, para exocitarse en el bolsillo basolateral, donde accedería físicamente a las APC residentes bajo el epitelio. Su captura por células dendríticas inmaduras, sería el primer paso hacia el desencadenamiento de una reacción inmune mucosa y potencialmente sistémica. Nosotros únicamente pudimos revelar que los enterocitos son capaces de capturar ARQ por diferentes tipos de endocitosis. Pero, al igual que otros investigadores (Asai y Morrison, 2013), también hallamos que la determinación del tráfico intracelular mediante inhibidores de endocitosis y marcadores de tráfico resultó un trabajo complejo y poco reproducible que desalentó el abordaje de un estudio similar sobre células símil M.

A pesar de tal carencia, en el Capítulo 4 llevamos a cabo un estudio comparativo de la captura de ARQ y liposomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada/colesterol, con un modelo *in vitro* de barrera epitelial intestinal que expresa células símil-M (co-cultivos Caco-2/Raji). Asimismo, se determinó la biodistribución comparativa del radiofármaco hidrosoluble impermeante ^{99m}Tc-DTPA libre o incorporado a ARQ y a liposomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada/colesterol, luego de su administración oral en ratas. Cabe señalar que en este estudio, el diámetro de la población vesicular empleada fue de unos 500-600 nm, en tanto en el Capítulo 3 se emplearon ARQ y liposomas extruidos de unos 100 nm de diámetro. Esta diferencia de tamaño excluiría prácticamente todas las capturas endocíticas exceptuando la fagocitosis y la endocitosis mediada por caveolina, esta última presumiblemente involucrada en procesos de transcitosis. *In vitro*, hallamos que las intensidades de fluorescencia de Rh-PE y de HPTS en ARQ cuadruplicó a las de

liposomas convencionales. Esto sugeriría que las células símil M capturarían a los ARQ con mayor avidez que a los liposomas convencionales. Más aún, el hallazgo de una fracción de sonda fluorescente hidrosoluble en el compartimiento basal de la monocapa, podría considerarse indicativo de transcitosis de ARQ a través de células símil M. A pesar de haber llevado a cabo estos estudios de captura sobre un modelo de barrera que carecía de capa de mucus —lo que no nos permitió evaluar el rol de la mucopenetrabilidad del material particulado— los resultados *in vitro* fueron sustentados por los hallazgos *in vivo*, donde se determinó la biodistribución de ^{99m}Tc-DTPA tanto libre como incorporado a ARQ o a liposomas. Efectivamente, hallamos que luego de administrado oralmente libre o en liposomas, el ^{99m}Tc-DTPA permaneció principalmente en el TGI. Cuando fue administrado en ARQ en cambio, su permanencia en el TGI fue cerca de tres veces menor (un 20 % vs 60-70% de la marca radiactiva total, indicativo de un potencial proceso de absorción), apareció un 22 % en sangre (en tanto no lo hizo en forma libre o incorporado a liposomas, nuevamente indicativo de una potencial absorción) y también un 20 % en orina (en tanto no lo hizo en forma libre o incorporado a liposomas, nuevamente indicativo de una potencial absorción). En su conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que los ARQ podrían ser capturados, tanto en el lado apical de las monocapas o luminal del TGI, presumiblemente mediante células símil M, para ser transcitados al otro lado de la barrera epitelial. Sumado esto a la capacidad de los ARQ para proteger la estructura de proteínas incorporadas a su interior frente a la digestión gastrointestinal simulada y a la inocuidad de la misma sobre la estructura química de los arqueolípidos, consideramos contar con las razones suficientes como para esperar que los ARQ conteniendo antígenos proteicos en su interior, pudieran inducir una respuesta inmune sistémica antígeno dependiente luego de su administración oral a ratones.

En el Capítulo 5 mostramos los resultados de una primera prueba de concepto, donde testamos la reacción inmunológica generada luego de la administración oral a ratones de ARQ conteniendo proteínas solubles de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados fueron relativamente alentadores, ya que obtuvimos una reacción sistémica antígeno dependiente y sostenida en el tiempo en sólo uno de los cinco ratones inmunizados con ARC-Tc. Como discutimos extensamente al final de dicho capítulo, futuros ensayos deberán llevarse a cabo a partir de un diseño experimental diferente, que contemple no sólo ayuno previo sino también un mínimo de cuatro horas sin acceso al alimento después de la inmunización oral.

En suma, si bien quedan muchos aspectos por explorar —determinando el/los mecanismo/s de captura de material particulado por parte de células M o símil M, relevando el rol de los enterocitos en la captura de material particulado en el rango de 100 nm de diámetro, llevando a cabo ensayos previos de mucopenetración y/o de mucoadhesividad y luego correlacionándolos con la unión y captura por células del FAE,

entre otros— claramente la información reunida en esta Tesis es suficiente como para proponer a los ARQ como vesículas capaces de generar reacciones inmunes sistémicas luego de su administración oral. Notablemente, los ARQ no poseen componentes que puedan ser ligandos de TLR y por lo tanto no pueden clasificarse como inmunomoduladores. Sin embargo, trabajos recientemente publicados por nuestro grupo mostraron que asociados a material pobremente antigénico son capaces de generar una intensa producción de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6 por parte de células J774A.1, aún en mayor extensión que la producida por LPS, el conocido ligando de TLR4. Dentro de los desafíos futuros se encuentra la comprensión de los mecanismos subyacentes a su actividad y hallar las condiciones experimentales adecuadas para conseguir una inmunización eficiente.

Bibliografía

- Altin, J.G., Parish, C.R., 2006. Liposomal vaccines-targeting the delivery of antigen. *Methods* 40, 39-52.
- Álvarez, M.N., Peluffo, G., Piacenza, L., Radi, R., 2011. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem* 286, 6627-6640.
- Amin, M., Jaafari, M.R., Tafaghodi, M., 2009. Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. *Colloids Surf B Biointerfaces* 74, 225-229.
- Andar, A.U., Hood, R.R., Vreeland, W.N., Devoe, D.L., Swaan, P.W., 2014. Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms. *Pharm Res* 31, 401-413.
- Aoki, T., Nomura, R., Fujimoto, T., 1999. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp Cell Res* 253, 629-636.
- Araki, N., Johnson, M.T., Swanson, J.A., 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135, 1249-1260.
- Arora, D., Goyal, A., Paliwal, S.R., Khurana, B., Vyas, P., 2010. Oral Mucosal Immunization: Recent Advancement and Future Prospects. *Curr Immunol Rev* 6, 234-259.
- Asai, T., Morrison, S.L., 2013. The SRC family tyrosine kinase HCK and the ETS family transcription factors SPIB and EHF regulate transcytosis across a human follicle-associated epithelium model. *J Biol Chem* 288, 10395-10405.
- Auguet, J.C., Barberan, A., Casamayor, E.O., 2009. Global ecological patterns in uncultured *Archaea*. *ISME J* 4, 182-190.
- Bachmann, M.F., Jennings, G.T., 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10, 787-796.

- Banerjee, T., Mitra, S., Kumar Singh, A., Kumar Sharma, R., Maitra, A., 2002. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 243, 93-105.
- Bareford, L.M., Swaan, P.W., 2007. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 748-758.
- Barnadas-Rodriguez, R., Sabes, M., 2001. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *Int J Pharm* 213, 175-186.
- Barnadas Rodriguez, R., Sabes Xamani, M., 2003. Liposomes prepared by high-pressure homogenizers. *Methods Enzymol* 367, 28-46.
- Basith, S., Manavalan, B., Lee, G., Kim, S.G., Choi, S., 2011. Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). *Expert Opin Ther Pat* 21, 927-944.
- Becker, P.D., Corral, R.S., Guzman, C.A., Grinstein, S., 2001. Adamantylamide dipeptide as effective immunoadjuvant in rabbits and mice. *Vaccine* 19, 4603-4609.
- Becker, P.D., Norder, M., Guzman, C.A., Grinstein, S., 2007. Immune modulator adamantylamide dipeptide stimulates efficient major histocompatibility complex class I-restricted responses in mice. *Clin Vaccine Immunol* 14, 538-543.
- Bermejo, D.A., Amezcua Vesely, M.C., Khan, M., Acosta Rodriguez, E.V., Montes, C.L., Merino, M.C., Toellner, K.M., Mohr, E., Taylor, D., Cunningham, A.F., Gruppi, A., 2011. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* 132, 123-133.
- Bernardi, A., Frozza, R.L., Hoppe, J.B., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Battastini, A.M., Guterres, S.S., 2013. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int J Nanomedicine* 8, 711-728.
- Bertot, G.M., Restelli, M.A., Galanternik, L., Aranibar Urey, R.C., Valvano, M.A., Grinstein, S., 2007. Nasal immunization with *Burkholderia multivorans* outer membrane proteins and the mucosal adjuvant adamantylamide dipeptide confers efficient protection against experimental lung infections with *B. multivorans* and *B. cenocepacia*. *Infect Immun* 75,

2740-2752.

- Bhatia, V., Garg, N.J., 2008. Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine Immunol* 15, 1158-1164.
- Biltonen, R.L., Lichtenberg, D., 1993. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids* 64, 129-142.
- Blanco, M.D., Alonso, M.J., 1997. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm* 43, 287-294.
- Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Puglia, C., Bonina, F., Rossi, C., Ricci, M., 2011. Lipid nanoparticles for brain targeting I. Formulation optimization. *Int J Pharm* 419, 287-295.
- Borges, O., Borchard, G., Verhoef, J.C., de Sousa, A., Junginger, H.E., 2005. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm* 299, 155-166.
- Böttcher, C.J.F., gent, C.M.V., Pries, C., 1961. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal Chim Acta* 24, 203-204.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandtzaeg, P., 2007. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25, 5467-5484.
- Brayden, D.J., 2001. Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *Eur J Pharm Sci* 14, 183-189.
- Brayden, D.J., Baird, A.W., 2001. Microparticle vaccine approaches to stimulate mucosal immunisation. *Microbes Infect* 3, 867-876.
- Brayden, D.J., Jepson, M.A., Baird, A.W., 2005. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 10, 1145-1157.

- Bruno, R.P., McIlwrick, R., 2001. Microfluidizer processor technology for high performance particle size reduction, mixing and dispersion. In: Müller, R.H., Böhm, B.H. (Eds.), 4th, Colloidal
- Drug Carriers; Dispersion techniques for laboratory and industrial scale processing. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, pp. 77-90.
- Buda, A., Sands, C., Jepson, M.A., 2005. Use of fluorescence imaging to investigate the structure and function of intestinal M cells. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 123-134.
- Carrer, D.C., Higa, L.H., Defain Tesoriero, M.V., Morilla, M.J., Roncaglia, D.I., Romero, E.L., 2014. Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. En prensa.
- Cavicchioli, R., Curmi, P.M., Saunders, N., Thomas, T., 2003. Pathogenic archaea: do they exist? *Bioessays* 25, 1119-1128.
- Cazorla, S.I., Frank, F.M., Malchiodi, E.L., 2009. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev Vaccines* 8, 921-935.
- Ceballos, L.A., Cardinal, M.V., Vazquez-Prokopec, G.M., Lauricella, M.A., Orozco, M.M., Cortinas, R., Schijman, A.G., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., 2006. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop* 98, 286-296.
- Cerutti, A., 2008. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8, 421-434. Cerutti, A., 2010. Immunology. IgA changes the rules of memory. *Science* 328, 1646-1647.
- Clark, M.A., Jepson, M.A., Hirst, B.H., 2001. Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 50, 81-106.
- Cone, R., 1999. Mucus. In: Michael, W.S., Lamm, E., McGhee, J.R., Mayer, L., Mestecky, J., Bienenstock, J. (Eds.), *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 43-64.
- Conlan, J.W., Krishnan, L., Willick, G.E., Patel, G.B., Sprott, G.D., 2001. Immunization of mice with lipopeptide antigens encapsulated in novel liposomes prepared from the polar lipids of various Archaeobacteria elicits rapid and prolonged specific protective immunity against infection with the facultative intracellular pathogen, *Listeria monocytogenes*.

Vaccine 19, 3509-3517.

Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.

Constantinides, P.P., Chaubal, M.V., Shorr, R., 2008. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 757-767.

Corcelli, A., Colella, M., Mascolo, G., Fanizzi, F.P., Kates, M., 2000. A novel glycolipid and phospholipid in the purple membrane. *Biochemistry* 39, 3318-3326.

Corcelli, A., Lattanzio, V.M., Mascolo, G., Babudri, F., Oren, A., Kates, M., 2004. Novel sulfonolipid in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Appl Environ Microbiol* 70, 6678-6685.

Corcelli, A., Lobasso, S., 2006. Characterization of Lipids of halophilic *Archaea*. In: Rainey, F.A., Oren, A. (Eds.), *Method in Microbiology: Extremophiles*. Academic Press, London, pp. 585-613.

Correia-Pinto, J.F., Csaba, N., Alonso, M.J., 2013. Vaccine delivery carriers: insights and future perspectives. *Int J Pharm* 440, 27-38.

Corthesy, B., 2007. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol* 178, 27-32.

Couch, R.B., 2004. Nasal vaccination, *Escherichia coli* enterotoxin, and Bell's palsy. *N Engl J Med* 350, 860-861.

Cox, E., Verdonck, F., Vanrompay, D., Goddeeris, B., 2006. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Vet Res* 37, 511-539.

Crampton, A., Vanniasinkam, T., 2007. Parasite vaccines: the new generation. *Infect Genet Evol* 7, 664-673.

Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., Alonso, M.J., 2006. The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 3, 463-478.

Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., Alonso, M.J., 2009. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 140-157.

- Cyster, J.G., 2003. Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* 194, 48-60.
- Chadwick, S., Kriegel, C., Amiji, M., 2010. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 394-407.
- Chaudhuri, T.K., 1974. Use of ^{99m}Tc-DTPA for measuring gastric emptying time. *J Nucl Med* 15, 391-395.
- Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 1995. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376, 177-180.
- Chen, Y., Inobe, J., Weiner, H.L., 1997. Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model. *Cell Immunol* 178, 62-68.
- Chong, P.L., Ayesa, U., Daswani, V.P., Hur, E.C., 2012. On physical properties of tetraether lipid membranes: effects of cyclopentane rings. *Archaea* 2012, 138439.
- de Alencar, B.C., Persechini, P.M., Haolla, F.A., de Oliveira, G., Silverio, J.C., Lannes-Vieira, J., Machado, A.V., Gazzinelli, R.T., Bruna-Romero, O., Rodrigues, M.M., 2009. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime- recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* 77, 4383-4395.
- De Magistris, M.T., 2006. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 52-67.
- De Temmerman, M.-L., Rejman, J., Demeester, J., Irvine, D.J., Gander, B., De Smedt, S.C., 2011. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discovery Today* 16, 569-582.
- Delgado, A.V., Gonzalez-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K., Lyklema, J., 2007. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J Colloid Interface Sci* 309, 194-224.
- Delgado, A.V., González-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K., Lyklema, J., 2005. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical

Report). *Pure Appl Chem* 77, 1753-1805.

Deming, S.N., Morgan, S.L., 1987. *Experimental design: a chemometric approach*. Elsevier, Amsterdam.

des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., Preat, V., 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release* 116, 1-27.

des Rieux, A., Fievez, V., Theate, I., Mast, J., Preat, V., Schneider, Y.J., 2007. An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *Eur J Pharm Sci* 30, 380-391.

Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I.C., Lang, A.B., Viret, J.F., 2003. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21, 678-683.

Driscoll, D.F., 2006. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharm Res* 23, 1959-1969.

Dubbel, H., 1955. *Manual del constructor de Máquinas*. Editorial Labor, Barcelona-Madrid.
Dumonteil, E., 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J Biomed Biotechnol* 2007, 90520.

Dumonteil, E., Bottazzi, M.E., Zhan, B., Heffernan, M.J., Jones, K., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Ortega, J., Rosales, S.P., Lee, B.Y., Bacon, K.M., Fleischer, B., Slingsby, B.T., Cravioto, M.B., Tapia-Conyer, R., Hotez, P.J., 2012. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines* 11, 1043-1055.

Dunphy, J.L., Balic, A., Barcham, G.J., Horvath, A.J., Nash, A.D., Meeusen, E.N., 2000. Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin. *J Biol Chem* 275, 32106-32113.

Eckburg, P.B., Lepp, P.W., Relman, D.A., 2003. *Archaea* and their potential role in human disease. *Infect Immun* 71, 591-596.

Eldridge, J.H., Meulbroek, J.A., Staas, J.K., Tice, T.R., Gilley, R.M., 1989. Vaccine-containing biodegradable microspheres specifically enter the gut-associated lymphoid tissue

following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. *Adv Exp Med Biol* 251, 191-202.

Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., Tice, T.R., Gilley, R.M., 1991. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 59, 2978-2986.

Ermak, T.H., Giannasca, P.J., 1998. Microparticle targeting to M cells. *Adv Drug Deliv Rev* 34, 261-283.

Estelrich, J., Gallardo, M., 2000. Zeta potential and its applications. *Afinidad* 57, 25-30.
European Medicines Agency (EMA), 2014. Dukoral.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000476/human_med_000745.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

Fan, H., Xue, Y., Ma, Y., Ventosa, A., Grant, W.D., 2004. *Halorubrum tibetense* sp. nov., a novel haloalkaliphilic archaeon from Lake Zabuye in Tibet, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1213- 1216.

Felnerova, D., Viret, J.F., Gluck, R., Moser, C., 2004. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 15, 518-529.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.

Fiani, M.L., Beitz, J., Turvy, D., Blum, J.S., Stahl, P.D., 1998. Regulation of mannose receptor synthesis and turnover in mouse J774 macrophages. *J Leukoc Biol* 64, 85-91.

Fievez, V., Plapied, L., des Rieux, A., Pourcelle, V., Freichels, H., Wascotte, V., Vanderhaeghen, M.L., Jerome, C., Vanderplasschen, A., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y.J., Preat, V., 2009. Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm* 73, 16-24.

Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L., McKenzie, I.F., Plebanski, M., 2004. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 173, 3148-3154.

- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T., 2003. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121-1131.
- Flanary, S., Hoffman, A.S., Stayton, P.S., 2009. Antigen delivery with poly(propylacrylic acid) conjugation enhances MHC-1 presentation and T-cell activation. *Bioconjug Chem* 20, 241-248.
- Flegel, M., Seifert, J., Farghali, H., 1986. Synthesis and pharmacological properties of adamantylamide analogs of muramyl-dipeptide. In: Theodoropoulos, D. (Ed.), *Peptides*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 561-564.
- Florence, A.T., 1997. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res* 14, 259-266.
- Floury, J., Bellettre, J.m., Legrand, J., Desrumaux, A., 2004. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science* 59, 843-853.
- Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., Sundblad, A., 2005. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 298, 315-322.
- Foster, N., Hirst, B.H., 2005. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 431-450.
- Frank, P.G., Pavlides, S., Lisanti, M.P., 2009. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 335, 41-47.
- Franzmann, P.D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J.K., Cameron, D.E., Stevenson, P.L., McMeekin, T.A., Burton, H.R., 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a Halophilic Bacterium Isolated from Deep Lake, Antarctica. *Sys Appl Microbiol* 11, 20-27.
- Friede, M., Aguado, M.T., 2005. Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 325-331.
- Frohlich, E., Roblegg, E., 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products.

Toxicology 291, 10-17.

Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *J Biosci Bioeng* 94, 518-525.

Garinot, M., Fievez, V., Pourcelle, V., Stoffelbach, F., des Rieux, A., Plapied, L., Theate, I., Freichels, H., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y.J., Preat, V., 2007. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Control Release* 120, 195-204.

Gazi, U., Martinez-Pomares, L., 2009. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554-561.

Gebert, A., Rothkotter, H.J., Pabst, R., 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167, 91-159.

Gebert, A., Steinmetz, I., Fassbender, S., Wendlandt, K.H., 2004. Antigen transport into Peyer's patches: increased uptake by constant numbers of M cells. *Am J Pathol* 164, 65-72.

Gibbons, N.E., 1974. Family V. Halobacteriaceae fam. nov. In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn. Williams & Wilkins, Baltimore.

Giudice, E.L., Campbell, J.D., 2006. Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 68-89. Glueck, R., 2001. Pre-clinical and clinical investigation of the safety of a novel adjuvant for intranasal immunization. *Vaccine* 20 Suppl 1, S42-44.

Gomez, S., Gamazo, C., Roman, B.S., Ferrer, M., Sanz, M.L., Irache, J.M., 2007.

Gantrez AN nanoparticles as an adjuvant for oral immunotherapy with allergens. *Vaccine* 25, 5263-5271.

González Cappa, S.M., Durante de Isola, E.L., Mirkin, G.A., 1996. Inmunología de las infecciones parasitarias. In: Margni, R.A. (Ed.), *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos* Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 521-530.

Gonzalez, R.O., Higa, L.H., Cutrullis, R.A., Bilén, M., Morelli, I., Roncaglia, D.I., Corral, R.S.,

- Morilla, M.J., Petray, P.B., Romero, E.L., 2009. Archaeosomes made of *Halorubrum tebenquichense* total polar lipids: a new source of adjuvancy. *BMC Biotechnol* 9, 71.
- Gullberg, E., Leonard, M., Karlsson, J., Hopkins, A.M., Brayden, D., Baird, A.W., Artursson, P., 2000. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 808-813.
- Gurnani, K., Kennedy, J., Sad, S., Sprott, G.D., Krishnan, L., 2004. Phosphatidylserine receptor-mediated recognition of archaeosome adjuvant promotes endocytosis and MHC class I cross-presentation of the entrapped antigen by phagosome-to-cytosol transport and classical processing. *J Immunol* 173, 566-578.
- Gutierrez, I., Hernandez, R.M., Igartua, M., Gascon, A.R., Pedraz, J.L., 2002. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine* 21, 67-77.
- Halleux, C., Schneider, Y.J., 1991. Iron absorption by intestinal epithelial cells: 1. CaCo2 cells cultivated in serum-free medium, on polyethyleneterephthalate microporous membranes, as an in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A, 293-302.
- Hamilton, J.G., 1966. Paper chromatography of lipids. *Prog Chem Fats other Lipids* 8, 361-372.
- Hansen, S.G., Vieville, C., Whizin, N., Coyne-Johnson, L., Siess, D.C., Drummond, D.D., Legasse, A.W., Axthelm, M.K., Oswald, K., Trubey, C.M., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., Picker, L.J., 2009. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med* 15, 293-299.
- Hapfelmeier, S., Lawson, M.A., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., Geuking, M.B., Curtiss, R., 3rd, McCoy, K.D., Macpherson, A.J., 2010. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328, 1705-1709.
- Harandi, A.M., Medaglini, D., Shattock, R.J., 2010. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine* 28, 2363-2366.
- Harding, S.E., 2006. Trends in muco-adhesive analysis. *Trends Food Sci Technol* 17, 255-262. Hava, D.L., Brigl, M., van den Elzen, P., Zajonc, D.M., Wilson, I.A., Brenner, M.B.,

2005. CD1 assembly and the formation of CD1-antigen complexes. *Curr Opin Immunol* 17, 88-94.
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H.H., Helenius, A., 2010. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* 191, 615-629.
- Hehnly, H., Stamnes, M., 2007. Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Lett* 581, 2112-2118.
- Hermida, L.G., 2006. Preparación y caracterización de formulaciones liposomales para administración por vía oral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, Buenos Aires.
- Hermida, L.G., Roig, A., Bregni, C., Sabes-Xamani, M., Barnadas-Rodriguez, R., 2011. Preparation and characterization of iron-containing liposomes: their effect on soluble iron uptake by Caco-2 cells. *J Liposome Res* 21, 203-212.
- Hermida, L.G., Sabes-Xamani, M., Barnadas-Rodriguez, R., 2009. Combined strategies for liposome characterization during in vitro digestion. *J Liposome Res* 19, 207-219.
- Hewlett, L.J., Prescott, A.R., Watts, C., 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol* 124, 689-703.
- Higa, L., 2012. Arqueosomas ultradeformables como adyuvantes tópicos. Tesis doctoral. Programa de Nanomedicinas. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal.
- Higa, L.H., Corral, R.S., Morilla, M.J., Romero, E.L., Petray, P.B., 2013. Archaeosomes display immunoadjuvant potential for a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin Immunother* 9, 409-412.
- Hillaireau, H., Couvreur, P., 2009. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 66, 2873-2896.
- Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V., 2010. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech* 11, 1526-1540.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11, S45-53.

- Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikstrom, M.E., Jahnsen, F.L., 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8, 142-152.
- Hooke, A.M., Bellanti, J.A., Oeschger, M.P., 1985. Live attenuated bacterial vaccines: new approaches for safety and efficacy. *Lancet* 1, 1472-1474.
- Huang, M., Ma, Z., Khor, E., Lim, L.Y., 2002. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharm Res* 19, 1488-1494.
- Hussain, N., Jaitley, V., Florence, A.T., 2001. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev* 50, 107-142.
- Huth, U.S., Schubert, R., Peschka-Suss, R., 2006. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J Control Release* 110, 490-504.
- Igartua, M., Hernandez, R.M., Esquisabel, A., Gascon, A.R., Calvo, M.B., Pedraz, J.L., 1998. Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. *J Control Release* 56, 63-73.
- Ihara, K., Watanabe, S., Tamura, T., 1997. *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *Int J Syst Bacteriol* 47, 73-77.
- Ivanov, A.I., 2008. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440, 15-33.
- Iwasaki, A., 2010. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nat Rev Immunol* 10, 699-711.
- Jackson, R.J., Fujihashi, K., Xu-Amano, J., Kiyono, H., Elson, C.O., McGhee, J.R., 1993. Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant. *Infect Immun* 61, 4272-4279.
- Jain, S., Singh, P., Mishra, V., Vyas, S.P., 2005. Mannosylated niosomes as adjuvant-carrier system for oral genetic immunization against hepatitis B. *Immunol Lett* 101, 41-49.

- Jain, V., Vyas, S.P., Kohli, D.V., 2009. Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives. *Nanomedicine* 5, 334-344.
- Jepson, M.A., Simmons, N.L., O'Hagan, D.T., Hirst, B.H., 1993. Comparison of poly(DL-lactide-co-glycolide) and polystyrene microsphere targeting to intestinal M cells. *J Drug Target* 1, 245-249.
- Joseph, A., Louria-Hayon, I., Plis-Finarov, A., Zeira, E., Zakay-Rones, Z., Raz, E., Hayashi, T., Takabayashi, K., Barenholz, Y., Kedar, E., 2002. Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. *Vaccine* 20, 3342-3354.
- Jovani, M., Barbera, R., Farre, R., Martin de Aguilera, E., 2001. Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 49, 3480-3485.
- Junghanns, J.U., Muller, R.H., 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine* 3, 295-309.
- Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D.C., Melo, M.B., Ropert, C., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., 2010. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 12, e29.
- Kamekura, M., Dyll-Smith, M.L., Upasani, V., Ventosa, A., Kates, M., 1997. Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 47, 853-857.
- Kamekura, M., Kates, M., 1999. Structural diversity of membrane lipids in members of Halobacteriaceae. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 969-972.
- Kamekura, M., Seno, Y., Dyll-Smith, M., 1996. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*; gene cloning, expression and structural studies. *Biochim Biophys Acta* 1294, 159-167.

- Kandler, O., König, H., 1998. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* 54, 305-308.
- Kararli, T.T., 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* 16, 351-380.
- Karchev, T., Kabakchiev, P., 1984. M-cells in the epithelium of the nasopharyngeal tonsil. *Rhinology* 22, 201-210.
- Kates, M., 1978. The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Prog Chem Fats Other Lipids* 15, 301-342.
- Kates, M., 1992. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. In: Danson, M.J., Hough, D.W., Lunt, G.G. (Eds.), *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Portland Press and Chapel Hill, London, pp. 51-77.
- Kates, M., 1993a. Biology of halophilic bacteria, Part II. Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia* 49, 1027-1036.
- Kates, M., 1993b. Membrane lipids of *Archaea*. In: Kates, M., Kushner, D.J., Mathenson, A.T. (Eds.), *In The biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Elsevier, Amsterdam, pp. 261-295.
- Kates, M., 1996. Structural analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *J Microbiol Methods* 25, 113-128.
- Kates, M., Moldoveanu, N., Stewart, L.C., 1993. On the revised structure of the major phospholipid of *Halobacterium salinarium*. *Biochim Biophys Acta* 1169, 46-53.
- Katz, D.E., DeLorimier, A.J., Wolf, M.K., Hall, E.R., Cassels, F.J., van Hamont, J.E., Newcomer, R.L., Davachi, M.A., Taylor, D.N., McQueen, C.E., 2003. Oral immunization of adult volunteers with microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS6 antigen. *Vaccine* 21, 341-346.
- Kean, E.L., 1968. Rapid, sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of sulfatides. *J Lipid Res* 9, 319-327.

- Keck, C.M., Müller, R.H., 2008. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry- 90% of the published measurements are false. *Int J Pharm* 355, 150-163.
- Kelly, R.B., 1990. Microtubules, membrane traffic, and cell organization. *Cell* 61, 5-7.
- Kenney, R.T., Edelman, R., 2003. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2, 167-188.
- Kerneis, S., Caliot, E., Stubbe, H., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J., Pringault, E., 2000. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microbes Infect* 2, 1119-1124.
- Kharroub, K., Quesada, T., Ferrer, R., Fuentes, S., Aguilera, M., Boulahrouf, A., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M., 2006. *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1583-1588.
- Kitano, T., Onoue, T., Yamauchi, K., 2003. Archaeal lipids forming a low energy-surface on air- water interface. *Chem Phys Lipids* 126, 225-232.
- Koga, Y., 2011. Early evolution of membrane lipids: how did the lipid divide occur? *J Mol Evol* 72, 274-282.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K.M., Grinstein, S., 2010. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol* 188, 547-563.
- Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R., 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 301-332.
- Krishnan, L., Dicaire, C.J., Patel, G.B., Sprott, G.D., 2000a. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun* 68, 54-63.
- Krishnan, L., Gurnani, K., Dicaire, C.J., van Faassen, H., Zafer, A., Kirschning, C.J., Sad, S., Sprott, G.D., 2007. Rapid clonal expansion and prolonged maintenance of memory CD8+ T cells of the effector (CD44^{high}CD62L^{low}) and central (CD44^{high}CD62L^{high})

- phenotype by an archaeosome adjuvant independent of TLR2. *J Immunol* 178, 2396-2406.
- Krishnan, L., Sad, S., Patel, G.B., Sprott, G.D., 2000b. Archaeosomes Induce Long-Term CD8+ Cytotoxic T Cell Response to Entrapped Soluble Protein by the Exogenous Cytosolic Pathway, in the Absence of CD4+ T Cell Help. *J Immunol* 165, 5177-5185.
- Krishnan, L., Sad, S., Patel, G.B., Sprott, G.D., 2001. The potent adjuvant activity of archaeosomes correlates to the recruitment and activation of macrophages and dendritic cells in vivo. *J Immunol* 166, 1885-1893.
- Krishnan, L., Sprott, G.D., 2008. Archaeosome adjuvants: immunological capabilities and mechanism(s) of action. *Vaccine* 26, 2043-2055.
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 75, 1-18.
- Kunkel, E.J., Butcher, E.C., 2003. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3, 822-829.
- Kwon, Y.J., James, E., Shastri, N., Frechet, J.M., 2005. In vivo targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18264-18268.
- Lai, S.K., Hida, K., Man, S.T., Chen, C., Machamer, C., Schroer, T.A., Hanes, J., 2007. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non- degradative pathway. *Biomaterials* 28, 2876-2884.
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., Hanes, J., 2009a. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 86-100.
- Lai, S.K., Wang, Y.Y., Hanes, J., 2009b. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 158-171.
- Lake, R.A., Robinson, B.W., 2005. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 5, 397-405.
- Lakkaraju, A., Rahman, Y.E., Dubinsky, J.M., 2002. Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates the endocytosis of anionic liposomes in neurons. *J Biol Chem* 277,

15085-15092.

- Lamm, M.E., 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51, 311-340.
- Larché, M., Wraith, D.C., 2005. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med* 11, S69-76.
- Larsen, H., 1973. The fourth A. J. Kluyver memorial lecture delivered before the Netherlands Society for Microbiology on April 27th, 1972, at the Delft University of Technology, Delft. The halobacteria's confusion to biology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 39, 383-396.
- Lee, B.Y., Bacon, K.M., Connor, D.L., Willig, A.M., Bailey, R.R., 2010. The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e916.
- Li, Z., Zhang, L., Sun, W., Ding, Q., Hou, Y., Xu, Y., 2011. Archaeosomes with encapsulated antigens for oral vaccine delivery. *Vaccine* 29, 5260-5266.
- Liang, E., Kabcenell, A.K., Coleman, J.R., Robson, J., Ruffles, R., Yazdanian, M., 2001. Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using in vitro converted M cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 46, 93-101.
- Lizama, C., Monteoliva-Sanchez, M., Suarez-Garcia, A., Rosello-Mora, R., Aguilera, M., Campos, V., Ramos-Cormenzana, A., 2002. *Halorubrum tebenquichense* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 149-155.
- Look, M., Bandyopadhyay, A., Blum, J.S., Fahmy, T.M., 2010. Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 378-393.
- Lori, F., Trocio, J., Bakare, N., Kelly, L.M., Lisziewicz, J., 2005. DermaVir, a novel HIV immunisation technology. *Vaccine* 23, 2030-2034.
- Loveday, S.M., Sarkar, A., Singh, H., 2013. Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. *Trends Food Sci Technol* 33, 5-20.

- Luongo, D., D'Arienzo, R., Bergamo, P., Maurano, F., Rossi, M., 2009. Immunomodulation of gut-associated lymphoid tissue: current perspectives. *Int Rev Immunol* 28, 446-464.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E., Brandtzaeg, P., 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1, 11-22.
- Madigan, M.T., Oren, A., 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* 2, 265-269.
- Makala, L.H., Suzuki, N., Nagasawa, H., 2002. Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine. *Pathobiology* 70, 55-68.
- Malvern Instruments Ltd, 2014a. Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes. <http://www.malvern.com> Malvern, Technical notes.
- Malvern Instruments Ltd, 2014b. Zeta Potential: An Introduction in 30 Minutes. <http://www.malvern.com>. Malvern, Technical notes.
- Manconi, M., Mura, S., Sinico, C., Fadda, A.M., Vila, A.O., Molina, F., 2009. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 342, 53-58.
- Mann, J.F., Acevedo, R., Campo, J.D., Perez, O., Ferro, V.A., 2009a. Delivery systems: a vaccine strategy for overcoming mucosal tolerance? *Expert Rev Vaccines* 8, 103-112.
- Mann, J.F., Scales, H.E., Shakir, E., Alexander, J., Carter, K.C., Mullen, A.B., Ferro, V.A., 2006. Oral delivery of tetanus toxoid using vesicles containing bile salts (bilosomes) induces significant systemic and mucosal immunity. *Methods* 38, 90-95.
- Mann, J.F., Shakir, E., Carter, K.C., Mullen, A.B., Alexander, J., Ferro, V.A., 2009b. Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine* 27, 3643-3649.
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., Bachmann, M.F., 2008. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol* 38, 1404-1413.

- Manunta, M., Tan, P.H., Sagoo, P., Kashefi, K., George, A.J., 2004. Gene delivery by dendrimers operates via a cholesterol dependent pathway. *Nucleic Acids Res* 32, 2730-2739.
- Marciani, D.J., 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today* 8, 934-943.
- Marinetti, G.V., 1965. Chromatography of Lipids on Commercial Silica Gel Loaded Filter Paper. *J Lipid Res* 6, 315-317.
- Marks, D.L., Singh, R.D., Choudhury, A., Wheatley, C.L., Pagano, R.E., 2005. Use of fluorescent sphingolipid analogs to study lipid transport along the endocytic pathway. *Methods* 36, 186-195.
- Martins, S., Costa-Lima, S., Carneiro, T., Cordeiro-da-Silva, A., Souto, E.B., Ferreira, D.C., 2012a. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int J Pharm* 430, 216-227.
- Martins, S., Tho, I., Souto, E., Ferreira, D., Brandl, M., 2012b. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 45, 613-623.
- Mathai, J.C., Sprott, G.D., Zeidel, M.L., 2001. Molecular mechanisms of water and solute transport across archaebacterial lipid membranes. *J Biol Chem* 276, 27266-27271.
- Mathiowitz, E., Jacob, J.R., Jong, Y.R., Thanos, K.P., Yip, M., Sandor, C., Santos, M., Kreitz, M., Abramson, D., 2000. Particle uptake vs. polymer structure. *Control Release Society*, 252-253.
- Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W.J., King, J., Green, A.M., 1984. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochim Biophys Acta* 775, 169-174.
- Maznah, I., Jr., 1999. The use of Caco-2 cells as an in vitro method to study bioavailability of iron. *Malays J Nutr* 5, 31-45.
- McGenity, T.J., Grant, W.D., 1995. Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the Genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov.,

Halorubrum sodomense comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. Syst Appl Microbiol 18, 237-243.

McGuckin, M.A., Linden, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat Rev Microbiol 9, 265-278.

Meeusen, E.N., 2011. Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines. Vaccine 29, 8506-8511.

Michetti, P., Kreiss, C., Kotloff, K.L., Porta, N., Blanco, J.L., Bachmann, D., Herranz, M., Saldinger, P.F., Corthesy-Theulaz, I., Losonsky, G., Nichols, R., Simon, J., Stolte, M., Ackerman, S., Monath, T.P., Blum, A.L., 1999. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. Gastroenterology 116, 804-812.

Minato, S., Iwanaga K Fau - Kakemi, M., Kakemi M Fau - Yamashita, S., Yamashita S Fau - Oku, N., Oku, N., 2003. Application of polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes for oral vaccine: effect of lipid dose on systemic and mucosal immunity. J Control Release 89, 189-197.

Minigo, G., Scholzen, A., Tang, C.K., Hanley, J.C., Kalkanidis, M., Pietersz, G.A., Apostolopoulos, V., Plebanski, M., 2007. Poly-L-lysine-coated nanoparticles: a potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. Vaccine 25, 1316-1327.

Minoprio, P., Burlen, O., Pereira, P., Guilbert, B., Andrade, L., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Coutinho, A., 1988. Most B Cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. Scand J Immunol 28, 553-561.

Minoprio, P.M., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A., 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand J Immunol 24, 661-668.

Mogensen, T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev 22, 240-273.

Moghimi, S.M., Hawley, A.E., Christy, N.M., Gray, T., Illum, L., Davis, S.S., 1994. Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph nodes. FEBS Lett 344, 25-30.

- Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Murakami-Murofushi, K., Nishikawa, K., Hirakawa, E., Murofushi, H., 1997. Heat stress induces a glycosylation of membrane sterol in myxamoebae of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem* 272, 486-489.
- Mutsch, M., Zhou W Fau - Rhodes, P., Rhodes P Fau - Bopp, M., Bopp M Fau - Chen, R.T., Chen Rt Fau - Linder, T., Linder T Fau - Spyr, C., Spyr C Fau - Steffen, R., Steffen, R., 2004. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350, 896-903.
- Napotnik, T.B., Valant, J., Gmajner, D., Passamonti, S., Miklavcic, D., Ulrih, N.P., 2013. Cytotoxicity and uptake of archaeosomes prepared from *Aeropyrum pernix* lipids. *Human & Experimental Toxicology* 32, 950-959.
- Neutra, M.R., 1999. M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 236, 17-32.
- Neutra, M.R., Kraehenbuhl, J.P., 2005. Cellular and Molecular Basis for Antigen Transport Across Epithelial Barriers. In: Mestecky, J., Lamm, M.E., McGhee, J.R., Bienenstock, J., Mayer, L., Strober, W. (Eds.), *Mucosal Immunology* (Third Edition). Academic Press, Burlington, pp. 111-130.
- New, R.R., 1990. *Liposomes: a practical approach*. Oxford. IRL Press, New York.
- Niedergang, F., Kraehenbuhl, J.P., 2000. Much ado about M cells. *Trends Cell Biol* 10, 137-141. Noguchi, Y., Hayashi, A., Tsujimoto, K., Miyabayashi, K., Mizukami, T., Naito, Y., Ohashi, M., 2004. Composition Analysis of Polar Lipids in Halobacteria with Mass Spectrometry. *Journal Mass Spectrom Soc Jpn* 52, 307-316.
- O' Neill, M.J., Guo, J., Byrne, C., Darcy, R., O' Driscoll, C.M., 2011. Mechanistic studies on the uptake and intracellular trafficking of novel cyclodextrin transfection complexes by intestinal epithelial cells. *Int J Pharm* 413, 174-183.
- Oddone, N., Zambrana, A., Tassano, M., Porcal, W., Cabral, P., Benech, J., 2013. Cell uptake mechanisms of PAMAM G4-FITC dendrimer in human myometrial cells. *J Nanopart Res*

15, 1-14.

- Odyniec, A.N., Barral, D.C., Garg, S., Tatituri, R.V., Besra, G.S., Brenner, M.B., 2010. Regulation of CD1 antigen-presenting complex stability. *J Biol Chem* 285, 11937-11947.
- Okada, J., Cohen, S., Langer, R., 1995. *In vitro* evaluation of polymerized liposomes as an oral drug delivery system. *Pharm Res* 12, 576-582.
- Oliveira, C.P., Venturini, C.G., Donida, B., Poletto, F.S., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2013. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter* 9, 1141-1150.
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D., 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557, 9-23.
- Omri, A., Agnew, B.J., Patel, G.B., 2003. Short-term repeated-dose toxicity profile of archaeosomes administered to mice via intravenous and oral routes. *Int J Toxicol* 22, 9-23.
- Omri, A., Makabi-Panzu, B., Agnew, B.J., Sprott, G.D., Patel, G.B., 2000. Influence of coenzyme Q10 on tissue distribution of archaeosomes, and pegylated archaeosomes, administered to mice by oral and intravenous routes. *J Drug Target* 7, 383-392.
- Oren, A., 2012. Taxonomy of the family *Halobacteriaceae*: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 263-271.
- Oren, A., Ventosa, A., 1996. A proposal for the transfer of *Halorubrobacterium distributum* and *Halorubrobacterium coriense* to the genus *Halorubrum* as *Halorubrum distributum* comb. nov. and *Halorubrum coriense* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1180.
- Owen, R.L., Jones, A.L., 1974. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66, 189-203.
- Oyewumi, M.O., Kumar, A., Cui, Z., 2010. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines* 9, 1095-1107.

- Padilla, A.M., Bustamante, J.M., Tarleton, R.L., 2009. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol* 21, 385-390.
- Pandolfe, W.D., 1982. Development of the New Gaulin Micro-Gap™ Homogenizing Valve. *J Dairy Sci* 65, 2035-2044.
- Paquin, P., 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Int Dairy J* 9, 329-335.
- Parodi, C., Padilla, A.M., Basombrio, M.A., 2009. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 288-294.
- Pasetti, M.F., Simon, J.K., Sztejn, M.B., Levine, M.M., 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol Rev* 239, 125-148.
- Pashine, A., Valiante, N.M., Ulmer, J.B., 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 11, S63-68.
- Patel, G.B., Agnew, B.J., Deschatelets, L., Fleming, L.P., Sprott, G.D., 2000. In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *Int J Pharm* 194, 39-49.
- Patel, G.B., Chen, W., 2010. Archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery system. *Expert Rev Vaccines* 9, 431-440.
- Patel, G.B., Omri, A., Deschatelets, L., Sprott, G.D., 2002. Safety of archaeosome adjuvants evaluated in a mouse model. *J Liposome Res* 12, 353-372.
- Patel, G.B., Zhou, H., Ponce, A., Chen, W., 2007. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 25, 8622-8636.
- Pavelic, Z., Skalko-Basnet, N., Filipovic-Grcic, J., Martinac, A., Jalsenjak, I., 2005. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release* 106, 34-43.
- Pavelic, Z., Skalko-Basnet, N., Schubert, R., 2001. Liposomal gels for vaginal drug delivery.

Int J Pharm 219, 139-149.

Peek, L.J., Middaugh, C.R., Berkland, C., 2008. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 915-928.

Pelkmans, L., Helenius, A., 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311-320.

Peppas, N.A., Carr, D.A., 2009. Impact of absorption and transport on intelligent therapeutics and nano-scale delivery of protein therapeutic agents. *Chem Eng Sci* 64, 4553-4565.

Perrier-Cornet, J.M., Marie, P., Gervais, P., 2005. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *J Food Eng* 66, 211-217.

Peyer, J.C., 1677. *Exercitatio ant. De glandulis intestinalium earumque usu et affectionibus*, Schaffausen. In: Garrison, F.H. (Ed.), *An Introduction to the History of Medicine*. 4th. Saunders, Philadelphia, p. 264.

Pless, D.D., Wellner, R.B., 1996. In vitro fusion of endocytic vesicles: effects of reagents that alter endosomal pH. *J Cell Biochem* 62, 27-39.

Postle, A.D., Wilton, D.C., Hunt, A.N., Attard, G.S., 2007. Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry. *Prog Lipid Res* 46, 200-224.

Preis, I., Langer, R.S., 1979. A single-step immunization by sustained antigen release. *J Immunol Methods* 28, 193-197.

Premier, R.R., Jacobs, H.J., Lofthouse, S.A., Sedgmen, B.J., Meeusen, E.N., 2004. Antibody isotype profiles in serum and circulating antibody-secreting cells following mucosal and peripheral immunisations of sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 98, 77-84.

Pulendran, B., Palucka, K., Banachereau, J., 2001. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293, 253-256.

Puri, V., Watanabe, R., Singh, R.D., Dominguez, M., Brown, J.C., Wheatley, C.L., Marks, D.L., Pagano, R.E., 2001. Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol* 154, 535-547.

- Quiding-Jarbrink, M., Nordstrom, I., Granstrom, G., Kilander, A., Jertborn, M., Butcher, E.C., Lazarovits, A.I., Holmgren, J., Czerkinsky, C., 1997. Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses. *J Clin Invest* 99, 1281-1286.
- Quijano-Hernandez, I., Dumonteil, E., 2011. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin* 7, 1184-1191.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402.
- Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N., Friede, M., 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 30, 23-32.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P., 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361-367.
- Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., Sandvig, K., 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10, 961-974.
- Rodrigues, M.M., de Alencar, B.C., Claser, C., Tzelepis, F., Silveira, E.L., Haolla, F.A., Dominguez, M.R., Vasconcelos, J.R., 2009. Swimming against the current: genetic vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 281-287.
- Romero, E.L., Morilla, M.J., 2011. Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3, 356-375.
- Rutters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkotter, J., 2002. Phospholipid analysis as a tool to study complex microbial communities in marine sediments. *J Microbiol Methods* 48, 149-160.
- Ruyschaert, T., Marque, A., Duteyrat, J.L., Lesieur, S., Winterhalter, M., Fournier, D., 2005. Liposome retention in size exclusion chromatography. *BMC Biotechnol* 5, 11.

- Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., 2010. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* 145, 182-195.
- Salamanca-Buentello, F., Persad, D.L., Court, E.B., Martin, D.K., Daar, A.S., Singer, P.A., 2005. Nanotechnology and the developing world. *PLoS Med* 2, e97.
- Sardinha, L.R., Mosca, T., Elias, R.M., do Nascimento, R.S., Goncalves, L.A., Bucci, D.Z., Marinho, C.R., Penha-Goncalves, C., Lima, M.R., Alvarez, J.M., 2010. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypanomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e578.
- Scheerlinck, J.P., Greenwood, D.L., 2008. Virus-sized vaccine delivery systems. *Drug Discov Today* 13, 882-887.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., 2013. The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: A review. *Org Geochem* 54, 19-61.
- Sedgmen, B.J., Lofthouse, S.A., Meeusen, E.N., 2003. Optimization of an ovine antibody-secreting cell assay for detection of antigen-specific immunoglobulin production in peripheral blood leukocytes. *Immunol Cell Biol* 81, 305-310.
- Shukla, A., Katare, O.P., Singh, B., Vyas, S.P., 2010. M-cell targeted delivery of recombinant hepatitis B surface antigen using cholera toxin B subunit conjugated bilosomes. *Int J Pharm* 385, 47-52.
- Siakotos, A.N., Rouser, G., 1965. Analytical separation of nonlipid water soluble substances and gangliosides from other lipids by dextran gel column chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 42, 913-919.
- Singh, R.D., Puri, V., Valiyaveetil, J.T., Marks, D.L., Bittman, R., Pagano, R.E., 2003. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell* 14, 3254-3265.
- Slütter, B., Plapied, L., Fievez, V., Sande, M.A., des Rieux, A., Schneider, Y.J., Van Riet, E., Jiskoot, W., Pr eat, V., 2009. Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. *J Control Release* 138, 113-121.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Sou, T., Meeusen, E.N., de Veer, M., Morton, D.A., Kaminskis, L.M., McIntosh, M.P., 2011. New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. *Trends Biotechnol* 29, 191-198.
- Sprott, G., Dicaire, C., Fleming, L., Patel, G., 1996. Stability of liposomes prepared from archaeobacterial lipids and phosphatidylcholine mixtures. *Cells and Materials* 6, 143-155.
- Sprott, G.D., 1992. Structures of archaeobacterial membrane lipids. *J Bioenerg Biomembr* 24, 555-566.
- Sprott, G.D., Brisson, J., Dicaire, C.J., Pelletier, A.K., Deschatelets, L.A., Krishnan, L., Patel, G.B., 1999. A structural comparison of the total polar lipids from the human archaea *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* and its relevance to the adjuvant activities of their liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1440, 275-288.
- Sprott, G.D., Dicaire, C.J., Cote, J.P., Whitfield, D.M., 2008. Adjuvant potential of archaeal synthetic glycolipid mimetics critically depends on the glyco head group structure. *Glycobiology* 18, 559-565.
- Sprott, G.D., Dicaire, C.J., Gurnani, K., Deschatelets, L.A., Krishnan, L., 2004a. Liposome adjuvants prepared from the total polar lipids of *Haloferax volcanii*, *Planococcus* spp. and *Bacillus firmus* differ in ability to elicit and sustain immune responses. *Vaccine* 22, 2154-2162.
- Sprott, G.D., Dicaire, C.J., Gurnani, K., Sad, S., Krishnan, L., 2004b. Activation of dendritic cells by liposomes prepared from phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin and adjuvant activity in vivo. *Infect Immun* 72, 5235-5246.
- Sprott, G.D., Larocque, S., Cadotte, N., Dicaire, C.J., McGee, M., Brisson, J.R., 2003a. Novel polar lipids of halophilic eubacterium *Planococcus* H8 and archaeon *Haloferax volcanii*. *Biochim Biophys Acta* 1633, 179-188.

- Sprott, G.D., Sad, S., Fleming, L.P., Dicaire, C.J., Patel, G.B., Krishnan, L., 2003b. Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. *Archaea* 1, 151-164.
- Sprott, G.D., Tolson, D.L., Patel, G.B., 1997. Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microbiology Letters* 154, 17-22.
- Strobl, C., Six, L., Heckmann, K., Henkel, B., Ring, K., 1985. Physicochemical characterization of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. II. Film balance studies on the monomolecular organization of the main glycophospholipid in monofilms. *Z Naturforsch* 40, 219-222.
- Strugnell, R.A., Wijburg, O.L., 2010. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* 8, 656-667.
- Sturt, H.F., Summons, R.E., Smith, K., Elvert, M., Hinrichs, K.U., 2004. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry--new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18, 617-628.
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H., McGraw, T.E., 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6775-6780.
- Sugihara, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., Takeuchi, H., 2012. Effects of food intake on the mucoadhesive and gastroretentive properties of submicron-sized chitosan-coated liposomes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 60, 1320-1323.
- Svennerholm, L., 1956. The quantitative estimation of cerebrosides in nervous tissue. *J Neurochem* 1, 42-53.
- Swartz, M.A., 2001. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* 50, 3-20.
- Szoka, F., Jr., Papahadjopoulos, D., 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4194-4198.

- Szoka, F., Jr., Papahadjopoulos, D., 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng* 9, 467-508.
- Tacket, C.O., Reid, R.H., Boedeker, E.C., Losonsky, G., Nataro, J.P., Bhagat, H., Edelman, R., 1994. Enteral immunization and challenge of volunteers given enterotoxigenic *E. coli* CFA/II encapsulated in biodegradable microspheres. *Vaccine* 12, 1270-1274.
- Tenchov, B., Vescio, E.M., Sprott, G.D., Zeidel, M.L., Mathai, J.C., 2006. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. *J Biol Chem* 281, 10016-10023.
- Thiele, L., Merkle, H.P., Walter, E., 2003. Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. *Pharm Res* 20, 221-228.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., van Deurs, B., 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13, 238-250.
- Thurn, K.T., Arora, H., Paunesku, T., Wu, A., Brown, E.M., Doty, C., Kremer, J., Woloschak, G., 2011. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine* 7, 123-130.
- Tindall, B.J., 1990. Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett* 66, 199-202.
- Tobío, M., Alonso, M.J., 1998. Study of the inactivation process of the tetanus toxoid in contact with poly(lactic/glycolic acid) degrading microspheres. *S.T.P. Pharma Sci.* 8, 303-310.
- Tolson, D.L., Latta, R.K., Patel, G.B., Sprott, G.D., 1996. Uptake of archaeobacterial liposomes and conventional liposomes by phagocytic cells. *J Liposome Res* 6, 755-776.
- Tomlinson, G.A., Hochstein, L.I., 1976. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate- metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 22, 587-591.
- Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B., Sandvig, K., 2001. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 114, 3737-3747.

- Torres, D., Seijo, B., 2009. Nanosistemas lipídicos. Monografía XXVIII Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Real Academia Nacional de Farmacia, pp. 133-167.
- Tunick, M.H., Van Hekken, D.L., Cooke, P.H., Malin, E.L., 2001. Transmission electron microscopy of mozzarella cheeses made from microfluidized milk. *J Agric Food Chem* 50, 99-103.
- Ugwoke, M.I., Agu, R.U., Verbeke, N., Kinget, R., 2005. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1640-1665.
- USP, 2011. United States Pharmacopeial Convention Inc. The United States Pharmacopeia (USP 34), Rockville.
- van de Vossenberg, J.L., Driessen, A.J., Grant, W.D., Konings, W.N., 1999. Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles* 3, 253-257.
- van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., Borchard, G., Junginger, H.E., 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 52, 139-144.
- Vazquez-Chagoyan, J.C., Gupta, S., Garg, N.J., 2011. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Adv Parasitol* 75, 121-146.
- Veenstra, T.D., Johnson, K.L., Tomlinson, A.J., Craig, T.A., Kumar, R., Naylor, S., 1998a. Zinc-induced conformational changes in the DNA-binding domain of the vitamin D receptor determined by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 9, 8-14.
- Veenstra, T.D., Johnson, K.L., Tomlinson, A.J., Kumar, R., Naylor, S., 1998b. Correlation of fluorescence and circular dichroism spectroscopy with electrospray ionization mass spectrometry in the determination of tertiary conformational changes in calcium-binding proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12, 613-619.
- Venkatesan, N., Vyas, S.P., 2000. Polysaccharide coated liposomes for oral immunization--development and characterization. *Int J Pharm* 203, 169-177.

- Vercauteren, D., Vandenbroucke, R.E., Jones, A.T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S.C., Sanders, N.N., Braeckmans, K., 2010. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther* 18, 561-569.
- Vila, A., Gill, H., McCallion, O., Alonso, M.J., 2004. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J Control Release* 98, 231-244.
- Voyksner, R.D., 1997. Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry. In: Cole, R.B. (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*. Wiley- Interscience, New york.
- Wack, A., Rappuoli, R., 2005. Vaccinology at the beginning of the 21st century. *Curr Opin Immunol* 17, 411-418.
- Wang, L.H., Rothberg, K.G., Anderson, R.G., 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123, 1107-1117.
- Washington N., W.C., Wilson, C.G., 2001. *Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption*. Taylor & Francis, New York.
- Welling, P.G., 1996. Effects of food on drug absorption. *Annu Rev Nutr* 16, 383-415.
- Wessel, D., Flugge, U.I., 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-143.
- West, M.A., Bretscher, M.S., Watts, C., 1989. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 109, 2731-2739.
- Whitfield, D.M., Eichler, E.E., Sprott, G.D., 2008. Synthesis of archaeal glycolipid adjuvants- what is the optimum number of sugars? *Carbohydr Res* 343, 2349-2360.
- Widera, A., Norouziyan, F., Shen, W.C., 2003. Mechanisms of TfR-mediated transcytosis and sorting in epithelial cells and applications toward drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1439-1466.
- Wilding, I.R., Coupe, A.J., Davis, S.S., 2001. The role of gamma-scintigraphy in oral drug

delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 103-124.

Winstanley, P.A., Orme, M.L., 1989. The effects of food on drug bioavailability. *Br J Clin Pharmacol* 28, 621-628.

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-4579.

Yamauchi, K., Onoue, Y., Tsujimoto, T., Kinoshita, M., 1997. Archaeobacterial lipids: high surface activity of polyisoprenoid surfactants in water. *Colloids Surf B Biointerfaces* 10, 35-39.

Zabala, J.P., 2010. La enfermedad de Chagas en la Argentina. Investigación científica, problemas sociales y políticas sanitarias. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal.

Zhao, W., Wu, W., Xu, X., 2007. Oral vaccination with liposome-encapsulated recombinant fusion peptide of urease B epitope and cholera toxin B subunit affords prophylactic and therapeutic effects against *H. pylori* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 25, 7664-7673.

Zinchuk, V., Zinchuk, O., 2008. Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Curr Protoc Cell Biol* 39, 4.19.11-14.19.16.

Zink, K.-G., Wilkes, H., Disko, U., Elvert, M., Horsfield, B., 2003. Intact phospholipids: microbial "life markers" in marine deep subsurface sediments. *Org Geochem* 34, 755-769.