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

Universidad
Nacional
de Quilmes

Altube, María Julia

Nanovesículas arqueolipídicas para targeting activo de agentes antiinflamatorios y antibióticos a macrófagos

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:
Altube, M. J. (2018). Nanovesículas arqueolipídicas para targeting activo de agentes antiinflamatorios y antibióticos a macrófagos. (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/20.500.11807/2032

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

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

María Julia Altube, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Marzo de 2018, pp. 292,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Nanovesículas arqueolipídicas para targeting activo de agentes antiinflamatorios y antibióticos a macrófagos

TESIS DOCTORAL

María Julia Altube

altubejulia@gmail.com

Resumen

Esta Tesis doctoral comenzó con la búsqueda de una explicación para la elevada tasa de captura de arqueosomas (ARQ) preparados en base a arqueolipidos polares totales (APT), extraídos de la arquebacteria hiperhalofila no alcalifilica *Halorubrum tebenquichense*. Cuando analizados cualitativamente por ESI-MS, los APT resultaron ser una mezcla de 5 estructuras, algunas de ellas emparentadas: el análogo arqueol [2,3-di-O-fitanil-*sn*glicerol] de fosfatidilglicerol: **PG**, el metil ester de fosfatidilglicerofosfato **PGP-Me**, la cardiolipina **BPG** (fosfolípido dimerico con 4 cadenas hidrofóbicas análogo glicerol dieter del bisfosfatidilglicerol: *sn*-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol -3-fosfo*sn*-di-O-fitanilglicerol), los arqueoles diglicosil sulfatados [que derivarían del manosilglucosil-difitanilglicerol (DGD)]: **SDGD5** (1-O-[α-D-manosa-(2´-SO3H)-(1´α 2´)-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol), precursor a su vez de una segunda cardiolipina, la **SDGD5PA** (2´-SO3H)-Man*p*-α 1,2Glcpα-1-1-[*sn*-2,3-di-Ofitanilglicerol]-6-[fosfo-*sn*-2,3-di-O-fitanilglicerol].

Nanovesículas arqueolipídicas para *targeting* activo de agentes antiinflamatorios y antibióticos a macrófagos

Lic. María Julia Altube

Directora: Dra. Eder Lilia Romero

Co-Directora: Dra. Diana Inés Roncaglia

Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas (CIDeN)

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2018

Agradecimientos

Quisiera agradecer a toda la gente que de manera directa o indirecta forma parte de esta Tesis e hizo posible que este proyecto de cinco años se concrete.

Agradecer al Consejo Nacional de Investigación Científico Tecnológica (CONICET) por el apoyo financiero al otorgarme una beca de doctorado que me permitió realizar esta investigación. También a la Secretaría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Quilmes por otorgarme durante el periodo de mi doctorado dos subsidios que me permitieron participar en congresos en el exterior.

Quisiera agradecer a Eder por el trabajo que hizo durante su dirección y por proponerme un tema de estudio creativo que me resultó muy interesante y con muchos desafíos. Tanto a Eder como a María José les agradezco por tratar de ir siempre un paso más e impulsarme no solo para este trabajo si no para mi desarrollo como investigadora, valoro mucho pertenecer a este grupo. Agradecer a Diana, por toda la ayuda que me brindó durante el primer año de doctorado para lograr la difícil tarea de aislar los lípidos de las arqueas. A Leticia, Paula y Priscila les agradezco sus consejos y buena onda durante estos siete años compartiendo el laboratorio. A Paula, en particular, le agradezco por la formación que me brindó durante mi tesina de grado, que me hizo más fácil llevar a cabo este trabajo de investigación. A los *doctornados* Aye, Fede, Jair y Gus y a las futuras doctorandas Yami y Noe por su gran ayuda en el día a día y por hacer del laboratorio un lugar más divertido. A Solange por la ayuda en los ensayos de nebulización y ph sensibilidad que formaron parte de su seminario de grado. A la gente del CITSE en Santiago del Estero, a Aníbal Disalvo por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar el proyecto del surfactante, y en especial a Andrea por la paciencia, el empuje y las ganas de seguir haciendo cosas en conjunto. Al equipo del Centro de Control de Biológicos del Instituto Malbrán, María Luisa, Patricia, Andrea, Mirla y Gisela por el profesionalismo, compromiso y tiempo dedicado al proyecto de los venenos. A Lorena Gonzalez y a Yamila Gondola de la Universidad de Buenos Aires por realizar las determinaciones de proteínas. A Paulo Maffia y Melina Martinez del Laboratorio de Microbiología

Molecular de la UNQ por la buena predisposición para realizar los ensayos biofilm. También quiero mencionar a la gente del Departamento de Ciencia y Tecnología, en especial a Bruno por estar siempre para alcanzarte ese reactivo urgente. Agradecer a Alexandra Elbakyan por hacer accesible el conocimiento científico.

Gracias a mis amigos y mi familia, en especial mi mamá, por apoyarme en todo momento, interesarse en mi trabajo y preocuparse por mi futuro. A Nico gracias por todo (no puedo escribir en pocas palabras todo lo que me ayudas), esta Tesis está dedicada a vos.

Indice

Lista de abreviaturas, siglas y símbolos……..13

1. Introducción: nanomedicinas inhalables 17

1.1 Definiciones sobre nanomedicina 19
1.2 Liposomas como sistemas de *delivery* de fármacos..... 21
1.3 Estrategias de *delivery*: *targeting* pasivo y activo 23
1.4. *Delivery* intracelular mediante liposomas pH sensibles 25
1.5 Nanomedicinas inhalatorias 28
1.6 Estructura y fisiología del pulmón 28
1.7 Macrófagos alveolares 31
1.8 Deposición de partículas en los pulmones..... 31
1.9 Liposomas inhalables..... 33
1.10 Dispositivos inhalatorios para la administración de liposomas 33
1.11 Nanovesículas arqueolipídicas: arqueosomas..... 37
1.12 Aplicaciones biomédicas de ARQ 41
1.13 Ventajas estructurales de ARQ 42
1.14 Técnicas de preparación y caracterización de nanovesículas..... 43
1.15. Referencias 46

2. Arqueosomas: unión a receptores, citotoxicidad y mecanismos de muerte celular .. 53

2.1 Objetivo 56
2.2 Introducción..... 57
2.2.1 Mecanismos de endocitosis de material particulado 58
2.2.2 Captura celular de ARQ 61
2.2.3 Receptor de manosa y Receptores *Scavenger* 62
2.2.4 Estudios de citotoxicidad de NP..... 63
2.2.5 Tipos de muerte celular..... 64
2.2.6 Toxicidad según el tipo de muerte celular..... 66
2.3 Materiales y Métodos 68
2.3.1 Materiales..... 68
2.3.2 Crecimiento, extracción y caracterización de los lípidos polares totales de *Halorubrum tebenquichense* 68
2.3.3 Preparación de nanovesículas arqueolipídicas y convencionales..... 69
2.3.4 Preparación de nanovesículas marcadas con RhPE..... 69
2.3.5 Caracterización fisicoquímica 70
2.3.5.i Cuantificación de fosfolípidos..... 70
2.3.5.ii Cuantificación de RhPE..... 70
2.3.5.iii Tamaño promedio y Potencial ζ 70
2.3.6 Crio-Microscopia Electrónica de Transmisión (Crio-TEM) de ARQ 71
2.3.7 Separación de LPT..... 71
2.3.7.i Separación por cromatografía en columna de por gravedad..... 71
2.3.7.ii Cromatografía en Capa Delgada..... 72
2.3.7.iii Purificación de fracciones mediante CCD preparativa 72
2.3.7.iv Espectrometría de masa mediante Ionización por electrospray (ESI-MS) 72
2.3.7.v Cuantificación de arqueolípidos glicosilados (GA)..... 73
2.3.8 Preparación de nanovesículas con diferentes proporciones de LPT marcadas con RhPE 73
2.3.9 Cultivos Celulares 74

2.3.10 Ensayo de Captura Celular 74
2.3.11 Ensayo de captura celular competitiva 75
2.3.12 Viabilidad celular 75
2.3.13 Ensayo de apoptosis/necrosis 76
2.3.13.i YO-PRO-1 / IP / Hoescht..... 76
2.3.13.ii Ensayo del TUNEL 77
2.3.13.iii Procesamiento de muestras para Western Blotting (WB) 78
2.3.13.iv Western Blotting (WB) 79
2.3.14 Análisis estadísticos 80
2.4 Resultados..... 81
2.4.1 Preparación de nanovesículas y características estructurales 81
2.4.2 Morfología de ARQ..... 82
2.4.3 Separación de LPT por cromatografía en columna de Silica gel 60 por gravedad 83
2.4.4 Determinación de pureza de las fracciones obtenidas 84
2.4.5 Preparación de nanovesículas 85
2.4.6 Captura de nanovesículas por células J774A.1 87
2.4.7 Ensayo de competición de captura celular 88
2.4.8 Viabilidad celular medida por MTT y LDH..... 89
2.4.9 Análisis de Apoptosis/Necrosis mediante IP, YO-PRO y Hoescht 90
2.4.10 Análisis de Apoptosis/Necrosis mediante TUNEL 96
2.4.11 Proteínas de señalización 100
2.5 Discusión 102
2.6 Referencias 108

3.Nanovesículas pH sensibles nebulizables 113

3.1 Objetivo 116
3.2 Introducción 117
3.2.1 Asma 117
3.2.2 Corticoesteroides 120
3.2.3 Arqueolípidos como ligandos de RS 122
3.3 Materiales y Métodos 123
3.3.1 Materiales 123
3.3.2 Preparación de nanovesículas 123
3.3.2.i Preparación de nanovesículas vacías..... 123
3.3.2.ii Preparación de nanovesículas con marca fluorescente..... 124
3.3.2.iii Preparación de nanovesículas con DP..... 124
3.3.3 Caracterización fisicoquímica 125
3.3.3.i Cuantificación HPTS encapsulado 125
3.3.3.ii Cuantificación de DP y LT 125
3.3.4 Determinación de pH sensibilidad en buffer 126
3.3.5 Cultivos Celulares 126
3.3.6 pH sensibilidad en cultivos celulares 127
3.3.7 Ensayos de citotoxicidad..... 126
3.3.8 Inhibición de citoquinas pro-inflamatorias 128
3.3.9 Inhibición de Especies Reactivas de Oxigeno (ERO) 128
3.3.10 Estabilidad coloidal durante almacenamiento..... 129
3.3.11 Estabilidad frente al proceso de nebulización..... 129
3.3.11.i Estabilidad de nanovesículas frente al proceso de nebulización..... 129
3.3.11.ii Estabilidad frente al proceso de nebulización luego de seis meses de almacenamiento 130
3.3.12 Análisis estadísticos 130
3.4 Resultados..... 131
3.4.1 Caracterización de nanovesículas pH sensibles..... 131
3.4.2 Cuantificación de HPTS 132

3.4.3 pH sensibilidad en buffer 133
3.4.4 Sensibilidad al pH en células 135
3.4.5 Incorporacion de DP 137
3.4.6 Viabilidad celular 139
3.4.7 Determinación de capacidad antiinflamatoria 140
3.4.8 Inhibición de ERO 143
3.4.9 Estabilidad de nanovesículas conteniendo DP frente al almacenamiento 144
3.4.10 Estabilidad de nanovesículas frente al proceso de nebulización 144
3.4.11 Estabilidad frente al proceso de nebulización luego de seis meses de almacenamiento 146
3.5 Discusión 147
3.6 Referencias 154

4. Interacción de nanovesículas con surfactante pulmonar 159

4.1 Objetivo 162
4.2 Introducción 163
4.3 Materiales y Métodos 168
4.3.1 Materiales 168
4.3.2 Preparación de nanovesículas 168
4.3.3 Preparación de vesículas de SP 168
4.3.4 Caracterización de nanovesículas 168
4.3.5 Preparación de nanovesículas marcadas con HPTS/DPX y RhPE 168
4.3.6 Crecimiento de células J774A.1 169
4.3.7 Nebulización de nanovesículas marcadas con HPTS/DPX-RhPE en células J774A.1 cubiertas por monocapas por SP 169
4.3.8 Perturbación mutua de la bicapa de vesículas de SP y nanovesículas: 170
4.3.8.i Polarización generalizada (GP) y anisotropía de fluorescencia (AF) de Laurdan en vesículas de SP 170
4.3.8.ii GP y AF de Laurdan en las nanovesículas 171
4.3.8.iii Liberación del contenido interno de las nanovesículas 171
4.3.9 Efecto de las nanovesículas sobre la presión superficial (π) durante los ciclos de expansión-compresión 172
4.3.10 Efecto de nanovesículas en un área constante 173
4.3.10.i Nanovesículas inyectadas en la subfase acuosa 173
4.3.10.ii Nanovesículas nebulizadas 173
4.3.11 Análisis estadístico 174
4.4 Resultados 175
4.4.1 Isoterma de compresión de Prosurf y características estructurales de las nanovesículas 175
4.4.2 Absorción de nanovesículas nebulizadas y *delivery* citoplasmático en macrófagos J774A.1 cubiertos por una monocapa de SP 176
4.4.3 Perturbación mutua de la bicapa de vesículas de SP y nanovesículas 177
4.4.3.i GP de las vesículas de SP 179
4.4.3.ii AF de las vesículas de SP 179
4.4.3.iii GP y AF de las nanovesículas 180
4.4.3.iv Cambios de tamaño de las vesículas de SP y fuga de contenido interno de las nanovesículas 182
4.4.4 Efecto de las nanovesículas sobre π, durante los ciclos de compresión-expansión (condición dinámica) 182
4.4.5 Inyección en la subfase vs nebulización de nanovesículas en monocapas de SP (condición estática) 184
4.5 Discusión 187
4.6 Referencias 193

5. Incorporación de azitromicina en nanovesículas nebulizables 199

5.1 Objetivo 202
5.2 Introducción 203
5.2.1 Actividad antimicrobiana 204
5.2.2 Mecanismo de acción inmunomodulador 205
5.2.3 Características químicas y biodistribución de AZ 206
5.2.4 Fibrosis Quística (FQ) 208
5.2.5 Biofilms 209
5.2.6 Tratamiento de enfermedad pulmonar en FQ 211
5.2.7 Liposomas Inhalatorios 211
5.3 Materiales y Métodos 213
5.3.1 Preparación de nanovesículas vacías y con AZ 213
5.3.2 Caracterización de nanovesículas 213
5.3.2.i Cuantificación de AZ 213
5.3.3 Estabilidad coloidal durante almacenamiento 214
5.3.4 Análisis térmico 214
5.3.5 Estabilidad frente a la nebulización de nanovesículas conteniendo AZ (nanovesículas-AZ) 214
5.3.6 Cultivos celulares 214
5.3.7 Viabilidad celular 215
5.3.8 Cultivo de *Staphylococcus aureus* 215
5.3.9 Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) 215
5.3.10 Efecto de las concentraciones sub-CIM de AZ libre y en nanovesículas sobre el crecimiento de *S. aureus* 216
5.3.11 Determinación de Inhibición de biofilm 216
5.3.12 Ensayos de erradicación de biofilm 217
5.3.13 Ensayos de viabilidad de biofilm 217
5.3.14 Análisis estadístico 217
5.4 Resultados 219
5.4.1 Caracterización de formulaciones 219
5.4.2 Análisis calorimétrico 221
5.4.3 Estabilidad frente a nebulización 222
5.4.4 Viabilidad celular 223
5.4.5 Actividad antimicrobiana 224
5.4.6 Crecimiento con concentraciones sub-CIM de AZ 225
5.4.7 Actividad anti-biofilm 226
5.4.7 Inhibición de formación de biofilm 227
5.5 Discusión 229
5.6 Referencias 234

6. Neutralización de toxinas de veneno mediante el uso de arqueosomas 239

6.1 Objetivo 243
6.2 Introducción 244
6.2.1 Envenenamiento por serpientes: un problema de salud pública a nivel global 244
6.2.2 Serpientes de relevancia regional 243
6.2.3 Efecto del envenenamiento y toxinas involucradas 245
6.2.4 Terapia contra envenenamientos de serpientes 246
6.2.5 Material nano y microparticulado como complemento a la terapia con anticuerpos 247
6.2.6 Actividad de PLA_2 249
6.2.7 Inhibidores de PLA_2 250
6.2.8 Arqueosomas como inhibidores de PLA_2 251
6.3 Materiales y Métodos 252
6.3.1 Preparación de nanovesículas 252
6.3.2 Preparación de vesículas grandes 252

6.3.3 Esterilización de vesículas grandes por autoclave 252
6.3.4 Caracterización de nanovesículas y vesículas grandes 252
6.3.5 Inhibición de actividad de fosfolipasa PLA_2 252
6.3.6 Cultivos celulares 254
6.3.7 Viabilidad celular 254
6.3.8 Determinación de dosis citotóxica 50 (DC50) 255
6.3.9 Neutralización *in vitro* de veneno de serpiente *B. neuwidi diporus* 256
6.3.10 Análisis estadístico 256
6.4 Resultados 257
6.4.1 Características fisicoquímicas de nanovesículas y vesículas grandes 257
6.4.2 Nanovesículas como inhibidores de la enzima PLA_2 258
6.4.3 Citotoxicidad de nanovesículas sobre células RD, 3T3 y L20B 259
6.4.4 Citotoxicidad de veneno de *B. neuwiedi* diporus sobre células RD, 3T3 y L20B 262
6.4.5 Evaluación de neutralización de veneno con nanovesículas 264
6.4.6 Evaluación de neutralización de veneno con ARQ grandes 266
6.5 Discusión 268
6.6 Referencias 274

7. Conclusiones generales 279
7.2 Referencias 291

.

Lista de abreviaturas, siglas y símbolos

A

AF: anisotropía de fluorescencia

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

APC: células presentadoras de antígeno

ApH: arqueosomas pH sensible

A-PMe: arqueosomas PGP-Me

A-PMe-GA: arqueosomas PGP-Me y GA

ARQ: arqueosomas

ARQg: arqueosomas gigantes

AZ: azitromicina

C

CBM: concentración mínima bactericida

CCD: cromatografía en capa delgada

CEM: cromatografía de exclusión molecular

CHEMS: colesteril hemisuccinato

CIM: concentración mínima inhibitoria

Crio-TEM: microscopía electrónica de transmisión por criofractura

D

DAMP: patrones moleculares de daño asociado

DC50: dosis citotóxica 50

DLS: dispersión dinámica de la luz

DMSO: dimetilsulfóxido

DOPE: Dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DP: dexametasona 21-fosfato sal disodica

DPX: P-xileno-bis-piridinio

DS: desvío estándar

DS: desvío estándar

E

EMC: endocitosis mediada por clatrina

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERO: especies reactivas de oxigeno

ESI-MS: espectroscopia de masa por ionización con electrospray

F

FDA: Administración de Drogas y Medicamentos

FQ: fibrosis quística

FSC: forward scatter

G

GA: glicoarqueolipido

GP: polarización generalizada

H

h: hora

HPTS: sal trisódica de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico

HRB: hiper-reactividad bronquial

HSPC: L-α-fosfatidilcolina 1,2-hidrogenada

I

IF: intensidad de fluorescencia

IP: ioduro de propidio

L

L: nanoliposomas de HSPC y colesterol

LD50: dosis letal 50

LDH: lactato deshidrogenasa

Lg: liposomas gigantes

LpH: liposoma pH sensible

LPS: lipopolisacarido

L-PS: liposomas con fosfatidilserina

LPT: arqueolipidos polares totales

Ls: nanoliposomas SPC

Ls-GA: nanoliposomas de SPC con GA

LT: Lípidos Totales

LUV: vesiculas unilamerales grandes

M

m/m: masa/masa

m/z: relación masa/carga

m:m: relación masa:masa

M1: macrófagos con activación clásica

M2: macrófagos con activación alternativa

MA: macrófagos alveolares

MCA: muerte celular accidental

MCR: muerte celular regulada

MEC: matriz extracelular

min: minuto

MLV: vesiculas multilamelares

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio

N

NP: nanopartícula

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

oxLDL: LDL oxidada, lipoproteina de baja densidad

P

PBS: buffer fosfato salino

pdi: índice de polidispersidad

PEG: polietilenglicol

PLA2: fosfolipasa A2

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

Poly(C): ácido policitidílico (5') potásico

Poly(I): ácido poliinosínico (5') potásico

PS: L-α-fosfatidil-L-serina

R

RG: receptor de glucocorticoide

RhPE: LissamineTM rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio

RM: receptor de manosa

RN: rojo neutro

RS: receptor scavenger

RS-AI/II: receptor scavenger de clase A

RTf: receptor de transferrina

S

SDGD-5: 1-O-[α-D-manosa-(2'-SO3H)-1'→2')-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol,

SDGD-5PA: 1-O-[α-D-manosa-(2'-SO3H)-1'→2')-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-ácido fosfatídico-sn-glicerol

SFB: Suero Fetal Bovino

SP: surfactante pulmonar

SPC: fosfatidilcolina de soja

SSC: *side scatter*

T

TEM: microscopia electrónica de transmisión

TLR: receptores tipo Toll o Toll like receptors

V

v/v: volumen/volumen

γ: tensión superficial

γ_{eq}: tensión superficial en equilibrio

π: presión superficial

π_{eq}: presión superficial en equilibrio

CAPITULO 1

1. Introducción: nanomedicinas inhalables

1.1 Definiciones sobre nanomedicina

La nanotecnología es el término popular para la construcción y utilización de estructuras funcionales con al menos una dimensión característica medida en nanómetros. Un nanómetro es una milmillonésima parte de un metro (10^{-9} m) y esto es aproximadamente cuatro veces el diámetro de un átomo individual. Las proteínas, por ejemplo, tienen un tamaño de entre 1 a 20 nm y los virus tienen un tamaño aproximado de 100 nm. La nanomedicina se puede definir de una manera amplia como la aplicación de la nanotecnología a la medicina. Esta rama de la nanotecnología abarca el uso de nanopartículas (NP) y nanodispositivos para diagnóstico y terapéutica (Jain & Jain, 2017).

Las NP forman la mayor parte de los nanomateriales que se investigan en el área biomédica. Las principales familias de NP son nanoesferas -con una estructura homogénea en toda la partícula- y nanovesículas –con una estructura de esfera hueca- (Jain & Jain, 2017). Ambos tipos de NP pueden estar fabricadas de diferentes materiales, las NP orgánicas o *"soft*" están construidas con materia blanda: liposomas, micelas, emulsiones, dendrimeros y nanoestructuras poliméricas o proteícas. Las NP inorgánicas o *"hard*" son NP metálicas, cerámicas o *quantum dots* (Etheridge et al., 2013).

Las propiedades fisicoquímicas únicas y la *performance* en sistemas biológicos de los nanomateriales hacen que sean de gran interés para aplicaciones médicas (Howard, 2016). La definición de nanomaterial según la Comisión Europea es la de *"un material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado no unido o como un agregado o aglomerado y donde, el 50% o más de las partículas tiene una o más dimensiones externas que están en el rango de tamaño 1 nm - 100 nm"*. Alternativamente, también es un nanomaterial "si tiene una superficie específica por unidad de volumen de más de 60 m^2 / cm^3 " (Comisión Europea, 2011). Hay varios fenómenos que son característicos de los nanomateriales y que tienen aplicaciones directas en el campo de la salud. Las propiedades ópticas y de dispersión de la luz exhibidas por NP metálicas de diferentes tamaños, formas y composiciones, se utiliza en biosensores de diagnóstico (Rosi & Mirkin, 2005). El cambio magnético a

superparamagnético que se genera en la nanoescala de ciertos materiales se puede utilizar para aplicaciones de imágenes moleculares (Larsen et al., 2009). El aumento de la solubilidad que se produce a escala nanométrica se utiliza en nanocristales para la disolución de fármacos poco solubles, ampliamente utilizados en la industria farmacéutica (Junghanns & Müller, 2008). Las NP sirven como nanovehículos para la administración de agentes terapéuticos porque exhiben propiedades biológicas únicas que pueden utilizarse para tener una mayor eficacia y menor toxicidad en los pacientes (Howard, 2016). Esto último, se debe en parte, a la capacidad de las NP para circular y extravasarse a través de las barreras endoteliales en el tejido y entrar en las células por endocitosis, ambos procesos dependientes del tamaño (Blanco, Shen, & Ferrari, 2015). Además, la gran área superficial de las NP potencia la capacidad de funcionalizar la superficie para estrategias de *targeting* o para evitar su reconocimiento por el sistema polimorfonuclear (Davis & Shin, 2008; Howard, 2016). Sin embargo, estos efectos biológicos no están estrictamente limitados a un tamaño máximo de 100 nanómetros y aunque una parte de la nanomedicina utiliza tamaños de 100 nm o menos, este límite excluye muchas aplicaciones con consecuencias significativas para el campo. En varios trabajos de revisión se propone extender el rango de tamaño para las nanomedicinas (Jain & Jain, 2017). Por ejemplo en (Etheridge et al., 2013) se propone extender el rango hasta 300 nm porque los autores opinan que, *"abarca mejor el comportamiento fisiológico único de los materiales"*. Más aun en (Wagner, Dullaart, Bock, & Zweck, 2006) proponen extender el límite de lo que se considera una nanomedicina hasta 1000 nm de tamaño, *"porque hasta éste límite no solo se obtienen resultados novedosos sino que se requieren técnicas químicas y de fabricación novedosa y científicamente exigente".*

La gran mayoría de las nanomedicinas comerciales o que están en fase clínica de investigación se administran por vía endovenosa para el tratamiento, principalmente, de diferentes tipos de tumores y ~ 80 % entran en el grupo de nanomedicinas *soft* (Etheridge et al., 2013). Durante los primeros años de la década de 1990 se aprobaron las primeras nanomedicinas comercializables. La primera fue la formulación de anfotericina B liposomal (Ambisome) para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas en Europa, en el año 1990 (T. M.

Allen & Cullis, 2013), Mientras que la formulación liposomal de doxorrubicina (Doxil®) fue la primera aprobada por la Administración de Comidas y Drogas de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de tumores sólidos en el año 1995 (Bobo, Robinson, Islam, Thurecht, & Corrie, 2016).

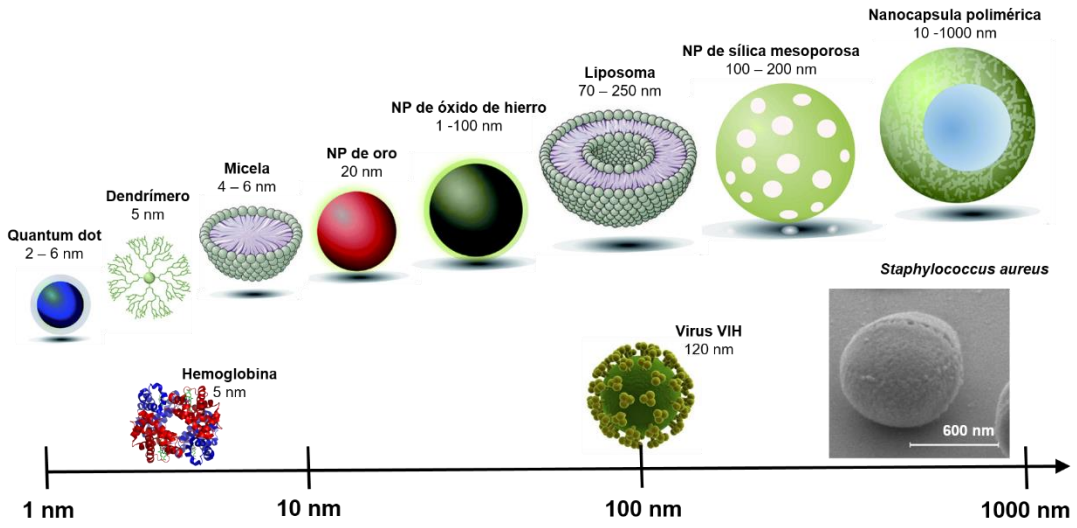


Figura 1 – Nanopartículas (NP) de distintos tamaños y materiales, molécula de hemoglobina, virus de HIC y bacteria *Staphylococcus aureus* en un rango de 1 a 1000 nm. Los dibujos no están realizados a escala. La imagen se realizó a partir de ilustraciones e información de (Gentile et al., 1994; Kothamasu et al., 2012; Monteiro et al., 2015; Nanomedicine, 2018; Richards, Maruani, & Chudasama, 2017; van Rijt, Bein, & Meiners, 2014; Watermann & Brieger, 2017).

1.2 Liposomas como sistemas de *delivery* de fármacos

Los liposomas se definen como vesículas de fosfolípidos que consisten en una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran espacios acuosos discretos (Sercombe et al., 2015). Están compuestos, principalmente, por moléculas que derivan o basan su estructura en lípidos de membranas biológicas, moléculas anfifílicas que tienen una cabeza hidrofílica y dos cadenas hidrófobas apolares. Cuando los fosfolípidos se dispersan en soluciones acuosas, debido a su naturaleza anfipática, tienen una fuerte tendencia a formar membranas (Papahadjopoulos & Kimelberg, 1974). Por un lado, sus cabezas polares prefieren interactuar con el ambiente acuoso; mientras que sus largas cadenas alifáticas apolares promueven la interacción entre ellas. Las cadenas hidrofóbicas de cada capa se enfrentan entre sí y constituyen un compartimento

interno lipófilo que actúa como una barrera de permeabilidad. Las interacciones hidrofóbicas son fundamentales en la formación de las bicapas lipídicas y las fuerzas de van der Waals mantienen juntas las largas colas de hidrocarburos, reforzando así esta arquitectura. Por último, los enlaces de hidrógeno y las interacciones polares entre las moléculas de agua del entorno acuoso y las cabezas polares de los lípidos estabilizan esta organización (Bozzuto & Molinari, 2015). La capacidad única de las NP del tipo liposomal para atrapar tanto los compuestos lipófilos como los hidrófilos permite la encapsulación de una amplia gama de agentes terapéuticos. Las moléculas hidrófobas se insertan en la bicapa y las moléculas hidrófilicas quedan atrapadas en el interior acuoso (T. M. Allen, 1998; V. P. Torchilin, 2005). Los liposomas se pueden clasificar en función del tamaño (pequeño, intermedio o grande) y lamelaridad (vesículas uni-, oligo- o multilamelares). La formación de vesículas unilamelares (LUV) o vesículas multilamelares (MLV) depende de los métodos de síntesis y homogenización utilizados para su preparación. Como los LUV (una bicapa lipídica, 50-250 nm) encierran un núcleo acuoso grande, son adecuados para la encapsulación de fármacos hidrófilos, mientras que, las MLV (dos o más bicapas lipídicas concéntricas organizadas como una cebolla, 1-5 µm) atrapan preferentemente las drogas hidrofóbicas (Bozzuto & Molinari, 2015).

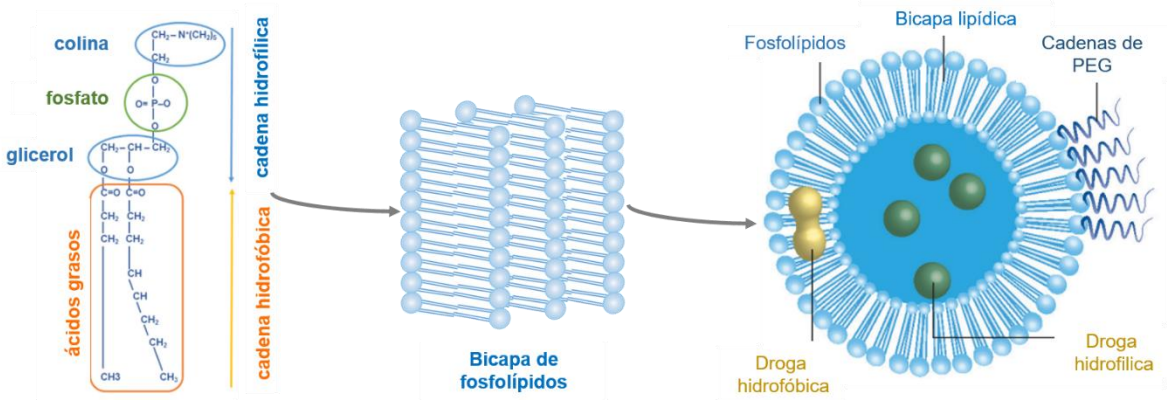


Figura 2. Ilustración esquemática del auto-ensamblaje de fosfolípidos en estructura de bicapas y luego su posterior transformación en liposomas unilamelares. Los liposomas pueden contener drogas hidrofóbicas en el interior de la membrana y drogas hidrofílicas dentro del interior acuoso, así como pueden estar funcionalizados con polietilenglicol (PEG)(Deshpande, Biswas, & Torchilin, 2013; Nogueira, Gomes, Preto, & Cavaco-Paulo, 2015).

Los liposomas ofrecen varias ventajas como sistema de *delivery* de fármacos: son biocompatibles, se autoensamblan (por lo que no requieren de síntesis química para su preparación), tienen la capacidad de transportar grandes cantidades de fármacos y son muy versátiles, ya que se pueden modificar una amplia gama de propiedades fisicoquímicas y biofísicas para controlar sus características biológicas (Sercombe et al., 2015). Ejemplo de esto último es la inserción del polimero polietilenglicol (PEG) en la superficie liposomal para estabilizarla estéricamente e inhibir la unión de proteínas del suero. Los liposomas peguilados no son reconocidos por el sistema fagocitico polimorfonuclear lo que permite aumentar su tiempo de circulación en sangre (T. Allen, 1989).

1.3 Estrategias de *delivery*: *targeting* pasivo y activo

En el campo de la nanomedicina, el término *targeting* (de *target*: dirigir, apuntar) se refiere al diseño de nanovehículos terapéuticos con la intención de aumentar su acumulación en los sitios del cuerpo que están enfermos. Históricamente el *targeting* activo y pasivo se refiere a las nanomedicinas equipadas o no con ligandos en su superficie, respectivamente (van der Meel, Vehmeijer, Kok, Storm, & van Gaal, 2016). El *targeting* pasivo produce una distribución diferencial en el organismo de las nanomedicinas de manera espontánea. Esencialmente, esta estrategia de *targeting* solo depende de las propiedades fisiopatológicas del tejido diana y de lograr que las nanomedicnas tengan un tiempo de circulación prolongado (V. Torchilin, 2011). El mecanismo de *targeting* pasivo más explotado, es el que se produce por el efecto de permeación y retención amplificada (EPR, por sus siglas en inglés). El efecto EPR se basa en una mayor permeabilidad en el endotelio vascular (debido a fenestraciones de entre 200-2000 nm), y a una disminución en el drenaje linfático, que evita el recambio rápido del fluido intersticial en la zona tumoral (Bertrand, Wu, Xu, Kamaly, & Farokhzad, 2014). De este fenómeno, de acumulación diferencial en el tejido tumoral, hacen uso formulaciones como Doxil, logrando disminuir significativamente los efectos adversos de la doxorrubicina libre para el tratamiento de tumores sólidos, como sarcoma de Kaposi (A. A. Gabizon, 2001).

Por otra parte, el *targeting* activo -o *targeting* mediado por ligandos- se basa en la incorporación de ligandos de afinidad en la superficie de las NP. Potencialmente, cuando las NP se encuentran con una célula que expresa en su superficie un receptor al que el ligando es afín, quedan retenidas y son internalizadas. De esta forma las NP tenderían a acumularse en las células que expresan el receptor correspondiente (Kunjachan et al., 2014). Aunque en teoría, esto puede mejorar el *targeting* de las NP y la actividad terapéutica, se cree que en el caso de muchas patologías, el *targeting* activo está sujeto a la misma localización fisiológica que las NP sin ligandos y por lo tanto tiene un perfil de distribución y acumulación similar. Sin embargo, el *targeting* activo puede ofrecer ventajas en términos de captura celular una vez que la NP llega al tejido diana (van der Meel et al., 2016). A tal fin, los ligandos se seleccionan para unirse a moléculas de superficie o receptores sobreexpresados en órganos, tejidos, células o dominios subcelulares enfermos (Bertrand et al., 2014). Una estrategia clásica de *targeting* activo es la incorporación en liposomas de moléculas de folato adosadas a fosfolípidos, para realizar un *delivery* de agentes quimioterapéuticos a células tumorales que típicamente sobreexpresan el receptor de folato (A. Gabizon, Shmeeda, Horowitz, & Zalipsky, 2004). A pesar de que un gran número de NP sin ligandos ha pasado pruebas clínicas o está en fases clínicas de desarrollo, hay muy pocas NP con ligandos que han progresado en este sentido (T. M. Allen & Cullis, 2013). La mayoría son NP basadas en lípidos que incorporan ligandos afines al receptor de transferrina (RTf, sobreexpresado en un rango amplio de células tumorales), como la proteína transferrina o fragmentos de anticuerpos anti-RTf (van der Meel et al., 2016). El progreso lento hacia ensayos clínicos de las NP con ligandos, comparados con las moléculas terapéuticas tradicionales o liposomas para *targeting* pasivo, está relacionado con los costos altos de desarrollo (fabricación, obtención de anticuerpos, controles de calidad y propiedad intelectual) (Lammers, Kiessling, Hennink, & Storm, 2012), en este contexto cobran relevancia aquellas estrategias de manufactura que priorizan la sencillez estructural con ligandos superficiales que carezcan de la complejidad estructural de una proteína.

Uno de los mayores desafíos que tiene el *delivery* con NP es cómo lograr administrar agentes terapéuticos a través de la membrana plasmática para llegar

a las moléculas diana intracelulares. Teniendo en mente esto, otra de las ventajas del *targeting* activo es que favorece la endocitosis mediada por receptor tanto de la NP como de su contenido, permitiendo su ingreso en el interior celular. La entrada a la célula se hace mediante el sistema vesicular endolisosomal, por lo que esta estrategia solo es válida sí la molécula terapéutica es capaz de sobrevivir al entorno ácido y rico en enzimas de los endosomas y lisosomas (T. M. Allen & Cullis, 2013).

1.4*. Delivery* intracelular mediante liposomas pH sensibles

Muchos agentes incorporados en NP deben acceder a sus receptores diana intracelulares para ejercer su efecto terapéutico. Los liposomas, generalmente, ingresan a las células por las vías endocíticas y siguen una ruta degradativa. (Jhaveri & Torchilin, 2016). Los endosomas maduran desde los endosomas tempranos (pH interno 6,5) hasta los endosomas tardíos (pH interno 6,5 a 5,5) que progresivamente se vuelven más ácidos y finalmente pueden fusionarse con los lisosomas (pH interno 5 o inferior). Las NP que entran en una célula a través de ésta vía endocítica quedan atrapadas en los endosomas y finalmente terminan en lisosomas, donde se degradan a través de la degradación activa por diversas enzimas lisosómicas digestivas. Dado que solo una pequeña fracción de los endosomas se degrada espontáneamente liberando su contenido, la mayoría del material endocitado se degrada y nunca llega al citosol (Liu & Huang, 2013). Esto da como resultado una administración restringida de agentes terapéuticos a sus dianas intracelulares. El escape endosomal es, por lo tanto, un cuello de botella crítico para el suministro intracelular de moléculas (Shete, Prabhu, & Patravale, 2014). Se han investigado varios enfoques para permitir un escape endosomal eficaz de agentes terapéuticos, incluida la desestabilización de la membrana endosómica mediante agentes fusogénicos o la disrupción fotoquímica, la hinchazón osmótica para permitir el estallido de los endosomas y el uso de péptidos formadores de poros (Shete et al., 2014).

Una de las estrategias para evitar la degradación prematura de los agentes terapéuticos, que transportan liposomas, es utilizar componentes que respondan a cambios en el pH de entorno y que sean capaces de desestabilizar la

membrana endosomal o romper endosomas al modificar los liposomas que se encuentran en su interior; como el lípido dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (V. P. Torchilin, 2014). El mecanismo biofísico que subyace a la capacidad de responder a cambios de pH, exhibida por los liposomas que contienen DOPE, radica en la forma molecular de los lípidos. Los lípidos cilíndricos se ensamblan en bicapas (fase laminar Lα), los que tienen forma de cono (área transversal de la cabeza polar más grande que el área transversal de las cadenas de acilo) se autoensamblan en micelas. En particular, DOPE es un cono invertido (cabeza polar pequeña y mal hidratada, con un área transversal menor en comparación con las cadenas de acilo). La forma del cono invertido favorece la formación de enlaces de hidrógeno entre las cabezas polares de DOPE (grupo amino y grupo fosfato de DOPE adyacente) que disminuyen la hidratación interfacial y favorecen su ensamblaje en una fase hexagonal invertida (H_{II}). A pH fisiológico, las moléculas DOPE no forman bicapas, y por encima de la temperatura de transición de fase (10 °C), adoptan la fase H_{II} (Morilla & Romero, 2012).

Sí se intercalan moléculas anfifílicas que tengan un grupo ácido protonable con carga negativa a pH fisiológico [como la molécula colesteril hemisuccinato, (CHEMS)] entre las moléculas de DOPE, se favorece la repulsión electrostática y permite la formación de estructuras de bicapa (fase Lα), lo que conduce a la formación de liposomas a pH y temperatura fisiológicos. Mientras que, a pH fisiológico se forman liposomas estables, la acidificación desencadena la protonación de los grupos carboxílicos de las moléculas anfifílicas, reduciendo su efecto estabilizador y llevando a la desestabilización liposómica (Simões, Moreira, Fonseca, Düzgüneş, & de Lima, 2004) (Morilla & Romero, 2012). Esto genera la fusión del liposoma con la membrana endosomal produciendo la desestabilización del endosoma y la posterior liberación, del contenido acuoso con el agente terapéutico al citoplasma celular, donde estará más disponible para unirse a varias moléculas diana intracelulares (Jhaveri & Torchilin, 2016).

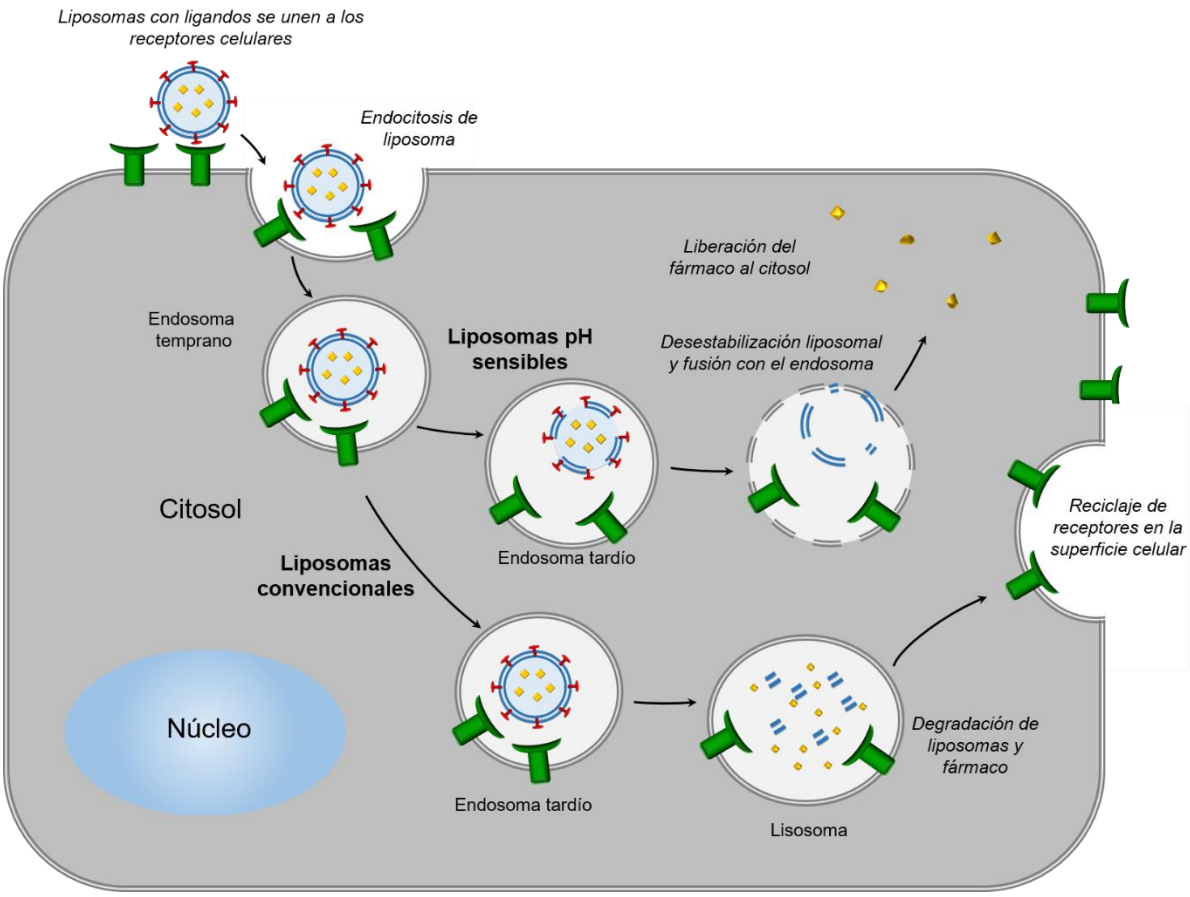


Figura 3. Esquema del mecanismo de *targeting* activo y pH sensibilidad de liposomas multifuncionales.

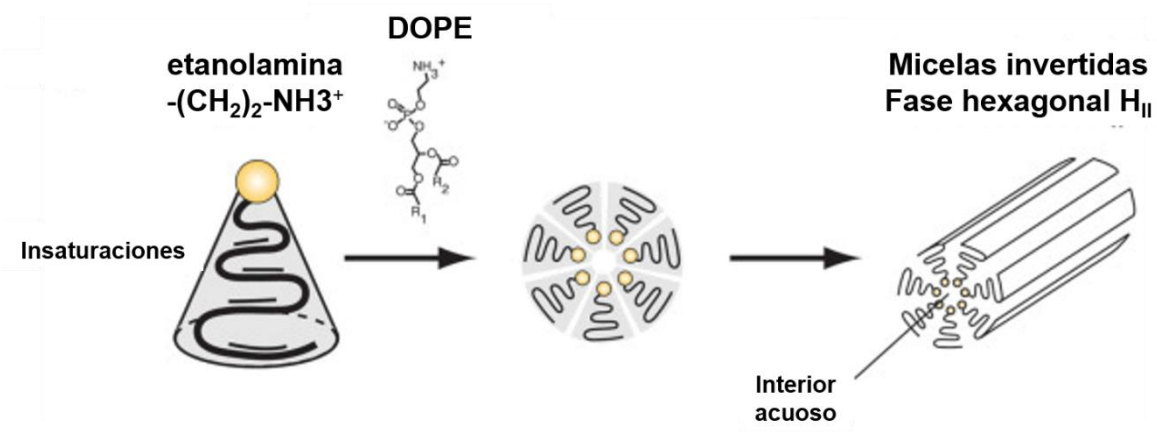


Figura 4. Ilustración que esquematiza la formación espontanea de fases hexagonales HII a partir de DOPE. (Kraft, Freeling, Wang, & Ho, 2014).

1.5 Nanomedicinas inhalatorias

La expansión del mercado de la nanomedicina y la utilidad de las NP ha despertado un gran interés en el desarrollo de nanomedicinas que utilicen los pulmones como ruta principal para el tratamiento local de enfermedades respiratorias o para administración sistémica. Los pulmones proporcionan un medio no invasivo para la administración sistémica de productos terapéuticos y una ruta directa para el tratamiento de enfermedades pulmonares específicas tales como trastornos pulmonares obstructivos crónicos, asma, fibrosis quística, infecciones pulmonares y cáncer de pulmón. Algunas de las ventajas de la administración sistémica de fármacos a través de la vía pulmonar son: evitar el metabolismo del primer paso hepático e intestinal, la baja actividad enzimática local de los pulmones (en comparación con el tracto gastrointestinal), una gran superficie de absorción, un epitelio alveolar delgado y un abundante suministro de sangre (Haque, Whittaker, McIntosh, Pouton, & Kaminskas, 2016; Mansour, Rhee, & Wu, 2009). Dependiendo del tipo de administración que se busque, sistémica o local, se diseñará o elegirá un tipo de nanomedicina en particular. Por ejemplo, las NP basadas en lípidos tienen una acumulación considerablemente mayor y un tiempo de retención más prolongado en los pulmones que las NP no lipídicas (*quantum dots*, dendrimeros, NP de silica), luego de la administración por inhalación (Garbuzenko, Mainelis, Taratula, & Minko, 2014).

1.6 Estructura y fisiología del pulmón

El pulmón humano es uno de los sistemas de órganos más complejos del cuerpo, se compone de 300 a 600 millones de alvéolos que aportan una superficie de intercambio gaseoso de ~100 m^2. Las principales funciones de los pulmones son transportar el oxígeno del ambiente a la sangre y eliminar el dióxido de carbono a la atmósfera. Además, los pulmones son la puerta de entrada para las partículas transportadas por el aire que incluyen contaminantes ambientales, sustancias medicinales y gaseosas (Nahar et al., 2013).

La estructura pulmonar se divide en dos partes funcionales: las vías conductoras que abarcan la región traqueobronquial, desde la laringe hasta los

bronquiolos terminales; y la región respiratoria o región alveolar, que comprende los bronquiolos y alvéolos respiratorios. El tracto respiratorio está muy bifurcado, cada bifurcación se conoce como generación, en total en el árbol bronquial hay ~ 21 generaciones. El 95% de la superficie total de los pulmones está compuesta por el área alveolar y un epitelio alveolar-vascular delgado con una extensa red capilar (Moreno-Sastre, Pastor, Salomon, Esquisabel, & Pedraz, 2015).

Las vías respiratorias conductoras son los conductos cuya función principal es suministrar gases casi totalmente estériles e hidratados a los alvéolos periféricos para el intercambio de gases. En pulmones humanos, las vías aéreas cartilaginosas se extienden hacia el interior del parénquima pulmonar y están rodeadas por abundantes glándulas submucosas. La tráquea, los bronquios y los bronquiolos humanos están revestidos principalmente por un epitelio pseudoestratificado cuya superficie está dominada por células ciliadas (Whitsett & Alenghat, 2015). El movimiento coordinado y direccional de los cilios impulsa el aclaramiento mucociliar de las vías respiratorias (Horváth & Sorscher, 2008). Las uniones fuertes que mantienen unidas a las células epiteliales pulmonares están mediadas por claudinas, conexinas, adhesinas y ocludinas, que crean una barrera a las partículas externas y proporcionan integridad estructural a las vías respiratorias (Whitsett & Alenghat, 2015). Las células basales localizadas debajo del epitelio superficial sirven como progenitores de células ciliadas y células secretoras y tienen un papel crítico en la regeneración del epitelio de las vías aéreas después de lesiones. El epitelio, también está formado por células secretoras, incluidas las células serosas, células Clara, neuroendocrinas y caliciformes productoras de mucus, que se encuentran en números relativamente bajos en las vías respiratorias normales (Whitsett & Alenghat, 2015). Las glándulas submucosas están formadas por células caliciformes que secretan fluidos y mucinas (proteínas altamente glicosiladas) y células serosas que secretan proteínas antimicrobianas como β-defensinas, lisozima y lactoferrina; su cantidad y actividad secretora también están influenciadas por la presencia de lesiones y/o infección (Wine & Joo, 2004).

A diferencia de la gran diversidad de células que hay en las vías de conducción, solo dos tipos recubren los alvéolos. Las células alveolares tipo I, son células escamosas que cubren aproximadamente el 90% de la superficie alveolar en los

pulmones adultos e interactúan estrechamente con las células endoteliales de los capilares pulmonares (Whitsett & Alenghat, 2015). Las otras células que recubren los alvéolos son células epiteliales cuboidales tipo II. Estas últimas son las células productoras y secretoras de surfactante pulmonar ya que sintetizan y almacenan lípidos, en forma de cuerpos lamelares y proteínas (SP-A, SP-B, SP-C y SP-D) que median la homeostasis del surfactante, cuya función es reducir la tensión superficial alveolar durante el ciclo respiratorio (Perez-Gil & Weaver, 2010). Las células alveolares tipo II también son las principales células progenitoras durante la reparación de los alvéolos por su capacidad de autorenovarse y ser las precursoras de las células tipo I (Barkauskas et al., 2013; Whitsett & Alenghat, 2015). Si bien la delgada barrera de tejido entre la interfase aire-sangre tiene, en promedio 2 µm de espesor, más de la mitad del área es de solo algunos cientos de nanómetros (Tsuda & Gehr, 2014).

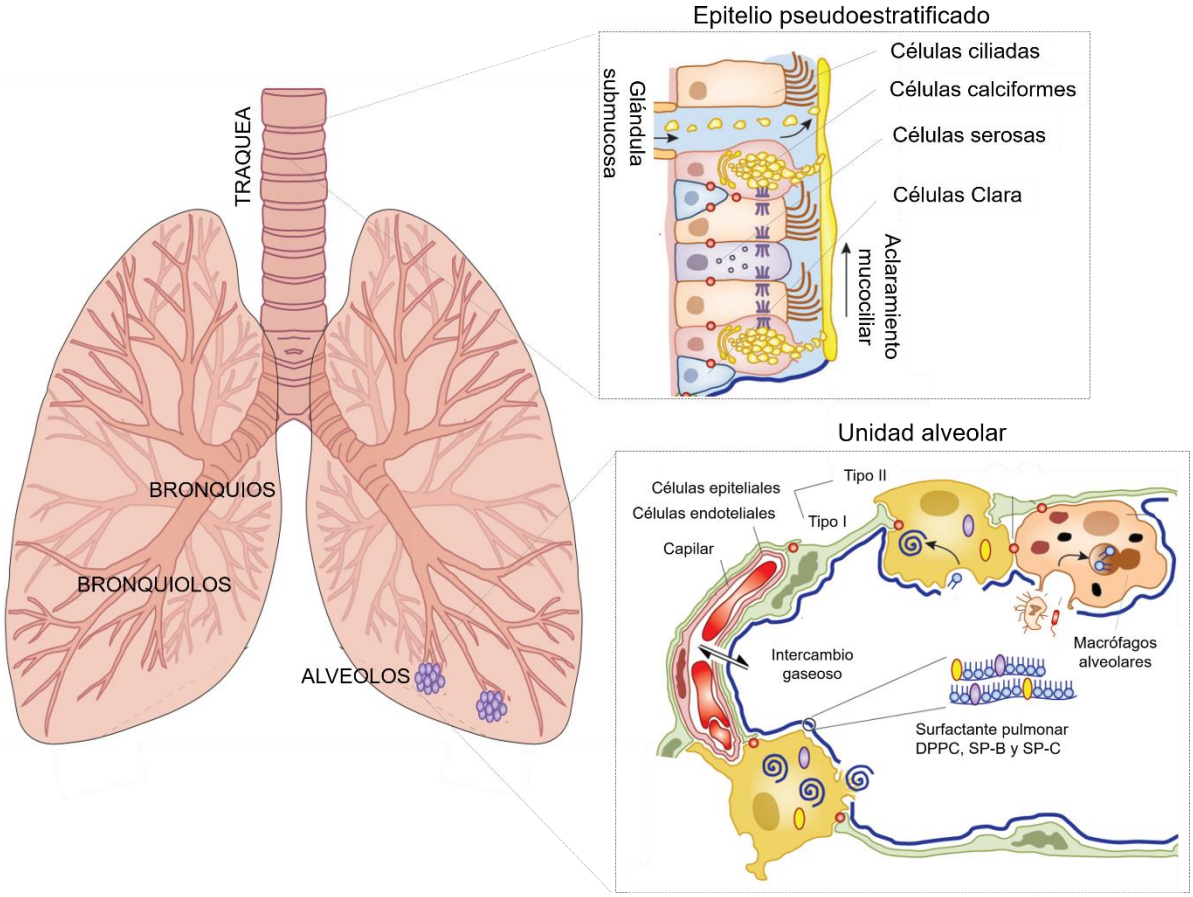


Figura 5. Ilustración del epitelio pseudoestratificado de las vías en las vías de conducción y de un alveolo pulmonar. Imagen modificada a partir de (Chen, Fillmore, Hammerman, Kim, & Wong, 2014; Whitsett & Alenghat, 2015).

1.7 Macrófagos alveolares

Los macrófagos alveolares (MA) ocupan el espacio luminal del epitelio respiratorio, mientras que las células dendríticas inmaduras se encuentran en la cara basal del epitelio que, eventualmente, pueden penetrar a través de las uniones estrechas para atrapar material antigénico en el lumen alveolar (Tsuda & Gehr, 2014).

Se cree que los MA desempeñan un papel central en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y la defensa del huésped en el pulmón. Están situados en el lumen de las vías respiratorias, muy cerca de la superficie de la mucosa, donde normalmente son las primeras células inmunitarias que se encuentran con las partículas foráneas (Mathie et al., 2015). El fenotipo de los MA está condicionado por los requisitos del tejido durante los procesos normales y patológicos. Su papel en la eliminación de las células apoptóticas y restos celulares, en condiciones normales o patológicas, es tan importante como su participación en las respuestas inmunológicas. Sin embargo, cada función requiere plasticidad dentro de la población de MA, de modo que se inhiban las respuestas proinflamatorias hacia restos celulares o antígenos inocuos, pero que no se vean comprometidas las respuestas inmunes efectivas contra microorganismos patógenos (Hussell & Bell, 2014). La capacidad de los macrófagos tisulares para adaptarse y llevar a cabo funciones tan dispares condujo a su amplia clasificación como macrófagos M1 (activación clásica) o macrófagos M2 (activación alternativa) (Gordon, 2003).

1.8 Deposición de partículas en los pulmones

Uno de los factores que influyen en la eficacia del suministro de fármacos pulmonares es la dosis capaz de alcanzar las células diana en el pulmón; que dependerá del lugar donde se depositen las partículas inhaladas que contienen el fármaco.

El diámetro hidrodinámico de una partícula es el factor principal que determina la deposición pulmonar de aerosoles en las diversas regiones del tracto respiratorio. Los mecanismos por los que se depositan las partículas son:

a) impactación inercial (se da cuando las partículas son demasiado grandes y mantienen su trayectoria independientemente del flujo de aire, por lo que colisionan con las paredes del tracto respiratorio), b) la sedimentación gravitacional (proceso dependiente del tiempo en el cual las partículas se asientan debido a la influencia de la gravedad) y c) la difusión (movimiento browniano) (Carvalho, Peters, & Williams III, 2011). Por lo tanto, las partículas más grandes (>10 µm) quedarán retenidas en la región orofaríngea y la laringe por impactación inercial. Las partículas que tienen un tamaño entre 2 - 10 µm generalmente se depositan en la región traqueobronquial. La deposición en las vías respiratorias y los alvéolos de partículas de tamaño pequeño (0,5 - 2 µm), es el resultado de la sedimentación gravitacional. Las partículas con un tamaño <0, 5 µm, como consecuencia de la difusión browniana, generalmente no se depositan y se expulsan al exhalar -se elimina el 80% de partículas <1 µm durante la respiración- (Moreno-Sastre et al., 2015).

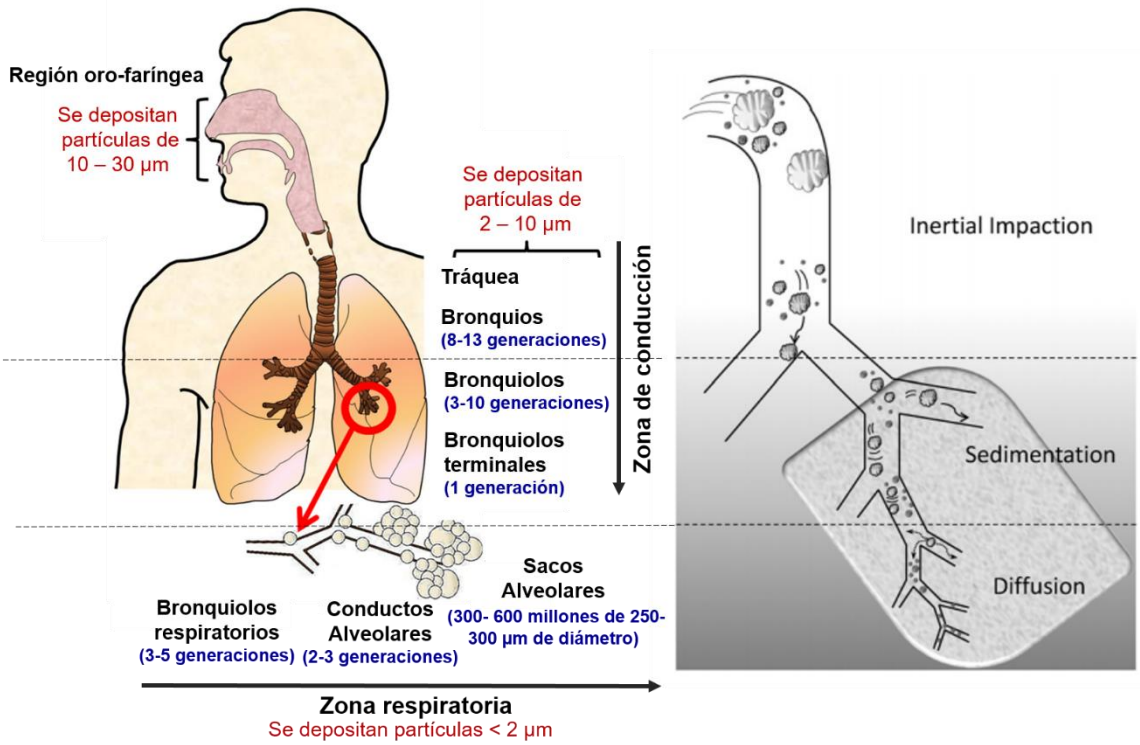


Figura 6. Ilustración de la deposición de partículas en las vías respiratorias según su tamaño. Imagen modificada a partir de (Carvalho et al., 2011; Nahar et al., 2013).

1.9 Liposomas inhalables

Hasta la fecha, los liposomas han sido las NP biodegradables más ampliamente exploradas para la administración controlada de agentes terapéuticos a los pulmones y, por lo tanto, son las únicas NPs que han entrado en ensayos clínicos como nanomedicinas inhalables. Son altamente biocompatibles porque se preparan a partir de materiales que imitan los componentes de los pulmones, como los fosfolípidos (Haque et al., 2016). Los fármacos hidrófobos se pueden incorporar en liposomas, para facilitar la administración por inhalación, sin excipientes potencialmente tóxicos (T. M. Allen, 2006). También se puede modificar el perfil de liberación del fármaco, prolongando su tiempo de residencia en el pulmón y logrando así una mayor duración del efecto terapéutico, como sucede con AmBisome, amikacina liposomal (ARIKACE) y ciprofloxacina liposomal (Lipoquin y Pulmaquin), tres formulaciones inhalables que están siendo evaluadas en ensayos clínicos en fase III (Haque et al., 2016).

La incorporación de fármacos en liposomas inhalables conlleva varias ventajas: disminuye la absorción sistémica al producir una liberación lenta del fármaco; pueden mejorar el perfil de tolerabilidad y reducir efectos no deseados de medicamentos que no son bien tolerados, tienen un sabor desagradable o causan tos (Cipolla, Gonda, & Chan, 2013). A su vez, los liposomas inhalados pueden facilitar el acceso a células específicas del pulmón como MA, en el tracto respiratorio (Vyas, Quraishi, Gupta, & Jaganathan, 2005; Wijagkanalan et al., 2008). Una administración inhalatoria exitosa exige además de ciertas características fisicoquímicas de los liposomas, un dispositivo inhalador que produzca un aerosol con tamaños de partículas adecuados, ya que el sitio de deposición de liposomas en los pulmones dependerá en gran medida del tamaño y las propiedades aerodinámicas de la partícula de aerosol que los contenga (Haque et al., 2016).

1.10 Dispositivos inhalatorios para la administración de liposomas

Existen numerosos dispositivos disponibles con propiedades y especificaciones que se utilizan para distintos tipos de formulaciones

farmacéuticas. Dado que el dispositivo influye en gran medida en la formación del aerosol y éste en la deposición de partículas, la elección del dispositivo apropiado para una formulación específica es una de las etapas más exigentes durante la fase de desarrollo de una nanomedicina inhalable, y es imprescindible para garantizar la eficacia de la formulación del fármaco (Andrade et al., 2013).

Dentro de las categorías de tecnologías de dispositivos de inhalación que más se utilizan se incluyen: nebulizadores, inhaladores de polvo seco (IPS, generan partículas entre 1 – 2 µm) e inhaladores de dosis medidas (IDM, utilizan un cartucho presurizado que contiene el medicamento micronizado en una suspensión con etanol como co-solvente) (Sanchis, Corrigan, Levy, & Viejo, 2013).

Los IPS, son los inhaladores que más se prescriben y combinan una formulación en polvo que contiene partículas en un rango de tamaño respirables y un dispositivo que dispersa el polvo como un bolo de aerosol (Cipolla et al., 2013). Los IPS son atractivos debido a su tamaño pequeño y portabilidad. Sin embargo, las formulaciones de IPS pueden verse obstaculizadas por el mayor tiempo de desarrollo y la dificultad de generar una formulación de polvo seco estable y dispersable a temperatura ambiente. Los IDM contienen una solución o suspensión de fármaco disperso en un propelente que, al actuar, administra un bolo de aerosol. Si bien la ventaja es que es un dispositivo económico y portable, la desventaja es que los IDM no son muy eficientes, tienen un riesgo alto de uso indebido y, por lo general, solo son apropiados para moléculas que son potentes en dosis bajas (Cipolla et al., 2013; O'Donnell et al., 2009). Los nebulizadores atomizan el líquido en gotitas usando aire comprimido o vibraciones piezoeléctricas rompiendo la tensión superficial del líquido y creando una capa nebulosa. La desventaja de los nebulizadores es que los tiempos de tratamiento son más largos, la portabilidad reducida y se necesita una fuente de alimentación externa, como aire comprimido para nebulizadores jet, o energía de la batería o de la red eléctrica. Sin embargo son simples de usar y operar en bebés, ancianos, pacientes con pulmones severamente comprometidos e incluso para pacientes con ventilación asistida; ya que no requieren coordinación ni un esfuerzo inspiratorio importante. A su vez la nebulización es la forma más elegida

y sencilla para administrar formulaciones liposomales en suspensión acuosa a pulmón (Cipolla et al., 2013).

Durante décadas se han comercializado dos tipos de nebulizadores, los nebulizadores jet y los nebulizadores ultrasónicos. Los nebulizadores jet operan pasando un gas de alta velocidad a través de una boquilla "venturi" estrecha para convertir el líquido en aerosoles; (Najlah et al., 2014) de manera relativamente ineficiente, con menos del 20% de la dosis cargada que llega a las vías respiratorias. (Cipolla et al., 2013). Los nebulizadores ultrasónicos generan aerosoles al emplear un cristal piezoeléctrico vibratorio de alta frecuencia. Pero debido al calor generado durante la atomización generalmente no son aptos para administrar suspensiones de liposomas grandes (Najlah et al., 2014) y otras estructuras delicadas, como algunas macromoléculas. Más recientemente, se ha introducido un tercer tipo de nebulizadores, conocidos como nebulizadores de malla vibratoria, que emplean placas perforadas que vibran para generar aerosoles (Najlah et al., 2014). Estudios con este tipo de nebulizadores han demostrado que, a diferencia de los dispositivos ultrasónicos, no calientan las soluciones durante la atomización, (Dhand, 2002) tienen tasas de entrega más rápidas y mejor eficiencia, factores que contribuyen a una reducción del tiempo de tratamiento (Cipolla et al., 2013). Además, estos dispositivos incluyen mejoras como un diseño compacto, portable y un funcionamiento silencioso que promueven el cumplimiento del tratamiento (Lehofer et al., 2014). Un ejemplo de dispositivos de malla vibratoria pasiva es el nebulizador Omron MicroAir NE-U22 que emplea una placa perforada con alrededor de 6000 orificios cónicos de aproximadamente 3 µm de diámetro. Un cristal piezoeléctrico vibrante transmite las vibraciones a la placa perforada, lo que produce una extrusión de fluido a través de los agujeros de la malla vibratoria para producir el aerosol (Najlah et al., 2014).

Tanto los procesos de nebulización jet como de malla generan un estrés mecánico al exponer a las formulaciones liposomales a la interfase aire-líquido y a fuerzas cortantes. Sin embargo, en el nebulizador jet, la formulación se expone repetidamente al proceso de nebulización ya que > 98% de las gotitas de nebulizado se vuelven a depositar dentro del nebulizador después de cada pasada (Cipolla et al., 2013). Esto hace que los dispositivos de malla vibratoria

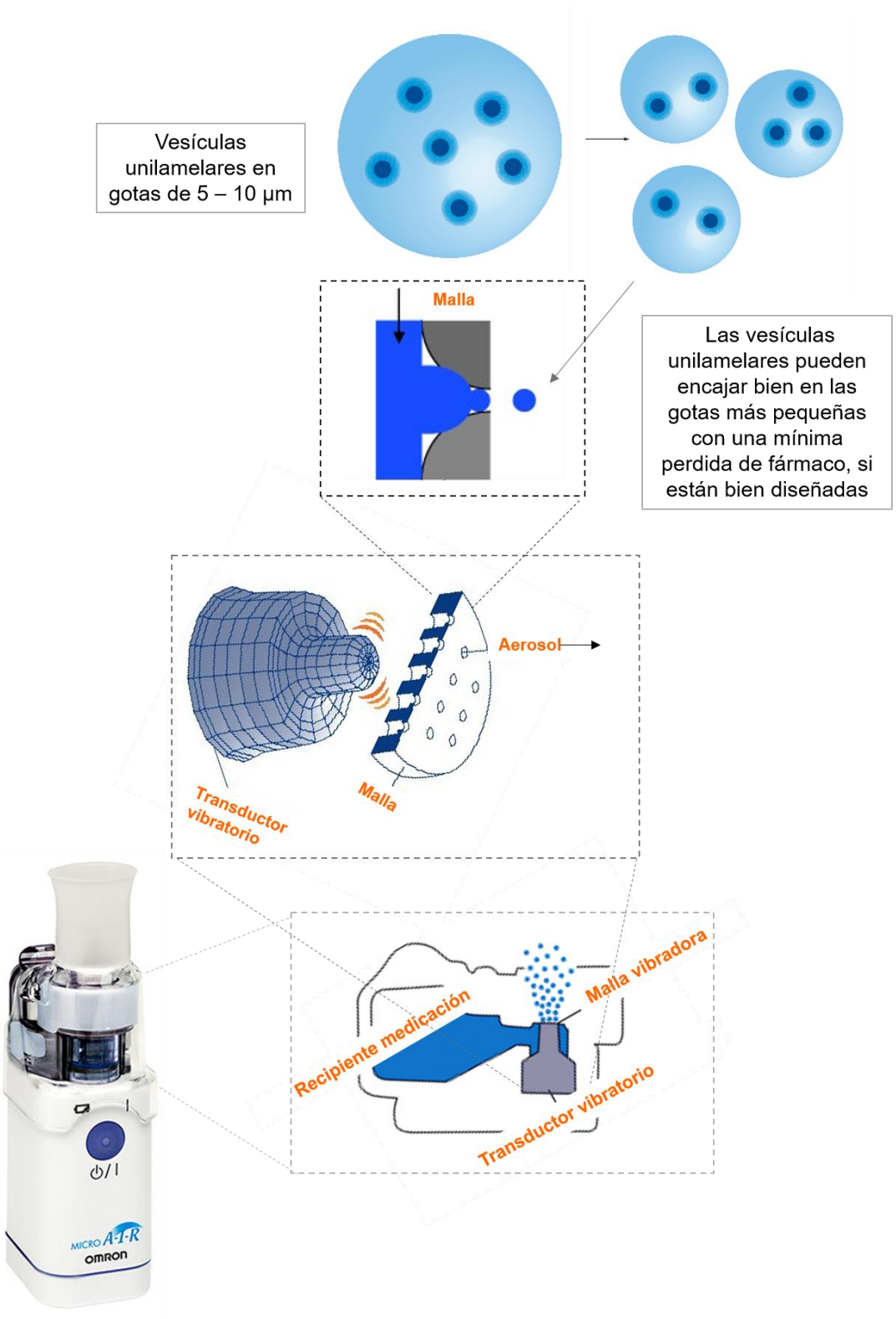


Figura 7. Esquema del proceso de nebulización de liposomas por malla vibratoria. Imágenes obtenidas de (Cipolla et al., 2013; HEALTHCARE OMRON, 2018)

ejerzan efectos menos dañinos sobre los liposomas. Además, el volumen residual una vez completa la nebulización, es insignificante cuando se usan soluciones de baja viscosidad (Najlah et al., 2014). Estas características hacen que los nebulizadores de malla vibratoria sean los dispositivos más eficaces para la nebulización de liposomas. Sin embargo a pesar de tener una mejor eficiencia, el estrés mecánico también puede afectar la integridad estructural de las membranas liposómicas y promover la liberación de fármacos (Lehofer et al., 2014).

1.11 Nanovesículas arqueolipídicas: arqueosomas

Los arqueosomas (ARQ) son NP preparadas con uno o varios lípidos extraídos de microorganismos del dominio *Archaea* (G. Sprott, Dicaire, Fleming, & Patel, 1996). Las arqueas o arqueobacterias, son microorganismos filogeneticamente distintos de las bacterias y eucariotas, aunque más relacionadas con estas últimas. (Eme, Spang, Lombard, Stairs, & Ettema, 2017). Morfológicamente son organismos unicelulares, sin núcleo ni organelas asociadas. Una de las características que diferencia a las arqueas, de bacterias y eucariotas, es la estructura de los lípidos de membrana. Estos lípidos, llamados arqueoles, tienen uniones éter, una estereoconfiguración del glicerol *sn* 2,3, cadenas hidrocarbonadas ramificadas C_{20} (fitanilos) derivadas de isoprenoides y pueden tener dímeros lipídicos con dos cabezas polares (bifitanilos) llamados caldarqueoles que forman zonas monocapa en la membrana lipídica (Kate, 1993). En cambio los lípidos de bacterias y eucariotas tienen uniones éster, cadenas hidrocarbonadas lineales y estereoconfiguración sn 1,2 y son monopolares.

En general las arqueas prosperan en ambientes extremos: los halófilos en sal saturada, los metanógenos en ambientes anóxicos y los termófilos extremos a temperaturas muy altas. Los microorganismos halófilos extremos se encuentran típicamente en las salinas a lo largo de las costas y los lagos hipersalinos, y se agrupan en la familia *Halobacteriaceae.* Muchos miembros de *Halobacteriaceae* se caracterizan por la presencia de pigmentos rojizo-anaranjados, llamados bacterioruberinas, en la membrana citoplásmica, que

ayudan a eliminar la radiación UV y proteger las células de los efectos nocivos de la luz solar (Corcelli & Lobasso, 2006). Éstas viven en ambientes con concentraciones salinas que pueden exceder los 250 - 300 g/L, concentraciones salinas como las que se encuentran en el mar Muerto (Oren, 1994).

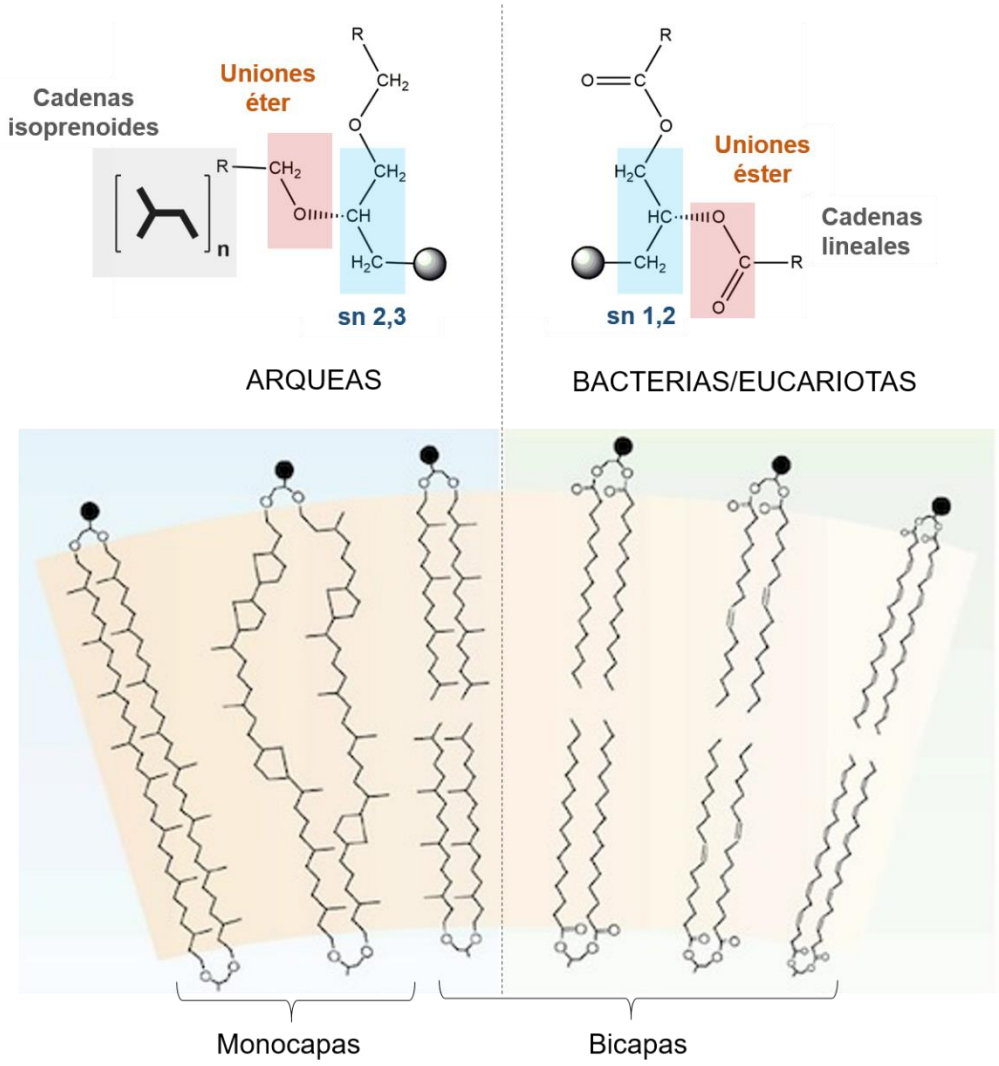


Figura 8 – Estructura química y diferencias entre arqueolípidos y lípidos de bacterias y eucariotas y tipos de membrana que pueden formar. Imagen modificada a partir de (Valentine, 2007)

Halorubrum tebenquichense es una especie de arquea hiperhalofila, aislada por primera vez en el lago Tebenquiche, en el desierto de Atacama, Chile (Lizama et al., 2002). Posteriormente, en el Centro de Investigación y Desarrollo de Nanomedicinas (CIDeN) de la Universidad Nacional de Quilmes se aisló una cepa de *H. tebenquichense* de Salina Chica, Península de Valdés en la provincia de Chubut, Argentina (Gonzalez et al., 2009). La composición cualitativa de los

lípidos polares que componen la membrana lipídica se determinó por tinciones diferenciales en cromatografía en capa delgada de una dimensión (Jose Morilla et al., 2011) y espectroscopía de masa (Gonzalez et al., 2009), junto con los datos bibliográficos de composición lipídica de arqueabacterias halófilas extremas (Corcelli & Lobasso, 2006). Se identificaron cinco arqueolipidos:

a. El sulfoglicolípido, 1-O-[α-D-manosa-(2'-SO_3H)-1'→2')-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol, SDGD-5 (m/z= 1055 como ión monocargado y m/z= 1113 correspondiente al SDGD-5 aducto con cloruro de sodio).

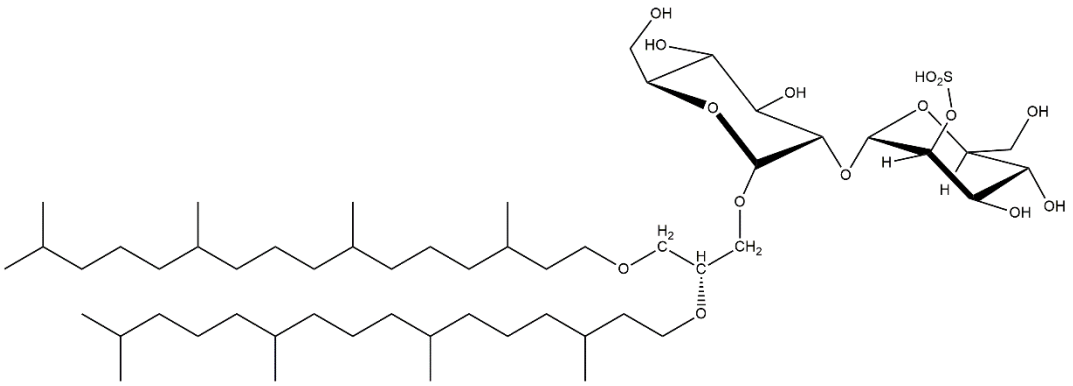
b. La cardiolipina glicosilada, 1-O-[α-D-manosa-(2'-SO3H)-1'→2')-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-ácido fosfatídico-sn-glicerol, SDGD-5-PA (m/z=1770 como ión monocargado).

c. El fosfolípido arqueal 2,3-di-O-fitanil-sn-fosfatidilglicerofosfato metilester, PGP-Me (m/z= 899 como ión monocargado y m/z= 922 correspondiente al PGP-Me aducto con sodio).

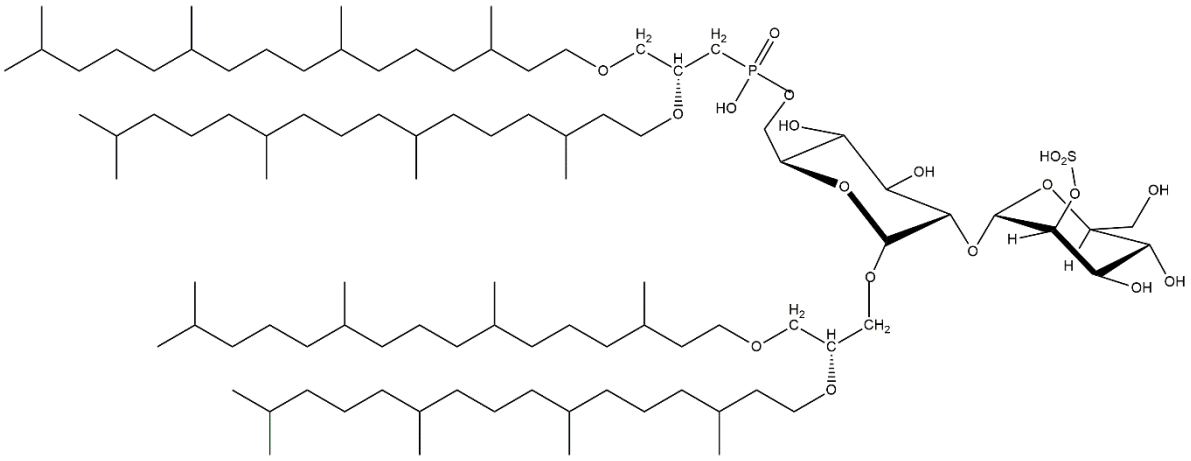
d. El fosfolípido arqueal 2,3-di-O-fitanil-sn-fosfatidilglicerol, PG (m/z=805 como ión monocargado).

e. La cardiolipina sn-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-sn-di-O-fitanilglicerol, BPG (m/z=1521 como ión monocargado).

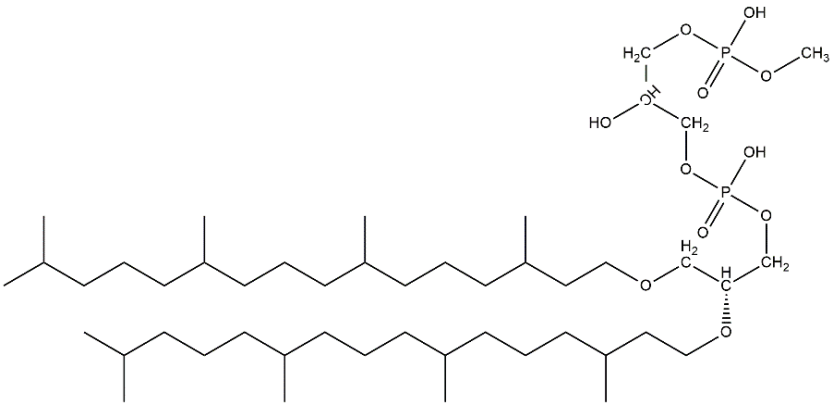
Los ARQ, al igual que los liposomas son nanovesículas; que se pueden encontrar en forma de una bicapa (si se fabrican exclusivamente a partir de arqueoles o con mezclas lipídicas que contienen arqueoles y lípidos no arqueobacterianos) o una monocapa (si se fabrica exclusivamente a partir de lípidos bipolares caldarqueoles) o una combinación de monocapas y bicapas (si están hechas de caldarqueol y arqueoles u otros lípidos monopolares) (Kaur, Garg, Rath, & Goyal, 2016).



a) **SDGD-5**

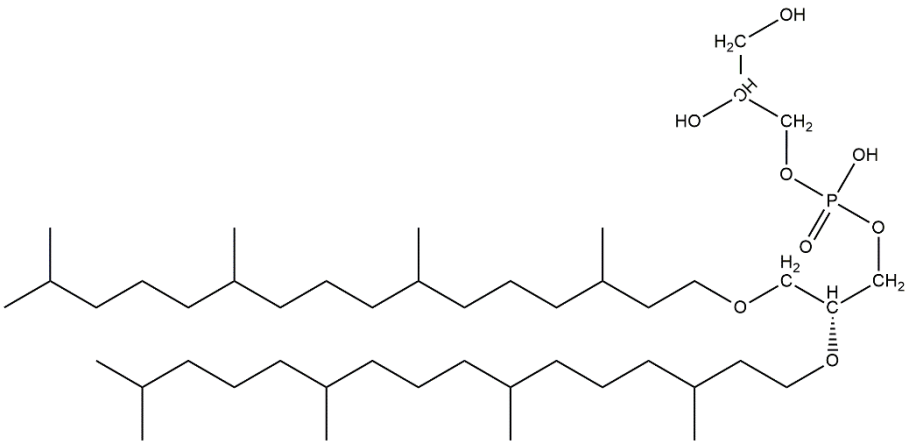


b) **SDGD-5PA**

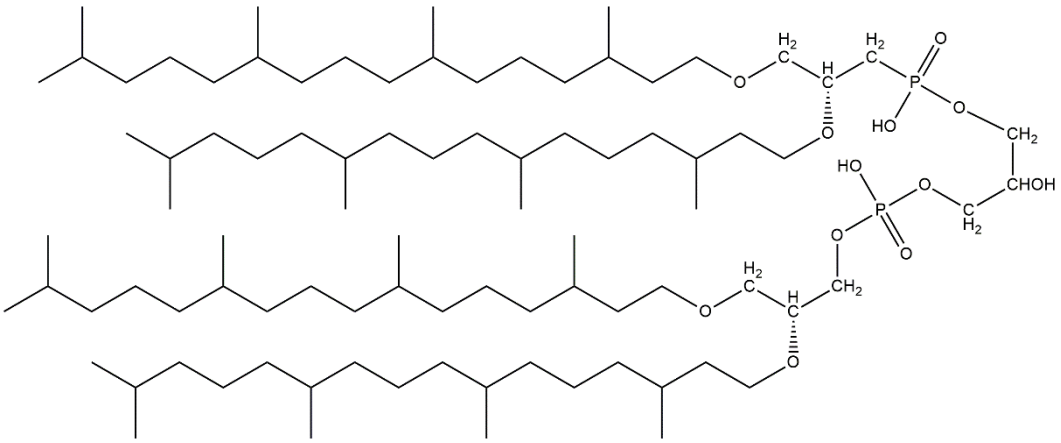


c) **PGP-Me**

Figura 9a. Estructura química los lípidos polares totales extraídos del arquea hiperhalófila *Halorubrum tebenquichense* SDGD-5, SDGD-5PA y PGP-Me



d) **PG**



a) **BPG**

Figura 9b. Estructura química los lípidos polares totales extraídos del arquea hiperhalófila *Halorubrum tebenquichense* PG y BPG.

1.12 Aplicaciones biomédicas de ARQ

Los ARQ se han utilizado como potentes coadyuvantes para la inducción de respuestas de células T, Th1, Th2 y $CD8^+$, luego de su administración parenteral o tópica (Caimi et al., 2017; Higa et al., 2016; Higa et al., 2012; Krishnan, Sad, Patel, & Sprott, 2003). Si bien no está del todo elucidado el mecanismo de inducción de la respuesta inmune, los diversos grupos de la cabeza polar pueden facilitar interacciones inmunoestimulantes únicas con las células presentadoras de antígenos (G. D. Sprott et al., 2003). Los ARQ

preparados a partir de arquelípidos de *Methanobrevibacter smithii* han sido muy bien caracterizados por su capacidad adyuvante, que se debería a la presencia de arqueaetidil serina. La serina promovería la interacción con el receptor de fosfatidilserina expresado en células presentadoras de antígeno (APC), esta unión mediaría la internalización de los ARQ con el antígeno incorporado y la posterior presentación cruzada del antígeno en moléculas de MHC de clase I. A su vez la unión con el receptor de fosfatidilserina regularía positivamente la co-estimulación de las APC sin producción manifiesta de citoquinas inflamatorias (Krishnan & Sprott, 2008). Recientemente, los ARQ están siendo evaluados, en estudios pre-clínicos, como sistemas de *delivery* de agentes terapéuticos, en donde han mostrado que mejoran su eficiencia terapéutica tanto *in vivo* como *in vitro* Ejemplo de esto es la incorporación en ARQ del quimioterapéutico paclitaxel (Alavi et al., 2014) o de las drogas antituberculosas isoniazida y rifampicina (Attar et al., 2017). Además se los ha probado como sistema de *delivery* tópico de agentes antioxidantes naturales como compuestos fenólicos derivados de la oliva (González-Paredes et al., 2011) o betametasona (González-Paredes et al., 2010); y como vehículo para la administración oral de insulina (Li, Chen, Sun, & Xu, 2010).

1.13 Ventajas estructurales de ARQ

Las ventajas en la utilización de ARQ, como sistema de vehiculización de agentes terapéuticos, con respecto a liposomas convencionales, radican en dos cuestiones: su elevada tasa de internalización celular (Higa et al., 2012; Krishnan et al., 2003) y su estabilidad estructural. La presencia de cadenas isoprenoides completamente saturadas otorgan estabilidad frente a la degradación oxidativa (Benvegnu, Lemiègre, & Cammas-Marion, 2009). Los enlaces éter son más estables que los ésteres en un amplio rango de pH (Patel, Agnew, Deschatelets, Fleming, & Sprott, 2000). La estereoquímica inusual *sn 2,3* de glicerol disminuye el ataque de las fosfolipasas liberadas por otros organismos (Patel et al., 2000; G. Sprott et al., 1996). La estructura ramificada de las cadenas alquil ayuda a reducir la temperatura de fusión y la permeabilidad de la membrana lo que confiere alta estabilidad térmica (Brown, Venegas, Cooke, English, & Chong,

2009; Caimi et al., 2017; Choquet, Patel, Beveridge, & Sprott, 1992; G. Sprott et al., 1996).

Por otra parte, con respecto a la seguridad y biocompatibilidad, los ARQ han demostrado ser bien tolerados y relativamente seguros para posibles aplicaciones en vacunas (Patel, Omri, Deschatelets, & Dennis Sprott, 2002), ya que no se detectaron anticuerpos anti-lípidos significativos ni hemolisis cuando se los inyectó por vía subcutánea en ratones. Además, las arqueas no tienen en su membrana liposolisacaridos (Eckburg, Lepp, & Relman, 2003) y los ARQ preparados con lípidos de *Thermoplasma acidophilum* y *M. smithii* no activan los receptores TLR2 yTLR4 (Krishnan et al., 2007). Aún más, a diferencia de bacterias y hongos, aunque hay arqueas que son mesófilas y habitan en el cuerpo humano (intestino delgado, piel) no se han identificado especies de arqueas patogénicas hasta la fecha (Cavicchioli, Curmi, Saunders, & Thomas, 2003; Gill & Brinkman, 2011).

1.14 Técnicas de preparación y caracterización de nanovesículas

Tanto los ARQ como los liposomas se pueden preparar de manera de obtener vesículas monodispersas con diámetros en el rango de los 100 a 200 nm utilizando las mismas técnicas de preparación y de caracterización fisicoquímica.

Una de las técnicas más utilizadas para la fabricación de nanovesículas es la hidratación de la película lipídica o el método de Bangham (V. Torchilin & Weissig, 2003). Brevemente, este método implica la disolución del lípido en un disolvente orgánico, la evaporación del disolvente y la dispersión de la película de lípidos obtenida, en medios acuosos. El agente terapéutico que se desea incorporar puede incluirse en los medios acuosos (para moléculas hidrófilicas) o en la película de lípidos (para moléculas hidrófobas). Una de las desventajas de esta técnica es que la eficacia de encapsulación de las drogas solubles en agua es baja (5% -15%). Además, este método produce MLV grandes y no homogéneos que requieren procesos de sonicación o extrusión para generar LUV pequeños y homogéneos (Bozzuto & Molinari, 2015). Para asegurar el tamaño deseado, la lamelaridad y las propiedades de homogeneidad de los

liposomas fabricados con esta técnica, se requiere un procesamiento de homogenización de tamaños. Los métodos más comunes para esto son la sonicación, la extrusión y la homogeneización a alta presión. La sonicación se usa para reducir el tamaño de las vesículas al dar energía a la suspensión de lípidos. Esto se puede obtener aplicando una irradiación ultrasónica a las suspensiones de MLV (Woodbury, Richardson, Grigg, Welling, & Knudson, 2006). El método de extrusión de membrana reduce el tamaño de los liposomas (LUV grandes o MLV) haciéndolos pasar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro definido (Berger, Sachse, Bender, Schubert, & Brandl, 2001).

Los parámetros que incluyen la forma, el tamaño, las características de la superficie y la lamelaridad influyen fuertemente en el comportamiento biológico de los liposomas. Por lo tanto, deben caracterizarse ampliamente antes de su uso para garantizar el rendimiento *in vitro* e *in vivo*.

La forma de las nanovesículas se puede evaluar usando técnicas de microscopía electrónica. La lamelaridad puede determinarse usando tinción negativa y / o liofilización para microscopía electrónica de transmisión (TEM), TEM por criofractura (crio-TEM) y análisis de resonancia magnética nuclear (Bozzuto & Molinari, 2015). Varias técnicas están disponibles para la determinación y distribución del tamaño, entre las más aplicadas se incluyen la dispersión dinámica de la luz (DLS) (Ostrowsky, 1993) y las técnicas de microscopia antes mencionadas (Ruozi et al., 2011).

La técnica de DLS mide las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo. Estas ocurren porque las partículas en una suspensión (por ejemplo liposomas) experimentan un movimiento browniano aleatorio debido a las colisiones entre las partículas suspendidas y las moléculas del disolvente. El análisis de las fluctuaciones de intensidad permite la determinación de la distribución de los coeficientes de difusión de los liposomas, que se convierten en una distribución de diámetro hidrodinámico mediante la ecuación de Stokes-Einstein. DLS es un método simple y rápido que permite obtener como datos primarios el tamaño promedio (*Z average*) de las partículas y el índice de polidispersidad (pdi) (Hallett, Watton, & Krygsman, 1991). El pdi indica el grado de variación de los valores de tamaños obtenidos y por lo tanto es un indicador de la homogeneidad de tamaños en la población; valores de pdi

cercanos a 0 indican una población monodispersa, mientras que valores más cercanos a 1 indican una población altamente polidispersa. Por el contrario, las técnicas de microscopía electrónica, tales como TEM y cryo-TEM proporcionan una determinación precisa del tamaño de los liposomas, ya que permiten la visualización de liposomas individuales y pueden resolver partículas de tamaño variable. El resultado es información exacta sobre el perfil de la población de liposomas en toda la gama de tamaños (Frederik & Hubert, 2005).

La carga adquirida por una partícula o molécula en un medio dado es su potencial ζ y surge de la carga superficial y la concentración y tipos de iones en la solución. Dado que las partículas de carga similar se repelerán entre sí, las que tengan cargas elevadas resistirán la floculación y la agregación durante periodos más largos, haciendo que dichas partículas sean más estables. El potencial ζ es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Si todas las partículas en suspensión tienen una gran diferencia de potencial ζ, modulo >30 mV, las cargas superficiales generan repulsión y no habrá tendencia a la agregación. Sin embargo, si las partículas tienen valores bajos de potencial ζ, entre -30 y +30 mV, entonces no habrá fuerzas necesarias para evitar la agregación de las partículas. Por lo tanto esta técnica es relevante para evaluar y predecir la estabilidad de una formulación nanovesicular, por ejemplo, durante su almacenamiento (Hunter, Midmore, & Zhang, 2001).

1.15. Referencias

Alavi, Seyed Ebrahim, Mansouri, Hamidreza, Esfahani, Maedeh Koohi Moftakhari, Movahedi, Fatemeh, Akbarzadeh, Azim, & Chiani, Mohsen. (2014). Archaeosome: as new drug carrier for delivery of paclitaxel to breast cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry, 29*(2), 150-153.

Allen, Theresa M. (1998). Liposomal drug formulations. *Drugs, 56*(5), 747-756.

Allen, Theresa M. (2006). Pharmacokinetics and biopharmaceutics of lipidbased drug formulations. *Liposome Technology, 3*, 49-55.

Allen, Theresa M, & Cullis, Pieter R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews, 65*(1), 36-48.

Allen, TM. (1989). Stealth liposomes: avoiding reticuloendothelial uptake. *Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer, 89*, 405-415.

Andrade, Fernanda, Rafael, Diana, Videira, Mafalda, Ferreira, Domingos, Sosnik, Alejandro, & Sarmento, Bruno. (2013). Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases. *Advanced drug delivery reviews, 65*(13-14), 1816-1827.

Attar, Azade, Bakir, Ceren, Yuce-Dursun, Basak, Demir, Serap, Cakmakci, Emrah, Danis, Ozkan, . . . Ogan, Ayse. (2017). Preparation, characterization and in vitro evaluation of isoniazid and rifampicin-loaded archaeosomes. *Chemical biology & drug design*.

Barkauskas, Christina E, Cronce, Michael J, Rackley, Craig R, Bowie, Emily J, Keene, Douglas R, Stripp, Barry R, . . . Hogan, Brigid LM. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of clinical investigation, 123*(7), 3025-3036.

Benvegnu, Thierry, Lemiègre, Loïc, & Cammas-Marion, Sandrine. (2009). New generation of liposomes called archaeosomes based on natural or synthetic archaeal lipids as innovative formulations for drug delivery. *Recent patents on drug delivery & formulation, 3*(3), 206-220.

Berger, N, Sachse, A, Bender, J, Schubert, R, & Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics, 223*(1-2), 55-68.

Bertrand, Nicolas, Wu, Jun, Xu, Xiaoyang, Kamaly, Nazila, & Farokhzad, Omid C. (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews, 66*, 2-25.

Blanco, Elvin, Shen, Haifa, & Ferrari, Mauro. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology, 33*(9), 941.

Bobo, Daniel, Robinson, Kye J, Islam, Jiaul, Thurecht, Kristofer J, & Corrie, Simon R. (2016). Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical research, 33*(10), 2373-2387.

Bozzuto, Giuseppina, & Molinari, Agnese. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine, 10*, 975.

Brown, Desmond A, Venegas, Berenice, Cooke, Peter H, English, Verrica, & Chong, Parkson Lee-Gau. (2009). Bipolar tetraether archaeosomes exhibit unusual stability against autoclaving as studied by dynamic light scattering and electron microscopy. *Chemistry and physics of lipids, 159*(2), 95-103.

Caimi, Ayelen Tatiana, Parra, Federico, de Farias, Marcelo Alexandre, Portugal, Rodrigo Villares, Perez, Ana Paula, Romero, Eder Lilia, & Morilla, Maria Jose. (2017). Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 152*, 114-123.

Carvalho, Thiago C, Peters, Jay I, & Williams III, Robert O. (2011). Influence of particle size on regional lung deposition–what evidence is there? *International journal of pharmaceutics, 406*(1-2), 1-10.

Cavicchioli, Ricardo, Curmi, Paul MG, Saunders, Neil, & Thomas, Torsten. (2003). Pathogenic archaea: do they exist? *Bioessays, 25*(11), 1119-1128.

Cipolla, David, Gonda, Igor, & Chan, Hak-Kim. (2013). Liposomal formulations for inhalation. *Therapeutic delivery, 4*(8), 1047-1072.

Comisión Europea, CE. (2011). *Recommendation on the definition of a nanomaterial*. (2011/696/EU). Retrieved from https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf.

Corcelli, Angela, & Lobasso, Simona. (2006). 25 characterization of lipids of halophilic archaea *Methods in microbiology* (Vol. 35, pp. 585-613): Elsevier.

Chen, Zhao, Fillmore, Christine M, Hammerman, Peter S, Kim, Carla F, & Wong, Kwok-Kin. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer, 14*(8), 535.

Choquet, Christian G, Patel, Girishichadra B, Beveridge, Terry J, & Sprott, GD. (1992). Formation of unilamellar liposomes from total polar lipid extracts of methanogens. *Applied and environmental microbiology, 58*(9), 2894-2900.

Davis, Mark E, & Shin, Dong M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery, 7*(9), 771.

Deshpande, Pranali P, Biswas, Swati, & Torchilin, Vladimir P. (2013). Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine, 8*(9), 1509-1528.

Dhand, Rajiv. (2002). Nebulizers that use a vibrating mesh or plate with multiple apertures to generate aerosol. *Respiratory care, 47*(12), 1406-1416; discussion 1416-1408.

Eckburg, Paul B, Lepp, Paul W, & Relman, David A. (2003). Archaea and their potential role in human disease. *Infection and immunity, 71*(2), 591-596.

Eme, Laura, Spang, Anja, Lombard, Jonathan, Stairs, Courtney W, & Ettema, Thijs JG. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology, 15*(12), 711.

Etheridge, Michael L, Campbell, Stephen A, Erdman, Arthur G, Haynes, Christy L, Wolf, Susan M, & McCullough, Jeffrey. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine, 9*(1), 1-14.

Frederik, Peter M, & Hubert, DHW. (2005). Cryoelectron microscopy of liposomes *Methods in enzymology* (Vol. 391, pp. 431-448): Elsevier.

Gabizon, Alberto A. (2001). Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer investigation, 19*(4), 424-436.

Gabizon, Alberto, Shmeeda, Hilary, Horowitz, Aviva T, & Zalipsky, Samuel. (2004). Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid–PEG conjugates. *Advanced drug delivery reviews, 56*(8), 1177-1192.

Garbuzenko, Olga B, Mainelis, Gediminas, Taratula, Oleh, & Minko, Tamara. (2014). Inhalation treatment of lung cancer: the influence of composition, size and shape of nanocarriers on their lung accumulation and retention. *Cancer biology & medicine, 11*(1), 44.

Gentile, Massimo, Adrian, Thomas, Scheidler, Angelika, Ewald, Monika, Dianzani, Ferdinando, Pauli, Georg, & Gelderblom, Hans R. (1994). Determination of the size of HIV using adenovirus type 2 as an internal length marker. *Journal of virological methods, 48*(1), 43-52.

Gill, Erin E, & Brinkman, Fiona SL. (2011). The proportional lack of archaeal pathogens: Do viruses/phages hold the key? *Bioessays, 33*(4), 248-254.

González-Paredes, Ana, Clarés-Naveros, Beatriz, Ruiz-Martínez, Mª Adolfina, Durbán-Fornieles, Juan José, Ramos-Cormenzana, Alberto, & Monteoliva-Sánchez, Mercedes. (2011). Delivery systems for natural antioxidant compounds: Archaeosomes and archaeosomal hydrogels characterization and release study. *International journal of pharmaceutics, 421*(2), 321-331.

González-Paredes, Ana, Manconi, Maria, Caddeo, Carla, Ramos-Cormenzana, Alberto, Monteoliva-Sánchez, Mercedes, & Fadda, Anna Maria. (2010). Archaeosomes as carriers for topical delivery of betamethasone dipropionate: in vitro skin permeation study. *Journal of liposome research, 20*(4), 269-276.

Gonzalez, Raul O, Higa, Leticia H, Cutrullis, Romina A, Bilen, Marcos, Morelli, Irma, Roncaglia, Diana I, . . . Romero, Eder L. (2009). Archaeosomes made of Halorubrum tebenquichense total polar lipids: a new source of adjuvancy. *BMC biotechnology, 9*(1), 71.

Gordon, Siamon. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews immunology, 3*(1), 23.

Hallett, FR, Watton, J, & Krygsman, P. (1991). Vesicle sizing: number distributions by dynamic light scattering. *Biophysical journal, 59*(2), 357-362.

Haque, Shadabul, Whittaker, Michael R, McIntosh, Michelle P, Pouton, Colin W, & Kaminskas, Lisa M. (2016). Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines: Opportunities and challenges. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12*(6), 1703-1724.

HEALTHCARE OMRON, Co. (2018). Talking about nebulization method.

Higa, Leticia H, Arnal, Laura, Vermeulen, Mónica, Perez, Ana Paula, Schilrreff, Priscila, Mundiña-Weilenmann, Cecilia, . . . Romero, Eder Lilia. (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with Leishmania braziliensis antigens. *PloS one, 11*(3), e0150185.

Higa, Leticia H, Schilrreff, Priscila, Perez, Ana Paula, Iriarte, Maiara A, Roncaglia, Diana I, Morilla, Maria Jose, & Romero, Eder L. (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8*(8), 1319-1328.

Horváth, György, & Sorscher, Eric J. (2008). Luminal fluid tonicity regulates airway ciliary beating by altering membrane stretch and intracellular calcium. *Cytoskeleton, 65*(6), 469-475.

Howard, Kenneth A. (2016). Nanomedicine: Working Towards Defining the Field *Nanomedicine* (pp. 1-12): Springer.

Hunter, Robert John, Midmore, Brian Robert, & Zhang, Hongchung. (2001). Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. *Journal of colloid and interface science, 237*(1), 147-149.

Hussell, Tracy, & Bell, Thomas J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews immunology, 14*(2), 81.

Jain, Kewal K, & Jain, Kewal K. (2017). *The handbook of nanomedicine*: Springer.

Jhaveri, Aditi, & Torchilin, Vladimir. (2016). Intracellular delivery of nanocarriers and targeting to subcellular organelles. *Expert opinion on drug delivery, 13*(1), 49-70.

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

Junghanns, Jens-Uwe AH, & Müller, Rainer H. (2008). Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International journal of nanomedicine, 3*(3), 295.

Kate, Morris. (1993). Membrane lipids of archaea *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 26, pp. 261-295): Elsevier.

Kaur, Gurmeet, Garg, Tarun, Rath, Goutam, & Goyal, Amit K. (2016). Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Drug delivery, 23*(7), 2497-2512.

Kothamasu, Pavankumar, Kanumur, Hemanth, Ravur, Niranjan, Maddu, Chiranjeevi, Parasuramrajam, Radhika, & Thangavel, Sivakumar. (2012). Nanocapsules: the weapons for novel drug delivery systems. *BioImpacts: BI, 2*(2), 71.

Kraft, John C, Freeling, Jennifer P, Wang, Ziyao, & Ho, Rodney JY. (2014). Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences, 103*(1), 29-52.

Krishnan, Lakshmi, Gurnani, Komal, Dicaire, Chantal J, Van Faassen, Henk, Zafer, Ahmed, Kirschning, Carsten J, . . . Sprott, G Dennis. (2007). Rapid clonal expansion and prolonged maintenance of memory CD8+ T cells of the effector (CD44highCD62Llow) and central (CD44highCD62Lhigh) phenotype by an archaeosome adjuvant independent of TLR2. *The Journal of Immunology, 178*(4), 2396-2406.

Krishnan, Lakshmi, Sad, Subash, Patel, Girishchandra B, & Sprott, G Dennis. (2003). Archaeosomes induce enhanced cytotoxic T lymphocyte responses to entrapped soluble protein in the absence of interleukin 12 and protect against tumor challenge. *Cancer Research, 63*(10), 2526-2534.

Krishnan, Lakshmi, & Sprott, G Dennis. (2008). Archaeosome adjuvants: immunological capabilities and mechanism (s) of action. *Vaccine, 26*(17), 2043-2055.

Kunjachan, Sijumon, Pola, Robert, Gremse, Felix, Theek, Benjamin, Ehling, Josef, Moeckel, Diana, . . . Hennink, Wim E. (2014). Passive versus active tumor targeting using RGD-and NGR-modified polymeric nanomedicines. *Nano letters, 14*(2), 972-981.

Lammers, Twan, Kiessling, Fabian, Hennink, Wim E, & Storm, Gert. (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of controlled release, 161*(2), 175-187.

Larsen, Esben KU, Nielsen, Thomas, Wittenborn, Thomas, Birkedal, Henrik, Vorup-Jensen, Thomas, Jakobsen, Mogens H, . . . Howard, Kenneth A. (2009). Size-dependent accumulation of PEGylated silane-coated magnetic iron oxide nanoparticles in murine tumors. *ACS nano, 3*(7), 1947-1951.

Lehofer, Bernhard, Bloder, Florian, Jain, Pritesh P, Marsh, Leigh M, Leitinger, Gerd, Olschewski, Horst, . . . Prassl, Ruth. (2014). Impact of atomization technique on the stability and transport efficiency of nebulized liposomes harboring different surface characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 88*(3), 1076-1085.

Li, Zhengrong, Chen, Jian, Sun, Wenqiang, & Xu, Yuhong. (2010). Investigation of archaeosomes as carriers for oral delivery of peptides. *Biochemical and biophysical research communications, 394*(2), 412-417.

Liu, Xin, & Huang, Guihua. (2013). Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. *asian journal of pharmaceutical sciences, 8*(6), 319-328.

Lizama, Catherine, Monteoliva-Sánchez, Mercedes, Suárez-García, Antonio, Roselló-Mora, Ramón, Aguilera, Margarita, Campos, Victoriano, & Ramos-Cormenzana, Alberto. (2002). Halorubrum tebenquichense sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 52*(1), 149-155.

Mansour, Heidi M, Rhee, Yun-Seok, & Wu, Xiao. (2009). Nanomedicine in pulmonary delivery. *International journal of nanomedicine, 4*, 299.

Mathie, SA, Dixon, KL, Walker, SA, Tyrrell, V, Mondhe, M, O'Donnell, Valerie Bridget, . . . Lloyd, CM. (2015). Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge. *Allergy, 70*(1), 80-89.

Monteiro, João M, Fernandes, Pedro B, Vaz, Filipa, Pereira, Ana R, Tavares, Andreia C, Ferreira, Maria T, . . . VanNieuwenhze, Michael S. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nature communications, 6*, 8055.

Moreno-Sastre, M, Pastor, M, Salomon, CJ, Esquisabel, A, & Pedraz, JL. (2015). Pulmonary drug delivery: a review on nanocarriers for antibacterial chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 70*(11), 2945-2955.

Morilla, MJ, & Romero, EL. (2012). Liposomal pH-sensitive nanomedicines in preclinical development (pp. 383-413): CRC Press, Boca Raton, FL.

Nahar, Kamrun, Gupta, Nilesh, Gauvin, Robert, Absar, Shahriar, Patel, Brijeshkumar, Gupta, Vivek, . . . Ahsan, Fakhrul. (2013). In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals. *European journal of pharmaceutical sciences, 49*(5), 805-818.

Najlah, Mohammad, Parveen, Ishrat, Alhnan, Mohamed Albed, Ahmed, Waqar, Faheem, Ahmed, Phoenix, David A, . . . Elhissi, Abdelbary. (2014). The effects of suspension particle size on the performance of air-jet, ultrasonic and vibrating-mesh nebulisers. *International journal of pharmaceutics, 461*(1-2), 234-241.

Nanomedicine, The British Society for. (2018). what is nanomedicine. from http://www.britishsocietynanomedicine.org/what-is-nanomedicine/

Nogueira, Eugénia, Gomes, Andreia C, Preto, Ana, & Cavaco-Paulo, Artur. (2015). Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 136*, 514-526.

O'Donnell, A, Swarnakar, L, Yashina, L, Nikolova, P, Marinov, R, Waghray, P, . . . Dimakou, K. (2009). *A placebo controlled study of liposomal amikacin for inhalation (ARIKACE™) nebulized once-daily in the treatment of bronchiectasis patients with chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection.* Paper presented at the ERS Annual Conference Abstract.

Oren, Aharon. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews, 13*(4), 415-439.

Ostrowsky, N. (1993). Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids, 64*(1-3), 45-56.

Papahadjopoulos, Demetrios, & Kimelberg, Harold K. (1974). Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins. *Progress in surface science, 4*, 141-232.

Patel, Girishchandra B, Agnew, Brian J, Deschatelets, Lise, Fleming, L Perry, & Sprott, G Dennis. (2000). In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *International journal of pharmaceutics, 194*(1), 39-49.

Patel, Girishchandra B, Omri, Abdelwahab, Deschatelets, Lise, & Dennis Sprott, G. (2002). Safety of archaeosome adjuvants evaluated in a mouse model. *Journal of liposome research, 12*(4), 353-372.

Perez-Gil, Jesús, & Weaver, Timothy E. (2010). Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology, 25*(3), 132-141.

Richards, Daniel A, Maruani, Antoine, & Chudasama, Vijay. (2017). Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical science, 8*(1), 63-77.

Rosi, Nathaniel L, & Mirkin, Chad A. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical reviews, 105*(4), 1547-1562.

Ruozi, Barbara, Belletti, Daniela, Tombesi, Andrea, Tosi, Giovanni, Bondioli, Lucia, Forni, Flavio, & Vandelli, Maria Angela. (2011). AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International journal of nanomedicine, 6*, 557.

Sanchis, Joaquin, Corrigan, Chris, Levy, Mark L, & Viejo, Jose L. (2013). Inhaler devices–from theory to practice. *Respiratory medicine, 107*(4), 495-502.

Sercombe, Lisa, Veerati, Tejaswi, Moheimani, Fatemeh, Wu, Sherry Y, Sood, Anil K, & Hua, Susan. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology, 6*, 286.

Shete, Harshad K, Prabhu, Rashmi H, & Patravale, Vandana B. (2014). Endosomal escape: a bottleneck in intracellular delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology, 14*(1), 460-474.

Simões, Sérgio, Moreira, João Nuno, Fonseca, Cristina, Düzgüneş, Nejat, & de Lima, Maria C Pedroso. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced drug delivery reviews, 56*(7), 947-965.

Sprott, G Dennis, Sad, Subash, Fleming, L Perry, DiCaire, Chantal J, Patel, Girishchandra B, & Krishnan, Lakshmi. (2003). Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. *Archaea, 1*(3), 151-164.

Sprott, GD, Dicaire, CJ, Fleming, LP, & Patel, GB. (1996). Stability of Liposomes Prepared from Archaeobacterical Lipids and Phosphatidylcholine Mixtures. *Cells and Materials, 6*(1), 16.

Torchilin, Vladimir. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews, 63*(3), 131-135.

Torchilin, Vladimir P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery, 4*(2), 145.

Torchilin, Vladimir P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature reviews Drug discovery, 13*(11), 813.

Torchilin, Vladimir, & Weissig, Volkmar. (2003). *Liposomes: a practical approach*: Oxford University Press.

Tsuda, Akira, & Gehr, Peter. (2014). *Nanoparticles in the lung: environmental exposure and drug delivery*: CRC Press.

Valentine, David L. (2007). Opinion: Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology, 5*(4), 316.

van der Meel, Roy, Vehmeijer, Laurens JC, Kok, Robbert Jan, Storm, Gert, & van Gaal, Ethlinn VB. (2016). Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status *Intracellular Delivery III* (pp. 163-200): Springer.

van Rijt, Sabine H, Bein, Thomas, & Meiners, Silke. (2014). Medical nanoparticles for next generation drug delivery to the lungs: Eur Respiratory Soc.

Vyas, Suresh P, Quraishi, Shama, Gupta, Swati, & Jaganathan, KS. (2005). Aerosolized liposome-based delivery of amphotericin B to alveolar macrophages. *International journal of pharmaceutics, 296*(1-2), 12-25.

Wagner, Volker, Dullaart, Anwyn, Bock, Anne-Katrin, & Zweck, Axel. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature biotechnology, 24*(10), 1211.

Watermann, Anna, & Brieger, Juergen. (2017). Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer. *Nanomaterials, 7*(7), 189.

Whitsett, Jeffrey A, & Alenghat, Theresa. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature immunology, 16*(1), 27.

Wijagkanalan, Wassana, Kawakami, Shigeru, Takenaga, Mitsuko, Igarashi, Rie, Yamashita, Fumiyoshi, & Hashida, Mitsuru. (2008). Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannosylated liposomes in rats. *Journal of Controlled Release, 125*(2), 121-130.

Wine, Jeffrey J, & Joo, Nam Soo. (2004). Submucosal glands and airway defense. *Proceedings of the American Thoracic Society, 1*(1), 47-53.

Woodbury, Dixon J, Richardson, Eric S, Grigg, Aaron W, Welling, Rodney D, & Knudson, Brian H. (2006). Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *Journal of liposome research, 16*(1), 57-80.

CAPITULO 2

2. Arqueosomas: unión a receptores, citotoxicidad y mecanismos de muerte celular

A partir de este Capítulo se realizaron las siguientes comunicaciones científicas:

"Dexametasona Nanoliposomal" **Altube MJ**, Roncaglia DI, Morilla MJ, Romero EL. IV Simposio Latinoamericano de Nanomedicinas, realizado en Asociación Médica Argentina, CABA. 26 de noviembre de 2014. Presentación oral.

"Dexametasona Nanoliposomal" **Altube MJ**, Roncaglia DI, Morilla MJ, Romero EL. Nanocordoba 2014, realizado en la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. 23 de octubre de 2014. Póster.

2.1 Objetivo

Los objetivos de este Capítulo fueron evaluar la capacidad de glicoarquelípidos de incrementar la captura celular de nanovesículas, determinar mediante qué receptores son endocitados los arqueosomas y evaluar la citotoxicidad y mecanismos de muerte celular que podrían inducir sobre macrófagos.

2.2 Introducción

Para llevar a cabo el *targeting* y *delivery* intracelular de un cargo transportado por un agente terapéutico nanoparticulado, es necesario su ingreso eficiente a través de la barrera de la membrana plasmática celular. Por lo tanto, es esencial conocer el o los mecanismos mediante los que dicho material nanoparticulado ingresa a la célula.

La membrana celular es impermeable a macromoléculas de más de 1 kDa. Sin embargo, las células poseen una variedad de mecanismos de internalización activa que permiten ingresar material micro y nanoparticulado a su interior. En términos generales la membrana celular se invagina para envolver material particulado y fluido extracelular en una vesícula intracelular llamada endosoma, que posteriormente realizará el tránsito del material internalizado en un proceso conocido como endocitosis (Bareford & Swaan, 2007). Las células contienen poblaciones heterogéneas de endosomas originados en diferentes sitios de la membrana celular equipada con distintas maquinarias endocíticas. Los endosomas pueden ser procesados de distintas formas: i) entregando su carga a otros compartimentos intracelulares específicos o ii) fusionándose con lisosomas para reciclar y liberar la carga al medio extracelular o iii) liberando su carga intacta a través de las células en un proceso conocido como transcitosis (Sahay, Alakhova, & Kabanov, 2010).

Los principales mecanismos endocíticos son la fagocitosis y la pinocitosis. La fagocitosis es utilizada principalmente por células dendríticas, neutrófilos y macrófagos. La pinocitosis es llevada a cabo por todos los tipos celulares y se puede subdividir en endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina / caveolina y macropinocitosis (Yameen et al., 2014).

Si bien las moléculas y NP pequeñas (<1 nm) pueden ingresar a la célula simplemente difundiendo a través de la bicapa lipídica, en tanto las micropartículas son capturadas por fagocitosis o macropinocitosis, en general el mecanismo endocítico involucrado en la captura de material particulado depende

del tamaño, geometría y superficie del material, y definirá su posterior tráfico y localización final intracelular (Zhang, Gao, & Bao, 2015).

2.2.1 Mecanismos de endocitosis de material particulado

La **fagocitosis** es un mecanismo endocítico que permite capturar partículas con tamaños >500 nm, y que necesita del reconocimiento y unión de ligandos por receptores de membrana. Las células fagocíticas profesionales son macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Mediante este mecanismo los fagocitos profesionales capturan partículas extrañas, células apoptóticas y microorganismos infecciosos (bacterias y virus) como parte de la respuesta inmune innata y adaptativa y para mantener la homeostasis (Flannagan, Jaumouillé, & Grinstein, 2012). Las partículas a ser fagocitadas son reconocidas primero por receptores de membrana. Dichos receptores reconocen opsoninas como anticuerpos IgG e IgM, proteínas de complemento (C3, C4 y C5) u otras proteínas plasmáticas que recubren la superficie de las partículas formando una "corona proteica" (Corbo et al., 2016). La corona proteica es reconocida por los receptores superficiales de las células blanco y dicha interacción desencadena la formación seudópodos que atrapan la partícula que es englobada en vesículas llamadas fagosomas (Yameen et al., 2014). Finalmente, los fagosomas se fusionan con los lisosomas, donde la partícula contenida será destruida por acidificación y enzimólisis. Teniendo en cuenta esto último, si se quiere mantener la integridad de la partícula y su cargo, será necesario evitar el paso final de destrucción lisosomal asociada a este mecanismo de internalización (Kou, Sun, Zhai, & He, 2013). La fagocitosis de partículas depende de su geometría. Las partículas esféricas tienden a ser capturadas más fácilmente, mientras que para otras geometrías su internalización dependerá del ángulo que se forma entre la membrana en el punto de contacto inicial y la línea que define la curvatura de la partícula en este punto (Ω). La velocidad de internalización es positiva a Ω≤45°, significando que la partícula se internaliza. Sin embargo, cuando el ángulo excede el valor crítico (~45°), la velocidad de internalización es cero y los macrófagos únicamente se extienden sobre la partícula y pierden su capacidad de internalizarla (Champion, Katare, & Mitragotri, 2007), como se muestra en la Fig. 1.

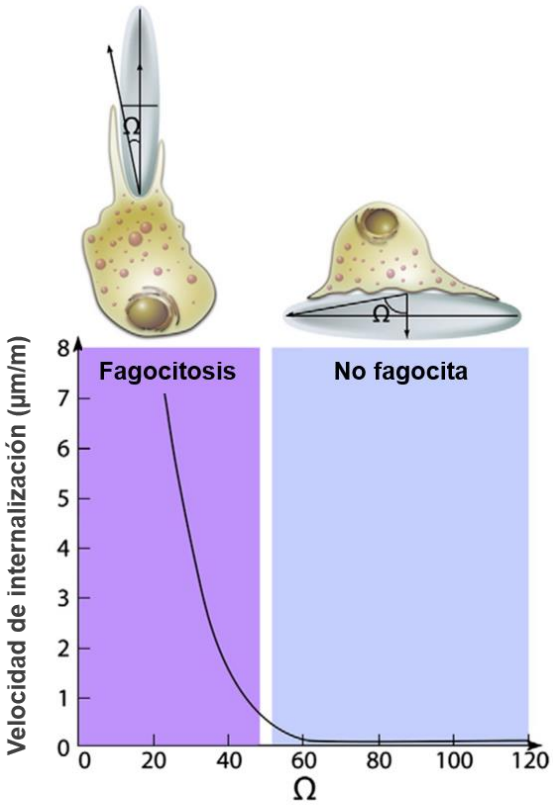


Figura 1- Efecto de la geometría de la partícula sobre la fagocitosis. Modificado a partir de (Sahay et al., 2010).

La **macropinocitosis** es un mecanismo endocítico mediado por actina donde las células internalizan una cantidad considerable de volumen de líquido extracelular a través de vesículas grandes (diámetro de 0,5-10 µm) conocidas como macropinosomas. A diferencia de la fagocitosis no necesitan de unión a receptores de membrana y generalmente las partículas de tamaño micrométrico se internalizan a través de esta vía (Yameen et al., 2014).

En la **endocitosis mediada por clatrina (EMC)**, la unión de un ligando con su correspondiente receptor de membrana desencadena la formación de un entramado poliédrico de clatrina en la superficie citosólica de la membrana celular, lo que ayuda a deformar la membrana en una invaginación de ~150 nm que luego se fusionará generando vesículas recubiertas de clatrina. La vesícula resultante tiene un diámetro de 100-120 nm; que al cabo de 5 a 10 minutos se fusionará con endosomas y finalmente con lisosomas entrando en una ruta

degradativa (Sahay et al., 2010; Yameen et al., 2014). **La endocitosis dependiente de caveolina** implica el ensamblaje de capas de caveolina en horquilla en el lado citosólico de la membrana plasmática, formando una estructura en forma de matraz de ~ 50-80 nm de diámetro (Zhang et al., 2015). En comparación con la EMC, este mecanismo es más lento y esta mediado por vesículas más pequeñas. Las NP capturadas por este mecanismo en cierta medida evitan un destino degradativo y acceden al retículo endoplasmatico o núcleo (Kou et al., 2013).

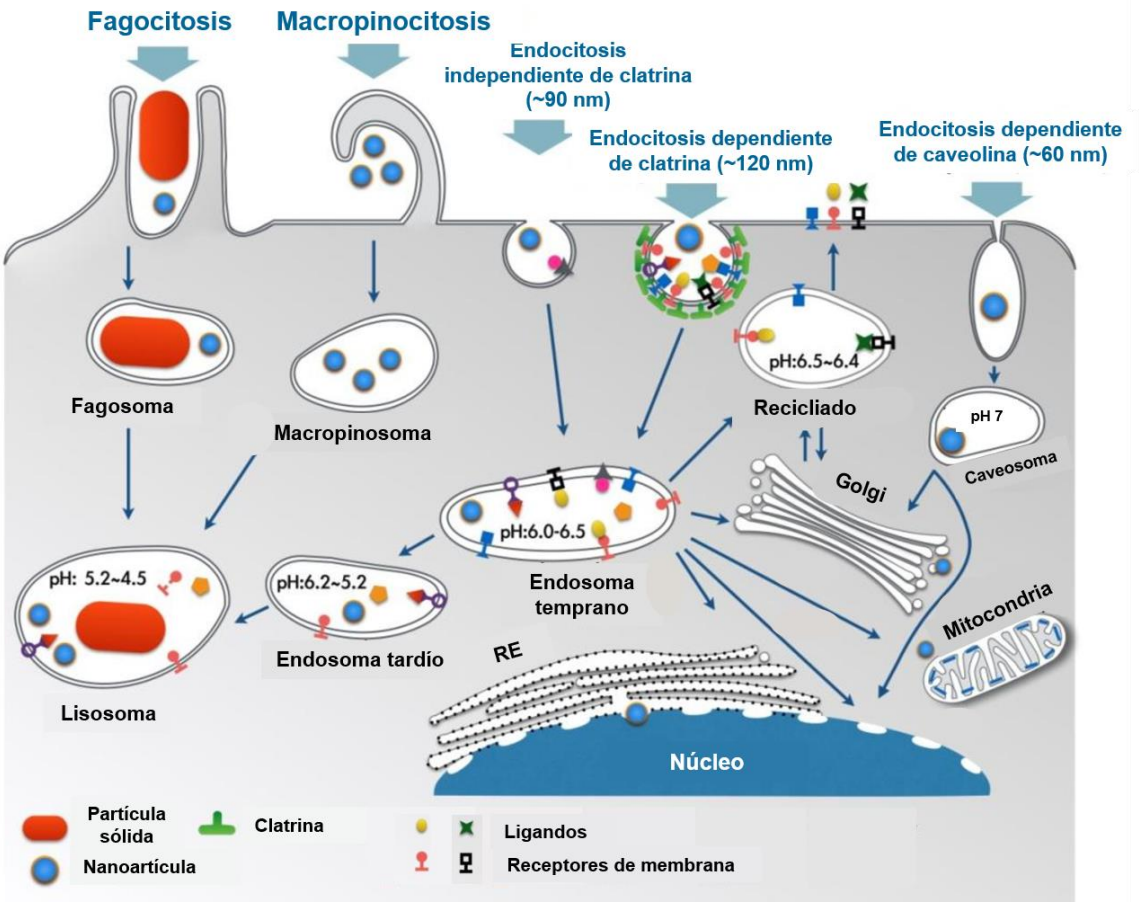


Figura 2- Esquema de rutas endocíticas de material particulado. Modificado a partir de (Yameen et al., 2014).

Fundamentalmente, la **captura de material particulado mediada por receptores** se produce a través de EMC (Yameen et al., 2014) una vía de internalización celular muy rápida. Dependiendo del ligando asociado a la

superficie del material particulado se puede controlar su tráfico intracelular así como el tipo celular blanco (Bareford & Swaan, 2007). Ejemplos de esto son los receptores de folato, RTf, receptor de factor de crecimiento epidérmico receptor, entre otros (Yameen et al., 2014).

En resumen, el destino intracelular del material particulado dependerá del tipo celular, receptores endociticos involucrados, de características físicas de la NP como tamaño, la forma, carga superficial y del tipo de corona proteica. Dependiendo de la ruta de internalización el agente terapéutico que transporte el material particulado podrá ser degradado sin llegar a ejercer su efecto o puede internalizarse en mayor medida en un tipo celular sobre otro. Por esta razón para diseñar una terapia exitosa mediada por material particulado es de suma importancia conocer tanto sus características fisicoquímicas como su mecanismo de captura.

2.2.2 Captura celular de ARQ

En el trabajo de tesis de la Dra. Defain Tesoreiro (Tesoreiro, 2014) se estudiaron las vías endocíticas de captura y el tráfico intracelular de ARQ en la línea celular de macrófagos J774.A1 y en células epiteliales de intestino Caco-2, utilizando inhibidores y marcadores específicos de las diferentes rutas endocíticas. Además se cuantificó la internalización de ARQ y liposomas de fosfatidilcolina de soja marcados fluorescentemente utilizando citometría de flujo. Los resultados mostraron que los ARQ fueron ávidamente capturados por ambas líneas celulares en comparación con liposomas. En las células J774.A1 los ARQ fueron internalizados mediante fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina y caveolina. Las células Caco-2 capturaron ARQ mediante macropinocitosis y endocitosis mediada por caveolina. En particular, se consideró que la preferencia de internalización de los ARQ se debía a la presencia en su composición de glicolípidos sulfatados que interactuarían con receptores específicos de azúcares (como el receptor de manosa) presentes tanto macrófagos como en células epiteliales (Wagner, Lynch, Walter, Schwaeble, & Loos, 2003). Por otra parte el elevado potencial ζ negativo de los ARQ también podía ser un indicio de que sean reconocidos y endocitados por receptores de tipo *scavenger*.

2.2.3 Receptor de manosa y Receptores *Scavenger*

El receptor de manosa (RM), CD206, es un receptor de lectina endocítico altamente efectivo con una amplia especificidad de unión que abarca ligandos de origen microbiano y endógeno. El RM es un receptor de unión a carbohidratos expresado por poblaciones seleccionadas de macrófagos y células dendríticas y es único debido a la presencia de dos dominios independientes de unión a carbohidratos que reconocen azúcares sulfatados y manosilados (Martinez-Pomares, 2012).

Los receptores *scavenger* (RS) son un grupo de receptores estructuralmente muy heterogéneos que están subdivididos en 10 clases, según las características estructurales compartidas, llamadas clase A-J (Zani et al., 2015). La agrupación de RS en una superfamilia se debe principalmente a las propiedades funcionales que comparten. En general, los RS identifican y remueven entidades no deseadas a partir del reconocimiento de moléculas propias o exógenas. El rango de ligandos que pueden reconocer es extremadamente diverso e incluye moléculas endógenas sin modificar, moléculas endógenas modificadas llamadas patrones moleculares asociados al daño (DAMP), moléculas que se expresan en células apoptóticas, así como estructuras exógenas como partículas o macromoléculas microbianas como lipopolisacárido (LPS), conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La remoción de estos agentes la llevan a cabo mediante EMC, aunque en ciertos casos pueden estar implicados procesos de fagocitosis o macropinocitosis. (Canton, Neculai, & Grinstein, 2013). Para lograr la internalización los RS deben formar complejos multimoleculares con otras proteínas de membrana (Heit et al., 2013; Todt, Hu, & Curtis, 2008). El objetivo de la internalización puede tener como fin funciones metabólicas como el *delivery* de LDL oxidada (oxLDL) a los lisosomas, presentación de antígenos o activar una ruta de señalización (Canton et al., 2013). Los RS regulan diferentes estados fisiopatológicos, incluida la aterosclerosis, infecciones de patógenos, cáncer y participan en la respuesta inmune innata así como en procesos de homeostasis celular (Zani et al., 2015).

2.2.4 Estudios de citotoxicidad de NP

El aumento en el área superficial relativa que ocurre a medida que el tamaño de las partículas disminuye hasta la escala nanométrica, origina nuevas propiedades estructurales, pero también las hace biológicamente más reactivas. Por esta razón el empleo de material particulado con fines terapéuticos también puede generar efectos adversos no deseados (Dhawan & Sharma, 2010). Hasta la fecha, los estudios de toxicidad de NP se han centrado principalmente en exámenes *in vitro* debido a la facilidad de ejecución, control e interpretación de los experimentos en comparación con las pruebas *in vivo*. Además, las pruebas *in vivo* requieren mucho tiempo, son costosas e implican problemas éticos. Al considerar cuidadosamente las condiciones experimentales, los estudios de toxicidad *in vitro,* bien definidos, pueden simular el sistema *in vivo* y funcionar como un método simple para investigar el efecto tóxico de dichos materiales. Por estos motivos, los estudios *in vitro* son la primera opción que utilizan la mayoría de los investigadores que trabajan con nanomateriales (Dhawan & Sharma, 2010; Kong, Seog, Graham, & Lee, 2011).

El efecto tóxico de las NP depende en gran medida de los órganos y, más específicamente, de los tipos celulares contactados en su administración. Esto se debe a la variación en la fisiología celular de cada tipo de tejido (por ejemplo, epitelial, linfoide), el estado de proliferación (células tumorales o en reposo), las características de la membrana, capacidad fagocítica. Con el fin de relevar el efecto de las NP sobre las células de interés, el ensayo de citotoxicidad debe incluir células que representan la ruta de exposición y los órganos a los que va dirigida la terapia (Kong et al., 2011). La selección del ensayo de citotoxicidad apropiado es vital para la evaluación de la toxicidad de las NP. En este contexto, la citotoxicidad mide el grado de muerte celular causada por las NP. Sin embargo, en algunos casos, pueden ocurrir cambios celulares sub-letales, que alteran ciertas funciones de la célula pero no dan como resultado la muerte celular. Estos efectos tóxicos menos obvios se deben caracterizar cuidadosamente mediante pruebas que miden el daño de la membrana, o en el funcionamiento metabólico (Kong et al., 2011). A su vez es de gran utilidad determinar por qué mecanismos se desencadena la muerte celular ya que las

formas en que mueren las células tienen un impacto directo en el sistema inmune.

2.2.5 Tipos de muerte celular

Según las recomendaciones que realizó en el 2015 el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) (L Galluzzi et al., 2015) las instancias de muerte celular pueden clasificarse operativamente en dos categorías amplias, mutuamente excluyentes: "accidental" y "regulada". La muerte celular accidental (MCA) es causada por injurias severas, incluyendo físicas (temperaturas elevadas o altas presiones), químicos (detergentes potentes o variaciones extremas en el pH) y mecánicos. Esto se ve reflejado en un rápido desensamblado estructural de la célula que no involucra una maquinaria molecular específica. Por otra parte, la muerte celular regulada (MCR) implica una maquinaria molecular codificada genética y específicamente. Además, la MCR a menudo ocurre de manera relativamente tardía y se inicia en el contexto de respuestas adaptativas que (sin éxito) intentan restaurar la homeostasis celular. Dependiendo del estímulo iniciador, tales respuestas pueden involucrar diferentes procesos (L Galluzzi et al., 2015). La clasificación funcional de los modos de MCR es en función de características bioquímicas y comprende una amplia variedad de tipos de muerte celular entre los que se incluyen anoikis, muerte celular autofágica, apoptosis, necroptosis, netosis y piroptosis, entre otras (Lorenzo Galluzzi et al., 2012).

La **apoptosis** ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares en los tejidos. La apoptosis también se produce como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Elmore, 2007). En la apoptosis, los eventos bioquímicos conducen a cambios celulares característicos en su morfología. Estos cambios incluyen la formación de vacuolas, la contracción celular, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN cromosómico; y puede ser dependiente o independiente de caspasas. La apoptosis se ha caracterizado por diversos criterios bioquímicos, incluidos

cambios en la cinética de la exposición a fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberación de proteínas intermembranales mitocondriales, la activación dependiente de caspasas y la translocación nuclear de DNAsa activada por caspasa, lo que resulta en la escisión del ADN internucleosomal. La identificación de estos marcadores morfológicos y bioquímicos de la apoptosis permite distinguirla de otras formas de muerte celular (Berghe et al., 2013).

Por el contrario, la **necrosis** se caracteriza por una hinchazón citoplásmica rápida que culmina con la ruptura de la membrana plasmática y la descomposición de los orgánulos. Esta es una consecuencia del estrés fisicoquímico extremo, como calor, el choque osmótico, el estrés mecánico, congelación-descongelación y alta concentración de peróxido de hidrógeno. En estas condiciones, la muerte celular ocurre rápidamente debido al efecto directo del estrés en la célula, por lo que este proceso de muerte celular se incluye dentro de la clasificación de MCA. Sin embargo, muchos estímulos celulares diferentes pueden inducir un proceso necrótico que sigue pasos definidos y eventos de señalización, por lo que ciertos tipos de necrosis se clasifican dentro de MCR (Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhouet, Walczak, & Vandenabeele, 2014). La **necroptosis** designa un tipo particular de necrosis regulada cuyas principales características bioquímicas son la señalización del receptor de muerte, la inhibición de caspasas y la activación de las enzimas RIPK1 y / o RIPK3. La piroptosis también es una forma de muerte celular regulada, es dependiente de caspasas y está asociada con respuestas antimicrobianas durante la inflamación y sus principales características bioquímicas son la activación de caspasa-1 y caspasa-7 y la secreción de IL-1β e IL-18 (Berghe et al., 2014; Sanz et al., 2014).

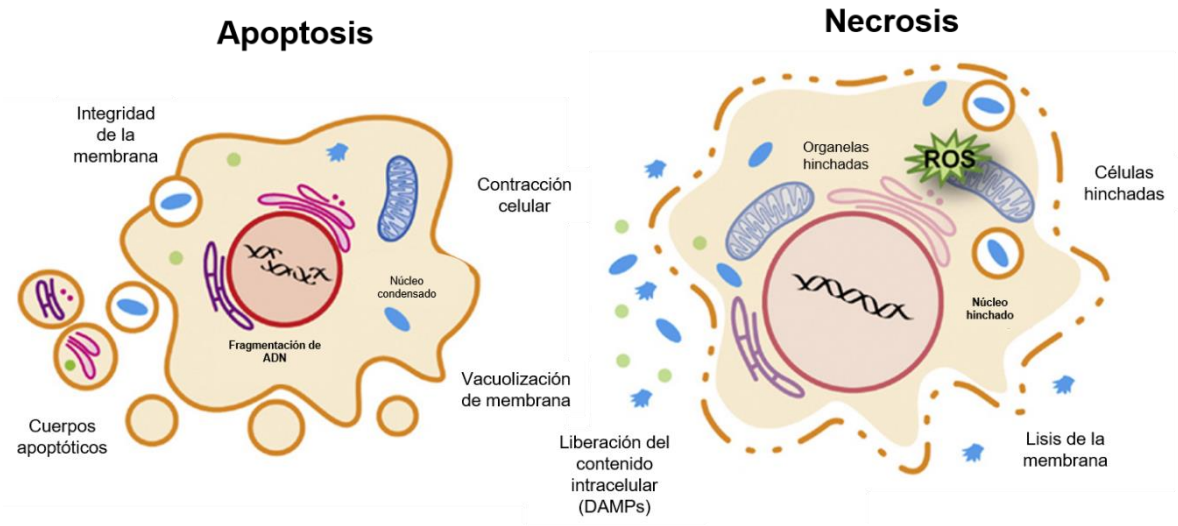


Figura 2. Esquema con características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis. Modificado a partir de (Guo, Liu, & Bartlett, 2014).

2.2.6 Toxicidad según el tipo de muerte celular

Varias moléculas endógenas se convierten en pro-inflamatorias si se liberan de las células cuando esta se lisa. Estas moléculas, DAMP, activan macrófagos y células dendríticas a través de la señalización de receptores de tipo Toll (TLR) y otros mecanismos. La liberación y el reconocimiento de DAMP pueden ayudar a alertar al sistema inmune de la existencia de un patógeno intracelular, pero si se desencadena de manera inapropiada tiene efectos nocivos como la autoinmunidad. En este sentido, tanto la duración como el tipo de muerte celular son los principales medios para regular la liberación de DAMP (Tait, Ichim, & Green, 2014). La apoptosis se considera (aunque no siempre) un tipo de muerte que no genera inflamación ya que cuando la célula esta moribunda se “autoempaqueta” en vesículas llamadas cuerpos apoptóticos, minimizando la liberación de DAMP (Davidovich, Kearney, & Martin, 2014). En una célula apoptótica, los procesos dependientes de caspasa también generan señales para atraer células fagocíticas y facilitar su reconocimiento y aclaramiento. En consecuencia, las células apoptóticas se eliminan eficazmente *in vivo*. En ausencia de fagocitosis, las células apoptóticas experimentan necrosis secundaria y lisis; aunque no está claro si ante esta situación podrían o no estimular una respuesta inflamatoria (Davidovich et al., 2014). Por el contrario, la MCA es altamente pro-inflamatoria al generar una lisis celular que libera al

medio extracelular DAMPs como la familia de citoquinas IL-1. Incluso las formas de necrosis regulada como piroptosis o necroptosis tienen como consecuencia una respuesta pro-inflamatoria (Tait et al., 2014) (Davidovich et al., 2014).

Teniendo en cuenta esto, es importante poder distinguir si la potencial citotoxicidad de las NP desencadena en una muerte celular por apoptosis o necrosis, luego de cuánto tiempo de exposición y si es dependiente de la concentración. Esto sin embargo no es sencillo de elucidar, por varios puntos: i) en ausencia de fagocitosis, las células apoptóticas desarrollan características morfológicas y bioquímicas de la necrosis secundaria (Berghe et al., 2013), ii) la apoptosis y la necrosis son dos procesos que pueden ocurrir de forma independiente, secuencial o simultánea. En algunos casos, es el tipo de estímulo y / o el grado de estímulo lo que determina si las células mueren por apoptosis o necrosis, por ejemplo un estímulo a dosis bajas puede inducir apoptosis, pero a dosis más altas puede producir necrosis (Elmore, 2007), iii) No hay ningún marcador bioquímico disponible para discriminar de forma inequívoca la necrosis de la apoptosis. Por lo tanto realizar una discriminación precisa solo es posible a través de un enfoque integrado basado en varios parámetros morfológicos y bioquímicos (Berghe et al., 2013).

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Materiales

Fosfatidilcolina de soja (SPC) (Fosfolipón 90 G, con una pureza mayor al 90%) fue un regalo de Lipoid, Ludwigshafen, Alemania. L-α-fosfatidilcolina 1,2-hidrogenada (HSPC), fue adquirida en Northern Lipids Inc, Vancouver, Canadá. Lissamine™ rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (RhPE), fue adquirida en Thermo Fisher Scientific, MA, USA. El marcador YO-PRO-1® es de Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA. L-α-fosfatidil-L-serina (PS), ácido poliinosínico (5') potásico [Poly(I)], ácido policitidílico (5') potásico [Poly(C)], mannan de *Saccharomyces cerevisiae*, colesterol, ioduro de propidio (IP), 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), antrona y D-manosa fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Silica Gel 60 fue adquirido en Merck, Argentina. El medio RPMI 1640, sulfato de penicilina-estreptomicina, glutamina y tripsina/ácido etilenediaminetetraacetico fueron adquiridos en Gibco®, Life Technologies (New York, USA). El suero fetal bovino (SFB), fue adquirido en Internegocios, Buenos Aires, Argentina. Los demás reactivos de grado analítico son de Anedra, Research AG (Buenos Aires, Argentina).

2.3.2 Crecimiento, extracción y caracterización de los lípidos polares totales de *Halorubrum tebenquichense*

El arquea *H. tebenquichense* fue aislada a partir de muestras de suelo de Salina Chica, Península de Valdés, Chubut, Argentina. Los cultivos se realizaron en medio basal suplementado con extracto de levadura y glucosa a 37 °C (Gonzalez et al., 2009). La biomasa se cultivó en 15 L de medio en un biorreactor de acero inoxidable de fabricación propia de 25 L de capacidad total y se recolectó luego de 96 h de crecimiento. Los lípidos polares totales de arqueas (LPT) se extrajeron a partir de un concentrado de biomasa utilizando el método de *Blight & Dyer* modificado para arqueas hiperhalófilas según (Kates & Kushwaha, 1995). Al finalizar el proceso se aislaron entre 400 y 700 mg de LPT

de cada lote de cultivo. La composición de cada lote se determinó de forma rutinaria por el contenido de fosfato mediante el método de Bôtcher (Böttcher & Pries, 1961), por espectrometría y *electrospray* de ionización de masas (ESI-MS), como se describe en (Higa et al., 2012).

2.3.3 Preparación de nanovesículas arqueolipídicas y convencionales

Se prepararon arqueosomas con la mezcla de LPT (ARQ), liposomas convencionales HSPC:colesterol 7,5:2,5 m:m (L) o SPC (Ls) y liposomas conteniendo fosfatidilserina (PS) SPC:PS 4:1 m:m (L-PS). Las formulaciones se prepararon por el método de resuspensión de la película lipídica. Brevemente, las mezclas de lípidos se disolvieron en cloroformo:metanol 1:1 % v/v y se eliminó el solvente por flujo de N_2. El film resultante se resuspendió por agitación magnética en buffer Tris 10 mM con NaCl 0,9 % m/v pH 7,4 hasta lograr una concentración de Lípidos Totales (LT) de 10 mg/mL. La suspensión obtenida se sonicó durante 1 hora con sonicador de baño a 80 W, 80 KHz y luego se extruyó 21 veces por dos membranas de policarbonato de tamaño de poro de 200 nm (Merck Millipore Ltd. Cork, IRL) utilizando un extrusor manual (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA). Finalmente la muestra se filtró por membrana de nylon estéril de 200 nm en flujo laminar.

2.3.4 Preparación de nanovesículas marcadas con RhPE

Para determinar captura intracelular se incorporó en la membrana liposomal el lípido fluorescente RhPE. Para esto se mezcló RhPE con LT en cloroformo: metanol 1:1 % v/v, para obtener una concentración de 50 µg/mL de RhPE, luego se formaron los films lipídicos y se prepararon las nanovesículas mediante la metodología descripta en la **Sección anterior 2.3.3.**

2.3.5 Caracterización fisicoquímica

2.3.5.i Cuantificación de fosfolípidos

Los fosfolípidos se cuantificaron por un microensayo colorimétrico de fosfatos (Bötcher et al., 1961). Brevemente, alícuotas de liposomas se trataron con ácido perclórico y se incubaron a 180°C durante 30 minutos. Esta etapa de digestión convierte el fosfato orgánico a ortofosfato. Luego, se adiciona molibdato de amonio en ácido sulfúrico y ácido ascórbico para convertir el ácido fosfo-molíbdico a ortofosfato, que se reduce a un complejo de color azul durante el calentamiento. Este compuesto luego se determinó colorimétricamente a 818 nm utilizando un espectrofotómetro. Para la cuantificación de LPT se utilizó la relación de 1,25 mmol de fosfato orgánico/1 mg de LPT; en el caso de L de 0,96 mmol de fosfato orgánico/1 mg de LT y en el caso de S la relación fue de 1,3 mmol de fosfato orgánico/1 mg de LT.

2.3.5.ii Cuantificación de RhPE

Se cuantificó RhPE midiendo emisión de fluorescencia a $\lambda_{emisión}$ 580 nm y $\lambda_{exitación}$ 561 nm en espectrofluorómetro LS55 Perkin Elmer luego de la disrupción completa de las nanovesículas en metanol. Se preparó una curva de calibración en un rango de concentración 0,075 – 0,5 µg/mL de RhPE en metanol, con pendiente de 997,6 ± 60,9, ordenada de -1,052 ± 15,683 y un coeficiente de correlación lineal R2=0,9939 ± 0,0025.

2.3.5.iii Tamaño promedio y Potencial ζ

El tamaño promedio y potencial ζ de nanovesículas se determinó por dispersión dinámica de la luz (DLS) y por análisis de fase de dispersión de luz, respectivamente, utilizando un equipo Zetasizer Malver Instruments. A tal fin las suspensiones nanovesiculares se diluyeron hasta una concentración de 200 µg/mL de LT en Tris 10 mM con NaCl 0,9 % p/v pH 7,4.

2.3.6 Crio-Microscopia Electrónica de Transmisión (Crio-TEM) de ARQ

Para realizar la tinción negativa las muestras se prepararon en carbón Ultrathin en una grilla de malla de cobre Lacey Carbon Tipo A 400 (TedPella, USA). Las grillas se sometieron al proceso de descarga luminiscente en un easiGlow (Pelco, EE.UU.), con los siguientes parámetros: corriente de 15 mA; carga negativa; 25 s tiempo. La tinción se realizó aplicando 3 µL de solución acuosa de acetato de uranilo al 2% durante 30 segundos seguido de transferencia y secado al aire. Luego, las muestras se prepararon en carbón Ultrathin en una grilla de malla de cobre Lacey Carbon Tipo A 400 (TedPella, USA). Las grillas se sometieron al proceso de descarga luminiscente en un easiGlow (Pelco, EE.UU.), con los siguientes parámetros: corriente de 15 mA; carga negativa; 25 s tiempo. La congelación en hielo amorfo se realizó en Vitrobot Mark IV (FEI, Países Bajos) con temperatura controlada (22ºC) y humedad (100%). Para preparar las crio-muestras se utilizaron los siguientes parámetros: tiempo de *blot* 3 segundos; fuerza de *blot* -5, espera de *blo*t 20 segundos. A continuación 3 µL de las muestras se dejaron caer en la grilla y se sumergieron en etano líquido. Después de sumergir la grilla se mantuvo en condiciones de nitrógeno líquido hasta que se realizó el análisis de microscopía, manteniéndose a -173ºC durante toda la sesión.

Las imágenes se adquirieron en un equipo Jeol JEM-1400Plus (JEOL, Japón), operando a 120 kV con filamento LaB6, utilizando una cámara CCD Gatan MultiScan 794 (1k x 1k píxeles). El rango total de ampliación fue de 5.000 a 40.000x, pero la adquisición mayoritaria se realizó entre 15.000 y 25.000x. La colección de imágenes y las mediciones se realizaron con DigitalMicrograph (Gatan-USA). Las imágenes no fueron procesadas después de la adquisición.

2.3.7 Separación de LPT

2.3.7.i Separación por cromatografía en columna de por gravedad

Para la separación de los lípidos polares se realizó una cromatografía en columna por gravedad de Silica gel 60 utilizando un gradiente de elución de cloroformo: metanol: ácido acético: agua 85:22,5:10:4; 85:22,5:20:8;

85:5,2:42:4,6 v:v. En una columna preparada con 15 g de Silica Gel 60 se sembraron 140 mg de LPT disueltos en cloroformo: metanol: ácido acético: agua 85:22,5:10:4 v:v y se fueron recolectando 10 fracciones de 3 mL para cada composición de solvente.

2.3.7.ii Cromatografía en Capa Delgada

Para determinar la composición cualitativa de las fracciones obtenidas se realizó una cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando placas de Silica Gel 60 F254 Aluminio (Merk, Bs.As., Argentina). Los muestras se sembraron en bandas a una concentración de aproximadamente 1 mg/mL. Luego se revelaron lípidos totales utilizando H_2SO_4 5% v/v en etanol absoluto seguido de calentamiento a 120°C.

2.3.7.iii Purificación de fracciones mediante CCD preparativa

Una vez identificadas las fracciones de interés, estas se juntaron y se concentraron utilizando un rotavapor Heildoph hasta obtener un volumen final de 3 mL y se realizó una CCD con el volumen total. Luego se levantó la silica en la zona de cada una de las bandas correspondientes a cada arqueolípido. Estas se disolvieron en cloroformo: metanol y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos en centrifuga Gelec 144D (Argentina) para separar la silica. Esto se repitió hasta lavar completamente la silica. El volumen total recolectado se rotavapeó hasta obtener un film lipídico completamente seco, que se pesó en balanza analítica para determinar la cantidad de cada uno de los arquelípidos.

2.3.7.iv Espectrometría de masa mediante Ionización por electrospray (ESI-MS)

Para la identificación de los lípidos y determinar el grado de pureza de la separación se determinó la relación masa/carga (m/z) de los componentes de los LPT en solvente orgánico 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/minuto. 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.

2.3.7.v Cuantificación de arqueolípidos glicosilados (GA)

Para la cuantificación de GA se utilizó el método de antrona que permite cuantificar azucares totales. Para esto se hizo reaccionar una muestra con 500 µL de ácido fosfórico al 80% v:v y se calentó durante 15 minutos a 90ºC en una placa calefactora de tubos. Luego se incorporaron 1250 µL de reactivo de antrona (0,2 % m/v en H_2SO_4 al 80%) y se calentaron los tubos con reflujo en placa calefactora a 100ºC durante 20 minutos. Se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofometro. Como los GA contienen manosa y glucosa en una relación 1:1 mol:mol para el armado de la curva de calibración se realizó una solución en agua destilada que contenía ambos azucares en partes iguales. La curva se realizó en un rango de 28 – 166 nmol de azúcar. Se obtuvo una curva con una pendiente de 2,061 ± 0,016, una ordenada al origen de 0,0246 ± 0,0014 y un coeficiente de correlación líneas R^2 de 0,988 ± 0,004.

2.3.8 Preparación de nanovesículas con diferentes proporciones de LPT marcadas con RhPE

A partir de los aislamientos obtenidos en la **Sección 2.3.7.iii** se prepararon formulaciones de nanovesículas con diferente composición de arqueolípidos: fracción de PGP-Me (A-PMe), mezclas de fracciones PGP-Me:GA 10:0,5 m:m (A-PMe-GA), 10:1,2 m:m (A-PMe-GA 2), SPC:GA 10:1,2 m:m (Ls-GA), arqueosomas preparados con la mezcla de LPT (ARQ). Las formulaciones se prepararon por el método de resuspensión de la película lipídica. Brevemente, las mezclas de lípidos se disolvieron en cloroformo: metanol 1:1 % v/v junto con RhPE y se eliminó por flujo de N_2. Las nanovesículas se prepararon como se describió en la **Sección 2.3.3.**

2.3.9 Cultivos Celulares

La línea celular de macrófagos murinos inmortalizados en ratones Balb/c J774A.1 (ATCC® TIB-67™) fue suministrada por la Dra. Erina Petrera, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires Argentina. La misma se cultivó en RPMI 1640, con rojo fenol suplementado con 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2 mM de glutamina (RPMI Completo) al 10% de SFB. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmosfera con 5% de CO_2 y 95% humedad. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana.

2.3.10 Ensayo de Captura Celular

En una placa de cultivo de 24 pocillos se sembraron $1{,}5 \times 10^5$ células J774A.1 por pocillo con RPMI completo suplementado al 10% SFB. Luego de 24 horas se incubaron las muestras durante 1, 3 y 5 horas. Las mismas se agregaron disueltas en RPMI al 5% SFB a una concentración de LT de 0,5 mg/mL. Luego de transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS, se levantaron con tripsina y resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS). Se analizaron un total de 1×10^5 células mediante citometría de flujo (BD FACSCaliburTM, BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Los datos se analizaron utilizando el software WinMDI 2.9 (Microsoft, Redmond, WA, EE.UU.). Para analizar los resultados se normalizaron los resultados de captura con la relación µg /mg RhoPE /LT:

$$\text{IF normalizada} = \text{IF}_{\text{formulación x}} / (\mu\text{g RhPE/ mg LT})_{\text{formulación x}} \qquad \textbf{Fórmula 1}$$

En donde $\text{IF}_{\text{formulación x}}$ es la intensidad de fluorescencia en FL3 para cada una de las nanovesículas y µg RhPE/ mg LT es la cantidad de RhPE cuantificada para la nanovesícula correspondiente. Al utilizar esta relación se puede analizar la captura celular independientemente de la cantidad de RhPE y LT final de cada formulación.

2.3.11 Ensayo de captura celular competitiva

Se realizó un ensayo de competición de captura celular para evaluar mediante qué receptor celular son capturados los ARQ, según (Wang, Wu, & Reinhard, 2012). Con este objetivo, la captura celular de ARQ-RhPE se midió en presencia de diferentes competidores. Las células J774A.1 se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 1,5 x 10^5 células por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se incubaron con a) 1 mg/mL de mannan; b) 100 µg/mL de ácido poliinosínico [poly(I)]; c) 100 µg/mL de ácido policitidílico [poly(C)] o d) fosfatidilserina incorporada en liposomas, L-PS, 1 mg/ml de LT, durante 30 minutos. A continuación, se retiraron los medios de cultivo y se reemplazaron por medio fresco que contenía ARQ-RhPE a 0,5 mg/mL. Las células incubadas sólo con ARQ-RhPE se utilizaron como control. Después de 1 hora de incubación, las células se tripsinaron, se lavaron con PBS y se analizaron un total de 1 x 10^5 células como se describe en la **Sección 2.3.10.**

2.3.12 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el método de MTT y LDH. Brevemente, el método de MTT consiste en determinar el nivel de respiración celular medido por la actividad de las enzimas deshidrogenasas. El método de LDH consiste en medir lisis celular mediante la cuantificación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio extracelular. A tal fin, las células J774A.1 se sembraron en placa de 96 pocillos, a una densidad de 4x10^4 células/pocillo y se dejaron crecer por 24 horas. Luego, se cambió el medio de cultivo y se remplazó por medio fresco al 5% de SFB con las formulaciones ARQ, L o Ls. Las concentraciones testeadas de LT fueron de 10, 50 y 500 µg/mL. Luego de 24 horas de incubación, los sobrenadantes se transfirieron a una nueva placa, que se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos utilizando una centrífuga Gelec 144D. Se determinó la liberación de la enzima LDH utilizando el Kit CytoTox®, al medir absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas Dynex Technologies, modelo MRX tc. La liberación de LDH se expresó como un porcentaje relativo al tratamiento de las células con Triton-X100, utilizando este

valor como liberación total de LDH. Se utilizó como límite de toxicidad un 10% de liberación de LDH (Fischer et al., 2003).

Por otra parte, se agregaron 110 µL/pocillo de solución de MTT (5 mg/mL de medio con 5% de SFB) a las células adheridas a la placa. Luego de 3 horas de incubación a 37°C se retiró la solución de MTT y se agregaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán. Una vez que se disolvieron completamente los cristales se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Dynex Technologies, modelo MRX tc. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje relativo a la viabilidad de las células crecidas en medio de cultivo con 5 % de SFB.

2.3.13 Ensayo de apoptosis/necrosis

2.3.13.i YO-PRO-1 / IP / Hoescht

Alteraciones en la composición lipídica y permeabilidad a pequeñas moléculas catiónicas como YO-PRO-1 son signos relativamente tempranos en la cascada de apoptosis (Boffa et al., 2005). Sin embargo, durante la muerte celular por necrosis la integridad de la membrana plasmática se pierde y las células no pueden excluir colorantes catiónicos tales como Ioduro de Propidio (IP). Por otra parte durante la apoptosis la cromatina se condensa y fragmenta, esto se puede evidenciar marcando el ADN con Hoechst (Henry, Hollville, & Martin, 2013). La inducción de apoptosis o necrosis sobre células J774A.1 luego del tratamiento con ARQ o L se determinó según el protocolo del kit de apoptosis Vybrant de Molecular Probes, utilizando microscopia de fluorescencia. Este método se basa en la doble tinción con el marcador fluorescente de apoptosis YO-PRO-1® y el marcador de necrosis Ioduro de Propidio (IP).

Se sembraron $1{,}5 \times 10^5$ células J774A.1 por pocillo en placa de 24 pocillos. Luego de 24 horas de incubación se remplazó el medio de cultivo por 350 µL de medio fresco al 5 % de SFB con las muestras ARQ, Ls o L a concentraciones de LT de 10, 50 y 500 µg/mL durante 3, 14 o 24 horas de incubación. Como control de necrosis las células se incubaron con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) 2,5 mM durante 3 horas y como control positivo de apoptosis la células fueron expuestas

a luz UV (254 nm) durante 30 minutos. Una vez que transcurrió el tiempo de incubación se descartó el medio y se realizó un lavado con PBS. Las células se dejaron con 1 mL de PBS frío. Se agregó 1 µL de solución de YO-PRO 100 µM, luego de 15 minutos de incubación se agregó 1 µL de solución de IP 0,1 mg/mL y 20 µL de solución de Hoescht de 0,1 mg/mL. Inmediatamente las células se observaron en Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA. Con el cubo de fluorescencia YFP se observó YO-PRO, con el cubo RFP se observó IP y con el cubo DAPI se observó Hoescht, las células sin marca fluorescente se observaron en campo claro. Las fotografías se tomaron en un aumento de 20X y 10X. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ.

2.3.13.ii Ensayo del TUNEL

Un marcador relevante de apoptosis es la activación de nucleasas que eventualmente degradan el ADN en fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases de longitud. El ensayo del TUNEL (por sus siglas en ingles *Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling*) detecta fragmentos de ADN a partir del hecho de que el ADN fragmentado expone gran cantidad de extremos terminales 3´OH. Estos extremos libres sirven de puntos de partida para la polimerización del ADN por la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT por sus siglas en inglés) la cual agrega deoxiribonucleotidos sin requerir una hebra molde. La adición de un análogo de deoxitimidina, 5-bromo-2´-deoxiuridina 5´-trifosfato (BrdUTP) a la reacción con TdT sirve para marcar los puntos de rotura del ADN. Una vez que BrdU se incorpora en el ADN éste se detecta utilizando un anticuerpo anti-BrdU con marca fluorescente (Darzynkiewicz, Galkowski, & Zhao, 2008; Heatwole, 1999). En una placa de 24 pocillos se sembraron J774A.1 a una densidad de 2,5 x10^5 células/pocillo en RPMI completo al 10% SFB. Las células se crecieron durante 24 horas. Luego se cambió el medio de cultivo por medio fresco al 5 % de SFB con ARQ o L a 50, 100 y 500 µg/mL. Como control de apoptosis las células fueron expuestas a luz UV (254 nm) durante 30 minutos y como Control de necrosis las celulas se incubaron 3 horas con peróxido de hirogeno. Luego de 24 horas de incubación, las células se lavaron con PBS dos veces y se levantaron con trispsina. Luego

de 24 horas de incubación a 37°C las células se lavaron dos veces con PBS y colectaron en tubos de microcentrífuga por tratamiento con tripsina. La tripsina se inactivó con SFB, la células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación (1000 g, 5 minutos a 4°C), la densidad celular fue ajustada a ~1 x 10^6 células/mL en PBS y las células se fijaron con paraformaldehído. Para esto se agregó paraformaldehído al 1% m/v, las células se dejaron en hielo por 15 minutos, se centrifugaron por 15 minutos a 300 g y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces con PBS, se agregó a la suspensión de células etanol frío al 70% v/v y las células se almacenaron en freezer a -20°C hasta su posterior análisis. El grado de fragmentación y el contenido total de ADN se determinaron utilizando el kit APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, Molecular Probes, Invitrogen (Oregon, USA Un total de 10.000 células se analizaron utilizando un láser de excitación de 488 nm y midiendo la emisión a 530 nm (FL1) para Alexa Fluor 488 y > 575 nm (FL3) para IP, en citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.). Los datos fueron analizados utilizando el software WinMDI 2.9.

2.3.13.iii Procesamiento de muestras para Western Blotting (WB)

En una placa de 6 pocillos se sembraron 1 x10^6 células/pocillo. Las células se crecieron durante 24 horas. Luego, se cambió el medio de cultivo y se remplazó por medio fresco al 5% de SFB con las formulaciones ARQ y L_S. Las concentraciones testeadas de LT fueron de 10, 50, 100 y 500 µg/mL. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS, se descartó el PBS y las placas se congelaron a -80 ºC hasta su procesamiento.

Para el procesamiento de las muestras se agregaron 50 µl de buffer de solubilizado (tritón X-100 1% (P/V), Hepes 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM y ortovanadato de sodio 10 mM, PMSF 2 mM y aprotinina 0,032 unidades inhibitorias de tripsina, pH 7,4) en cada placa (sobre hielo), distribuyéndolo con la ayuda de una espátula de punta plana. Se incubó en presencia del buffer de solubilización durante 10 minutos y luego, utilizando también la espátula, se raspó la placa y se pasó el contenido a un tubo.

Posteriormente, se homogenizó el contenido con pipeta y los solubilizados se dejaron reposar 10 minutos más, siempre manteniendo los tubos en hielo. Luego, las muestras se centrifugaron (Centrífuga Eppendorf refrigerada) a 15.000 g y 4 °C durante 40 minutos para separar el material insoluble. Terminada la centrifugación, se traspasó el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se procedió a realizar la determinación de proteínas mediante el método de BCA [ácido bicinconínico, (Smith et al., 1985)] Finalmente, se prepararon las muestras de forma tal de obtener una concentración final de proteínas de 1 mg/ml, mediante la adición de agua destilada y solución de Laemmli 2X (1x final), y luego se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se guardaron a -20 °C hasta su utilización para Western Blotting.

2.3.13.iv Western Blotting (WB)

Los solubilizados de las células fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente SDS (SDS-PAGE), utilizando equipos Mini Protean (Bio-Rad Laboratories). Se sembraron las muestras en geles de 6, 10 o 12 % (m/v) según el peso molecular de la proteína de interés. Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó la electrotransferencia hacia una membrana de PVDF, durante 1 h, con un equipo Scie Plas Limited modelo V20-SDB en condiciones semi-secas, con una solución Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v), pH 8,3. Luego de la transferencia, las membranas fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo, formada por buffer T-TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,02 %, pH 7,6) y seroalbúmina bovina (BSA) 3 % (p/v), para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche, con agitación y a 4°C. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue recuperado y las membranas lavadas 3 veces durante 5 minutos con T-TBS. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) que reconoce el anticuerpo de la especie correspondiente al primer anticuerpo (anti-IgG de ratón o conejo) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. A continuación, se realizaron como mínimo 3 lavados de 15 minutos cada uno también con T-TBS y posteriormente un lavado con agua destilada. Finalmente, se realizó la

incubación con el reactivo ECL Plus, el cual permite la reacción de quimio-luminiscencia entre la enzima HRP y el sustrato luminol presente en el reactivo. La señal se recogió en placas radiográficas que fueron reveladas, y las imágenes obtenidas se escanearon. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Gel-Pro analyzer 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EE.UU.) Para poner en evidencia otras proteínas sobre la misma membrana de PVDF, se re-incubaron las mismas con otros anticuerpos. Primero, las membranas fueron lavadas con acetonitrilo durante 10 minutos y luego incubadas en una solución que contiene Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 % p/v, 2-mercaptoetanol 100 mM (pH 6,7) durante 40 minutos a 50 ºC. Posteriormente se las lavó, bloqueó e incubó con el anticuerpo primario como se describió anteriormente. En el caso de la tinción de las membranas de PVDF con el colorante Coomasie Blue, la misma se realizó mediante la incubación de las membranas con una solución del colorante al 0,1 % durante 15 minutos, y luego se destiñeron con la solución decolorante (50 % metanol y 10 % ácido acético) durante 20 minutos. Finalmente fueron lavadas con agua destilada y escaneadas.

2.3.14 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una entrada, seguido del test de Dunnett utilizando el software Prisma 6,00 (Graphpad Software Corporation, San Diego, California, EE.UU.). El valor $p < 0.05$ se consider significativamente distinto. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$; n.s. representa no significativo ($p > 0.05$).

2.4 Resultados

2.4.1 Preparación de nanovesículas y características estructurales

Los ARQ son nanovesículas compuestas por una mezcla de LPT. En este trabajo su preparación se realizó mediante el método de hidratación de la película lipídica o método de Bangham. Mediante esta técnica se obtienen ARQ multilamelares con valores de pdi muy altos (cercanos a 1), por lo que las muestras son muy heterogéneas. Para disminuir el valor de pdi y lograr una población de vesículas entre los 100 - 200 nanómetros los ARQ son sometidos a sonicación, que permite disminuir la lamelaridad y el tamaño promedio y posteriormente a un proceso de extrusión por membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro de 200 y 100 nm. Esto permitió obtener una población de ARQ con las características estructurales que se muestran en la Tabla 1. El tamaño promedio obtenido por DLS (*Z average*) es de valores cercanos a los 180 nm, pdi de 0,2 y un potencial ζ de -40 mV (Tabla 1). Al comparar estas características con las de nanovesículas convencionales, preparadas bajo las mismas condiciones, se observa que los tamaños promedios, pdi, y concentración de LT obtenidos son similares; sin embargo para ARQ el potencial ζ es significativamente menor. Esta diferencia se debe a la presencia de arqueolípidos cargados negativamente con grupos fosfato y sulfato en sus cabezas polares (Gonzalez et al., 2009).

Tabla 1- Características estructurales de ARQ, L y Ls

Muestras	**Composición** (m:m)	**Tamaño Promedio** (nm)	**pdi**	**Potencial ζ** (mV)	**LT** (mg/ml)
L	HSPC:Col 7,5:2,5	271 ± 45	0,37 ± 0,08	-6,6 ± 0,8	5,6 ± 1,7
ARQ	LPT	179 ± 49	0,25 ± 0,06	-39,1 ± 7,1	7,2 ± 2,2
Ls	SPC	191 ± 7	0,20 ± 0,005	-3,2 ± 0,5	10,2 ± 2,3

Los resultados están expresados en promedio ± DS de tres lotes independientes.

2.4.2 Morfología de ARQ

En la Fig. 4 se muestra una típica imagen de crio-TEM de ARQ. Notablemente, a pesar de haber sido sometidos a ciclos de extrusión, que disminuirían el grado de lamelaridad, éstos se ven como vesículas mono- u oligolamelares. A su vez, se pueden ver vesículas atrapadas dentro de otras vesículas de mayor tamaño. Mediante esta técnica, el diámetro promedio de ARQ es aproximadamente 140 nm. Los ARQ más grandes y los más pequeños tienen diámetros de aproximadamente 500 y 40 nm, respectivamente.

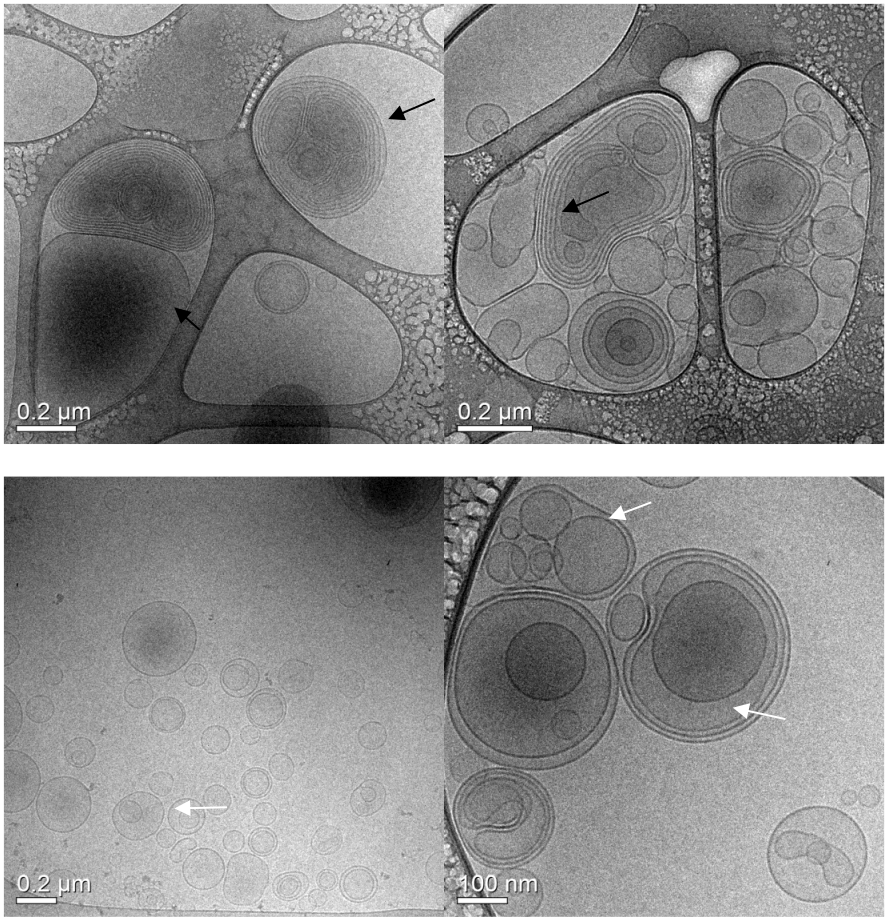


Figura 4. Imágenes de Crio-TEM de arqueosomas. Las flechas negras y blancas indican nanovesículas oligolamelares y nanovesículas atrapadas entre nanovesículas, respectivamente.

2.4.3 Separación de LPT por cromatografía en columna de Silica gel 60 por gravedad

Se realizó un análisis de LPT *H. tebenquichense* para determinar si su composición se mantenía estable y se correspondía con los resultados previos obtenidos por (Gonzalez et al., 2009) -las estructuras químicas fueron mostradas en el Capítulo 1, Fig. 9-. Para esto se realizó una CCD en donde se observó la presencia de las cinco bandas correspondientes a los cinco arqueolípidos que componen la mezcla de LPT, ordenados en orden de mayor a menor polaridad: SDGD-5, SDGD-5PA, PGP-Me, PG y BPG (Fig. 5), a su vez se pudo observar en el frente de corrida una banda que se corresponde con la mezcla de lípidos neutros. Por ESI-MS se observaron cinco picos diferentes de m/z, en la Fig. 6a no se pudo mostrar el pico de 1771 m/z (que se corresponde con SDGD-5PA) por tener una abundancia relativa menor y estar en una zona del espectro con mucho ruido en la señal.

Con el objetivo de aislar los GA (SDGD-5 y SDGD-5PA) y PGP-Me, se realizó una cromatografía en columna en donde se sembraron los LPT. Los lípidos neutros, que quedaron como contaminantes de la extracción de LPT, se recolectaron en las primeras fracciones apareciendo como una banda marrón. Si bien la mayor parte se puede observar en las primeras fracciones, estos continúan eluyendo durante toda la corrida. PGP-Me se obtuvo luego de los lípidos neutros, luego eluyó la cardiolipina SDGD-5PA, y SDGD-5 eluyó posteriormente (Fig. 5, Paso 2). Luego se juntaron las fracciones que correspondían a cada uno de los lípidos y se concentraron al evaporar el solvente. Para seguir purificando se realizó una CCD a modo preparativo con cada concentrado de cada lípido. En la Fig. 5, Paso 3 se muestra a modo de ejemplo la siembra del concentrado correspondiente a SDGD-5.

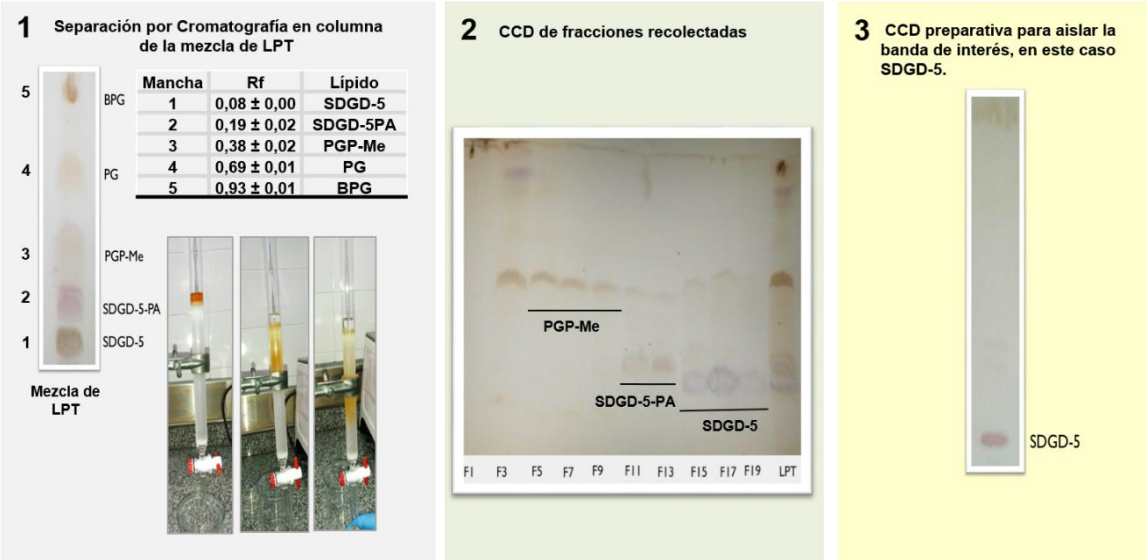


Figura 5- Separación de LPT. El primer paso en la separación es (1) siembra de la mezcla de LPT, compuesta por 5 arqueolípidos, en columna de Silica Gel 60 (2) las fracciones recolectadas son analizadas por CCD y se juntan las que contienen el mismo arqueolípido (3) esta mezcla se concentra y se vuelve a separar por CCD preparativa. (n=3)

2.4.4 Determinación de pureza de las fracciones obtenidas

Una vez aisladas las bandas obtenidas en las CCD se identificó cada uno de los arqueolípidos presentes y el grado de pureza de las muestras mediante ESI-MS. En base a los resultados obtenidos en los espectros se pudo determinar que la muestra con SDGD-5 se encuentra con un alto grado de pureza, Fig. 6c, ya que se observa únicamente el pico característico del SDGD-5 a m/z 1056 y la formación del aducto de SDGD-5 con NaCl a 1113 m/z. En el caso de SDGD-5PA, Fig. 6b, se observó como señal predominante la de 1771 m/z, pico correspondiente a SDGD5-PA, si bien se podría hablar de muestra enriquecida en dicho sulfoglicolípido, no se encontraría en estado puro. También se determinó la pureza de la fracción correspondiente a PGP-Me, como se observa en la Fig. 6d, con el pico a 899 m/z correspondiente a dicho arqueolípido en estado mayoritario. Mediante el pesaje de cada lípido puro se estimó la cantidad de cada arqueolípido obtenido a partir de 100 mg de LPT. Los resultados fueron 14,0 ± 3,9 mg de SDGD-5; 16 ± 1,2 mg de SDGD-5PA y 26,5 ± 14,2 mg de PGP-Me.

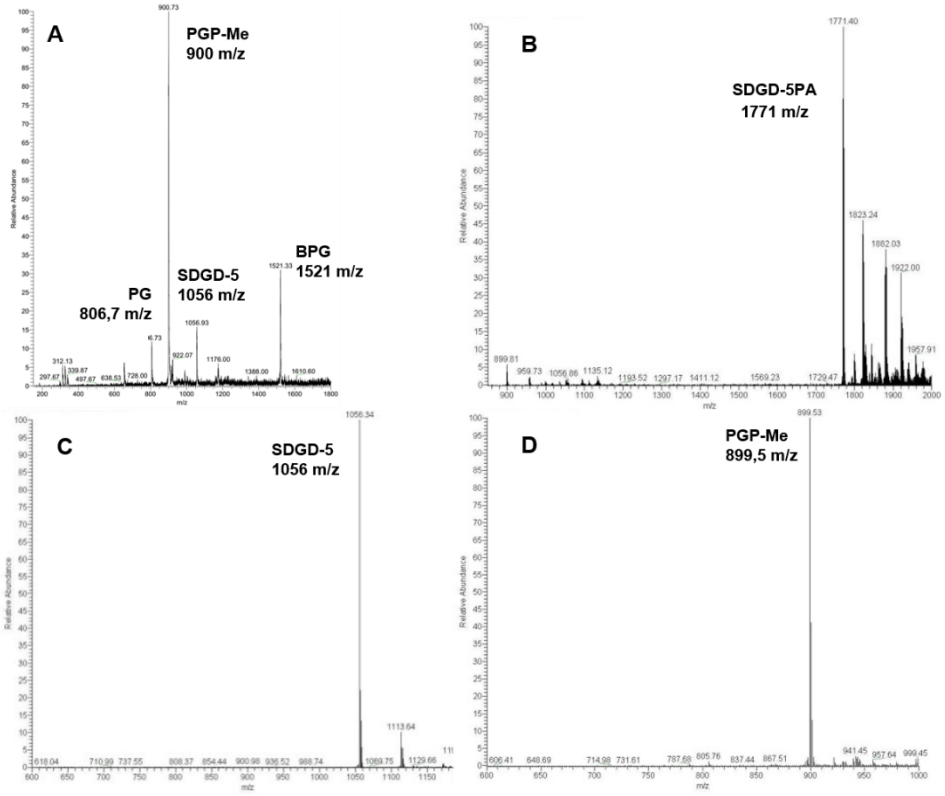


Figura 6- Determinación de pureza por ESI-MS. Espectros de ESI-MS en modo negativo de a) la mezcla de LPT y cada una de las fracciones aisladas b) SDGD-5PA, c) SDGD-5 y d) PGP-Me. (n=3).

2.4.5 Preparación de nanovesículas

Para determinar si alguno de los arqueolípidos aislados de la mezcla de LPT era el responsable de la captura diferencial que se observó en trabajos anteriores sobre distintas líneas celulares (Higa et al., 2016; Higa et al., 2012; Perez et al., 2014), se prepararon nanovesículas con diferente composición de arqueolípidos: formulaciones conteniendo LPT enriquecidas en PGP-Me (A-PMe), formulaciones conteniendo LPT, enriquecidas en GA y PGP-Me (A-PMe-GA y A-PMe-GA2), formulaciones conteniendo fosfolípidos y GA (Ls-GA), además de ARQ. La formulación A-PMe-GA debería tener una composición similar a los ARQ, mientras que A-PMe-GA2 contendría mayor cantidad de GA. A su vez, se hipotetizó que si los GA tienen residuos de manosa, estos podrían ser reconocidos por el RM y su inclusión podría aumentar la captura endocítica de diferentes nanovesículas.

Las formulaciones conteniendo LPT y GA presentaron tamaños similares cercanos a los 250 nm. La formulación Ls-GA, tuvo un tamaño promedio menor, resultando una población más monodispersa de potencial ζ menos negativo, aunque más negativo que lo esperado para nanovesículas ordinarias de SPC. Este cambio seguramente se deba a la incorporación de cargas negativas provenientes del grupo sulfato de los GA. Por otra parte el potencial ζ de nanovesículas con LPT y GA fue menor que para los nanovesículas preparadas únicamente con PGP-Me (Tabla 2).

Tabla 2. Características estructurales de nanovesículas con diferente composición de arqueolípidos.

Muestra	**Potencial ζ** (mV)	**pdi**	**Tamaño Promedio** (nm)
A-PMe	-32	0,44	259
A-PMe-GA	-44	0,4	255
A-PMe-GA 2	-40	0,42	277
Ls-GA	-18	0,14	110
ARQ	-48	0,45	261

En cuanto a la concentración de LT se obtuvieron valores similares para todas las formulaciones. Con respecto a la concentración de RhPE se observaron diferencias de incorporación del lípido fluorescente en la membrana lipídica, por lo que para analizar los resultados obtenidos con estas muestras se requirió de una paso de normalización en función de la relación RhPE/LT (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de Lípidos Totales (LT) y RhPE.

Muestra	**RhPE** (µg/mL)	**LT** (mg/mL)	**Rh/LT** (µg/mg)
A-PMe	6,3	17	0,37
A-PMe-GA	5,8	17,9	0,32
A-PMe-GA 2	9,5	19,3	0,49
Ls-GA	10,6	21,5	0,49
ARQ	9,8	20,4	0,48

Para determinar la cantidad y proporción de GA final en cada formulación se cuantificó la concentración de azucares por el método de antrona, sin embargo no se pudieron obtener resultados de la formulación Ls-GA ya que SPC interfiere con la cuantificación. Como se muestra en la Tabla 4, las relaciones de GA/LT fueron mayores para A-PMe-GA 2 > ARQ > A-PMe-GA > A-PMe. Esto es un indicio de que la fracción de PGP-Me quedo con contaminantes de GA a pesar de los sucesivos pasos de extracción.

Tabla 4. Concentración de GA en cada formulación.

Muestra	GA (mg/ml)	GA/LT (% m/m)
A-PMe	0,4	2,2
A-PMe-GA	1,2	6,4
A-PMe-GA 2	2	9,6
ARQ	1,7	7,5

2.4.6 Captura de nanovesículas por células J774A.1

Previamente se demostró que la captura por células J774A.1 de liposomas preparados con SPC es prácticamente nula comparada con la captura de ARQ (Higa et al., 2012; Tesoreiro, 2014). Nuevamente, con la nueva formulación de SPC, Ls-GA, observamos que la se mantuvo prácticamente nula hasta 5 horas de incubación. Cuando se remplaza SPC por la fracción arqueolipídica con PGP-Me (formulación A-PMe-GA2) la extensión de captura aumenta significativamente. Por otra parte, la extensión de la captura de la formulación que contiene únicamente PGP-Me es importante, aunque menor que para las formulaciones que tienen la totalidad de los LPT (ARQ). No se observaron diferencias significativas entre la extensión de captura de ARQ, y la de las formulaciones conteniendo PGP-Me y GA luego de 5 horas de incubación. Remarcablemente, aunque A-PMe-GA2 contendría mayor cantidad de GA que ARQ, la extensión de captura fue similar para ambos es decir, que no aumentó con el contenido de GA, como hipotetizamos al principio (Fig. 7).

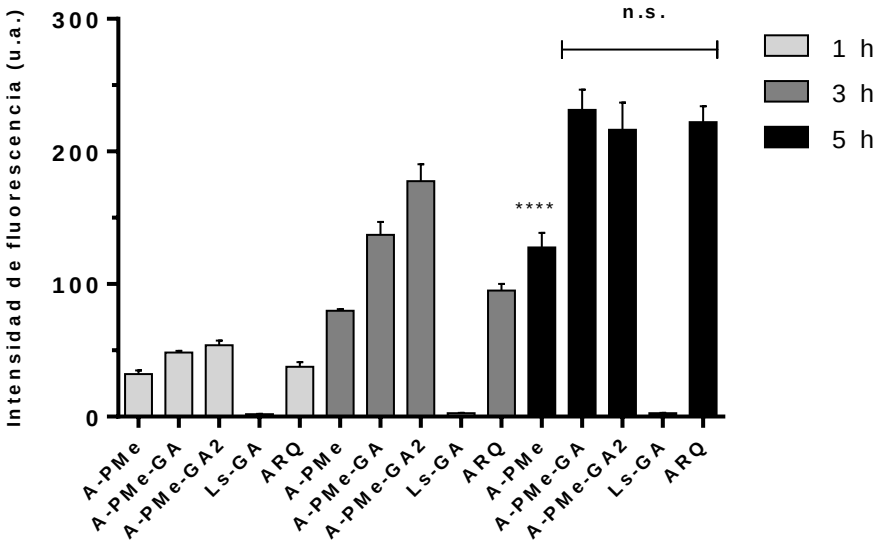


Figura 7- Captura celular de nanovesículas. Se midió la captura celular en J774A.1 de las distintas formulaciones a 1, 3 y 5 horas de incubación por citometria de flujo. Diferencias significativas entre las formulaciones con 5 h de incubación.

2.4.7 Ensayo de competición de captura celular

Para determinar qué tipo de receptores estarían implicados en la internalización de ARQ por células J774A.1, se llevó a cabo un ensayo de captura en presencia de competidores. Estos competidores son ligandos de receptores conocidos, a saber: la macromolécula mannan es un polisacárido que se une a receptores de manosa; liposomas conteniendo fosfatidilserina, L-PS, son ligandos de RS de clase B (Kawasaki, Nakagawa, Nagaosa, Shiratsuchi, & Nakanishi, 2002), poly(I) es ligando de RS de clase A y poly(C) es una molécula estructuralmente muy parecida a poly-I pero no reconocida por RS (Peiser et al., 2002). El ensayo de competición mostró que en presencia de poly(I) la captura de ARQ disminuyó sustancialmente (~80%), al cabo de 1 h de incubación (Fig. 8). Por el contrario, ni poly-C, ni *mannan*, ni L-PS inhibieron la captura de ARQ. Estos resultados mostraron que ni el receptor de manosa ni los RS de Clase B participan en la unión de ARQ a la célula. En tanto, mientras que poly(I) y no poly(C), disminuyó la captura de ARQ, los resultados sugieren que es el RS de clase A (RS-AI/II), el receptor implicado en el reconocimiento e internalización de ARQ por células J774A1.

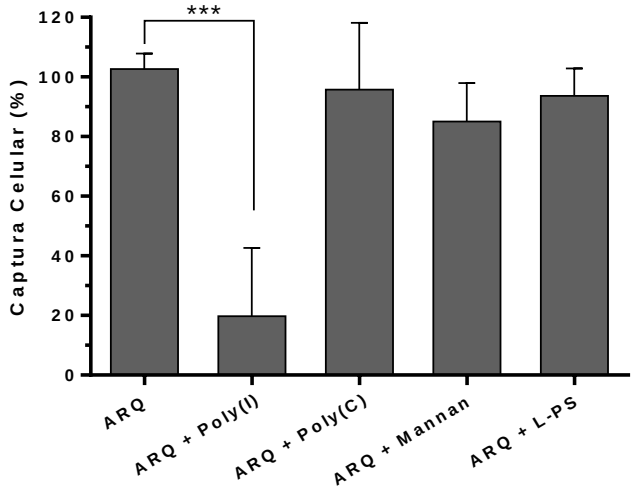


Figura 8. Ensayo de competición de captura celular. La captura de ARQ marcados con RhPE por parte de macrófagos J774A.1 se midió por citometria de flujo luego de 1 h de co-incubación con diferentes competidores. Los valores están expresados como promedio ± DS (n=3).

2.4.8 Viabilidad celular medida por MTT y LDH

El método de MTT permite medir la proliferación y actividad metabólica celular de manera general. El mecanismo exacto de la reducción de MTT a formazán no está del todo entendido, pero involucraría a enzimas del tipo deshidrogenasas que transfieren electrones de NADH o NADPH al MTT. La cantidad de señal generada es dependiente de varios parámetros como: el periodo de incubación, el número de células viables y la actividad metabólica. La cantidad de formazán generado es generalmente proporcional al número de células metabólicamente viables (van Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011).

LDH es una enzima citosólica soluble que solo se libera al medio extracelular cuando hay un aumento de permeabilidad de la membrana plasmática, por lo que es un indicador de muerte celular (Hillegass et al., 2010).

Con L, hasta 24 horas de incubación, en todas las concentraciones testeadas no se observaron niveles significativos de la enzima LDH en los sobrenadantes celulares. La viabilidad celular, medida por MTT, fue independiente del tiempo de incubación y de las concentraciones testeadas siendo cercana al 80%. Con Ls hasta 24 horas no se observó ni lisis celular ni cambios en el metabolismo. Con

ARQ la viabilidad celular disminuyó ~35 % a partir de 24 horas de incubación a concentraciones de 500 µg/mL (Fig. 9a). La liberación de LDH aumentó únicamente luego de 24 horas de incubación con 500 µg/mL de ARQ a valores cercanos al 30 % (Fig. 9b).

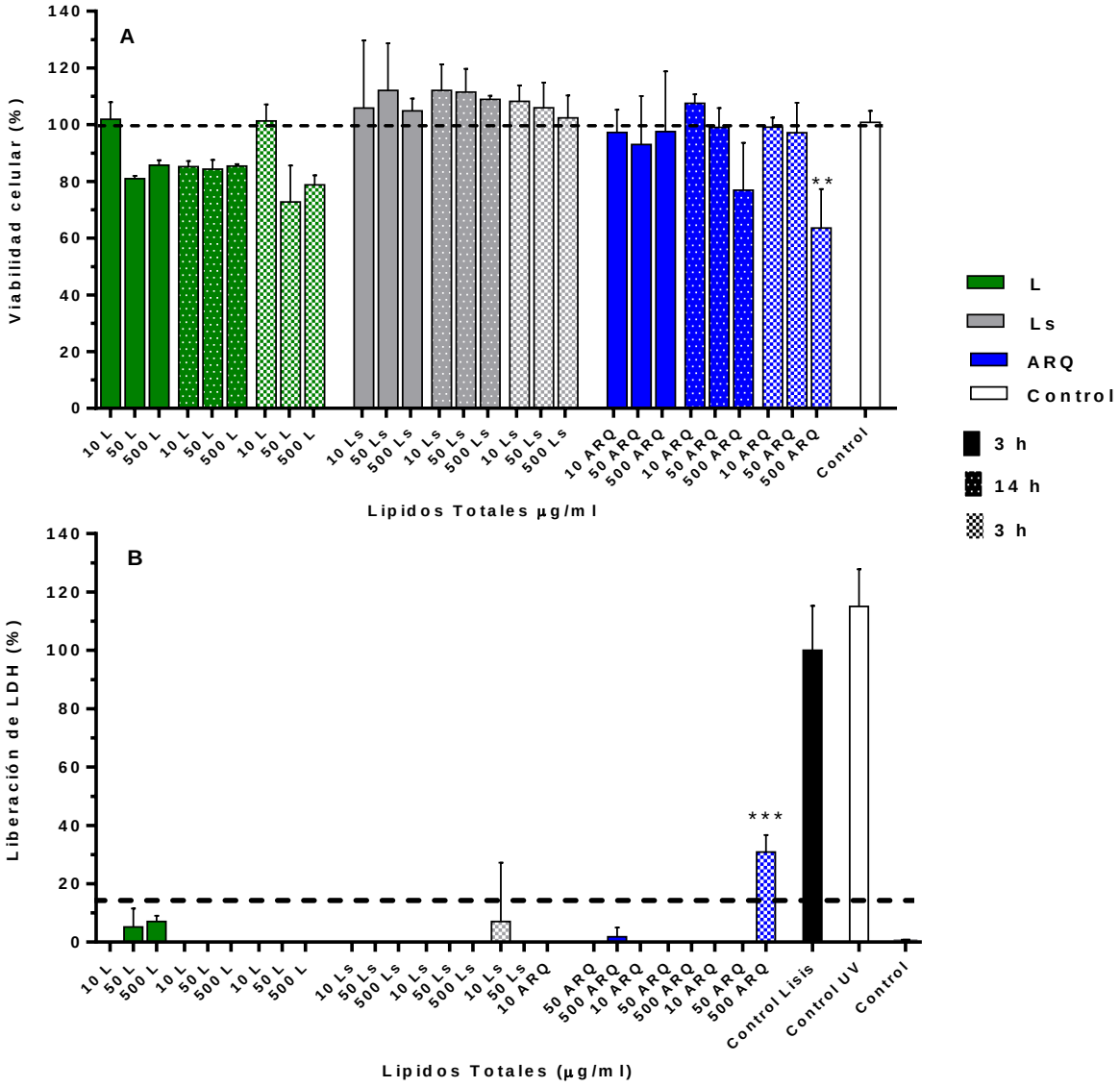


Figura 9- Ensayos de citotoxicidad. Citotoxicidad celular de ARQ, L y Ls sobre células J774A.1 a diferentes concentraciones de lípidos totales, durante 3, 14 y 24 horas medida por (a) el método de MTT y (b) el método de LDH. Las diferencias significativas son al comparar con celular Control. Los valores están expresados como promedio ± DS (n=2).

2.4.9 Análisis de Apoptosis/Necrosis mediante IP, YO-PRO y Hoescht

Durante la apoptosis temprana la membrana citoplasmática se vuelve levemente permeable. Ciertos colorantes como el fluoróforo YO-PRO pueden entrar en las células apoptóticas mientras que otros colorantes como IP no pueden. Por otra parte, el colorante Hoechst puede permear a través de la membrana plasmática de células vivas y unirse al surco menor de la doble hebra de ADN. Sin embargo en procesos de apoptosis el ADN se condensa y Hoechst tiñe la cromatina de manera más brillante que como tiñe a la cromatina de células no-apoptóticas.

Las células control, sin ningún tratamiento, luego de 24 horas de crecimiento tienen su núcleo marcado únicamente con Hoescht, de un azul no muy brillante y la densidad celular es de un 90%. Al tratar las células durante 3 horas con 2,5 mM de H_2O_2, un agente oxidante muy fuerte, se induce la muerte celular por necrosis (Kulms & Schwarz, 2000). Entonces la membrana plasmática aumenta su permeabilidad y permite el paso de IP; entonces las células se ven marcadas con los tres colorantes (Fig. 10a).

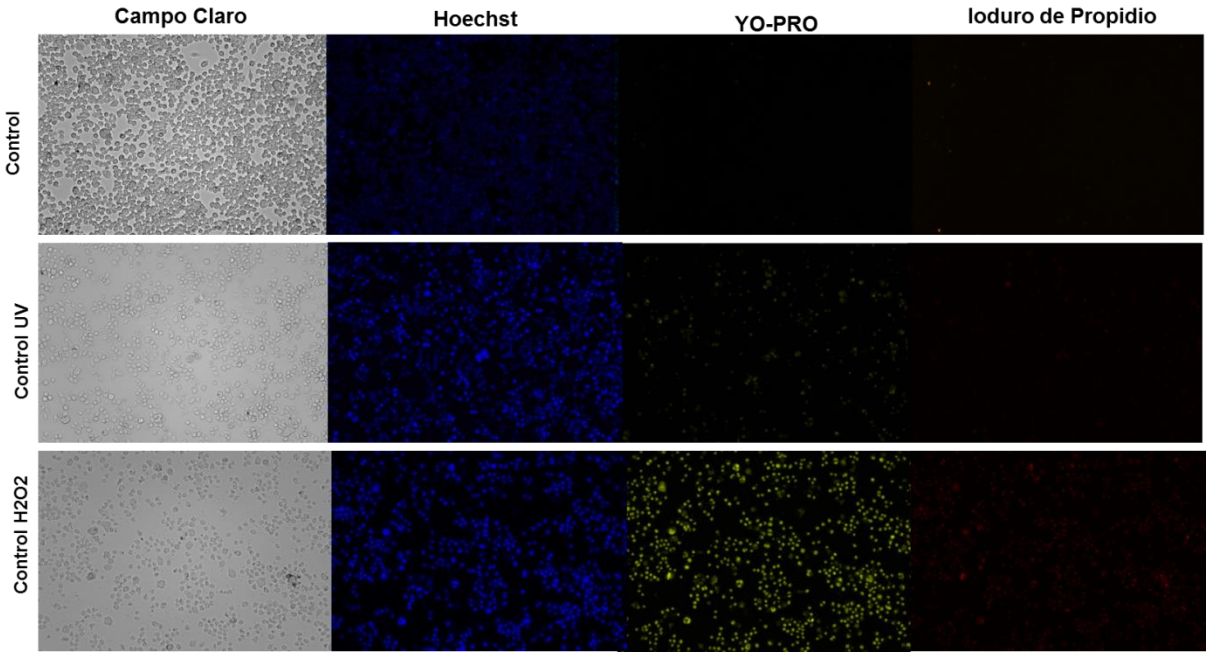


Figura 10a. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células J774A.1 marcadas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con H_2O_2 durante 3 h, con luz UV durante 30 minutos o sin tratamiento (Control). Aumento 10X. (n=2)

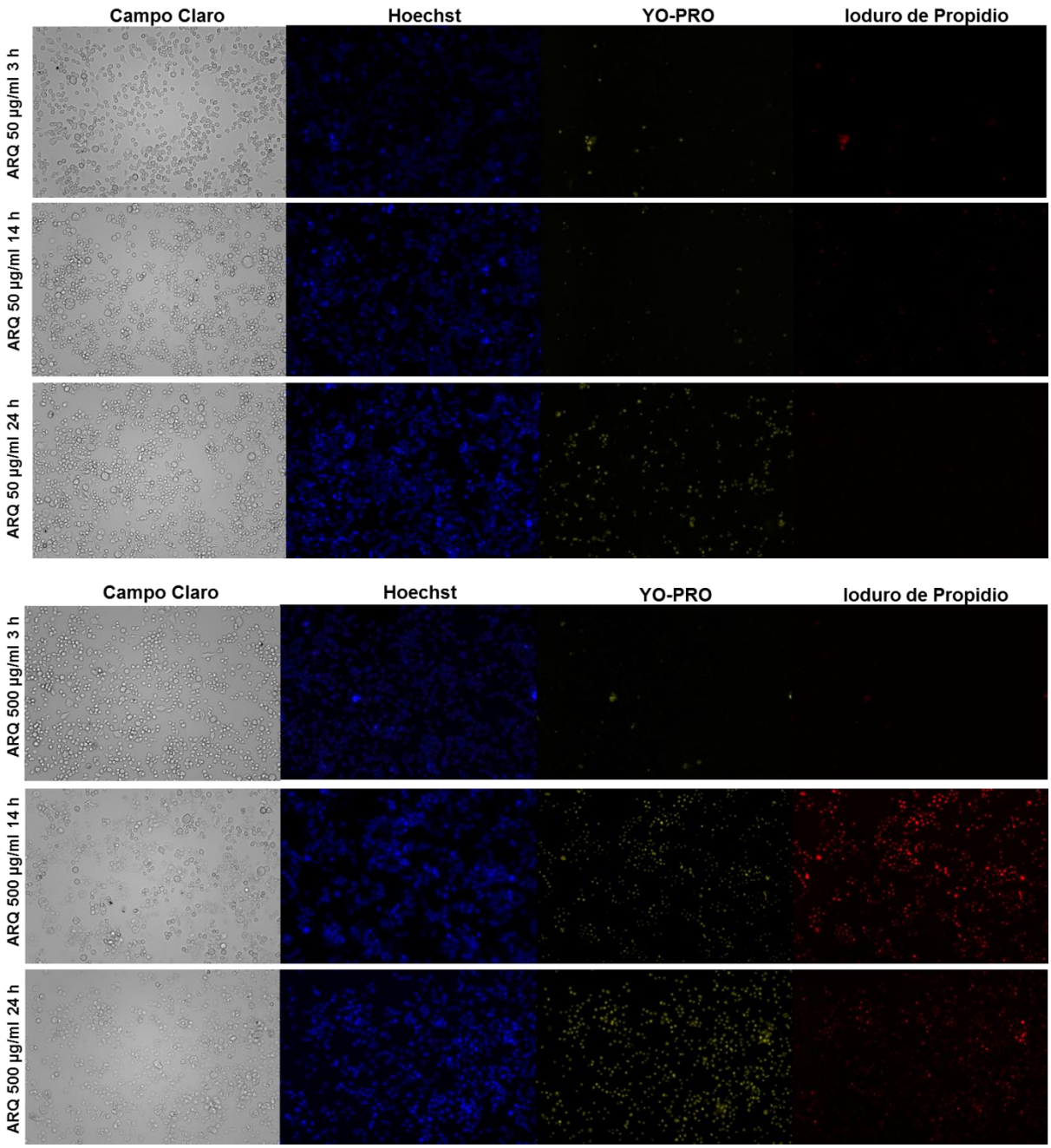


Figura 10b. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células J774A.1 marcadas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con ARQ durante 3, 14 y 24 h a 50 o 500 µg/mL de lípidos totales. Aumento 10X. (n=2)

Por otra parte al exponer a las células durante 30 minutos a luz UVC se induce la muerte por apoptosis (Darzynkiewicz et al., 1997). En el caso de las células tratadas con luz UV, se pueden ver algunas células marcadas con Hoechst y YO-PRO. Además con los dos tratamientos se observa una disminución en la densidad celular de las células en campo claro (Fig. 10a).

Nuestros resultados mostraron que para ARQ a 50 µg/mL hubo un aumento en la marcación con YO-PRO luego de 24 h de incubación, mientras que no se observaron células marcadas con IP. Esto podría indicar que algunas células luego de tiempos largos de incubación están en apoptosis temprana. (Fig. 10b) A una concentración de 500 µg/mL de ARQ, se observó un aumento en la marcación con YO-PRO e IP a partir de 14 horas de incubación que indicaría lisis celular (Fig. 10b). En el caso de L a 500 µg/mL a las 14 horas se observó marcación con YO-PRO, pero no con IP por lo que las células estarían apoptosis temprana (Fig. 10c), mientras que a las 24 horas hay marcación con IP, lo que indicaría lisis celular.

Por otro lado, se realizaron microscopias de fluorescencia y campo claro de las células incubadas con ARQ con un mayor aumento (20X), para determinar más detalles, como morfología y densidad de tinción con Hoescht. Al cabo de 3 horas de incubación a una concentración de ARQ de 50 µg/mL las células no están teñidas con IP o YO-PRO, y el núcleo teñido con Hoescht no muestra diferencias de densidad Fig. 11.

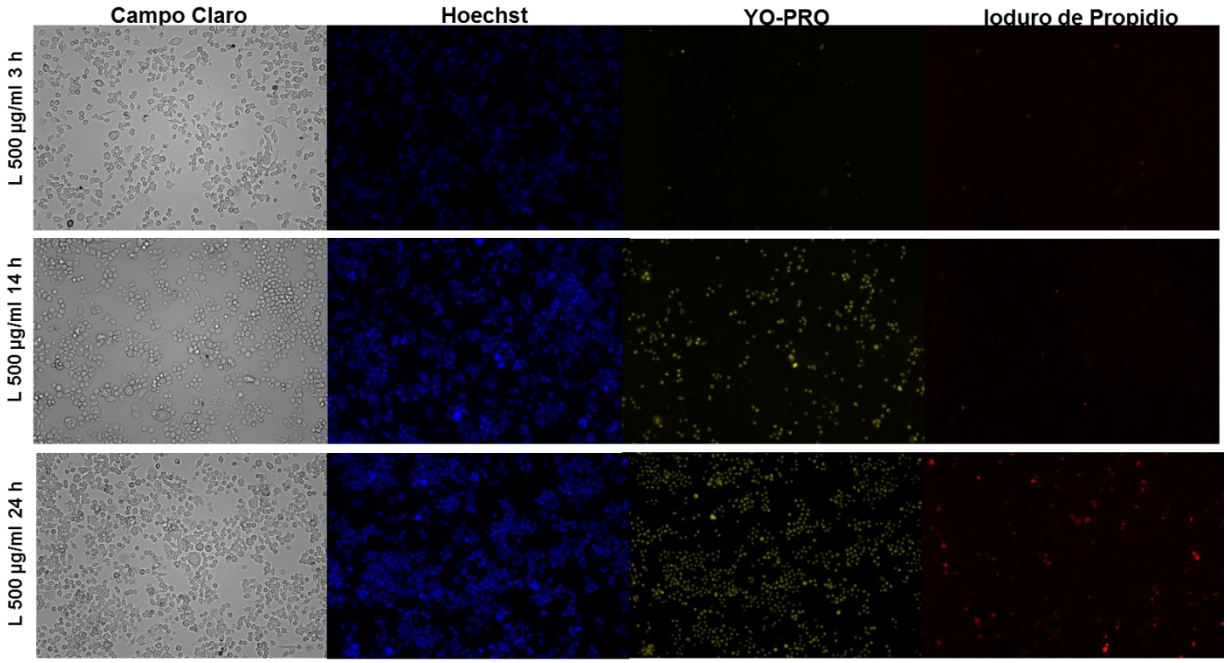


Figura 10c. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células J774A.1 marcadas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con L durante 3, 14 y 24 h a 500 µg/mL lípidos totales. Aumento 10X. (n=2)

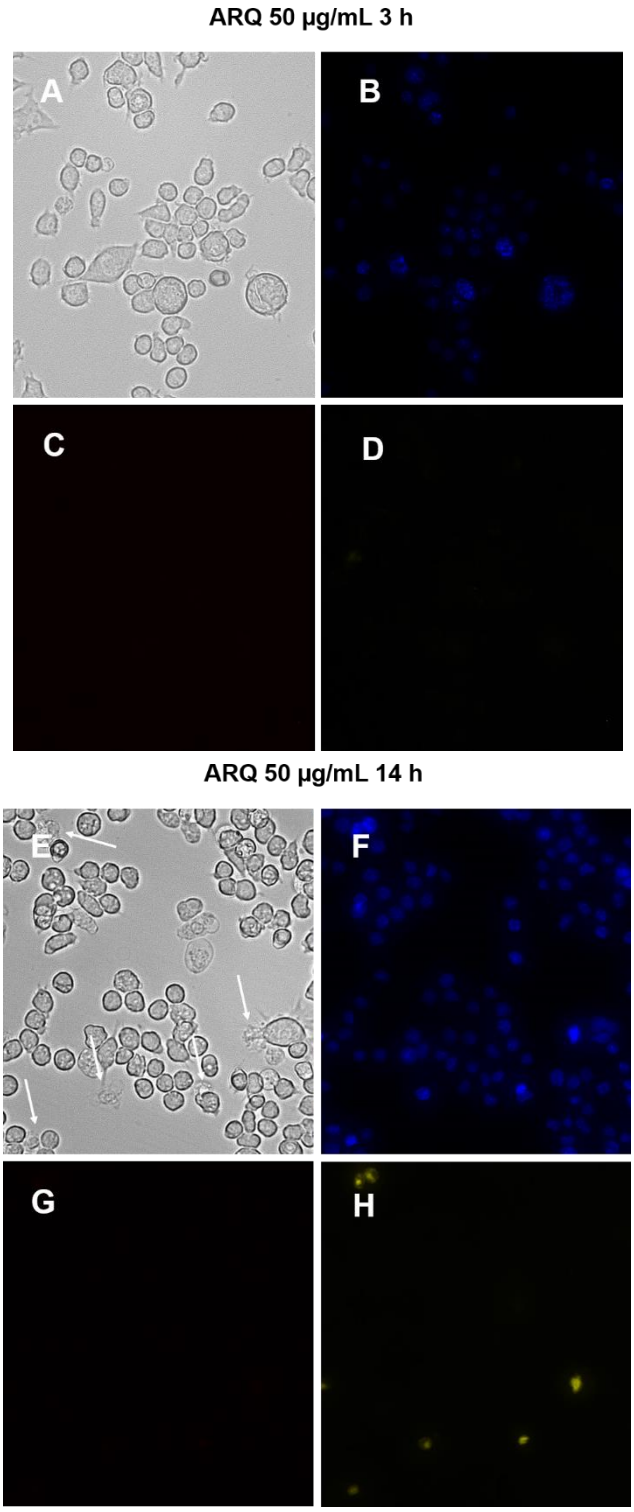


Figura 11. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células J774A.1 en a) y e) campo claro marcadas o marcadas con b) y f) Hoechst, c) y g) IP y d) y h) YO-PRO luego de haber sido incubadas con ARQ 50 µg/mL durante 3 y 14 h. Aumento 20X.

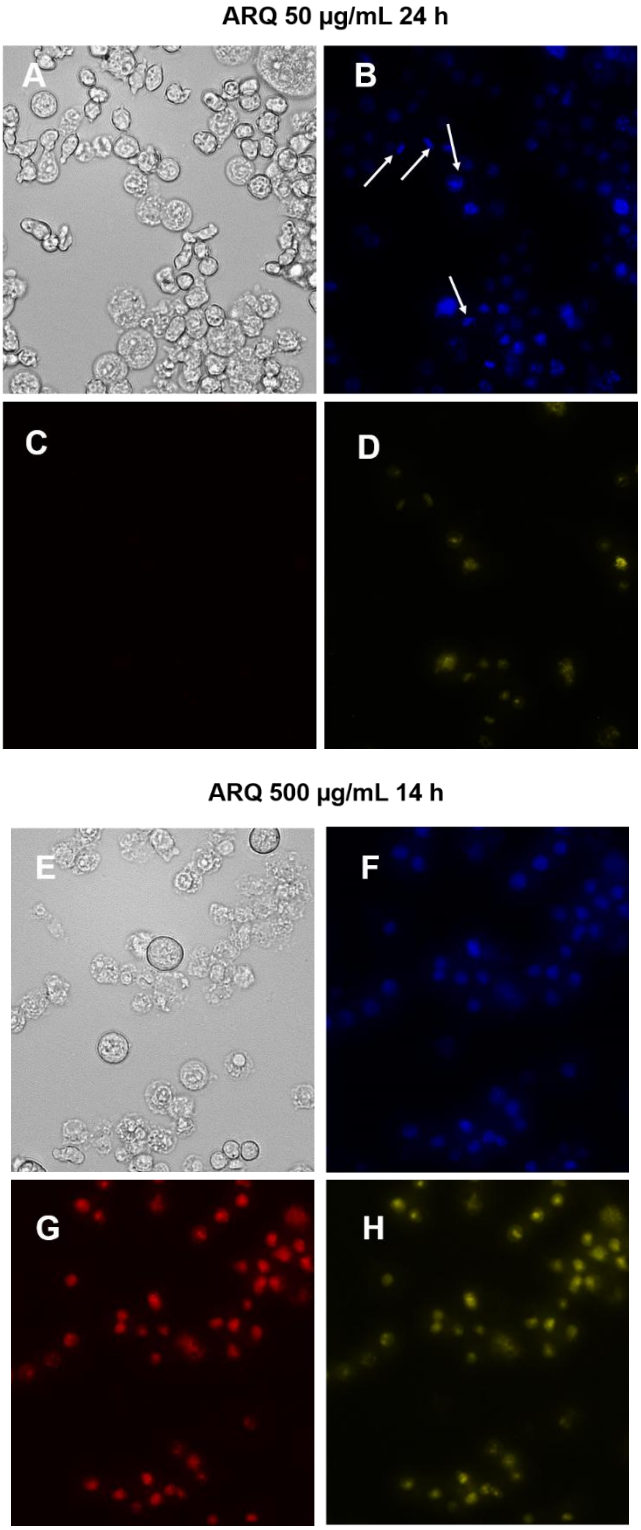


Figura 12. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células J774A.1 en a) y e) campo claro marcadas o marcadas con b) y f) Hoechst, c) y g) IP y d) y h) YO-PRO luego de haber sido incubadas con ARQ 50 µg/mL durante 24 h o 500 µg/mL durante 14 h. Aumento 20X.

Luego de 14 horas se observaron algunas células con tinción de YO-PRO (Fig. 11h) y sin tinción de IP (Fig. 11g). En este caso las células teñidas con YO-PRO también muestran una marcación más brillante con Hoescht. En cuanto a su morfología, estas células parecen más vacuoladas y chicas como se muestra con las flechas en campo claro (Fig. 11e). Luego de 24 horas aumenta el número de células con estas características y se puede ver claramente una marcación más brillante con Hoescht en algunas zonas del núcleo que podría ser por condensación de cromatina como se muestra en la Fig. 12b señalado con flechas.

Luego de 14 horas a una concentración de ARQ de 500 µg/mL, las células están poco adheridas, los bordes poco definidos, así como con muchas vacuolas (Fig. 12e). En este caso la marcación da positiva para IP y no se observan las diferencias de tinción con Hoescht.

2.4.10 Análisis de Apoptosis/Necrosis mediante TUNEL

El ensayo del TUNEL permitió determinar el grado de fragmentación del ADN de células J774A.1 luego de incubarlas con L o ARQ durante 24 horas. Cuando las células tienen un alto grado de fragmentación de su ADN estas se encuentran en apoptosis tardía. Tal es el caso de las células tratadas con luz UV, para las que pudimos determinar un aumento en la cantidad de ADN fragmentado cuando comparamos la IF con la de las células control, como se muestra en los histogramas de la Fig. 13.

Por otra parte, no se observó un aumento de la IF para L entre 50 y 500 µg/mL, por lo que concluimos que no generaron fragmentación de ADN. Para ARQ hasta 100 µg/mL tampoco se observó que la IF aumentara, mientras que para 500 µg/mL parte de las células analizadas aumentaron su IF, indicando ADN fragmentado (Fig. 13). Las células tratadas con peróxido de hidrogeno, no pudieron ser analizadas ya que no se pudo recuperar un número de células suficiente.

.

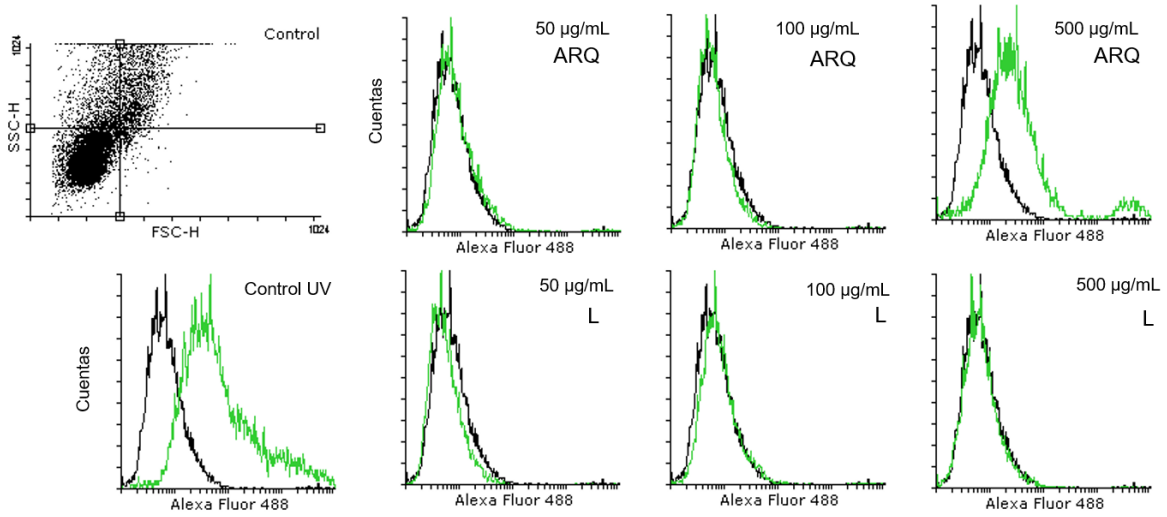


Figura 13. Ensayo TUNEL, histogramas IF de células J774A.1, medida por citometria de flujo luego de incubar ARQ o L durante 24 h a diferentes concentraciones de lípidos totales o exponer a luz UVC durante 0,5 h. (n=2)

Adicionalmente se analizaron las células que fueron positivas en el ensayo del TUNEL (Fig. 13) para determinar cambios en la granularidad y tamaño luego de las 24 horas de incubación con ARQ o L.

La citometría de flujo puede brindar datos sobre la morfología celular al determinar cambios en el patrón de luz dispersada que genera cada célula. La dispersión directa de la luz (detectada en línea con el haz incidente, *Forward Scatter*, FSC), se correlaciona con el volumen celular, mientras que la dispersión lateral (detectada perpendicularmente al haz incidente a 90°, *Side Scatter*, SSC) se correlaciona con la complejidad estructural, como la forma del núcleo, la cantidad y tipo de gránulos citoplasmáticos, o la rugosidad de la membrana. Cuando una célula muere por apoptosis, la reducción del volumen celular y la formación de cuerpos apoptóticos se correlacionan con una disminución del FSC y un aumento del SSC. En cambio cuando las células entran en apoptosis tardía/necrosis secundaria se caracterizan por una menor capacidad para dispersar la luz en ambas direcciones. Durante la necrosis, se produce rápidamente la reducción simultánea de la intensidad de luz dispersada en FSC y SSC (Wlodkowic, Telford, Skommer, & Darzynkiewicz, 2011). Por tal motivo

estos parámetros no permiten distinguir apoptosis tardía de necrosis secundaria, pero si apoptosis temprana.

Se comparó la intensidad de la luz en FSC y SSC para las células control sin tratamiento, control UV y las células incubadas durante 24 horas con ARQ a 500 µg/mL (concentración en donde se observó un aumento de la fragmentación de ADN). Al observar en un gráfico de *dot plot* la distribución de las células que fueron positivas en el ensayo del TUNEL (población azul), se observó un aumento en el porcentaje de células que tienen mayor intensidad en SSC, tanto para las células tratadas con UV como incubadas con 500 µg/mL de ARQ al compararlas con las células Control. Esto sería un indicio de un aumento en la complejidad de un 30 % de las células que tienen su ADN fragmentado (Fig. 14).

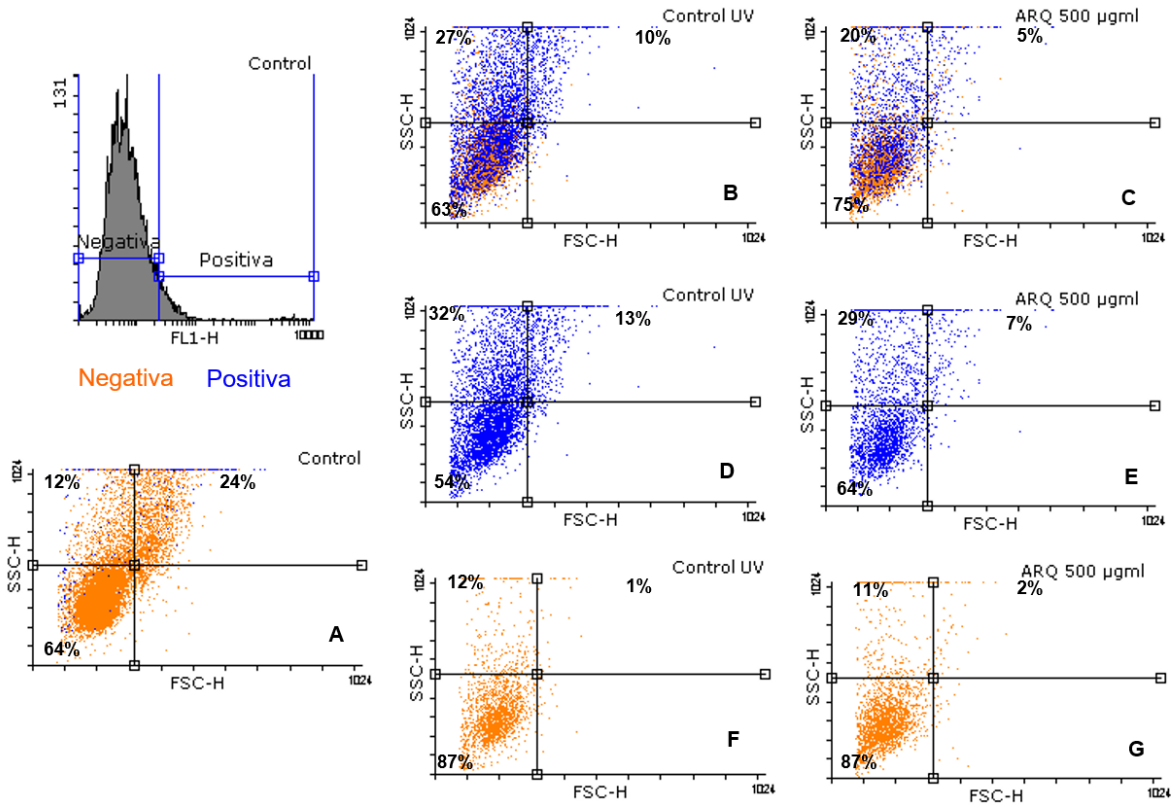


Figura 14. Dot Plot de *Forward scatter* (FSC) *vs Side scatter* (SSC) de células J774A.1 que fueron sometidas la ensayo del TUNEL. Se muestra los gráficos de las muestras positivas para TUNEL ARQ a 500 µg/mL y Control UV.

Después las teñir las células con un fluorocromo específico de ADN, como IP, pueden reconocerse por citometría las etapas del ciclo celular en el que se encuentran las células. Las células que están en un estado quiescente o que están entrando al ciclo celular, mediante la síntesis de ARN y proteínas, tendrán un contenido de ADN diploide (2N) (estadio G_0/G_1). En la fase de síntesis de ADN (S) tendrán más ADN que las células en G1 (entre 2N-4N) y tomarán proporcionalmente más IP y emitirán una fluorescencia más intensa, hasta que hayan duplicado su contenido de ADN (4N) y se encuentren en fase G2 o en mitosis (M) y serán aproximadamente el doble de brillantes que las células en G1.

Por otra parte como resultado de la fragmentación del ADN, las células apoptóticas muestran un déficit en el contenido de ADN. En los histogramas el contenido de ADN a menudo se caracteriza por una población "sub-G_0/G_1" (Crowley, Chojnowski, & Waterhouse, 2016). En el ensayo del TUNEL también se agregó IP antes de analizar las muestras por citometría para determinar el estadio del ciclo celular en el que se encontraban las células luego de las 24 horas de incubación con ARQ o L. En este caso como las células fueron previamente fijadas con paraformaldehído y etanol, IP permea a través de la membrana celular en todas las condiciones, incluso en las células control. Todas las células salvo las tratadas con UV están en mayor porcentaje en la fase del ciclo celular G_0/G_1 y no se observó una población celular en etapa de división G2/M por lo que las células estarían principalmente en un estado quiescente, esto puede tener que ver con el tiempo de incubación y la falta de nutrientes, debido al consumo del medio de cultivo (Wallen, Higashikubo, & Dethlefsen, 1984). Las células incubadas con ARQ tienen un porcentaje de sus células en fase sub-G_0/G_1 que aumenta a medida que aumenta la concentración de ARQ, siendo de un 9,5 % para 500 µg/mL. Este estadio del ciclo se corresponde con células en apoptosis que tienen su ADN fragmentado (Fig. 15).

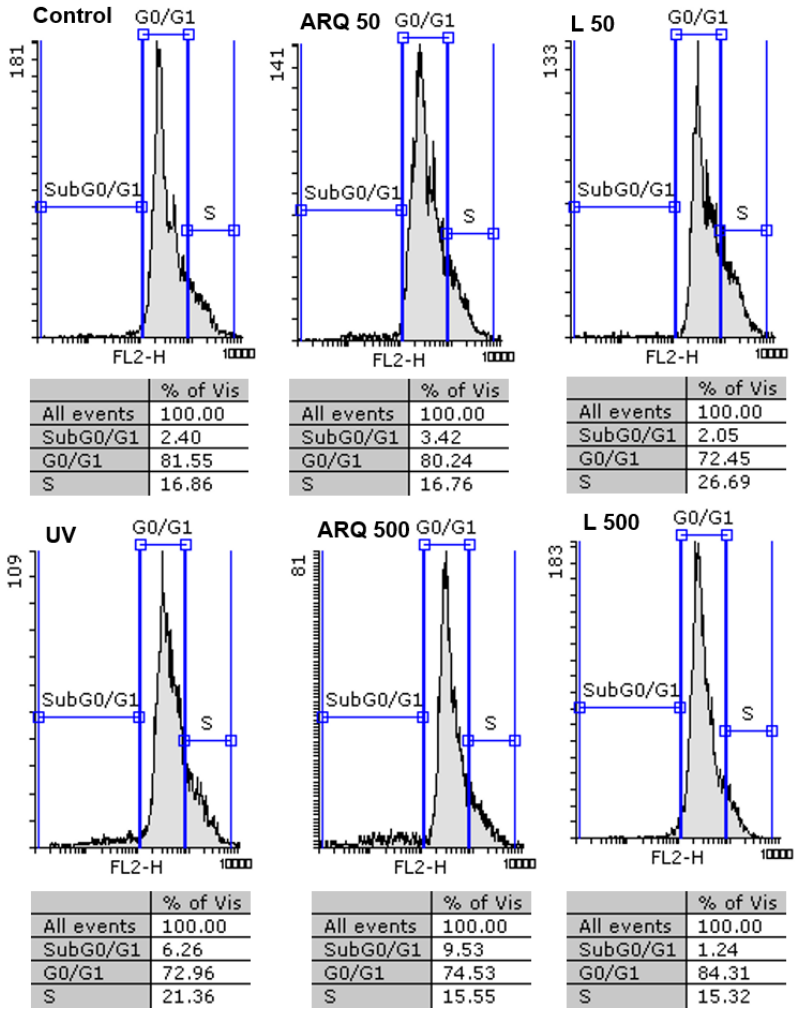


Figura 15. Determinación del ciclo celular**.** Histogramas IF de IP en células J774A.1, medida por citometria de flujo luego de incubar ARQ o L durante 24 h a diferentes concentraciones de LT y células expuestas a luz UVC durante 0,5 h. (n=2).

2.4.11 Proteínas de señalización

Mediante Western Blot se determinaron cambios en la cantidad de las proteínas AKT/pAKT, ERK/pERK y PARP-1 que se expresan en células J774A.1 luego de 24 horas de incubación con ARQ o Ls a 10, 50, 100 y 500 µg/ml.

La proteína Akt1 tiene una amplia distribución en todos los tejidos y está implicada en el crecimiento supervivencia celular. Muchos factores de crecimiento y citoquinas activan cascadas de señalización que incrementan la activación de AKT (pAKT) (Hers, Vincent, & Tavaré, 2011). En los ensayos en donde se incubaron ARQ y Ls, los niveles de la enzima AKT y pAKT no

cambiaron con respecto al control de muestras sin tratar como se muestra en la Fig. 16.

Dentro de las rutas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se encuentran las quinasas relacionadas a señales extracelulares (ERK). Esta via de señalización responde principalmente a factores de crecimiento y agentes mitógenos que controlan el crecimiento, la proliferación celular, supervivencia celular y muerte celular. ERK es una enzima citoplasmática que es activada mediante fosforilación (pERK). Una vez activada se trasloca al núcleo donde activa diferentes factores de transcripción que inducen la expresión de genes que promueven la supervivencia, división y motilidad celular (Roskoski Jr, 2012). En la Fig. 16, se muestran los resultados para la enzima ERK y pERK; cuando las células se incuban con ARQ a partir de 100 µg/mL aumenta la cantidad de pERK, mientras que no se observan cambios en ERK en comparación con las células control.

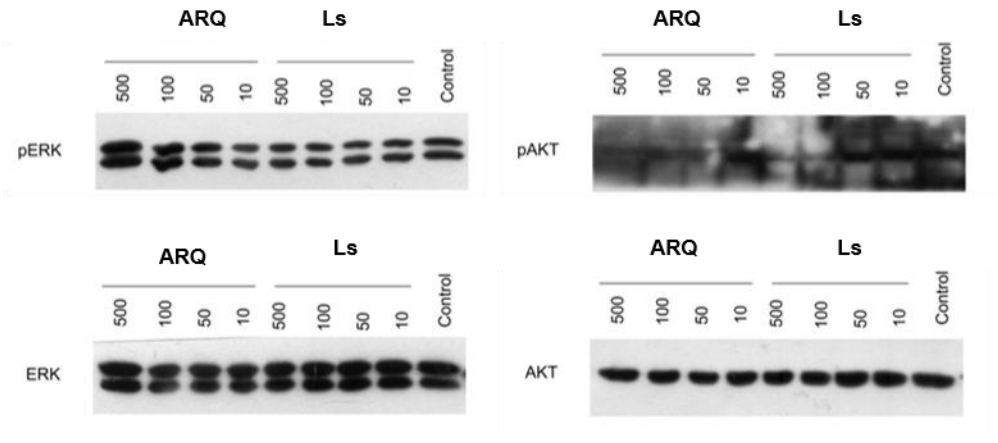


Figura 16. Imagen de Western Blot en celulas J774A.1, luego de 24 horas de incubación con ARQ o Ls a diferentes concentraciones. (n=3).

2.5 Discusión

Una de las características más sobresalientes de los ARQ preparados a partir de los LPT del arqueabacteria *H. tebenquichense,* radica en ser extensamente internalizados por distintos tipos celulares. Esta propiedad puede ser aprovechada para llevar a cabo un *delivery* intracelular de drogas, más eficientemente que con nanovesículas ordinarias (liposomas).

Debido a la presencia de glicolípidos SDGD-5 y SDGD-5PA con manosas sulfatadas en sus cabezas polares en los LPT, inicialmente hipotetizamos que estos GA pudieran ser ligandos del RM y que serían responsables de su extensiva captura por macrófagos, células que expresan gran cantidad de RM en su superficie. Propusimos entonces que toda nanovesícula enriquecida en GA podría ser extensivamente endocitada. Por otra parte, también se decidió evaluar el rol del lípido con mayor abundancia relativa, PGP-Me, en la captura celular. Por estas razones preparamos dos extractos arqueolipídicos purificados: uno de GA y otro de PGP-Me. Para esto separamos los LPT por columna de Silica seguida de CCD preparativa. Pero sorprendentemente, la formulación conteniendo los GA aislados y SPC no registró captura celular (Fig. 7), es decir los GA solos no actuaron como ligandos de receptores endocíticos que hicieran su captura extensiva. En cambio las formulaciones conteniendo solo PGP-Me fueron extensamente capturadas, aunque en menor proporción que ARQ o la formulación conteniendo PGP-Me y GA. Por lo tanto, el arqueolípido PGP-Me sería el único directamente involucrado en la captura extensiva de las nanovesículas; en cambio los GA parecerían intervenir únicamente en combinación con PGP-Me.

Estos resultados nos dirigieron a re-elaborar nuestra hipótesis acerca de qué tipo de receptores estarían involucrados en el reconocimiento y extensiva captura de los ARQ. Identificar los receptores intervinientes nos permitiría predecir qué tipos celulares serían los blancos de ARQ en una administración *in vivo* y diseñar terapias que tuvieran en cuenta esta característica. Debido al rol fundamental de PGP-Me en la captura celular y su carácter aniónico con una

carga neta de -2, hipotetizamos entonces que la internalización de ARQ por células J774A1 estaría mediada por RS, receptores de un amplio espectro de materia particulada polianionica. Además, se ha reportado previamente sobre la afinidad de RS-AI/II con elementos con carga superficial negativa (Canton et al., 2013). El potencial ζ negativo de los ARQ, en el orden de -40 mV en buffer Tris, indica que éstos tienen en la superficie cargas negativas expuestas, que podrían ser las responsables de la unión ARQ-RS-AI/II. En las células J774A.1, los ensayos de competición de captura de ARQ mostraron que únicamente hubo inhibición de captura cuando luego de incubados con el ácido poly-I, un ligando conocido de RS de clase A (RS-AI/II). Concluimos además que los ARQ serían endocitados por mecanismos diferentes a los liposomas de SPC y fosfatidilserina, debido a que estos últimos no funcionaron como inhibidores.

El receptor RS-AI/II, también conocido como CD204, es una proteína de membrana de Tipo II que comprende un corto dominio citoplasmático seguido de una sola región transmembrana y un gran dominio extracelular que media el reconocimiento del ligando. SR-AI/II puede internalizar ligandos mediante EMC y endocitosis mediada por caveolina (Zhu et al., 2011), así como por fagocitosis (Peiser, Gough, Kodama, & Gordon, 2000; Thomas et al., 2000). Una de sus funciones es el aclaramiento de células apoptóticas, por lo que se expresa principalmente en macrófagos con un fenotipo M2, con un perfil anti-inflamatorio. También participa en el aclaramiento de moléculas modificadas como LDLox, en la remoción de bacterias y en adhesión celular (Platt & Gordon, 2001). Se expresa principalmente en macrófagos, aunque también se lo ha identificado en células epiteliales, endoteliales y células dendríticas (Canton et al., 2013; Harshyne, Zimmer, Watkins, & Barratt-Boyes, 2003). Previamente se ha utilizado la incorporación de ligandos de RS para realizar *targeting* activo de liposomas a macrófagos, pero estos diseños incluyen la incorporación de lípidos purificados como fosfatidilserina (Tempone et al., 2004) o la unión química de ligandos de RS a fosfolípidos (Etzerodt et al., 2012; Rensen et al., 2006). La ventaja de los ARQ con respecto a estas formulaciones es que los LPT funcionan como ligandos naturales de estos receptores sin la necesidad de realizar síntesis química o utilizar lípidos caros.

La eventual citotoxicidad de ARQ se relevó sobre estas mismas células J774A.1 dada su extensa capacidad de captura. Para profundizar el estudio de los mecanismos que mediarían la citotoxicidad de ARQ, se realizaron una serie de ensayos para diferenciar entre muerte por apoptosis o necrosis. Como control de muerte por apoptosis, empleamos células tratadas con luz UVC y como control de necrosis, células tratadas con H_2O_2 2,5 mM. Los resultados mostraron que para ARQ a 50 µg/mL hasta 3 horas, no se halló ningún cambio respecto de las células control. A las 24 horas de incubación no disminuyó el metabolismo celular (Fig. 9a), ni se registró lisis celular por LDH (Fig. 9b); la membrana de algunas células se volvió permeable a YO-PRO, pero no a IP (Fig. 10b), algunas células mostraron su ADN más condensado (Fig. 11), pero no hubo fragmentación (Fig. 13), tampoco cambios en la expresión de proteínas (Fig. 16). Analizando estos resultados de manera global podemos concluir que los ARQ a 50 µg/mL a 24h inducen apoptosis en algunas células, pero en líneas generales no generaron citotoxicidad significativa. A su vez como las células que mueren lo hacen por apoptosis no habría riesgos de desencadenar una respuesta inflamatoria.

Por otra parte para ARQ a 500 µg/mL a las 24 horas de incubación el metabolismo celular disminuyó un 30% (Fig. 9a). Esto es coincidente con resultados previos obtenidos por (Gonzalez et al., 2009) con una disminución de viabilidad del 25 % en células J774A.1 bajo las mismas condiciones experimentales. Además con 500 µg/mL aumentó un 30 % la lisis celular medida por LDH (Fig. 9b), las células fueron permeables a YO-PRO e IP (Fig. 10b), no se observó condensación del ADN (Fig. 12f) pero hubo fragmentación significativa (Fig. 13) y además al determinar el ciclo celular se registró un aumento de un 7% en la población de células subG_0/G_1 (Fig. 15). Dentro de la población de células con ADN fragmentado se observó un aumento en la población de células con mayor complejidad interna (Fig. 14). Este conjunto de parámetros podría indicar que los ARQ a 500 µg/mL y 24 horas de incubación generan una citotoxicidad significativa y que las células podrían estar muriendo por un proceso de apoptosis o por necrosis. Los indicios de muerte por apoptosis los aporta la fragmentación de ADN y el aumento en la complejidad de parte de las células con ADN fragmentado así como la falta de disminución drástica del

tamaño, característica de necrosis. Sin embargo que las células tengan su membrana lisada, como se puede ver por la entrada de IP o por la presencia de LDH extracelular podría ser un indicio de que algunas células mueren por necrosis. Por otra parte, es importante destacar que la necrosis como proceso de MCA es rápido y en este caso solo se observó a tiempos largos de incubación ya que a las 3 horas no hubo lisis, ni por IP ni por LDH. Por otra parte, luego de que las células pasan una primer fase de apoptosis temprana, si no son reconocidas y endocitadas, entran en un proceso similar a la necrosis (necrosis secundaria) en donde parte de su membrana se lisa y liberan parte de su contenido citoplasmático al medio extracelular (Berghe et al., 2013). A diferencia de estos, los L luego de 14 horas de incubación con 500 µg/mL, tuvieron una permeabilidad selectiva a YO-PRO, indicio de apoptosis temprana, mientras que luego de 24 horas la membrana celular comenzó a ser permeable a IP, hecho que podría indicar una necrosis secundaria. Sin embargo estos fueron los únicos indicios de citotoxicidad, ya que no se encontraron otros marcadores como fragmentación del ADN o lisis celular por liberación de LDH. Con respecto a la lisis celular es importante tener en cuenta que IP es una molécula chica de 668 Da, mientras que la enzima LDH es una proteína multimérica con una masa de 140 kDA. Estas diferencias de tamaño podrían indicar diferencias de permeabilidad, ya que la lisis de la membrana debe ser más extensa para permitir la salida de macromoléculas grandes como las enzimas. Teniendo en cuenta esto, sería razonable observar lisis celular por IP, pero no por LDH en casos de menor grado de ruptura de la membrana.

Con la formulación de ARQ a 500 µg/mL también se observó un aumento significativo de la proteína quinasa pERK en comparación con las células control. Dependiendo de la duración, la magnitud y su localización subcelular, la activación ERK controla diversas respuestas celulares, como proliferación, migración, diferenciación y muerte. Muchos estudios relacionan el potencial oncogénico de su activación constitutiva debido a la inducción de supervivencia celular (Junttila, Li, & Westermarck, 2008; Zhou, Islam, & Pestka, 2005). Paradójicamente, un número creciente de estudios también sugieren que en ciertas condiciones, la activación ERK puede promover la muerte celular por apoptosis.(Cagnol & Chambard, 2010; Tang et al., 2002). Esto parece suceder

con diversos estímulos que dañan el ADN, como radiación UV, que aumentan los niveles de pERK; incluso el nivel de activación de pERK sería proporcional al daño generado en el ADN (Fisher et al., 1998; Kauppinen et al., 2006). En este caso con ARQ se registró un aumento en la cantidad de pERK, en concordancia con un aumento en el ADN fragmentado, lo que podría ser otro indicio de muerte celular regulada.

Previamente se han realizado ensayos para estudiar la inducción de apoptosis por liposomas con diferente carga superficial. A concentraciones altas de lípidos (~400 µg/mL) para liposomas neutros preparados a partir de fosfatidilcolina o liposomas aniónicos no se determinó apoptosis tardía por fragmentación de ADN con el ensayo del TUNEL, o al determinar el patrón de tamaños de fragmentos de ADN por gel de agarosa; mientras que si se observó fragmentación con liposomas catiónicos (Aramaki, Takano, & Tsuchiya, 1999). Estos últimos inducirían apoptosis mediante la activación de caspasa-8, mediada por p38 (una MAPK) pero no por ERK1/2, luego de 3 horas de incubación en macrófagos RAW264.7 (Iwaoka, Nakamura, Takano, Tsuchiya, & Aramaki, 2006).

Podemos concluir que es complejo el análisis global y con los datos recolectados no se puede asegurar por qué mecanismos mueren las células con concentraciones altas de ARQ. Para esto serían necesarios más ensayos que nos permitieran identificar ciertas proteínas relevantes que participan en apoptosis y necrosis, para diferenciar apoptosis seguida de necrosis, de necrosis clásica. En esta línea la NCCD recomienda medir el estado funcional o la localización subcelular de proteínas relevantes como caspasas, RIPK1, RIPK3, PARP-1 ya que pueden proporcionar información sobre los mecanismos que acompañan (y regulan la cinética de) muerte celular (L Galluzzi et al., 2015). En resumen, en este Capítulo se pudo determinar que los ARQ son reconocidos y endocitados, principalmente mediante RS-AI/II, un mecanismo diferente al de liposomas convencionales. Al comparar ARQ con L o Ls, observamos un aumento en los niveles de citotoxicidad generados por los ARQ. Esto inferimos está estrechamente relacionado con la tasa de captura intracelular que tiene cada una de las nanovesículas. También pudimos determinar que hasta con concentraciones de 50 µg/mL ARQ no se afecta la viabilidad de la línea celular

que los captura más ávidamente. Esto último nos da un indicio de que la citotoxicidad sobre líneas celulares que tengan menor capacidad de captura celular será menor. Es importante señalar que, si bien es útil expresar la citotoxicidad en términos de concentración, esto no tiene una correlación directa la exposición que se producirá *in vivo*. Las NP tienen una tendencia a difundir y aglomerarse en los medios de cultivo. Entonces si se tiene en cuenta la sedimentación gravitacional sería de mayor utilidad presentar los resultados en términos de masa de nanovesículas/ célula o masa por unidad de área (Kong et al., 2011). En particular para predecir la toxicidad a nivel pulmonar es útil utilizar como parámetro la masa por unidad de área (Braakhuis et al., 2016). En ese caso los ARQ se podrían utilizar hasta una cantidad de 15,6 µg/cm^2 con una densidad de células de 125.000/cm^2. Estos resultados brindan información necearía para el diseño racional de futuras terapias que incluyan a los ARQ como sistema de transporte de principios activos.

2.6 Referencias

Aramaki, Yukihiko, Takano, Shuhei, & Tsuchiya, Seishi. (1999). Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes. *FEBS letters, 460*(3), 472-476.

Bareford, Lisa M, & Swaan, Peter W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews, 59*(8), 748-758.

Berghe, Tom Vanden, Grootjans, Sasker, Goossens, Vera, Dondelinger, Yves, Krysko, Dmitri V, Takahashi, Nozomi, & Vandenabeele, Peter. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods, 61*(2), 117-129.

Berghe, Tom Vanden, Linkermann, Andreas, Jouan-Lanhouet, Sandrine, Walczak, Henning, & Vandenabeele, Peter. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology, 15*(2), 135.

Boffa, Daniel J, Waka, John, Thomas, Dolca, Suh, Sungwook, Curran, Kevin, Sharma, Vijay K, . . . Suthanthiran, Manikkam. (2005). Measurement of Apoptosis of Intact Human Islets by Confocal Optical Sectioning and Stereologic Analysis of YO-PRO-1–Stained Islets. *Transplantation, 79*(7), 842-845.

Böttcher, CJF, & Pries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta, 24*, 203-204.

Braakhuis, Hedwig M, Giannakou, Christina, Peijnenburg, Willie JGM, Vermeulen, Jolanda, van Loveren, Henk, & Park, Margriet VDZ. (2016). Simple in vitro models can predict pulmonary toxicity of silver nanoparticles. *Nanotoxicology, 10*(6), 770-779.

Cagnol, Sebastien, & Chambard, Jean-Claude. (2010). ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death–apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS journal, 277*(1), 2-21.

Canton, Johnathan, Neculai, Dante, & Grinstein, Sergio. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology, 13*(9), 621.

Corbo, Claudia, Molinaro, Roberto, Parodi, Alessandro, Toledano Furman, Naama E, Salvatore, Francesco, & Tasciotti, Ennio. (2016). The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine, 11*(1), 81-100.

Crowley, Lisa C, Chojnowski, Grace, & Waterhouse, Nigel J. (2016). Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols, 2016*(10), pdb. prot087247.

Champion, Julie A, Katare, Yogesh K, & Mitragotri, Samir. (2007). Making polymeric micro-and nanoparticles of complex shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 104*(29), 11901-11904.

Darzynkiewicz, Zbigniew, Galkowski, Dariusz, & Zhao, Hong. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods, 44*(3), 250-254.

Darzynkiewicz, Zbigniew, Juan, Gloria, Li, Xun, Gorczyca, Wojciech, Murakami, Tomoyuki, & Traganos, Frank. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry, 27*(1), 1-20.

Davidovich, Pavel, Kearney, Conor J, & Martin, Seamus J. (2014). Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biological chemistry, 395*(10), 1163-1171.

Dhawan, Alok, & Sharma, Vyom. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and bioanalytical chemistry, 398*(2), 589-605.

Elmore, Susan. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology, 35*(4), 495-516.

Etzerodt, Anders, Maniecki, Maciej Bogdan, Graversen, Jonas Heilskov, Møller, Holger Jon, Torchilin, Vladimir P, & Moestrup, Søren Kragh. (2012). Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *Journal of controlled release, 160*(1), 72-80.

Fisher, Gary J, Talwar, Harvinder S, Lin, Jiayuh, Lin, Pinpin, McPhillips, Fiona, Wang, ZengQuan, . . . Voorhees, John J. (1998). Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *The Journal of clinical investigation, 101*(6), 1432-1440.

Flannagan, Ronald S, Jaumouillé, Valentin, & Grinstein, Sergio. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 7*, 61-98.

Galluzzi, L, Bravo-San Pedro, JM, Vitale, I, Aaronson, SA, Abrams, JM, Adam, D, . . . Annicchiarico-Petruzzelli, M. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation, 22*(1), 58.

Galluzzi, Lorenzo, Vitale, I, Abrams, JM, Alnemri, ES, Baehrecke, EH, Blagosklonny, MV, . . . Fulda, S. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation, 19*(1), 107.

Gonzalez, Raul O, Higa, Leticia H, Cutrullis, Romina A, Bilen, Marcos, Morelli, Irma, Roncaglia, Diana I, . . . Romero, Eder L. (2009). Archaeosomes made of Halorubrum tebenquichense total polar lipids: a new source of adjuvancy. *BMC biotechnology, 9*(1), 71.

Guo, Zong Sheng, Liu, Zuqiang, & Bartlett, David L. (2014). Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity. *Frontiers in oncology, 4*, 74.

Harshyne, Larry A, Zimmer, Michael I, Watkins, Simon C, & Barratt-Boyes, Simon M. (2003). A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *The Journal of Immunology, 170*(5), 2302-2309.

Heatwole, Virginia M. (1999). TUNEL assay for apoptotic cells *Immunocytochemical Methods and Protocols* (pp. 141-148): Springer.

Heit, Bryan, Kim, Hani, Cosío, Gabriela, Castaño, Diana, Collins, Richard, Lowell, Clifford A, . . . Grinstein, Sergio. (2013). Multimolecular signaling complexes enable Syk-mediated signaling of CD36 internalization. *Developmental cell, 24*(4), 372-383.

Henry, Conor M, Hollville, Emilie, & Martin, Seamus J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods, 61*(2), 90-97.

Hers, Ingeborg, Vincent, Emma E, & Tavaré, Jeremy M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling, 23*(10), 1515-1527.

Higa, Leticia H, Arnal, Laura, Vermeulen, Mónica, Perez, Ana Paula, Schilrreff, Priscila, Mundiña-Weilenmann, Cecilia, . . . Romero, Eder Lilia. (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with Leishmania braziliensis antigens. *PloS one, 11*(3), e0150185.

Higa, Leticia H, Schilrreff, Priscila, Perez, Ana Paula, Iriarte, Maiara A, Roncaglia, Diana I, Morilla, Maria Jose, & Romero, Eder L. (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8*(8), 1319-1328.

Hillegass, Jedd M, Shukla, Arti, Lathrop, Sherrill A, MacPherson, Maximilian B, Fukagawa, Naomi K, & Mossman, Brooke T. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2*(3), 219-231.

Iwaoka, Sayaka, Nakamura, Tomoko, Takano, Shuhei, Tsuchiya, Seishi, & Aramaki, Yukihiko. (2006). Cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase–caspase-8–Bid pathway in macrophage-like RAW264. 7 cells. *Journal of leukocyte biology, 79*(1), 184-191.

Junttila, Melissa R, Li, Song-Ping, & Westermarck, Jukka. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal, 22*(4), 954-965.

Kates, M, & Kushwaha, SC. (1995). Isoprenoids and polar lipids of extreme halophiles. *Archaea, a laboratory manual. Halophiles. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*, 35-54.

Kauppinen, Tiina M, Chan, Wai Y, Suh, Sang Won, Wiggins, Amanda K, Huang, Eric J, & Swanson, Raymond A. (2006). Direct phosphorylation and regulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 103*(18), 7136-7141.

Kawasaki, Yuki, Nakagawa, Akihisa, Nagaosa, Kaz, Shiratsuchi, Akiko, & Nakanishi, Yoshinobu. (2002). Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular sertoli cells. *Journal of Biological Chemistry, 277*(30), 27559-27566.

Kong, Bokyung, Seog, Ji Hyun, Graham, Lauren M, & Lee, Sang Bok. (2011). Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine, 6*(5), 929-941.

Kou, Longfa, Sun, Jin, Zhai, Yinglei, & He, Zhonggui. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 8*(1), 1-10.

Kulms, D, & Schwarz, T. (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine, 16*(5), 195-201.

Martinez-Pomares, Luisa. (2012). The mannose receptor. *Journal of leukocyte biology, 92*(6), 1177-1186.

Peiser, Leanne, de Winther, Menno PJ, Makepeace, Katherine, Hollinshead, Michael, Coull, Philip, Plested, Joyce, . . . Gordon, Siamon. (2002). The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for Neisseria meningitidis which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infection and immunity, 70*(10), 5346-5354.

Peiser, Leanne, Gough, Peter J, Kodama, Tatsuhiko, & Gordon, Siamon. (2000). Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infection and immunity, 68*(4), 1953-1963.

Perez, Ana Paula, Casasco, Agustina, Schilrreff, Priscila, Tesoriero, Maria Victoria Defain, Duempelmann, Luc, Altube, Maria Julia, . . . Romero, Eder L. (2014). Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes. *International journal of nanomedicine, 9*, 3335.

Platt, Nick, & Gordon, Siamon. (2001). Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional?—The mouse's tale. *The Journal of clinical investigation, 108*(5), 649-654.

Rensen, Patrick CN, Gras, JC, Lindfors, Eva K, van Dijk, Ko Willems, Jukema, J Wouter, van Berkel, Theo JC, & Biessen, Erik AL. (2006). Selective targeting of liposomes to macrophages using a ligand with high affinity for the macrophage scavenger receptor class A. *Current drug discovery technologies, 3*(2), 135-144.

Roskoski Jr, Robert. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research, 66*(2), 105-143.

Sahay, Gaurav, Alakhova, Daria Y, & Kabanov, Alexander V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release, 145*(3), 182-195.

Sanz, Ana B, Sanchez-Niño, Maria D, Izquierdo, Maria C, Gonzalez-Espinoza, Liliana, Ucero, Alvaro C, Poveda, Jonay, . . . Egido, Jesus. (2014). Macrophages and recently identified forms of cell death. *International reviews of immunology, 33*(1), 9-22.

Smith, P K, Krohn, R I, Hermanson, G T, Mallia, A K, Gartner, F H, Provenzano, M Dea, . . . Klenk, D C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry, 150*(1), 76-85.

Tait, Stephen WG, Ichim, Gabriel, & Green, Douglas R. (2014). Die another way–non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci, 127*(10), 2135-2144.

Tang, Damu, Wu, Dongcheng, Hirao, Atsushi, Lahti, Jill M, Liu, Lieqi, Mazza, Brie, . . . Ingram, Alistair J. (2002). ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *Journal of Biological Chemistry, 277*(15), 12710-12717.

Tempone, André Gustavo, Perez, Daniel, Rath, Susanne, Vilarinho, André Luis, Mortara, Renato A, & de Andrade Jr, Heitor Franco. (2004). Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54*(1), 60-68.

Tesoreiro, María Victoria Defain. (2014). *Nanoadyuvantes para ruta mucosa a partir de fuentes sustentables de lípidos.* (Doctor), Universidad National de Qualms, Bernal.

Thomas, Christian A, Li, Yongmei, Kodama, Tatsuhiko, Suzuki, Hiroshi, Silverstein, Samuel C, & El Khoury, Joseph. (2000). Protection from lethal Gram-positive infection by macrophage scavenger receptor–dependent phagocytosis. *Journal of Experimental Medicine, 191*(1), 147-156.

Todt, Jill C, Hu, Bin, & Curtis, Jeffrey L. (2008). The scavenger receptor SR-AI/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase Mertk during apoptotic cell uptake by murine macrophages. *Journal of leukocyte biology, 84*(2), 510-518.

van Meerloo, Johan, Kaspers, Gertjan JL, & Cloos, Jacqueline. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay *Cancer cell culture* (pp. 237-245): Springer.

Wagner, Swen, Lynch, Nicholas J, Walter, Wolfgang, Schwaeble, Wilhelm J, & Loos, Michael. (2003). Differential expression of the murine mannose-binding lectins A

and C in lymphoid and nonlymphoid organs and tissues. *The Journal of Immunology, 170*(3), 1462-1465.

Wallen, C Anne, Higashikubo, R, & Dethlefsen, LA. (1984). Murine mammary tumour cells in vitro. I. The development of a quiescent state. *Cell Proliferation, 17*(1), 65-77.

Wang, Hongyun, Wu, Linxi, & Reinhard, Björn M. (2012). Scavenger receptor mediated endocytosis of silver nanoparticles into J774A. 1 macrophages is heterogeneous. *Acs Nano, 6*(8), 7122-7132.

Wlodkowic, Donald, Telford, William, Skommer, Joanna, & Darzynkiewicz, Zbigniew. (2011). Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death *Methods in cell biology* (Vol. 103, pp. 55-98): Elsevier.

Yameen, Basit, Choi, Won Il, Vilos, Cristian, Swami, Archana, Shi, Jinjun, & Farokhzad, Omid C. (2014). Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release, 190*, 485-499.

Zani, Izma Abdul, Stephen, Sam L, Mughal, Nadeem A, Russell, David, Homer-Vanniasinkam, Shervanthi, Wheatcroft, Stephen B, & Ponnambalam, Sreenivasan. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells, 4*(2), 178-201.

Zhang, Sulin, Gao, Huajian, & Bao, Gang. (2015). Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS nano, 9*(9), 8655-8671.

Zhou, Hui-Ren, Islam, Zahidul, & Pestka, James J. (2005). Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. *Toxicological Sciences, 87*(1), 113-122.

Zhu, Xu-Dong, Zhuang, Yan, Ben, Jing-Jing, Qian, Ling-Ling, Huang, Han-Peng, Bai, Hui, . . . Chen, Qi. (2011). Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *Journal of Biological Chemistry, 286*(10), 8231-8239.

CAPITULO 3

3. Nanovesículas pH sensibles nebulizables

A partir de los datos exparimentales obtenidos en este Capítulo se ha publicado el trabajo:

"*Surviving nebulization-induced stress: dexamethasone in pH-sensitive archaeosomes*" **María Julia Altube**, Solange Mailen Selzer, Marcelo Alexandre de Farias, Rodrigo Villares Portugal, María Jose Morilla, Eder Lilia Romero. Nanomedicine, Future Medicine Group. Junio 2016. doi: 10.2217/nnm-2016-0165. IF: 4,727 (2016).

A partir de este Capítulo se realizaron las siguientes comunicaciones científicas:

"*Dexamethasone in pH sensitive archaeosomes: design and characterization*"**.** **Altube MJ**; Selzer SM; Morilla MJ; Romero EL. 3rd International Conference on Nanotechnology in Nanomedicine, Manchester Conference Centre, UK. 23 de Noviembre de 2015. Póster.

"Diseño y caracterización de Arqueosomas pH sensibles con dexametasona fosfato". **Altube MJ**; Selzer SM; Morilla MJ; Romero EL. Segundas Jornadas de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. 13 de Octubre 2015. Presentación oral.

3.1 Objetivo

El objetivo de este Capítulo fue el diseño y desarrollo de nanovesículas para el *delivery* inhalatorio de un corticoesteroide modelo, al citoplasma de células de pulmón, implicadas en el establecimiento de procesos inflamatorios.

3.2 Introducción

3.2.1 Asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias en la que células del sistema inmune innato y adaptativo actúan junto con células epiteliales para causar sobreproducción de moco, remodelación y el estrechamiento de las vías respiratorias e hiperreactividad bronquial [(HRB), tendencia de las células del músculo liso a reaccionar a estímulos como el aire frío y el ejercicio]. En personas susceptibles, esto conduce a períodos repetidos de dificultad para respirar, sibilancias y opresión en el pecho (Holgate et al., 2015). El asma ha aumentado su incidencia con los años, en la actualidad es la enfermedad pulmonar más común y la enfermedad crónica con mayor prevalencia en niños. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en la actualidad hay 235 millones de pacientes con asma. El asma está presente en todos los países, independientemente de su grado de desarrollo, sin embargo más del 80 % de las muertes por asma tienen lugar en países de ingresos bajos y medios-bajos (OMS, 2018).

Hay varios fenotipos de asma, que se pueden dividir en dos grandes grupos, como asma alérgica y no alérgica. Más del 80% de los niños y el 50% adultos tienen asma alérgica; generalmente es causada por alérgenos, contaminantes del aire y factores genéticos. Este tipo de asma se caracteriza por la infiltración de eosinófilos en los pulmones. En el asma no alérgica no hay evidencia de IgE específica y generalmente es causada por infección por virus, drogas, irritantes químicos o tabaquismo, se desarrolla en la vida adulta, con mayor incidencia en mujeres, y se caracteriza por la infiltración de neutrófilos en los pulmones. A su vez una pequeña porción de pacientes con asma sufre de asma grave, que incluye características del asma alérgica y no alérgica (Lambrecht & Hammad, 2015). Si bien cada fenotipo tiene características diferentes, todos generan HRB. Los eventos que subyacen a la HRB tienen que ver con la remodelación de las vías aéreas. En el asma, la pared de la vía aérea se engrosa de manera proporcional a la gravedad y duración de la enfermedad. La remodelación implica

un aumento del músculo liso de las vías respiratorias, engrosamiento de la lámina reticular por fibrosis subepitelial (depósito aumentado de colágeno I, colágeno III y colágeno V, así como fibronectina) angiogénesis, y metaplasia de la mucosa epitelial, un proceso que implica la aparición de células mucosas en nuevas áreas de las vías respiratorias y que generan un aumento de la producción de moco que forma tapones que pueden extenderse a las vías respiratorias pequeñas y que dificultan el intercambio gaseoso (Holgate et al., 2015).

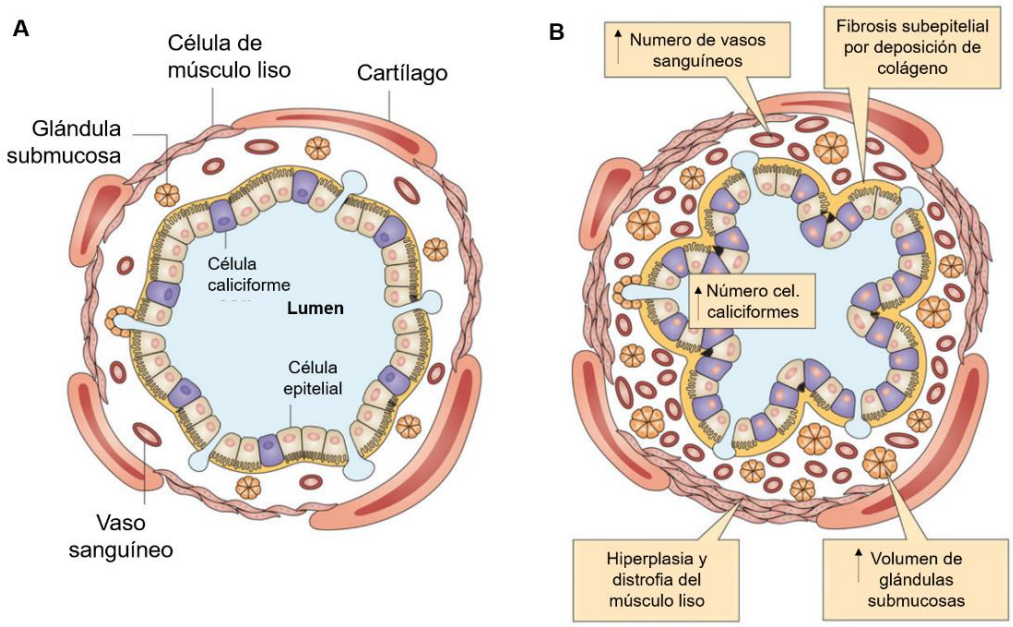


Figura 1. Esquema de la patología del asma, a) vías aéreas normales, b) vías aéreas asmáticas. Modificado de (Fahy, 2015).

El paradigma de respuesta inmune tipo 1 y tipo 2 describe respuestas inmunitarias distintas que están reguladas principalmente por subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$ conocidos como T *helper* 1 (T_H1) y células T_H2, respectivamente. Las células T_H1 secretan interleucina-2 (IL-2), interferón-γ (IFNγ) y linfotoxina-α, y estimulan la inmunidad de tipo 1, que se caracteriza por una actividad fagocítica prominente. El asma alérgica está mediada por respuestas inmunitarias de tipo 2, en donde linfocitos T_H2 secretan principalmente las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 que estimulan la inmunidad de

tipo 2 (Fahy, 2015). Esta se caracteriza por títulos altos de anticuerpos IgE y un gran número de eosinofilos que liberan peroxidasas y neurotoxinas y mastocitos unidos a IgE que liberan histamina y leucotrienos y juntos generan la HRB (Holgate et al., 2015). En el asma no alérgica contribuyen otras células del sistema inmune en donde predominan los neutrófilos y la ausencia de citoquinas T_H2 (Kim, DeKruyff, & Umetsu, 2010). Esta se da en particular, en las personas con formas tardías y más graves de asma en donde la obstrucción de las vías respiratorias es menos reversible y predominan las citoquinas T_H1 y T_H17 (Lambrecht & Hammad, 2015).

Otras células importantes de la respuesta inmune innata en el pulmón y que están involucrados en el inicio y la resolución de la inflamación pulmonar durante las respuestas inmunitarias alérgicas son los macrófagos (Boorsma, Draijer, & Melgert, 2013; Hussell & Bell, 2014; Jiang & Zhu, 2016). Los macrófagos pulmonares son una población heterogénea de fagocitos mononucleares, como se describió en el **Capítulo 1, Sección 7**. Los MA se activan de diferentes maneras en el asma severa dependiendo del perfil de citoquinas del entorno. A través de estas diferentes formas de activación, los macrófagos M1 parecen estar involucrados en la exacerbación de la respuesta inflamatoria, mediante la producción de iNOS, IL-1β y TNF-α (Hussell & Bell, 2014). Mientras que los macrófagos M2 [que expresan arginasa1, moléculas de tipo quitinasa y la molécula de tipo resistina-α (FIZZ1)] pueden inhibir la producción de citoquinas T_H2 alérgicas (Kim et al., 2010) y participar en la reparación del pulmón dañado. Sin embargo, la persistencia de las células M2 y la producción excesiva de factores pro-fibróticos parecen contribuir a la remodelación crónica de las vías respiratorias que caracteriza al asma severa (Pappas, Papaioannou, Kostikas, & Tzanakis, 2013). Finalmente, un tercer tipo de macrófagos, los macrófagos tipo M2 (Boorsma et al., 2013), parecen tener un papel regulador al liberar IL-10, una citoquina anti-inflamatoria (Boorsma et al., 2013).

El tratamiento de primera línea para el asma persistente es una combinación de corticosteroide inhalado (CI) en dosis bajas, que actúa para suprimir la inflamación, y un agonista β2-adrenérgico que actúa como broncodilatador (Ricciardolo, Blasi, Centanni, & Rogliani, 2015). Sin embargo, aproximadamente

el 10% de los pacientes necesitan una dosis máxima de CI y cerca del 1% necesita un tratamiento regular de corticosteroides oral (Howarth et al., 1995).

3.2.2 Corticoesteroides

Los corticoesteroides sintéticos son los agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores más usados y son la única terapia que suprime la inflamación en las vías respiratorias asmáticas. A nivel celular, los corticosteroides reducen el número de células inflamatorias en las vías respiratorias, incluidas eosinófilos, linfocitos T, mastocitos y células dendríticas (Barnes & Adcock, 2003). Su mecanismo de acción a nivel molecular depende de su difusión a través de la membrana celular y unión a los receptores de glucocorticoides en el citoplasma celular. Tras la unión del ligando, los receptores de glucocorticoides se activan y translocan rápidamente al núcleo. Allí activan o apagan la transcripción de distintos genes a través de la interacción con histonas acetiltransferasas (Barnes & Adcock, 2009). La principal acción es desactivar múltiples genes inflamatorios que codifican citoquinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17,IL-18, TNF-α, GM-CSF) y quimioquinas (IL-8, RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxina) , moléculas de adhesión (ICAM1, E-selectina), enzimas inflamatorias (fosfolipasa A_2 citosolica, iNOS) y receptores. Normalmente estos genes se activan en las vías respiratorias mediante factores de transcripción pro-inflamatorios, como el factor nuclear NFκB y proteína activadora 1 (Barnes & Adcock, 2003).

Cuando los corticoesteroides se administran a nivel sistémico generan una variedad de efectos adversos, metabólicos (diabetes mellitus, aumento de peso, lipodistrofia) y cardiovasculares (hipertensión y eventos cardiovasculares) que pueden ser potencialmente mortales (Fardet & Fève, 2014). Los CI en dosis bajas tienen menos posibilidades de ingresar a la sangre, lo que los hace más seguros y con menos efectos secundarios que los corticosteroides sistémicos (Stanbury & Graham, 1998). La absorción sistémica de CI se minimiza debido a su baja biodisponibilidad oral y a la baja absorción de la dosis depositada en las vías respiratorias más profundas. Por otra parte, los CI tienen que exhibir una biodisponibilidad pulmonar alta y un tiempo largo de retención pulmonar. Por

estas razones, el efecto ejercido por un CI depende de su química, y su eficacia está influenciada por su deposición en las vías respiratorias, un hecho que se rige por el tipo de dispositivo de administración (Ricciardolo et al., 2015). A su vez, cuando los CI se utilizan a dosis altas y por periodos de tiempo prolongados generan efectos adversos sistémicos (cataratas, osteoporosis, supresión de glándula adrenal) y locales (afonía, candidiasis). Por lo que a pesar de las ventajas significativas asociadas con el advenimiento de CI, las terapias pueden evolucionar hacia productos más refinados.

Las NP inhaladas, por ejemplo, se proponen para maximizar el tiempo de residencia en los pulmones y proteger la estructura química de las drogas (Kuzmov & Minko, 2015). El rendimiento de una gran variedad de NP inhaladas se ha evaluado preclínicamente para la administración pulmonar de corticosteroides, antitumorales y antibióticos (Paranjpe & Müller-Goymann, 2014). Debido al volumen de conocimiento adquirido en los últimos 20 años sobre los procesos de fabricación robustos y la disponibilidad de excipientes de alta calidad, ahora las vesículas lipídicas (liposomas y nanoliposomas) se desarrollan con estabilidades químicas y físicas aceptables para respaldar una vida útil farmacéutica significativa (D Cipolla, Redelmeier, Eastman, Bruinenberg, & Gonda, 2011). Por eso, a pesar del universo de NP en estudios preclínicos, la mayoría de las micro/nano estructuras aceptadas por la industria farmacéutica son los liposomas y estructuras relacionadas (Sercombe et al., 2015).

La administración pulmonar plantea un desafío debido a la complejidad anatómica del sistema respiratorio humano. De la misma manera que CI, el rendimiento de los liposomas inhalados depende del dispositivo inhalador. Los dispositivos de inhalación más elegidos para el suministro de liposomas son los nebulizadores, ya que son los mejores para transportar grandes cantidades de soluciones acuosas a los pulmones (David Cipolla, Gonda, & Chan, 2013), como se describió en el **Capítulo 1, Sección 10**.

Los nanoliposomas inhalados a su vez pueden evolucionar hacia NP relacionadas más sofisticadas que presenten nuevas funcionalidades, compatibles con su fabricación industrial. Sería deseable, por ejemplo, contar con NP que permitan que los fármacos se administren a un sitio subcelular específico (Rajendran, Knölker, & Simons, 2010). Como es el caso de los

corticoesteroides, que se deben unir a receptores que se encuentran en el citoplasma celular. Teniendo en cuenta esto, una hipótesis valida es que el rendimiento de los corticosteroides nebulizables podría mejorar si se emplean NP diseñadas específicamente para realizar un *targeting* citoplasmático. Como los liposomas clásicos, una vez que son endocitados, permanecen atrapados dentro de vesículas endo/fagocíticas la utilización de liposomas sensibles al cambios de pH sería una alternativa para explorar en el *delivery* de corticoesteroides. Este tipo de nanoliposoma, como se detalló en el **Capítulo 1, Sección 4**, permite que la carga que transporta se escape del sistema endolisosomal y esté disponible en el citoplasma celular.

3.2.3 Arqueolípidos como ligandos de RS

Como se ha demostrado en el Capítulo 2 los ARQ se unen a RS-AI/II, por lo tanto la inclusión de arqueolípidos a una formulación de LpH puede dar lugar a que los nanoliposomas exhiban nuevas propiedades farmacodinámicas que dependerán de su unión a RS en la superficie de los distintos tipos celulares. A su vez, al incluir un mecanismo de *targeting* activo se incrementaría la tasa de captura endocítica respecto a la de liposomas convencionales cuya captura no está mediada por RS. Esta captura celular estaría amplificada en células que expresen en mayor medida este receptor, como macrófagos. Por otra parte, la presencia de arqueolípidos podría conferir estabilidad estructural a los LpH durante el estrés mecánico y evitar la pérdida del material encapsulado durante el proceso de nebulización, cuestión que hasta el momento unicamente se ha conseguido empleando liposomas conteniendo altas proporciones de lipidos hidrogenados y colesterol.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Materiales

El Dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) fue adquirido en Avanti Polar Lipids Alabama, USA. El P-xileno-bis-piridinio (DPX) y H2DCFDA fueron adquiridos en Invitrogen Oregon, USA. Colesteril hemisuccinato (CHEMS), sal trisódica de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS), dexametasona 21-fosfato sal disodica (DP), Sephadex® G-25 Fine, lipopolisacarido de Escherichia coli 0111:B4 (LPS), Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 2-mercaptoetanol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Missouri, USA). El medio de Eagle modificado por Dulbecco con una mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12), sulfato de penicilina-streptomicina, glutamina, piruvato de sodio, y tripsina/ácido etilenediaminatetraacetico fueron adquiridos en Gibco®, Life Technologies (New York, USA).

3.3.2 Preparación de nanovesículas

3.3.2.i Preparación de nanovesículas vacías

Se prepararon liposomas convencionales HSPC:Col 7,5:2,5 m:m (L), arqueosomas de LPT (ARQ), liposomas pH sensibles DOPE:CHEMS 7:3 m:m (LpH) y diferentes formulaciones de arqueosomas pH sensibles DOPE:CHEMS:LPT (ApH 1, 2 y 3). Para estas últimas se partió de la composición de LpH y se mezclaron diferentes proporciones lipídicas en donde DOPE se reemplazó por cantidades crecientes de LPT. La composición de cada una de estas formulaciones se muestra en la Tabla 1.

Las formulaciones se prepararon por el método de resuspensión de la película lipídica como se detalló en el **Capítulo 2 Sección 2.3.3.**

Tabla 1. Composición teórica de nanovesículas.

Formulación	Composición (m:m)				
	LPT	DOPE	CHEMS	HSPC	Colesterol
L				7,5	2,5
ARQ	10				
LpH		7	3		
ApH1	0,5	6,5	3		
ApH2	1,4	5,6	3		
ApH3	2,8	4,2	3		

3.3.2.ii Preparación de nanovesículas con marca fluorescente

Para realizar el ensayo de pH sensibilidad en buffer se prepararon nanovesículas incorporando el par fluoróforo-*quencher* HPTS-DPX en su interior acuoso según (Morilla et al., 2005). Los films lipídicos se resuspendieron en una solución stock de 35 mM HPTS y 50 mM DPX en buffer Tris pH 7,4 100 mM con NaCl 0,9 % m/v. El HPTS y DPX libre fueron eliminados por cromatografía de exclusión molecular (CEM) empleando un lecho de Sephadex G-25 con tamaño de poro fino (20 – 80 µm) en columnas de 3 mL de volumen de lecho. Se sembraron 200 µL de muestra por columna, las cuales se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm en centrifuga G144D (Gelec, Argentina). Luego se determinó el perfil de elución de los nanoliposomas y del HPTS, cuantificando en cada fracción recolectada el fluoróforo y los fosfolípidos. Para ensayos de pH sensibilidad en células, se utilizaron nanoliposomas con doble marca fluorescente, HPTS-DPX en el interior acuoso y el lípido fluorescente RhPE que se incorporó en la membrana lipídica. Para esto se mezcló RhPE con LT y luego se formaron los films lipídicos mediante la metodología antes descripta en el **Capítulo 2 Sección 2.3.4.**

3.3.2.iii Preparación de nanovesículas con DP

Se incorporó DP en el interior acuoso de las formulaciones L, LpH, ApH3 y ARQ. A tal fin, los films lipídicos se resuspendieron en buffer Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 0,9 % p/v con 20 mg/mL de DP. La droga libre se eliminó por cromatografía de exclusión molecular utilizando la metodología descripta en la **Capítulo 2 Sección 2.3.2.ii.**

3.3.3 Caracterización fisicoquímica

La cuantificación de LT, RhPE y las medidas de tamaño promedio, pdi y potencial ζ se realizaron como se describe en el **Capítulo 2 Sección 2.3.5.**

3.3.3.i Cuantificación HPTS encapsulado

El HPTS es una molécula cuya emisión de fluorescencia es altamente dependiente del pH. Por tal motivo se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de la molécula a diferentes pH utilizando como $\lambda_{excitación}$ el punto isosbéstico (413 nm), para asegurar la independencia de la IF cuando se realizaran los ensayos de liberación de HPTS con distintas condiciones de pH.

El HPTS encapsulado se cuantificó midiendo intensidad de fluorescencia a $\lambda_{emisión}$ 515 nm y $\lambda_{excitación}$ 413 nm (punto isosbéstico) en espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55. A tal fin las suspensiones de nanovesículas se diluyeron 1/175 en buffer Tris pH 7,4 con NaCl 0,9 % m/v y en buffer Tris NaCl 0,9 % m/v conteniendo Tritón X-100 1% m/v. Se calculó la cantidad de HPTS encapsulado a partir de IF tritón – IF. Se preparó una curva de calibración de HPTS-DPX en un rango de concentraciones de 0,18 - 11,8 µM de HPTS, con pendiente de 39,7 ± 9,6, ordenada al origen de 6,7 ± 1,8 y un coeficiente de correlación lineal R2 0,9962 ± 0,0016.

3.3.3.ii Cuantificación de DP y LT

Para poder cuantificar de forma diferencial los fosfolípidos y la DP mediante el método de Bötcher, se realizó una primera etapa de separación de DP de los lípidos por el método de Blight & Dyer modificado (Böttcher & Pries, 1961), obteniendo fosfolípidos y DP en soluciones separadas. En la fase clorofórmica resultante se cuantificaron los fosfolípidos, mientras que en la fase acuosa se cuantificó la DP.

3.3.4 Determinación de pH sensibilidad en buffer

La sensibilidad de liposomas a cambios de pH, medido como desestabilización de la membrana liposomal, se determinó diluyéndolos hasta una concentración de 20 µg lípidos/mL en buffer Tris a pH 7 o buffer acetato de sodio a pH 6,5; 6; 5,5; 5; 4,5 y 4, e incubando 10 minutos a 37°C en oscuridad. La liberación de HPTS del interior acuoso se midió por intensidad de fluorescencia de HPTS a $\lambda_{emisión}$ 515 nm, $\lambda_{excitación}$ 413 nm en espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55. La liberación total de HPTS se midió desestabilizando los liposomas con Tritón X-100 al 1% m/v. El porcentaje de liberación de HPTS a cada pH se calculó a partir de la Fórmula 1:

$$\% \text{ Liberación HPTS} = (IF_{pH} - IF_{pH\ 7,4}) / (IF_{tritón} - IF_{pH\ 7,4}) * 100 \quad \textbf{Fórmula 1}$$

Donde IF_{pH} es la intensidad de fluorescencia en el pH medido, $IF_{pH\ 7,4}$ es la intensidad de fluorescencia a pH 7,4 e $IF_{tritón}$ es la intensidad de fluorescencia luego de la disrupción completa de los liposomas con Tritón.

3.3.5 Cultivos Celulares

Las células J774A.1 se cultivaron como se describió en el **Capítulo 2 Sección 2.3.9**. Las células epiteliales de pulmón A549 (ATCC® CCL-185™) fueron obtenidas de la Asociación Banco Argentino de Células y los macrófagos alveolares de rata NR8383 (ATCC® CRL-2192™) fueron suministrados por la Dr. Mirjam Schuchardt, Universidad de Berlín, Alemania. Ambas se cultivaron en DMEM-F12 suplementado con 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de glutamina (DMEM-F12 Completo) con 10 y 20 % de SFB, respectivamente. La línea de monocitos humanos THP-1 (ATCC® TIB-202™), fue suministrada por la Dra. Paula Barrionuevo, Academia Nacional de Medicina, Argentina, y se cultivó en RPMI completo al 10% SFB con 0,05 mM 2-mercaptoetanol y 1,0 mM de piruvato de sodio. Para transformarlas en macrófagos adherentes, las células se sembraron en placa y se incubaron durante 72 horas con RPMI completo con 10 ng/mL PMA. Luego se cambió el medio, por medio fresco y las células se incubaron por 96 horas. Para corroborar la diferenciación celular se midió el marcador de macrófagos CD14 en la

membrana con anticuerpo anti CD14 (BD Biosciences, San Diego CA, USA), por Citometría de flujo (Park et al., 2007). Todas las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en una atmosfera con 5% de CO2 y 95% humedad. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana.

3.3.6 pH sensibilidad en cultivos celulares

Las líneas celulares J774A.1, NR8383 o A549 se sembraron a una densidad de 1,5 x 105 células/pocillo en placa de 24 pocillos y se dejaron crecer por 24 horas. Se cambió el medio de cultivo y se remplazó por medio fresco al 5% de SFB con nanovesículas marcadas con (HPTS-DPX)-RhPE a una concentración de lípidos de 0,1 mg/mL. Las formulaciones se incubaron 0,5, 1 y 3 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS, las células se levantaron con tripsina, se lavaron y resuspendieron en PBS. Se analizaron $1x10^4$ células mediante citometría de flujo. Con la señal en FL-1 se midió HPTS y con FL-3 se midió RhPE. Debido a que la relación fluoróforo/LT no fue exactamente igual para todas las formulaciones, las intensidades de fluorescencia obtenidas fueron normalizadas en función de la relación fluoróforo/LT siguiendo las Fórmulas 2 y 3.

$$\text{IF HPTS normalizada} = IF_{FL1} / (\mu g \text{ HPTS} / \text{mg LT}) \quad \textbf{Fórmula 2}$$

$$\text{IF RhPE normalizada} = IF_{FL3} / (\mu g \text{ RhPE} / \text{mg LT}) \quad \textbf{Fórmula 3}$$

Donde IF_{FL1} e IF_{FL3} es la intensidad de fluorescencia medida en cada canal.

3.3.7 Ensayos de citotoxicidad

La viabilidad celular se determinó por el método de MTT. Las células J774A.1, A549 y THP-1 se sembraron en placa de 96 pocillos, a una densidad de $4x10^4$ células/pocillo y se dejaron crecer por 24 horas. En el caso de las células THP-1 estas se diferenciaron en placa, como se describió anteriormente. Luego, en todos los casos, se cambió el medio de cultivo y se remplazó por medio fresco al 5% de SFB con las formulaciones L-DP, LpH-DP, ApH3-DP, ARQ-DP, DP y las respectivas formulaciones sin droga. Las concentraciones testeadas de DP fueron de 1,5 µg/mL, 10 µg/mL y 50 µg/mL, lo que correspondió a concentraciones de LT promedio de 7, 50 y 220 µg/mL respectivamente. Luego

de 24 horas de incubación, se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS y se agregaron 110 µL/pocillo de solución de MTT (5 mg/ml de medio con 5% de SFB) a las células adheridas a la placa. Luego de 3 horas de incubación a 37°C se retiró la solución de MTT y se agregaron 100 µL de dimetilsulfóxido para disolver los cristales de formazán. Una vez que se disolvieron completamente los cristales se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Dynex Technologies, modelo MRX tc. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje relativo a la viabilidad de las células crecidas en medio de cultivo con 5 % de SFB.

3.3.8 Inhibición de citoquinas pro-inflamatorias

Se determinó la capacidad de las formulaciones de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias producidas por células activadas con LPS o PMA. Para ello, las células J774A.1, THP-1 y A549 se sembraron a una densidad de $2x10^5$ células/pocillo en placa de 24 pocillos y se dejaron crecer por 24 horas. Las células THP-1 se diferenciaron en placa, como se describió anteriormente. Las células J774A.1 y THP-1 se activaron realizando una co-incubación con LPS, para esto el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco con 1 µg/mL de LPS conteniendo las muestras LpH-DP, ApH3-DP, LpH, ApH3 y DP, a concentraciones de DP 10 µg/mL y concentraciones de LT promedio de 50 µg/mL. Las células A549 se co-incubaron con las formulaciones de nanovesículas y 0,1 µg/mL de PMA durante 24 horas. Luego se tomaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20ºC hasta la determinación de TNF-α e IL-6 ratón y TNF-α, IL-1β e IL-6 humano mediante ELISA Sets BD OptEIATM (BD Biosciences, San Diego CA, USA). Además, se midió la liberación de citoquinas en las diferentes líneas celulares en presencia de las formulaciones pero sin activarlas.

3.3.9 Inhibición de Especies Reactivas de Oxigeno (ERO)

La capacidad de las formulaciones de inhibir la generación de ERO en células activadas con LPS se determinó utilizando la sonda Carboxy-H2DCFDA. Esta es

un forma acetilada y reducida de la fluoresceína utilizada como indicador de ERO en las células. Esta molécula no-fluorescente se convierte a su forma verde fluorescente cuando el grupo acetato es removido por las esterasas intracelulares y luego es oxidado por acción de ERO dentro de la célula. Brevemente, células J774.A1 y THP-1 se sembraron a una densidad de $2x10^5$ células/pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron por 24 horas. Las células THP-1 se diferenciaron en la placa, como se describió anteriormente. Luego el medio se reemplazó por PBS a 37ºC con 10 µM de carboxy-H2DCFDA y se dejó incubando en oscuridad por 30 minutos. El medio se remplazó por medio fresco al 5% de SFB sin rojo fenol, conteniendo las muestras DP-LpH, DP-ApH3, LpH y ApH3, a concentraciones de DP 10 µg/mL y concentraciones de LT cercanas a 50 µg/mL, en presencia o ausencia de 1 µg/mL LPS (cita Hsien-Yeh Hsu). La intensidad de fluorescencia se midió en placa luego de 24 horas de incubación con el lector de fluorescencia Cytation™ 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a λexcitación 490 nm y λemisión 520 nm.

3.3.10 Estabilidad coloidal durante almacenamiento

Las nanovesículas vacías o con DP se almacenaron a 4°C durante 6 meses. Una vez transcurrido ese tiempo se midió el tamaño y pdi como se describió previamente.

3.3.11 Estabilidad frente al proceso de nebulización

3.3.11.i Estabilidad de nanovesículas frente al proceso de nebulización

Se determinó la estabilidad estructural de las nanovesículas frente a nebulización. Para ello, en un nebulizador de malla vibradora NE-U22 (OMRON Healthcare, Japón) se colocaron 2 mL de la formulación a testear, LpH, ApH3, ARQ y L marcados con HPTS-DPX a una concentración promedio de LT de 50 µg/mL. Para realizar la nebulización, se conectó al pico del nebulizador un balón de 50 mL en donde se fue recolectando el nebulizado condensado. Se midió el tamaño promedio y se cuantificó HPTS encapsulado y LT de la suspensión de nanovesículas antes y después de la nebulización.

3.3.11.ii Estabilidad frente al proceso de nebulización luego de seis meses de almacenamiento

Se determinó la estabilidad estructural, como se describe en la **Sección 3.3.11.i**, de las muestras LpH y ApH3 marcados con HPTS-DPX luego de almacenarlas a 4°C durante seis meses. Para esto se cuantificó HPTS encapsulado y LT de la suspensión antes y después de la nebulización.

3.3.12 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una entrada, seguido del test de Dunnet utilizando el software Prisma 6.01 (Graphpad Software Corporation, San Diego, California, EEUU). Los niveles de significación se indican en las leyendas de las figuras. El valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$; n.s. no significativo ($p > 0,05$).

3.4 Resultados

Se prepararon tres nuevas formulaciones mixtas de nanovesículas a partir de una formulación convencional LpH. Esta fue modificada sustituyendo el lípido DOPE por cantidades crecientes de LPT para obtener ApH. Las nuevas formulaciones mixtas, DOPE: CHEMS: LPT, deberían combinar sensibilidad al pH (mediada por la desestabilización de DOPE a pH ácido) con una amplia tasa de captura por las células y alta resistencia fisicoquímica (por la incorporación de LPT).

3.4.1 Caracterización de nanovesículas pH sensibles

Cada una de las formulaciones se caracterizó en cuanto a su contenido de LT, tamaño, pdi y potencial ζ. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.a y Tabla 2.b. El diámetro promedio de las formulaciones mixtas osciló en torno a los 160- 200 nm. Tanto L como LpH tuvieron tamaños cercanos a los 250 nm y los ARQ fueron los más pequeños con un diámetro de 144 nm. El pdi fue en promedio de 0,2 para todas las formulaciones excepto para L la cual tuvo un pdi más alto, de 0,46. El potencial ζ de L fue el más alto siendo -5,4 mV. Luego con la incorporación de CHEMS (lípido con un grupo ácido) en las formulaciones pH sensibles el potencial ζ disminuyó a -15,5 mV. Las formulaciones con LPT disminuyeron aún más su potencial ζ siendo del orden de -40 mV, independientemente del contenido de LPT.

Tabla 2a. Características estructurales de los nanovesículas vacías.

Formulación	Diámetro promedio (nm)	pdi	Potencial ζ (mV)
L	282 ± 53	0,46 ± 0,11	-5,4 ± 1,1
LpH	214 ± 14	0,22 ± 0,07	-15,5 ± 1,7
ApH 1	168 ± 10	0,08 ± 0,03	-47,9 ± 1,5
ApH 2	156 ± 14	0,21 ± 0,02	-32,7 ± 7,5
ApH 3	213 ± 20	0,34 ± 0,14	-40,4 ± 4,6
ARQ	144 ± 9	0,34 ± 0,05	-41,3 ± 3,5

Los resultados corresponden al promedio ± DS de tres lotes de muestras

La recuperación de LT luego del proceso de preparación fue mayor para ARQ obteniendo un 87% del total. Para las formulaciones mixtas se recuperó un promedio de 66% de LT y las formulaciones sin LPT fueron las de menor porcentaje de recuperación con un 40% (Tabla 2b).

Tabla 2b. Recuperación de LT una vez finalizada la preparación

Formulación	Concentración de fosfolípidos (mg/mL)	% Recuperación*
L	4,0 ± 1,0	40
LpH	4,1 ± 0,2	41
ApH 1	5,8 ± 1,1	58
ApH 2	6,1 ± 0,2	61
ApH 3	7,9 ± 1,1	79
ARQ	8,7 ± 0,2	87

*Calculado a partir de la cantidad de LT utilizados para la preparación.

3.4.2 Cuantificación de HPTS

Los espectros de excitación y emisión del HPTS son altamente dependientes del pH, siendo su intensidad proporcional al aumento del pH (Fig. 2). Para evitar estos cambios, la excitación se realizó a una longitud de onda, correspondiente al punto isosbéstico ($\lambda_{excitación}$ 413 nm), a la cual la intensidad de fluorescencia se mantiene constante frente a cualquier cambio en el entorno de la muestra (Straubinger, Papahadjopoulos, & Hong, 1990). En tales condiciones, la intensidad de emisión de fluorescencia a 515 nm es independiente del pH como se muestra en la Fig. 2.

Para eliminar el HPTS y DPX libres (fuera del interior de las vesículas) se realizó una CEM. Las nanovesículas, debido a su masa molecular alta y radio hidrodinámico alto, eluyen principalmente en la primer fracción recolectada (volumen muerto) en donde se recupera más de un 50 % de la masa de LT. Mientras que la solución de HPTS comienza a eluir a partir de la fracción 3, en donde se recupera un 3 % de HPTS (Fig. 3). En función de estos perfiles de elución se utilizó la fracción 1, en donde se recuperó la mayor concentración de LT y no hay HPTS libre.

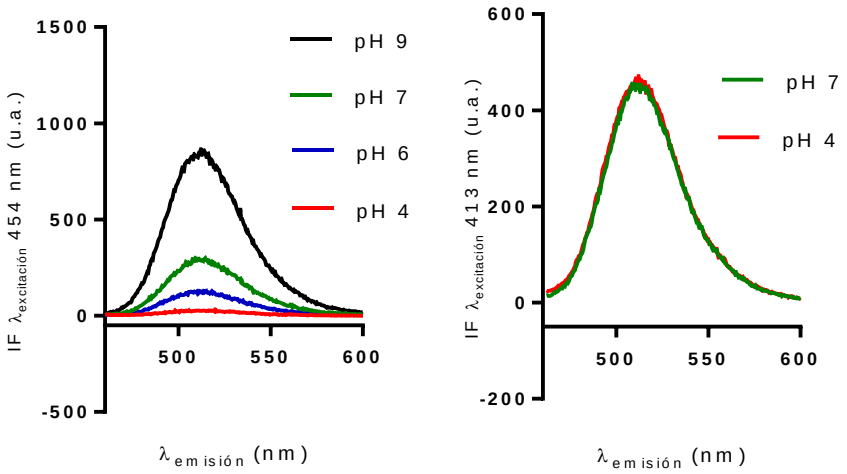


Figura 2. Espectro de fluorescencia de HPTS+DPX en buffer a diferentes pH: 9; 7; 6 y 4, con $\lambda_{excitación}$ 454 y 413 nm (punto isosbéstico).

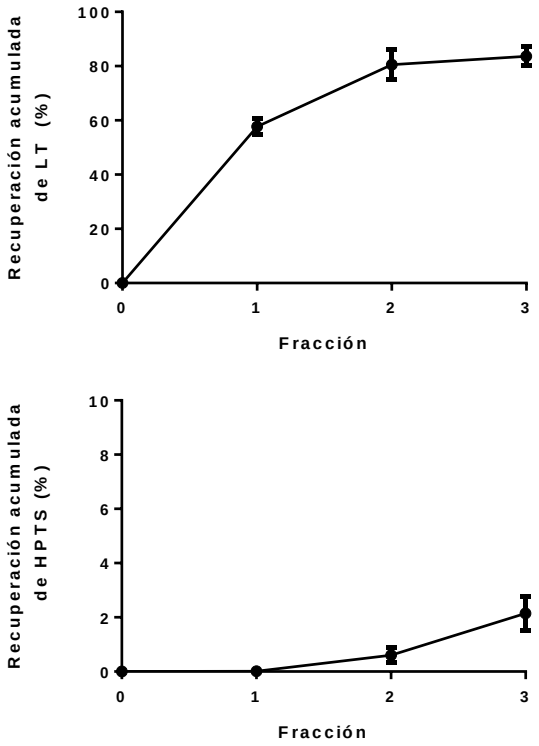


Figura 3 Perfil de elución de una solución de HPTS 34 mM y de una muestra de nanovesículas LpH. (n=2)

3.4.3 pH sensibilidad en buffer

La relación de DOPE y CHEMS en LpH es óptima para desencadenar su transición de fase lamelar a fase hexagonal invertida, lo que produce la desestabilización de la membrana a valores de pH entre 4 y 5. Al incorporar LPT se hipotetizó que la pH sensibilidad para las formulaciones mixtas podría cambiar. Entonces, como primera aproximación, se determinó la capacidad de respuesta a cambios de pH de las diferentes formulaciones en buffer. Para esto se midió la liberación del fluoróforo HPTS, en función del pH. A tal efecto, HPTS y su *quencher*, DPX, se cargaron en el interior acuoso de los nanovesículas a concentraciones de 34,4 y 50 mM respectivamente. A estas concentraciones la cercanía de las moléculas hace que la fluorescencia de HPTS sea bloqueada por DPX. Si las moléculas se diluyen y se alejan la fluorescencia aumenta como se muestra en la Fig. 4.

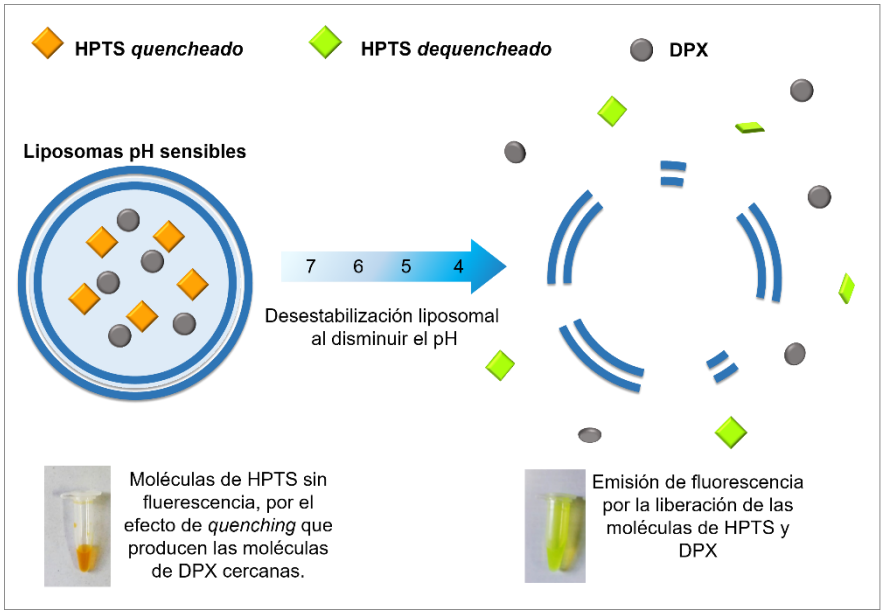


Figura 4. Desestabilización de nanovesículas pH sensibles, liberación y *dequenching* de HPTS.

La liberación de HPTS máxima y por ende la IF máxima, se observó para la formulación LpH a pH 4, la cual corresponde a una liberación de 47,4 ± 20 % del contenido acuoso liposomal. Las formulaciones ApH1 y ApH2 fueron las formulaciones mixtas con mayor IF pero muy similares entre ellas con un promedio de 26 ± 3% de liberación de HPTS. ApH3 estuvo muy por debajo con

un valor de 13,8 ± 10,3% de liberación y por último ARQ fue la formulación que presento la IF más baja a pH 4, sin liberación de HPTS (Fig. 5).

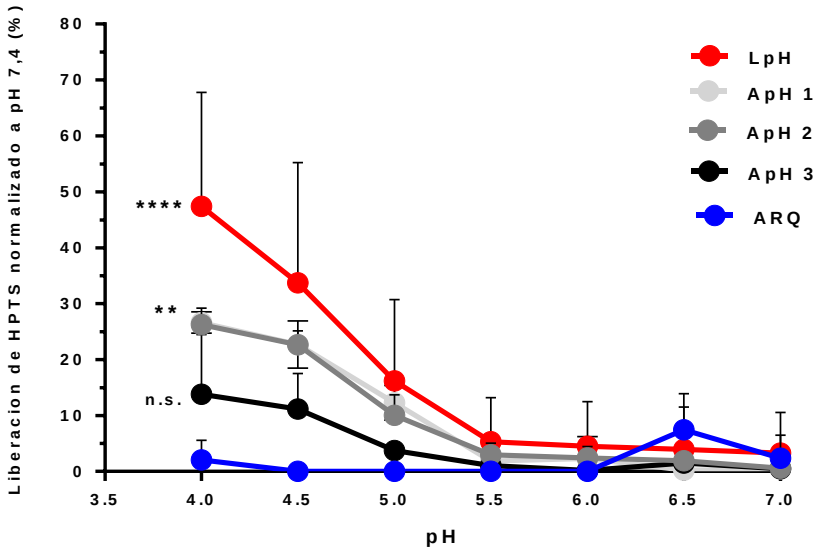


Figura 5. pH sensibilidad: liberación de HPTS de nanovesículas en función del pH. Resultados significativos con respecto a ARQ. (n=3)

3.4.4 Sensibilidad al pH en células

La evaluación de sensibilidad a cambios de pH se complementó con la determinación de pH sensibilidad subcelular en las células J774A.1, NR8383 y A549. Este ensayo permitió determinar si el grado de captura endocítica era proporcional a la cantidad de LPT de cada formulación mixta, y si la sensibilidad al pH tenía un impacto en la liberación de HPTS en las células. Con este objetivo, los nanovesículas fueron doblemente marcadas, con HPTS-DPX en el interior acuoso y con RhPE en la bicapa lipídica (que a concentraciones <1% no afecta la sensibilidad al pH, (Slepushkin et al., 1997). La IF de RhPE dentro de las células indicó el grado de la captura endocítica mientras que la IF del HPTS indicó la liberación al citoplasma del contenido acuoso de las nanovesiculas.

Como ApH1 y ApH2 mostraron una respuesta similar a la acidez en buffer (Fig. 5), en este ensayo sólo fueron probados ApH2 y ApH3. Además, se incluyó la formulación de liposomas convencionales hechos de HSPC: colesterol (L) que no es sensible al pH y es muy rígida. Para poder determinar la cantidad de marca

fluorescente de cada formulación se cuantificó la relación de HPTS y RhPE con los LT. La relación de RhPE/LT fue similar para las formulaciones pH sensibles, en promedio de 5 µg/mL; L tuvo un valor de 6,2 µg/mL y ARQ tuvo una relación de 5,2 µg/mL pero con un desvío estándar mayor siendo de ± 2 (Tabla 3). En cuanto a la relación de HPTS/LT, esta fue mayor para ApH2 y ApH3, intermedio para LpH y ARQ y el más bajo para L. Debido a la variación en la relación de fluoroforos/LT, estos valores se utilizaron para normalizar las lecturas de citometría de flujo.

Tabla 3.. Relaciones de RhPE y HPTS con LT

Muestra	RhPE/LT (µg/mg)	HPTS/LT (µg/mg)
LpH	5,4 ± 0,1	26,0 ± 10,6
ApH2	4,7 ± 0,1	51,9 ± 35,3
ApH3	4,3 ± 0,8	56,7 ± 21,4
ARQ	5,2 ± 2,0	20,3 ± 5,5
L	6,2 ± 0	8 ± 0

La liberación subcelular de HPTS fue mayor para la formulación ApH3 en los tres tipos celulares, luego de 3 horas de incubación. En las células J774A.1, la liberación de HPTS siguió la siguiente tendencia: ApH3> ApH2 = LpH> ARQ> L (Fig. 6). En NR8383 y A549, la tendencia fue similar, con la única diferencia que la IF de LpH, ApH2 y ARQ fueron similares (Fig. 6b y c). El grado de captura para los tres tipos de células cambió con la composición de los nanovesículas, y fue proporcional al contenido de LPT. La tendencia encontrada luego de 3 horas de incubación fue la siguiente: captura de ARQ (100% LPT)> ApH3> ApH2> LpH> L (Fig 6 d, e y f). Al comparar las tres líneas celulares observamos que la captura fue mayor en células J774A.1, siendo entre 10 y 12 veces más alta que en NR8383 y A549 respectivamente, a juzgar por la IF normalizada de RhPE.

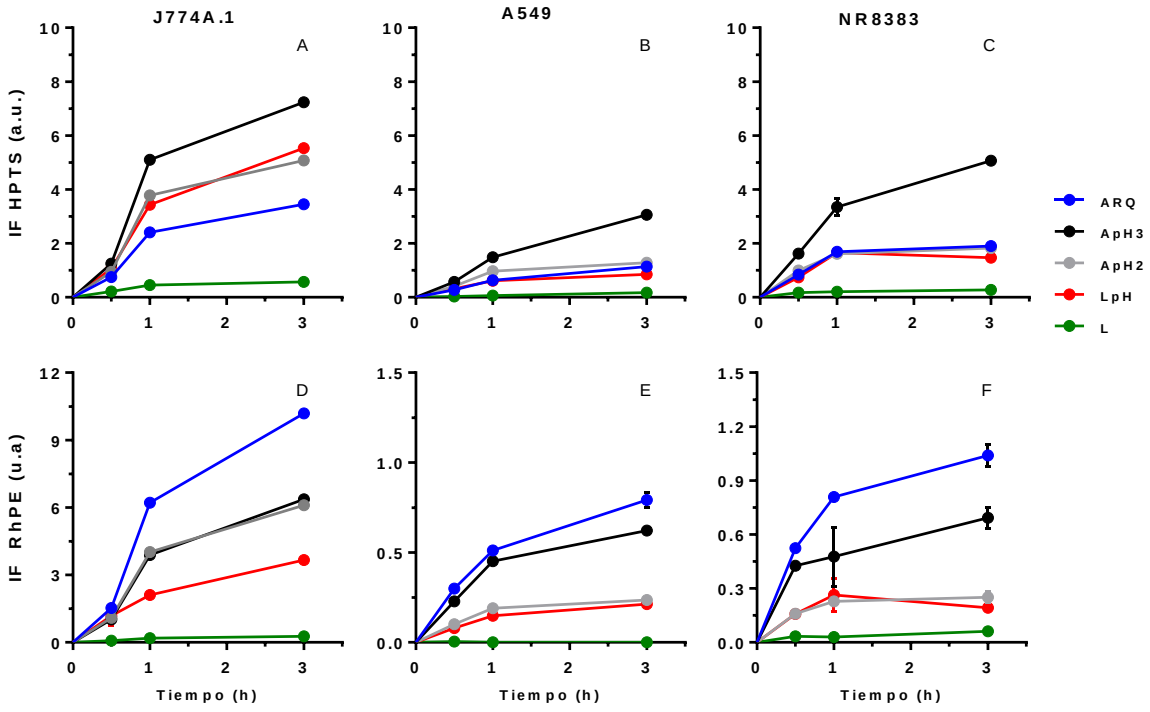


Figura 6. Intensidad de fluorescencia de HPTS (liberación citoplasmática del HPTS) en a) J774A.1, b) A549 y c) NR8383 e Intensidad de fluorescencia de RhPE (captura celular de nanovesículas) en d) J774A.1, e) A549 y f) NR8383 durante 0,5, 1 y 3 h. (n=2)

3.4.5 Incorporacion de DP

Para este trabajo se eligió utilizar como corticoesteroide modelo a la dexametasona fosfato (DP), cuya estructura química se muestra en la Fig. 7. La elección del fármaco se realizó en función de su potencia eleveda (Meikle & Tyler, 1977) y su carácter hidrofílico que permite encapsularla en el interior acuoso nanovesicular. Debido a que con la formulación ApH3 se obtuvo la mayor liberación de HPTS en el citoplasma celular, combinado con una amplia captura celular, fue la formulación mixta elegida para ser cargada con DP (ApH3-DP). También se prepararon L-DP (no pH sensible / baja captura), ARQ-DP (no pH sensible / alta captura) y LpH-DP (sensible al pH / captura intermedia).

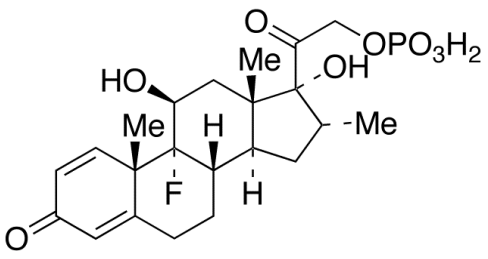


Figura 7 Estructura química de dexametasona fosfato (DP)

Debido a la naturaleza hidrofílica de DP, parte de la droga queda retenida en el interior acuoso de las nanovesículas y otra parte queda libre fuera de la nanovesícula. Para eliminar la droga libre, las formulaciones fueron sometidas a una CEM con Sephadex G-25. Como la DP es una droga de baja masa molecular (516 g/mol) ésta queda retenida en la columna, mientras que los nanovesículas, en su mayoría, eluyen en el volumen muerto (fracción 1) de la columna como se muestra en la Fig. 3. El perfil de elución de una solución stock de DP en buffer Tris muestra que la droga libre comienza a eluir a partir de la fracción 8 (Fig. 8). Por lo tanto se puede recuperar en la fracción 1 las nanovesículas únicamente con DP encapsulada.

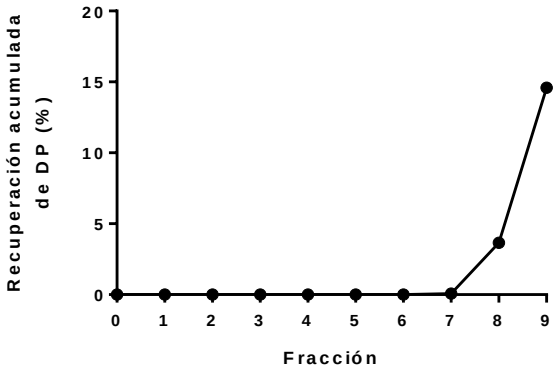


Figura 8 Perfil de elución de una solución de DP 20 mg/mL.

Como se muestra en la Tabla 4, los porcentajes de incorporación fueron de 14,7 ± 4,6 % para LpH-DP; 9,8 ± 1,2 % para ARQ; 7,7 ± 4,7 % para ApH3 y 1,8 ± 1,2 % para L, en donde el porcentaje de DP encapsulada fue mínimo. Se obtuvieron

relaciones de droga/LT de 0,17 ± 0,05; 0,18 ± 0,10 y 0,26 ± 0,07 mg/mg para ARQ-DP, ApH-DP y LpH-DP respectivamente. La menor relación obtenida fue para L-DP con un valor de 0,08 ± 0,05.

La incorporación de DP en el interior acuoso de las formulaciones no afectó el tamaño promedio de los nanovesículas ni su pdi. Mientras que el potencial ζ de ApH 3-DP y ARQ-DP aumentó comprado con las respectivas formulaciones vacías (Tabla 5).

Tabla 4 Cuantificación de DP y LT

Formulación	LT (mg/mL)	DP (mg/mL)	Encapsulación DP (%)	DP/LT (mg/mg)
L-DP	3,1 ± 0,2	0,26 ± 0,17	1,8 ± 1,2	0,08 ± 0,05
LpH-DP	4,8 ± 2,7	2,06 ± 0,64	14,7 ± 4,6	0,26 ± 0,07
ApH 3-DP	6,6 ± 0,4	1,07 ± 0,66	7,7 ± 4,7	0,18 ± 0,10
ARQ-DP	8,6 ± 1,5	1,37 ± 0,17	9,8 ± 1,2	0,17 ± 0,05

Los resultados corresponden al promedio ± DS de tres lotes de muestras

Tabla 5 Caracterización fisicoquímica de formulaciones con DP

Formulación	Tamaño Promedio (nm)	pdi	Potencial ζ (mV)
L-DP	268 ± 110	0,50 ± 0,04	-4,5 ± 0,4
LpH-DP	171 ± 6	0,17 ± 0,04	-22,5 ± 6,2
ApH 3-DP	165 ± 4.1	0,19 ± 0,08	-33,9 ± 1,2
ARQ-DP	139 ± 21	0,24 ± 0,01	-23,4 ± 0,5

Los resultados corresponden al promedio ± DS de tres lotes de muestras

3.4.6 Viabilidad celular

Con el objetivo de determinar rangos de concentraciones de LT y DP que no sean tóxicos para las células se realizaron ensayos de viabilidad. Para esto se midió el grado de metabolismo celular mediante el método de MTT, de las células A549, J774A.1 y THP-1 después de 24 horas de incubación con nanovesículas vacías, conteniendo DP y de la droga libre.

En las células J774A.1 la viabilidad celular se vio afectada con las formulaciones ApH3 y ARQ, mientras que LpH, L y DP libre no resultaron citotóxicas en todas

las concentraciones testeadas. ApH3 a concentraciones de 220 µg/mL de LT disminuyó la viabilidad un 40 % y ARQ un 20 %. (Fig. 9a). Las formulaciones conteniendo DP tuvieron el mismo patrón de citotoxicidad. Aunque la citotoxicidad aumentó para ARQ-DP registrándose una viabilidad de un 30% con 50 ug/mL de droga (Fig 9b).

La viabilidad de las células THP-1 disminuyó sólo para ApH3-DP a una concentración de 50 µg/mL de DP, mientras que la formulación vacía no afectó la viabilidad en ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 9e y f). Como se muestra en la Fig. 9c y d, la viabilidad de las células A549 no resultó significativamente disminuida por ninguna formulación ni por la droga libre en las concentraciones testeadas.

3.4.7 Determinación de capacidad anti-inflamatoria

El efecto de las nanovesículas pH sensibles sobre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias se evaluó sobre células sin activación, para controlar que las formulaciones no tuvieran un efecto inflamatorio por sí mismas. Mientras que para estudiar la capacidad de suprimir una respuesta inflamatoria, se determinó el grado de inhibición de liberación de citoquinas pro-inflamatorias de las células activadas con LPS o PMA. Para estos ensayos se testearon las formulaciones ApH3 y LpH3 a concentraciones de LT de 50 µg/ml y 10 µg/ml de DP, rango de concentraciones que no fueron citotóxicos durante 24 horas de incubación.

En la Fig. 10 a y b se muestran los niveles de IL-6 y TNF-α liberados por las células J774A1. Si bien la DP libre reduce ligeramente la liberación de IL-6, ApH3-DP la suprimió completamente. Por otro lado, LpH-DP no tuvo un efecto anti-inflamatorio, y se observó una ligera disminución de IL-6 para ApH3 vacíos. Para TNF-α, nuevamente la DP libre disminuyó ligeramente los niveles de TNF-α y ApH3-DP fue el mayor inhibidor. El resto de las formulaciones no afectaron significativamente a los niveles de TNF-α liberados por las células J774A.1. En la Fig. 10c,d y f se muestran los niveles de IL-6, TNF-α e IL-1β que liberan las células THP-1. En este caso todas las formulaciones con o sin DP reducen la liberación de IL-6, TNF-α e IL-1ß. Aunque ApH3-DP fue la formulación que produjo el descenso más pronunciado en los niveles de las tres citoquinas.

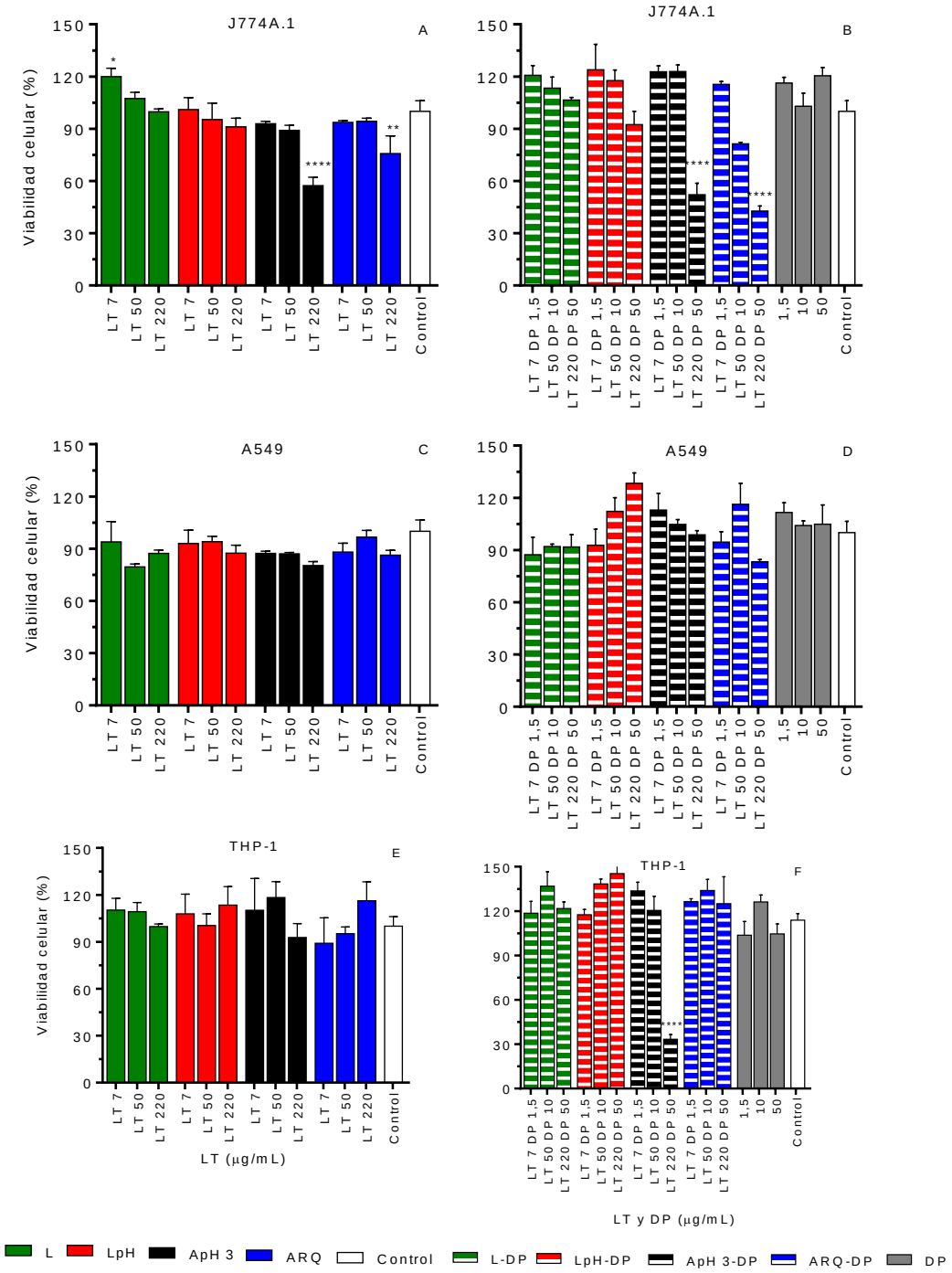


Figura 9. Citotoxicidad de formulaciones vacías o con diferentes concentraciones de DP luego de 24 horas. Resultados significativos comparado con el control. (n=2)

En esta línea celular, la DP no tuvo un efecto anti-inflamatorio significativo. Las células epiteliales de pulmón A549, estimuladas con PMA tuvieron un patrón

diferente al observado en las otras líneas. La Fig. 10f muestra que tanto la DP libre como las formulaciones con o sin DP causaron una reducción similar en la respuesta de IL-6.

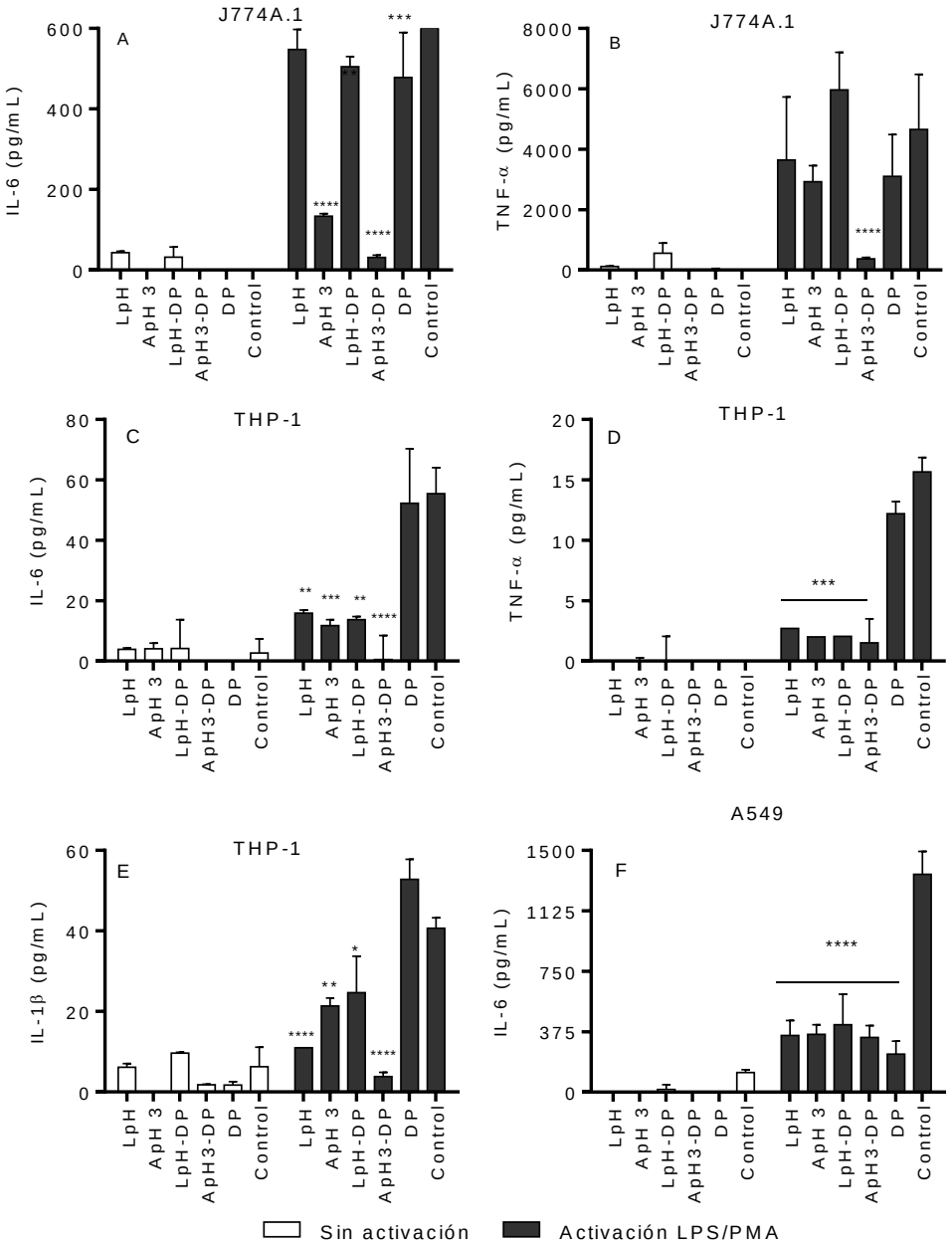


Figura 10. Perfil de liberación de citoquinas pro-inflamatorias liberadas por células a), b) J774A.1, c), d), e) THP-1 y f) A549 con o sin activación (LPS para THP-1 y J774A.1 y PMA para A549). Resultados significativos comparado con control con LPS/PMA. (n=2)

Por último, en las tres líneas celulares no se registraron aumentos de liberación de citoquinas sobre las células sin estimulación, por lo que podemos concluir que no tienen un efecto inflamatorio por sí mismas.

3.4.8 Inhibición de ERO

Se evaluó la capacidad de las nanovesículas ApH3 y LpH de potenciar la capacidad de DP para disminuir ERO dentro de macrófagos activados con LPS.

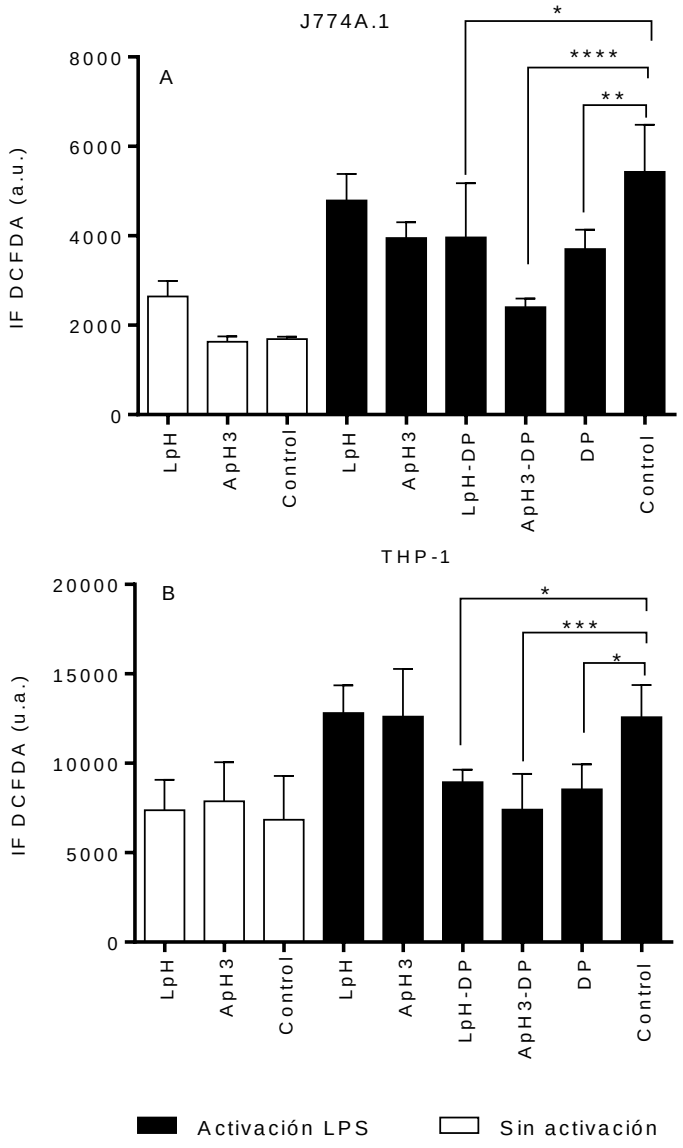


Figura 11. Perfil de inhibición de ERO en células a) J774A.1 y b) THP-1 con o sin activación. Resultados significativos comparado con el Control con LPS. (n=2)

Tanto en células J774A.1 como en THP-1 la formulación ApH3 fue la que logró disminuir de manera más significativa las especies reactivas luego de 24 horas de co-incubación con LPS (Fig. 11).

3.4.9 Estabilidad de nanovesículas conteniendo DP frente al almacenamiento

Como se muestra en la Fig. 12 los L-DP y LpH-DP, luego de 3 meses de almacenamiento aumentaron el tamaño promedio de las nanovesiculas entre un 30 y 40 % respectivamente. Las formulaciones con LPT mantuvieron sus tamaños con menores variaciones. Con respecto a los pdi, la formulación L-DP fue la única que mantuvo sus valores de pdi, ARQ-DP tuvo un aumento leve y las dos formulaciones sensibles al pH tuvieron un aumento más marcado, siendo máximo para LpH.

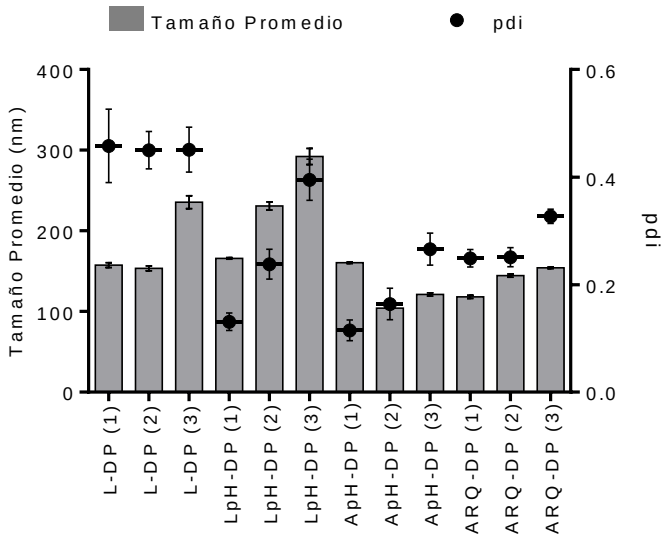


Figura 12- Tamaños y pdi de nanovesículas con DP luego de almacenarlas (1) 1 mes, (2) 2 meses y (3) meses a 4°C.

3.4.10 Estabilidad de nanovesículas frente al proceso de nebulización

El tamaño, el contenido de HPTS y la concentración de fosfatos de las suspensiones de nanovesículas vacías se determinaron antes y después de

nebulizar las formulaciones con un equipo de nebulización por malla vibradora.

Todas las formulaciones conservaron su tamaño luego de nebulizarlas como se observa en la Fig. 13, aunque se registró un aumento en los valores de pdi de todas las formulaciones, salvo ApH3. Tanto ARQ como L fueron las formulaciones con mayor porcentaje de recuperación de LT con valores cercanos al 100%. Sin embargo, para ARQ solo se mantuvo encapsulado el 54,5 % y se observó una pérdida de aproximadamente un 41,2% de HPTS que no se recuperó ni encapsulado ni libre en el nebulizado.

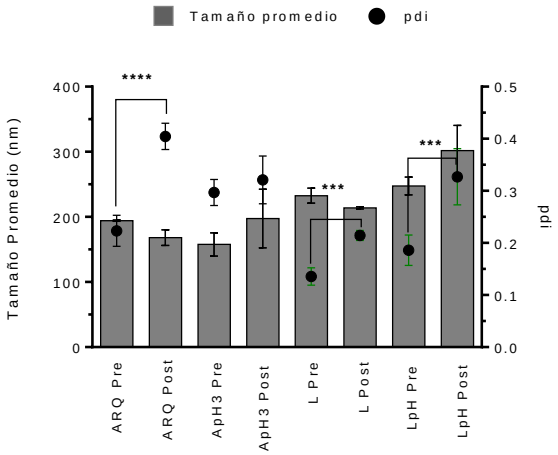


Figura 13. Tamaño promedio y pdi de las nanovesiculas pre y post nebulización. (n=2)

Para L por el contrario se obtuvo casi un 90% del HPTS encapsulado. LpH tuvo un porcentaje promedio de recuperación de 55% para ambos parámetros y ApH3 tuvo un 75% de recuperación de HPTS encapsulado y un 74% de LT (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento de recuperación de LT y HPTS encapsulado luego de nebulizar.

Formulación	HPTS encapsulado (%)	HPTS libre (%)	LT (%)
ApH3	75 ± 4	19,6 ± 0,1	74 ± 2
LpH	53 ± 1	41,3 ± 1,2	54 ± 0
ARQ	54,5 ± 6,0	4,3 ± 4,1	96,8 ± 8,1
L	89,7 ± 1,2	21,2 ± 6,7	99,2 ± 2,4

3.4.11 Estabilidad frente al proceso de nebulización luego de seis meses de almacenamiento

Finalmente, se evaluó la estabilidad estructural, frente al proceso de nebulización, luego de almacenar las formulaciones LpH y ApH3 durante seis meses a 4°C. Los resultados muestran que la formulación ApH3 mantiene su rendimiento luego del almacenamiento, con porcentajes de recuperación de LT y HPTS encapsulado cercanos al 70 %. Mientras que LpH no logró resistir al proceso de nebulización, la recuperación de LT y HPTS encapsulado es nula, solo se cuantificó en el nebulizado HPTS libre (Tabla 7) y aumentó de manera significativa el pdi (Fig. 14).

Tabla 7. Rendimiento de recuperación de LT y HPTS encapsulado luego de nebulizar formulaciones almacenadas durante seis meses.

	HPTS encapsulado (%)	HPTS libre (%)	LT (%)
ApH3	73 ± 4	11,5 ±1,2	67 ± 1
LpH	0	98,4 ± 2,8	<7,7

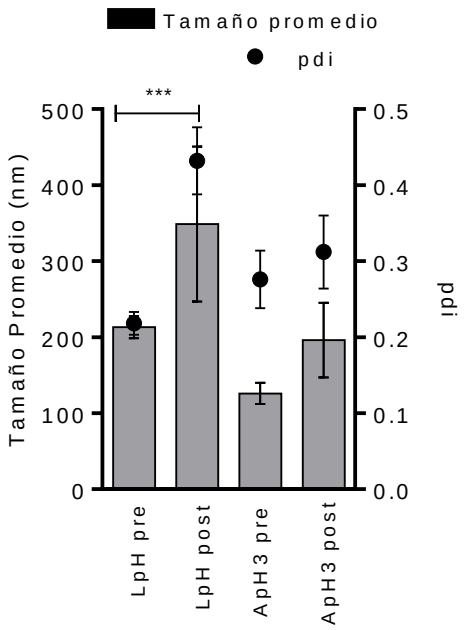


Figura 14. Tamaños y pdi de ApH3 y LpH, luego de nebulizar las formulaciones almacenadas durante seis meses.

3.5 Discusión

El primer objetivo de este trabajo fue desarrollar una formulación de nanovesículas que incrementara el *delivery* de DP en el citoplasma celular, para así aumentar su acceso al RG, estrategia que aumentaría su efecto terapéutico aún a bajas dosis respecto de DP libre. A tal fin se aplicaron dos estrategias: en una se incrementó la captura celular de DP mediante un mecanismo de *targeting* activo, mediado por RS-AI/II; en la otra se aplicó un mecanismo de escape de la DP endocitada desde el interior acuoso de la nanovesícula al citoplasma, como respuesta a la disminución del pH, en lugar de su procesamiento en el sistema endo-lisosomal.

Para lograr que las nanovesículas respondan a cambios de pH del entorno se eligió utilizar la matriz lipídica compuesta por DOPE: CHEMS 7:3 m:m. Ya se ha demostrado que esta matriz funciona desestabilizándose y fusionándose con los endosomas tardíos, en distintas líneas celulares así como modelos in *vivo* (Morilla et al., 2005; Slepushkin et al., 1997). A su vez, para aumentar la cantidad de DP dentro de la célula se eligió un mecanismo de *targeting* activo al incorporar una mezcla de LPT, lípidos que funcionan como ligandos de SR-AI/II, como se demostró en el Capítulo 2.

En este sentido la primera etapa del trabajo consistió en evaluar la sensibilidad al pH de nanovesículas, en buffers de acidez creciente, al sustituir el lípido DOPE por LPT. Este cambio llevó a una disminución significativa de la respuesta al pH en los nanovesículas mixtas, dependiente de la proporción de LPT, siendo menor para la formulación ApH3 con mayor contenido de LPT (Fig. 5). La mezcla de LPT contiene lípidos con carga negativa a pH fisiológico, debido a la presencia de grupos fosfato y sulfato, lo que se ve reflejado en el potencial ζ negativo de los ARQ (-40 mV). Al remplazar DOPE, un lípido sin carga neta, por LPT estas cargas negativas adicionales en las formulaciones mixtas podrían estar estabilizando la matriz por repulsión electrostática cuando se produce la disminución del pH, inhibiendo el mecanismo de desestabilización clásico de este tipo de formulaciones, como se explica en el Capítulo 1. Por otra parte, si

bien los LPT y DOPE pueden formar un sistema homogéneo completamente mezclado, la presencia de LPT en la bicapa puede dificultar el ensamblaje espacial del DOPE en la estructura de fases hexagonales impidiendo la desestabilización de la bicapa lipídica (Carrer et al., 2014).

Una vez clasificados según su capacidad de respuesta a cambios de pH, se determinó la eficacia de cada nanoliposoma para entregar HPTS al citoplasma celular. Al medir la IF de HPTS dentro de la célula se mide la cantidad del contenido acuoso de la nanovesícula que es liberado al citoplasma celular. Encontramos que la formulación ApH3 a pesar de tener una sensibilidad a cambios pH en buffer baja (apenas superior a ARQ que no es pH sensible), proporcionó la administración subcelular de HPTS más alta en las tres líneas celulares (Fig. 6). Inferimos que la administración subcelular de HPTS fue impulsada principalmente por dos factores: el mecanismo intrínseco de sensibilidad al pH de las nanovesículas y la gran captura endocítica. El enorme contenido de LPT en ApH3 (Fig. 6), sería responsable de su extensa captura endocítica (entre dos y tres veces superior a la de LpH). Esta captura resultó en la entrega subcelular máxima de HPTS en las tres líneas celulares. A su vez, aunque baja, la mayor capacidad de desestabilización a cambios de pH (respecto de nanovesículas ordinarias no pH sensibles) permitió que esta formulación libere una mayor proporción de HPTS, que la formulación de ARQ, con una tasa de captura mayor, pero con pH sensibilidad nula. En este sentido, podemos concluir que la formulación mixta ApH3, es una plataforma novedosa para *delivery* de agentes terapéuticos al citoplasma celular que combina características tanto de LpH como ARQ, logrando una mejora significativa en la efectividad de ambas formulaciones.

En la segunda etapa del trabajo se evaluó el desempeño de la formulación ApH3 como sistema de *delivery* de una droga anti-inflamatoria modelo. La droga elegida fue DP, un potente glucocorticoide, que debido a su naturaleza hidrofílica, se incorporó en el interior acuoso de la formulación liposomal. A su vez, para comparar su rendimiento se utilizaron como controles las formulaciones LpH, ARQ y L, formulación altamente estable preparada a partir de colesterol y HSPC. Los porcentajes de encapsulación de DP estuvieron en el orden del 10% en ApH3, ARQ y LpH, los cuales están dentro del rango reportado

para DP así como para otras moléculas hidrofílicas de masa molecular semejante (Bartneck et al., 2014); (Koning et al., 2006). En general la cuantificación de LT y DP tuvo gran variabilidad debido a la separación de los fosfolípidos de la DP por el método de *Blight & Dyer* (Böttcher & Pries, 1961), el cual lleva varios pasos de extracción, dando desvíos estándar muy elevados.

Al establecer las concentraciones tanto de DP como lípidos que afectan la viabilidad celular observamos que generaron citotoxicidad (en las concentraciones más altas que se testearon) las formulaciones que tuvieron una mayor tasa de captura. Las formulaciones ApH3-DP y ARQ-DP no generaron citotoxicidad sobre las células A549 pero si sobre la línea celular J774A.1, cuya tasa de captura fue 10 veces mayor. Estos resultados sumados con los resultados del Capítulo II, refuerzan la idea de que los ARQ y vesículas relacionadas no generan citotoxicidad hasta concentraciones de 50 µg/mL de LT.

Hay varias citoquinas implicadas en el inicio y mantenimiento de procesos inflamatorios, dentro de estas, IL-1β, IL-6 y TNF-α. Estas tres citoquinas son producidas principalmente por monocitos activados y se cuantifican para evaluar procesos inflamatorios y actividad de DP en NPs (Bartneck et al., 2014; Barton, Jakway, Smith, & Siegel, 1991; Choksi et al., 2013; Wijagkanalan et al., 2008). La formulación ApH3-DP, a pesar de tener una baja relación DP/lípido, provocó la mayor disminución de IL-6, TNF-α e IL-1β en células J774A.1 y THP-1 estimuladas con LPS. Sorprendentemente, la formulación vacía y L-DP mostraron actividad anti-inflamatoria en células THP-1. Este hecho podría deberse a que los monómeros de LPS (su concentración micelar crítica es de 10-14 µg LPS/mL) podrían insertarse en la bicapa liposomal, disminuyendo así su disponibilidad para estimular receptor TLR4 (Alam & Yamazaki, 2011). Por otro lado, LpH-DP fue menos eficaz para reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Esta formulación aportó una menor cantidad de HPTS citoplasmático que ApH3 lo que podría coincidir con una entrega de DP inferior en el citoplasma celular y por lo tanto un menor efecto anti-inflamatorio. Estos resultados sugieren que el acceso de fármacos hidrosolubles al receptor citoplasmático, y por lo tanto la eficacia del fármaco, se puede aumentar por medio de un nano-objeto sensible al pH de elevada captación endocítica. Las células A549, por otro lado, son muy similares a las células epiteliales alveolares

de tipo II ya que también sintetizan fosfatidilcolina y secretan surfactante. Las células epiteliales alveolares de tipo II cubren aproximadamente el 4% de la superficie alveolar de los mamíferos, pero constituyen el 15% de todas las células pulmonares y pueden actuar como centinelas en la defensa contra una infección (Chuquimia et al., 2012). En la terapia anti-asmática, son uno de los blancos más importantes para los CI, ya que estas células están involucradas en la secreción de muchas proteínas pro-inflamatorias (Nonaka, Nave, McCracken, Kawashimo, & Katsuura, 2007). Sin embargo, a diferencia de las células J774A.1 y THP-1, se encontró que en A549 la actividad anti-inflamatoria de DP fue idéntica a la de las formulaciones pH sensibles, con o sin DP. Como en el caso de LPS, PMA también es una molécula anfipática que se podría incorporar en la membrana lipídica lo que podría disminuir su actividad. A su vez en esta línea celular la DP libre ya tiene un efecto supresor máximo de IL-6 a diferencia de lo que se observa en J774A.1 y THP-1 donde la droga libre tiene un efecto menos significativo, esto evitaría ver diferencias entra DP encapsulada o libre en células A549.

La generación de ERO, funciona como una respuesta temprana previa a la inflamación, las ERO son moléculas de señalización clave que desempeñan un papel importante en la progresión de los trastornos inflamatorios (Schieber & Chandel, 2014). En los macrófagos, por ejemplo, el LPS estimula rápidamente las ERO derivadas de NADPH oxidasa, antes de inducir, 3 horas más tarde, las citoquinas IL-1β y TNF-α (Hsu & Wen, 2002). El efecto de DP en las nanovesículas pH sensibles, en la generación de ROS, por lo tanto, daría cuenta de la eficacia de la administración citoplásmica de DP sobre endocitosis, en comparación con la difusión de DP libre. Como era de esperar, encontramos que ApH3-DP fue la formulación más efectiva para reducir los niveles de ERO en J774A1 y en células THP-1.

Si bien el diseño de la NP para transportar DP (la elección de su composición química así como su forma y tamaño) es esencial para lograr una respuesta eficiente que contemple mayor actividad y menor dosis requerida, la vía de acceso elegida para su administración también es de gran relevancia para lograr una respuesta óptima. La ruta de administración inhalatoria, es la elegida para la administración de DP a pulmón.

La deposición eficaz de liposomas inhalados en las partes distales de los pulmones (fracción de difusión) depende del nebulizador. Es el tamaño de las gotitas de aerosol, no el tamaño de los liposomas, lo que determina el sitio de deposición (Farr, Kellaway, Parry-Jones, & Woolfrey, 1985), cuando las gotas son más pequeñas difunden hacia las zonas más distales como los alvéolos. En particular para el nebulizador utilizado en este trabajo se han reportado tamaños de gotas en el orden de los ~4 µm o inferiores (Berg, Svensson, & Asking, 2007). Este tamaño permitiría una deposición óptima en las zonas más profundas del pulmón. Sin embargo es estrictamente necesario que las nanovesículas nebulizadas tengan un tamaño inferior, que permita la incorporación de los mismos dentro de la gota de manera intacta (David Cipolla et al., 2013) ya que el mantenimiento de las propiedades físicas de las nanovesículas después de la nebulización es uno de los primeros pasos para lograr un producto exitoso (Gaspar, Bakowsky, & Ehrhardt, 2008). Dentro de los métodos estudiados para la administración inhalatoria de liposomas la técnica de nebulización con de malla vibratoria parece ser la más adecuada (Lehofer et al., 2014). Sin embargo, con estos nebulizadores se ha informado una mayor pérdida de fármaco encapsulado al aumentar el tamaño de las vesículas nebulizadas, esto sucede porque la energía de la malla vibratoria afecta a los liposomas antes de que estos lleguen a la malla y luego de que pasen a través de ella. Como resultado, estos nebulizadores pueden provocar una tasa de liberación alta de las moléculas encapsuladas (Lehofer et al., 2014). El tamaño y la lamelaridad de las nanovesículas, la eficacia de la encapsulación y la tasa de liberación *in vitro* se deben mantener después de la aplicación de aerosol para garantizar que el perfil de liberación *in vivo* sea consistente para cada persona. Los liposomas unilamelares de tamaño pequeño con un tamaño medio típicamente en el rango de aproximadamente 30-150 nm (David Cipolla et al., 2013) son menos susceptibles a la tensión cortante y más robustos al proceso de nebulización (Beck-Broichsitter et al., 2013; Unida, Ito, Onodera, Tahara, & Takeuchi, 2016).

En el caso de L, ApH y LpH el porcentaje de HPTS encapsulado y la cantidad de lípidos recuperados en el nebulizado es similar (Tabla 6). Esto sugiere que todos los nanovesículas que fueron nebulizadas y recuperados en el balón, mantuvieron su estructura intacta durante el proceso así como sus tamaños. Esto

no ocurre en el caso de ARQ donde se recupera mayor cantidad de LT en comparación con HPTS encapsulado, lo que podría indicar que un 40 % de los nanovesículas que pasaron a través de la malla vibradora no mantuvieron su estructura intacta y perdieron parte de su contenido acuoso. Esto se puede deber a la naturaleza multilamelar de los ARQ, como se ve en la imágenes de crio TEM presentadas en el Capítulo 2 Fig.3. Por otra parte para ApH3 y LpH la perdida de material se podría haber originado antes del pasaje a través de la malla vibratoria, tal vez por quedar retenido en la misma. La formulación con una mejor *performance* fue la de liposomas convencionales L, que logró mantener el 90 % de HPTS encapsulado y la recuperación fue del 100 % de los LT. Esto era lo esperable ya que las bicapas rígidas (que tienen 30% de colesterol o lípidos con altas temperaturas de transición de fase por encima de temperatura ambiente, como es el caso de HSPC), se utilizan para aumentar la retención de drogas pulmonares (Unida et al., 2016).

Finalmente, al estudiar la *performance* de LpH y ApH3 luego de seis meses de almacenamiento quedó expuesta la capacidad de los LPT de otorgar estabilidad estructural a la formulación convencional LpH. Con la inclusión de LPT se lograron mantener los porcentajes de recuperación de LT y de contenido acuoso encapsulado, como cuando se realizaron sobre formulaciones recién preparadas. Estos resultados son fundamentales para pensar en una terapia en donde la formulación de liposomas debe resistir un periodo de almacenamiento antes de ser administrada.

En nuestro caso, incluir LPT en la formulación de DOPE: CHEMS tuvo como consecuencia la modificación de la farmacodinamia del nano-objeto. Esto se logró sin la incorporación de ligandos complejos como anticuerpos (que tienen una elevada relación costo/beneficio poco atractiva para la industria farmacéutica) si no que se priorizo la sencillez estructural del nano-objeto. A su vez, la mezcla entre DOPE: CHEMS: LPT aumentó significativamente la resistencia coloidal de los nanovesículas a la nebulización sin incluir colesterol o lípidos hidrogenados caros de alta temperatura de transición de fase en la bicapa de las nanovesiculas, lo que complejizaría su preparación y podría afectar su sensibilidad al pH.

Los liposomas inhalados dirigidos siguen siendo una tecnología emergente (Murata, Nakano, Tahara, Tozuka, & Takeuchi, 2012). En este escenario, los arqueosomas sensibles al pH son una plataforma nanotecnológica novedosa tanto por su estabilidad estructural como por su actividad anti-inflamatoria y podrían mejorar significativamente la actividad de los corticosteroides *in vivo*, en una terapia inhalatoria.

3.6 Referencias

Alam, Jahangir Md, & Yamazaki, Masahito. (2011). Spontaneous insertion of lipopolysaccharide into lipid membranes from aqueous solution. *Chemistry and physics of lipids, 164*(2), 166-174.

Barnes, Peter J, & Adcock, Ian M. (2003). How do corticosteroids work in asthma? *Annals of internal medicine, 139*(5_Part_1), 359-370.

Barnes, Peter J, & Adcock, Ian M. (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *The Lancet, 373*(9678), 1905-1917.

Bartneck, Matthias, Peters, Franziska Marie, Warzecha, Klaudia Theresa, Bienert, Michaela, van Bloois, Louis, Trautwein, Christian, . . . Tacke, Frank. (2014). Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine, 10*(6), 1209-1220.

Barton, Beverly E, Jakway, James P, Smith, Sidney R, & Siegel, Marvin I. (1991). Cytokine inhibition by a novel steroid, mometasone furoate. *Immunopharmacology and immunotoxicology, 13*(3), 251-261.

Beck-Broichsitter, Moritz, Rieger, Monika, Reul, Regina, Gessler, Tobias, Seeger, Werner, & Schmehl, Thomas. (2013). Correlation of drug release with pulmonary drug absorption profiles for nebulizable liposomal formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 84*(1), 106-114.

Berg, Elna, Svensson, Jan Olof, & Asking, Lars. (2007). Determination of nebulizer droplet size distribution: a method based on impactor refrigeration. *Journal of aerosol medicine, 20*(2), 97-104.

Boorsma, Carian E, Draijer, Christina, & Melgert, Barbro N. (2013). Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. *Mediators of inflammation, 2013*.

Böttcher, CJF, & Pries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta, 24*, 203-204.

Carrer, Dolores C, Higa, Leticia H, Tesoriero, Maria Victoria Defain, Morilla, Maria Jose, Roncaglia, Diana I, & Romero, Eder Lilia. (2014). Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121*, 281-289.

Cipolla, D, Redelmeier, T, Eastman, S, Bruinenberg, P, & Gonda, I. (2011). Liposomes, niosomes and proniosomes–a critical update of their (commercial) development as inhaled products. *Respiratory drug delivery Europe*, 41-54.

Cipolla, David, Gonda, Igor, & Chan, Hak-Kim. (2013). Liposomal formulations for inhalation. *Therapeutic delivery, 4*(8), 1047-1072.

Choksi, Arpankumar, Sarojini, KVL, Vadnal, Prashant, Dias, Charmaine, Suresh, PK, & Khandare, Jayant. (2013). Comparative anti-inflammatory activity of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer–dexamethasone conjugates with dexamethasone-liposomes. *International journal of pharmaceutics, 449*(1-2), 28-36.

Chuquimia, Olga D, Petursdottir, Dagbjort H, Rahman, Muhammad J, Hartl, Katharina, Singh, Mahavir, & Fernández, Carmen. (2012). The role of alveolar epithelial cells

in initiating and shaping pulmonary immune responses: communication between innate and adaptive immune systems. *PLoS one, 7*(2), e32125.

Fahy, John V. (2015). Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology, 15*(1), 57.

Fardet, Laurence, & Fève, Bruno. (2014). Systemic glucocorticoid therapy: a review of its metabolic and cardiovascular adverse events. *Drugs, 74*(15), 1731-1745.

Farr, SJ, Kellaway, IW, Parry-Jones, DR, & Woolfrey, SG. (1985). 99m-Technetium as a marker of liposomal deposition and clearance in the human lung. *International journal of pharmaceutics, 26*(3), 303-316.

Gaspar, Maria Manuela, Bakowsky, Udo, & Ehrhardt, Carsten. (2008). Inhaled liposomes–current strategies and future challenges. *Journal of Biomedical Nanotechnology, 4*(3), 245-257.

Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., & Sly, P. D. (2015). Asthma. *Nat Rev Dis Primers, 1*, 15025. doi: 10.1038/nrdp.2015.25

Howarth, P, Johnson, M, Kay, B, Lee, T, Postma, D, Pride, N, . . . Thomson, N. (1995). Glucocorticoid resistance in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine, 152*, 5125-5142.

Hsu, Hsien-Yeh, & Wen, Meng-Hsuan. (2002). Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *Journal of Biological Chemistry, 277*(25), 22131-22139.

Hussell, Tracy, & Bell, Thomas J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews immunology, 14*(2), 81.

Jiang, Zhilong, & Zhu, Lei. (2016). Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *Journal of asthma and allergy, 9*, 101.

Kim, Hye Young, DeKruyff, Rosemarie H, & Umetsu, Dale T. (2010). The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature immunology, 11*(7), 577.

Koning, Gerben A, Schiffelers, Raymond M, Wauben, Marca HM, Kok, Robbert J, Mastrobattista, Enrico, Molema, Grietje, . . . Storm, Gert. (2006). Targeting of angiogenic endothelial cells at sites of inflammation by dexamethasone phosphate–containing RGD peptide liposomes inhibits experimental arthritis. *Arthritis & Rheumatology, 54*(4), 1198-1208.

Kuzmov, Andriy, & Minko, Tamara. (2015). Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. *Journal of Controlled Release, 219*, 500-518.

Lambrecht, Bart N, & Hammad, Hamida. (2015). The immunology of asthma. *Nature immunology, 16*(1), 45.

Lehofer, Bernhard, Bloder, Florian, Jain, Pritesh P, Marsh, Leigh M, Leitinger, Gerd, Olschewski, Horst, . . . Prassl, Ruth. (2014). Impact of atomization technique on the stability and transport efficiency of nebulized liposomes harboring different surface characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 88*(3), 1076-1085.

Meikle, A Wayne, & Tyler, Frank H. (1977). Potency and duration of action of glucocorticoids: effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. *The American journal of medicine, 63*(2), 200-207.

Morilla, Maria Jose, Montanari, Jorge, Frank, Fernanda, Malchiodi, Emilio, Corral, Ricardo, Petray, Patricia, & Romero, Eder Lilia. (2005). Etanidazole in pH-

sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti-Trypanosoma cruzi activity. *Journal of controlled release, 103*(3), 599-607.

Murata, Mitsutaka, Nakano, Koji, Tahara, Kohei, Tozuka, Yuichi, & Takeuchi, Hirofumi. (2012). Pulmonary delivery of elcatonin using surface-modified liposomes to improve systemic absorption: polyvinyl alcohol with a hydrophobic anchor and chitosan oligosaccharide as effective surface modifiers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 80*(2), 340-346.

Nonaka, Takashi, Nave, Rüdiger, McCracken, Nigel, Kawashimo, Atsuko, & Katsuura, Yasuhiro. (2007). Ciclesonide uptake and metabolism in human alveolar type II epithelial cells (A549). *BMC pharmacology, 7*(1), 12.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018). Chronic respiratory diseases. Asthma. from http://www.who.int/respiratory/asthma/en/

Pappas, Konstantinos, Papaioannou, Andriana I, Kostikas, Konstantinos, & Tzanakis, Nikolaos. (2013). The role of macrophages in obstructive airways disease: chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Cytokine, 64*(3), 613-625.

Paranjpe, Mukta, & Müller-Goymann, Christel C. (2014). Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *International journal of molecular sciences, 15*(4), 5852-5873.

Park, EK, Jung, HS, Yang, HI, Yoo, MC, Kim, C, & Kim, KS. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research, 56*(1), 45-50.

Rajendran, Lawrence, Knölker, Hans-Joachim, & Simons, Kai. (2010). Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nature reviews Drug discovery, 9*(1), 29.

Ricciardolo, Fabio LM, Blasi, Francesco, Centanni, Stefano, & Rogliani, Paola. (2015). Therapeutic novelties of inhaled corticosteroids and bronchodilators in asthma. *Pulmonary pharmacology & therapeutics, 33*, 1-10.

Schieber, Michael, & Chandel, Navdeep S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology, 24*(10), R453-R462.

Sercombe, Lisa, Veerati, Tejaswi, Moheimani, Fatemeh, Wu, Sherry Y, Sood, Anil K, & Hua, Susan. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology, 6*, 286.

Slepushkin, Vladimir A, Simões, Sérgio, Dazin, Paul, Newman, Mary S, Guo, Luke S, de Lima, Maria C Pedroso, & Düzgüneş, Nejat. (1997). Sterically stabilized pH-sensitive liposomes intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *Journal of Biological Chemistry, 272*(4), 2382-2388.

Stanbury, Rosalyn M, & Graham, Elizabeth M. (1998). Systemic corticosteroid therapy—side effects and their management. *British Journal of Ophthalmology, 82*(6), 704-708.

Straubinger, Robert M, Papahadjopoulos, Demetrios, & Hong, Keelung. (1990). Endocytosis and intracellular fate of liposomes using pyranine as a probe. *Biochemistry, 29*(20), 4929-4939.

Unida, Shinshu, Ito, Yosuke, Onodera, Risako, Tahara, Kohei, & Takeuchi, Hirofumi. (2016). Inhalation properties of water-soluble drug loaded liposomes atomized by nebulizer. *Asian J Pharm Sci, 11*(1), 205-206.

Wijagkanalan, Wassana, Higuchi, Yuriko, Kawakami, Shigeru, Teshima, Mugen, Sasaki, Hitoshi, & Hashida, Mitsuru. (2008). Enhanced anti-inflammation of inhaled

dexamethasone palmitate using mannosylated liposomes in an endotoxin-induced lung inflammation model. *Molecular pharmacology, 74*(5), 1183-1192.

CAPITULO 4

4. Interacción de nanovesículas con surfactante pulmonar

.

A partir de los datos experimentales obtenidos en este Capítulo se ha publicado el trabajo:

"*Nebulizing novel multifunctional nanovesicles: the impact of macrophage-targeted-pH-sensitive archaeosomes on a pulmonary surfactant*" **María Julia Altube**, Andre Cutro, Laura Bakas, María Jose Morilla, Edgardo Anibal Disalvo, Eder Lilia Romero. Journal of Materials Chemistry B, Royal Society of Chemistry. Septiembre 2017. 10.1039/C7TB01694H. IF: 4,543 (2016)

A partir de este Capítulo se realizaron las siguientes comunicaciones científicas:

"*The interaction of nano-archeasomes with lung surfactant in monolayer biomimetic systems*" **Altube MJ**, Cutro A, Disalvo A, Romero EL. XLV Reunión Anual SAB. Tucumán. 25 de Noviembre de 2016. Póster electrónico.

"*The interaction of pH sensitive liposomes with lung surfactant in monolayer biomimetic systems*". **Altube MJ**, Cutro A, Disalvo A, Romero EL. Reunión conjunta SAIC. SAI. SAFE. Nanomed-ar. AACyTAL 2016, Mar del Plata, Argentina. 18 de Noviembre de 2016. Presentación oral y Póster. Publicado en Medicina ISBN 1669-9106, Estudio Sigma, Buenos Aires, Argentina.

4.1 Objetivo

El objetivo de este Capítulo fue determinar sí las nanovesículas arqueolipídicas/pH sensibles mantienen su capacidad de realizar *targeting* activo sobre macrófagos recubiertos de una monocapa de surfactante pulmonar, así como evaluar sí el surfactante pulmonar conserva su capacidad tensoactiva luego de entrar en contacto con las nanovesículas.

4.2 Introducción

La inhalación de NP a diferencia del *delivery* parenteral, es una ruta no invasiva, puede limitar la acción del fármaco en el pulmón durante períodos prolongados y reducir efectos adversos sistémicos (David Cipolla, Shekunov, Blanchard, & Hickey, 2014; Haque, Whittaker, McIntosh, Pouton, & Kaminskas, 2016; Rudokas, Najlah, Alhnan, & Elhissi, 2016). Sin embargo, vale la pena señalar, que de la amplia gama de material nanoparticulado desarrollado hasta el momento solo las nanovesículas lipídicas - seguidas por las micelas poliméricas y los nanocristales- entran en el portfolio de la industria farmacéutica (D Cipolla, Redelmeier, Eastman, Bruinenberg, & Gonda, 2011; Sercombe et al., 2015); principalmente por sus métodos robustos de producción y su alta biocompatibilidad (Loira-Pastoriza, Todoroff, & Vanbever, 2014). Hasta ahora se ha reunido un conjunto de conocimientos sólido, sobre las características farmacotécnicas de las nanovesículas lipídicas en estudios preclínicos y clínicos. Sin embargo, se han realizado pocos estudios biofísicos que estudian la interacción de dichas NP con surfactante pulmonar (SP).

En el **Capítulo 3**, se han descripto las características estructurales de los ApH, nanovesículas multifuncionales que, gracias a su contenido arqueolipídico, ofrecen una plataforma versátil para la administración de fármacos. Los ApH combinan dos características necesarias para alcanzar el *delivery* masivo de fármacos al citoplasma de la célula. **1)** Una tasa alta de captura endocítica, debido a la presencia de LPT que permite el *targeting* específico a macrófagos y células endoteliales -evitando así el uso de derivatización covalente (Greaves & Gordon, 2009) y 2)- con **2)** la capacidad para responder a la acidez endosomal mediante una transición de fase, la fusión subsiguiente con el endosoma y la liberación masiva del contenido interno al citoplasma celular, gracias a su contenido DOPE:CHEMS. Los ApH también muestran una resistencia estructural superior en comparación con los LpH: pueden conservarse durante seis meses de almacenamiento en medio acuoso y ser nebulizados de manera exitosa. Las nanovesículas nebulizables (no pH-sensibles) requieren de colesterol o fosfolípidos hidrogenados para

hacer bicapas resistentes a la rotura por estrés físico y a los ataques químicos (Clancy et al., 2013; Niven & Schreier, 1990). La fosfatidilcolina hidrogenada, sin embargo, es cara y puede estar contaminada con isómeros trans altamente tóxicos (List & King, 2016). En resumen, por el diseño de los ApH estos son excelentes candidatos para realizar una administración inhalatoria cuyo *target* sean macrófagos alveolares y células inmunes. No obstante, estas células viven en la interfaz aire-sangre, cubiertas por una delgada película de SP (Hussell & Bell, 2014) que se interpone entre todas las NP respirables y las células *target* en los alvéolos.

Durante el ciclo respiratorio, la interface aire/líquido, que se encuentra en la luz del epitelio alveolar, tiene una tensión superficial (γ) que se estabiliza mediante la difusión de una película rica en lípidos en la interfaz alveolar. Esta película de lípidos tensoactivos es el SP. Los cambios cuantitativos (por ejemplo, síndrome de dificultad respiratoria) o cualitativos (por ejemplo, síndrome de dificultad respiratoria aguda) en la composición del SP, pueden conducir al colapso alveolar y la necesidad de soporte ventilatorio. Por lo tanto, el mantenimiento de la función del surfactante es esencial para la respiración y, en última instancia, para la supervivencia (Perez-Gil & Weaver, 2010).

Los principales componentes del surfactante pulmonar incluyen fosfolípidos (~ 80% m/m) y lípidos neutros (principalmente colesterol, ~10%). Dentro de los fosfolípidos, DPPC es el mayoritario con un ~40% m/m (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014; Perez-Gil & Weaver, 2010). Además de la composición lipídica, el SP está compuesto por cuatro proteínas, si bien su porcentaje dentro de PS es bajo (~1-2%), su presencia es crítica para la función normal del surfactante. Las proteínas A (SP-A) y D (SP-D) pertenecen a la familia de proteínas colectina. Están directamente relacionadas con la defensa innata en el pulmón y reconocen, unen y eliminan los patógenos (Whitsett & Alenghat, 2015). Las proteínas B (SP-B) y C (SP-C) son pequeñas proteínas hidrófobas que están profundamente integradas en los fosfolípidos; estas ayudan a la adsorción interfacial de las moléculas tensoactivas en la interfaz aire-líquido y contribuyen a la estabilidad mecánica de las monocapas interfaciales (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014).

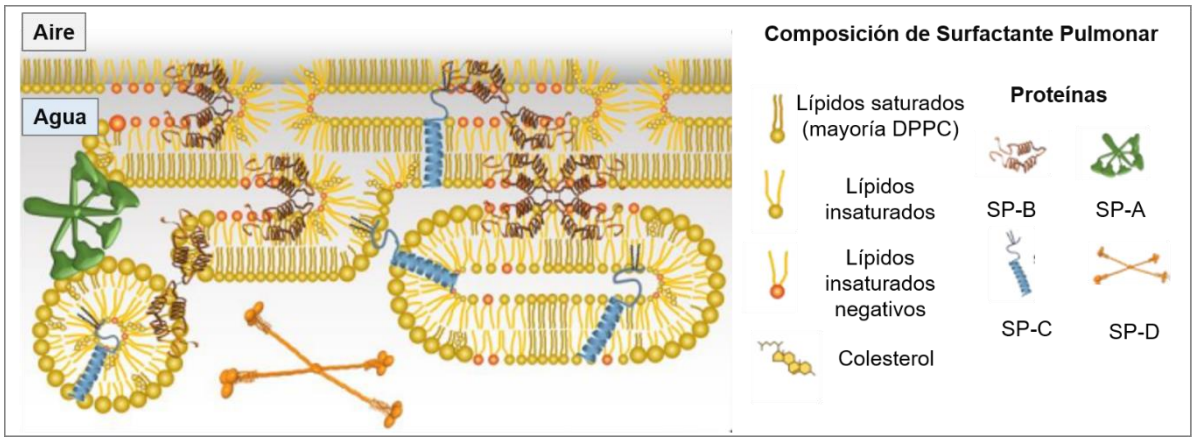


Figura 1. Esquema del surfactante pulmonar y las moléculas que lo componen, en la interfase aire-agua del alvéolo; por debajo de la monocapa de surfactante se encuentra el reservorio que producen las células alveolares tipo II. Modificado a partir de (Hidalgo, Cruz, & Pérez-Gil, 2017).

La γ de un líquido es la energía necesaria para aumentar su superficie en una unidad de área y, por lo tanto, se expresa en energía por unidad de área o longitud (mN / m). La γ cuantifica la energía necesaria para superar las fuerzas que minimizan el área expuesta a un medio que no sea el líquido. Esta se genera por las fuerzas de atracción entre las moléculas líquidas. Dentro del seno del líquido, las fuerzas atractivas actúan en todas las direcciones y se compensan entre las moléculas. Sin embargo, en la interfaz, estas fuerzas atractivas no se compensan por completo, produciendo una fuerza de atracción neta hacia el interior del líquido. Para el epitelio pulmonar, que está cubierto por una capa delgada de agua, estas fuerzas juegan un papel importante en la estabilización mecánica y estructural de los pulmones durante el proceso de respiración. Si estas fuerzas no se minimizan durante la exhalación, los alvéolos más pequeños tendrían una tendencia a colapsarse debido a que la tensión superficial minimizaría el área expuesta al aire, reduciendo el área disponible para el intercambio de gases (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014). El SP minimiza estas fuerzas de superficie, especialmente los fosfolípidos colocados en la interfaz, desplazan las moléculas de agua para compensar las fuerzas atractivas y, por lo tanto, reducir la γ. Cuando la interfaz está totalmente ocupada por moléculas de fosfolípidos, se alcanza una **tensión superficial de equilibrio (γeq)**. La adición de más moléculas de fosfolípidos no disminuye más la tensión superficial porque la adsorción y la desorción de la interfaz

compensan mutuamente el equilibrio del sistema. Sin embargo, el área ocupada por la superficie alveolar varía continuamente mientras se comprime durante la exhalación y se expande durante la inhalación según los ciclos respiratorios. (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014).

Durante la exhalación la monocapa de SP se comprime para evitar el colapso alveolar, el SP reduce la γ por debajo de la γeq equilibrio a un valor mínimo [γmin, (de 2-3 mN/m)]; esto lo logra debido a que cambia su composición específica de fosfolípidos, y aumenta el porcentaje de DPPC, que permite un mayor empaquetamiento de la monocapa por sus cadenas saturadas. Normalmente, el surfactante reduce la γ de aproximadamente 70 mN/m (la γ de la subfase acuosa) a 24 mN / m (γeq), tensión que debe mantener durante la inhalación (Perez-Gil & Weaver, 2010). **Tanto las proteínas SP-B como SP-C parecen promover la re-expansión y la inserción por adsorción de los fosfolípidos desde los compartimentos sub-superficiales a la interfaz durante la expansión alveolar** (Perez-Gil & Weaver, 2010).

En resumen el papel del SP es facilitar la dinámica respiratoria disminuyendo la tensión superficial del agua en la interfaz alveolar (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014) y para lograrlo tiene al menos tres propiedades biofísicas esenciales: ser de rápida adsorción, lograr una tensión superficial muy baja durante la compresión del film, y tener una reposición eficaz de la película durante la expansión de la monocapa (Possmayer, 2004).

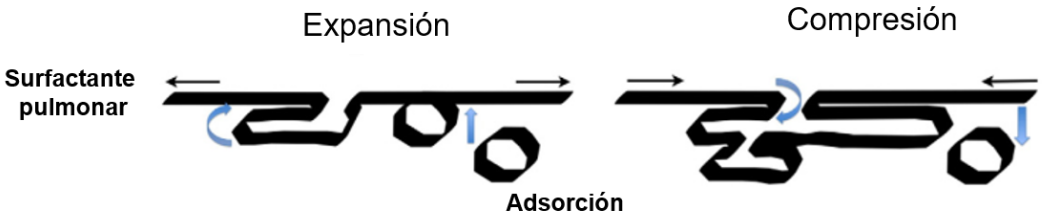


Figura 2. Film interfacial de surfactante durante la compresión (en la exhalación) y la expanión (durante inhalación). Derecha: la compresión produce una exclusión selectiva de fosfolipidos insaturados y colesterol de la monocapa hacia el reservorio interconectado, por un proceso llamado "*squeeze out*". Izquierda: expansión de la interfase y re adsorción del material del reservorio en la monocapa.

Ambos procesos son facilitados por las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-D. Imagen modificada de (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014).

La inactivación de surfactante es potencialmente mortal y se refiere a todos los procesos que interfieren con la actividad de superficie del surfactante. La inactivación del SP puede ocurrir debido a factores externos (fuga de proteínas activas de suero, ácidos grasos, lisoderivados, proteína C reactiva) o endógenos (secreción alterada de células alveolares de tipo II) (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014). El advenimiento de nuevas técnicas para la detección, producción y caracterización estructural de NP respirables, permitieron estudiar su impacto en la función respiratoria, específicamente en su interacción con el SP (Harishchandra, Saleem, & Galla, 2010; Schleh & Hohlfeld, 2009). Sin embargo ha surgido una amplia evidencia apoyando el hecho de que la translocación de silicona oxidada polimérica o metilada, oxido de titanio (Chhoden, Clausen, Larsen, Nørgaard, & Lauritsen, 2015), poliestireno cargado negativa o positivamente (Beck-Broichsitter, Ruppert, Schmehl, Günther, & Seeger, 2014) o NP metálicas, induce la inactivación de SP. Las NP de hidroxiapatita inyectadas en la subfase del SP Infasurf por ejemplo, causa un desplazamiento significativo hacia la izquierda en las isotermas de compresión dependiente del tiempo; esto quiere decir que se requiere más reducción de la superficie para aumentar la presión superficial, indicando la inactivación de surfactante (Fan, Wang, Zhao, Loo, & Zuo, 2011). Por lo tanto, se debe probar que las NP en contacto con el SP no induzcan la inactivación del surfactante.

De este modo, cuando se piensa en formulaciones de NP inhalables se debe tener en cuenta que estas no sólo tienen que sobrevivir al estrés de la nebulización, al almacenamiento y lograr un *delivery* de fármacos después de cruzar una monocapa de surfactante, sino que también se debe garantizar la seguridad para la función respiratoria.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Materiales

El surfactante pulmonar PROSURF fue provisto por la empresa Nialtec S.A. (Buenos Aires, Argentina).

4.3.2 Preparación de nanovesículas

La preparación de L, ARQ y ApH y LpH se realizó como se describe en el **Capítulo 3, Sección 3.3.2.i.**

4.3.3 Preparación de vesículas de SP

PROSURF es una suspensión en cloroformo estéril que contiene lípidos y proteínas extraídas por medio de lavado broncoalveolar de pulmones de origen bovino. PROSURF se compone de fosfolípidos en un 94,8% (de los que un 46% es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)); colesterol 4,4% y proteínas (SP-B, SP-C) 0,8% (Hager & DePaoli, 2001). El cloroformo fue evaporado a baja presión y por debajo de 40°C; la película lipidica fue resuspendida en solución salina estéril (0,9% NaCl) a 50°C, obteniendo una concentración de fosfolípidos final de 30 mg/mL, correspondiente a 41 mM de DPPC (vesículas de SP).

4.3.4 Caracterización de nanovesículas

La cuantificación de LT y las medidas de tamaño promedio, pdi y potencial ζ se realizaron como se describe en el **Capítulo 2, Sección 2.3.5.**

4.3.5 Preparación de nanovesículas marcadas con HPTS/DPX y RhPE

Para preparar las nanovesículas marcadas con HPTS/DPX y RhPE se utilizó el procedimiento descrito en el **Capítulo 3, Sección 3.3.2.ii.**

4.3.6 Crecimiento de células J774A.1

Las células J774A.1 fueron crecidas como se describe en el **Capítulo 2, Sección 2.3.9.**

4.3.7 Nebulización de nanovesículas marcadas con HPTS/DPX-RhPE en células J774A.1 cubiertas por monocapas por SP

La presión superficial (π) se define como el grado en el que una monocapa reduce la γ de una interfaz limpia; denota la fuerza ejercida por una película interfacial en sus límites de confinamiento lineal, con unidades de fuerza/longitud (Piknova, Schram, & Hall, 2002). π_{eq} es la presión superficial máxima de monocapas comprimidas en una interfaz aire/agua bajo condiciones de equilibrio. Una compresión adicional induce el colapso de la interfaz bidimensional y se forman estructuras tridimensionales (Lee, Kim, & Needham, 2001) pero no se produce un aumento en la densidad de la monocapa o en la presión superficial (Horie & Hildebrandt, 1971; Schürch, Goerke, & Clements, 1978).

Las células J774A.1 se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 1,5 x 10^5 células por pocillo. Después de 24 horas de crecimiento, el medio de cultivo se reemplazó por 300 µL de PBS. Se extendió una solución de SP en cloroformo (3,1 mg/mL) sobre la interfaz acuosa de PBS para obtener una presión superficial (π) aproximada de 10 ± 1 mN/m o 45 ± 1 mN/m π, valor cercano a πe, la presión superficial de equilibrio de las fosfatidilcolinas. Se utilizó un nebulizador Omron NE-U22 de malla vibratoria, adaptado para reducir el flujo de salida a una velocidad de 5 µL/min, para nebulizar las suspensiones acuosas de nanovesículas con una concentración de 2,5 mg/mL de LT en la superficie de cada monocapa de Prosurf durante 1 minuto. Luego las células se incubaron durante 3 horas a 37ºC, se lavaron, tripsinaron y resuspendieron en PBS y un total de 1 x 10^4 células fueron analizadas por citometría de flujo. Se analizó la fluorescencia verde de HPTS en FL-1, mientras que para la RhPE la fluorescencia roja se analizó en FL - 3.

Luego se normalizó la fluorescencia a la relación de HPTS/total de lípidos y de RhPE/total de lípidos de cada formulación. La estabilidad coloidal de las nanovesículas nebulizadas a través de la monocapa de SP, antes de ser absorbidas por las células, se determinó midiendo el % de HPTS encapsulado en los sobrenadantes celulares después de 3 horas de nebulización. La captura y la pH-sensibilidad subcelular de las nanovesículas doblemente marcadas RhPE-HPTS / DPX fue seguido por la fluorescencia de RhPE, mientras que la fluorescencia de HPTS indicó su grado de *dequenching* subcelular, o pH-sensibilidad.

4.3.8 Perturbación mutua de la bicapa de vesículas de SP y nanovesículas:

4.3.8.i Polarización generalizada (GP) y anisotropía de fluorescencia (AF) de Laurdan en vesículas de SP

El orden y la fluidez de la bicapa de SP, luego de ponerse en contacto con las nanovesículas, fueron evaluados determinando, respectivamente, GP y AF de Laurdan en las vesículas de SP. Las vesículas de SP se marcaron con Laurdan mezclando 10 µL de una solución de Laurdan 120 mM en metanol con un volumen de vesículas de SP suficiente para obtener una proporción de 1:20 mol:mol Laurdan:lípidos. Después de 30 minutos, se añadieron las nanovesículas a las vesículas de SP en una relación de 1:0,1 PS:nanovesículas m:m y la mezcla se incubó a temperatura ambiente. Se determinó el tamaño promedio, GP y AF de las bicapas de vesículas de SP en función del tiempo. GP se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$GP = I_{440} - I_{490} / I_{440} + I_{490}$$ **Fórmula 1**

Donde I_{440} y I_{490} son las intensidades de fluorescencia a $\lambda_{emisión}$ 440 nm y $\lambda_{emisión}$ 490 nm respectivamente a partir de los espectros de emisión entre 400-520 nm a $\lambda_{exitación}$ 364 nm ($Slit_{ex}$:5,0 nm y $Slit_{em}$:10,0 nm. Velocidad de scan: 100 nm/minuto)

AF se calculó mediante el software del fluorométro LS55 Perkin Elmer de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$AF = (I_0 - GI_{90}) / (I_0 + 2GI_{90})$$ **Fórmula 2**

Donde I_0 e I_{90} son las intensidades de fluorescencia a $\lambda_{emisión}$ 440 nm con $\lambda_{exitación}$ 364 nm y el polarizador de excitación fue orientado a 0 y 90 ° respectivamente. El factor de corrección (G) se obtuvo de la relación de la intensidad de emisión a 0 y 90 ° con el polarizador de excitación orientado a 90 ° (después de la substracción de la dispersión de luz).

4.3.8.ii GP y AF de Laurdan en las nanovesículas

De forma similar, el orden y la fluidez de las bicapas de las nanovesículas, luego de entrar en contacto con las vesículas de SP, fueron evaluados por GP y AF de Laurdan. En este caso Laurdan fue incubado con las nanovesículas durante 30 minutos y el SP se agregó luego. Las medidas se realizaron empleando las mismas condiciones experimentales que en la **sección anterior 4.3.8.i**

4.3.8.iii Liberación del contenido interno de las nanovesículas

La liberación de HPTS de las nanovesículas luego de ponerse en contacto con las vesículas de SP, fue determinada en función del tiempo. Brevemente, las nanovesículas-HPTS-DPX fueron incubadas 1,5 y 20 horas a 25 °C en 10 mM de buffer Tris-HCl con las vesículas de SP en la misma proporción que en la **sección 4.3.8.i**. El porcentaje de HPTS liberado se calculó como sigue: $(IF/IF_{Triton\ X\text{-}100}) \times 100$. Donde IF es la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{emisión}$ 515 nm y $\lambda_{exitación}$ 413 nm en cada punto de tiempo, y $IF_{Triton\ X\text{-}100}$ es la intensidad de fluorescencia después de añadir Triton X-100 al 1% m/v.

Además, el tamaño medio de los nanoliposomas y las vesículas de SP se determinó por dispersión dinámica de la luz.

4.3.9 Efecto de las nanovesículas sobre la presión superficial (π) durante los ciclos de expansión-compresión

Las isotermas de presión superficial vs área (π vs A) se realizaron en el equipo KSV (240 cm^2 de área) con una balanza de Wilhelmy proporcionada por una sonda de Platinum (39,24 mm^2) (KSV-NIMA, Finlandia). Todo el equipo se encerró en una caja de acrílico para minimizar la evaporación del solvente y evitar contaminaciones del ambiente durante el estudio. Primero se determinó una isoterma de compresión para la monocapa de Prosurf. Para ello, se preparó una monocapa de SP diseminando una solución de SP en cloroformo (3,1 mg/mL) en la interfaz acuosa de buffer Tris-HCl 10 mM y se dejó estabilizar durante 30 minutos. Después de eso se sometió a la monocapa a una compresión con una tasa de 5 mm/minuto.

La presión superficial es un valor que reporta el equipo y se calcula a partir de la Fórmula 3.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \qquad \textbf{Fórmula 3}$$

Donde π es la presión superficial de la monocapa, γ_0 es la tensión superficial inicial de la fase acuosa sola (~ 72 mN/m, buffer Tris pH 7,4 con NaCl 0,9 % m:v) y γ es la tensión superficial medida por el equipo.

Las tasas compresión y expansión de monocapas de SP fueron de 5 mm/minuto, la π *target* se fijó en 30 mN/m (compresión) y la temperatura fue 20 ± 2°C. Las nanovesículas se inyectaron en la subfase a una concentración final de 10 µg/mL cuando la monocapa alcanzó una π de 30 mN/m, al final de la primera compresión. Después de cada medida, la cuba de KSV se limpió exhaustivamente con agua ultrapura y se comprobó que la γ fuera de 72 mN/m. La π y las barreras fueron controladas por el software NIMA (KSV-NIMA, Finlandia). Los experimentos de control en ausencia de nanovesículas también se llevaron a cabo en las mismas condiciones, extendiendo la misma cantidad de SP en la superficie.

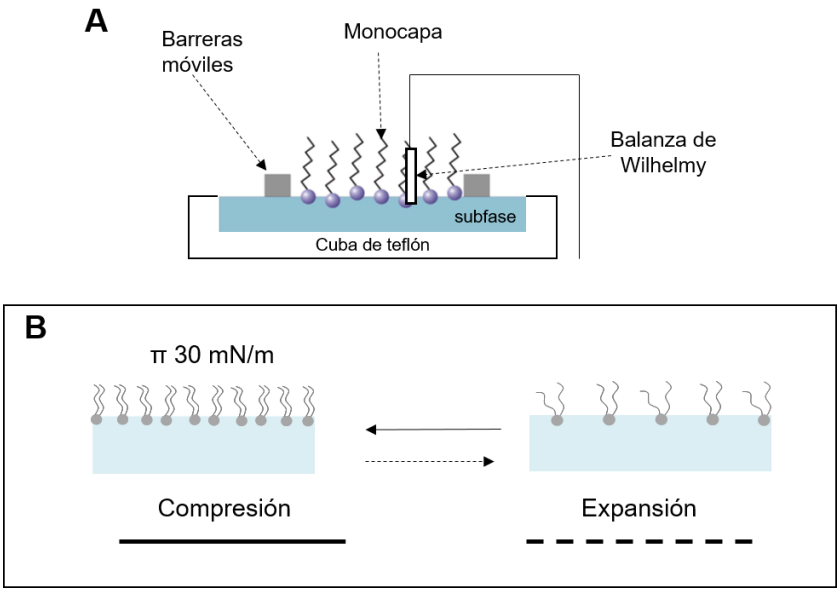


Figura 2. a) Esquema del equipo KSV con una monocapa de tensoactivo en la interfase aire/agua y b) ciclo de compresión y expansión de una monocapa de SP comprimida hasta 30 mN/m.

4.3.10 Efecto de nanovesículas en un área constante

4.3.10.i Nanovesículas inyectadas en la subfase acuosa

Se diseminó una solución de SP en cloroformo (3,1 mg / mL) en una interfase acuosa de buffer Tris-HCl 10 mM con NaCl 0,9 % m/v para obtener una presión superficial inicial de 10 ± 1 mN/m, 30 ± 1 mN/m y 45 ± 1 mN/m respectivamente, en un equipo Kibron µtrough S (13,6 cm^2 área, 8 mL subfase) (Kibron,Finland). Los cambios en la presión superficial de la monocapa de SP tras la inyección en la subfase se registraron en función del tiempo, hasta llegar al valor de una presión constante. La concentración final de nanovesículas fue de 0,3 y 10 µg/mL respectivamente. Con el fin de evitar la evaporación del disolvente y la contaminación del ambiente durante el ensayo, todo el equipo fue encerrado en una caja de acrílico. Después de cada medida, la cuba se limpió exhaustivamente con agua ultrapura y se comprobó que la γ fuera de 72 mN/m. En todos los ensayos, se mantuvo la temperatura a 20 ± 0,5 ° C.

4.3.10.ii Nanovesículas nebulizadas

Empleando condiciones idénticas que en la **sección anterior 4.3.10.1**, las nanovesículas fueron nebulizadas durante 1 minuto sobre la monocapa formada, seguido de una segunda dosis 15 minutos más tarde. Las dosis

totales fueron de 0,06 o 1,5 µg de LT. Después de eso se dejó estabilizar la monocapa otros 15 minutos.

4.3.11 Análisis estadístico

Los analisis estadisticas se realizaron usando el test de Dunnet con Prisma 6.0 Software (Graph Pad, CA, USA). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$; n.s. es no significativo ($p > 0.05$).

4.4 Resultados

4.4.1 Isoterma de compresión de Prosurf y características estructurales de las nanovesículas

La isoterma de compresión del surfactante pulmonar Prosurf empleado en este trabajo mostró una presión de colapso (π_c) de ~60 mN/m (Fig. 4), un valor similar al π_c del surfactante pulmonar de origen bovino para uso clínico Sorvanta (Laboratorios Abbott, North chicago, IL) (62 mN /m) y casi 10 mN/M menor a la del derivado porcino Curosurf (CHIESIUSA.com) y el derivado bovino Infasurf (ONYINC), (Zhang, Wang, Fan, & Zuo, 2011). Las características estructurales de las nanovesículas se muestran en la Tabla 1.

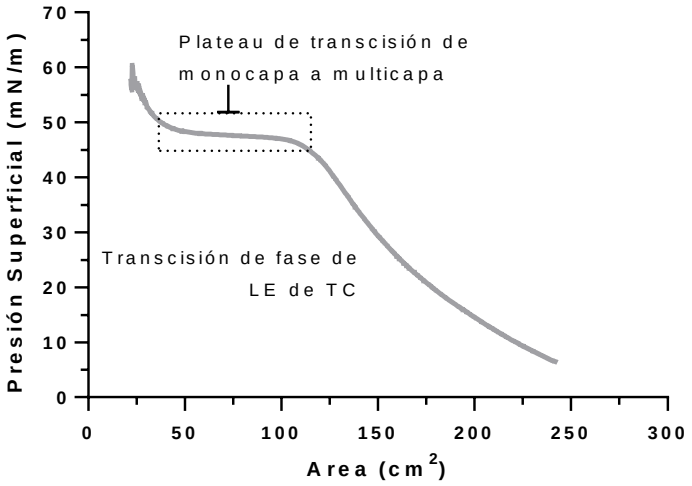


Figura 4. Isoterma de compresion expansion de monocapas de Prosurf. A medida que la presión superficial aumenta de 10 mN/m a 40 mN/m, ocurre la transcisión de fase liquido expandido a liquido cristalino (LE- TC), luego se caracteriza por un *plateau* entre 40 mN/m to 50 mN/m donde los dominios TC y LE coexisten, conocido como la presión superficial de equilibrio πe. Una mayor compresión de πe incrementa la presión superficial de la monocapa; en esta condición la interfase de monocapas interactúa con bicapas que excluidas en la subfase acuosa (Casals & Cañadas, 2012; Zuo, Veldhuizen, Neumann, Petersen, & Possmayer, 2008) hasta colapsar a 60 mN /m.

Tabla 1. Características estructurales de nanovesículas.

Muestra	Tamaño Promedio (nm)	pdi	Potencial ζ (mV)	Lípidos Totales (mg/ml)
L	271 ± 45	0,37 ± 0,08	-6,6 ± 0,8	5,6 ± 1,7
ARQ	179 ± 49	0,25 ± 0,06	-39,1 ± 7,1	7,2 ± 2,2
LpH	188 ± 18	0,22 ± 0,0	-20,2 ± 9,2	4,5 ± 2,2
ApH	174 ± 48	0,49 ± 0,33	-30,7 ± 13,0	6,0 ± 1,4
PS	1057 ± 293	0,64 ± 0,18	-20,5 ± 7,6	30 ± 2,5

Los resultados son el promedio ± DS de tres lotes de muestras independientes.

4.4.2 Absorción de nanovesículas nebulizadas y *delivery* citoplasmático en macrófagos J774A.1 cubiertos por una monocapa de SP

Como determinó en el Capítulo 3, la ruptura por estrés durante la nebulización induce una pérdida parcial de contenido acuoso de los nanovesículas. Luego de nebulizar las diferentes nanovesículas sobre el sobrenadante celular, estas se dejaron incubando 3 horas y luego se midió la cantidad de HPTS encapsulado. Como se muestra en la Tabla 2, mientras que los nanoliposomas perdieron casi la mitad del HPTS encapsulado, los ApH conservaron cerca del 75% de su contenido acuoso. No obstante, después de atravesar la monocapa de SP, no se produjo ninguna pérdida adicional de HPTS: después de ser nebulizado en buffer o en monocapas de SP a 10 o 45 mN/m, la cantidad de HPTS retenida permaneció sin alterar. Por otro lado, después de atravesar las monocapas de SP que cubren las células J774A.1, se observó que las nanovesículas ARQ y ApH, que contenían arqueolípidos, fueron capturadas en la extensión más alta (la señal mayor de RhPE), seguido de las LpH, mientras que no se registró ninguna captura de L (Fig. 5a). En consonancia con los resultados obtenidos en el Capítulo 3 sobre el *delivery* citoplasmático de ApH (las células sin monocapa de SP), los ApH mostraron, nuevamente, el *delivery* citoplasmático más alto, medido a través de la señal más intensa de HPTS. Los ARQ, si bien que fueron capturados en igual medida que ApH, no liberararon su contenido acuoso (HPTS) al citoplasma celular debido a su falta de sensibilidad al pH. También observamos que a 45 mN/m (valor cercano al πe de las fosfatidilcolinas) la captura y posterior *delivery* citoplasmático de ApH parece disminuir ligeramente, en comparación con aquel a 0 o 10 mN /m (Fig. 5b). En general, observamos que al menos una fracción

de nanovesículas nebulizadas atravesó la monocapa de SP de manera intacta. Después de entrar en la subfase, las nanovesículas fueron capturadas por las células y procesadas de acuerdo con las características estructurales de cada una. La captura y posterior *delivery* citoplasmático, ligeramente menores a πe, sugieren que durante el ciclo respiratorio la captura de nanovesículas nebulizadas seguiría una relación inversa con la presión superficial, siendo probablemente más baja cuando la monocapa de SP está completamente comprimida muy por encima de πe.

Tabla 2. HPTS encapsulado en nanovesículas 3 h después de nebulizar sobre una monocapa de SP que recubría las células J774A.1.

Sobrenadante celular	Presión Superficial (mN/m)	HPTS encapsulado (%)
L	0	47,7 ± 0,1
	10	55,7 ± 1,9
	45	61,7 ± 4,9
ARQ	0	58,9 ± 3,9
	10	47,5 ± 8,1
	45	55,5 ± 1,5
LpH	0	69,2 ± 4,6
	10	67,5 ± 2,5
	45	63,0 ± 1,3
ApH	0	74,2 ± 6,4
	10	77,0 ± 1,1
	45	75,2 ± 3,6

.

4.4.3 Perturbación mutua de la bicapa de vesículas de SP y nanovesículas

Laurdan es una sonda fluorescente que se incorpora en membranas lipídicas y es sensible al efecto de relajación del solvente. Esta sonda detecta las diferencias en el número/movilidad de las moléculas de agua asociadas al esqueleto de glicerol de los fosfolípidos de las bicapas de fosfatidilcolina (Beck-

Broichsitter et al., 2014; Chong & Wong, 1993; Parasassi, De Stasio, Ravagnan, Rusch, & Gratton, 1991).

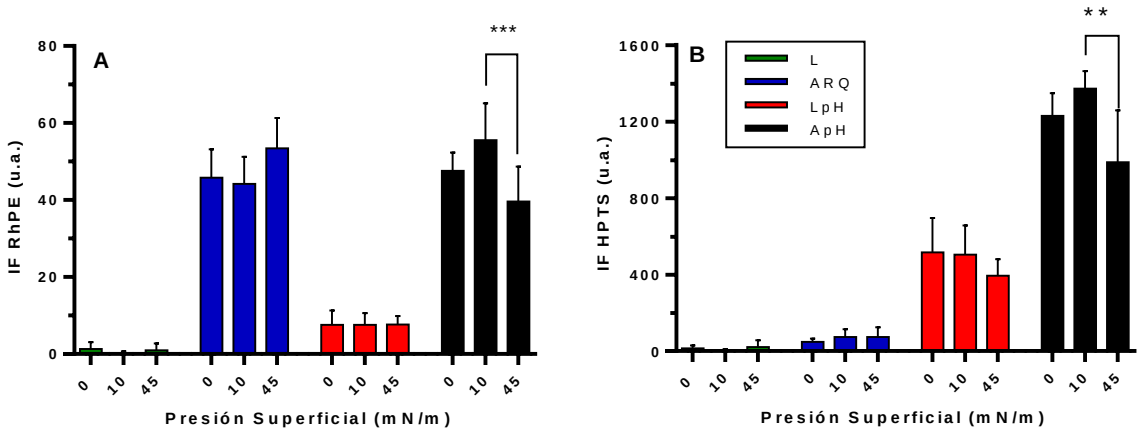


Figura 5. Intensidad de fluorescencia de RhPE (a) y HPTS (b) dentro de células J774A.1 luego de 3 horas post nebulización de nanovesículas. Antes de la nebulización, cada pocillo se cubrió con SP con cantidades que corresponden con ~10 o 45 mN/m de presión superficial, teniendo en cuenta la relación de masa de lípidos/área previamente determinada en las isotermas de Prosurf.

Tras la excitación, el momento dipolo de Laurdan aumenta notablemente, y las moléculas de agua en la vecindad de la sonda se reorientan alrededor de este nuevo dipolo. Por consiguiente, Laurdan es sensible a las transiciones de fase de membrana y otras alteraciones a la fluidez de la membrana (Harris, Smith, & Bell, 2001; Sheffield et al., 1995). Cuando la membrana está en una fase fluida, la tasa de reorientación es más rápida que el proceso de emisión y, en consecuencia, se observa un desplazamiento de color rojo a $\lambda_{excitación}$ 340 nm desde aproximadamente 435 nm a aproximadamente 480 nm (Sheffield et al., 1995). Cuando el empaquetamiento de la bicapa aumenta, algunas de las moléculas de agua son excluidas de la bicapa y la tasa de relajación dipolar de las restantes moléculas de agua es más lenta, llevando a un espectro de emisión que está significativamente menos desplazado al rojo. La polarización generalizada (GP) cuantifica este desplazamiento al rojo de los espectros de emisión. El "orden" se puede definir como el orden conformacional de las moléculas de fosfolípidos, (principalmente basado en las cadenas acilo) y la

“fluidez” como la capacidad de los lípidos de difundir en el plano de la bicapa y/o rotar (Wilson-Ashworth et al., 2006)). El cambio de fase desordenada a ordenada representa una pérdida de moléculas de agua de las bicapas.

En particular, el trabajo de (Harris, Best, & Bell, 2002) se demostró que cuando la fluidez de la membrana cambia pero el orden de los fosfolípidos permanece constante, se podría esperar que la anisotropía fluorescente de Laurdan (AF) cambie, pero no el valor de GP. Ya que la AF reporta cambios en la fluidez de la membrana mientras que GP es más sensible a las variaciones en el orden de la membrana (Harris et al., 2002), las perturbaciones mutuas en el orden y fluidez de las vesículas de SP en contacto con las nanovesículas se evaluaron por GP y AF de la sonda Laurdan.

4.4.3.i GP de las vesículas de SP

El orden de las bicapas (GP), de las vesículas de SP y de las nanovesículas solas fue: vesículas SP ~ L> [ApH ~ LpH] >>ARQ. Luego de incubar las vesículas de SP con las nanovesículas, el orden de las vesículas de SP (comparado con las vesículas SP solas) fue: vesículas SP ~ [vesículas SP-L]> [vesículas SP-(ApH, LpH)]> [vesículas SP-ARQ]. El contacto con L no modificó el orden de la bicapa de las vesículas de SP; ApH y LpH desordenaron de manera intermedia las bicapas de PS, mientras que el desorden más alto fue inducido por ARQ (Fig. 6a).

4.4.3.ii AF de las vesículas de SP

La AF de la bicapa de SP (inversamente relacionada con la fluidez) (Harris et al., 2002) y de cada nanovesícula sola fue: vesículas SP ~ L>ARQ> ApH> LpH. Luego de incubar las vesículas de SP con las nanovesículas, la AF de las vesículas de SP (comparado con las vesículas SP solas) fue: [vesículas SP-L]> vesículas SP ~ [vesículas SP- (ApH, LpH, ARQ)]. El contacto con L disminuyó ligeramente la fluidez de vesículas SP; el resto de las nanovesículas no tuvieron efecto sobre la fluidez de las vesículas de SP (Fig. 6b).

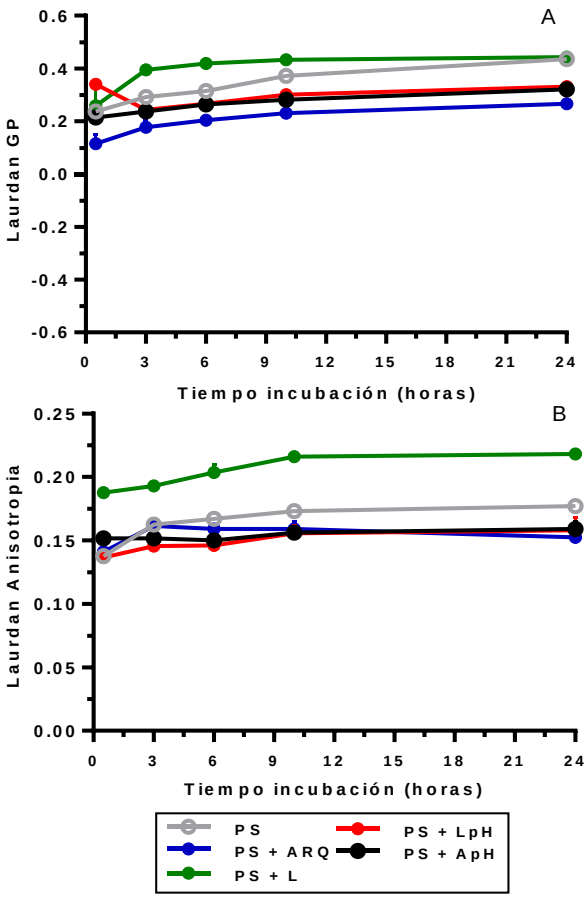


Figura 6. Laurdan: Polarización Generalizada (GP) (a) y Anisotropia de Fluorescencia (b) de vesículas de SP solo y después de incubarlas con nanovesículas, en función del tiempo.

4.4.3.iii **GP y AF de las nanovesículas**

Por otro lado, 24 horas después de incubar las nanovesículas con las vesículas de SP, el orden de las nanovesículas pH-sensibles y de los ARQ aumentó significativamente a valores cercanos a 0,2 (el valor de GP de vesículas de SP solas) (Fig. 7a), mientras que la fluidez de todas las nanovesículas disminuyó (Fig. 7b),

En resumen, excluyendo a los L, las nanovesículas no tuvieron efecto sobre la fluidez de las vesículas de SP. Sin embargo, se registró una perturbación mutua en el orden de la bicapa. El mayor desorden en las bicapas de SP fue inducido por ARQ; LpH y ApH indujeron menos desorden, mientras que el contacto con L no tuvo ningún efecto. En general, el orden de las bicapas de

SP pareció desplazarse hacia los valores típicos para cada tipo de nanoliposoma, sugiriendo la aparición de un flujo de lípidos desde lasnanovesículas (particularmente de ARQ) hacia las vesículas de SP. Este puede ser el motivo del desorden alto en las bicapas de SP incubadas con ARQ. A su vez, se sabe que los arqueolípidos forman una fase homogénea con fosfolípidos. (Carrer et al., 2014) y que las bicapas arqueolipídicas exhiben características estructurales peculiares diferentes de las bicapas de fosfolípidos, ya que aunque son muy entrópicas (desordenadas), muestran una permeabilidad relativamente baja y una difusión lateral reducida. (Kitano, Onoue, & Yamauchi, 2003).

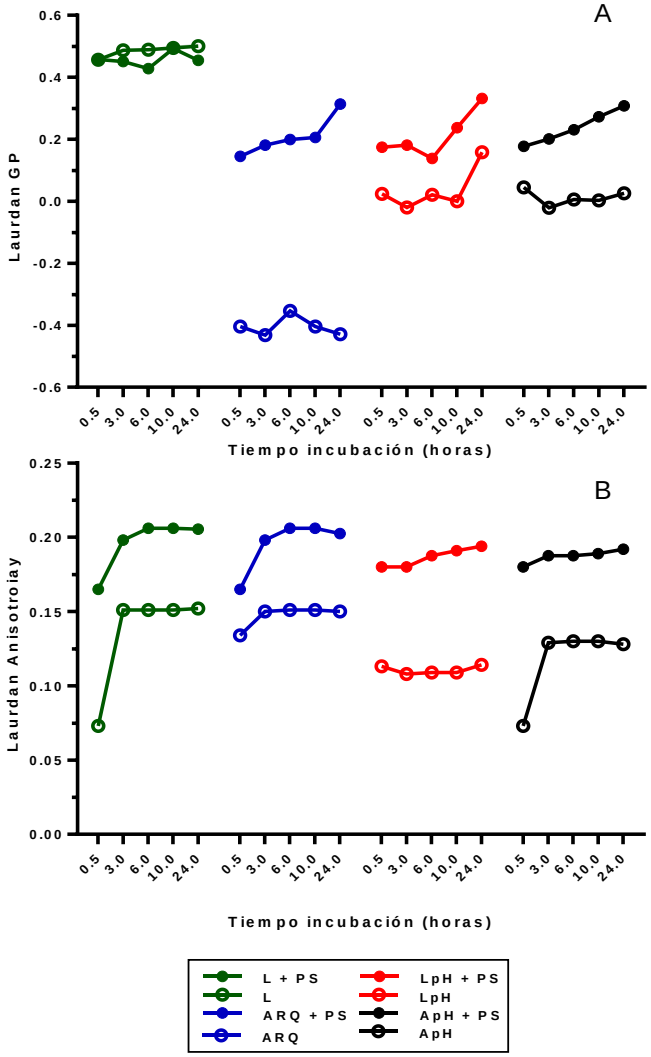


Figure 7. Laurdan: Polarización Generalizada (GP) (a) y Anisotropia de Fluorescencia (b) en nanovesículas y despues de incubarlas con vesiculas de SP, en función del tiempo.

La AF depende de la viscosidad del entorno molecular local, en este caso la bicapa; y también es inversamente proporcional a la tasa de rotación de Laurdan, un parámetro directamente relacionado con la fluidez de la bicapa (Harris et al., 2002).

Los valores de GP y AF de Laurdan de los ARQ indicaron bicapas desordenadas que tenían una movilidad lateral altamente reducida. Las vesículas de SP y las bicapas de los ARQ presentan baja fluidez (alta AF). Sin embargo, las bicapas de vesículas de SP están altamente ordenadas y se desordenan después de ponerse en contacto con ARQ.

4.4.3.iv Cambios de tamaño de las vesículas de SP y fuga de contenido interno de las nanovesículas

Después de que las nanovesículas con HPTS-DPX entraron en contacto con las vesículas de SP el tamaño medio de las vesículas de SP permaneció sin cambios (Fig. 8b). Además, como se muestra en la Fig. 8a no se registró liberación de HPTS de las nanovesículas.

4.4.4 Efecto de las nanovesículas sobre π, durante los ciclos de compresión-expansión (condición dinámica)

Al inyectar las nanovesículas en la subfase acuosa de monocapas de SP, π varió según cada tipo de estructural de nanovesícula (Fig. 9). El efecto de L y ARQ se registró durante el segundo ciclo de expansión: entre 30 y 0 mN/m (200 cm^2) para L y ~ 5 mN/m (175 cm^2) para ARQ, la expansión fue casi idéntica a la del SP solo (Fig. 9a). Desde estos puntos hasta el final de la expansión, π no disminuyó a 0, sino que aumentó a ~ 5 y ~ 25 mN/m, respectivamente (Fig. 9b, c). Por el contrario, LpH y ApH inmediatamente afectaron π a lo largo de la primera expansión. Entre 30 mN/m y ~ 9 mN/m (150 cm^2) para LpH y ~ 12,5 mN/m (150 cm^2) para ApH, la expansión fue casi idéntica a la de SP solo. Sin embargo, desde estos puntos hasta el final de la expansión, π no disminuye a 0, sino que se elevó a ~ 25 mN/m. La segunda compresión requirió sólo una reducción del área del 16% (hasta ~ 210 cm^2) para subir de 25 a 30 mN/m (Fig. 9d, e).

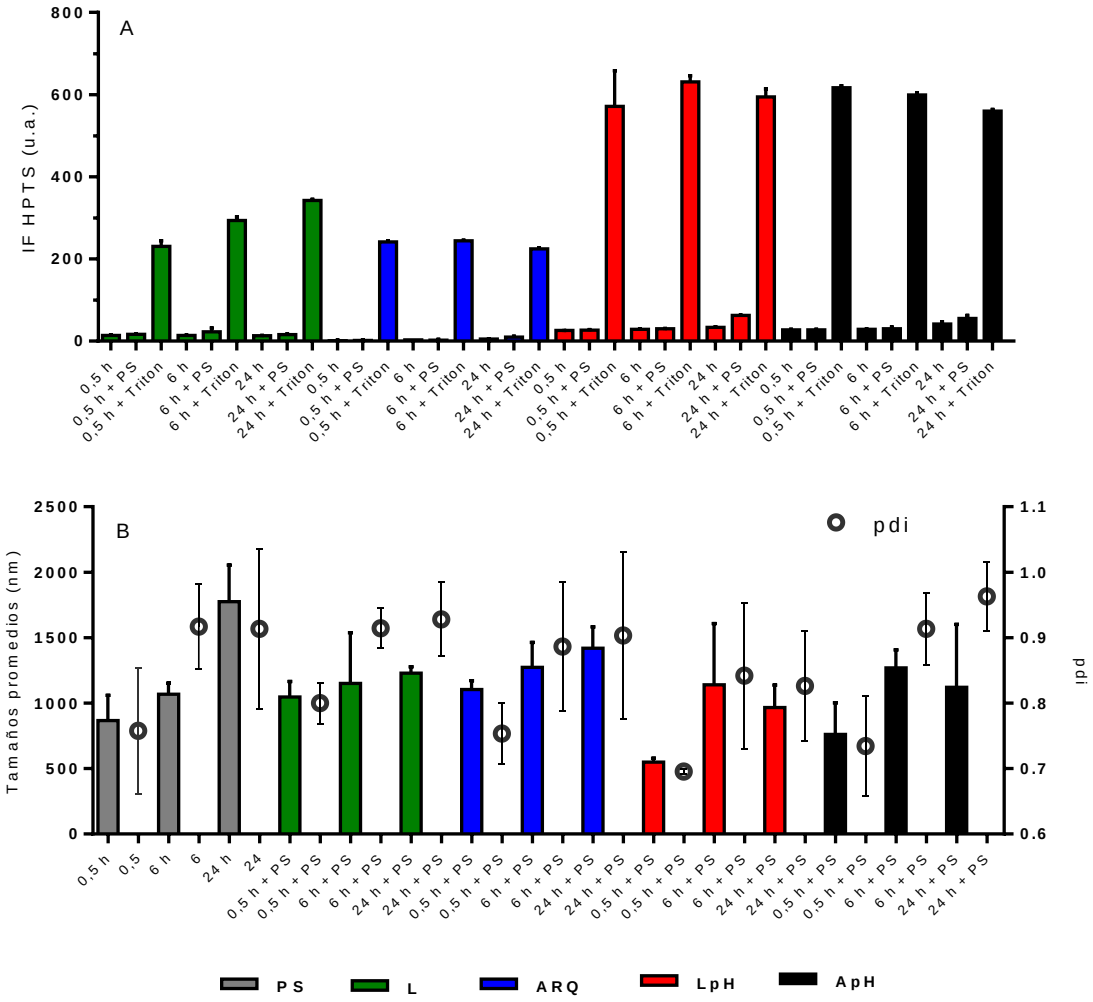


Figura 8. Tamaños e integridad estructural de nanovesículas, a) Liberación de HPTS del interior acuoso de las nanovesículas y b) tamaños, luego de incubarlas a las 0,5, 6 y 24 horas de incubación. La liberación total de HPTS se midió al disrumpir las nanovesículas con Tritón

En cambio, las monocapas de SP solas requirieron una reducción de la superficie del 60% (de 250 a ~ 100 cm^2) para elevar π de 0 a 30 mN/m. Esto significó que la inserción de nanovesículas pH-sensibles requirió una compresión casi 4 veces menor para alcanzar el valor máximo de π.

En conjunto, estos resultados sugieren que las nanovesículas pH-sensibles fueron adsorbidas rápidamente y que afectaron de manera pronunciada π a un grado de compresión relativamente alto (150 cm^2). ARQ y L se adsorbieron de manera más tardía y en monocapas más relajadas (>175

cm^2). De acuerdo con su capacidad para perturbar π, las nanovesículas se ordenan de la siguiente manera: ApH = LpH>ARQ>> L. Además, se determinó una relación directa entre la capacidad para insertarse en monocapas más comprimidas y el aumento de π: mientras que componentes de las nanovesículas pH-sensibles se insertaron en monocapas más comprimidas a 150 cm^2, los componentes de los ARQ lo hicieron en monocapas menos comprimidas a (175 cm^2), mientras que los componentes de los L necesitaron monocapas casi totalmente expandidas (200 cm^2).

4.4.5 Inyección en la subfase vs nebulización de nanovesículas en monocapas de SP (condición estática)

Dado que se observó que la interacción entre las nanovesículas y la monocapa de SP comenzó durante la expansión de la monocapa de SP, se testeó como afectaban la π, la inyección de una masa alta (80 µg) y baja (2,4 µg) de nanovesículas en la subfase de monocapas de SP expandidas, a una π fija de 10 mN/m. El efecto de 80 µg de nanovesículas pH-sensibles se observó después de 15 minutos, con π aumentando en un 50% (LpH) y un 75% (ApH) (Fig. 10a).

En general, los efectos de nanovesículas inyectadas coincidió con los datos anteriores sobre compresión-expansión: las nanovesículas pH-sensibles fueron adsorbidas más rápidamente y la π aumentó drásticamente. De acuerdo a su capacidad de perturbar π, las nanovesículas fueron ordenadas de la siguiente manera: ApH ~ LpH>ARQ ~ L. En una etapa posterior se ensayó el efecto de las nanovesículas nebulizadas en monocapas de SP expandida a 10 mN/m. Esta vez se encontró que después de 15 minutos, 1,5 µg de nanovesículas pH-sensibles fueron suficientes para aumentar π en un ~ 80% para LpH y en un 140% para ApH. Notablemente, los ARQ también aumentaron π en un 60%. Estos resultados sugieren que la nebulización indujo una diseminación más rápida de los lípidos sobre las monocapas y un aumento más eficiente de π, alcanzado con ~ 53 veces menos masa que si se inyectase en la subfase (Fig. 10b). Según su capacidad de perturbar π, las nanovesículas se ordenan como sigue (de manera similar a aquellas inyectadas durante la compresión-expansión): ApH> LpH>ARQ> L.

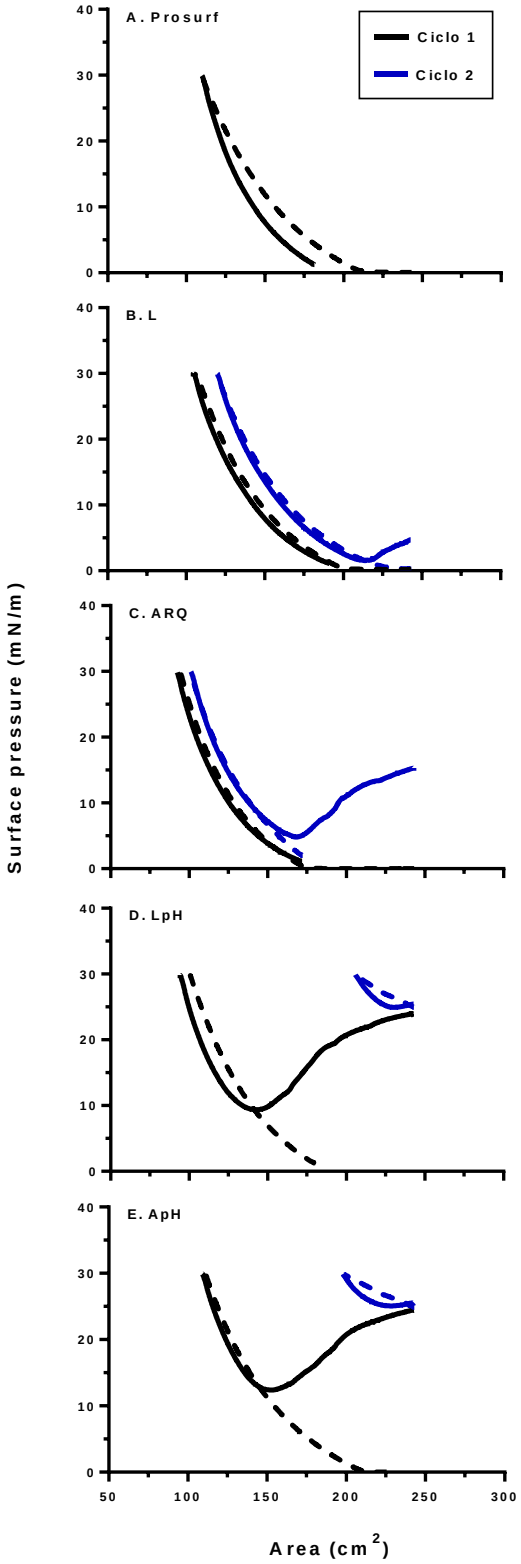


Figura 9. Isotermas de Compresión-expansión de SP. Las nanovesículas se inyectaron en la subfase en la primera compresión a 30 mN/m de presión superficial. Línea continua: expansión y línea llena: compresión.

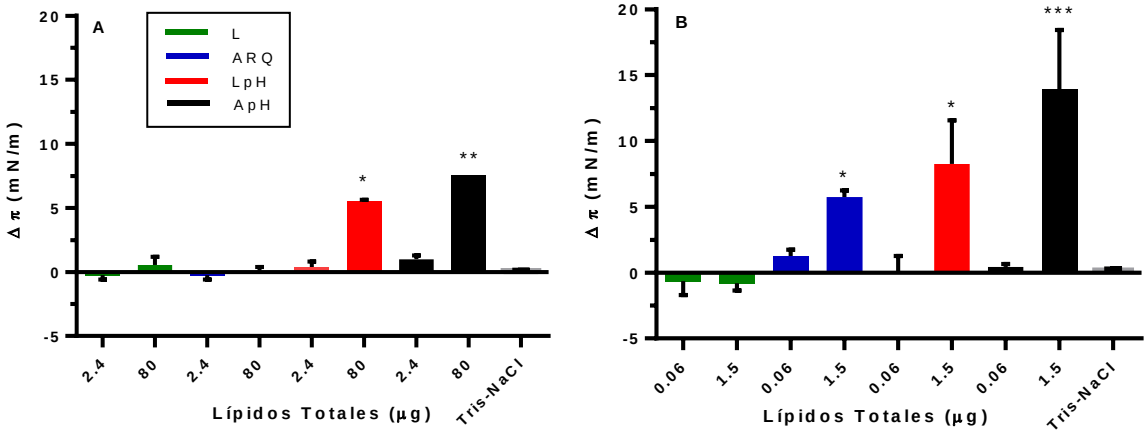


Figura 10. Variación de la presión superficial de la monocapa de SP luego de 15 minutos de inyección en la subfase acuosa (a) o nebulización (b) de nanovesículas. La presión inicial fue de 10 mN/m.

Finalmente, se probó el efecto de las nanovesículas nebulizadas en monocapas de SP a diferentes grados de compresión. Una masa de 1,5 µg de nanovesículas generó aumentos menos pronunciados en las monocapas de SP con π a 30 mN/m, siguiendo una tendencia similar a aquella de la monocapa expandida. Sin embargo, a 45 mN/m no se registraron cambios en π. Esto puede interpretarse como un umbral entre 30 y 45 mN/m de π, por encima de la cual los monómeros tensoactivos ya no pueden insertarse en la monocapa (Fig. 11).

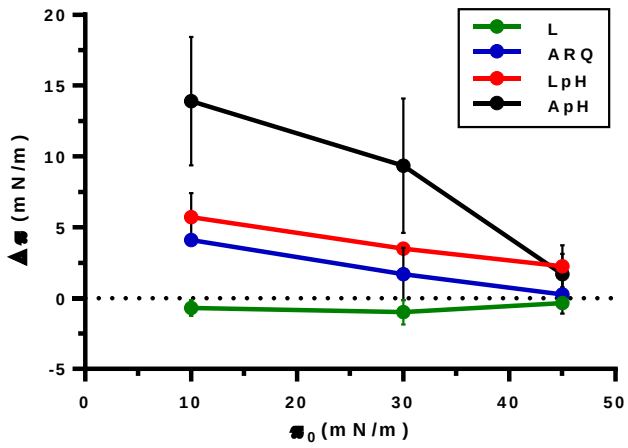


Figura 11. Variación de presión superficial de monocapa de SP 15 minutos después de la nebulización de nanoliposomas sobre monocapas con presión superficial inicial de 10, 30 and 45 mN/m.

4.5 Discusión

Las nanovesículas nebulizadas para el *delivery* de fármacos citoplasmáticos, tales como los ApH, están pensadas para ser endocitadas de manera intacta. En el **Capítulo 3** se demostró que los ApH son parcialmente sensibles a la ruptura por el estrés producto de la nebulización, ya que cerca de un tercio de su contenido interno se pierde. Además, recientemente en el trabajo de (Stetten et al., 2016) se muestra que la nebulización induce la liberación de monómeros lipídicos de la bicapa de las nanovesículas, un hecho que potencialmente podría conducir a la pérdida del contenido hidrofílico Hasta ahora, no existen datos disponibles sobre el destino de nanovesículas nebulizadas a través de monocapas de SP. La combinación de la ruptura debido al estrés de la nebulización junto a la potencial barrera física del SP, podría conducir a una disminución, o incluso a la eliminación, de la cantidad de nanovesículas intactas que accedan a las células.

Sin embargo en la primera sección de este Capítulo se pudo demostrar que una fracción de nanovesículas sobrevivió a la nebulización y posterior pasaje a través de la monocapa de SP, llevando eficientemente su carga al citoplasma de los macrófagos J774A.1. En segundo lugar, se llevaron a cabo algunas determinaciones biofísicas básicas destinadas a caracterizar la interacción entre el SP y nanovesículas para predecir la potencial inactivación de surfactante. Primero se determinó el tamaño, orden y fluidez de vesículas de SP al ponerse en contacto con nanovesículas de diferente composición. Luego se estudió el efecto de nanovesículas inyectadas o nebulizadas sobre la presión superficial de una monocapa de SP en condiciones dinámicas y estáticas.

El primer hallazgo fue que no se produjo un cambio de tamaño de las vesículas de SP al entrar en contacto con las nanovesículas. La reducción de tamaño de las vesículas de SP se asocia a la inactivación del SP (R. Veldhuizen et al., 1997; R. A. VELDHUIZEN, Li-Juan, HEARN, POSSMAYER, & LEWIS, 1996). Mientras que vesículas grandes de SP (en el orden de varios

micrómetros de diámetro) representan los componentes con actividad surfactante de la SP, las vesículas más pequeñas muestran una adsorción lenta e incapacidad de alcanzar una baja γ (R. Veldhuizen et al., 1997; R. A. VELDHUIZEN et al., 1996). Las NP de hidroxiapatita por ejemplo, además de cambiar la forma de las isotermas de compresión, inducen la reducción de tamaño de las vesículas de SP (Fan et al., 2011). Este hecho se explica por la pérdida de proteínas hidrofóbicas catiónicas B y C (Hochachka & Mommsen, 1998; Possmayer, Nag, Rodriguez, Qanbar, & Schürch, 2001; Rodriguez-Capote, Nag, Schürch, & Possmayer, 2001) del SP que se particionan en la superficie de las NP. B y C son proteínas transmembrana que inducen la fusión vesicular y promueven la formación de vesículas grandes y con actividad surfactante. La pérdida de proteínas B y C induce una π de la monocapa del SP, ya que impide la adsorción/diseminación adicional de SP. Tales proteínas garantizan una re-extensión eficiente de la película interfacial durante la expansión, esencial para mantener la π_{eq} durante la inhalación (Hochachka & Mommsen, 1998; Possmayer et al., 2001), y son importantes para minimizar la energía requerida para expandir la interfaz alveolar y estabilizar el epitelio pulmonar. La reducción del tamaño de las vesículas de SP al entrar en contacto con agentes deletéreos se considera un indicador significativo de la degradación de surfactante (R. Veldhuizen et al., 1997; R. A. VELDHUIZEN et al., 1996). Aquí no fueron detectados cambios en el tamaño de las vesículas de SP, lo que sugiere que, a diferencia de las NP rígidas ("*hard*"), las nanovesículas no indujeron la pérdida de proteínas hidrófobas de las vesículas de SP.

Sin embargo, a pesar de la ausencia de pérdida de proteínas B y C, se encontró una perturbación estructural mutua entre las nanovesículas y las vesículas de SP. Las nanovesículas ApH, por ejemplo, disminuyeron ligeramente el orden de las bicapas de SP, al mismo tiempo que aumentaron significativamente el suyo. Esto sugirió la existencia de un intercambio de lípidos entre las vesículas de SP y las nanovesículas. Debido a la naturaleza química de las nanovesículas, tal intercambio puede modificar la fluidez y por lo tanto las propiedades tensioactivas de la monocapa de SP. Las monocapas lipídicas que a temperatura corporal están en fase liquida expandida (LE), como

DOPC bajo compresión cuasi elástica, colapsan en la πeq. En contraste, DPPC –el fosfolípido saturado mayoritario del SP- forma monocapas a 37°C que bajo compresión, se pasan de una fase LE a una fase de estructuras cristalinas (TC), y no colapsan por encima de πe (Gugliotti & Politi, 2001; Rugonyi, Biswas, & Hall, 2008; Watkins, 1968). Por lo tanto la fase TC es necesaria para evitar el colapso de la monocapa bajo compresión (Yan, Biswas, Laderas, & Hall, 2007). En este contexto, agentes fluidificantes, como lisoderivados, ácidos grasos o fosfolípidos insaturados (tales como DOPE en nanovesículas pH-sensibles) pueden, por un lado - y con la ayuda de proteínas B y C (Lhert, Yan, Biswas, & Hall, 2007) - ser necesarios para la propagación/adsorción normal de SP (Notter, 1984), y por otro lado, dado que los agentes fluidificantes son inductores de fase LE, pueden favorecer el colapso de una monocapa comprimida (Gugliotti & Politi, 2001; Lee et al., 2001). Otro ejemplo del doble papel desempeñado por los agentes fluidificantes son los lisoderivados tales como lisofosfatidilcolina, que forman micelas curvadas positivamente que pueden prevenir la formación de estructuras H_{II} por otros lípidos, inhibiendo la adsorción del propio SP (Biswas, Rananavare, & Hall, 2007). En resumen, los agentes fluidificantes inhiben activamente el SP mediante múltiples mecanismos (Lopez-Rodriguez & Pérez-Gil, 2014). Sin embargo, encontramos que ninguna de las nanovesículas estudiadas (incluso las nanovesículas pH-sensibles que contienen DOPE), aumentaron la fluidez de las vesículas de SP. Más bien al contrario, la ligera interacción con L disminuyó la fluidez del SP.

Curiosamente, cuando se inyectaron las nanovesículas en la subfase de monocapas de SP comprimido a 30 mN/m, afectaron la π a lo largo de la expansión posterior, que en lugar de disminuir a 0 mN / m, creció. En particular, las nanovesículas pH-sensibles inyectadas desplazaron π de 0 a 25 mN/m (casi el valor π de 30 mN /m de la monocapa comprimida de SP sola). Tal comportamiento sugirió no sólo la ausencia de inactivación, sino la mejora de la función tensoactiva de la SP. El aumento más alto de π fue causado por nanovesículas pH-sensibles, estructuras que por debajo de pH 5,5 -debido al contenido de CHEMS:DOPE- experimentan una transición de fase lamelar a hexagonal H_{II} (Andresen, Jensen, & Jørgensen, 2005; Chu, Dijkstra, Lai, Hong, & Szoka, 1990; Venugopalan et al., 2002). La fase hexagonal H_{II} mediaría la

adsorción/fusión de bicapas sin las proteínas tensioactivas con las monocapas en la interfase (Biswas et al., 2007; Perkins et al., 1996; Yu, Harding, & Possmayer, 1984) y probablemente desempeñó un papel en la interacción entre los ApH, los LpH y la monocapa de SP. Por otro lado, ARQ afectó la π en la segunda expansión y se mostró más lento y con una cinética menos pronunciada de adsorción/fusión que las nanovesículas pH-sensibles, probablemente debido a la falta de fase H_{II}, al igual que L, que no afectó π durante las dos expansiones-compresiones.

La inactivación del SP causada por las NP de hidroxiapatita se describe como un desplazamiento hacia la izquierda dela isoterma de π vs. área (Fan et al., 2011). En otras palabras, la presencia de NP inactivadoras contrarresta el aumento de π inducido por la compresión. Aquí mostramos que, en oposición a esto, las nanovesículas pH-sensibles desplazaron la curva hacia la derecha: una ligera compresión indujo una π más alta que en ausencia de nanovesículas. El aumento de π implicaría una reducción en el esfuerzo de expansión mecánica durante la inspiración. Como se discute más adelante, tales resultados alentadores no tienen necesariamente un paralelo fisiológico.

Finalmente comparamos la capacidad de nanovesículas inyectadas vs nebulizadas para alterar la π de las monocapas de SP. Nuestros resultados indicaron que siempre se incrementó π según la naturaleza química, concentración, tiempo de contacto y vía de administración de cada nanovesícula. Las nanovesículas nebulizadas causaron el mayor impacto en π, a dosis ~53 veces menores que las inyectadas en la subfase. La razón de este fenómeno radica en el efecto disruptivo de la nebulización en la bicapa de la nanovesícula. Se sabe que las nanovesículas DPPC intactas disminuyen ligeramente la tensión superficial del agua, en una medida dependiente del procesamiento de lípidos (Kim & Franses, 2005; Wen & Franses, 2001). Esto se debe a la concentración micelar critica de los fosfolípidos monoméricos (las especies dominantes en disminuir la tensión superficial) en equilibrio con dispersiones acuosas de nanovesículas es extremadamente baja, entre 10^{-8}-10^{-10} M (Buboltz & Feigenson, 2005; Kim & Franses, 2005; Smith & Tanford, 1972). La γ de la monocapa de SP sólo se ve afectada por nanovesículas en la subfase luego de que estas difunden y se rompen produciendo monómeros

lipídicos tensoactivos que se incorporan a la monocapa preexistente (Launois-Surpas et al., 1992). En comparación con las nanovesículas que no eran pH-sensibles, las nanovesículas pH-sensibles inyectadas en la subfase aumentaron π, probablemente debido a la mejor adsorción/propagación permitida por la estructura H_{II}. El aumento de π causado por la inyección en la subfase fue sin embargo más lento y menos pronunciado en comparación con la inducida por la nebulización. Esto se debió probablemente a la ruptura generada por el estrés de la nebulización, responsable de la generación de monómeros tensoactivos. En el trabajo de (Stetten et al., 2016) demostraron que la nebulización de vesículas multilamelares de DPPC puro y de dimiristoilfosfatidilcolina (utilizando un nebulizador similar al que se utiliza en este trabajo) rompió las vesículas y creó una gran superficie de pequeñas gotas en las que se pueden almacenar lípidos monoméricos (Stetten et al., 2016). Sin embargo, los resultados discutidos arriba solo se obtuvieron en monocapas expandidas a 10 mN/m. Cuando la π se incrementó a 30 mN/m el impacto de las nanovesículas nebulizadas menos pronunciado, mientras que a πe, la nebulización no afecto la presión.

Las conclusiones derivadas de estos enfoques experimentales simples pueden agruparse en tres bloques: en el primer bloque, podemos afirmar que al menos una fracción de nanovesículas nebulizadas permanecieron estructuralmente estables después de atravesar una monocapa de SP, manteniendo la capacidad de llevar a cabo un *delivery* citoplasmático exitoso. Esto significaría que es factible el uso terapéutico de nanovesículas pH-sensibles nebulizadas para el *delivery* citoplasmático dirigido a células target, a pesar de ser materia sensible a la ruptura (debido al estrés de la nebulización y la interacción con la barrera de surfactante) a lo largo del camino hacia las células. En el segundo bloque, se demostró que las nanovesículas nebulizadas sólo pueden aumentar la función tensoactiva de una monocapa de SP, cuando la monocapa está lo suficientemente relajada por debajo de π_{eq}, esto es, fuera del rango fisiológico. Esto significaría que es poco probable que ocurra, *in vivo,* perturbaciones en la función tensoactiva del surfactante pulmonar inducida por nanovesículas nebulizadas. Tercero, podemos concluir que si bien *in vivo* no ocurriría la inserción de monómeros en la monocapa de SP, sí podría ocurrir el

paso de nanovesículas a través de la misma. El hecho de que el *delivery* citoplasmático a través de ApH decreciera ligeramente a través de monocapas en π_{eq}, sugiere que el pasaje de nanovesículas a través de la monocapa de SP está inversamente relacionado con la compresión de monocapa durante el ciclo respiratorio. Esto significaría que mientras las nanovesículas nebulizadas cruzaron la barrera de surfactante independientemente de la inserción de monómeros, el cruce sería dependiente del grado de compresión de la monocapa. Junto con los hallazgos de que las nanovesículas no eliminaron las proteínas B y C del SP ni aumentaron la fluidez de este, los resultados indican que en nuestras condiciones experimentales, las nanovesículas nebulizadas no inducirían cambios biofísicos que lleven a la inactivación del SP, abriendo la puerta a futuros estudios traslacionales más profundos.

4.6 Referencias

Andresen, Thomas L, Jensen, Simon S, & Jørgensen, Kent. (2005). Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in lipid research, 44*(1), 68-97.

Beck-Broichsitter, Moritz, Ruppert, Clemens, Schmehl, Thomas, Günther, Andreas, & Seeger, Werner. (2014). Biophysical inhibition of synthetic vs. naturally-derived pulmonary surfactant preparations by polymeric nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1838*(1), 474-481.

Biswas, Samares C, Rananavare, Shankar B, & Hall, Stephen B. (2007). Differential effects of lysophosphatidylcholine on the adsorption of phospholipids to an air/water interface. *Biophysical journal, 92*(2), 493-501.

Buboltz, Jeffrey T, & Feigenson, Gerald W. (2005). Phospholipid solubility determined by equilibrium distribution between surface and bulk phases. *Langmuir, 21*(14), 6296-6301.

Carrer, Dolores C, Higa, Leticia H, Tesoriero, Maria Victoria Defain, Morilla, Maria Jose, Roncaglia, Diana I, & Romero, Eder Lilia. (2014). Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121*, 281-289.

Casals, Cristina, & Cañadas, Olga. (2012). Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1818*(11), 2550-2562.

Cipolla, D, Redelmeier, T, Eastman, S, Bruinenberg, P, & Gonda, I. (2011). Liposomes, niosomes and proniosomes–a critical update of their (commercial) development as inhaled products. *Respiratory drug delivery Europe*, 41-54.

Cipolla, David, Shekunov, Boris, Blanchard, Jim, & Hickey, Anthony. (2014). Lipid-based carriers for pulmonary products: preclinical development and case studies in humans. *Advanced drug delivery reviews, 75*, 53-80.

Clancy, JP, Dupont, L, Konstan, MW, Billings, J, Fustik, S, Goss, CH, . . . Rubenstein, RC. (2013). Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with Pseudomonas aeruginosa infection. *Thorax*, thoraxjnl-2012-202230.

Chhoden, Tashi, Clausen, Per Axel, Larsen, Søren T, Nørgaard, Asger W, & Lauritsen, Frants R. (2015). Interactions between nanoparticles and lung surfactant investigated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 29*(11), 1080-1086.

Chong, Parkson Lee-Gau, & Wong, Patrick TT. (1993). Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1149*(2), 260-266.

Chu, Chun-Jung, Dijkstra, Jan, Lai, Ming-Zong, Hong, Keelung, & Szoka, Francis C. (1990). Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture. *Pharmaceutical research, 7*(8), 824-834.

Fan, Qihui, Wang, Yi E, Zhao, Xinxin, Loo, Joachim SC, & Zuo, Yi Y. (2011). Adverse biophysical effects of hydroxyapatite nanoparticles on natural pulmonary surfactant. *ACS nano, 5*(8), 6410-6416.

Greaves, David R, & Gordon, Siamon. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *Journal of lipid research, 50*(Supplement), S282-S286.

Gugliotti, Marcos, & Politi, Mario J. (2001). The role of the gel⇔ liquid-crystalline phase transition in the lung surfactant cycle. *Biophysical chemistry, 89*(2-3), 243-251.

Hager, Alfredo Adolfo, & DePaoli, Tomas. (2001). Method for extracting and purifying pulmonary surfactant: Google Patents.

Haque, Shadabul, Whittaker, Michael R, McIntosh, Michelle P, Pouton, Colin W, & Kaminskas, Lisa M. (2016). Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines: Opportunities and challenges. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12*(6), 1703-1724.

Harishchandra, Rakesh Kumar, Saleem, Mohammed, & Galla, Hans-Joachim. (2010). Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers. *Journal of The Royal Society Interface, 7*(Suppl 1), S15-S26.

Harris, Faith M, Best, Katrina B, & Bell, John D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1565*(1), 123-128.

Harris, Faith M, Smith, Samantha K, & Bell, John D. (2001). Physical properties of erythrocyte ghosts that determine susceptibility to secretory phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry, 276*(25), 22722-22731.

Hidalgo, Alberto, Cruz, Antonio, & Pérez-Gil, Jesús. (2017). Pulmonary surfactant and nanocarriers: toxicity versus combined nanomedical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1859*(9), 1740-1748.

Hochachka, PW, & Mommsen, TP. (1998). Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology.

Horie, T, & Hildebrandt, J. (1971). Dynamic compliance, limit cycles, and static equilibria of excised cat lung. *Journal of Applied Physiology, 31*(3), 423-430.

Hussell, Tracy, & Bell, Thomas J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews immunology, 14*(2), 81.

Kim, Sook Heun, & Franses, Elias I. (2005). New protocols for preparing dipalmitoylphosphatidylcholine dispersions and controlling surface tension and competitive adsorption with albumin at the air/aqueous interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 43*(3-4), 256-266.

Kitano, Takahiro, Onoue, T, & Yamauchi, Kiyoshi. (2003). Archaeal lipids forming a low energy-surface on air-water interface. *Chemistry and physics of lipids, 126*(2), 225-232.

Launois-Surpas, MA, Ivanova, Tz, Panaiotov, I, Proust, JE, Puisieux, F, & Georgiev, G. (1992). Behavior of pure and mixed DPPC liposomes spread or adsorbed at the air-water interface. *Colloid and Polymer Science, 270*(9), 901-911.

Lee, Sunghee, Kim, Dennis H, & Needham, David. (2001). Equilibrium and dynamic interfacial tension measurements at microscopic interfaces using a micropipet technique. 2. Dynamics of Phospholipid Monolayer Formation and Equilibrium Tensions at the water− air interface. *Langmuir, 17*(18), 5544-5550.

Lhert, Florence, Yan, Wenfei, Biswas, Samares C, & Hall, Stephen B. (2007). Effects of hydrophobic surfactant proteins on collapse of pulmonary surfactant monolayers. *Biophysical journal, 93*(12), 4237-4243.

List, Gary R, & King, Jerry W. (2016). *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*: Elsevier.

Loira-Pastoriza, Cristina, Todoroff, Julie, & Vanbever, Rita. (2014). Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Advanced drug delivery reviews, 75*, 81-91.

Lopez-Rodriguez, Elena, & Pérez-Gil, Jesús. (2014). Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1838*(6), 1568-1585.

Niven, Ralph W, & Schreier, Hans. (1990). Nebulization of liposomes. I. Effects of lipid composition. *Pharmaceutical research, 7*(11), 1127-1133.

Notter, RH. (1984). Surface chemistry of pulmonary surfactant: the role of individual components. *Pulmonary surfactant*, 17-65.

Parasassi, T, De Stasio, G, Ravagnan, G, Rusch, RM, & Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical journal, 60*(1), 179-189.

Perez-Gil, Jesús, & Weaver, Timothy E. (2010). Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology, 25*(3), 132-141.

Perkins, Walter R, Dause, Richard B, Parente, Roberta A, Minchey, Sharma R, Neuman, Keir C, Gruner, Sol M, . . . Janoff, Andrew S. (1996). Role of lipid polymorphism in pulmonary surfactant. *Science, 273*(5273), 330-332.

Piknova, Barbora, Schram, Vincent, & Hall, StephenB. (2002). Pulmonary surfactant: phase behavior and function. *Current opinion in structural biology, 12*(4), 487-494.

Possmayer, Fred. (2004). Physicochemical aspects of pulmonary surfactant *Fetal and Neonatal Physiology (Third Edition)* (pp. 1014-1034): Elsevier.

Possmayer, Fred, Nag, Kaushik, Rodriguez, Karina, Qanbar, Riad, & Schürch, Samuel. (2001). Surface activity in vitro: role of surfactant proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 129*(1), 209-220.

Rodriguez-Capote, Karina, Nag, Kaushik, Schürch, Samuel, & Possmayer, Fred. (2001). Surfactant protein interactions with neutral and acidic phospholipid films. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 281*(1), L231-L242.

Rudokas, Mindaugas, Najlah, Mohammad, Alhnan, Mohamed Albed, & Elhissi, Abdelbary. (2016). Liposome delivery systems for inhalation: a critical review highlighting formulation issues and anticancer applications. *Medical Principles and Practice, 25*(Suppl. 2), 60-72.

Rugonyi, Sandra, Biswas, Samares C, & Hall, Stephen B. (2008). The biophysical function of pulmonary surfactant. *Respiratory physiology & neurobiology, 163*(1-3), 244-255.

Schleh, Carsten, & Hohlfeld, Jens M. (2009). Interaction of nanoparticles with the pulmonary surfactant system. *Inhalation toxicology, 21*(sup1), 97-103.

Schürch, Samuel, Goerke, Jon, & Clements, John A. (1978). Direct determination of volume-and time-dependence of alveolar surface tension in excised lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 75*(7), 3417-3421.

Sercombe, Lisa, Veerati, Tejaswi, Moheimani, Fatemeh, Wu, Sherry Y, Sood, Anil K, & Hua, Susan. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology, 6*, 286.

Sheffield, Mark J, Baker, Brian L, Li, Du, Owen, Noel L, Baker, Marilyn L, & Bell, John D. (1995). Enhancement of Agkistrodon piscivorus piscivorus venom phospholipase A2 activity toward phosphatidylcholine vesicles by lysolecithin and palmitic acid: studies with fluorescent probes of membrane structure. *Biochemistry, 34*(24), 7796-7806.

Smith, Ross, & Tanford, Charles. (1972). The critical micelle concentration of l-α-dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions. *Journal of molecular biology, 67*(1), 75-83.

Stetten, Amy Z, Moraca, Grace, Corcoran, Timothy E, Tristram-Nagle, Stephanie, Garoff, Stephen, Przybycien, Todd M, & Tilton, Robert D. (2016). Enabling Marangoni flow at air-liquid interfaces through deposition of aerosolized lipid dispersions. *Journal of colloid and interface science, 484*, 270-278.

Veldhuizen, RA, Ito, YUSHI, Marcou, J, Yao, LJ, McCaig, L, & Lewis, JF. (1997). Effects of lung injury on pulmonary surfactant aggregate conversion in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 272*(5), L872-L878.

VELDHUIZEN, Ruud AW, Li-Juan, YAO, HEARN, Stephen A, POSSMAYER, Fred, & LEWIS, James F. (1996). Surfactant-associated protein A is important for maintaining surfactant large-aggregate forms during surface-area cycling. *Biochemical Journal, 313*(3), 835-840.

Venugopalan, P, Jain, S, Sankar, S, Singh, P, Rawat, A, & Vyas, SP. (2002). pH-sensitive liposomes: mechanism of triggered release to drug and gene delivery prospects. *Die Pharmazie, 57*(10), 659-671.

Watkins, JC. (1968). The surface properties of pure phospholipids in relation to those of lung extracts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 152*(2), 293-306.

Wen, Xinyun, & Franses, Elias I. (2001). Role of subsurface particulates on the dynamic adsorption of dipalmitoylphosphatidylcholine at the air/water interface. *Langmuir, 17*(11), 3194-3201.

Whitsett, Jeffrey A, & Alenghat, Theresa. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature immunology, 16*(1), 27.

Wilson-Ashworth, Heather A, Bahm, Quinn, Erickson, Joshua, Shinkle, Aaron, Vu, Mai P, Woodbury, Dixon, & Bell, John D. (2006). Differential detection of phospholipid fluidity, order, and spacing by fluorescence spectroscopy of bis-pyrene, prodan, nystatin, and merocyanine 540. *Biophysical journal, 91*(11), 4091-4101.

Yan, Wenfei, Biswas, Samares C, Laderas, Ted G, & Hall, Stephen B. (2007). The melting of pulmonary surfactant monolayers. *Journal of Applied Physiology, 102*(5), 1739-1745.

Yu, Shou-Hwa, Harding, Paul GR, & Possmayer, Fred. (1984). Artificial pulmonary surfactant: Potential role for hexagonal hii phase in the formation of a surface-active monolayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 776*(1), 37-47.

Zhang, Hong, Wang, Yi E, Fan, Qihui, & Zuo, Yi Y. (2011). On the low surface tension of lung surfactant. *Langmuir, 27*(13), 8351-8358.

Zuo, Yi Y, Veldhuizen, Ruud AW, Neumann, A Wilhelm, Petersen, Nils O, & Possmayer, Fred. (2008). Current perspectives in pulmonary surfactant—inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1778*(10), 1947-1977.

CAPITULO 5

5. Incorporación de azitromicina en nanovesículas nebulizables

.

Los datos experimentales de este Capítulo forman parte del manuscrito en preparación:

"Nebulizable azithromicin into anti-biofilm superstable archaeosomes". **Altube MJ**, Cutro AC, Parra FL, Melina Martinez, Paulo Maffia, Morilla MJ, Disalvo AE, Romero EL. Acta Biomaterialia, 2018.

A partir de este Capítulo se realizaron las siguientes comunicaciones científicas:

"*Nebulizabled archaeolipid nanovesicles: interaction with pulmonary surfactant*". **Altube MJ**, Cutro AC, Parra FL, Morilla MJ, Disalvo AE, Romero EL. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias de 13 al 17 de Noviembre de 2017. CABA, Argentina. Póster.

"*Nebulizabled archaeolipid nanovesicles: azithromycin incorporation and interaction with pulmonary surfactant*". **Altube MJ**, Cutro AC, Parra FL, Morilla MJ, Disalvo AE, Romero EL. 1st Pan American Congress of Nanotechnology Fundamentals and Applications to Shape the Future del 27 al 30 de Noviembre de 2017. Guarujá, Brasil. Póster. **Ganador del premio "BEST STUDENT POSTER AWARD- ACS Publications".**

5.1 Objetivo

El objetivo de este Capítulo fue desarrollar formulaciones de nanovesículas nebulizables conteniendo el antibiótico azitromicina para el tratamiento inhalatorio de infecciones pulmonares donde intervengan biofilms bacterianos.

5.2 Introducción

La azitromicina (AZ) es un antibiótico macrólido de segunda generación con amplio espectro de acción antibacteriana y actividad inmunomoduladora. La AZ se sintetizó por primera vez a partir del antibiótico eritromicina y en 1988 se introdujo al mercado a través de un acuerdo entre la compañía PLIVA (Sumamed®) y Pfizer (Zithromax®). Luego del año 2000, la AZ se convirtió en el antibiótico líder para el tratamiento de infecciones respiratorias. Zithromax fue el antibiótico más vendido en todo el mundo con un pico de ventas por 2.000 millones de dólares en 2005, para luego declinar debido a la perdida de la patente y el surgimiento de la competencia por la producción de genéricos (Jelić & Antolović, 2016; Parnham et al., 2014). Actualmente pertenece a la lista de medicinas esenciales de la OMS debido a su eficacia y bajo costo (OMS, 2018b).

En la actualidad cientos de empresas farmacéuticas comercializan AZ alrededor del mundo. AZ ha sido formulada de múltiples formas, atendiendo a su ruta de administración: tabletas de liberación inmediata de 250/500/600 mg, microesferas de liberación controlada de 2g, polvo para preparar suspensiones orales, AZ liofilizada para solución intravenosa y una formulación oftálmica de 1,5% que se aprobó en el 2007 (Zuckerman, Qamar, & Bono, 2011).

Teniendo en cuenta la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de la AZ, tanto la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en Argentina, como la FDA han aprobado el uso de AZ para el tratamiento de: exacerbaciones de EPOC por infecciones bacterianas agudas, sinusitis bacteriana agua, neumonía adquirida en la comunidad, faringitis, infecciones no complicadas de la piel y tejidos blandos, uretritis, ulceras genitales y otitis media (ANMAT, 2016; FDA, 2013b).

5.2.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de la AZ es relativamente amplia y si bien es inferior a la de su precursor, la eritromicina, su mayor estabilidad estructural le

da un perfil farmacocinético muy superior. AZ inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* y bacterias Gram-negativas como *Bordetella pertussis* y especies de *Legionella*, de *Chlamydia* y muchas bacterias atípicas como *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycobacterium avium complex* (Williams, 1991).

Su mecanismo de acción como el de otros antibióticos macrólidos, consiste en inhibir la síntesis proteica bacteriana, al unirse e interferir con el ensamblaje de la subunidad ribosomal grande 50S. De esta forma se inhibe el crecimiento de la cadena polipeptídica naciente. La AZ se une al sitio de salida del ribosoma, cerca del centro peptidil transferasa (P) en la subunidad 23S, pero en contraste con otros macrólidos, no lo inhibe (Parnham et al., 2014).

5.2.2 Mecanismo de acción inmunomodulador

La actividad antimicrobiana de la AZ se ve facilitada por sus acciones inmunomoduladoras sobre las respuestas inmunes innatas y adaptativas. El fármaco parece ejercer una acción bifásica que puede servir para promover la defensa inicial del huésped contra la infección y más tarde reducir la lesión tisular y promover la resolución de la inflamación (Parnham et al., 2014). Para lograr un efecto inmunomodulador la terapia con AZ debe durar más de tres meses y las dosis usadas ser más bajas que la concentración mínima inhibitoria (CIM). Sus efectos se ven incluso en pacientes infectados con bacterias resistentes a macrólidos como *Pseudomonas aeruginosa* (Parnham et al., 2014).

En una etapa inicial AZ inhibe el crecimiento de bacterias y factores de virulencia y desencadena un efecto estimulador sobre neutrófilos y células epiteliales, probablemente mediado por interacciones con fosfolípidos y las rutas de señalización de Erk1/2. Luego de 24 horas de tratamiento comienza a inhibir la actividad de los factores de transcripción AP-1 y NFκB, y la consecuente liberación de citoquinas inflamatorias y mucinas. Los efectos inmunomoduladores tardíos, luego de varias semanas de tratamiento, están relacionados con su elevada acumulación lisosómica y la interrupción del transporte de proteínas y lípidos a través del aparato de Golgi. Esto conlleva un aumento en la autofagia y cambios en la expresión de receptores de membrana

que estimulan a macrófagos al cambio de fenotipo M2. Estos cambios tardíos, particularmente en macrófagos, parecen ser la base de muchos efectos inmunomoduladores experimentales y clínicos de AZ, que contribuyen a la reducción de la frecuencia de exacerbaciones en enfermedades crónicas de las vías respiratorias (Kanoh & Rubin, 2010). Por estas razones AZ se administra de manera prologada en el tratamiento de enfermedades crónicas como fibrosis quística (FQ), bronquiectasia, bronquiolitis obliterante y EPOC (Kanoh & Rubin, 2010).

5.2.3 Características químicas y biodistribución de AZ

La estructura química de la molécula de AZ es un anillo de lactona de 15 miembros tipo azalida (Fig. 1). Difiere estructuralmente de la eritromicina en la sustitución de un grupo metilo por un átomo de nitrógeno en el carbono 9 del anillo de lactona. Es una base débil debido a la presencia de dos aminas terciarias, una en el azúcar de desosamina y otra como parte del anillo de lactona. Debido a los valores de pKa de estos grupos amino (pKa1 ~ 8,7 and pKa2 ~ 9,3, respectivamente), ésta molécula existe con diferentes cargas dependiendo del pH de su entorno (Mandić, 2014).

Su solubilidad en agua a 37°C es de 0,07 mg/mL mientras que a 25 °C es de 0,0025 mg/mL y aumenta significativamente a valores de pH más bajos (Aucamp, Odendaal, Liebenberg, & Hamman, 2015). A su vez su estabilidad química es altamente dependiente del pH, luego de 8 minutos a pH 1,2 el 10 % se degrada perdiendo el anillo de cladinosa, mientras que tarda 3 horas en degradarse a pH 4,2. La incubación de AZ a pH 1,5 con fluidos gástricos humanos genera la degradación de AZ con una vida media de 25 minutos (Curatolo, 2011). Pero aún con estos niveles de degradación es más estable en medios ácidos que los macrólidos de generaciones más antiguas.

A pH fisiológico AZ se comporta como una base débil, esencialmente no polar y lipofílica con capacidad de penetrar las membranas celulares. Dentro del citosol, donde el pH interno es alrededor de 0,5 puntos inferior al pH extracelular, la droga se protona y se acumula intracelularmente. El pH más bajo de los lisosomas favorece la ionización de la forma di catiónica haciendo que la difusión

fuera de la célula sea muy baja. Dentro de la célula la AZ se distribuye mayormente en los lisosomas, aunque entre un 30 – 50 % puede hallarse libre en el citosol (Rothermel, 2003).

Como resultado de su alta acumulación celular (particularmente en macrófagos) las concentraciones de AZ alcanzadas en los tejidos, son hasta 100 veces más altas que en el plasma (Amsden, 2001; Wilms, Touw, & Heijerman, 2006). Por otro lado, aunque AZ se acumula en tejidos -como los pulmones- de manera eficiente, su ubicación intralisosomal en macrófagos es responsable de una disminución en su actividad dada la acidez de su entorno. Además, como parte de AZ se degrada en el estómago, su biodispinobilidad es solo de un 30% de la dosis administrada por vía oral (Beringer et al., 2005).

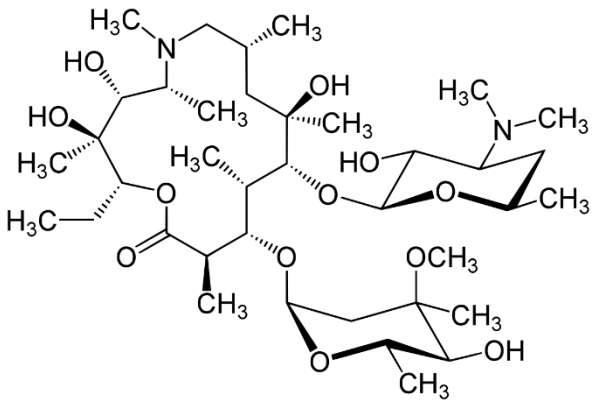


Figura 1. Estructura química de azitromicina (AZ).

5.2.4 Fibrosis Quística (FQ)

La FQ es un trastorno genético autosómico recesivo, causado por mutaciones en un gen que codifica un canal transmembrana conductor de cloruro llamado regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). CFTR se expresa mayormente en el tejido epitelial glandular donde regula el transporte de aniones y juega un rol importante en la inhibición del transporte de Na^+. Su disfunción genera una deshidratación de la superficie epitelial y secreciones hiperviscosas (Ratjen et al., 2015). Una de las consecuencias de la disfunción de CFTR es que se impide el aclaramiento

mucociliar en las vías respiratorias hecho que genera la característica clínica más importante de FQ: la enfermedad pulmonar. Esta se caracteriza por secreciones de las vías respiratorias anormalmente gruesas, infección bacteriana persistente e inflamación pulmonar (Update in Cystic Fibrosis 2006). A su vez la disfunción de las células epiteliales genera una serie de trastornos en el páncreas (malabsorción), hígado (cirrosis biliar), glándulas sudoríparas (choque térmico) y conductos deferentes (infertilidad). La principal causa de mortalidad es por enfermedad pulmonar crónica progresiva que genera bronquiectasia, obstrucción de vías respiratorias pequeñas y deterioro respiratorio progresivo y, por lo tanto, es el foco principal de la atención clínica y la investigación (Elborn, 2016; Ratjen et al., 2015)

La incidencia de FQ varía en todo el mundo, siendo mayor su prevalencia en personas de origen caucásico. En la Unión Europea 1:2.000-3.000 recién nacidos se ve afectado por la FQ y en Estados Unidos 1:3.500 (OMS, 2018a). En Argentina, en particular en la provincia de Buenos Aires y en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, la enfermedad afecta alrededor de 1:6.400-7.300 recién nacidos (Grupo Registro Nacional de Fibrosis Quística, 2014; Registro FQ Provincia de Buenos Aires, 2018).

En la actualidad la mediana de la edad de supervivencia de una persona con FQ es de 33,4 años. Si bien este número es bajo, hace solo tres décadas no se esperaba que un paciente con FQ superará los 15 años (OMS, 2018a). Este aumento en la esperanza de vida es producto del desarrollo y la administración de fármacos que mejoraron el aclaramiento del moco de los pulmones y el tratamiento de las infecciones pulmonares de manera rápida y agresiva, en combinación con la corrección de la insuficiencia pancreática y la desnutrición (Elborn, 2016). Las primeras infecciones que tienen la mayoría de los niños con FQ se producen por colonias de *Staphylococcus aureus*. La infección temprana de *S. aureus* en vías respiratorias inferiores produce un empeoramiento de la función pulmonar, una nutrición más deficiente y un aumento en la respuesta inflamatoria (Ahmed & Mukherjee, 2016). A medida que se desarrolla la infección hay una co-infeccion con *P. aeruginosa*. (Ahmed & Mukherjee, 2016; Beaudoin et al., 2017). Cuando la infección con *P. aeruginosa* se vuelve persistente provoca insuficiencia respiratoria, requiriendo un trasplante de pulmón o

causando la muerte de los pacientes. La persistencia de la infección se da por mecanismos adaptativos que eluden la defensa del sistema inmune y resisten la terapia con antibióticos. El mecanismo de adaptación más importante es la formación de biofilms bacterianos (Ciofu, Tolker-Nielsen, Jensen, Wang, & Høiby, 2015; Høiby, Ciofu, & Bjarnsholt, 2010).

5.2.5 Biofilms

Los biofilms son consorcios de bacterias que crecen inmovilizadas en una matriz polimérica extracelular que ellas mismas producen (Fig. 2). Si bien los constituyentes moleculares implicados en el desarrollo de los biofilms bacterianos varían entre las especies bacterianas, un modelo básico ampliamente reconocido consta de tres etapas secuenciales: (i) unión, (ii) acumulación / maduración y (iii) desprendimiento / dispersión. Durante la etapa de unión, las células planctónicas se adhieren a superficies y proliferan en agregaciones adhesivas llamadas microcolonias (también conocidas como torres o estructuras similares a hongos). A medida que se desarrollan estas microcolonias, las células bacterianas producen una matriz extracelular (MEC) que sirve como andamio esencial para establecer esta arquitectura tridimensional. Al alcanzar una densidad celular específica, se desencadena un mecanismo que inicia la degradación de MEC y se liberan células incrustadas dentro del biofilm que se dispersan y reinician el desarrollo de biofilm en sitios distales (Koo, Allan, Howlin, Stoodley, & Hall-Stoodley, 2017; Moormeier & Bayles, 2017).

La estructura de la MEC dependerá de la bacteria, pero en general está compuesta por polisacáridos, proteínas y ADN (Fig. 1). Dado que las bacterias están dentro de esta MEC, permanecen inaccesibles a los macrófagos y a antibióticos que no pueden penetrar el biofilm o que son degradados, ya que la MEC ofrece un ambiente hostil, con pH ácido y enzimas degradativas. Además las bacterias dentro del biofilm pueden evolucionar a cepas resistentes o hallarse en estado de dormancia (Flemming & Wingender, 2010; Høiby et al., 2010; Koo et al., 2017).

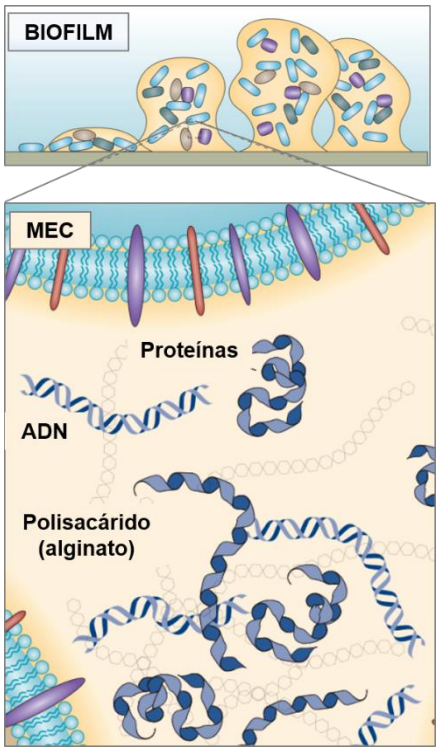


Figura 1. Esquema de un biofilm bacteriano y la matriz extracelular (MEC). Imagen modificada de (Flemming & Wingender, 2010)

P. aeruginosa fue la primera infección de biofilm descrita en humanos y en la actualidad es la mejor estudiada. Sin embargo, también se ha demostrado que *Burkholderia multivorans, Achromobacter xylosoxidans, Stenotrophomonas maltophilia*, especies de *Dyella*, *Mycobacterium abscessus* y cepas de *S. aureus* mucoides pueden producir biofilms en las vías respiratorias de personas con FQ (Birtel et al., 2015; Høiby et al., 2017; Molina et al., 2008).

5.2.6 Tratamiento de enfermedad pulmonar en FQ

El tratamiento recomendado para pacientes pulmonares crónicos por encima de los seis años con infección persistente de *P. aeruginosa* está basado en administración del antibiótico tobramicina por vía inhalatoria, agentes mucolíticos como DNAsas, kinesiología para poder expectorar el moco y el uso de AZ. El tratamiento con AZ recomendado es por lapsos de hasta seis meses con dosis de 250 o 500 mg/día tres veces por semana por vía oral (Flume et al., 2007). Como la AZ tiene propiedades microbiológicas e inmunomoduladoras

reduce algunos de los problemas biológicos que causan el daño pulmonar progresivo, como la inflamación crónica. Aunque no es activa contra *P. aeruginosa,* en concentraciones clínicamente relevantes, a concentraciones sub-inhibitorias puede reducir su patogenigidad interfiriendo con factores de virulencia como factores estimulantes de crecimiento, factores de *quorum-sensing* y la producción de alginato. Como consecuencia AZ disminuye la formación de biofilms y aumenta la susceptibilidad a los antibióticos anti-*pseudomonas* (Principi, Blasi, & Esposito, 2015). A su vez se está evaluando el impacto que podría tener la AZ sobre las infecciones de *S. aureus* en personas co-infectadas o no con *P. aeruginosa* (Ahmed & Mukherjee, 2016).

El principal inconveniente para el uso prolongado de AZ oral es su tolerabilidad. Las reacciones adversas que genera con mayor frecuencia son: molestias gastrointestinales, erupción cutánea, hepatotoxicidad (aumento transitorio de enzimas hepáticas y colestasis) y ototoxicidad (pérdida auditiva principalmente reversible) (Altenburg, De Graaff, Van der Werf, & Boersma, 2011). El efecto secundario más grave es la toxicidad cardíaca con una prolongación del intervalo QT, lo que aumenta el riesgo de arritmias cardíacas y muerte súbita. En consecuencia, la FDA recomienda evaluar los factores de riesgo de los pacientes antes del tratamiento con AZ (FDA, 2013a). Estos efectos secundarios resultan en tasas relativamente altas de interrupción del tratamiento o reducción de las dosis administradas.

La administración inhalatoria de AZ podría ser una alternativa para minimizar los efectos adversos sistémicos mientras maximizaría la acumulación del fármaco en sitio *target* de la enfermedad, el pulmón (Hickey, Lu, Ashley, & Stout, 2006; Siekmeier, Hofmann, & Scheuch, 2014). Su uso por vía inhalatoria además, se refuerza por el impacto altamente positivo que tuvo la incorporación de antibióticos inhalados como aztreonam, colistina y tobramicina en el tratamiento de FQ. Se logró reducir la tasa de deterioro de la función pulmonar, la frecuencia de exacerbaciones (lo que derivó en menos hospitalizaciones), la necesidad de antibióticos endovenosos y la carga bacteriana en las secreciones respiratorias (Geller, 2009; Sermet-Gaudelus et al., 2002; Touw, Brimicombe, Hodson, Heijerman, & Bakker, 1995). A pesar de esto, en la actualidad existe solo un número muy limitado de estudios que investigan la administración de AZ

al pulmón mediante aerosolización (Ramaiah, Nagaraja, Kapanigowda, Boggarapu, & Subramanian, 2016; Zhang et al., 2010). Debido a las características químicas de la AZ, es difícil lograr una suspensión acuosa estable para nebulización, por ejemplo, la nebulización de una suspensión de Zithromax resultó en una eficiencia de nebulización de solo un 50% de AZ (Hickey et al., 2006).

5.2.7 Liposomas Inhalatorios

Las propiedades de un antibiótico inhalado se pueden modificar mediante el uso de sistemas de *delivery* para mejorar la tolerabilidad, modificar el perfil farmacocinético (aumentando el tiempo de retención en los pulmones) y aumentar la penetración en biofilms. También las formulaciones de nanopartículas inhalables pueden mejorar la solubilidad y las velocidades de disolución de los fármacos insolubles en agua, así como para minimizar el aclaramiento mucociliar prematuro de los fármacos (Zhou et al., 2015).

En la actualidad hay dos formulaciones de antibióticos liposomales que están en fases clínicas avanzadas para su uso en FQ. Lipoquin es una formulación de ciprofloxacina incorporada en liposomas de 80 nm de HSPC con colesterol, muy estable frente a la nebulización, desarrollada por Aradigm Corporation la cual está en fase clínica IIa (Aradigm Corporation, 2018; Cipolla, Blanchard, & Gonda, 2016) Arikace es una formulación que encapsula el antibiótico amikacina en liposomas neutros compuestos de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) y colesterol desarrollada por Insmed Inc, que se encuentra en fase clínica III (Bulbake, Doppalapudi, Kommineni, & Khan, 2017). Arikace se administra a los pacientes utilizando un sistema nebulizador que genera liposomas de ~ 300 nm que penetran el esputo y tienen una semivida pulmonar prolongada (varias horas) en comparación con amikacina libre (Clancy et al., 2013).

Teniendo en cuenta las ventajas que puede proveer el uso de liposomas para el *delivery* de fármacos a pulmón, en este trabajo se propuso la incorporación de AZ en nanovesículas con el objeto de conseguir una formulación nebulizable de manera eficiente, que provea acción prolongada,

reduzca efectos sistémicos resultantes de su administración oral, de potencial aplicación en infecciones/ enfermedades inflamatorias crónicas. Debido a la alta estabilidad de los ARQ nebulizados y su estabilidad coloidal demostrada en el **Capítulo 3**, así como la cantidad de material que puede ser nebulizado y luego capturado por macrófagos, como fue demostrado en el **Capítulo 4** inferimos que los ARQ podrían funcionar como un excelente sistema de *delivery* de AZ tanto a células epiteliales como macrófagos pulmonares.

5.3 Materiales y Métodos

5.3.1 Preparación de nanovesículas vacías y con AZ

La composición de las formulaciones con AZ fue de HSPC: colesterol: AZ 0,75:0,25:1 m:m [L-AZ(1)], 0,75:0,25:0,4 m:m [L-AZ(2)]; LPT:AZ 1:1 m:m [ARQ-AZ(1)] y LPT:AZ 1:0,4 m:m [ARQ-AZ(2)]. Estas se prepararon por el método de resuspensión de la película lipídica. Brevemente, las mezclas de lípidos se disolvieron en cloroformo: metanol 1:1 % v/v y se agregó AZ disuelta en metanol. El solvente se eliminó por flujo de N_2. El film resultante se resuspendió por agitación magnética en buffer Tris 10 mM con NaCl 0,9 % m/v pH 7,4 hasta lograr una concentración de LT de 10 mg/mL. La suspensión obtenida se sonicó durante 1 hora con sonicador de baño a 80 W, 80 KHz y luego se extruyó 21 veces por dos membranas de policarbonato de tamaño de poro de 800 nm o de 200-100 nm (Merck Millipore Ltd. Cork, IRL) utilizando un extrusor de mesada (Northern Lipids, Burnaby, Canada). Finalmente las muestras se filtraron por membrana de nylon estéril de 200 nm en flujo laminar y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.3.2 Caracterización de nanovesículas

La cuantificación de LT y las medidas de tamaño promedio, pdi y potencial ζ se realizaron como se describe en el **Capítulo 2, Sección 2.3.5.**

5.3.2.i Cuantificación de AZ

Para cuantificar AZ se realizó una derivatización ácida según (Haleem et al., 2006). Primero se realizó una disrupción completa de las muestras en metanol. Luego se agregó ácido clorhídrico concentrado y se calentaron a 60°C en baño termostatizado con reflujo durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 482 nm en un fotómetro Metrolab. Se preparó una curva de calibración en un rango de concentraciones de 0,075 – 0,5 µg/mL de AZ en metanol, con pendiente

de 0,00694 ± 0,0009, ordenada de -0,0136 ± 0,0272 y un coeficiente de correlación lineal R^2=0,9866 ± 0,0042.

5.3.3 Estabilidad coloidal durante almacenamiento

Las nanovesículas vacías o con AZ se almacenaron a 4°C durante 2 meses. Una vez transcurrido ese tiempo se registró la presencia o ausencia de precipitado. Luego se re suspendieron todas las muestras con vortex y se midió el tamaño y pdi como se describió en el **Capítulo 2, Sección 2.3.5.**

5.3.4 Análisis térmico

El análisis calorimétrico de las suspensiones de nanovesículas se realizó usando un Calorímetro Diferencial de Barrido (en inglés, DSC) Q200 TA equipado con un Sistema de Refrigeración (RCS90). Brevemente, 10 mg de suspensión se colocaron en una capsula sellada de aluminio. Los escaneos se tomaron desde -50 a 80°C con una tasa de calentamiento de 10°C/minuto utilizando una capsula vacía como referencia. La temperatura de fusión y la entalpia se calcularon usando el programa TA Universal Analysis, provisto por TA Instruments®.

5.3.5 Estabilidad frente a la nebulización de nanovesículas conteniendo AZ (nanovesículas-AZ)

Se determinó la estabilidad estructural de las nanovesículas frente a la nebulización. Para ello, en un nebulizador de malla vibradora NE-U22 (OMRON *Healthcare*, Japón) se colocaron 2 ml de la una suspensión de ARQ-AZ o L-AZ a una concentración promedio de AZ de 15 µg/ml. Para realizar la nebulización, se conectó al pico del nebulizador un balón de 50 mL en donde se fue recolectando el nebulizado condensado. Se midió el tamaño promedio, índice de polidispersidad y se cuantificó AZ, antes y después de la nebulización.

5.3.6 Cultivos celulares

Las líneas celulares THP-1 y A549 se cultivaron como se describió en el **Capítulo 3, Sección 3.3.5.**

5.3.7 Viabilidad celular

Se determinaron los niveles de citotoxicidad de AZ libre y las nanovesículas vacías o con AZ sobre células THP-1 transformadas a macrófagos o A549 por el método de MTT.

Se sembraron 4 x 10^4 células A549 o THP-1 por pocillo en placas de 96 pocillos con MEM suplementado con L-glu y ATB-ATM al 10% de SFB o RPMI con L-glu y ATB-ATM al 10% de SFB con 100 µg/mL de PMA en el caso de THP-1. Las células se dejaron crecer durante 24 horas, se descartó el medio de cultivo, se agregaron diluciones de nanovesículas en medio con concentraciones de AZ de 5, 15 y 75 µg/mL o de 25, 75 y 225 µg/mL de LT en el caso de las nanovesículas vacías y se incubaron durante 24 o 48 hs a 37 °C en una atmosfera de humedad con 5% de CO2. Luego se midió la viabilidad celular por el método de MTT como se describe en el **Capítulo 2, Sección 2.3.12.**

5.3.8 Cultivo de *Staphylococcus aureus*

En este trabajo se utilizó una cepa de *S. aureus* aislada por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes. Esta se almacenó a -80°C en medio LB al 10 % de glicerol. Los cultivos se crecieron en LB a 37°C con agitación a 200 rpm durante una noche antes de realizar los ensayos de actividad antimicrobiana.

5.3.9 Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se determinó la CIM para *S. aureus* por el método de la microdilución en placa según la guía del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Wikler, 2009). El cultivo de bacterias se llevó a una concentración de 5x10^5 UFC/mL en medio Mueller-Hinton con ajuste de cationes en la placa. Las

bacterias se mezclaron con diluciones seriadas de AZ, ARQ-AZ y L-AZ. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se determinó la CIM al medir inhibición de crecimiento por medidas de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Para determinar la CBM se inocularon en placas de agar-LB los cultivos cuyo crecimiento se había inhibido y luego de 24 horas de incubación a 37°C se determinó la CBM al observar las placas sin crecimiento bacteriano.

5.3.10 Efecto de las concentraciones sub-CIM de AZ libre y en nanovesículas sobre el crecimiento de *S. aureus*

Se incubaron cultivos de *S. aureus* con concentraciones de 1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM y 1/16 CIM como se describió en la sección anterior. La placa se incubó a 37°C con agitación orbital a una frecuencia de 237 cpm y se midió DO_{600} cada una hora en el equipo Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA.

5.3.11 Determinación de Inhibición de biofilm

Para realizar los ensayos de inhibición de biofilm se siguió el protocolo modificado de (Mishra & Wang, 2017). En una placa de 96 pocillos se agregaron diluciones seriadas de AZ, ARQ-AZ y L-AZ y medio de cultivo *S. aureus* de forma de tener $5x10^5$ UFC/mL en medio Mueller Hinton con ajuste de cationes. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se midió el crecimiento bacteriano por DO_{600}. Se retiró el sobrenadante con cuidado de no levantar el biofilm formado y se realizaron dos lavados con 150 µl / pocillo de solución fisiológica. El biofilm se fijó con metanol durante 15 minutos y se tiño agregando 100 µl de solución de cristal violeta de 0,1 % m/v durante 5 minutos. Luego se realizaron dos lavados con 200 µl de agua destilada y la placa se dejó secando a 37°C durante 30 minutos. Se agregaron 100 µl de ácido acético al 30 % a cada pocillo para disolver el cristal violeta. Se incubó durante 15 minutos y se homogenizó con micropipeta. Finalmente se midió absorbancia a 595 nm en el equipo Cytation™ 5.

5.3.12 Ensayos de erradicación de biofilm

Para realizar los ensayos de erradicación de biofilm se siguió el protocolo modificado de (Mishra & Wang, 2017). En una placa de 96 pocillos se agregó un cultivo *S. aureus* con $5x10^5$ UFC/mL en medio Mueller Hinton con ajuste de cationes. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se retiró el sobrenadante con cuidado de no levantar el biofilm formado y se realizaron dos lavados con 150 µl / pocillo de solución fisiológica. Se agregaron las muestras de AZ, ARQ-AZ o L-AZ disueltas en medio Mueller Hinton con ajuste de cationes. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se midió el crecimiento bacteriano por DO_{600}. Luego se midió la cantidad de biofilm al teñir con cristal violeta.

5.3.13 Ensayos de viabilidad de biofilm

Para realizar los ensayos de erradicación de biofilm se siguió el protocolo modificado de (Kwieciński, Eick, & Wójcik, 2009).

Sobre biofilms pre-formados, como se describe en la sección anterior, se incubaron las muestras de AZ, ARQ-AZ o L-AZ con concentraciones de AZ por encima de la CIM, disueltas en medio Mueller Hinton con ajuste de cationes. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se midió el crecimiento bacteriano por DO_{600} y se determinó el porcentaje de bacterias viables dentro del biofilm. Para esto se descartó el sobrenadante con cuidado de **no** levantar el biofilm formado y se realizaron dos lavados con 150 µl / pocillo de solución fisiológica. Luego se agregaron 100 ul de reactivo de MTT por pocillo y se incubaron a 37°C durante 2,5 horas. Luego se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 µL de DMSO que se mezclaron por agitación orbital durante 15 minutos. Se midió absorbancia a 570 nm en el equipo Cytation™ 5.

5.3.14 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una entrada, seguido del test de Dunnet utilizando el software Prisma 6.01 (Graphpad Software Corporation, San Diego, California, EEUU). El valor $p < 0,05$ se

consideró estadísticamente significativo. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$; n.s. no significativo ($p > 0,05$).

5.4 Resultados

5.4.1 Caracterización de formulaciones

Se prepararon dos tipos de formulaciones de nanovesículas conteniendo AZ asociada a la bicapa. Una de las formulaciones empleó 10 mg/mL AZ y 10 mg/mL de LT (1), la otra con un 60 % menos de AZ, 4 mg/mL (2). Las primeras únicamente se lograron extruir a través de membranas de 800 nm. Las segundas en cambio pudieron ser extruidas exitosamente a través de membranas de 200-100 nm. Como se muestra en la Tabla 1, la recuperación de AZ al final del proceso de preparación fue de valores cercanos al 50 % para las formulaciones de ARQ y de un 35 % para las formulaciones con HSPC: colesterol. Si bien estos porcentajes son similares, el desvió estándar de las formulaciones (2) fue mucho menor, lo que nos da la pauta de una mayor reproducibilidad para estas formulaciones. Las formulaciones (2) proporcionaron mayor cantidad de LT recuperados, cercana al 80% para ARQ-AZ y de 60 % para L-AZ. Para todas las formulaciones no se registraron diferencias entre la recuperación de LT para las muestras vacías como con AZ, por lo que el % de recuperación estaría relacionado con el proceso de extrusión.

Tabla 1. Caracterización de la composición química de las nanovesículas.

Muestra	Proceso de homogenización	Teórico		Final			
		LT mg/mL	AZ mg/mL	AZ mg/mL	LT mg/mL	Recuperación AZ %	Recuperación LT %
ARQ(1)	Sonicación-Extrusión 800 nm	10	0		4,6 ± 0,4		46 ± 4
L(1)		10	0		3,4 ± 2,5		34 ± 25
ARQ-AZ(1)		10	10	4,9 ± 2,2	5,4 ± 0,4	49 ± 22	54 ± 4
L-AZ(1)		10	10	3,6 ± 3,0	4,3 ± 2,4	36 ± 30	43 ± 24
ARQ(2)	Sonicación-Extrusión 200-100 nm	10	0		7,6 ± 0,1		76 ± 1
L(2)		10	0		6,2 ± 0,5		62 ± 5
ARQ-AZ(2)		10	4	1,9 ± 0,1	7,1 ± 1,6	48 ± 3	81 ± 11
L-AZ(2)		10	4	1,3 ± 0,2	6,5 ± 0,0	33 ± 6	65 ± 0

Los resultados son el promedio ± DS de tres lotes independientes de muestra.

Los tamaños de las formulaciones ARQ fueron cercanos a los 200 nm en todos los casos, con pdi cercano a 0,2. El potencial ζ de las formulaciones vacías

fue de ~-40 mV y de valores de ~-31 mV para las formulaciones con AZ. Los tamaños de las formulaciones (2) de HSPC:colesterol fueron ligeramente inferiores- cercanos a los 150 nm- y se registró una disminución de los valores de pdi, en tanto el potencial ζ se mantuvo cercano a -6 mV para todas las formulaciones **Tabla 2**.

Tabla 2. Caracterización de estructural de las nanovesículas.

Muestra	Proceso de homogenización	Tamaño Promedio (nm)	pdi	Potencial ζ (mV)
ARQ(1)	Sonicación-Extrusión 800 nm	233 ± 54	0,24 ± 0,01	-39,7 ± 0,6
L(1)		375 ± 104	0,41 ± 0,04	-6,3 ± 0,3
ARQ-AZ(1)		192 ± 21	0,26 ± 0,00	-31,4 ± 5,2
L-AZ(1)		260 ± 37	0,59 ± 0,10	-5,3 ± 2,4
ARQ(2)	Sonicación-Extrusión 200-100 nm	182 ± 11	0,18 ± 0,02	-38,7 ± 2,0
L(2)		143 ± 4	0,10 ± 0,01	-6,0 ± 0,9
ARQ-AZ(2)		168 ± 26	0,23 ± 0,10	-31,2 ± 0,8
L-AZ(2)		172 ± 26	0,17 ± 0,08	-7,1 ± 2,7

Uno de los principales parámetros estructurales que definen la utilidad de las formulaciones nanovesiculares es su estabilidad coloidal. Utilizamos como criterio de estabilidad estructural el mantenimiento del tamaño y pdi de la población, y la permanencia de la homogeneidad macroscópica, sin formación de precipitado. Luego de 2 meses de almacenamiento a 4°C las formulaciones (1) mantuvieron su tamaño aunque aumentó el pdi de las formulaciones con AZ y se observó la presencia de precipitado en L, L-AZ y ARQ-AZ. En cambio para el grupo de formulaciones (2) no se observaron cambios en los tamaños, pdi, ni se observó formación de precipitado, salvo para la L-AZ (Tabla 3).

Teniendo en cuenta la superioridad de las formulaciones (2), en términos de mayor estabilidad coloidal y reproducibilidad de los lotes en cuanto a contenido de AZ y recuperación de LT, se decidió continuar estudiando este

grupo de formulaciones a las que se continuó nombrando simplemente ARQ, L, ARQ-AZ y L-AZ.

Tabla 3. Estabilidad de las formulaciones luego de 2 meses de almacenamiento a 4°C. Los resultados son de tres lotes independientes de muestra.

Muestra	Tamaño Promedio (nm)	pdi	Presencia de precipitado*
ARQ(1)	288 ± 29	0,26 ± 0,03	NO
L(1)	275 ± 14	0,61 ± 0,17	SI
ARQ-AZ(1)	179 ± 14	0,48 ± 0,9	SI
L-AZ(1)	203 ± 14	0,79 ± 0,8	SI
ARQ(2)	161 ± 14	0,22 ± 0,03	NO
L(2)	175 ± 23	0,21 ± 0,01	NO
ARQ-AZ(2)	179 ± 38	0,19 ± 0,04	NO
L-AZ(2)	203 ± 58	0,22 ± 0,12	SI

SI Se observó formación de precipitado, **NO** No se observó formación de precipitado

5.4.2 Análisis calorimétrico

El efecto sobre la estructura de bicapa lipídica, de la incorporación de moléculas de AZ, se relevó por calorimetría diferencial de barrido. En este análisis se inspeccionó la existencia de cambios en el perfil de transición endotérmico de las vesículas vacías y con AZ. Para la formulación ARQ-AZ se registró una temperatura de transición de fase gel a líquido cristalino ($L_\beta \rightarrow L_\alpha$), 2,08 °C inferior a la de las vesículas vacías así como una disminución en la entalpia de fusión (Tabla 4). Para las formulaciones L y L-AZ no se registró el pico endotérmico en un rango entre -50 a 80 °C.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos

Muestra	Tf (°C)*	ΔHcal (J/gr fosfolípido)**
ARQ	-23,16	5,868
ARQ-AZ	-25,08	2,607

*Temperatura correspondiente al máximo del pico calorimétrico,
**Entalpía calorimétrica calculada del área bajo la curva

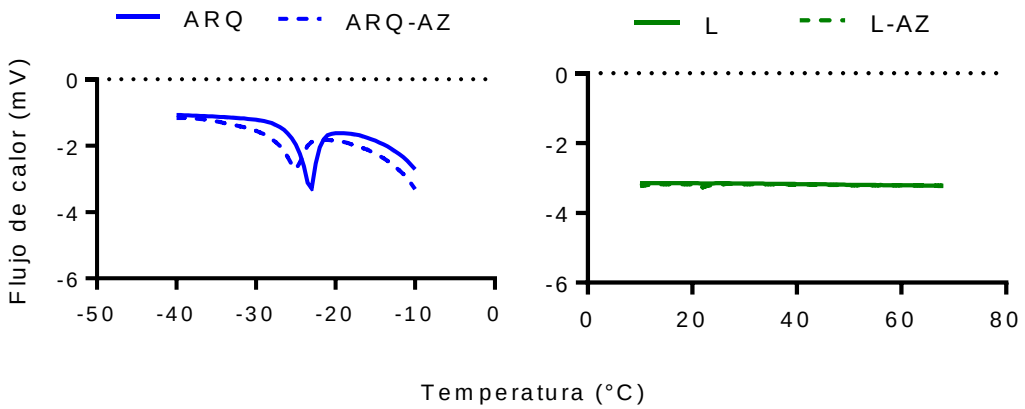


Figura 2. Termogramas de nanovesículas

5.4.3 Estabilidad frente a nebulización

La capacidad de las nanovesículas de mantener su estructura coloidal frente al proceso de nebulización, se inspeccionó determinando su tamaño poblacional, pdi y recuperación de AZ y LT antes y después de la nebulización. Luego de nebulizar la formulación de ARQ-AZ se recuperó más de un 90% de AZ y LT en el nebulizado y se mantuvo el tamaño promedio de las nanovesículas aunque aumentó el pdi. Por otra parte, en el nebulizado de L-AZ se recuperó solo un 5% del contenido de LT y no se lograron determinar cantidades cuantificables de AZ.; su tamaño promedio y pdi aumentaron más de 6 y 4 veces respectivamente.

Tabla 5. Estabilidad de las nanovesículas con AZ frente a la nebulización

	Pre Nebulización		**Post Nebulización**	
	LT	**AZ**	**LT**	**AZ**
	(µg/mL)			
ARQ-AZ	300 ± 45	18,6 ± 0,5	290 ± 50	16,4 ± 0,8
L-AZ	201 ± 30	13,9 ± 1,9	12 ± 6	< 0,075*

*Inferior al límite de detección del método de cuantificación

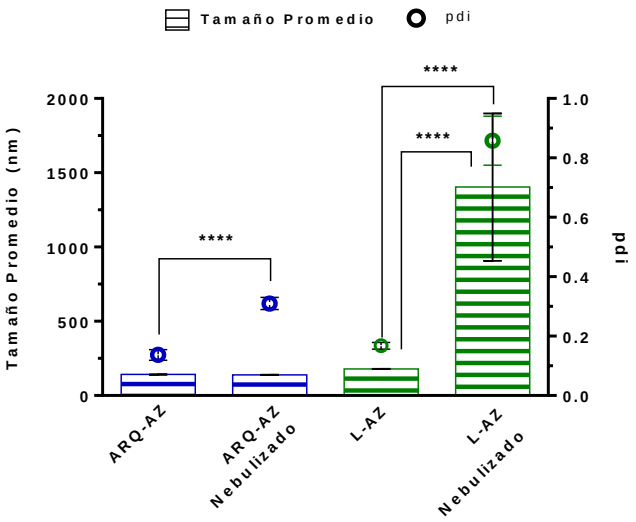


Figura 3. Estabilidad coloidal de las nanovesículas con AZ frente a la nebulización

5.4.4 Viabilidad celular

Con el objetivo de evaluar la toxicidad que podrían inducir las nanovesículas sobre líneas celulares de origen humano, se realizó un ensayo de citotoxicidad por el método de MTT incubando las formulaciones a diferentes concentraciones de LT y AZ. A 24 horas de incubación con AZ libre o incorporada en las nanovesículas no disminuyeron los niveles de viabilidad celular (Fig. 4a y c). En cambio, luego de 48 horas de incubación las nanovesículas vacías y con AZ disminuyeron un 20 % la viabilidad de las células A549 con 225 µg/mL de LT. En células THP-1 transformadas a macrófagos la viabilidad disminuyó de manera significativa, entre un 20-40%, con AZ libre desde 5 µg/mL, así como con ARQ-AZ y L-AZ a una concentración de 45 µg/mL de droga (Fig. 4b y d).

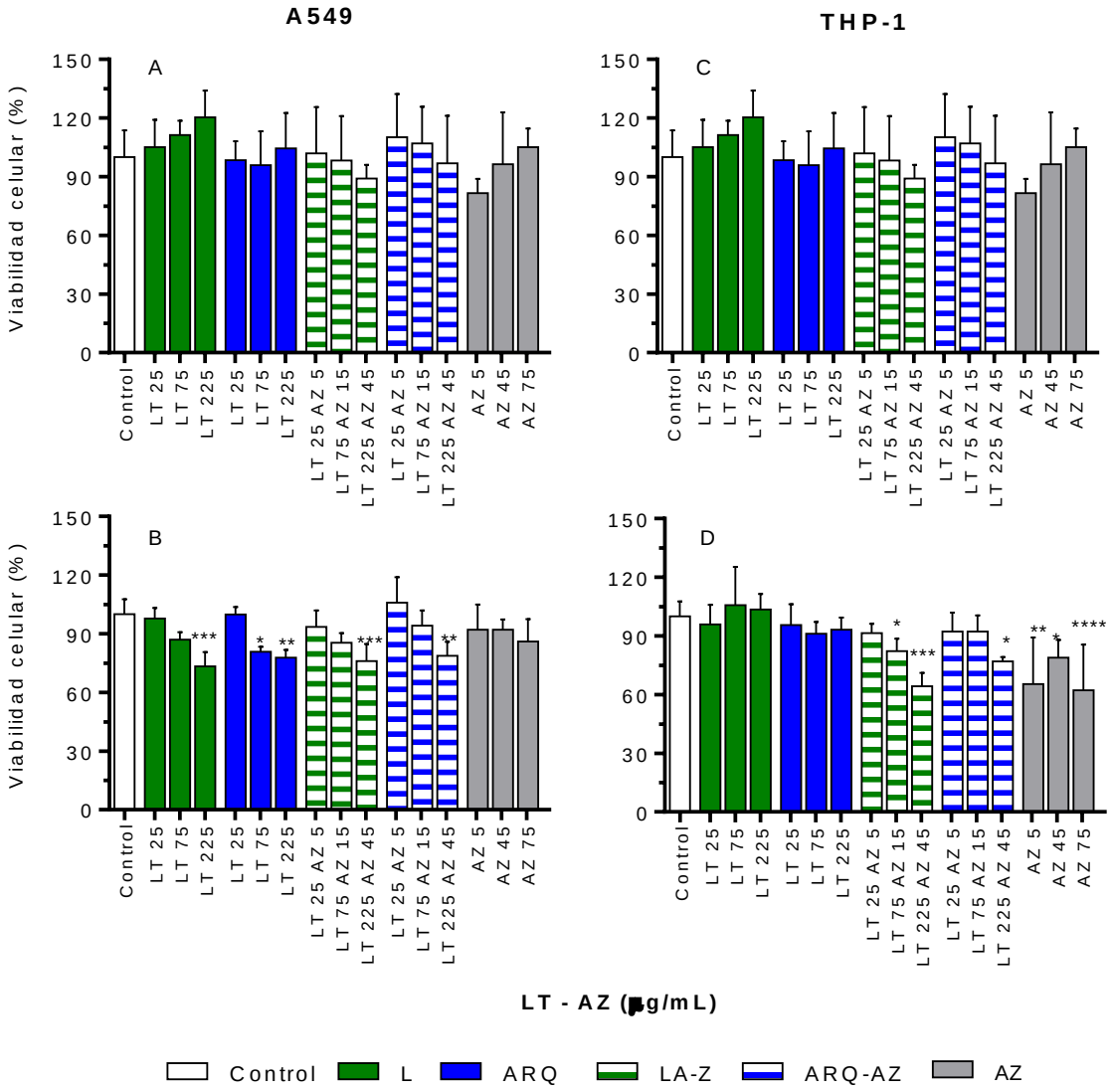


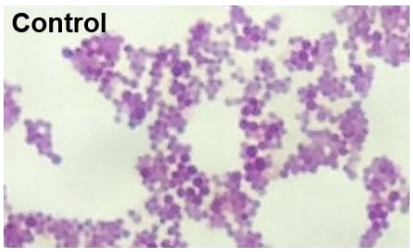
Figura 4. Viabilidad celular medida por MTT de las nanovesículas a las a) y c) 24 hs y b) y d) 48 h de incubación sobre células A549 y THP-1. (n=2)

5.4.5 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las nanovesículas con AZ y de AZ libre sobre cultivos la bacteria *S. aureus* se muestra en la Tabla 6. Hallamos que la CIM fue de 4 µg/mL tanto para AZ libre como incorporada en las nanovesículas. Por otro lado, en tanto AZ libre y L-AZ no tuvieron actividad bactericida, ARQ-AZ tuvo una CMB de 16 µg/mL. (Fig. 5).

Tabla 6. CIM y CMB de nanovesículas con AZ sobre *S. aeurus* a las 24 hs.

Muestra	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
AZ	4	>32
L-AZ	4	>32
ARQ-AZ	4	16



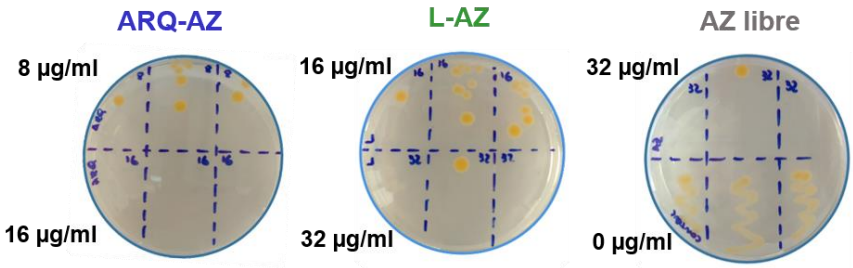


Figura 5. Imagen de microscopia del cultivo de *S. aureus* utilizado como inoculo. Imagen de placas luego de 24 h de crecimiento para determinar la CBM, junto con concentraciones de AZ utilizadas. (n=3)

5.4.6 Crecimiento con concentraciones sub-CIM de AZ

En presencia de una concentración 1/2 CIM de AZ el crecimiento de *S. aureus* planctónica se mantuvo inhibido significativamente durante 20 horas. A una concentración 1/4 de CIM de AZ, tanto AZ libre como incorporada en nanovesículas el crecimiento de *S. aureus* disminuyó a lo largo de diez horas. Por último, a 1/8 de la CIM no hubo diferencias significativas entre el crecimiento de las bacterias control y las incubadas con AZ (Fig. 6).

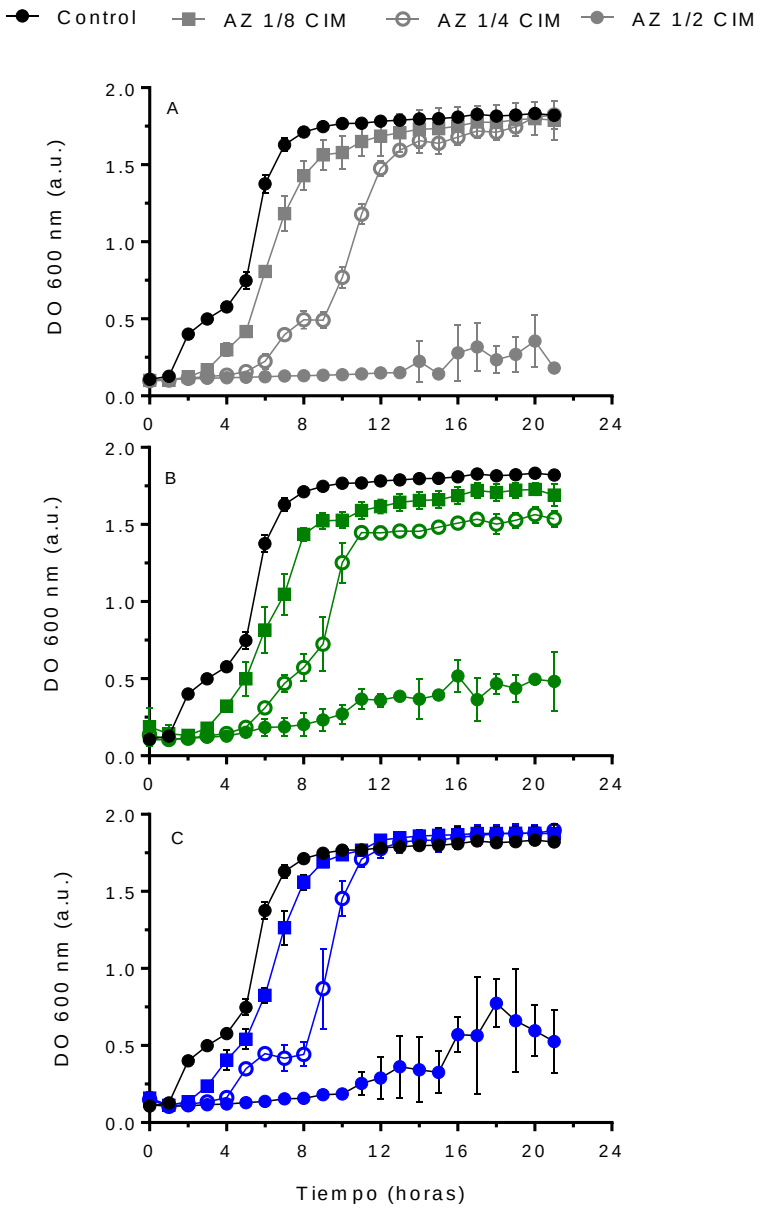


Figura 6. Cinética de crecimiento de *S. aureus* a concentraciones sub-inhibitorias de a) AZ libre, b) ARQ-AZ y b) L-AZ. (n=3)

5.4.7 Inhibición de formación de biofilm

Los resultados mostraron que ni AZ libre ni en nanovesículas tienen actividad de inhibición de formación de biofilm de *S. aureus.* Las concentraciones a las que se registró una disminución en la cantidad de biofilm formado, también indujeron una disminución del crecimiento bacteriano (Fig. 7). A 1/2 CIM tanto AZ libre como en nanovesículas inhibieron un 50% el

crecimiento de las bacterias planctónicas. Remarcablemente, en tanto AZ libre no tuvo efecto sobre la formación de biofilm, AZ en nanovesículas inhibió ~ 40% su cantidad respecto al control.

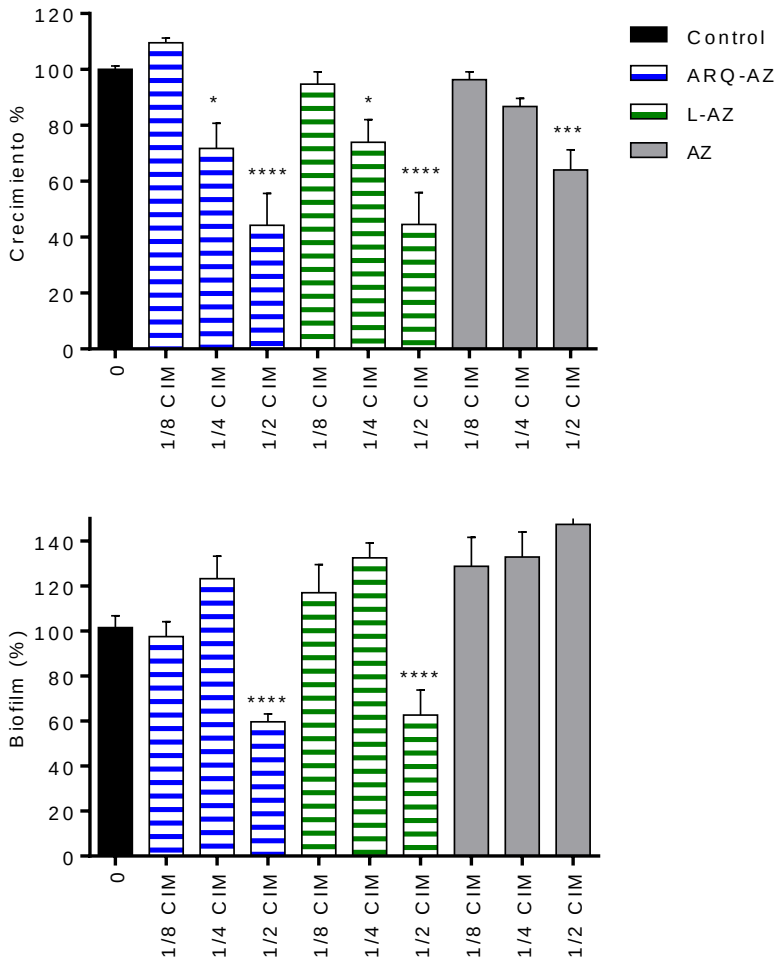


Figura 7. Inhibición de formación de biofilm de *S. aureus* con nanovesículas con AZ y AZ libre luego de 24 h. a) Crecimiento calculado por DO_{600} y b) Biomasa de biofilm medida por tinción con cristal violeta. (n=2)

5.4.7 Actividad anti-biofilm

Luego se relevó la actividad de AZ libre o en las nanovesículas sobre biofilms ya formados. En estos casos se evaluaron concentraciones por encima de la CIM. Observamos que para todas las concentraciones testeadas de AZ, la cantidad de biomasa de biofilm se mantuvo constante, como se muestra en la Fig. 8b, aunque la cantidad de bacterias viables dentro del biofilm disminuyó entre un 70-80 % con AZ libre o en las nanovesículas (Fig. 8c). En estos ensayos

la actividad sobre el biofilm no dependió de la concentración y si bien se encontró una inhibición del crecimiento ésta no fue total.

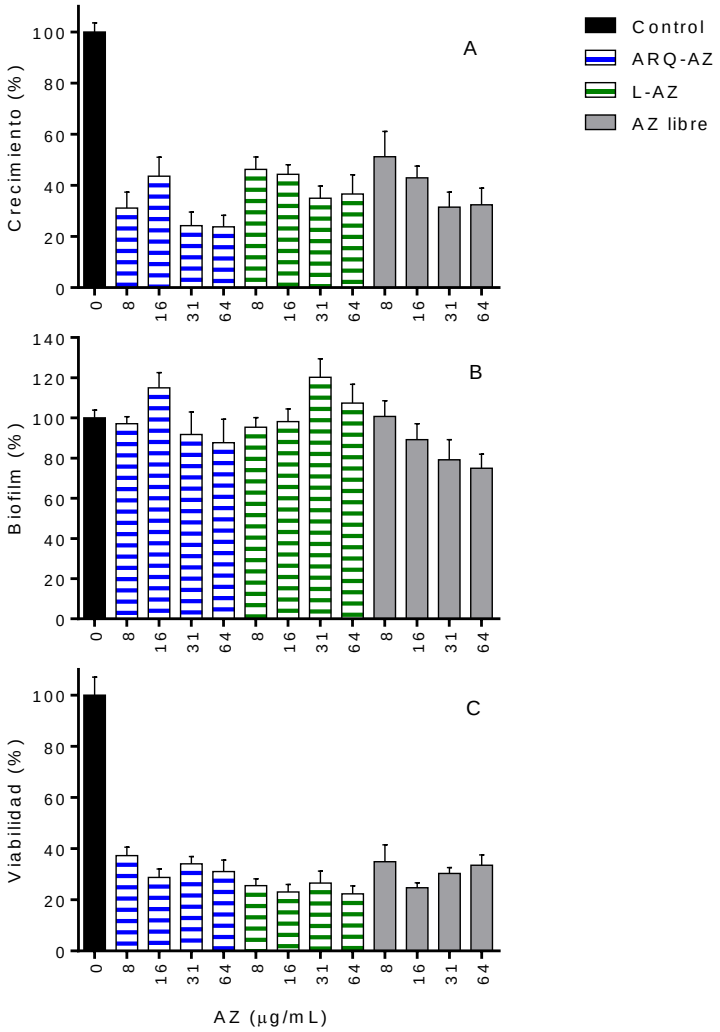


Figura 8. Actividad anti-biofilm de *S. aureus* con nanovesículas con AZ y AZ libre luego de 24 h de incubación sobre biofilm ya formado. a) crecimiento calculado por DO_{600} y b) biomasa de biofilm medida por tinción con cristal violeta. (n=2)

5.5 Discusión

AZ es una droga poco soluble en agua y por lo tanto requiere del uso de excipientes como emulsificadores que permitan generar una suspensión para su administración oral (FDA, 2018) o se debe resuspender en agua con ácido cítrico para disminuir el pH del medio y de esta manera solubilizarla para su administración endovenosa. Además ambas suspensiones tienen una estabilidad limitada, por lo que solo se pueden almacenar por periodos de tiempos cortos, como una semana (FDA, 2018). Estas limitaciones en su formulación dificultan su administración por ruta inhalatoria, donde la droga debe estar en suspensión acuosa estable que permita su nebulización eficiente. En este trabajo nos propusimos explotar la estabilidad de los ARQ, para diseñar una formulación de AZ estable en suspensión acuosa durante largos periodos de tiempo, no solo durante su almacenamiento sino durante su nebulización, manteniendo a la vez su actividad antimicrobiana, o aun aumentándola.

Nuestros resultados mostraron que únicamente las formulaciones ARQ-AZ con 4 mg/mL [AZ] inicial produjeron nanovesículas de composición reproducible lote a lote y estable en el tiempo. Las formulaciones con 10 mg/mL [AZ] inicial tenían una relación masa de LT:masa AZ 1:1; probablemente una masa de AZ demasiado elevada como para asociarse en su totalidad con la cantidad disponible de bicapa, sería el motivo de su escasa estabilidad. Si bien hay muy pocos trabajos que abordan la asociación de AZ a liposomas, nuestros resultados analíticos coinciden con uno de los pocos reportes previos. En el mismo prepararon liposomas con el lípido saturado con carga negativa 1,2-dioctadecanoil-sn-glycero-3-fosfoglicerol (DSPG) y colesterol en una relación molar 2:1. Si bien probaron incorporar diferentes cantidades de AZ, concluyeron que la única manera en la que pudieron retener AZ en la bicapa durante un mes a 4°C, sin la aparición de precipitado, fue con un contenido de 4 mg de AZ cada 10 mg de lípidos totales (Oh, Nix, & Straubinger, 1995).

En el análisis térmico de la formulación ARQ-AZ se puede observar una leve diminución de la temperatura de transición de fase desde un estado en gel

a líquido cristalino en comparación con ARQ sin droga. Esta disminución de Tf así como la disminución en la entalpia de fusión son indicadores de un aumento en la fluidez de la bicapa lipídica. Estudios previos mostraron que cuando AZ se inserta en la interface hidrofóbica-hidrofilica de la bicapa de liposomas de 1,2 dioleiol-sn glicerol 3-fosfocolina (DOPC) (Fa et al., 2007) o cuando se incorpora en liposomas de lípido saturado de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) y colesterol (Solleti, Alhariri, Halwani, & Omri, 2014) genera una disminución en el módulo elástico de las membranas. Por estas razones puede concluirse que AZ está incorporada en la bicapa lipídica de ARQ. La inserción de AZ en la bicapa no se pudo comprobar para la formulación L-AZ porque no se registró el pico endotérmico ni en la formulación de L-AZ ni en L vacíos. Esta formulación está compuesta por un 40% de moles de colesterol, que hacen que la membrana este en único estado líquido ordenado (L_o) por lo que desaparece la transición de fase (Kitayama et al., 2014).

Remarcablemente, ARQ-AZ y L-AZ mostraron diferencias en estabilidad tanto durante el almacenaje, como durante la nebulización. Esta falta de estabilidad, manifestada como aparición de un precipitado, puede tener relación con la interacción de la droga con los lípidos de membrana. El ζ de ARQ resultante de las cargas negativas de sus abundantes grupos fosfatos es cercano a -40mV. Los L están compuesta por HSPC y colesterol. HPSC es una mezcla de lípidos de soja con una proporción mayoritaria de DPPC, un lípido tipo zwitterión sin carga neta. La gran cantidad de cargas negativas de los LPT en ARQ podría ser responsable de asociaciones electrostáticas con la carga positiva de AZ. Esto estaría en concordancia con información previa en donde se propone que la AZ penetra la bicapa lipídica, el nitrógeno del anillo de desosamina se inserta en el dominio hidrofóbico y el anillo macrociclico ocupa la posición en la interface hidrofóbica-hidrofilica, en esta posición AZ cargada positivamente puede unirse por interacciones electrostáticas y neutralizar las cabezas polares de lípidos cargados negativamente como fosfatidilinositol (J-P Montenez et al., 1999; Jean-Pierre Montenez et al., 1996). La disminución en el potencial ζ de los ARQ-AZ respecto de los ARQ vacíos, podría ser un indicio de dicha interacción electrostática. Por el contrario, no se observaron cambio en el potencial ζ de L-AZ y L (Tabla 2).

Evaluar la estabilidad de las formulaciones durante el proceso de nebulización es clave para lograr que una formulación inhalable sea un sistema de *delivery* exitoso (Lehofer et al., 2014). A pesar de que el nebulizador de malla vibratoria es el tipo de nebulizador más eficiente para suspensiones acuosas nanovesiculares, las mismas son sometidas a cierto estrés mecánico como fuerzas de corte además de ser expuestas a la interface aire-liquido. Esto puede causar la disrupción de las bicapas, resultando en la fusión de las vesículas, que se corresponde con un aumento del tamaño, o la fragmentación con una disminución de su tamaño (Cipolla, Gonda, & Chan, 2013). Si bien las membranas de HSPC-colesterol al ser muy rígidas pueden soportar bien este proceso, la incorporación de AZ cambió drásticamente este comportamiento haciendo que la formulación quede retenida en el nebulizador y que lo poco que logró ser nebulizado (~5% de LT) tenga un tamaño en el orden de los µm. Por otra parte la formulación con ARQ-AZ tuvo una eficiencia de nebulización excelente sin pérdidas significativas de masa y con estabilidad coloidal.

La viabilidad celular se evaluó sobre dos tipos celulares representativos de la estructura alveolar. Una fue la línea de células humanas de adenocarcinoma de pulmón A549, la cual tiene características de las células alveolares tipo II (Lieber, Todaro, Smith, Szakal, & Nelson-Rees, 1976) y la otra, fue la línea celular de macrófagos humanos, THP-1. Aunque el tiempo de retención en los pulmones de los diferentes tipos de nanovesículas puede variar dependiendo de factores como su tamaño y superficie (Ong et al., 2014) en un estudio, sobre el tiempo de retención de Arikace en los pulmones, se observó que luego de 48 horas todavía permanecían en los pulmones cerca del 40 % de los liposomas inhalados (Weers et al., 2009). Teniendo en cuenta esto, es importante evaluar la citotoxicidad a tiempos largos, ya que los liposomas tienden a tener tiempos de retención prolongados en el pulmón. En nuestro trabajo, solo a partir de 48 horas de incubación se comenzó a registrar una disminución de la viabilidad celular; con ARQ-AZ la disminución fue de un ~20 % en ambos tipos celulares. En las células THP-1 fue donde se registró la mayor toxicidad para AZ libre (con 5 µg/mL de droga se observó una disminución de la viabilidad de un 40 %, Fig. 4d), mientras que con la droga incorporada en las nanovesículas esta toxicidad disminuyó significativamente. Esta citotoxicidad diferencial de AZ libre en THP-1

podría tener que ver con que AZ puede ser capturada por estas células de manera activa y sostenida en el tiempo de manera que se acumula dentro de la célula (Bosnar, Kelnerić, Munić, Eraković, & Parnham, 2005). Esta acumulación ocurre en los lisosomas donde se ha reportado que puede inducir alteraciones, aun a concentraciones bajas de 5 µg/mL, como formación de cuerpos lamelares (fosfolipidosis) (Van Bambeke et al., 1998). Si bien se deberían realizar ensayos para demostrarlo, la inclusión de AZ en nanovesículas, podría disminuir su interacción con las membranas de endosomas/lisosomas y el consiguiente daño que esta genera. Teniendo en cuenta las toxicidades registradas en ambas líneas celulares concluimos que la formulación ARQ-AZ se podría utilizar sobre células macrofagos y celulas epiteliales hasta una concentración de 15 µg/mL de AZ y 75 µg/ml de LT.

Se han reportado varios trabajos en donde logran una actividad potenciada del antibiótico al estar incorporado en liposomas, y a menudo ésta se ha atribuido a la fusión de liposomas con la membrana externa bacteriana (d'Angelo et al., 2014). En el trabajo de Solleti *et al* se logró aumentar la eficacia de AZ al incorporarla en liposomas al disminuir los valores de la CIM ocho veces para algunas cepas de *P. aeruginosa,* aunque no se encontraron diferencias en las curvas de crecimiento a concentraciones sub-inhibitorias (Solleti et al., 2014). Por otra parte también se han reportado estudios en donde la actividad de antibióticos aminoglucosidos disminuye al estar incorporados en liposomas, por ejemplo con liposomas aniónicos se necesitan valores de 4 x CIM para inhibir por completo el crecimiento bacteriano (Omri & Ravaoarinoro, 1996). En este trabajo, la actividad antibacteriana de AZ se mantuvo tanto en ARQ-AZ como en L-AZ obteniéndose una CIM de 4 µg/mL, en el caso de ARQ-AZ se registró un valor de CBM de 16 µg/mL mientras que la droga libre o en L-AZ no tuvo actividad bactericida. Al estudiar las curvas de crecimiento con concentraciones sub-inhibitorias se registró una actividad dependiente de la concentración de AZ tanto con la droga libre como incorporada en las vesículas. Es importante resaltar que el valor de la CIM está por debajo de la concentración citotóxica de AZ en células eucariotas a las 48 horas y el valor de la CBM es aproximadamente el mismo. Por lo que esta formulación debería ser efectiva en matar *S. aureus* sin dañar las células del tejido hospedador.

Se han reportado resultados dispares sobre la actividad de AZ sobre biofilms de *S. aureus*, algunos donde muestran actividad de la droga a concentraciones sub-inhibitorias (Gui et al., 2014) y otros donde la AZ no logra inhibir la formación de biofilm (Molina et al., 2008). La cepa de *S. aureus* que utilizamos en este trabajo es considerada una cepa formadora de biofilm moderada (++), teniendo en cuenta la clasificación propuesta por (Stepanović et al., 2007). En este trabajo se observó un efecto incrementado en la actividad de AZ incorporada en nanovesículas respecto de AZ libre. A 1/2 de la CIM tanto la droga libre como incorporada en nanovesículas inhibió ~ 50% el crecimiento de bacterias planctónicas, pero solo cuando se encontraba incorporada en nanovesículas logró disminuir la cantidad de biofilm generado un 40% (Fig. 7).

Cristal violeta es un colorante básico que se une a moléculas con una carga superficial negativa y polisacáridos. Por lo que tanto tiñe, tanto las células (vivas o muertas) como la MEC. Esto hace que sea un método poco eficiente para evaluar la muerte de las bacterias del biofilm. Para discriminar entre bacterias vivas y muertas es útil medir la actividad metabólica dentro del biofilm (Peeters, Nelis, & Coenye, 2008). Cuando se agrega AZ tanto libre como en nanovesículas a concentraciones por encima de la CIM la tinción con cristal violeta muestra que no hay disminución en la cantidad de biomasa del biofilm (Fig. 8b). Sin embargo al evaluar la cantidad de bacterias viables dentro del biofilm podemos ver que con AZ libre o en las nanovesículas el biofilm tiene un 70% menos de bacterias viables (Fig. 8c). Esto indicaría que si bien se mantiene la estructura del biofilm, se logró disminuir significativamente las bacterias que residen dentro del mismo.

5.6 Referencias

Ahmed, Molla I, & Mukherjee, Saptarshi. (2016). Treatment for chronic methicillin-sensitive Staphylococcus aureus pulmonary infection in people with cystic fibrosis. *The Cochrane Library*.

Altenburg, J, De Graaff, CS, Van der Werf, TS, & Boersma, WG. (2011). Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics–part 2: advantages and disadvantages of long-term, low-dose macrolide therapy. *Respiration, 81*(1), 75-87.

Amsden, GW. (2001). Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics. *International journal of antimicrobial agents, 18*, 11-15.

Boletin (2016).

Aradigm Corporation. (2018). ARD-3150 Pulmaquin® and ARD-3100 Lipoquin®. from http://www.aradigm.com/products_3100.html

Aucamp, Marique, Odendaal, Roelf, Liebenberg, Wilna, & Hamman, Josias. (2015). Amorphous azithromycin with improved aqueous solubility and intestinal membrane permeability. *Drug development and industrial pharmacy, 41*(7), 1100-1108.

Beaudoin, T, Yau, YCW, Stapleton, PJ, Gong, Y, Wang, PW, Guttman, DS, & Waters, V. (2017). Staphylococcus aureus interaction with Pseudomonas aeruginosa biofilm enhances tobramycin resistance. *NPJ biofilms and microbiomes, 3*(1), 25.

Beringer, Paul, Huynh, Kitty My Tu, Kriengkauykiat, Jane, Bi, Luke, Hoem, Nils, Louie, Stan, . . . Rao, Purush A. (2005). Absolute bioavailability and intracellular pharmacokinetics of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 49*(12), 5013-5017.

Birtel, J, Schwartbeck, B, Treffon, J, Kale, D, Kahl, J, Hirschhausen, N, . . . Rohde, H. (2015). 88 Prevalence and characterization of unusual Staphylococcus aureus strains with a mucoid phenotype recovered from the airways of cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis, 14*, S79.

Bosnar, Martina, Kelnerić, Željko, Munić, Vesna, Eraković, Vesna, & Parnham, Michael J. (2005). Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 49*(6), 2372-2377.

Bulbake, Upendra, Doppalapudi, Sindhu, Kommineni, Nagavendra, & Khan, Wahid. (2017). Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics, 9*(2), 12.

Ciofu, Oana, Tolker-Nielsen, Tim, Jensen, Peter Østrup, Wang, Hengzhuang, & Høiby, Niels. (2015). Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced drug delivery reviews, 85*, 7-23.

Cipolla, David, Blanchard, Jim, & Gonda, Igor. (2016). Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics, 8*(1), 6.

Cipolla, David, Gonda, Igor, & Chan, Hak-Kim. (2013). Liposomal formulations for inhalation. *Therapeutic delivery, 4*(8), 1047-1072.

Clancy, JP, Dupont, L, Konstan, MW, Billings, J, Fustik, S, Goss, CH, . . . Rubenstein, RC. (2013). Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with Pseudomonas aeruginosa infection. *Thorax*, thoraxjnl-2012-202230.

Curatolo, William. (2011). Interdisciplinary science and the design of a single-dose antibiotic therapy. *Pharmaceutical research, 28*(9), 2059-2071.

d'Angelo, Ivana, Conte, Claudia, La Rotonda, Maria Immacolata, Miro, Agnese, Quaglia, Fabiana, & Ungaro, Francesca. (2014). Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: challenges and emerging drug delivery strategies. *Advanced drug delivery reviews, 75*, 92-111.

Elborn, J. S. (2016). Cystic fibrosis. *Lancet, 388*(10059), 2519-2531. doi: 10.1016/s0140-6736(16)00576-6

Fa, Nathalie, Lins, Laurence, Courtoy, Pierre J, Dufrêne, Yves, Van Der Smissen, Patrick, Brasseur, Robert, . . . Mingeot-Leclercq, M-P. (2007). Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1768*(7), 1830-1838.

FDA. (2013a). FDA Drug Safety Communication: Azithromycin (Zithromax or Zmax) and the risk of potentially fatal heart rhythms

from https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm341822.htm

FDA. (2013b). FDA Drug Safety Communication: Azithromycin (Zithromax or Zmax) and the risk of potentially fatal heart rhythms. from https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm341822.htm

FDA. (2018). ZITHROMAX® (azithromycin tablets) and (azithromycin for oral suspension). ID: 3263750 https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/050710s039,050711s036,050784s023lbl.pdf

Flemming, Hans-Curt, & Wingender, Jost. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology, 8*(9), 623.

Flume, Patrick A, O'sullivan, Brian P, Robinson, Karen A, Goss, Christopher H, Mogayzel Jr, Peter J, Willey-Courand, Donna Beth, . . . Quittell, Lynne. (2007). Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *American journal of respiratory and critical care medicine, 176*(10), 957-969.

Geller, David E. (2009). Aerosol antibiotics in cystic fibrosis. *Respiratory care, 54*(5), 658-670.

Grupo Registro Nacional de Fibrosis Quística, RENAFQ. (2014). *FIBROSIS QUISTICA: INFORME DEL REGISTRO NACIONAL*. Retrieved from www.sap2.org.ar/newsletter/enviados/informe%20fq.pdf.

Gui, Zhihong, Wang, Huafu, Ding, Ting, Zhu, Wei, Zhuang, Xiyi, & Chu, Weihua. (2014). Azithromycin reduces the production of α-hemolysin and biofilm formation in Staphylococcus aureus. *Indian journal of microbiology, 54*(1), 114-117.

Haleem, DJ, Shireen, E, Haleem, MA, Kaye, WH, Bailer, UF, Frank, GK, . . . Henry, SE. (2006). Degradation studies of azithromycin and its spectrophotometric determination in pharmaceutical dosage forms. *Pak. J. Pharm. Sci, 19*(2), 98-103.

Hickey, Anthony J, Lu, Dongmei, Ashley, Elizabeth Dodds, & Stout, Jason. (2006). Inhaled azithromycin therapy. *Journal of aerosol medicine, 19*(1), 54-60.

Høiby, Niels, Bjarnsholt, Thomas, Moser, Claus, Jensen, Peter Østrup, Kolpen, Mette, Qvist, Tavs, . . . Ciofu, Oana. (2017). Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *Apmis, 125*(4), 339-343.

Høiby, Niels, Ciofu, Oana, & Bjarnsholt, Thomas. (2010). Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. *Future microbiology, 5*(11), 1663-1674.

Jelić, Dubravko, & Antolović, Roberto. (2016). From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics, 5*(3), 29.

Kanoh, Soichiro, & Rubin, Bruce K. (2010). Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clinical microbiology reviews, 23*(3), 590-615.

Kitayama, Hiroki, Takechi, Yuki, Tamai, Nobutake, Matsuki, Hitoshi, Yomota, Chikako, & Saito, Hiroyuki. (2014). Thermotropic phase behavior of hydrogenated soybean phosphatidylcholine–cholesterol binary liposome membrane. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 62*(1), 58-63.

Koo, Hyun, Allan, Raymond N, Howlin, Robert P, Stoodley, Paul, & Hall-Stoodley, Luanne. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology, 15*(12), 740.

Kwieciński, Jakub, Eick, Sigrun, & Wójcik, Kinga. (2009). Effects of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil on Staphylococcus aureus in biofilms and stationary growth phase. *International journal of antimicrobial agents, 33*(4), 343-347.

Lehofer, Bernhard, Bloder, Florian, Jain, Pritesh P, Marsh, Leigh M, Leitinger, Gerd, Olschewski, Horst, . . . Prassl, Ruth. (2014). Impact of atomization technique on the stability and transport efficiency of nebulized liposomes harboring different surface characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 88*(3), 1076-1085.

Lieber, Michael, Todaro, George, Smith, Barry, Szakal, Andras, & Nelson-Rees, Walter. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer, 17*(1), 62-70.

Mandić, Zoran. (2014). Voltammetric study of the partitioning of macrolide antibiotics at the water/nitrobenzene interface. Relationship to the pharmacokinetic profiling of macrolides. *ADMET and DMPK, 2*(3), 168-178.

Mishra, Biswajit, & Wang, Guangshun. (2017). Individual and combined effects of engineered peptides and antibiotics on Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Pharmaceuticals, 10*(3), 58.

Molina, Auxiliadora, Del Campo, Rosa, Maiz, Luis, Morosini, María-Isabel, Lamas, Adelaida, Baquero, Fernando, & Canton, Rafael. (2008). High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST228-SCC mec I capable of biofilm formation. *Journal of antimicrobial chemotherapy, 62*(5), 961-967.

Montenez, J-P, Van Bambeke, Françoise, Piret, Jocelyne, Brasseur, Robert, Tulkens, Paul M, & Mingeot-Leclercq, M-P. (1999). Interactions of macrolide antibiotics (erythromycin A, roxithromycin, erythromycylamine [dirithromycin], and azithromycin) with phospholipids: computer-aided conformational analysis and studies on acellular and cell culture models. *Toxicology and applied pharmacology, 156*(2), 129-140.

Montenez, Jean-Pierre, Van Bambeke, Françoise, Piret, Jocelyne, Schanck, André, Brasseur, Robert, Tulkens, Paul M, & Mingeot-Leclercq, Marie-Paule. (1996). Interaction of the macrolide azithromycin with phospholipids. II. Biophysical and

computer-aided conformational studies. *European journal of pharmacology, 314*(1-2), 215-227.

Moormeier, Derek E, & Bayles, Kenneth W. (2017). Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology, 104*(3), 365-376.

Oh, Yu-Kyoung, Nix, David E, & Straubinger, Robert M. (1995). Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular Mycobacterium avium infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 39*(9), 2104-2111.

Omri, A, & Ravaoarinoro, M. (1996). Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against Pseudomonas aeruginosa. *Chemotherapy, 42*(3), 170-176.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018a). Genes and human disease. from http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#CF

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018b). WHO Model Lists of Essential Medicines.

Ong, Hui Xin, Benaouda, Faiza, Traini, Daniela, Cipolla, David, Gonda, Igor, Bebawy, Mary, . . . Young, Paul M. (2014). In vitro and ex vivo methods predict the enhanced lung residence time of liposomal ciprofloxacin formulations for nebulisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 86*(1), 83-89.

Parnham, Michael J, Haber, Vesna Erakovic, Giamarellos-Bourboulis, Evangelos J, Perletti, Gianpaolo, Verleden, Geert M, & Vos, Robin. (2014). Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics, 143*(2), 225-245.

Peeters, Elke, Nelis, Hans J, & Coenye, Tom. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods, 72*(2), 157-165.

Principi, N, Blasi, F, & Esposito, S. (2015). Azithromycin use in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34*(6), 1071-1079.

Ramaiah, Balakeshwa, Nagaraja, Sree Harsha, Kapanigowda, Usha Ganganahalli, Boggarapu, Prakash Rao, & Subramanian, Rajarajan. (2016). High azithromycin concentration in lungs by way of bovine serum albumin microspheres as targeted drug delivery: lung targeting efficiency in albino mice. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 24*(1), 14.

Ratjen, F., Bell, S. C., Rowe, S. M., Goss, C. H., Quittner, A. L., & Bush, A. (2015). Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers, 1*, 15010. doi: 10.1038/nrdp.2015.10

Registro FQ Provincia de Buenos Aires. (2018). Retrieved from http://www.registrofqprovinciabuenosaires.org/.

Rothermel, Constance D. (2003). Single-dose azithromycin for acute otitis media: a pharmacokinetic/pharmacodynamic rationale. *Current therapeutic research, 64*, 4-15.

Sermet-Gaudelus, Isabelle, Le Cocguic, Yann, Ferroni, Agnés, Clairicia, Marlène, Barthe, Joel, Delaunay, Jan-Pierre, . . . Lenoir, Gérard. (2002). Nebulized antibiotics in cystic fibrosis. *Pediatric Drugs, 4*(7), 455-467.

Siekmeier, R1, Hofmann, T, & Scheuch, G. (2014). Inhalation of macrolides: a novel approach to treatment of pulmonary infections *Inflammatory Disorders* (pp. 13-24): Springer.

Solleti, Venkata Saran, Alhariri, Moayad, Halwani, Majed, & Omri, Abdelwahab. (2014). Antimicrobial properties of liposomal azithromycin for Pseudomonas infections in cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 70*(3), 784-796.

Stepanović, Srdjan, Vuković, Dragana, Hola, Veronika, BONAVENTURA, GIOVANNI DI, Djukić, Slobodanka, Ćirković, Ivana, & Ruzicka, Filip. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis, 115*(8), 891-899.

Touw, DJ, Brimicombe, RW, Hodson, ME, Heijerman, HG, & Bakker, W. (1995). Inhalation of antibiotics in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal, 8*(9), 1594-1604.

Van Bambeke, Françoise, Gerbaux, Cécile, Michot, Jean-Michel, d'Yvoire, M Bouvier, Montenez, Jean-Pierre, & Tulkens, Paul M. (1998). Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy, 42*(6), 761-767.

Weers, Jeffry, Metzheiser, Beth, Taylor, Glyn, Warren, Simon, Meers, Paul, & Perkins, Walter R. (2009). A gamma scintigraphy study to investigate lung deposition and clearance of inhaled amikacin-loaded liposomes in healthy male volunteers. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery, 22*(2), 131-138.

Wikler, Matthew A. (2009). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. *Approved Standard M7-A8*.

Wilms, Erik B, Touw, Daniel J, & Heijerman, Harry GM. (2006). Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Therapeutic drug monitoring, 28*(2), 219-225.

Williams, JD. (1991). Spectrum of activity of azithromycin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10*(10), 813-820.

Zhang, Yu, Wang, Xiaoli, Lin, Xia, Liu, Xiaoliang, Tian, Bin, & Tang, Xing. (2010). High azithromycin loading powders for inhalation and their in vivo evaluation in rats. *International journal of pharmaceutics, 395*(1-2), 205-214.

Zhou, Qi Tony, Leung, Sharon Shui Yee, Tang, Patricia, Parumasivam, Thaigarajan, Loh, Zhi Hui, & Chan, Hak-Kim. (2015). Inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections. *Advanced drug delivery reviews, 85*, 83-99.

Zuckerman, Jerry M, Qamar, Fozia, & Bono, Bartholomew R. (2011). Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycylcyclines (tigecycline). *Medical Clinics, 95*(4), 761-791.

CAPITULO 6

6. Neutralización de toxinas de veneno mediante el uso de arqueosomas

.

A Saluki

Los datos experimentales de este Capítulo forman parte del manuscrito en preparación:

“A novel tool to defeat local snake envenoming: archaeosomes as inhibitors of PLA2” que se enviará a Journal of Controlled Release

6.1 Objetivo

El objetivo de este Capítulo fue evaluar la potencialidad de los ARQ como inhibidores de fosfolipasa PLA_2 -enzima con gran actividad en venenos de serpiente- para utilizarlos como terapia complementaria de antídotos para envenenamientos producidos por *Bothrops neuwidi diporus,* la especie de serpientes con mayor relevancia clínica de la Argentina.

6.2 Introducción

6.2.1 Envenenamiento por serpientes: un problema de salud pública a nivel global

Los venenos de serpiente son mezclas complejas que juegan un rol adaptativo asociado a la inmovilización y digestión de las presas, así como a un mecanismo de defensa contra depredadores. Las toxinas en los venenos de serpiente son mezclas complejas de proteínas que pueden ejercer diferentes efectos deletéreos en el organismo (Fry et al., 2006).

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública importante a nivel global. Tal es así, que desde el año 2017 fue incorporada en la lista de las enfermedades tropicales desatendidas de la OMS (OMS, 2018). Cada año se producen cerca de 5,4 millones de mordeduras de serpiente que causan entre 1,8 y 2,7 millones de casos de envenenamiento, de los cuales producen hasta 140.000 muertes y aproximadamente el triple de amputaciones y otras discapacidades permanentes. La mayoría de los casos se producen en África, Asia y Latinoamérica con mayor prevalencia en mujeres, niños y trabajadores rurales de comunidades pobres con escasos recursos médicos (OMS, 2017).

6.2.2 Serpientes de relevancia regional

En Argentina en el período de 2007 a 2012 fueron notificados un promedio de 730 casos por año de envenenamiento por serpientes. La gran mayoría de los casos fueron producidos por víboras del género *Bothrops spp*., conocida comúnmente como “yarará”, en menor número (menos del 3%) por víboras del género *Crotalus spp*. (“cascabel”), y en un porcentaje casi insignificante por serpientes del género *Micrurus* (“coral”) (Ministerio de Salud, 2014). *Bothrops diporus (Bothrops neuwidi diporus)*, conocida como “yarará chica”, es una de las víboras venenosas endémicas en Sudamérica. *B. diporus* es relativamente

pequeña (las hembras adultas pueden crecer hasta 110 cm de largo) y se la puede encontrar en los estados del sudoeste de Brasil, en el sur de Bolivia, Paraguay y en Argentina en las provincias del Nordeste y Noroeste, llegando hasta la zona del norte de la Patagonia. Debido a su abundancia, amplia distribución geográfica y a su comportamiento altamente agresivo, *B. diporus* es la mayor fuente de mordeduras de serpiente en Argentina, siendo la región del noroeste la que tiene la mayor tasa de mordeduras (De Roodt, 2014; Dolab et al., 2014).

6.2.3 Efecto del envenenamiento y toxinas involucradas

Luego del ingreso del veneno al organismo tras mordedura, ocurren dos procesos simultáneos: a) el desarrollo de efectos tóxicos inducidos por las toxinas del veneno y b) la estimulación de la respuesta inmune innata y adaptativa por parte de la víctima, con el objetivo de neutralizar y remover las proteínas del veneno. Cuando la capacidad del veneno de generar daño local y sistémico excede la capacidad del organismo de asimilar y responder a la agresión, ocurre el envenenamiento.

El envenenamiento clásico por *Bothrops spp.* genera efectos a nivel local y sistémico. Entre los efectos locales están la formación de edema, hemorragia y necrosis que pueden llevar a la pérdida del tejido y discapacidad permanente. Las complicaciones sistémicas se manifiestan como hemorragias sistémicas y problemas de coagulación que pueden lesionar los riñones y producir un shock cardiovascular (Albuquerque et al., 2013; J. M. Gutiérrez et al., 2010; White, 2005). Estos efectos resultan de la acción integrada de varios componentes del veneno como fosfolipasas, metaloproteinasas y serinprotesas. Las fosfolipasas (en inglés, PLA_2) están involucradas en los efectos tóxicos a nivel local y en la miotoxicidad (J. M. Gutiérrez & Lomonte, 2013). Las metaloproteinasas**,** conocidos como metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMPs en inglés) son enzimas multifuncionales que causan efectos a nivel sistémico y local, como hemorragia, inflamación y activación de factores de coagulación e inhibición de la agregación plaquetaria (Moura-da-Silva, Butera, & Tanjoni, 2007). Las serinoproteasas de veneno de serpiente (en inglés, SVSP), son enzimas del tipo

trombinas que están involucradas en los problemas de coagulación, observados en la mayoría de los pacientes (Serrano & Maroun, 2005). Adicionalmente pueden existir proteínas del tipo L-aminoácido oxidasas (LAO), que catalizan la oxidación de L-aminoácidos a α-ceto ácidos, peróxido de hidrogeno y amonio; y péptidos vasoactivos (VAP), entre otras (Calvete, 2010). Aunque estas familias de proteínas están bien caracterizadas como los mayores componentes del veneno de *Bothrops spp*, hay una gran variabilidad en la composición de los venenos. Esta variabilidad puede depender de la filogenia, sexo, distribución geográfica y dieta de cada serpiente y está relacionada con el nivel de expresión de cada grupo de toxinas más que con la ausencia o presencia de familia de proteínas (Sousa et al., 2013). A pesar de la relevancia médica de la especie *B. diporus,* recién en el año 2016 en el trabajo de Gay et al (Gay, Sanz, Calvete, & Pla, 2015) se presentó por primera vez la composición proteica del veneno. Su proteoma está compuesto por toxinas que pertenecen a 14 familias de proteínas, en donde predominan metaloproteinasas PI- y PIII-SVMP (34,2 % del total de proteínas del veneno), moléculas de PLA_2 (24,1%), péptidos vasoactivos (15,9%), L-aminoácidos oxidasas (7,4%) y serinproteasas (7,2%). Este perfil de toxinas está asociado con el perfil altamente proteolítico, hemorrágico y miotóxico del veneno que genera como principales efectos a nivel local la formación rápida de edema, dolor, inflamación, hemorragia, mio- y dermonecrosis e hinchazón (Gay et al., 2015).

6.2.4 Terapia contra envenenamientos de serpientes

En la actualidad la única terapia científicamente validada para tratar envenenamientos de serpientes es la administración parenteral de sueros antivenenos (OMS, 2010). Las preparaciones de antivenenos son inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas (Fab) capaces de unirse a las toxinas del veneno y neutralizar sus efectos tóxicos. Los antivenenos se producen al inmunizar animales, en su mayoría caballos, con el veneno de una o varias especies, y así se generan antivenenos monovalentes o polivalentes, respectivamente. Luego, las inmunoglobulinas enteras o Fab se purifican, formulan y esterilizan para utilizarse como productos biofarmaceuticos (León et al., 2011).

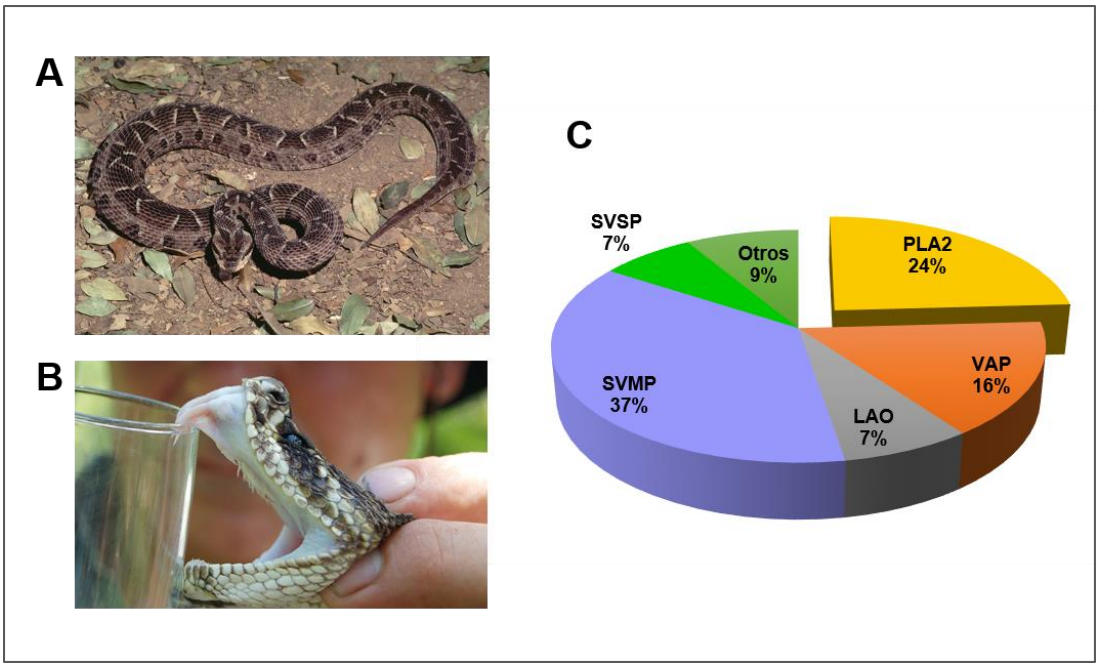


Figura 1. a) Imagen de *B. neuwidi diporus,* b) imagen de obtención de veneno de *B. neuwidi diporus*, c) composición relativa de proteínas (% de proteínas total de veneno) de *B. neuwidi diporus.* PLA2 fosfolipasa, VAP,péptidos vasoactivos, LAO L-aminoácido oxidasa, SVMP metaloproteinasa, SVSP serinproteasa, (Gay et al., 2015). Imagen provista por Patricia Geoghegan.

El suero antiveneno más usado en Argentina para el tratamiento de envenenamientos bothropicos es un fragmento de anticuerpo $F(ab´)_2$ producido por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB, Buenos Aires, Argentina) a partir de veneno de *B. alternatus* and *B. neuwiedi diporus* como immunógenos (de Oliveira, Lanari, Hajos, & de Roodt, 2011; Gay et al., 2015).

6.2.5 Material nano y microparticulado como complemento a la terapia con anticuerpos

La base de la terapia contra envenenamientos es el uso de sueros; sin embargo esto conlleva una serie de inconvenientes que deben tenerse en cuenta. **(1)** Aún no está disponible un antiveneno específico conteniendo un amplio espectro de anticuerpos requeridos para tratar el envenenamiento por diferentes especies de serpientes o la misma especie de diferentes lugares geográficos. La reactividad cruzada de anticuerpos, no implica necesariamente la ocurrencia de neutralización cruzada. Por ejemplo, los anticuerpos del

antiveneno de *Bothrops jararaca* reaccionan satisfactoriamente con el veneno de nueve especies diferentes de *Bothrops*, pero no son capaces de neutralizar los efectos producidos por la actividad de fosfolipasas PLA_2 ni la formación de edema (Ferreira, Moura-da-Silva, & Mota, 1992). **(2)** El hecho que el antiveneno esté compuesto por grandes proteínas heterólogas, genera una alta incidencia de reacciones adversas asociadas a la activación del sistema inmune. Esto depende de la calidad de los antisueros producidos y su nivel de purificación (Morais & Massaldi, 2009). **(3)** Hay casos en los que las manifestaciones clínicas de los envenenamientos no permiten identificar la especie de la que provenía el veneno, por lo que deben utilizarse kits para identificar la procedencia del veneno y poder realizar una correcta selección del antiveneno (León et al., 2011), **(4)** la efectividad del antiveneno se limita al nivel sistémico, al restablecer por ejemplo la capacidad de coagulación sanguínea, pero falla al revertir el daño tisular local. **(5)** La disponibilidad de antivenenos en las poblaciones pobres y de mayor riesgo muchas veces es deficiente (Cruz, Vargas, & Lopes, 2009; Thwin, Samy, Satyanarayanajois, & Gopalakrishnakone, 2010).

Dado que el uso clínico de antivenenos específicos basados en inmunoglobulinas no es completamente eficiente, sería interesante impulsar el desarrollo de plataformas antivenenos con un espectro de aplicación más abarcativo. **En este sentido una estrategia novedosa seria el uso de nanovesiculas/vesículas cuyas bicapas mimeticen las membranas celulares, con capacidad de secuestrar e inhibir enzimas como la PLA2 presente en los venenos.** Sabiendo que las bicapas liposomales se asemejan a las membranas celulares, Henry et al demostró la neutralización de un gran número de enzimas bacterianas, como la fosfolipasa C, con liposomas de esfingomielina sola o con colesterol (Henry et al., 2015). Teniendo en cuenta que las PLA_2s son enzimas que juegan un **rol crucial en la inducción del daño local que no es neutralizada por antisueros clásicos**, **la inhibición de su actividad** representa una atractiva estrategia adicional que podría ampliar el alcance del tratamiento del envenenamiento (J. M. a. Gutiérrez & Ownby, 2003; J. Gutiérrez & Lomonte, 1995; Lomonte, Angulo, Sasa, & Gutierrez, 2009).

6.2.6 Actividad de PLA_2

La superfamilia de proteínas fosfolipasa A2 se puede dividir en cuatro grandes categorías: fosfolipasa A2 secretadas (PLA_2), citosólicas (cPLA2), independientes de calcio (iPLA2s) y asociada a lipoproteina ((Lp) PLA2). Tanto los venenos de serpiente, como de abejas o escorpiones contienen fosfolipasas secretadas. Este grupo de enzimas tiene una masa molecular baja de unos 13-15 kDa y cataliza la hidrólisis de fosfoglicéridos (como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) a través del mismo mecanismo. Remarcablemente, a diferencia de la mayoría de las enzimas solubles, PLA_2 son únicas en que catalizan preferentemente sustratos agregados incluyendo monocapas de fosfolipidos, bicapas liposomas y micelas, a través de un fenómeno que se conoce como "activación interfacial". El sustrato difunde desde la membrana para entrar al sitio catalítico a través de un canal hidrofóbico. La enzima y el sustrato interaccionan en el sitio catalítico a través de puentes de hidrogeno entre los carbonilos de los enlaces éster en la posición *sn-1* y *sn-2.* Luego se produce la extracción de un protón de una molécula de agua seguido de un ataque nucleofílico en el enlace éster en la posición sn-2. La molécula de agua se activa por la presencia de un residuo de histidina o acido aspártico, de manera dependiente de Ca^{+2} (J. M. Gutiérrez & Lomonte, 2013). Esta hidrolisis da lugar a la formación de lisofosfolípidos y ácidos grasos. *In vivo*, uno de los principales productos de hidrolisis es el ácido araquidónico (presente en los fosfolipidos de las membranas celulares eucariotas) que se metaboliza a eicosanoides (como prostaglandinas o leucotrienos), por la acción de ciclooxigensas asi como liso-derivados que pueden producir un gran daño celular (Burke & Dennis, 2009; Kini, 2003).

Los venenos de *Bothrops spp.* contienen distintos tipos de PLA_2 responsables de un amplio espectro de actividades toxicas incluyendo neurotoxicicidad, miotoxicidad, citotoxicidad, actividad anticoagulante y proinflamatoria. La toxicidad no siempre está relacionada con la actividad fosfolipasa. Hay enzimas homologas de PLA_2 como las del tipo K49PLA_2 (contienen un residuo de lisina en la posición 49 en lugar de un residuo de ácido aspártico altamente conservado) que carecen de actividad lipasa, y cuya actividad no depende de Ca^{+2}. A pesar de ello, este grupo de toxinas genera

daños en la membrana plasmática e induce necrosis del musculo esquelético a nivel local y sistémico. Si bien su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado, estaría involucrada la unión de PLA_2 con receptores en la membrana plasmática que inducen un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática (J. Gutiérrez & Lomonte, 1995; Kini, 2003).

La gran abundancia de PLA_2 en la composición del veneno de *B. diporus* (24,1%) está directamente relacionada con la generación de inflamación, edema, mionecrosis y daño muscular agudo ocurridas en este tipo de envenenamiento. Del total de PLA_2 un 65% corresponde a las formas catalíticamente activas de las cuales se han identificado previamente dos isoenzimas PI y PII (Gay et al., 2015) con importante actividad de inducción de edema pero no de miotoxicidad (Daniele, Bianco, Delgado, Carrillo, & Fidelio, 1997). Dentro del grupo de proteínas homologas de PLA_2, sin actividad lipasa, se encuentra la miotoxina I K49-PLA2. Esta proteína fue estudiada previamente en el trabajo de (Geoghegan, Angulo, Cangelosi, Díaz, & Lomonte, 1999) en donde se mostró que ejerce una miotoxicidad muy potente así como actividad citolítica e inducción de formación de edema.

6.2.7 Inhibidores de PLA_2

En las últimas décadas se han encontrado una variedad de inhibidores específicos de la actividad enzimática de PLA_2. Una de las estrategias investigadas es el uso de **análogos de sustrato de PLA_2** extraídos de fuentes naturales (por ejemplo plantas medicinales), popularizados desde antiguo como medicamentos contra la inflamación y mordeduras de serpiente. Un ejemplo es el sesterterpenoide no esteroideo manolide, que se obtiene de esponjas marinas (Glaser & Jacobs, 1986). La actividad de otros principios como indometacina, flavonoides, retinoides y anticuerpos que se identificaron como inhibidores de PLA_2 también fue explorada. Únicamente manolide, sin embargo, llego a utilizarse en pruebas clínicas como anti-inflamatorio en pacientes con psoriasis. Por otra parte el gran problema del desarrollo de drogas análogas de sustrato como fosfotidilcolinas modificadas, tiene como problema asociado a su síntesis

la gran lipofilicidad de las cadenas acil *sn-1* y *sn-2* de los lípidos naturales (Narendra Sharath Chandra et al., 2007).

6.2.8 Arqueosomas como inhibidores de PLA_2

Estudios previos mostraron que diferentes tipos de arqueosomas preparados con arqueolipidos polares totales extraídos de las arqueas *Halobacterium cutirubrum*, *Methanosarcina mazei, Methanococcus voltae y Thermoplasma acidophilum* entre otras, fueron resistentes a la hidrolisis por parte de PLA_2 de veneno de abeja, así como de lipasa pancreática (tipo de PLA_2 secretada (Choquet, Patel, Sprott, & Beveridge, 1994; Patel, Agnew, Deschatelets, Fleming, & Sprott, 2000; Sprott, Dicaire, Fleming, & Patel, 1996). Esta resistencia puede explicarse considerando que los arqueolipidos están compuestos por cadenas de fitalinos saturadas unidas por enlaces éter al glicerol por una configuración *sn-2,3* (Corcelli & Lobasso, 2006) en lugar de las cadenas de ácidos grasos unidas al glicerol en los carbonos *sn-1,2* por enlaces éster de los fosfolípidos ordinarios. Al carecer de la esteroconfiguración *sn-1,2* y de los grupos funcionales que participan en la catálisis, estos: a) podrían no ser reconocidos por la enzima como ligandos o b) ser reconocidos**, pero no catalizada su hidrolisis; en este último caso podrían funcionar como inhibidores de actividad catalítica por bloqueo del sitio activo.**

En este Capítulo se evaluará a los ARQ como inhibidores de la enzima PLA_2 para usarse como terapia complementaria de antisueros, en el envenenamiento producido por mordeduras de *Bothrops neuwidi diporus*. A tal fin, específicamente en primer lugar se determinará la capacidad inhibitoria de la actividad de la enzima PLA_2 *in vitro* y la capacidad de ARQ para neutralizar el efecto citotóxico de un extracto de veneno crudo, sobre diferentes líneas celulares.

6.3 Materiales y Métodos

6.3.1 Preparación de nanovesículas

Las nanovesículas con LPT (ARQ) y con HSPC:colesterol 7,5:2,5 relación masa:masa (L) se prepararon y esterilizaron por filtración siguiendo el protocolo detallado en el **Capítulo 2, Sección 2.3.3.**

6.3.2 Preparación de vesículas grandes

Se preparó una formulación de ARQ grandes (ARQg) y L grandes (Lg) usando la misma composición lipidica que en la sección anterior. Se formó el film lipídico en un balón con flujo de nitrógeno que se resuspendió mediante agitación magnética en buffer Tris pH 7,4 con NaCl 0,9 % m/v hasta conseguir una concentración final de 50 mg de LT/ml de suspensión.

6.3.3 Esterilización de vesículas grandes por autoclave

Las suspensiones de vesículas grandes se pusieron en frascos de vidrio con la tapa débilmente cerrada para permitir el contacto de del vapor presurizado con las muestras. Las vesículas se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C en un autoclave eléctrico VZ 100 (Villar y Zaurdo S.R.L. Buenos Aires, Argentina).

6.3.4 Caracterización de nanovesículas y vesículas grandes

La cuantificación de lípidos totales LT, el tamaño promedio, pdi y potencial ζ se midió como se describe en el **Capítulo 2, Sección 2.3.5.**

6.3.5 Inhibición de actividad de fosfolipasa PLA_2

Se midió la capacidad de L y ARQ para disminuir la actividad fosfolipasa de la enzima PLA_2. Para esto se utilizó el kit EnzChek® Phospholipase A_2 Assay de Molecular Probes, Invitrogen (Oregon, USA). Este ensayo permite seguir la

actividad de enzimas PLA_2, extraídas de veneno de abeja *Apis mellifera*, a partir de la hidrolisis de un sustrato específico de la enzima PC-A2 BODIPY. El clivaje del enlace éster que une al ácido pentanoico-BIODIPYFL con el glicerol en la posición *sn-2* hace que se separen las dos moléculas de BIODIPY y se elimine el efecto de *quenching* generado un aumento en la intensidad de fluorescencia (IF) a 515 nm. Por lo tanto la hidrolisis enzimática y la cantidad de producto generado serán proporcional a la IF registrada.

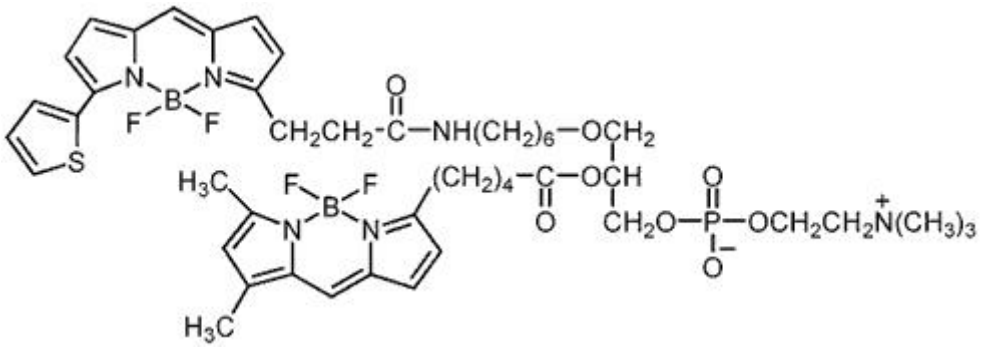


Figura 2. Estructura química del sustrato PC-A2 BIODIPY. La enzima PLA_2 hidroliza el enlace éster en la posición sn-2.

Debido a que PLA_2 actúa sobre agregados lipídicos, el sustrato se incorporó en liposomas (LS). Para esto, se prepararon liposomas por el método de inyección etanólica mezclando diolfosfatidilglicerol (DOPG), dioleilfosfatidilcolina (DOPC) y el sustrato PC-A2 BIODIPY en una relación de DOPG:DOPC:PCA2BIODIPY 1:1:0,1 mol:mol según las indicaciones del kit.

Para medir la capacidad de inhibición de hidrolisis enzimática de L y ARQ, éstos se co-incubaron con PLA_2 y su sustrato LS. Se agregó una suspensión de PLA_2 en una placa de 96 pocillos para obtener una concentración final en cada pocillo de 0,25 U/mL Luego se co-incubó la enzima con LS y ARQ o L a concentraciones de 0,25; 2,5; 25; 75 y 150 µg/mL de LT y 25 µg/mL de LS. Para conocer la actividad máxima de la enzima, esta se incubó únicamente con LS. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se midió IF a $\lambda_{emisión}$ 515 nm con $\lambda_{exitación}$ 460 nm cada 1,5 minutos con el equipo Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader.

6.3.6 Cultivos celulares

Las líneas celulares de fibroblastos de ratón L20B y 3T3, y células musculares de rabdomiosarcoma humano RD fueron provistas por el Centro de Control de Biológicos del Instituto Malbrán. Las tres líneas se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM), con rojo fenol suplementado con 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de glutamina al 10% de SFB. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmosfera de humedad con 5% de CO_2. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana.

6.3.7 Viabilidad celular

Se determinaron los niveles de citotoxicidad de ARQ y L sobre células L20B, RD y 3T3 por el método de MTT, LDH y Rojo Neutro (RN).

El ensayo de RN se basa en la capacidad de las células viables para incorporar y retener en su interior el colorante vital RN. Este colorante débilmente catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva no iónica y se concentra en los lisosomas, donde se carga positivamente, debido a la disminución del pH del entorno, entonces se une por interacciones electrostáticos a grupos aniónicos y/o grupos fosfato de la matriz lisosomal donde queda retenido. La captura celular del colorante se puede modificar por alteraciones en la superficie celular o en las membranas lisosomales, así como por la pérdida de capacidad de la célula para mantener los gradientes de pH, a través de la producción de ATP. Consecuentemente la cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de colorante retenido, que se cuantifica por su absorbancia a 540 nm (Repetto, Del Peso, & Zurita, 2008).

Para realizar los ensayos de MTT, LDH y RN se sembraron 2 x 10^4 células L20 B, RD y 3T3 por pocillo en placas de 96 pocillos con MEM suplementado con L-glu y ATB-ATM al 10% de SFB. Las células se dejaron crecer durante 24 horas, se descartó el medio de cultivo, se agregaron diluciones de nanovesículas en MEM con concentraciones de 3,7; 11,1; 33,3; 100 y 300 µg/mL de LT y se incubaron durante 24 o 48 hs a 37 °C en una atmosfera de humedad con 5% de CO2.

En el caso del ensayo de RN, luego de transcurrido el tiempo de incubación se descartó el sobrenadante celular y se agregó el reactivo de RN (Sigma Aldrich) a una concentración de 40 µg/ml de RN en MEM. Se dejó incubando a 37 °C en una atmosfera de humedad con 5% de CO_2 durante 3 horas. Luego las células se lavaron con 250 µl/well de PBS. Se agregaron 100 µl/well de solución reveladora (50% etanol, 49% agua y 1% ácido acético) y la placa se agitó durante 30 minutos protegida de la luz. Por último, se midió absorbancia a 540 nm en un lector Multiskan Go marca Thermo Scientific. La viabilidad celular se calculó en términos de porcentaje de las células control sin tratamiento.

La generación de lisis celular, medida por la cantidad de enzima citoplasmática LDH en el sobrenadante celular y el nivel de metabolismo celular medido por el método de MTT se determinó como se describe en el **Capítulo 2 Sección 2.3.12.**

6.3.8 Determinación de dosis citotóxica 50 (DC50)

La dosis citotóxica 50 (DC50) es la concentración de veneno que mata al 50 % de las células en un cultivo *in vitro* y es un parámetro que se utiliza para medir su actividad.

La actividad *in vitro* del veneno de serpiente se midió en base al protocolo modificado de (Oliveira, de Oca, Duarte, Diniz, & Fortes-Dias, 2002). Se preparó una suspensión de veneno (SV), para esto se pesaron 2 mg de veneno crudo extraído de *Bothrops neuwiedi diporus* que se resuspendieron en PBS hasta lograr una concentración de 100 µg/ml de veneno y se filtraron por membranas de 0,22 µm en esterilidad. Se sembraron 2 x 10^4 células L20B, 3T3 o RD por pocillo en una placa de 96 pocillos con MEM suplementado con L-glu y ATB-ATM al 10 % de SFB. Las células se dejaron creciendo durante 24 horas y se descartó el medio de cultivo. Luego se incubaron diluciones al medio de SV en MEM al 5% de SFB. Luego de 24 horas se determinó la actividad citotóxica del veneno sobre las células por el ensayo de RN y al observar al microscopio el grado de confluencia de la monocapa y cambios morfológicos. En este último caso de registró como actividad citotóxica positiva cuando se determinó una grado alto

de disrupción de la monocapa medido por una confluencia < al 80% o por cambios morfológicos.

6.3.9 Neutralización *in vitro* de veneno de serpiente *B. neuwidi diporus*

En este ensayo se evaluó la capacidad de las diferentes vesículas de neutralizar la citotoxicidad generada por el veneno de serpiente *B. neuwiedi diporus* sobre cultivos celulares. Para esto se midió la citotoxicidad por el ensayo de RN y al observar cambios morfológicos y disrupción de la monocapa celular al microscopio.

Se sembraron 2 x 10^4 células L20B, 3T3 o RD por pocillo en una placa de 96 pocillos con MEM suplementado con L-glu y ATB-ATM al 10 % de SFB. Las células se crecieron durante 24horas. Luego se incubaron diferentes concentraciones de veneno con ARQ, L, ARQg y Lg a 37 °C en MEM al 5 % de SFB. Luego de 30 minutos de incubación, las mezclas de veneno con las diferentes vesículas se agregaron sobre las células y se dejaron incubando a 37°C con CO_2 al 5%. Luego de 24 horas se determinó la actividad del veneno sobre las células como se describió en la sección anterior.

6.3.10 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una entrada, seguido del test de Dunnet utilizando el software Prisma 6.01 (Graphpad Software Corporation, San Diego, California, EEUU). El valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$; n.s. no significativo ($p > 0,05$). Para calcular la DC50 se utilizó el análisis estadístico de Spearman Karber en función de los resultados positivos y negativos obtenidos por observación. También se calculó con los resultados obtenidos con el ensayo de RN interpolando en la curva la dosis de veneno resultante de reducir un 50 % la viabilidad celular.

6.4 Resultados

6.4.1 Características fisicoquímicas de nanovesículas y vesículas grandes

Las suspensiones de ARQ y L homogenizadas por sonicación y extrusión y luego esterilizadas por filtración, resultaron de tamaños inferiores a los 200 nm, índices de polidispersidad bajos (inferiores a 0,3) y un potencial ζ de -40 y -7 mV respectivamente (Tabla 1). Por otra parte las vesículas no sometidas a homogenización (vesículas grandes), resultaron de tamaños promedios muy dispares: cercanos a los 600 nm (ARQg) y 4,5 µm (L). Ambos tipos de vesículas mostraron valores altos de pdi, sin variaciones significativas en potencial ζ respecto de las nanovesículas. La esterilización de las vesiculas se llevó a cabo mediante calor húmedo, dado su tamaño muy superior a los 220 nm, que les impediría atravesar los poros de los filtros de esterilización. Luego de someter las vesículas a un ciclo de autoclavado, sus parámetros estructurales se volvieron a determinar. Observamos que los ARQg mantuvieron su tamaño promedio, pdi y potencial ζ mientras que los Lg aumentaron significativamente su tamaño promedio a valores entre 6 – 7 µm, aunque no se modificó su pdi y potencial ζ (Fig. 3).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de nanovesículas y de vesículas grandes autoclavadas.

Muestra	Proceso de preparación	Proceso de esterilización	Lípidos Totales	Tamaño Promedio	pdi	Potencial ζ
			mg/mL	nm		mV
ARQ	Resuspensión del film lipídico por agitación Sonicación Extrusión por membranas de 200 - 100 nm	Filtración por membrana de Nylon de 200 nm	9,0 ± 0,8	185 ± 6,1	0,23 ± 0,09	-39,8 ± 5,9
L			5,7 ± 1,2	157 ± 29	0,12 ± 0,09	-6,8 ± 3,3
ARQg	Resuspensión del film lipídico por agitación	Calor húmedo 15 minutos a 121 °C	47,2 ± 5,3	439 ± 21	0,51 ± 0,04	-42,7 ± 2,9
Lg			45,8 ± 3,8	6700 ± 650	0,47 ± 0,13	-3,7 ± 0,9

Los resultados se expresan como el promedio ± DS de tres lotes independientes.

Estos resultados muestran una vez más la mayor estabilidad estructural de los arqueolípidos frente a altas temperaturas, que los lípidos de fosfatidilcolina hidrogenados.

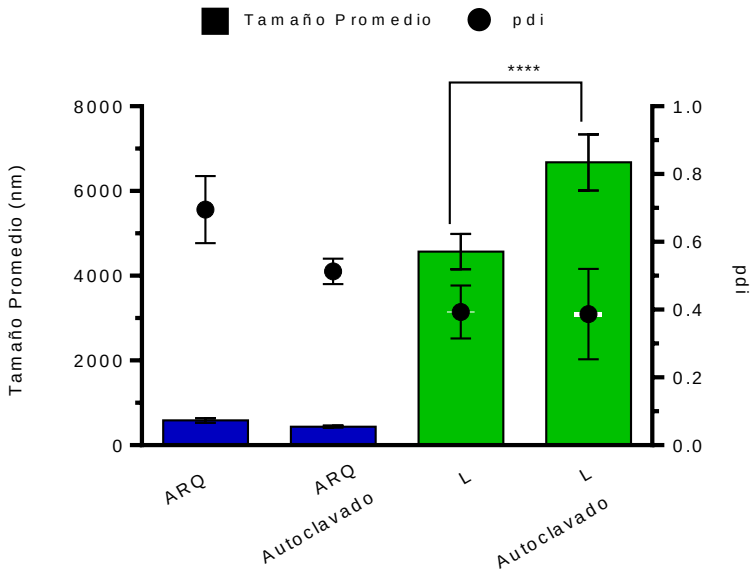


Figura 3. Estabilidad de las formulaciones ARQg y Lg durante la esterilización por calor húmedo. Ciclo de autoclavado de 15 minutos a 121°C y 1 atm de sobrepresión.

6.4.2 Nanovesículas como inhibidores de la enzima PLA_2

Con el objetivo de determinar si los arqueolipidos actuaban como inhibidores, la actividad de la enzima fosfolipasa PLA_2, se midió en presencia de nanovesiculas ARQ y L. Cuando la enzima se incubó con un sustrato conocido (el lípido LS) y se midió la cantidad de sustrato hidrolizado a lo largo del tiempo, se observó que durante los primeros 30 minutos, esta aumentaba linealmente. Observamos después que al transcurrir la reacción, la enzima hidrolizó cada vez menos sustrato hasta disminuir por completo su actividad a los 190 minutos de reacción, punto a partir del cual la cantidad de producto generado se mantuvo constante. Esto se explica porque la cantidad de producto generado depende de la cantidad de sustrato en el medio de reacción; a medida que el sustrato se consume, la cantidad de producto generado en un intervalo de tiempo es menor;

una vez consumido todo el sustrato, la cantidad de producto generada se mantiene constante.

Como se muestra en la Fig. 4 en presencia de ARQ, la cantidad final de producto generado disminuyó en un 29 ± 2 %, mientras que en presencia de L disminuyó un 15 ± 1 %. En el caso de ARQ, la disminución de la actividad enzimática dependió de la concentración de nanovesículas: a partir de 2,5 µg/mL se comenzó a registrar una inhibición que aumentó hasta los 75 µg/ml. Por encima de esa concentración de ARQ, no se registró aumento de inhibición. (Fig. X) Por otra parte en el caso de los L, la inhibición comenzó a ser significativa a partir de los 150 µg/mL. A su vez, al calcular el % inihibicion/[nanovesicula] como medida de efectividad, los **ARQ son ~ 4 veces más efectivos que L inhibir actividad PLA2**

6.4.3 Citotoxicidad de nanovesículas sobre células RD, 3T3 y L20B

Para determinar las concentraciones de vesículas que se podían utilizar sobre los cultivos sin dañar a las células, se evaluó la citotoxicidad de ARQ y L sobre las líneas celulares de fibroblastos L20B, la línea celular de fibroblasto 3T3 y de rabdmiosarcoma RD mediante tres métodos: el método de RN, MTT y de cuantificación de la enzima LDH.

Al incubar la formulación de nanovesículas L durante 24 o 48 horas con las tres líneas celulares, no se registró disminución de la viabilidad celular con todas las concentraciones testeadas por los tres métodos utilizados (Fig. 5 y Fig. 6). Al incubar durante 24 horas la formulación de ARQ sobre las células L20B se registró una disminución en la viabilidad celular de un 25% con 300 µg/mL de nanovesículas. Sobre las células 3T3 a partir de 100 µg/mL se registró una disminución del 75 % de la viabilidad celular por el método de RN, sin embargo con ésta concentración se registró un aumento de casi un 50 % en la proliferación celular por el método de MTT. Sobre las células RD hasta 24 horas de incubación no se determinó una disminución en la viabilidad celular ni por el método de MTT ni por el de LDH aunque con RN se observó una disminución de un 40 % de la viabilidad a partir de 100 µg/mL (Fig. 5).

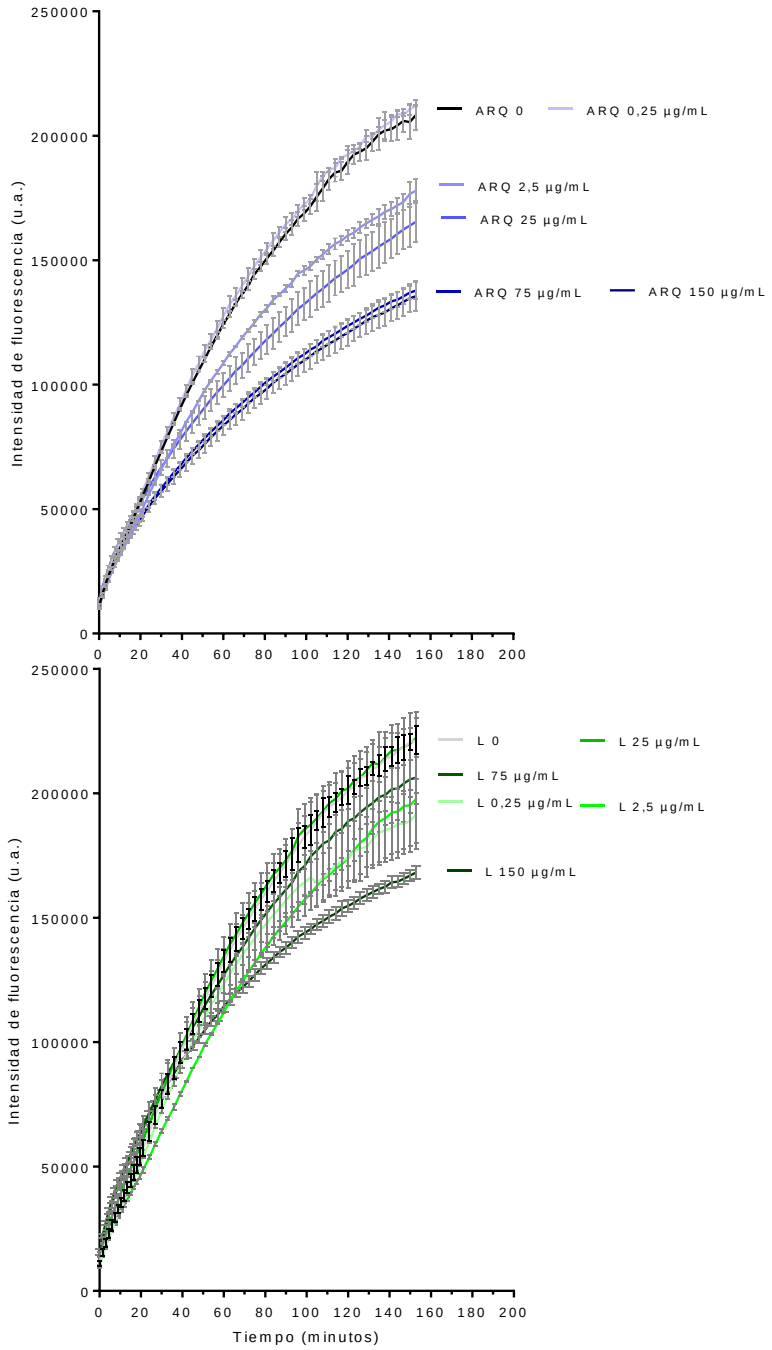


Figura 4. Actividad de la enzima PLA_2 medida por IF generada por el producto de hidrolisis del sustrato LS co-incubada con ARQ y L a diferentes concentraciones. (n=3)

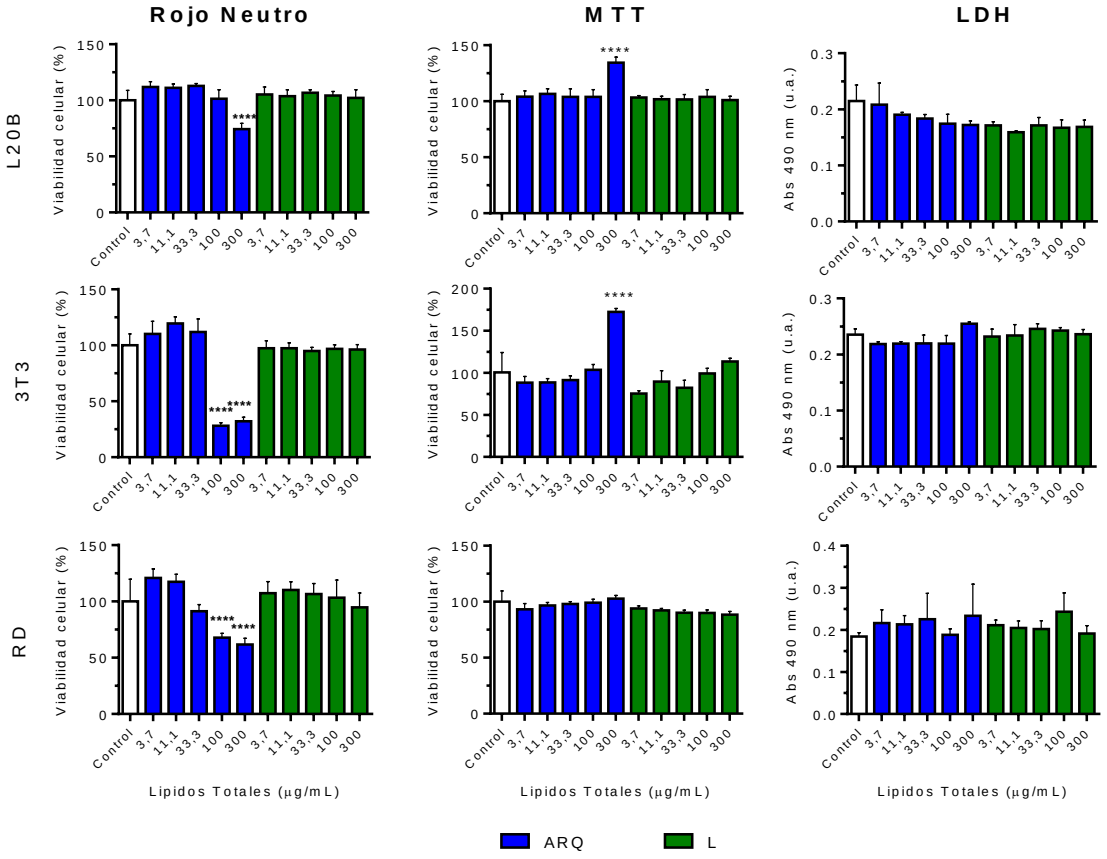


Figura 5. Viabilidad celular, determinada por Rojo Neutro, MTT y LDH de las líneas 3T3, L20B y RD luego de 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de ARQ y L. Diferencias significativas en comparación con el Control. (n=3)

Luego de 48 horas de incubación con ARQ, en las tres líneas celulares se registró una aumentó citotoxicidad. Sobre las células L20B y RD se registraron aumentos en los niveles de LDH desde 11,1 µg/mL de nanovesículas. Además por RN se determinó una disminución de la viabilidad de un 90 % para todas las concentraciones en RD y con 300 µg/mL para L20B y RD (Fig. 6).

En suma, estos resultados mostraron que la citotoxicidad de ARQ fue dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. La máxima concentración que se pudo utilizar sin afectar la viabilidad celular fue de hasta 33,3 ug/ml para L20B y 3T3, hasta 100 µg/mL sobre células L20B y 24 horas de incubación.

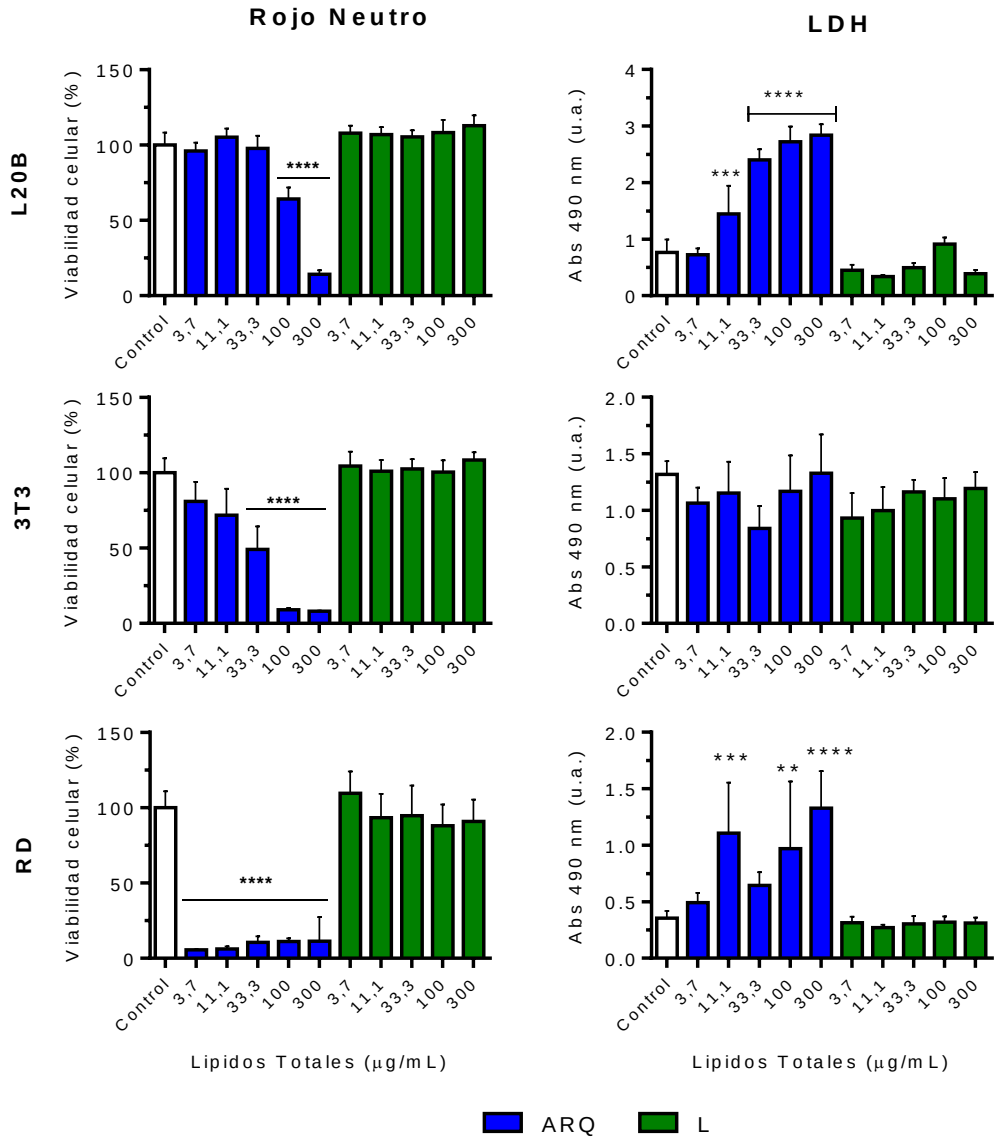


Figura 6. Viabilidad celular, determinada por Rojo Neutro y LDH de las líneas 3T3, L20B y RD luego de 48 h de incubación con diferentes concentraciones de ARQ y L. Diferencias significativas en comparación con el Control. (n=2)

6.4.4 Citotoxicidad de veneno de *B. neuwiedii* diporus sobre células RD, 3T3 y L20B

La citotoxicidad generada por el veneno extraído de serpientes *B. neuwiedii* se evaluó luego de 24 horas de incubación con las líneas celulares L20B, 3T3 y RD. Para esto se determinó si se producía disrupción de la monocapa celular así como los niveles de viabilidad celular determinados por el método de RN.

Como se muestra en la Tabla 2 la actividad citotóxica del veneno (actividad **+**) se observó a partir de concentraciones de 6,5 µg/mL de veneno. A partir de los valores obtenidos se pudo determinar utilizando el análisis estadístico Spearman Karber, la dosis citotóxica 50 (DC50) que fue de 2,5 µg/mL.

Tabla 2. Actividad del veneno de *B. neuwiedi diporus* sobre las líneas celulares RD, L20B y 3T3 luego de 24 h de incubación.

Concentración de veneno (µg/mL)										**Actividad Citotóxica**
0,049	0,098	0,195	0,391	0,781	1,563	3,125	6,25	12,5	25	
x										
	x									
		x								**-**
			x							**-**
				x						**-**
					x					**-**
						x				**+**
							x			**+**
								x		**+**
									x	**+**

+ Cambios morfológicos o inhibición del crecimiento con una confluencia inferior al 80 % - Monocapa con una confluencia > 80% cambios morfológicos

Además se determinó la viabilidad celular por RN; sobre las células L20B y 3T3. A partir de 3,75 µg/mL de veneno la viabilidad celular disminuyó de manera significativa y en las células RD a partir de 0,938 µg/mL (Fig. 7). A partir de la interpolación de las curvas de viabilidad se determinó la DC50 para L20B, 3T3 y RD que fueron de 2,803; 3,285 y de 2,589 µg/mL respectivamente. Los valores obtenidos fueron coincidentes con el resultado de observación al microscopio.

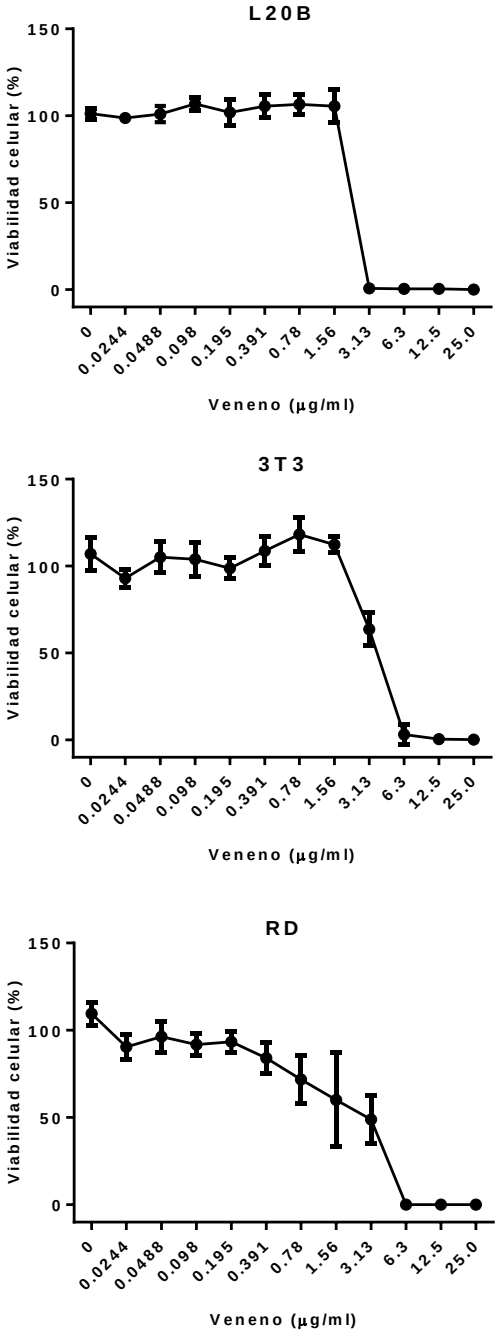


Figura 7. Viabilidad celular, determinada por Rojo Neutro, de las líneas 3T3, L20B y RD luego de 24 h de incubación con diferentes concentraciones de veneno de *B. neuwiedi diporus.* Diferencias significativas en comparación con el Control.

6.4.5 Evaluación de neutralización de veneno con nanovesículas

Se evaluó la capacidad de nanovesículas ARQ y L para neutralizar la DC50 y dos veces la DC50 del veneno de *B. neuwiedi diporus* sobre las líneas celulares

RD, L20B y 3T3. Las concentraciones elegidas para probar la neutralización fueron las máximas permitidas según los resultados obtenidos de citotoxicidad de las nanovesículas solas: hasta 0,03 mg/ml (o 33,3 ug/mL). En la Tabla 3 se puede observar que ninguna de estas concentraciones, tanto de ARQ como de L, logró inhibir la actividad del veneno a la DC50. Como la disrupción de la monocapa fue superior al 80 % en todos los casos en donde se incubó el veneno no se realizó la determinación de viabilidad por RN.

Tabla 3. Actividad de veneno de *B. neuwiedi diporus* sobre las líneas celulares RD, L20B y 3T3 luego de 24 h de incubación con nanovesículas ARQ y L.

ARQ 0,01	**ARQ 0,03**	**L 0,01**	**L 0,03**	**V 2,5**	**V 5**	**Actividad del veneno**
mg/ml				µg/ml		
						-
x						**-**
	x					**-**
		x				**-**
			x			**-**
				x		**+**
					x	**+**
x				x		**+**
	x			x		**+**
x					x	**+**
	x				x	**+**
		x		x		**+**
			x	x		**+**
		x			x	**+**
			x		x	**+**

+ Cambios morfológicos o inhibición del crecimiento con una confluencia inferior al 80 % - Monocapa con una confluencia > 80% sin cambios morfológicos

Luego se ensayó la mitad de la DC50 y se aumentó la concentración de ARQ a 0,1 mg/ml (µg/mL) solo con la línea celular L20B para la cual esta concentración de ARQ no resultó citotóxica. Al observar las células al microscopio no se registró efecto de actividad del veneno aún en la DC50. Al cuantificar la viabilidad celular por RN se pudo determinar que el veneno a la DC50 disminuyó un 25 % la viabilidad y co-incubar con ARQ a 0,1 mg/mL, la viabilidad aumentó un 10 %(Fig. 8).

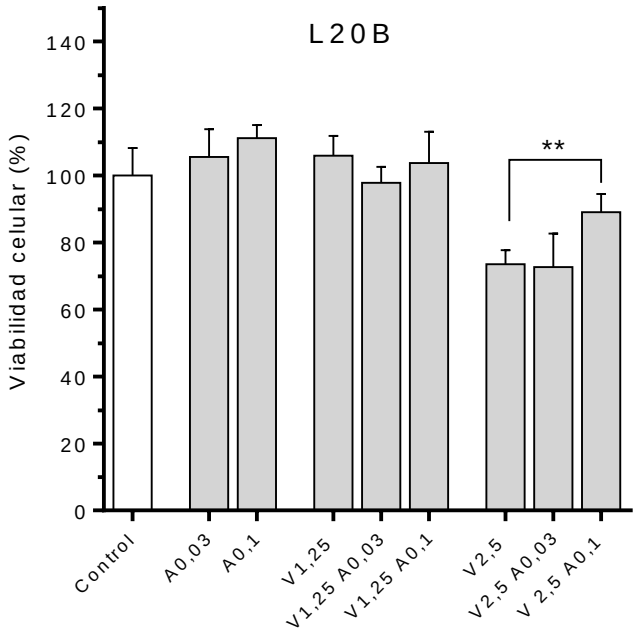


Figura 8. Viabilidad celular, determinada por Rojo Neutro de la línea celular L20B luego de 24 h de incubación con diferentes concentraciones de veneno *de B. neuwiedi diporus* y nanovesículas ARQ. (n=2)

6.4.6 Evaluación de neutralización de veneno con ARQ grandes

En esta sección se determinó la capacidad de neutralización de ARQg sobre la línea celular L20B a 0,5; 1, 2 y 4 veces la DC50 de concentraciones 0,1; 1 y 10 mg/mL de ARQg. Ahora, la turbidez del sobrenadante celular resultante de las altas concentraciones y elevados tamaños de ARQg, impidió observar la monocapa de células al microscopio. Por el método de RN se pudo determinar que ninguna de las concentraciones testeadas ARQg disminuyó la viabilidad celular. Observamos aquí que una concentración de veneno de la mitad de la DC50, generó una viabilidad celular de un 30%, mientras que en presencia de 10 mg/ml ARQg, la viabilidad subió al 80 %. A 10 mg/ml ARQg se logró aumentar un 20 % la viabilidad para la DC50 (Fig. 9).

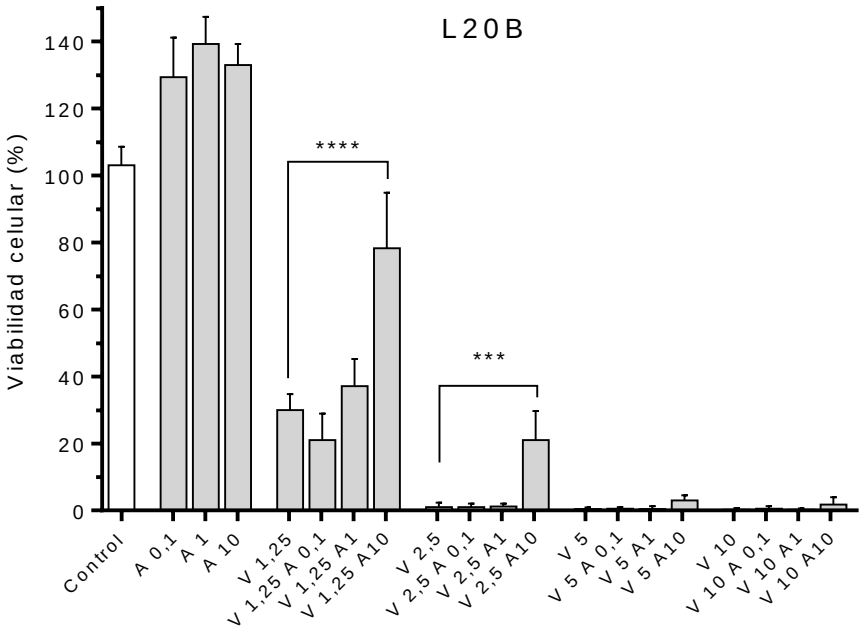


Figura 9. Viabilidad celular determinada por Rojo Neutro sobre la línea celular L20B luego de 24 h de incubación con diferentes concentraciones de veneno de *B. neuwiedi diporus* y ARQg. (n=2)

6.5 Discusión

En este capítulo determinamos el efecto de esterilización por autoclave sobre la estabilidad estructural de ARQ y L de gran tamaño. La esterilidad de las formulaciones liposomales es un requisito para su administración *in vivo*, especialmente por ruta sistémica. Como las vesículas de gran tamaño no podían ser esterilizadas por filtración, se aplicó la esterilización por calor húmedo. Esta técnica a su vez trae ciertas ventajas sobre la esterilización por filtración, en tanto pueda ser implementada sin inconvenientes sin perder la estabilidad coloidal de la muestra, ya que a diferencia de la filtración, elimina contaminantes como virus y es un proceso más rápido para la aplicación a gran escala (Pattni, Chupin, & Torchilin, 2015).

Observamos que el autoclavado aumentó el tamaño de las vesículas Lg, pero no el de ARQg (Fig. 3). Estas diferencias en la estabilidad están relacionadas con la estructura química de cada lípido. Cuando los lípidos convencionales se exponen a altas temperaturas se genera una transición de fase abrupta de la bicapa lipídica desde un estado gel a liquido-cristalino (Kitayama et al., 2014). Este es el caso de HSPC con una temperatura de transición de 53°C. Este cambio puede dañar las bicapas lipídicas generando una pérdida irrecuperable por oxidación, hidrólisis y agregación (Pattni et al., 2015). Por otra parte, desde hace varios años se está estudiando la estabilidad de arqueosomas frente a la esterilización por autoclave obteniéndose buenos resultados en términos de estabilidad física (Caimi et al., 2017). Esto se puede explicar porque los arqueolípidos tienen una temperatura de transición de fase mucho menor, entre -20 y -15 ° C, probablemente por la presencia de la cadenas carbonadas ramificadas (Koga, 2012) por lo que no sufren cambios abruptos en el estado de las bicapa.

Con el objetivo de tener una primera aproximación sobre la actividad de los ARQ como posibles inhibidores de PLA_2 se trabajó con un kit comercial que mide la actividad de PLA2 de veneno de abeja. Si bien las fosfolipasas de abeja y serpientes tienen diferentes estructuras moleculares, utilizan el mismo

mecanismo de catálisis (Scott et al., 1990) por lo que es válido utilizarla como modelo de estudio. Los ARQ lograron inhibir la actividad de 0,25 U/mL de PLA_2 a partir de una concentración de 2,5 µg/mL. Esta inhibición fue dosis dependiente hasta 75 µg/mL donde se logró la inhibición máxima: 30 % menos de actividad enzimática. Por otra parte con la misma concentración de L no se logró disminuir la actividad (Fig. 4) y recién con 150 µg/mL se registró una disminución de actividad del 15%. Si bien con los ensayos realizados no se podría establecer cuál es el tipo de inhibición, en principio ambas formulaciones bloquearían el sitio activo de la enzima de manera permanente ya que en ambos casos parte del sustrato queda sin hidrolizar. Las diferencias observadas entre formulaciones se podrían explicar por la falta de enlace éster en los arqueolipidos, grupo funcional clave durante la catálisis (Scott et al., 1990), que evitarían su hidrolisis (Choquet et al., 1994) haciéndolos más eficientes inhibidores de la enzima.

Para evaluar la capacidad de ARQ de neutralizar el veneno de serpientes se decidió realizar ensayos *in vitro* sobre líneas celulares. Los ensayos *in vivo* requieren de un número alto de animales para testear cada una de las actividades toxicas además de causarle un considerable sufrimiento al animal al inducir necrosis, hemorragias internas, edemas y dolor. Sumado a esto, los ensayos son caros y los resultados muchas veces muestran muy poca o nula correlación con el envenenamiento en humanos (de Souza et al., 2015; Theakston, Warrell, & Griffiths, 2003). Estos factores fueron tenidos en cuenta en el trabajo de(Oliveira et al., 2002), donde se evaluó en que extensión los ensayos *in vitro* reflejaban la toxicidad de los venenos de serpiente *in vivo*. Para esto compararon sus resultados con los obtenidos previamente *in vivo* por (Sanchez et al., 1992). El método utilizado para medir actividad del veneno fue determinar la citotoxicidad con RN. Mediante este ensayo determinaron la DC50 de varios venenos de serpientes del genero *Bothrops* incluido *B. neuwidi diporus* y los compararon con los valores obtenidos de (Sanchez et al., 1992) para la DL50 tanto por por inyección intravenosa como por intraperitoneal. Encontraron una correlación positiva ($p<0,001$) entre la DC50 y la mediana de la DL50 por inyección intravenosa ($R^2 = 0,7954$) así como para la LD50 intraperitoneal ($R^2 = 0,6453$). Por otra parte, no encontraron correlación entre la DC50 y la actividad medida por (Sanchez et al., 1992) en términos de formación de edema, actividad

necrotizante y generación de hemorragia. Más aun, no encontraron correlación positiva para algunas especies de *Bothrops*. Por esta razón advierten que el reemplazo de ensayos *in vivo* por ensayos *in vitro* solo se debe utilizar en el caso en donde se observe correlación entre la DC50 y la DL50 (Oliveira et al., 2002).

Antes de llevar a cabo los ensayos de neutralización fue necesario determinar: a) la DC50 del veneno y b) las concentraciones máximas de ARQ y L solos que no generaran citotoxicidad.

Se midió la DC50 del veneno de *B. neuwidi diporus* sobre fibroblastos L20B, 3T3 y células de rabdomiosarcoma RD. Los valores, que variaron entre 2,589 - 3,285 µg/mL dependiendo del tipo celular usado, fueron ligeramente inferiores a los reportados por (Oliveira et al., 2002) sobre células Vero (14,4 ± 4,26 ug/mL). La causa de esta diferencia puede ser la variabilidad en la composición los venenos que se observa incluso entre venenos de serpientes de la misma especie. (Sousa et al., 2013).

La citotoxicidad de ARQ fue dosis dependiente. A las 24 horas, únicamente se vio reflejada por el ensayo del colorante vital RN siendo de 33,3 µg/mL para las células RD y 3T3 y de 100 µg/mL para L20B (Fig. 5). Como la estructura de la membrana y el metabolismo celular se mantuvieron óptimos, la disminución en la captación del colorante RN se pudo deber a daños producidos a nivel lisosomal (Repetto et al., 2008). El aumento en la citotoxicidad a las 48 horas fue lógico debido al aumento en el tiempo de exposición, en este caso sí se detectó lisis de la membrana celular junto con una disminución de la captación de RN (Fig. 6). La combinación de estos indicadores hace suponer que la toxicidad a este tiempo se debe a un efecto citotóxico a nivel general. **Tanto las diferencias de toxicidad entre ARQ y L como el daño lisosomal a las 24 horas podrían ser un indicio de una mayor tasa de captura celular**. Tanto en este trabajo (**Capítulo 3 Sección 3.4.4**) como en estudios previos de nuestro grupo (Higa et al., 2012; Perez et al., 2014) ya se habían probado las diferencias de captura de vesículas con arqueolípidos sobre L. Además como los ARQ son internalizados por endocitosis vía RS (**Capitulo 2 Sección 2.4.7**), su acumulación exacerbada dentro del sistema endolisosomal podría generar el daño observado en la membrana de los lisosomas.

Una vez obtenidos los valores de CD50 (2,5 µg de veneno/mL) y las concentraciones de ARQ y L que no generaron citotoxicidad, se testeó la capacidad de las nanovesículas de neutralizar la citotoxicidad. Los resultaron mostraron que en las tres líneas celulares testeadas, no se registró ningún efecto de inhibición sobre la actividad del veneno hasta 33,3 µg/ml de ARQ y L (Tabla 3). Estos resultados decepcionantes se mantuvieron hasta los 100 µg/ml ARQ, (únicamente determinados sobre las células L20B, la única de las tres líneas celulares que no evidenció disminución de la viabilidad celular con esta concentración de ARQ, a las 24 horas [Si bien a las 48 ocurrió una leve disminución de la viabilidad celular, la actividad del veneno se determinó a las 24 horas cuando no alcanzó a manifestarse efecto citotóxico por parte de ARQ]). En este caso a una DC50 de veneno, la presencia de tal elevada concentración de ARQ aumentó la viabilidad un 10 % (Fig. 8).

Vale la pena señalar que los tres tipos celulares utilizados son células no fagocíticas. Sus mecanismos de internalización abarcan desde endocitosis dependiente de clatrina, caveolina a macropinocitosis. Los RS-AI/II pueden funcionar como receptores endocíticos internalizando ligandos a través de endocitosis dependiente de clatrina o por endocitosis independiente de clatrina (por ejemplo, dependiente de caveolina) (Zani et al., 2015). Estos mecanismos endociticos operan internalizando material nanoparticulado de aproximadamente 120 nm, como las nanovesiculas (Yameen et al., 2014). El tamaño promedio de 450 nm de ARQg restringe significativamente su internalización por parte de este tipo de células: ARQg y Lg únicamente pueden ser fagocitados. El uso de ARQg como inhibidores de venenos permite utilizar altas concentraciones de vesículas, porque al no ser internalizadas, su citotoxicidad se reducirá para con aquellas células que no sean fagocíticas. Si bien no se realizaron ensayos de captura celular esto se pudo corroborar al determinar la citotoxicidad por RN en donde no se registró disminución de la viabilidad hasta 10 mg/ml de ARQg (Fig. 9), mientras que con 300 µg/ml de ARQ con tamaños de 185 nm disminuyó la viabilidad significativamente.

La mayor concentración de ARQg elevó la capacidad de las vesiculas para neutralizar el veneno: a 1,25 µg/mL de veneno (la mitad de la DC50), la viabilidad fue de ~30 %; al co-incubar esa dosis de veneno con 10 mg/mL de ARQg la

viabilidad aumentó al ~80%. A una concentración de veneno de DC50, la viabilidad celular fue nula; al co-incubar con 10 mg/mL de ARQg, la viabilidad celular aumentó al 20 % (Fig. 9). Es importante resaltar que el valor de la DC50 tiene cierta variabilidad; y en los distintos ensayos y repeticiones hubo casos para los que para 2,5 µg/mL de veneno se registró una viabilidad celular inferior (Fig 9) o superior del 50 % (Fig. 8). Estos cambios estarían relacionados con la variabilidad inherente a la preparación de las suspensiones de veneno que se utilizan en cada ensayo.

En el trabajo de (de Souza et al., 2015) se correlaciona la actividad de enzimas PLA2 con la DC50. La actividad de PLA2 se mide con el kit EnzChek® Phospholipase A2 Assay utilizado en este trabajo. La actividad de enzimas PLA2 que hay en 2 µg de veneno de serpiente es calculada como porcentaje de actividad tomando como 100 % la actividad de 10 U/mL de PLA2 de veneno de abeja. A partir de los resultados obtenidos con venenos de diferentes especies de Bothrops logran determinar que hay una correlación positiva (R=0,64) entre la actividad de PLA2 y la DC50. En nuestro caso, utilizando los valores reportados en el trabajo e interpolando con la DC50 obtenida en las células L20B (2,8 µg/mL) se podría inferir que dicha cantidad de veneno tendría una actividad de 9 U/mL de PLA2. Estos valores indicarían que para inhibir un 30 % la actividad de PLA2 en el extracto de veneno crudo a la DC50, se necesitarían una cantidad de ARQ cercana a los 3 mg/ml. Si bien la concentración de ARQ capaz de inhibir un 20% la actividad del veneno a la DC50 in vitro determinada en este trabajo es de más de tres veces ese valor (10 mg/ml), puede decirse que nuestros resultados son consistentes, ya que en la citotoxicidad del veneno también cuentan la actividad de toxinas como las SVSPs y LAOs, que también tienen una correlación positiva con la DC50 (de Souza et al., 2015).

Si bien restó evaluar la capacidad de neutralización de L a una mayor concentración, este resultado solo serviría a fines comparativos y para entender mejor la actividad de los ARQg. Aunque se observó cierta capacidad de L de inhibir a la enzima PLA2 de abeja, una de las grandes desventajas de utilizar vesículas preparadas con fosfatidilcolina de soja es que la enzima puede utilizar estos lípidos como sustrato, hidrolizarlos y generar precursores inflamatorios que

obstaculizarían la resolución del daño local durante el envenenamiento (Qin, Qiu, & Zhao, 2014).

Finalmente, los resultados obtenidos en este Capítulo son auspiciosos, aunque preliminares, por lo que se continuará ensayando la capacidad de las nanovesiculas para neutralizar venenos en las líneas celulares restantes, 3T3 y RD. Asi mismo se buscará estudiar otro tipo de actividad como la capacidad anti-hemolitica *in vitro*.

6.6 Referencias

Albuquerque, Polianna LMM, N Jacinto, Camilla, Silva Junior, Geraldo B, Lima, Juliana B, Veras, Maria do Socorro B, & Daher, Elizabeth F. (2013). Acute kidney injury caused by Crotalus and Bothrops snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 55*(5), 295-301.

Burke, John E, & Dennis, Edward A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research, 50*(Supplement), S237-S242.

Caimi, Ayelen Tatiana, Parra, Federico, de Farias, Marcelo Alexandre, Portugal, Rodrigo Villares, Perez, Ana Paula, Romero, Eder Lilia, & Morilla, Maria Jose. (2017). Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 152*, 114-123.

Calvete, Juan J. (2010). Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon, 56*(7), 1284-1291.

Corcelli, Angela, & Lobasso, Simona. (2006). 25 characterization of lipids of halophilic archaea *Methods in microbiology* (Vol. 35, pp. 585-613): Elsevier.

Cruz, Luzia S, Vargas, Roberto, & Lopes, Antônio Alberto. (2009). Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity & disease, 19*(1), 42.

Choquet, CG, Patel, GB, Sprott, GD, & Beveridge, TJ. (1994). Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Applied microbiology and biotechnology, 42*(2-3), 375-384.

Daniele, JJ, Bianco, ID, Delgado, C, Carrillo, D Briones, & Fidelio, GD. (1997). A new phospholipase A2 isoform isolated from Bothrops neuwiedii (Yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. *Toxicon, 35*(8), 1205-1215.

de Oliveira, Vanessa Costa, Lanari, Laura Cecilia, Hajos, Silvia Elvira, & de Roodt, Adolfo Rafael. (2011). Toxicity of Bothrops neuwiedi complex (“yarará chica”) venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae). *Toxicon, 57*(5), 680-685.

De Roodt, A.R.C.N. (2014). *Aspectos epidemiológicos del ofidismo en argentina con énfasis en la región nordeste* (M.E. Peichoto, Salomón , O.D Ed.). Argentina: Instituto Nacional de Medicina Tropical: Puerto Iguazú.

de Souza, Letícia Lopes, Stransky, Stephanie, Guerra-Duarte, Clara, Flor-Sa, Ana, Schneider, Francisco Santos, Kalapothakis, Evanguedes, & Chávez-Olórtegui, Carlos. (2015). Determination of toxic activities in Bothrops spp. snake venoms using animal-free approaches: correlation between in vitro versus in vivo assays. *Toxicological Sciences, 147*(2), 458-465.

Dolab, Jorge Adrián, de Roodt, Adolfo Rafael, de Titto, Ernesto Horacio, García, Susana Isabel, Funes, Raúl, Salomón, Oscar Danie, & Chippaux, Jean-Philippe. (2014). Epidemiology of snakebite and use of antivenom in Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 108*(5), 269-276.

Ferreira, Monica L, Moura-da-Silva, Ana M, & Mota, I. (1992). Neutralization of different activities of venoms from nine species of Bothrops snakes by Bothrops jararaca antivenom. *Toxicon, 30*(12), 1591-1602.

Fry, Bryan G, Vidal, Nicolas, Norman, Janette A, Vonk, Freek J, Scheib, Holger, Ramjan, SF Ryan, . . . Richardson, Michael K. (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature, 439*(7076), 584.

Gay, Carolina, Sanz, Libia, Calvete, Juan J, & Pla, Davinia. (2015). Snake venomics and antivenomics of Bothrops diporus, a medically important pitviper in northeastern Argentina. *Toxins, 8*(1), 9.

Geoghegan, Patricia, Angulo, Yamileth, Cangelosi, Adriana, Díaz, Mónica, & Lomonte, Bruno. (1999). Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake Bothrops neuwiedii (yarará chica) from Argentina. *Toxicon, 37*(12), 1735-1746.

Glaser, Keith B, & Jacobs, Robert S. (1986). Molecular pharmacology of manoalide: inactivation of bee venom phospholipase A2. *Biochemical pharmacology, 35*(3), 449-453.

Gutiérrez, José María, & Lomonte, Bruno. (2013). Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon, 62*, 27-39.

Gutiérrez, José María, & Ownby, Charlotte L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon, 42*(8), 915-931.

Gutiérrez, José María, Rucavado, Alexandra, Escalante, Teresa, Lomonte, Bruno, Angulo, Yamileth, & Fox, Jay W. (2010). Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon, 55*(1), 166-170.

Gutiérrez, JoséMaría, & Lomonte, Bruno. (1995). Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon, 33*(11), 1405-1424.

Henry, Brian D, Neill, Daniel R, Becker, Katrin Anne, Gore, Suzanna, Bricio-Moreno, Laura, Ziobro, Regan, . . . Kleuser, Burkhard. (2015). Engineered liposomes sequester bacterial exotoxins and protect from severe invasive infections in mice. *Nature biotechnology, 33*(1), 81.

Higa, Leticia H, Schilrreff, Priscila, Perez, Ana Paula, Iriarte, Maiara A, Roncaglia, Diana I, Morilla, Maria Jose, & Romero, Eder L. (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8*(8), 1319-1328.

Kini, R Manjunatha. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon, 42*(8), 827-840.

Kitayama, Hiroki, Takechi, Yuki, Tamai, Nobutake, Matsuki, Hitoshi, Yomota, Chikako, & Saito, Hiroyuki. (2014). Thermotropic phase behavior of hydrogenated soybean phosphatidylcholine–cholesterol binary liposome membrane. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 62*(1), 58-63.

Koga, Yosuke. (2012). Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea, 2012*.

León, Guillermo, Sánchez, Laura, Hernández, Andrés, Villalta, Mauren, Herrera, María, Segura, Álvaro, . . . Maria Gutierrez, Jose. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy), 10*(5), 381-398.

Lomonte, Bruno, Angulo, Yamileth, Sasa, Mahmood, & Gutierrez, Jose M. (2009). The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein and peptide letters, 16*(8), 860-876.

Ministerio de Salud. (2014). *Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica de los Envenenamientos Ofídicos*. (Resolución N° 34/2007). Retrieved from http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000529cnt-Ofidismo_interior%20V8.pdf.

Morais, VM, & Massaldi, H. (2009). Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 15*(1), 2-18.

Moura-da-Silva, AM, Butera, D, & Tanjoni, I. (2007). Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Current Pharmaceutical Design, 13*(28), 2893-2905.

Narendra Sharath Chandra, JN, Ponnappa, KC, Sadashiva, CT, Priya, BS, Nanda, BL, Veerabasappa Gowda, T, . . . Rangappa, KS. (2007). Chemistry and structural evaluation of different phospholipase A2 inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. *Current topics in medicinal chemistry, 7*(8), 787-800.

Oliveira, JCR, de Oca, H Montes, Duarte, MM, Diniz, CR, & Fortes-Dias, CL. (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. *Toxicon, 40*(3), 321-325.

WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins (2010).

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2017). Mordeduras de serpientes venenosas. from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/es/

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018). Neglected tropical diseases. from http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

Patel, Girishchandra B, Agnew, Brian J, Deschatelets, Lise, Fleming, L Perry, & Sprott, G Dennis. (2000). In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *International journal of pharmaceutics, 194*(1), 39-49.

Pattni, Bhushan S, Chupin, Vladimir V, & Torchilin, Vladimir P. (2015). New developments in liposomal drug delivery. *Chemical reviews, 115*(19), 10938-10966.

Perez, Ana Paula, Casasco, Agustina, Schilrreff, Priscila, Tesoriero, Maria Victoria Defain, Duempelmann, Luc, Altube, Maria Julia, . . . Romero, Eder L. (2014). Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes. *International journal of nanomedicine, 9*, 3335.

Qin, Xiaofei, Qiu, Chunguang, & Zhao, Luosha. (2014). Lysophosphatidylcholine perpetuates macrophage polarization toward classically activated phenotype in inflammation. *Cellular immunology, 289*(1-2), 185-190.

Repetto, Guillermo, Del Peso, Ana, & Zurita, Jorge L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols, 3*(7), 1125.

Sanchez, EF, Freitas, TV, Ferreira-Alves, DL, Velarde, DT, Diniz, MR, Cordeiro, MN, . . . Diniz, CR. (1992). Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon, 30*(1), 95-103.

Scott, David L, White, Steven P, Otwinowski, Zbyszek, Yuan, Wei, Gelb, Michael H, & Sigler, Paul B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science, 250*(4987), 1541-1546.

Serrano, Solange MT, & Maroun, Rachid C. (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon, 45*(8), 1115-1132.

Sousa, Leijiane F, Nicolau, Carolina A, Peixoto, Pedro S, Bernardoni, Juliana L, Oliveira, Sâmella S, Portes-Junior, José Antonio, . . . Chalkidis, Hipócrates M. (2013). Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of bothrops complex. *PLoS neglected tropical diseases, 7*(9), e2442.

Sprott, GD, Dicaire, CJ, Fleming, LP, & Patel, GB. (1996). Stability of Liposomes Prepared from Archaeobacterical Lipids and Phosphatidylcholine Mixtures. *Cells and Materials, 6*(1), 16.

Theakston, R David G, Warrell, DA, & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon, 41*(5), 541-557.

Thwin, Maung–Maung, Samy, Ramar Perumal, Satyanarayanajois, Seetharama D, & Gopalakrishnakone, Ponnampalam. (2010). Venom neutralization by purified bioactive molecules: Synthetic peptide derivatives of the endogenous PLA2 inhibitory protein PIP (a mini-review). *Toxicon, 56*(7), 1275-1283.

White, Julian. (2005). Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon, 45*(8), 951-967.

Yameen, Basit, Choi, Won Il, Vilos, Cristian, Swami, Archana, Shi, Jinjun, & Farokhzad, Omid C. (2014). Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release, 190*, 485-499.

Zani, Izma Abdul, Stephen, Sam L, Mughal, Nadeem A, Russell, David, Homer-Vanniasinkam, Shervanthi, Wheatcroft, Stephen B, & Ponnambalam, Sreenivasan. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells, 4*(2), 178-201.

CAPITULO 7

7. Conclusiones generales

.

Esta Tesis doctoral comenzó con la búsqueda de una explicación para la elevada tasa de captura de arqueosomas (ARQ) preparados en base a arqueolipidos polares totales (APT), extraídos de la arquebacteria hiperhalofila no alcalifilica *Halorubrum tebenquichense*. Cuando analizados cualitativamente por ESI-MS, los APT resultaron ser una mezcla de 5 estructuras, algunas de ellas emparentadas: el análogo arqueol [2,3-di-O-fitanil-*sn*glicerol] de fosfatidilglicerol: **PG**, el metil ester de fosfatidilglicerofosfato **PGP-Me**, la cardiolipina **BPG** (fosfolípido dimerico con 4 cadenas hidrofóbicas análogo glicerol dieter del bisfosfatidilglicerol: *sn*-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol -3-fosfo*sn*-di-O-fitanilglicerol), los arqueoles diglicosil sulfatados [que derivarían del manosilglucosil-difitanilglicerol (DGD)]: **SDGD5** (1-O-[α-D-manosa-(2´-SO3H)-(1´$\rightarrow$2´)-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol), precursor a su vez de una segunda cardiolipina, la **SDGD5PA** (2´-SO3H)-Man*p*-α1,2Glcpα-1-1-[*sn*-2,3-di-Ofitanilglicerol]-6-[fosfo-*sn*-2,3-di-O-fitanilglicerol].

Hipotetizamos en un principio, que el residuo manosilado (y sulfatado) exhibido por SDGD-5 y SDGD-5PA sería responsable de la elevada captura de ARQ por células que expresaran el RM. Sobre este supuesto, propusimos refinar la composición de los ARQ, considerando que aquellos ARQ cuya composición arqueolipidica estuviera enriquecida en SDGD-5 y SDGD-5PA, serian capturados en mayor extensión que aquellos con menos proporción de dichos lípidos manosilados. El primer año de trabajo doctoral se centró entonces en la puesta a punto de técnicas que permitieran fraccionar eficientemente los LPT a escala preparativa en el laboratorio, con objeto de aislar y cuantificar fracciones de SDGD-5 y SDGD-5PA. Sin embargo, al determinar la captura de los ARQ enriquecidos en SDGD-5, no encontramos aumento alguno respecto de los ARQ convencionales. Mucho peor aún, ARQ con una elevadísima proporción de SDGD-5 pero carentes de la fracción PGP-Me, ni siquiera eran capturados por células J774A1.

Claramente, esos primeros resultados sugerían que la captura de ARQ estaba mediada por un receptor que al fin y al cabo no estaba relacionado con la fracción glicosilada, sino con la carga eléctrica superficial de los ARQ, una de cuyas principales diferencias respecto de los liposomas preparados en base a fosfolípidos de origen animal o vegetal, es su gran potencial Z negativo, en el

orden de -35 mV. De hecho, los macrófagos son capaces de poner en marcha mecanismos de captura endocitica de material particulado eléctricamente cargado, a través de receptores de polianiones. Como se detalló en el **Capítulo 2**, los receptores *scavenger* reconocen un amplio espectro de materia particulada polianionica, entre ellos-y gracias a la presencia del arqueolipido de doble carga electrica negativa PGP-Me- los ARC.

Esta vez, la nueva hipótesis fue confirmada a principios del segundo año de trabajo: como se detalló en el **Capítulo 2,** descubrimos que a diferencia de ARQ preparados a partir de arqueolipidos con grupos serina extraídos del arquea metanogena *Methanobrevibacter smithii (Gurnani, Kennedy, Sad, Sprott, & Krishnan, 2004)* nuestros ARQ son capturados por SR, específicamente por el receptor SR Clase AI/II, y no por SR involucrado en el reconocimiento de fosfatidilserina (clase B). Esto abrió la puerta a futuros desarrollos de estrategias de *targeting* activo a macrófagos incorporando la mezcla de LPT a diferentes tipos de nanopartículas pobremente endocitadas, como es el caso del trabajo recientemente publicado por (Higa et al., 2017).

La confirmación de que los ARQ de *Halorubrum tebenquichense* son ligandos naturales de los SRAI/II nos permitió especular con la posibilidad de ingenierizar estas nanovesículas para conseguir prestaciones especiales que se sumarían al *targeting* activo sobre determinados grupos celulares. Así, tres conceptos claves mediaron la ingenierización de los llamados arqueosomas pH-sensibles (ApH). El primero, dado que los receptores de corticosteroides se ubican en el citoplasma, que la actividad de todo corticosteroide puede incrementarse si se aumenta su concentración citoplasmática. El segundo, que la concentración citoplasmática de una droga ingresada en el interior de una NP endocitada, puede incrementarse si la NP posee un mecanismo de escape endosomal, que permitiera su vuelco masivo al citoplasma. El tercero, que a mayor endocitosis de NP, mayor cantidad de droga podrá acceder al citoplasma.

Una ingenierizacion cuidadosa, donde reemplazamos cantidades variables de DOPE en la estructura de un nanovesicula pH sensible DOPE:CHEMS, nos permitió obtener nanovesículas multifuncionales que combinaban pH sensibilidad (mecanismo de escape) con mayor captura endocitica (debido al reconocimiento por SRAI/II) por parte de células blanco.

Gracias a la combinación de las tres propiedades mencionadas, los ApH demostraron una mayor capacidad para descargar drogas al citoplasma de las células blanco, que los nanovesiculas clásicos DOPE:CHEMS. Las ventajas competitivas de ApH sin embargo, no terminaron allí: también hallamos que ApH sobreviven después de 6 meses de almacenados en suspensión acuosa, a la nebulización mediante malla vibratoria, conservando su estructura coloidal y tamaño, la mayor parte de su contenido acuoso interno, sin ocluir la malla y recuperándose más del 60 % de los arqueolípidos tras la nebulización.

Por otra parte, en el **Capítulo 2** pudieron determinarse los rangos no citotóxicos de ARQ sobre la línea celular J774A.1, que presenta la mayor tasa de internalización. Sobre estas células no se encontró toxicidad significativa hasta 50 µg/mL. La muerte celular causada por ARQ sería de tipo apoptótica: por ese motivo, podría inferirse que in *vivo,* la letalidad de ARQ no estaría acompañada por una respuesta adversa del tipo inflamatoria. Como se demostró en el **Capítulo 3** y **5,** los ARQ en células epiteliales A549 y macrófagos humanos THP-1 tampoco afectaron el metabolismo celular a dicha concentración. Lo mismo ocurrió con concentraciones similares para las células LB20, 3T3 y RD, como se determinó en el **Capítulo 6**.

Como detalláramos en el **Capítulo 1**, la nebulización es una técnica de administración de material nanoparticulado inhalable cuya principal ventaja reside en posibilitar que el material nebulizado contacte directamente sobre las células *target.* Nosotros seleccionamos como de interés relevante los macrófagos alveolares inflamados, células que de otro modo no estarían fácilmente accesibles al material nanoparticulado desde circulación sistémica (ya que debería atravesar el endotelio vascular y la membrana basal alveolar). En este contexto, los resultados del **Capítulo 3** únicamente mostraron el éxito de nuestra estrategia de *delivery* desde un punto de vista biofísico. Tales resultados, si bien alentadores, no son suficientes como para asegurar que una formulación nebulizable de este tipo pudiera tener efecto terapéutico alguno *in vivo*. Obtener datos pre-clínicos con significancia predictiva en humanos es complejo, si se trata de demostrar un efecto anti-inflamatorio. Es pertinente señalar, por ejemplo, que la inducción de inflamación en roedores no tendría más valor experimental que para el campo veterinario. De acuerdo a *(Harrison,*

2013), y a (Seok et al., 2013) (este último un estudio multicéntrico donde intervinieron las Universidades de Stanford, Massachusetts, Harvard, Texas, Rochester Pittsburgh California, Washington, Toronto entre otras), mientras en humanos, la respuesta inflamatoria frente a diferentes estresores (trauma, quemaduras, endotoxinas, así como infecciones) tiende a seguir un camino común, en ratones ocurre algo completamente diferente. Sus respuestas no solo difieren radicalmente de las humanas (en términos de *up* o *down* en la regulación de genes, entre otras cosas), sino que difiere de acuerdo con el tipo de estrés. Humanos y ratones difieren en tipos de genes que se activaran, tiempo durante el cual se expresaran y en ruta rio abajo. Los ratones no son, por lo tanto, el mejor modelo a utilizar si se quiere testear la toxicidad y ulterior eficacia terapéutica de estas formulaciones.

Teniendo esto en mente, y dentro de las muchas incógnitas que aun podían develarse mediante un diseño experimental estratégico, decidimos abordar un estudio biofísico que nos permitiera estimar el impacto que causarían los ApH nebulizados sobre la delgada monocapa de surfactante pulmonar que recubre los alveolos pulmonares. La tecnología de nebulización de nanovesiculas está en su infancia, y hasta donde sabemos, nunca se inspeccionó lo que ocurriría con la estructura nanovesicular una vez en contacto con la monocapa de surfactante. Las pocas formulaciones nanovesiculares hoy en fases clínicas avanzadas, no están pensadas para *delivery* a células alveolares. Por lo tanto, nunca hubo interés en determinar la permanencia de la estructura nanovesicular una vez atravesado el surfactante: el antibiótico transportado en nanovesiculas es capturado por bacterias que están en la superficie de los bronquiolos, eventualmente envueltas en un biofilm protector y parcialmente responsable de su resistencia a la antibioticoterapia convencional. En nuestro caso, existía el riesgo que la combinación del estrés de nebulización, más el contacto con el detergente superficial, tuviera un efecto deletéreo sobre las nanovesículas nebulizadas. Si luego de nebulizados, los ApH eran destruidos antes de ser capturados por las células inmersas en surfactante pulmonar, la estrategia de escape endosomal y *delivery* masivo de antiinflamatorio al citoplasma carecería de sentido alguno.

Nuestro esquema experimental detallado en el **Capítulo 4** mostró que tras la nebulización de una dosis de ApH sobre una monocapa de surfactante pulmonar que recubría células J774.A1 como modelo de macrófagos alveolares, al menos una fracción de ApH permanece estructuralmente estable y capaz de ejecutar un *delivery* masivo de drogas hidrosolubles al citoplasma celular. Nuevamente estos resultados, aunque auspiciosos, deben ser analizados a la luz de las restricciones impuestas por el modelo experimental: *in vivo,* la monocapa de surfactante se encuentra en equilibrio metaestable con multicapas presentes en la subfase, que son producidas constantemente por las células epiteliales tipo II. Nosotros ignoramos por ejemplo, si en nuestro experimento de nebulización la monocapa estática no fue "agotada" por el contacto con el material nebulizado: las gotas de agua nebulizadas tienen un tamaño en el orden de los 2-3 μm de diámetro, e impactan y atraviesan una delgada película de 2-5 nm de espesor. En cada gota se dispersa una pequeña fracción de monómero lípido separada de las nanovesículas originales por el estrés de nebulización. Es posible que el impacto mecánico de la nebulización haya arrastrado o desarmado la película de detergente sobre las células. Una forma de averiguarlo hubiera sido medir la presión superficial antes y después de la nebulización, cuestión que no fue posible debido a que el experimento se llevó a cabo en ausencia de un mecanismo de medida de la presión. *In vivo*, es posible que la película de surfactante fuera arrastrada y repuesta por la constante producción de monocapa generada por las células subyacentes.

Una segunda sección de las medidas biofísicas reveló la existencia de una perturbación mutua entre las nanovesículas nebulizadas y la monocapa de surfactante. La perturbación fue bidireccional, probablemente mediada por las proteínas hidrofóbicas del surfactante, y condujo a aumentos de desorden en la bicapa del surfactante, que dependieron de la naturaleza química de las nanovesículas, y que fueron máximos para las nanovesículas que únicamente contenían arqueolipídos. Dado que el objetivo central de la nebulización es que las nanovesículas atraviesen la monocapa de surfactante para ser endocitadas -en lo posible intactas- por las células subyacentes, la existencia de esta interacción-no buscada- señala también el peligro adicional que la función detergente de la monocapa de surfactante fuera perturbada por interacción con

los ApH nebulizados. En otras palabras, que la nebulización indujera la peligrosa inactivación del surfactante, una condición potencialmente letal, que descartaría su uso terapéutico. De hecho en los últimos años, una cantidad sustantiva de trabajos han mostrado que la inhalación de una multitud de nanopartículas de distinta naturaleza química (aunque ninguna de naturaleza “blanda”, como las nanovesículas estudiadas en este Tesis) induce inactivación de surfactante a distintos niveles. (Hidalgo, Cruz, & Pérez-Gil, 2017).

En la última sección del **Capítulo 4** observamos que, en nuestras condiciones experimentales, la nebulización de ApH, lejos de reducir la presión superficial del surfactante pulmonar, la incrementa. Aunque el diseño de los ApH se pensó para ejecutar un *targeting* activo del material inhalable, su impacto sobre la monocapa de surfactante, podría interpretarse como una mejora de las condiciones en las que ocurre el intercambio gaseoso, ya que el esfuerzo muscular respiratorio necesario para expandir la interfase alveolar, se reduciría transitoriamente al recibir los arqueolípidos. Esto podría generar un efecto sinérgico que combine por ejemplo actividad antiinflamatoria con mejora en la actividad del surfactante.

En su conjunto, estos resultados significan que es posible ingenierizar nanoestructuras blandas capaces de resistir el estrés de nebulización tras el almacenamiento. Por primera vez hemos observado que en principio, se mantendrían estructuralmente estables luego de nebulizadas, siendo capaces de atravesar una monocapa de surfactante para desencadenar una entrega masiva de droga al citoplasma celular tras ser endocitados. El rol de los arqueolípidos ha mostrado ser crítico para la preservación estructural de las nanovesículas, para conseguir su *targeting* y al menos *in vitro* a como efecto colateral, al revés que las NP respirables rígidas, para aumentar la tensioactividad del surfactante pulmonar.

En el futuro, se necesitarán estudios más profundos para revelar el verdadero impacto de la nebulización de este tipo de formulaciones. Estudios llevados a cabo en los clásicos “impactores en cascada” usados para predecir la profundidad a la que accederán las nanopartículas inhaladas, no son necesario en casos como este, porque la partícula [nanovesicula] queda englobada en el tamaño de la gota de agua nebulizada, que a su vez depende del mecanismo de

generación de gota del nebulizador. En otras palabras, en tanto se emplee el mismo tipo de nebulizador (malla vibratoria), el tamaño de la gota nebulizada será el mismo; en nuestro caso, lo suficientemente pequeña como para ser respirable. Otro tipo de estudio, probablemente basado en un modelo tridimensional de pulmón que pueda ofrecer el adecuado contexto de dialogo multicelular ante la llegada de agentes externos durante la dinámica de la respiración, deberá ser desarrollado a futuro.

En el **Capítulo 5**, nos planteamos continuar con los estudios de administración por vía inhalatoria, esta vez de un antibiótico. La droga elegida fue el macrólido azalide azitromicina (AZ), porque es un fármaco que se administra en enfermedades crónicas, por ejemplo, en el tratamiento de fibrosis cística (FQ), enfermedad típicamente complicada por la formación de biofilms bacterianos. En la actualidad hay varias terapias inhalatorias con antibióticos aplicables al tratamiento de FQ, pero aún no se han desarrollado formulaciones inhalables de AZ. Inferimos que esto se debería a su carácter hidrofóbico que dificulta su nebulización, como lo muestra uno de los pocos estudios que hay al respecto (Hickey, Lu, Ashley, & Stout, 2006). Teniendo en cuenta esto, se hipotetizó que la su formulación en ARQ podría en principio facilitar su nebulización. Dado que para poder suspenderse en solución acuosa, AZ debería particionarse en la bicapa lipídica, se decidió formularla en ARQ y no en ApH. Las vesículas pH sensibles desarrolladas en el **Capítulo 3**, se diseñaron para transportar drogas hidrosolubles en su interior acuoso; estas drogas no afectan el mecanismo de pH sensibilidad. En cambio, la partición de drogas hidrofóbicas en la bicapa, podría afectar drásticamente la pH sensibilidad, además de no desasociarse fácilmente a su forma libre.

Debido a su elevada estabilidad estructural, los liposomas conteniendo colesterol y lípidos de elevada temperatura de transición de fase son las formulaciones nanovesiculares a elección para administrarse por ruta inhalatoria (características discutidas en el **Capítulo 3**). Sin embargo, por lo menos aplicando las técnicas de preparación utilizada en este trabajo, liposomas de tales características conteniendo AZ, prácticamente no pudieron ser nebulizados satisfactoriamente. La formulación de AZ en ARQ (AZ-ARQ) por otro lado, es ideal, dada la elevada estabilidad de estos últimos. Los resultados del **Capítulo**

3 mostraron que la bicapa de ARQ sufre sin embargo un cierto estrés mecánico frente a la nebulización, resultando una pérdida parcial de su contenido acuoso. Una formulación de AZ en ARQ, donde AZ permanece particionada en la bicapa, no correría riesgos de perderse tras una potencial ruptura del ARQ. Al presente tenemos resultados preliminares, que mostraron que el tamaño, medido por DLS, no experimenta cambios significativos, salvo un leve aumento del pdi, tras nebulizarse. En el futuro, la estructura de los ARQ tras la nebulización debería explorarse más exhaustivamente, por ejemplo, por crio-TEM.

Respecto a la actividad antimicrobiana de AZ-ARQ sobre *S. aureus* planctónico o en biofilms, al momento no encontramos diferencias significativas entre AZ libre y AZ-ARC o AZ-en liposomas. Si bien varios trabajos con antibióticos han reportado mejoras sustantivas al incorporarlos en liposomas, estos últimos suelen ser liposomas catiónicos que pueden asociarse electrostáticamente a las membranas eléctricamente negativas de bacterias (Alhariri, Azghani, & Omri, 2013). Sin embargo, se sabe que los liposomas catiónicos son altamente tóxicos para células de mamíferos, dada su elevada interacción no específica con la membrana celular (Sriraman & Torchilin, 2014). *S. aureus* fue empleado como microorganismo modelo para hacer los primeros ensayos de actividad antimicrobiana de las nuevas formulaciones. Su relevancia en la patología FQ sin embargo, es menor que la de bacterias gram-negativas *P. aeruginosa*, mucho más peligrosas en virtud de su resistencia y capacidad para crecer en biofilms. Se encuentran en curso estudios de la eficacia de estas formulaciones sobre formas planctónicas y en biofilm de este último microorganismo.

En el **Capítulo 6** exploramos finalmente, una potencial aplicación de los ARQ no relacionada con su impacto sobre células involucradas en la función respiratoria, sino con la naturaleza única de sus arqueolípidos. En este Capítulo sentamos las bases de un nuevo concepto para atacar los envenenamientos causados por yarará (*B. neuwidi diporus),* consistente en la neutralización local del veneno mediante nanovesículas. La actividad de los antisueros está basada en la neutralización del veneno -una colección de enzimas capaces de destruir tejidos y provocar la muerte de la víctima-, con anticuerpos policlonales heterologos. Los antisueros posibilitan que la víctima sobreviva a los efectos

sistémicos del veneno. Sin embargo, no son eficientes para neutralizar el efecto local, que puede conducir a la perdida de miembro donde ha ocurrido la picadura. Su producción y administración tienen un grado considerable de complejidad, además del riesgo latente sobre personas alérgicas. Gran parte de la actividad enzimática es del tipo fosfolipasa A2, capaz de hidrolizar el enlace éster de la posición sn2 de los fosfolípidos, y liberar acido araquidónico, precursor de prostaglandinas y tromboxanos responsables del dolor y gran inflamación. La inflamación hemorrágica se acompaña por actividad mionecrotica, también a cargo de fosfolipasas no hidrolíticas. Considerando que el envenenamiento ocurre como consecuencia de la actividad de enzimas PLA2 no micaelianas, que necesitan anclarse superficialmente a sustratos como paso previo al inicio de su actividad, propusimos que los ARQ podrían actuar como “sustratos insensibles” a la acción de las fosfolipasas. Aunque los ARQ no fueran sustrato de la actividad PLA2 debido a su naturaleza estructural (estereoisometría y enlaces éteres), igualmente podrían actuar como punto de anclaje para la misma. Tal anclaje podría dificultar su salto hacia sustratos sensibles (células de tejidos de la víctima), disminuyendo la fracción de PLA2 libre disponible para atacar, y reduciendo la cantidad de ácido araquidónico liberado. Los resultados descriptos en el **Capítulo 6** no muestran la desaparición de la actividad de una enzima PLA_2 modelo (apitoxina de abeja), luego de incubarse con diferentes concentraciones de ARQ, aunque si, una reducción de su actividad aproximadamente a la mitad. Un efecto menos pronunciado se encontró para la incubación con liposomas ordinarios. Aunque modestos, estos resultados sugieren que la interacción con nanovesículas interfiere con la actividad de la fosfolipasa, y que esta interferencia podría jugar a favor de una futura terapia anti-veneno que complementará la actual con anticuerpos neutralizantes.

En una segunda etapa, se buscó evaluar de manera más directa la posible neutralización del veneno de serpiente de *B. neuwidi diporus*. El modelo elegido fue medir la actividad citotóxica por el método de RN sobre cultivos celulares *in vitro*, de fibroblastos y células tipo musculares RD, ya que esta especie tiene buena correlación entre la DC50 generada por el veneno y la DL50 por inyección intravenosa así como intraperitoneal. Los ARQ a concentraciones altas de 10 y

50 mg/mL y tamaños grandes (>400 nm) mostraron capacidad de neutralizar en parte la actividad del veneno sobre fibroblastos.

Si bien es demasiado temprano como para extrapolar estos resultados a un envenenamiento real, ya que se necesitaría seguir evaluando la actividad de ARQ sobre células del tipo musculares RD y hacer ensayos de hemolisis, son un fuerte indicio de que los ARQ podrían complementar una terapia con sueros antivenenos, al disminuir la actividad PLA_2 y por lo tanto disminuir los efectos locales que esta enzima produce.

7.2 Referencias

Alhariri, Moayad, Azghani, Ali, & Omri, Abdelwahab. (2013). Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert opinion on drug delivery, 10*(11), 1515-1532.

Gurnani, Komal, Kennedy, Jessica, Sad, Subash, Sprott, G Dennis, & Krishnan, Lakshmi. (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. *The Journal of Immunology, 173*(1), 566-578.

Harrison, Charlotte. (2013). Inflammatory disorders: Of mice and humans. *Nature Reviews Drug Discovery, 12*(4), 264.

Hickey, Anthony J, Lu, Dongmei, Ashley, Elizabeth Dodds, & Stout, Jason. (2006). Inhaled azithromycin therapy. *Journal of aerosol medicine, 19*(1), 54-60.

Hidalgo, Alberto, Cruz, Antonio, & Pérez-Gil, Jesús. (2017). Pulmonary surfactant and nanocarriers: toxicity versus combined nanomedical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1859*(9), 1740-1748.

Higa, Leticia Herminia, Jerez, Horacio Emanuel, de Farias, Marcelo Alexandre, Portugal, Rodrigo Villares, Romero, Eder Lilia, & Morilla, Maria Jose. (2017). Ultra-small solid archaeolipid nanoparticles for active targeting to macrophages of the inflamed mucosa. *Nanomedicine, 12*(10), 1165-1175.

Seok, Junhee, Warren, H Shaw, Cuenca, Alex G, Mindrinos, Michael N, Baker, Henry V, Xu, Weihong, . . . Hennessy, Laura. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 110*(9), 3507-3512.

Sriraman, Shravan Kumar, & Torchilin, Vladimir P. (2014). Recent advances with liposomes as drug carriers. *Advanced Biomaterials and Biodevices*, 79-119.