



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“COMPARACIÓN DE LA BIOADHESIÓN *IN VITRO* DE
MICROPARTÍCULAS (MP) DE QUITOSANO SULFATADO (QS),
TIOLADO (QT) Y COMERCIAL (QC) EN MONOCAPAS DE
CULTIVOS CELULARES.”**

CAMILO ALEJANDRO GÁLVEZ ARACENA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: DR. SERGIO BUCAREY VIVANCO
UNIVERSIDAD DE CHILE

PROYECTO FONDEF IT13I20021

SANTIAGO, CHILE
2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“COMPARACIÓN DE LA BIOADHESIÓN *IN VITRO* DE
MICROPARTÍCULAS (MP) DE QUITOSANO SULFATADO (QS),
TIOLADO (QT) Y COMERCIAL (QC) EN MONOCAPAS DE
CULTIVOS CELULARES.”**

CAMILO ALEJANDRO GÁLVEZ ARACENA.

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

Nota final:

FIRMA

Profesor guía : Sergio Bucarey Vivanco

Profesor corrector: Andrónico Neira Carrillo

Profesor corrector: Ma. Soledad Fernández Garay

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia, en especial a mis padres y abuela quienes me apoyaron incondicionalmente durante este proceso. También a mis amigos, compañeros e integrantes de laboratorio que me ayudaron e impactaron de forma positiva a lo largo de este periodo.

Agradecer también a mi profesor guía, el Dr. Sergio Bucarey quien me brindo total apoyo y confió en mi para llevar a cabo este proyecto. También agradecer a mis profesores correctores, la profesora Ma. Soledad Fernández Garay y el Dr. Andrónico Neira Carrillo, junto con el Dr. Víctor Neira, quienes me fueron aconsejando a lo largo de este proyecto y se mostraron siempre dispuestos a contestar mis dudas e inquietudes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESÚMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Microencapsulación	5
2. Quitosano	6
3. Bioadhesión	8
3.1. Mecanismo de bioadhesión del quitosano.....	9
3.2. Factores que afectan la bioadhesión del quitosano.	11
4. Funcionalización de quitosano	13
5. Epitelio intestinal: sitio blanco e interacción con MPQ	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Cultivos celulares	17
1.1. Diferenciación de monocapa.....	18
2. Funcionalización de quitosano	20
2.1. Obtención de quitosano sulfatado (QS)	20
2.2. Obtención de quitosano tiolado (QT).....	20
2.3. Formulación de micropartículas (MP)	21
3. Medición tamaño y Z potencia de MPQ	22
4. Marcaje de micropartículas con fluoróforo	22
5. Ensayos de bioadhesión	23

RESULTADOS	24
1. Cultivos celulares y diferenciación de monocapa	24
2. MPQ funcionalizadas	26
3. Marcaje con FITC	27
4. Caracterización de MPQ.....	29
5. Ensayo de bioadhesión.....	32
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. Diluciones seriadas de MPQ- <i>f</i> con sus respectivas valores de FSU	28
TABLA 2. Pendiente, intercepto y ecuación de la recta para cada tipo de MPQ- <i>f</i>	29
TABLA 3. Caracterización de MPQC, MPQT y MPQS	30
TABLA 4. Valores de potencial Z de MPQ marcadas con FITC	30
TABLA 5. Valores de FSU para 500 μ L de MPQ- <i>f</i> y Medio de cultivo	32
TABLA 6. FSU post incubación y Δ FSU para cada tipo de MPQ- <i>f</i>	33
TABLA 7. Índices de adhesión (esperada, máxima y mínima) para MPQ- <i>f</i>	35
TABLA 8. Porcentajes de bioadhesión de cada tipo de MPQ- <i>f</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS.

FIGURA 1. Microscopía óptica (40x) de cultivos celulares de la línea Caco-2.....	25
FIGURA 2. Microscopía óptica (40x) de cultivos celulares Caco-2 y HT-29	26
FIGURA 3. Imagen de lotes de MPQ obtenidas por secado por atomización	27
GRÁFICO 1. Curvas de calibración para marcaje MPQ con FITC	28
FIGURA 4. Microscopía óptica de fluorescencia (40x) de MPQ- <i>f</i>	31
GRÁFICO 2. Valores Δ F _{SU} para MPQ- <i>f</i> en cultivos diferenciados y sin diferenciar	35
GRÁFICO 3. Porcentajes de bioadhesión para cada tipo de MPQ- <i>f</i>	34

RESÚMEN

El quitosano (Q) es un polisacárido de origen natural que se obtiene a partir de la desacetilación parcial de la quitina y que se caracteriza por tener un carácter catiónico debido a la presencia de un grupo funcional amino en su estructura el cual le brinda, entre otras propiedades la capacidad de poder adherirse a matrices biológicas en un proceso denominado bioadhesión. Cuando este fenómeno ocurre en epitelios cubiertos por una capa de mucina se denomina mucoadhesión. Esta propiedad ha generado gran interés en el área farmacéutica donde se busca utilizar este polímero como potenciador de la absorción de macromoléculas hidrofílicas (HFMM) como proteínas o antígenos mediante su utilización como micropartículas (MP). Por otra parte se buscan distintos métodos que permitan potenciar esta capacidad bioadhesiva, principalmente la funcionalización del Q, proceso que consiste en la conjugación del polímero con algún grupo funcional. En este proyecto se propone la conjugación del Q con grupos tiol (-SH) y sulfato (-SO₃), los cuales permitirían la formación de enlaces más fuertes durante el proceso de mucoadhesión entre las micropartículas de quitosano y los residuos de cisteína presentes en la capa de mucina que recubre distintos epitelios como el intestinal. De esta forma se busca comprobar la adhesión de las MP de Q sin funcionalizar (MPQC) y MP de Q funcionalizado con grupos tiol y sulfato (MPQT y MPQS respectivamente) utilizando isotiocianato de fluoresceína (FITC) como fluoróforo, el cual se une covalentemente al quitosano, permitiendo observar e identificar la cantidad de micropartículas que se unen a monocapas celulares diferenciadas y sin diferenciar de la línea Caco-2 la cual es similar al epitelio que compone el tracto intestinal, y que además se caracteriza por presentar uniones intercelulares estrechas, tras un proceso de diferenciación en una matriz de pocillos Transwell los cuales tienen una capa microporosa en su base. De acuerdo a esto, se determinó la fluorescencia de los distintos tipos de MPQ previa administración en los cultivos y tras un periodo de incubación de 90 minutos se removió el sobrenadante y se midió su fluorescencia determinando la capacidad bioadhesiva de cada tipo de micropartículas, las cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Palabras claves: Quitosano, Micropartículas Bioadhesión, HFMM, Funcionalización, Caco-2, Transwell.

ABSTRACT

Chitosan (C) is a natural polysaccharide obtained from deacetylated chitin, known by its cationic character due to the presence of an amine functional group in its structure. This amine group determine some chitosan properties as his capacity of adhesion to biological surfaces, process known as bioadhesion. If this union takes place on a mucin-covered epithelium it is called mucoadhesion. This property generates interest and attention from the pharmaceutical industry for its use as a controled delivery system as well as absorption enhancer of hydrophilic macromolecules (HFMM) drugs such as proteins or antigens when used as microparticles (MP). On the other hand, several efforts are focused on improving this bioadhesion capacity, mainly by chemical functionalization of the polymer. In this thesis, is proposed the chemical conjugation with tiol (-SH) and sulfate (-SO₃) groups of C chains, which would allow to form stronger bonds between chitosan microparticles (CMP) and cysteine residues presents in the mucin layer that cover several epithelial during the mucoadhesion process. Thus, the objective is to test the adhesion capacity of functionalized CMP with tiol and sulfate groups (CTMP and CSMP respectively) and non-functionalized CMP (CCMP) by marking them with Fluorescein isothiocyanate (FITC) which is covalently bound to chitosan chains in order to evidence microparticles adhesion on differentiated and non-differentiated Caco-2 cell line monolayers, which has been described to be similar to the epithelium composing the intestinal tract and is also characterized by expresing tight junctions after a differentiation process on Tranwell inserts that have a microporous layer at their base. According to this, it was determined the fluorescence of each type of CMP prior and after incubation period of 90 minutes, thus the supernatants were removed and their fluorescences were measured in order to determine the bioadhesive capacity of the microparticles. No stastically significant differences were registered.

Keywords: Chitosan, Microparticles Bioadhesion, HFMM, Chemical functionalization, Caco-2, Transwell.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tecnologías y técnicas de ADN recombinante han permitido disponer de un gran número de proteínas terapéuticas y antígenos basados en proteínas, consideradas como macromoléculas hidrofílicas (HFMM). Las HFMM se administran casi exclusivamente mediante inyecciones parenterales debido a su baja biodisponibilidad y/o baja inmunogenicidad cuando son administradas mediante vías no-parenterales. Sin embargo, el uso de esta vía genera ciertos inconvenientes tanto para quienes las aplican como para quienes las reciben, y además la obtención de este tipo de formulaciones inyectables está asociado a mayores costos de producción, junto con la necesidad de contar con personal calificado para su administración (Amidi *et al.*, 2010; Van der Lubben *et al.*, 2001). Debido a lo anterior, en el último tiempo se ha centrado la atención en encontrar vías de administración alternativas no invasivas, preferentemente las rutas oral, nasal, pulmonar y vaginal (también denominadas rutas mucosas), que destacan principalmente por poseer áreas grandes absorción como las superficies gastrointestinal, nasal y pulmonar. Sin embargo, la entrega de HFMM mediante estas rutas significa un desafío importante debido a su mala absorción, susceptibilidad aumentada a la degradación enzimática junto con presentar una baja capacidad de transporte a través de barreras mucosas (Amidi *et al.*, 2010; Behrens *et al.*, 2002; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Van der Lubben *et al.*, 2001).

Por otra parte, la administración de vacunas por una vía alternativa a la parenteral es objeto de gran interés en el ámbito de la medicina, no sólo humana sino que también veterinaria. En esta última, la generación de vacunas que tengan la posibilidad de utilizarse por vía oral en animales productivos, implicaría una marcada reducción en los gastos asociados al personal calificado necesario para su administración, junto con una reducción en las pérdidas económicas que conllevan las enfermedades que se buscan combatir. Para lograr lo anterior, es necesario desarrollar una formulación que: asegure la llegada del antígeno a su sitio blanco, sea capaz de protegerlo de la degradación enzimática, prolongar su permanencia en su lugar de acción y aumentar de forma reversible la permeabilidad de la mucosa epitelial (Amidi *et al.*, 2010; Meng-Lund *et al.*, 2014; Thanou *et al.*, 2001); mejorando de esta manera la efectividad de una respuesta inmune específica, sin producir inmunogenicidad no deseada (Amidi *et al.*, 2010).

Es así como la utilización de MP de biopolímeros o polímeros naturales ha ganado importancia en el campo biomédico y en la industria farmacéutica, particularmente en su uso como adyuvantes de diversas HFMM. El uso de este tipo de MP permite la elaboración de formulaciones que controlen la liberación de éstos productos, permitiendo un efecto potenciador de larga duración (Islam *et al.*, 2012). Dentro de los distintos tipos de materiales con los cuales se producen estas MP, destaca el grupo de los polímeros, y entre ellos el uso de Q, que ha sido preponderante durante los últimos años. El Q corresponde a un polisacárido catiónico derivado de la quitina, que ha sido empleado tanto como regenerador de tejido óseo y en el tratamiento de heridas, así como aditivo en la producción de alimentos. Sus usos múltiples se explicarían por características físico-químicas relacionadas con su carga, grado de desacetilación y peso molecular (PM), que resultan en que este polisacárido sea biocompatible, biodegradable, bioadhesivo, presente capacidad inmunopotenciadora y baja toxicidad.

La utilización de micropartículas de quitosano (MPQ) como potenciadores de absorción de Ag en vacunas orales sería favorable debido a sus propiedades bioadhesivas y su habilidad de interactuar con las uniones intercelulares estrechas o *Tight Junctions* (TJ) (Islam *et al.*, 2012), incrementando de esta forma su absorción (Thanou *et al.*, 2001). Sin embargo, esta formulación podría presentar ciertos problemas relacionados con su presentación de administración y medio en el que debe actuar; ante lo cual se ha propuesto la funcionalización del Q. Este proceso consiste en la conjugación química de determinado(s) grupo(s) funcional(es) del polímero y de esta forma soslayar dichos inconvenientes.

En este proyecto se busca evaluar la bioadhesión de MPQ comercial no funcionalizado y de MPQ comercial funcionalizado con grupos tiol y sulfato, en monocapas de cultivos celulares epiteliales diferenciados y sin diferenciar de la línea Caco-2, mediante fluorescencia y bajo condiciones controladas que permitan evaluar la adhesión de las MP, así poder comprobar el efecto de la funcionalización y evaluar este efecto en los cultivos celulares diferenciados. Esto podría significar un gran avance para el desarrollo de vacunas cuya vía de administración sea alternativa a la parenteral, como las vacunas mucosas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Microencapsulación.

Es el procedimiento mediante el cual se obtienen partículas de tamaño micrométrico o micropartículas (MP). Existen diferentes métodos de microencapsulación, los cuales se agrupan en tres tipos de procesos (Martin-Villena *et al.*, 2009):

- I. Físicos (Secado por atomización o *Spray dryer*).
- II. Químicos tales como la polimerización interfacial o inclusión molecular.
- III. Procesos fisicoquímicos correspondientes a la coacervación simple y compleja, liposomas, y gelificación iónica.

Un gran número de inconvenientes se asocian al uso de métodos de entrecruzamiento químico, ya que pueden afectar de forma adversa la estabilidad del contenido de las MP y/o modificar su estructura química; lo mismo se espera de los procesos de coacervación/precipitación, aunque estos se consideran más inocuos. En cambio, la técnica de secado por atomización se considera una técnica que presenta menos efectos adversos para la molécula a encapsular (Amidi *et al.*, 2010).

Dentro de los usos que se les puede dar a estas MP, destaca su utilización en el área farmacéutica, principalmente en la elaboración de formulaciones que permitan la liberación controlada de HFMM, así como también facilitar el transporte junto con la absorción de éstas, permitiendo con ello, un efecto potenciador de larga duración sin afectar su estructura ni sus propiedades (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2012). Lo anterior es debido a que las HFMM usualmente son poco permeables en las membranas celulares, especialmente en aquellos epitelios que poseen una capa de mucus en su superficie, debido a su masa molecular alta, presencia de cargas o grupos funcionales que se unan a los átomos de hidrógeno, y poseer una superficie polar superior (Behrens *et al.*, 2002; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Thanou *et al.*, 2001; Van der Lubben *et al.*, 2001), lo cual también las hace propensas a la degradación enzimática.

Como se mencionó, algunos epitelios pueden estar cubiertos por una capa de mucus, el cual está compuesto por mucina, una glicoproteína de alto peso molecular (200 kDa–200 MDa), rica en dominios aminoácidos portadores de grupos amino primarios y tioles. Suele estar cargada negativamente debido a su carácter peptídico que posee cadenas laterales de oligosacáridos los cuales suelen terminar en residuos de ácido siálico. Se ha reportado que éste componente proteico disminuye considerablemente la difusión de HFMM junto con ser agente causante de que éstas se aglomeren dificultando aún más su transporte en los sitios blancos de interés (Behrens *et al.*, 2002; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015; Meng-Lund *et al.*, 2014).

Entre los materiales que pueden ser utilizados para formar MP destaca el Q. Se han descrito numerosas aplicaciones para las MPQ en el área biomédica, destacando principalmente su uso como transportadores de fármacos, y adyuvantes para vacunas (Bravo-Osuna, *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2012; Thanou *et al.*, 2001; Van der Lubben *et al.*, 2001).

2. Quitosano.

El Q [α -(1–4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucan] es un copolímero natural de glucosamina, el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, y se obtiene mediante la desacetilación parcial de la quitina (polisacárido) (Amidi *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2017). Q está compuesto por monómeros de N-acetilglucosamina y D-glucosamina, unidos a través de enlaces glucosídicos β 1-4. Es soluble en soluciones con pH ácido (Islam *et al.*, 2012; Thanou *et al.*, 2001; Smart, 2005). Es biocompatible, biodegradable, presenta baja toxicidad, y su absorción intrínseca es mínima (Thanou *et al.*, 2001). Además posee la capacidad de adherirse a superficies mucosas (Lehr *et al.*, 1992).

Estas propiedades están determinadas principalmente por su carga neta positiva, grado de desacetilación y PM. Además, el Q puede formar MP de estructura porosa y posee alta afinidad por proteínas (Van der Lubben *et al.*, 2001). Finalmente, el Q actúa como potenciador de la absorción transmucosa de HFMM, al aumentar la hidrofiliidad de las células sin provocar alteraciones en su membrana ni en su morfología. Esto se debe principalmente a la presencia del grupo funcional amino (-NH₂) en la estructura del Q, ya que la interacción de éste grupo amino en su forma protonada con las membranas celulares resultan en una ampliación transitoria de las uniones intercelulares estrechas (*Tight Junctions* o TJ) mediante la reorganización de proteínas asociadas a éstas, sin disminuir la resistencia eléctrica transepitelial, ni dañar la membrana celular (Amidi *et al.*, 2010; Thanou *et al.*, 2001). Las uniones intercelulares estrechas corresponden a la principal barrera al movimiento pasivo de líquido, electrolitos, macromoléculas y células mediante la vía paracelular, y contribuyen al transporte transepitelial al promover la polaridad epitelial de las células (Amidi *et al.*, 2010; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2013; Thanou *et al.*, 2001; Van der Lubben *et al.*, 2001).

Otra característica fundamental del Q es que es un polímero bioadhesivo, que interacciona fuertemente con la capa de mucus de los epitelios anteriormente mencionados mediante la formación de puentes de hidrógeno íter-moleculares, enlaces hidrológicos, hidrofílicos e interacciones electrostáticas con el ácido siálico y residuos sulfatados de la mucina, que al estar cargados negativamente le brindan un carácter aniónico a la capa formada por glicoproteína (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Mahmood *et al.*, 2017; Palazzo *et al.*, 2017). Por lo tanto, no sólo actúa como un potenciador de la absorción de HFMM, sino también como un sistema bioadhesivo de entrega (Amidi *et al.*, 2010).

Es de ésta forma que el Q puede funcionar como un sistema *carrier* particulado, el cual intensifica la interacción de HFMM con la membrana de células epiteliales y/o mucosa, aumenta el tiempo de residencia de las formulaciones en los sitios blanco, protege su contenido de la degradación enzimática, y promueve la libre absorción de éste (Amidi *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha descrito que la vacunación mucosa tiende a producir una respuesta inmune tanto sistémica como local (Islam *et al.*, 2012). De hecho, formulaciones de MPQ cargadas con antígeno (MPQ_{AG}) no sólo mejoran su captación por parte del sistema de células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés), macrófagos y células M, sino que también inducen una elevada respuesta de anticuerpos a nivel local o sistémico. Además MPQ_{AG} no solo promueven la inducción de citoquinas citotóxicas (linfocitos T CD8+ o linfocitos T citotóxicos) respecto a inmunizaciones que consideran el uso de antígeno libre; sino que también mejoran su eficiencia de encapsulación y regulan su liberación desde las MP (Amidi *et al.*, 2010).

3. Bioadhesión.

Se define como el estado en que dos materiales, siendo al menos uno de naturaleza biológica, se mantienen unidos por un periodo de tiempo extendido, debido a fuerzas interfaciales. Cuando esta interacción ocurre en epitelios recubiertos con una capa de mucina se denomina mucoadhesión (Smart, 2005). De hecho, algunos investigadores postulan que ésta denominación se refiere a la interacción que ocurre exclusivamente entre un polímero y la capa de mucus (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Meng-Lund *et al.*, 2014).

Independiente de la definición, la importancia de este fenómeno radica en su potencial para optimizar la liberación local de fármacos o vacunas, lo cual brinda nuevas alternativas en la administración de éstos (Thanou *et al.*, 2001; Smart, 2005). El comportamiento de la bioadhesión parece estar gobernado por el transporte a través de la capa de mucos y del establecimiento de enlaces no covalentes e inespecíficos entre el biopolímero y la mucina (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Mahmood *et al.*, 2017).

Las características necesarias para que un polímero pueda llevar a cabo este fenómeno pueden resumirse como sigue (Lehr *et al.*, 1992):

1. Presencia de grupos químicos funcionales que permitan la formación de fuertes enlaces con hidrógeno, como los grupos hidroxilo (-OH) y carboxilo (-COOH).
2. Flexibilidad adecuada en las cadenas estructurales del polímero.
3. Una cantidad de energía superficial apta que favorezca la difusión del polímero a través de la capa de mucina.

Como se mencionó, debido a que el Q posee una naturaleza catiónica puede interactuar electrostáticamente con la mucosa epitelial, que presenta carga negativa en un medio con pH superior a 3, puesto que esta capa está compuesta principalmente por glicoproteínas hidratadas de alto PM (que a menudo poseen residuos de ácido siálico en su estructura), cuyo punto isoeléctrico (PI) se encuentra en un rango de pH de 2-3 (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015; Meng-Lund *et al.*, 2014); también se debe considerar la presencia del glicocalix que cubra estas células o de aquellas que carezcan de una capa de mucina (Behrens *et al.*, 2002).

3.1. Mecanismo de bioadhesión del quitosano.

Existen diversas teorías que explican cómo se produce este fenómeno, pero debido a las características de los componentes que participan en este sistema, es probable que ninguna por sí sola pueda describir el proceso de forma completa. Es así como se describen cuatro posibles escenarios, en los cuales ocurre la formación de un enlace mucoadhesivo *in vivo*, y es poco probable que el proceso sea el mismo para cada uno (Smart, 2005):

- I. Contacto entre superficies con grandes cantidades de mucina y formulaciones secas o parcialmente hidratadas.
- II. Interacción de formulaciones totalmente hidratadas con superficies cubiertas por una gruesa capa de mucina.
- III. Formulaciones secas o parcialmente hidratadas contactando superficies con una delgada capa de mucus, o que ésta se presente de forma discontinua.
- IV. Superficies con una delgada o discontinua capa de mucina interactuando con formulaciones totalmente hidratadas.

Independientemente de lo anterior se describen dos etapas necesarias y universales para que se produzca este fenómeno de adhesión (Palazzo *et al.*, 2017):

1. Etapa de contacto. Contacto íntimo entre el polímero y la membrana mucosa. En esta etapa se facilita la deshidratación de la mucosa junto con hidratación del polímero formando una red hidratada de éste, razón por la cual se denomina “*Wetting*” a esta interacción (Meng-Lund *et al.*, 2014; Smart, 2005). El proceso varía de acuerdo al lugar/ entorno/ medio en el cual ocurra la adhesión, de ésta forma por ejemplo, en la mucosa gastrointestinal un pre-requisito fundamental para que se establezca la unión es que se produzca la adsorción de las partículas mucoadhesivas, y a su vez éste proceso dependerá del movimiento Browniano (flujo de líquidos dentro de una cavidad y movimientos corporales tales como la peristalsis), y de la interacción entre las fuerzas de atracción/ repulsión de las partículas contra la superficie mucosa (Smart, 2005). Es importante destacar que la interacción electrostática entre el Q y la mucina en esta etapa es reversible, pero con la capacidad de iniciar rápidamente contacto con la mucosa (epitelio intestinal) (Kim *et al.*, 2015).
2. Etapa de consolidación. Se producen interacciones físico-químicas que fortalecen y consolidan la unión entre el polímero y las moléculas de mucina. Es debido a la humedad, el gradiente químico potencial y cambio en las propiedades físicas de la capa de mucus que las cadenas libres de ésta difunden y se entrelazan con las MPQ, formando complejos Q/mucina denominados **enlaces mucoadhesivos**, los cuales son de naturaleza heterogénea, ya que se producen mediante fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y principalmente por interacciones electrostáticas (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015; Meng-Lund *et al.*, 2014; Smart, 2005). El cambio en las propiedades físicas de la capa mucina se puede explicar mediante dos teorías: una basada en el “Efecto de Inter-penetración Macromolecular”, en la cual las moléculas mucoadhesivas se unen e interpenetran mediante interacciones secundarias a las glicoproteínas del mucus; y la otra corresponde a la “Teoría de Deshidratación”, la cual se aplica cuando una formulación seca o parcialmente hidratada entra en contacto con la capa de mucus, desencadenando el paso de agua desde la cubierta de mucina hacia la matriz de Q permitiendo la consolidación del enlace mucoadhesivo de forma rápida (Smart, 2005).

Estas etapas dependen principalmente de la naturaleza física de la formulación y de la superficie en la cual ocurra (Meng-Lund *et al.*, 2014; Smart, 2005).

Comúnmente, el fallo en la adhesión ocurre en el punto más débil de la unión formada, dicho punto dependerá a su vez de la fuerza de interacción de las partículas (Mahmood *et al.*, 2017) por otro lado en los puntos más fuertes, los componentes claves son la capa de mucus y el estado de hidratación del sistema. Cualquiera sea el caso, eventualmente todas las formulaciones serán desplazadas por la renovación celular y de la capa de mucina (Smart, 2005).

3.2. Factores que afectan la bioadhesión del quitosano.

Cómo se mencionó, este fenómeno de bioadhesión depende principalmente de la naturaleza física de la formulación que se entregue, así como de las características del medio en que se lleve a cabo la adhesión (Meng-Lund *et al.*, 2014). Es así como podemos agrupar los factores en dos grandes grupos: aquellos que guarden relación directa con el Q y en la formulación de sus MPs, y por otro lado, aquellos factores externos que están relacionados con el medio en que ocurre el fenómeno de adhesión.

3.2.1. Factores relacionados con el quitosano y su microencapsulación.

La fuerza y duración de la adhesión del Q dependen principalmente de su capacidad de hidratación, el PM (óptimo de 10 kDa hasta 4.000 kDa), flexibilidad y largo de las cadenas del polímero (Bravo-Osuna *et al.*, 2007). De ésta forma la proporción, grado de hidratación y el entrelazamiento, junto con las interacciones electrostáticas contribuyen a que ocurra el fenómeno (Meng-Lund *et al.*, 2014).

Además, se debe considerar la hidrofobicidad de la partícula. Las HFMM presentes en su superficie, así como también la morfología, concentración y el grado de funcionalización del polímero al momento de administrarla (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Van der Lubben *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2017). Si bien el diámetro hidrodinámico tiene un efecto en la bioadhesión de MPQ, su importancia se traduce en la capacidad de difusión de las MP a través de la capa de mucina en epitelios mucosos (Palazzo *et al.*, 2017).

La carga positiva del Q explicaría su facilidad para asociarse a membranas celulares (Meng-Lund *et al.*, 2014; Van der Lubben *et al.*, 2001), debido a la formación de puentes de hidrógeno, y enlaces iónicos entre los residuos de ácido siálico de la mucina y los grupos amino, ubicados a lo largo de la cadena del polímero (Bravo-Osuna *et al.*, 2007).

El Q exhibiría un umbral de fuerza en la mucoadhesión dependiente del largo de la cadena, de esta forma, cadenas muy largas del polisacárido podrían perjudicar su difusión y penetración en la capa de mucus, y por tanto entorpecería el proceso de unión (Meng-Lund *et al.*, 2014). Sin embargo, hay que considerar que una mayor longitud de la cadena de Q puede favorecer la mucoadhesión (Bravo-Osuna *et al.*, 2007). También es importante considerar la morfología de la partícula al momento de administrarla, ya que podría favorecer su gelificación y/o aglomeramiento, y por consiguiente interferir con el mecanismo de adhesión (Van der Lubben *et al.*, 2001), al igual que las concentraciones en que se administre el Q, pues puede variar su accionar en distintos medios (Thanou *et al.*, 2001).

3.2.2. Factores relacionados con el medio.

Entre los factores del medio que pueden afectar la bioadhesión se pueden mencionar: la presencia de enzimas y/o microorganismos que puedan degradar la MPQ, el estado de hidratación del medio, y la temperatura (T°) en que se lleve a cabo este fenómeno, los cuales podrían resultar en una disminución en la fuerza, intensidad o duración de la unión.

El pH del medio es otro factor de gran importancia, ya que limita la acción del Q, al afectar su solubilidad y por ende su capacidad de hidratarse (Mahmood *et al.*, 2017); por esta razón la bioadhesión junto con sus capacidades transportadoras sólo ocurren en sitios donde los valores de pH sean cercanos a los de su pK_a de alrededor de 6,2 (Thanou *et al.*, 2001), también se debe considerar que en este rango de pH las cadenas de mucina en el epitelio intestinal se encuentran cargadas negativamente favoreciendo la interacción con el Q (Palazzo *et al.*, 2017). Además, la actividad del Q sólo ocurre en su forma protonada, ya que a pH neutro difícilmente lleva carga, tiene una solubilidad baja y por tanto es esencialmente inactivo (Amidi *et al.*, 2010).

Por otra parte, hay que tener presente el tiempo de contacto y la presencia de iones metálicos que puedan interactuar con las MP, ya que pueden afectar la intensidad de la fuerza con la que se consolida la adhesión (Smart, 2005).

4. Funcionalización de quitosano.

Con el fin de superar los inconvenientes producidos por los factores ya mencionado sobre las MPQ, principalmente aquellos relacionados al pH en que se produce el efecto deseado, tanto como sistema bioadhesivo o como de potenciador de la absorción de HFMM en el tracto gastrointestinal (Thanou *et al.*, 2001), es que se ha propuesto la funcionalización de éste polisacárido. Éste método consiste básicamente en la conjugación química de un grupo funcional determinado, promoviendo sinérgicamente las propiedades mucoadhesivas del polímero (Kim *et al.*, 2015; Thanou *et al.*, 2001), y al mismo tiempo mejorando su permeabilidad, estabilidad y permitiendo un mayor control sobre la liberación de las macromoléculas microencapsuladas (Islam *et al.*, 2012).

Una de estas formas de funcionalización es mediante la tiolación de Q (QT), la cual se logra mediante la modificación de sus grupos amino primarios (Amidi *et al.*, 2010) que se conjugan con un grupo tiol (-SH). Este se considera un método altamente efectivo para mejorar las propiedades mucoadhesivas del Q, ya que de esta forma puede formar puentes disulfuro ínter e intramoleculares con los residuos de cisteína en la capa de mucus que reviste al epitelio intestinal a pH fisiológico; además de mejorar la permeabilidad mucosa mediante un mecanismo de regeneración de glutatión (GSH); finalmente posee la capacidad de unir cationes bivalentes los cuales son cofactores de varias proteasas (Amidi *et al.*, 2010; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015; Mahmood *et al.*, 2017; Palazzo *et al.*, 2017).

Otra forma de funcionalización es mediante la sulfonación de Q (QS) con un grupo funcional sulfato (-SO₃), a través de la cual se espera que el Q modificado exhiba propiedades similares a QT en cuanto a su capacidad mucoadhesiva: aparte de presentar propiedades anticoagulantes, antimicrobianas y antioxidantes (Zhang *et al.*, 2010), junto con poseer una capacidad mimética al receptor celular heparan sulfato (HS) que se desempeña en el mecanismo de invasión de distintas infecciones (Bucarey, 2017).

Basado en la información anterior, se espera que las MPQ funcionalizadas con grupos Tiol y Sulfato (MPQT y MPQS respectivamente) se comporten como “transportadores” apropiados para realizar una entrega prolongada de HFMM en los sitios “mucosos” blanco (Amidi *et al.*, 2010).

5. Epitelio intestinal: sitio blanco e interacción con MPQ

A lo largo del tracto intestinal mamífero no sólo se encuentran células epiteliales que componen la mucosa del lumen de los órganos que conforman este tracto (enterocitos), sino que también existen numerosas células diferenciadas y especializadas, tales como las células caliciformes, las células M, entre otras. Las células caliciformes son las responsables de producir la capa de mucina que recubre el lumen intestinal, mientras que las células M se localizan en las placas de Peyer y su rol está relacionado con la inmunidad de las mucosas, favoreciendo la presentación y reconocimiento de antígenos, o sustancias extrañas por parte de las células del sistema inmune (Zaldívar, 2002).

De esta forma, vacunas mucosas gastrointestinales tienen como principal sitio blanco las células M que se encuentran en las placas de Peyer. Sin embargo, la baja probabilidad de que el antígeno llegue y sea captado de forma íntegra por estas células han conducido a la utilización de MP en búsqueda de soslayar estos inconvenientes, y más aún, no generen una respuesta adversa al individuo, ni alteren las propiedades del antígeno.

Por otro lado, es importante tener presente que las células epiteliales se encuentran fuertemente selladas mediante TJ, las cuales permiten que estos epitelios sean prácticamente impermeables a numerosas macromoléculas. A lo anterior se suma el hecho que la capa de mucina funciona como una barrera extra para la recepción de macromoléculas (Amidi *et al.*, 2010). Bajo esta premisa, se ha adoptado la utilización de “potenciadores de penetración” en distintas formulaciones, los cuales pueden abrir de forma transitoria las TJ, facilitando el transporte de las macromoléculas deseadas a través de éstos epitelios. Por lo tanto, al utilizar MPQ es factible potenciar la acción y rango de HFMM terapéuticas y vacunales; se promueve la captación del antígeno a lo largo de todo el intestino, induciendo una respuesta inmune sistemática y local, mediante una entrega

eficiente de éste al tejido linfoide asociado a mucosas o por el sistema APC (Amidi *et al.*, 2010; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2012; Thanou *et al.*, 2001; Van der Lubben *et al.*, 2001), gracias a la capacidad mucoadhesiva que posee éste polímero.

Para comprobar la interacción y mucoadhesividad de las MPQ *in vitro* varios autores han propuesto y trabajado diversos modelos con distintas líneas celulares, y entre éstos aquellos que emplean las líneas celulares Caco-2 y HT-29 son los más reconocidos. Estas líneas celulares corresponden a células de intestino humano, aisladas desde adenocarcinomas colónicos; son utilizadas ampliamente en estudios mecanísticos y de adhesión/invasión *in vitro*, así como también en estudios de toxicología y absorción de drogas (Gagnon *et al.*, 2013; Natoli *et al.*, 2012). Ambas líneas poseen la particularidad de poder ser sometidas a un proceso de diferenciación sencillo, proceso mediante el cual adquieren polaridad y son capaces de presentar ciertas características propias de los enterocitos.

Es así como la línea Caco-2 forma monocapas polarizadas y se diferencia de manera muy similar a enterocitos en cultivo, no siendo necesario suplementarlas con factores de diferenciación, además son capaces de establecer TJs al cabo del proceso (Behrens *et al.*, 2002; Gagnon *et al.*, 2013; Natoli *et al.*, 2012). Por su parte, la línea HT-29 presenta un cultivo más heterogéneo, conteniendo una mayor proporción de células secretoras de mucus y células de absorción columnares (aunque esencialmente indiferenciadas en ambos casos), por lo que son bastante semejantes a un modelo de epitelio intestinal (Gagnon *et al.*, 2013; Natoli *et al.*, 2012).

HIPÓTESIS

La funcionalización de MPQ con grupos tiol y sulfato mejora la bioadhesión del polímero en monocapas de cultivos celulares epiteliales de la línea Caco-2, con respecto a MPQ no funcionalizado.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la bioadhesión de MPQ funcionalizado y no funcionalizado en monocapas de células Caco-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer una técnica de cultivo para monocapas diferenciadas y sin diferenciar de la línea celular epitelial Caco-2.
2. Evaluar la bioadhesión de MPQ comercial no funcionalizado (MPQC) y funcionalizado (MPQT y MPQS) en monocapas celulares diferenciadas y sin diferenciar.
3. Determinar y cuantificar la cantidad de MP adheridas a la monocapa celular mediante microscopía de fluorescencia y fluorimetría.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Centro Biotecnológico Veterinario (BIOVETEC) del Departamento de Ciencias Biológicas Animales y en el laboratorio de Virología del Departamento de Medicina Preventiva, ambos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDEF IT13I20021.

1. Cultivos celulares

La línea celular Caco-2 utilizada fue facilitada por el Dr. Alejandro Hidalgo del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Andrés Bello, Campus República (UNAB).

Se utilizó un medio de cultivo compuesto por Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y solución antibiótico-antimicótico correspondiente a 10.000 U.I./mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B al 1%.

Las células fueron cultivadas, en primera instancia, en frascos de cultivo celular T25 (25 cm²) y se mantuvieron en una incubadora a 37° C con un 5% de concentración de CO₂. Los cambios de medio se realizaron cada dos días o cuando se estimó conveniente; una vez alcanzado un 70% - 80% de confluencia de la capa celular se realizó su tripsinización y posterior pasaje. El proceso de tripsinización consistió:

1. Remoción del medio de cultivo desde los frascos de cultivo previo enjuague con este.
2. Adición de Tripsina con EDTA (0,25% de Tripsina con 2,21 mM de EDTA 1x) por cada frasco.
3. Incubación por cinco minutos bajo las condiciones de cultivo anteriormente descritas.
4. Adición medio de cultivo a un volumen equivalente al de Tripsina con EDTA utilizados, para de esta forma inactivar el efecto digestor la enzima.

5. Trasvasije de la suspensión de cada frasco a un tubo de centrifuga de 15 mL.
6. Centrifugación por 5 min a 1500 RCF, de esta forma las células sedimentan al fondo del tubo, permitiendo la eliminación del sobrenadante constituido por la mezcla de medio completo y Tripsina con EDTA.
7. El pellet se resuspende en medio de cultivo y desde esta nueva suspensión se extrae una alícuota para realizar un nuevo cultivo o para realizar la congelación de las células para su conservación.

Es importante mencionar que el total de estas acciones fueron realizadas en una campana de bioseguridad para evitar la contaminación de los cultivos. Las condiciones de incubación se mantuvieron durante todo el proceso experimental; además se mantuvo constantemente a lo largo de la realización del estudio un stock de 2 frascos de cultivo.

La conservación de la línea celular se mantuvo mediante la congelación de las alícuotas obtenidas en el séptimo paso del protocolo anterior. Para este proceso se utilizaron viales de congelación de 1-2 mL, con un medio de congelación preparado especialmente para la conservación de ésta línea celular, compuesto por SFB al 50%, dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y DMEM. La criopreservación se realizó de forma directa en un congelador a -80° C.

1.1. Diferenciación de monocapa

Una vez establecido y normalizado el protocolo de cultivo anteriormente descrito (proliferación constante) se procedió a la realización de la diferenciación de las células. De ésta forma al realizar un proceso de tripsinización normal, habiendo descartado el sobrenadante de Tripsina con EDTA tras la centrifugación, el pellet de células sedimentadas se reconstituyó con medio de cultivo, de ésta suspensión se extrajeron 20 μ L que se mezclaron con 10 μ L de Azul de Tripán para realizar un conteo de las células junto con evaluar la viabilidad de éstas.

El azul de Tripán es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas, se emplea para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir células vivas cuyas membranas celulares se encuentren íntegras; no es necesario para realizar conteos simples de células pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas de las vivas (Anon, 2011).

Las células con azul de Tripán se colocaron en un hemocitómetro de Neubauer y se procedió a contar el número de células vivas, resultado que luego se escaló al volumen original desde donde se extrajo la alícuota para saber la cantidad de células en 1 mL.

Luego de conocer la densidad celular, se procedió a realizar el cultivo en pocillos Transwell® (Corning®) transparentes de tereftalato de polietileno (PET) que poseen poros de 0,4 µm para lograr la diferenciación de las monocapas, es decir, adquieran polaridad (Gagnon *et al.*, 2013; Natoli *et al.*, 2012).

El proceso de cultivo en estos pocillos se realizó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Este consistió en:

1. Periodo de equilibrio inicial, el cual consiste en dejar la bandeja multipocillos incubando con medio de cultivo por una hora (esto para favorecer la adhesión de las células a los insertos).
2. Posteriormente se reemplazó el medio utilizado para el periodo de equilibrio con un medio de cultivo fresco, partiendo por la cámara inferior o externa con un total de 2,6 mL
3. Luego se colocó el inserto Transwell y se añadieron las células en una suspensión de 1,5 mL de medio de cultivo hasta alcanzar densidad de $1,5 \times 10^5$ - 2×10^5 células/cm² en cada uno de los pocillos.
4. Incubación bajo las condiciones descritas anteriormente.

Se mantuvieron así por 17-21 días bajo observación constante hasta lograr su polarización de acuerdo a lo postulado por distintos investigadores. Los cambios de medio se realizaron cada dos días durante la primera semana, y día por medio durante los días restantes hasta completar el periodo de maduración.

2. Funcionalización de quitosano.

Las MPQ funcionalizadas con grupos tiol y sulfato fueron sintetizadas y provistas por el laboratorio Polyforms en el marco de cooperación de este proyecto FONDEF. Es en este laboratorio donde se sintetizaron por primera vez MPQS en FAVET para la tesis “Estudio de recubrimiento de una matriz porosa a base de polipropileno funcionalizado con quitosano e hidroxiapatita y su posible uso como implante óseo” a cargo del Dr. Andrónico Neira-Carrillo. Como base se utilizó quitosano comercial (QC) no funcionalizado de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich).

2.1. Obtención de quitosano sulfatado (QS)

En este caso 1 gramo de QC fue disuelto en 40 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 4° C, y se mantuvo en agitación por dos horas. Luego utilizando 250 mL de éter etílico frío se hizo precipitar la solución de Q con ácido sulfúrico. Posteriormente se realizó la filtración de esta nueva mezcla y el producto no filtrado se agregó en 100 mL de agua nanopura a 4° C, inmediatamente después se ajustó el pH a 7,6 utilizando NaOH en solución acuosa, después se sometió a diálisis por 3 días contra agua nanopura utilizando membranas de celulosa. El producto obtenido fue sometido a evaporación con presión en un equipo evaporado rotativo (Heidolph Laborotta 4001 Efficent) hasta obtener 10 ml de QS.

2.2. Obtención de quitosano tiolado (QT)

Para la funcionalización con grupo tiol se disolvió 1 gramo de QC en 100 mL de una solución de ácido acético al 1%. Luego se agregó 2 mL de una solución acuosa de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y se mantuvo en agitación. Posteriormente se agregó 1 gramo de ácido tioglicólico ($C_2H_4O_3$) y el pH se ajustó a 5 utilizando una solución de NaOH 1M. Esta mezcla se incubó durante 4 horas en oscuridad, bajo agitación y

temperatura ambiente. Pasado este tiempo se procedió a dializar la solución utilizando membranas de celulosa a 4° C por 4 días bajo oscuridad y contra las siguientes soluciones: Hal 5 mM durante el primer día, Hal 5 mM + NaCl 1% (segundo y tercer día) y HCl 5 mM durante el último día.

2.3. Formulación de micropartículas (MP)

Para la obtención de MPQC, MPQT y MPQS se utilizó la técnica de secado por atomización utilizando un equipo Buchi Mini Spray Dryer B-290. Éste método de microencapsulación corresponde a una de las técnicas más usadas para su formulación, al ser un proceso eficiente, simple, puede ser fácilmente escalado, presenta pocos efectos adversos (hacia el contenido a encapsular), genera MP con buena estabilidad, permite una buena eficiencia de encapsulación, permite que éstas logren entrega prolongada de su contenido, y se puede controlar de mejor forma el tamaño de las partículas resultantes (Amidi *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2017). Sin embargo, se debe tener cuidado con el uso de agentes antiaglomerantes, y manejar meticulosamente el diámetro de apertura de la boquilla del equipo, velocidad del flujo de atomización, y la T° del aire para la presión (P°) de entrada, parámetros que afectan el tamaño de las MP resultantes, morfología, contenido de humedad, densidad y polimorfismo (Jiang *et al.*, 2017); por otra parte el tamaño de las MP también depende del PM del polímero (Islam *et al.*, 2012).

Los parámetros de formulación utilizados fueron los siguientes:

- T° de entrada: 140° C
- T° de salida: 80-90° C
- P° de aspiración: 100%
- P° de atomización: 300 NI/h
- Diámetro de boquilla: 0,7 mm

3. Medición tamaño y Z potencia de MPQ

Las MP fueron examinadas una vez formuladas y previo a los ensayos de bioadhesividad, para determinar su tamaño y valor de su potencial Z en un analizador Zeta Plus 90Plus/BI-MAS (Brookhaven Instruments Corp.), que permite la obtención de ambos parámetros.

Para cada tipo de MPQ se tomó una alícuota de 50 μ L y se disolvió en KCl 1 mM bifiltrado cuidando de que quede bien dispersa y no queden aglomerados. Al momento de realizar la medición del potencial Z hay que limpiar el electrodo del equipo con agua desionizada filtrada antes de analizar cada muestra, y al momento de introducirlo en la cubeta de medición se debe tener cuidado de no generar burbujas

4. Marcaje de micropartículas con fluoróforo

Para comprobar la adhesión de las MPQ a las monocapas celulares, se realizó el marcaje de las MP con isotiocianato de fluoresceína (FITC), donde su grupo isotiocianato reacciona de manera covalente con el grupo amino primario del Q (Ge *et al.*, 2009).

De esta forma se modificó un protocolo de marcaje en el que 5 mg de las MPQ se disolvieron en una solución de 1 mL de ácido acético 0,1 M y 1 mL de metanol, la cual se puso en un agitador magnético y luego se agregó lenta y paulatinamente 0,5 mL de FITC previamente disuelto en metanol, esta nueva solución de MPQ + FITC se dejó en agitación por tres horas, cuidando de que no fuese expuesta a la luz. Terminada esta etapa se procedió a agregar NaOH 0,5 M para aumentar el pH de la mezcla y así hacer precipitar las MPQ conjugadas con FITC (MPQ-*f*). Finalmente este precipitado se centrifugó a 10.000 RCF, se extrajo el sobrenadante y las MPQ-*f* fueron lavadas con agua destilada autoclavada (Ge *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2009).

Para la realización de estos experimentos se reemplazó el medio en el cual ocurre la conjugación del grupo amino primario del Q con el grupo isotiocianato del FITC por buffer PBS, y las centrifugaciones se realizaron a 10.000 RCF y los lavados se realizaron con agua desionizada. Junto con esto se realizaron curvas de calibración para cada tipo de MPQX-*f* (MPQC-*f*, MPQS-*f* y MPQT-*f*) para determinar de forma cuantitativa la cantidad de MPQ que se adhieran a las monocapas celulares.

5. Ensayos de bioadhesión

Previo al ensayo se realizó un análisis fluorimétrico de las MPQX funcionalizadas y no funcionalizadas marcadas con FITC. Luego tras un lavado con buffer fosfato salino de las monocapas se añadieron las MPQX-*f* en dosis de 500 μ L para cada inserto Transwell y pocillo, luego se dejaron incubando por 90 min a 37° C sin luz (Jia *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2017). Transcurrido este periodo se extrajo el sobrenadante de cada pocillo para medir su fluorescencia y posteriormente se procedió a la visualización de los cultivos en un microscopio de fluorescencia.

Los resultados obtenidos de la fluorimetría de la MPQX-*f* pre y post incubación se compararon en orden de obtener un delta de fluorescencia (delta FSU) e interpolar estos datos con lo observado bajo el microscopio para establecer una relación objetiva entre ambos parámetros.

RESULTADOS

1. Cultivos celulares y diferenciación de monocapa

Las células de la línea Caco-2 presentan una morfología característica que permite distinguir las fácilmente al observarlas bajo el microscopio. En comparación a otras líneas celulares utilizadas para propósitos similares (como la línea HT-29), la línea celular utilizada en esta tesis presenta células de gran tamaño, cuya forma puede ser circular a octagonal, con un citoplasma bastante amplio y translúcido, junto con un núcleo redondo grande que tiende a estar centrado (Figura 1).

Se evidenció que esta línea celular presenta un crecimiento lento tras su descongelación, alcanzando monocapas estables en un tiempo variable de catorce días a veinticinco días; variación atribuida al nivel de confluencia en que las monocapas fueron tratadas para ser criopreservadas. Una vez alcanzada la estabilidad de los cultivos, los cambios de medio o procesos de tripsinización/congelación se llevaron a cabo cada un día y medio o dos días evitando mantener cultivos por tiempos superiores a un mes.

En una primera instancia la monocapa celular presentó un comportamiento estable a partir del quinto pasaje, los cuales se realizaron al momento en que los cultivos presentaron una confluencia del 70% - 80%, junto con la criopreservación de células.

Los experimentos se llevaron a cabo a partir del frasco de cultivo que presentó la mayor tasa de crecimiento. En esta segunda etapa, el proceso de diferenciación se realizó tras el segundo pasaje cuando los porcentajes de confluencia se encontraron en el rango mencionado con anterioridad.

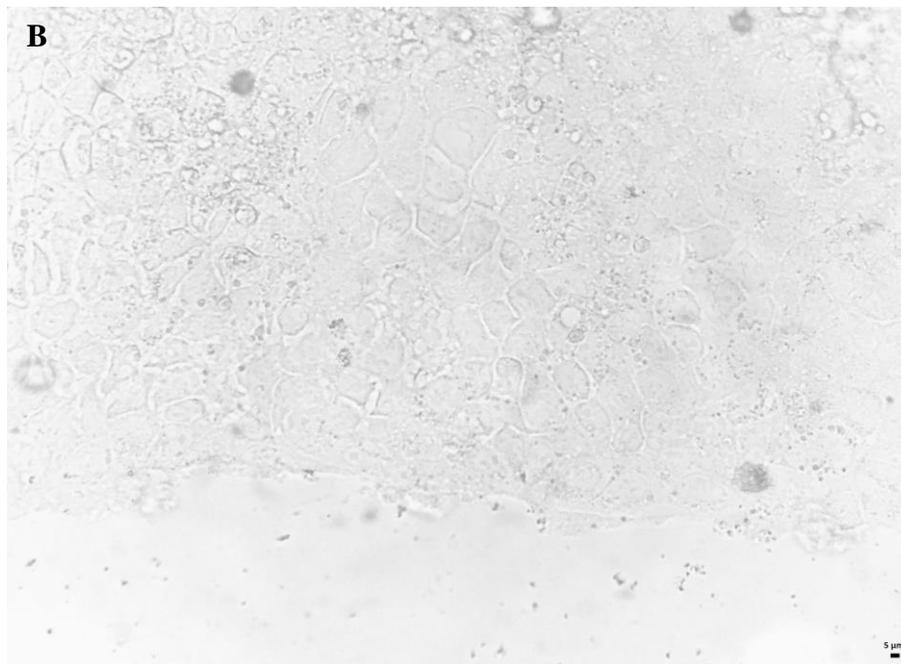
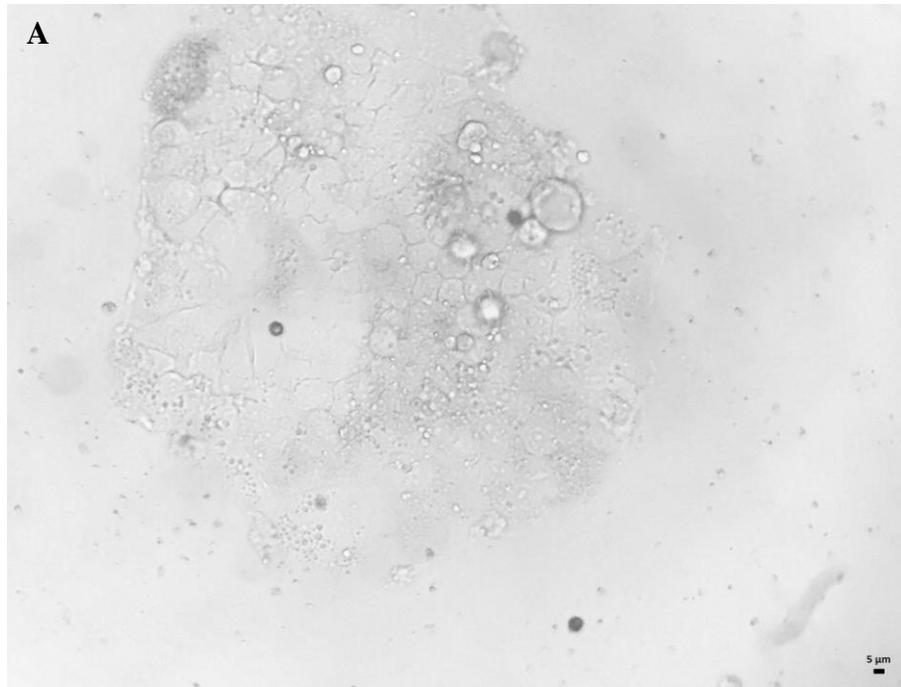


Figura 1. Microscopía óptica de cultivos celulares de la línea Caco-2 observados durante los días 7 (A) y 11 (B) de incubación en un mismo periodo de cultivo a magnificación 40x. Se puede apreciar claramente el cambio de tamaño de las células en el transcurso de la incubación y como su forma se mantiene estable, con bordes bien delimitados en ambas fotografías.

Se realizó un conteo de las células, utilizando el método de exclusión por azul de Tripan, donde se registraron $4,8 \times 10^6$ células para un frasco T25. De esta forma se realizó un cultivo en los insertos Transwell® con 200.000 células/ mL. Estos se dejaron incubando por un 21 días según lo reportado en la literatura (Gagnon *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2000) y bajo observación constante teniendo en consideración el desprendimiento celular observado a partir del día 17 en experiencias previas.

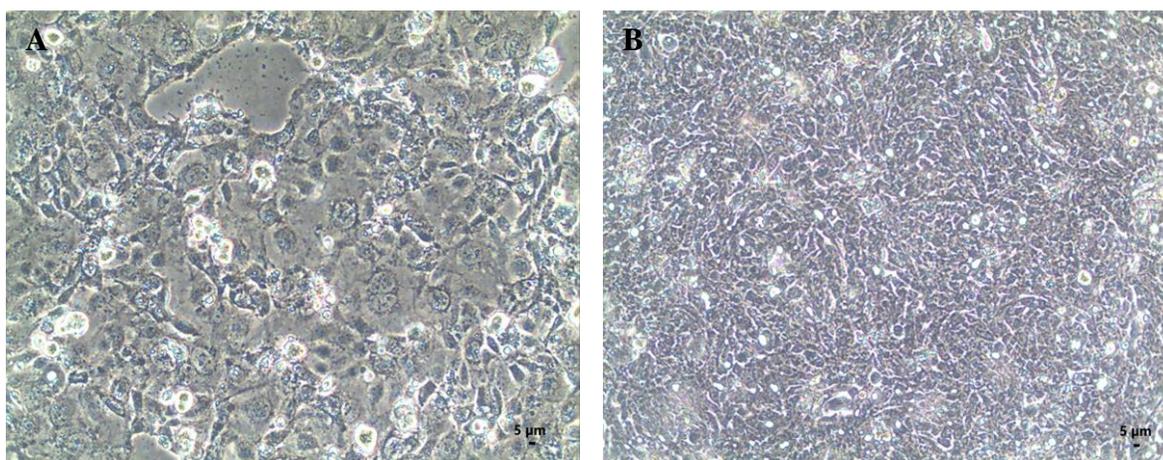


Figura 2. Microscopía óptica de cultivos celulares de las líneas Caco-2 (A) y HT-29 (B) a magnificación de 40x.. En la fotografía se puede apreciar un mayor tamaño celular, con un forma octagonal y mayor cantidad de citoplasma en comparación a las células de la fotografía B cuyo tamaño es menor, y forma más ahusada.

2. MPQ funcionalizadas

El Q funcionalizado se trató mediante el proceso de secado por atomización para su formulación como MP, obteniéndose tres lotes correspondientes a las MP de Q comercial no funcionalizado (MPQC), MP de quitosano tiolado (MPQT) y MP de quitosano sulfonado (MPQS). Las MPQ resultantes correspondieron a un polvo inoloro y cuyo color varió de blanco (MPQC) a un tono más amarillento (MPQS Y MPQT) (Figura 3), cambio que se puede atribuir por la presencia de grupos azufre en la estructura del Q funcionalizado.

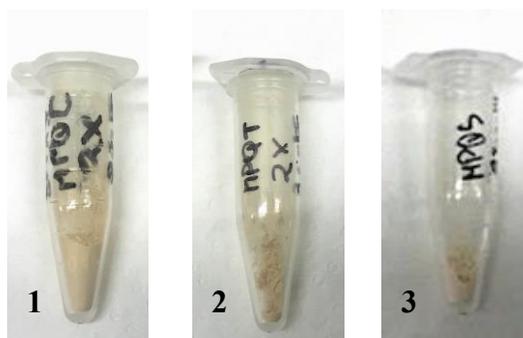


Figura 3. Imagen óptica de distintos lotes de MPQC, MPQT y MPQS respectivamente, obtenidos tras el proceso de microencapsulación por secado por atomización. La coloración observada se debe a que las MP fueron cargadas con antígenos (datos no mostrados).

De cada uno de estos lotes se extrajeron alícuotas para su caracterización morfológica y fisicoquímica, y posteriormente realizar el marcaje con FITC.

3. Marcaje con FITC

Para el marcaje de las MPQ con FITC se realizó una curva de calibración con soluciones de concentración conocida estándar para cada tipo de MPQ-*f* que se fueron diluyendo de manera seriada hasta una concentración final de 125 $\mu\text{g/mL}$ para cada tipo de MPQ-*f*. Estas soluciones fueron preparadas mediante dilución de la solución metanólica del reactivo que se utilizó para el marcaje de las MPQ, y PBS. Posteriormente, las soluciones se analizaron en un fluorímetro GloMax®-Multi Jr (Promega) utilizando el Kit óptico de lectura Azul, resultados ordenados en la Tabla 1. Los resultados obtenidos se ordenaron y graficaron permitiendo la visualización de las curvas de calibración correspondientes, así como permitir calcular las pendiente e interceptos correspondientes para cada tipo de MPQ (Gráfico 1).

	$\mu\text{g/mL}$	MPQC- <i>f</i> (FSU)	MPQT- <i>f</i> (FSU)	MPQS- <i>f</i> (FSU)
Blanco	0	2.681	2.660	2.700
D5	125	5.244	5.561	6.978
D4	250	7.854	7.922	11.522
D3	500	13.969	13.856	22.930
D2	750	21.180	20.755	37.457
D1	1.000	30.042	29.297	55.154

Tabla 1. Diluciones seriadas de los distintos tipos de MPQ-*f* en ($\mu\text{g/mL}$) junto a sus respectivas mediciones de fluorescencia (FSU). Se aprecia una mayor eficiencia de marcaje en MPQS-*f*, ya que a una misma concentración para los tres tipos de MPQ-*f*, son los que presentan mayores índices de FSU.

Una vez recuperadas las MPQ-*f*, posterior la etapa de marcaje, se realizaron lavados de éstas para evitar la presencia de FITC libre, el cual puede interferir en las mediciones de fluorescencia. Al comienzo de estos experimentos solo se realizaron lavados con una solución de acetona: agua en proporción 3:1 (v/v), y finalmente con PBS.

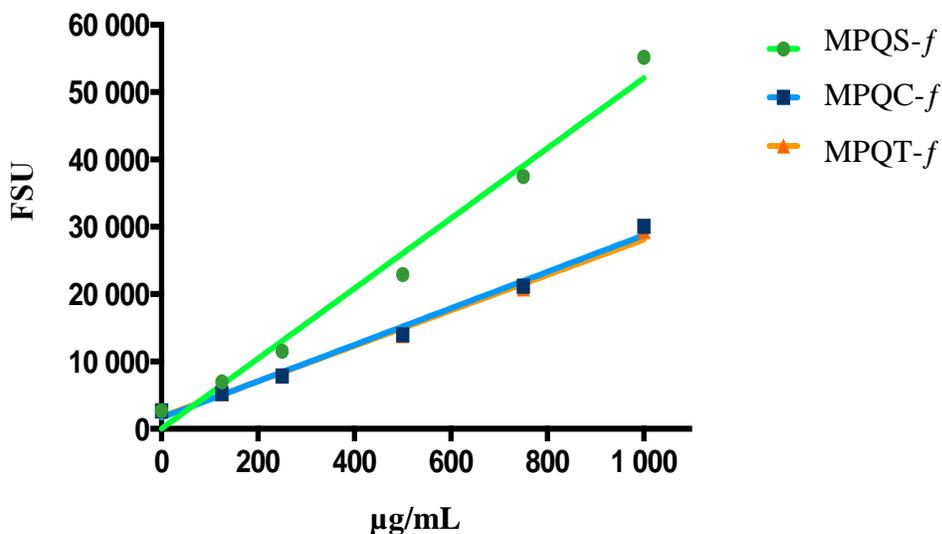


Gráfico 1. Curvas de calibración para MPQC-*f* (azul), MPQT-*f* (anaranjado), y MPQS-*f* (verde). En el eje de las ordenadas se encuentran los valores de FSU registrados en la Tabla 1 correspondientes a las concentraciones de MPQ-*f* dispuestas en las abscisas. Se aprecia una pendiente más pronunciada para MPQS-*f* con respecto a MPQC-*f* y MPQT-*f* cuyas pendientes se solapan en este gráfico; estas diferencias se pueden atribuir a la diferencia de carga para cada MPQ.

La realización de las curvas de calibración correspondientes no solo permitieron estandarizar una técnica de marcaje útil para los tres tipos de MPQ formulados, sino que entrega una herramienta que permite medir efectivamente la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de MP que se adhieran a las monocapas celulares utilizando las ecuaciones de la recta correspondientes a cada MPQ-*f* (Tabla 2).

	MPQC-<i>f</i>	MPQT-<i>f</i>	MPQS-<i>f</i>
Pendiente	$27,09 \pm 1,329$	$26,33 \pm 1,188$	$52,06 \pm 3,255$
Intercepto	$1.643 \pm 746,3$	$1.774 \pm 667,1$	$12,56 \pm 1.827$
Ecuación de la recta	$Y = 27,09 * X + 1.643$	$Y = 26,33 * X + 1.774$	$Y = 52,06 * X + 12,56$

Tabla 2. Pendiente, intercepto y ecuación de la recta para cada tipo de MPQ obtenidos tras la realización de las curvas de calibración del marcaje con fluoróforo.

Una vez terminados los lavados, y previo a los ensayos se tomaron alícuotas de cada tipo de MPQ-*f* para analizarlo con microscopía de fluorescencia y así corroborar de manera cualitativa lo registrado en el fluorímetro como se muestra en la figura 4, donde se aprecia la forma esférica de las MPQ-*f*, además de su capacidad de agregación, la cual se atribuye en este caso al pH del medio en el cual se llevo a cabo la conjugación del FITC con el Q, es por esto que las partículas se sometieron a una breve sonicación, para romper estos agregados, individualizando las MP.

4. Caracterización de MPQ

Una vez obtenidos los distintos lotes de MPQ se realizó una caracterización para cada tipo de éstas en base a su tamaño y valor de potencial Z. Las muestras de cada tipo de partículas se analizaron 10 veces, de esta forma el resultado utilizado corresponde a el promedio de cada una de estas mediciones, junto con su respectiva desviación estándar.

	Z-potencial (mV)	Tamaño (nm)	Polidispersidad
MPQC	33,66 ± 0,69	5435,6 ± 558,2	0,407 ± 0,010
MPQS	- 14,62 ± 0,62	1285,5 ± 33,7	0,349 ± 0,010
MPQT	27,09 ± 0,42	6109,3 ± 691,5	0,416 ± 0,014

Tabla 6. Caracterización de MPQX de acuerdo a sus valores de potencial Z, tamaño y polidispersidad.

Es importante destacar que el tamaño promedio de las MP formuladas con Q funcionalizado y no funcionalizado fue inferior a 10 μm como se señala en la tabla 6. Se busca que el tamaño de las MP con fines para liberación de antígenos en el tracto gastrointestinal no supere el rango del 10 μm , ya que se ha descrito que éste es un tamaño apropiado para su captación por células M (sitio blanco principal para las vacunas mucosas). Tamaños menores a este rango favorecen el transporte hacia el centro de las placas de Peyer, bazo y linfonodos, en los cuales se produce gran cantidad de IgM e IgG específicas (Islam *et al.*, 2012; Van der Lubben *et al.*, 2001).

Luego del marcaje con FITC, realizó una nueva caracterización de las MPQ-*f*, en esta nueva ocasión no se presentaron cambios significativos en el tamaño de las partículas pero si se registraron variaciones con respecto al potencial Z de las MPQ (Tabla 7). Se puede apreciar una gran variación en el símbolo del potencial Z para las MPQC marcadas con FITC con respecto a las MP sin marcar, quedando con un potencial de carga negativo, a diferencia de las MPQT-*f* y MPQS-*f* que mantuvieron su potencial positivo y negativo respectivamente. Cabe destacar que las MPQS no se vieron afectadas por el proceso de marcaje de acuerdo a estos resultados.

	Z-potencial (mV)
MPQC-<i>f</i>	- 4,29 ± 0,47
MPQS-<i>f</i>	- 15,78 ± 2,51
MPQT-<i>f</i>	13,41 ± 2,56

Tabla 7. Valores de potencial Z correspondientes a las micropartículas tras el marcaje con FITC. Los valores negativos obtenidos se atribuyen a la conjugación del isotiocianato del fluoróforo con el grupo amino disponible de las micropartículas.

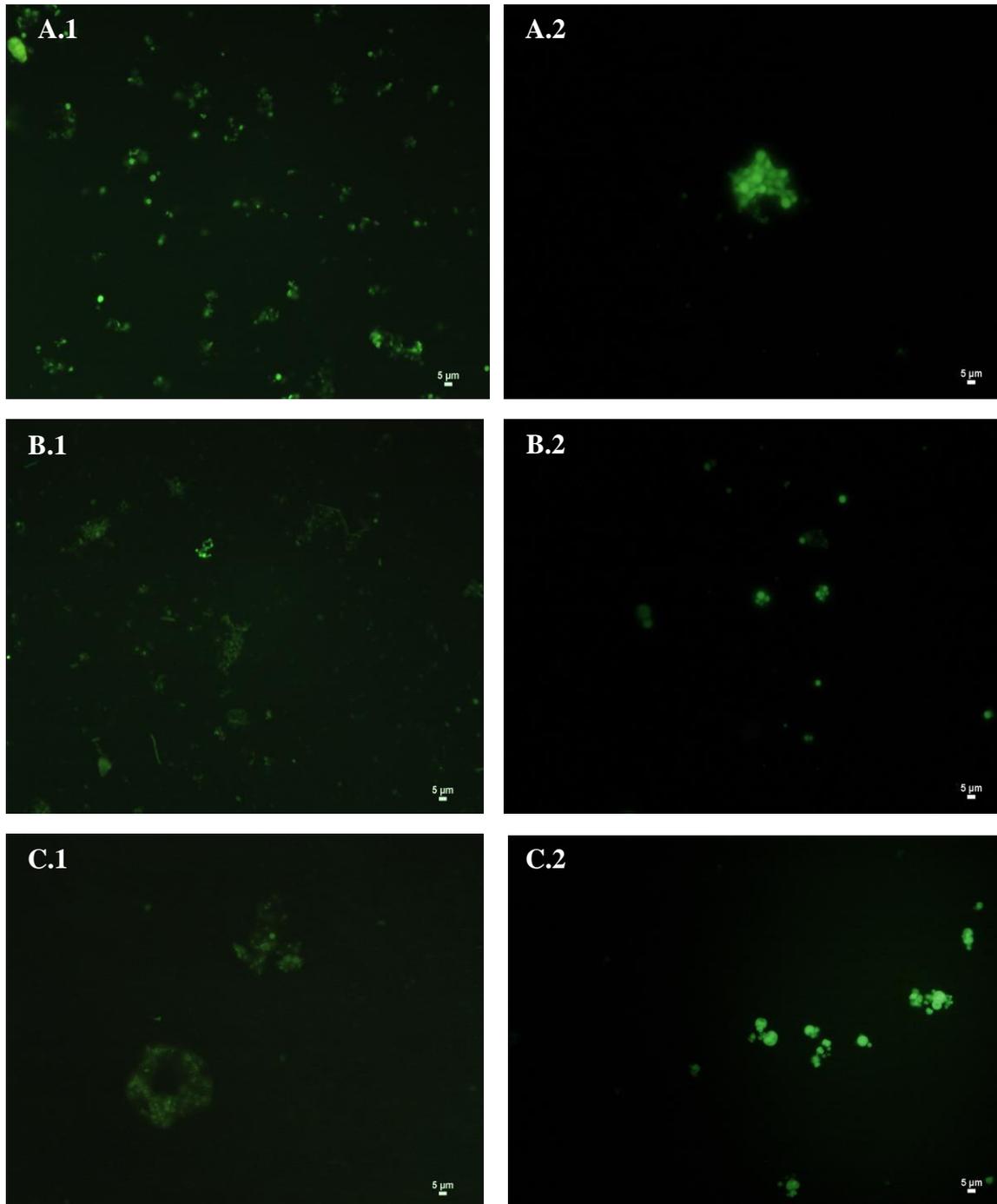


Figura 4. Microscopía óptica de fluorescencia de MPQC-*f* (A.1 y A.2), MPQT-*f* (B.1 y B.2) y MPQS-*f* (C.1 y C.2) obtenidas en aumento 40x. En la columna de la derecha se pueden apreciar de mejor manera las micropartículas tras haber sido sometidas a sonicación posterior a su formulación.

5. Ensayo de bioadhesión

Previo a los ensayos de bioadhesión se midió la fluorescencia de cada lote de MP junto con el medio de cultivo a utilizar en las pruebas. De esta manera se obtuvieron los valores de fluorescencia pre-incubación, y dada las curvas de calibración elaboradas con anterioridad también se obtuvo la cantidad promedio de MP que se emplearan en cada placa e inserto de cultivo.

MUESTRA	FSU	CANTIDAD (μg)
Medio de Cultivo	3.680,85	-
MPQC- <i>f</i>	7.580,10	219,16
MPQS- <i>f</i>	8.966,69	172
MPQT- <i>f</i>	7.820,66	229,65

Tabla 8 Valores de fluorescencia para 500 μL de Medio de cultivo MPQC-*f*, MPQS-*f* y MPQT-*f* junto con su respectiva cantidad en μg previo a su utilización en los ensayos de bioadhesión.

La monocapas celulares diferenciadas se mantuvieron en los insertos Transwell[®], mientras que las monocapas sin diferenciar se trabajaron en una placa multi-pocillos cuyas dimensiones se aproximaban a la de pocillos Transwell[®]. Los ensayos se coordinaron para ser realizados al termino de la etapa de diferenciación. Es así como en el día 21 se procede con las pruebas de adhesión siguiendo un protocolo adaptado de Behrens *et al.*, 2002 Lin *et al.*, 2008 y Jia *et al.*, 2009 donde las MPQX-*f* fueron resuspendidas en el medio de cultivo para luego ser inoculadas a las monocapas celulares y comprobar la cantidad de éstas que se mantuvieron unidas durante 90 minutos. Se realizaron pruebas en duplicado para cada tipo de MPQ, en cada una de las placas (Transwell y tradicional).

Una de las consideraciones a tener en cuenta es el pH del medio con partículas fluorescentes, puesto que debido a la técnica de conjugación con FITC puede producir variaciones de pH que pueden alterar la integridad de las monocapas, por lo cual se tuvo precaución en el viraje de color del medio de cultivo junto con la utilización de PBS en vez de una solución de acetona:agua como sugieren los autores mencionados.

Terminado el periodo de incubación se retiró el medio de cultivo y se procedió a analizar ambas placas en un microscopio de fluorescencia. En primera instancia se apreció fluorescencia, pero con una menor intensidad que la observada previo a los ensayos, debido a esto no se pudo realizar un registro fotográfico de la adhesión.

El medio de cultivo retirado fue analizado en el fluorímetro, obteniendo la fluorescencia correspondiente al sobrenadante de cada pocillo. De esta forma se realizaron tres lecturas para cada pocillo para posteriormente trabajar con el promedio de éstas, así se registraron 4 lecturas finales para cada tipo de MPQ-*f* (duplicado para cada placa). Con estos resultados se obtuvo la diferencia de fluorescencia pre y post incubación utilizando una fórmula para el diferencial de fluorescencia (Δ FSU).

	Cultivo	FSU post-incubación	ΔFSU
MPQC-<i>f</i>	Transwell	7.124,24	455,86
		7.241,84	338,26
	Estándar	6.827,82	725,29
		6.895,45	718,47
MPQT-<i>f</i>	Transwell	7.342,15	478,51
		7.440,36	380,30
	Estándar	7.167,47	653,19
		7.102,01	718,66
MPQS-<i>f</i>	Transwell	8.466,22	500,47
		8.548,37	418,32
	Estándar	8.253,18	713,51
		8.231,12	735,57

Tabla 9. Fluorescencia post incubación de los distintos tipos de MPQ-*f* junto con sus respectivos valores de Δ FSU para cada tipo de cultivos: diferenciados (Transwell) y sin diferenciar (Estándar). En color rojo se muestran los menores valores de Δ FSU registrados para cada tipo de MPQ-*f*, y en color azul los máximos.

$$\Delta FSU = (FSU_{pre-incubación} - FSU_{post-incubación})$$

Donde $FSU_{pre-inc}$ corresponde a la Fluorescencia pre-incubación, que se obtiene a partir de la fluorescencia de cada tipo de MPQ-*f* previa su administración en cultivos. Y $FSU_{post-inc}$ corresponde a la Fluorescencia post-incubación, obtenida a partir del sobrenadante extraído posterior al proceso de incubación, desde cada pocillo con MPQ-*f* enfrentadas a los distintos tipos de monocapas celulares. Esta fórmula permite analizar y comparar fácilmente la adhesión de los distintos tipos de MP en los pocillos con monocapas celulares diferenciadas y sin diferenciar, ya que permite identificar sin problemas la ocurrencia de esta puesto que un ΔFSU igual a cero ($\Delta FSU=0$) equivale a una no ocurrencia de este fenómeno. Además un mayor valor de ΔFSU obtenido equivaldría a un mayor número de MPQ-*f* adheridas a las monocapas, permitiendo una comparación estándar del rendimiento bioadhesivo de estas MP como se ve reflejado en la tabla 9, donde se aprecia que las MPQS-*f* presentaron un mayor rendimiento en cuanto a su capacidad bioadhesiva.

Estos resultados se condicen con la presencia de fluorescencia en las placas de cultivo observadas bajo microscopio de fluorescencia como ya se mencionó, y probablemente la poca fluorescencia encontrada se pudo deber a la cantidad de MPQ-*f* adheridas a la monocapa (aunque la intensidad de la emisión no guarde relación directa con este fenómeno). Junto con esto también se pueden definir un porcentaje de bioadhesión máximo para obtener la adhesión máxima esperada.

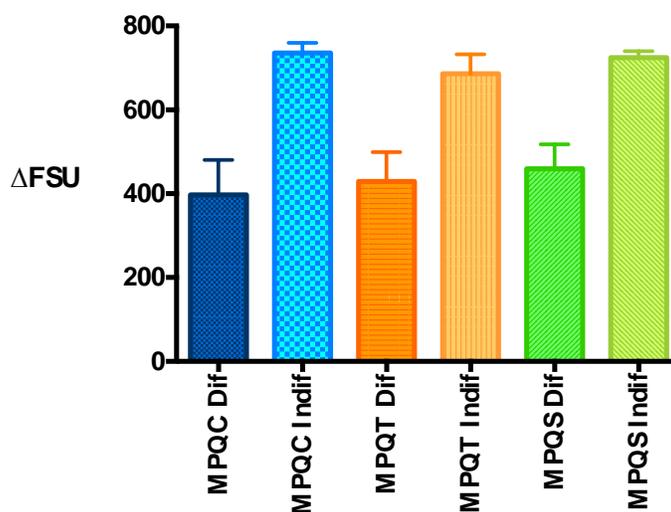
$$\text{Máxima adhesión esperada (100\% Bioadhesión)} = FSU_{MPQX} - FSU_{MC}$$

Donde la diferencia entre los valores de FSU para cada tipo de MP (FSU_{MPQ}) se resta a la fluorescencia intrínseca del Medio de Cultivo (FSU_{MC}) en el cual se llevaron a cabo las adhesiones correspondientes. De esta forma se pueden ordenar los índices de adhesión obtenidos en este ensayo con los valores mínimos, máximos y esperados en ambos tipos de cultivos de la línea Caco-2. Se aprecia claramente que los valores mínimos se registraron en los cultivos diferenciados a diferencia de lo que se planteaba al inicio del estudio, también se refuerza el hecho de la mayor adhesión registrada por MPQS-*f* en ambos tipos de cultivo (Tabla 10).

	Adhesión Esperada (ΔFSU)	Adhesión Máx. Registrada (ΔFSU)	Adhesión Mín. Registrada (ΔFSU)
MPQC-<i>f</i>	3.899,25	725,29	338,26
MPQT-<i>f</i>	4.139,81	718,66	380,30
MPQS-<i>f</i>	5.285,84	735,57	418,32

Tabla 10. ndice de adhesión máxima esperada estimada, adhesión máxima registrada y adhesión mínima registradas para los tres tipos de MP (MPQC-*f*, MPQT-*f* y MPQS-*f*) en ambos tipos de cultivos de la línea Caco-2. Se aprecia que los valores más altos corresponden a los obtenidos con MPQS-*f* con una mayor adhesión esperada (verde), mayor adherencia registrada (azul) y menor valor de adhesión obtenido (rojo).

De acuerdo a estos resultados la mayor cantidad de adhesión se registró en los cultivos cuyas monocapas se encontraban sin diferenciar (cultivos estándar) y cuyos valores de fluorescencia fueron: 752,28 FSU, 735,57 FSU, 718,66 FSU, para MPQC, MPQS y MPQT respectivamente. Así mismo se evidenció que las MPQC fueron las que mostraron mayores índices de bioadhesión en ambas matrices, seguidas por MPQT y finalmente MPQS (Tablas 9 y 10). En cambio los menores registros corresponden a los valores de fluorescencia de MPQS 418,32 FSU, seguido por MPQC 338,26 FSU y finalmente MPQT 380,30 FSU; estos resultados se aprecian en el gráfico 2.



Gráfico 2. Valores de Δ FSU para los tres tipos de MP en ambos tipos de cultivo: diferenciados (Dif) y sin diferenciar (Indif). Se aprecian mayores índices de unión en cultivos indiferenciados, donde la diferencia de adhesión entre los distintos tipos de MPQ-*f* es mínima.

Estos valores se muestran como porcentajes en la tabla 11, considerando como un 100% de adhesión a los valores del Δ FSU esperado.

	% Adhesión Máx.	% Adhesión Mín.
MPQC-<i>f</i>	19,30	8,42
MPQT-<i>f</i>	17,36	9,19
MPQS-<i>f</i>	13,91	7,9

Tabla 11. Porcentajes de bioadhesión para cada tipo de MPQ obtenidos a partir de la fluorescencia pre-incubación, Δ FSU post-incubación correspondientes a las adhesiones esperadas, y las adhesiones máximas y mínimas registradas.

En esta ocasión se aprecia un inversión en los máximos y mínimos de los resultados, con respecto al rendimiento de las MPQ-*f* en cuanto a su eficiencia de adhesión. Sin embargo se debe considerar que estos resultados se obtuvieron a partir de los resultados de los Δ FSU, que es un valor que de forma indirecta demuestra la adhesión de las partículas en las monocapas. Por ende, estos porcentajes se deben interpretar bajo esta luz y teniendo presente que estos porcentajes no permiten establecer comparaciones claras entre los tipos de MPQ-*f*, ya que no se realizó un control de adhesión estándar que permitiese comparar los tres tipos de MP utilizadas, y es la razón por la que no se realizó la comparación cuantitativa de la bioadhesión con estos porcentajes.

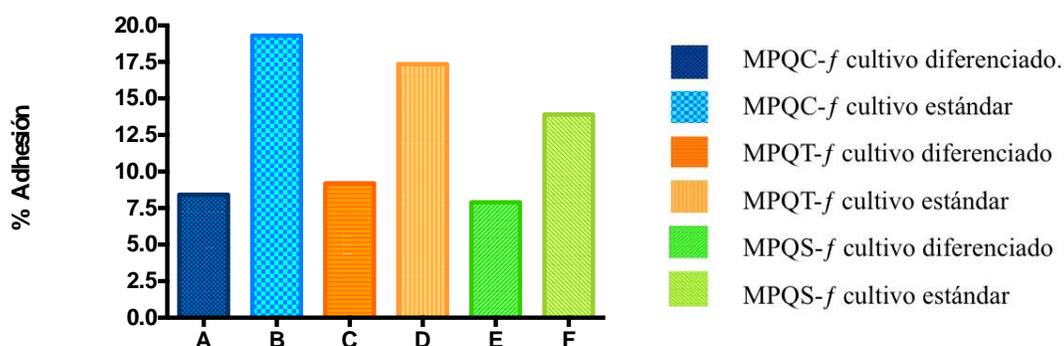


Grafico 3. Porcentajes de bioadhesión para cada tipo de MPQ-*f* obtenidos a partir de los diferenciales de fluorescencia Estimados y los diferenciales de fluorescencia registrados en el ensayo.

DISCUSIÓN

En éste estudio se busca evaluar la capacidad bioadhesiva de MPQ funcionalizado con grupos tiol y sulfato, comparándola con MP del polímero sin funcionalizar; ya que éste es un requerimiento fundamental al momento de formular vacunas mucosas. Las vacunas mucosas han generado gran interés en el último tiempo en el ámbito médico y farmacológico (Jiang *et al.*, 2017; Mahmood *et al.*, 2017; Palazzo *et al.*, 2017), ya que ofrecen ciertas ventajas prácticas respecto a vacunas de administración parenteral como, por ejemplo, menores costos de producción, menor dificultad al momento de administrar, y principalmente, generan un respuesta inmune tanto local como sistémica (Amidi *et al.*, 2010; Van der Lubben *et al.*, 2001).

La utilización de Q y su variante funcionalizada con grupos tiol para la formulación de MP que actúen como vehículos de antígenos vacunales está bien documentada (Islam *et al.*, 2012), sin embargo este es el primer acercamiento en el uso de éste polímero funcionalizado con grupos sulfato para este fin. De esta forma se espera mejorar las capacidades mucoadhesivas del Q, al establecer enlaces di-sulfuro entre estas MP y las glicoproteínas que se encuentran en la capa de mucus de los tejidos, que son el sitio blanco de la vacuna (Amidi *et al.*, 2010; Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015; Mahmood *et al.*, 2017; Palazzo *et al.*, 2017). Por lo tanto, la utilización de la línea celular Caco-2, que tiene la capacidad de expresarse fenotípicamente como enterocitos tras un proceso de diferenciación, genera un gran interés en este tipo de estudio, ya que permite comprobar de una manera más representativa la facultad de adhesión de las distintas MP, además esta línea se caracteriza por expresar uniones intercelulares de tipo estrechas (TJ) luego de la diferenciación (Islam *et al.*, 2012).

Es así como las células se cultivan en insertos Transwell® durante 21 días tiempo durante el cual se espera que la monocapa de células adquiera polaridad (Gagnon *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2000), gracias al gradiente de concentración que se establece entre las cámaras exterior e interior de los insertos debido a la presencia de una membrana con poros de 0,4 µm que se encuentra en su base. Transcurrido este tiempo, las monocapas están listas para realizar el ensayo final de adhesión.

Un punto importante a considerar es la estabilidad de las monocapas durante este proceso, puesto que durante la realización de esta tesis se evidenciaron cultivos en los cuales hubo un desprendimiento progresivo de las células desde la membrana porosa a partir del décimo día. Lo anterior podría deberse a un prolongado tiempo en que las células se mantuvieron en cultivo, o bien a la rapidez en que establecieron una confluencia total de la monocapa. Es por esto que resulta fundamental un seguimiento constante y exhaustivo de los cultivos durante el periodo de incubación en los insertos, asegurando así que el proceso de diferenciación se lleve a cabo sin interrupciones al establecer la monocapa. Un punto importante a destacar es que este desprendimiento parece ocurrir en un periodo importante durante de la diferenciación del cultivo celular, ya que es a partir del día 9 cuando se comienzan a expresar las uniones intercelulares estrechas como lo reporta Natoli *et al.* (2012), quienes realizaron un seguimiento exhaustivo del proceso de diferenciación utilizando anticuerpos específicos contra proteínas de la zonula occludens (ZO) de estas uniones (Lin *et al.*, 2008; Sonaje *et al.*, 2013), dado que la presencia de las TJ marca una adecuada diferenciación de estos cultivos. Bajo ésta perspectiva resulta interesante plantear un seguimiento cualitativo similar al mencionado como parte crucial de un protocolo de diferenciación para la línea celular Caco-2, donde se puede evidenciar la presencia de las uniones intercelulares estrechas antes de los 21 días estimados (Lin *et al.*, 2008; Natoli *et al.*, 2013; Sevin *et al.*, 2013; Sonaje *et al.*, 2012).

En cuanto a las MPQ formuladas, se puede apreciar que su tamaño promedio es menor a 10 μm , que corresponde al tamaño máximo esperado al momento de microencapsular con los parámetros utilizados con la técnica de secado por atomización, ya que se ha reportado que tamaños inferiores a 10 μm resultan ideales para este tipo de formulaciones ya que favorecen el transporte y absorción a células, tejidos y órganos especializados en producir una respuesta inmune (Amidi *et al.*, 2001), como es el caso de las células M en el sistema digestivo. Además, es posible observar que la cantidad de carga promedio, expresado como símbolo de potencial Z, de las MPQ sin funcionalizar es positivo ($33,66 \pm 0,69$), lo cual es consistente con el hecho de que Q es un polication. MPQS presentaron símbolo potencial Z negativo ($-14,62 \pm 0,62$), y las MPQT positivo ($27,09 \pm 0,42$). La variación en símbolo de potencial Z de las MPQS con respecto a MPQC podría estar relacionado al proceso de funcionalización del Q, ya que la conjugación y reemplazo del grupo químico funcional

ocurriría principalmente en el lugar de su grupo amino, responsable de brindarle un carácter catiónico al polímero; junto con la carga y naturaleza de los grupos sulfato. También es posible cuantificar la cantidad de grupos amino (-NH₂), sulfato (-SO₃) y tiol (-SH) en Q de partida y funcionalizados mediante espectroscopía NMR, lo cual podría aportar mayor información para esclarecer las interacciones de estas moléculas con la mucina.

Por otro lado para la realización de los ensayos de bioadhesión, junto con la preparación de los cultivos celulares diferenciados, resulta sumamente importante el marcaje de las MPQ con algún agente que permita la apreciación del fenómeno de adhesión, y más aún permita generar una cuantificación de éste para poder realizar estimaciones y comparaciones correspondientes. Es por esto que se utilizó FITC, molécula que se conjuga con el Q, produciendo una reacción de conjugación con el grupo amino de este polímero (Ge *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2009).

El marcaje con FITC fue realizado en base a los protocolos propuestos por Huang *et al.* (2004), quienes han reportado la obtención de MPQ-*f*. La diferencia principal entre el protocolo utilizado por Huang *et al.* (2004) y el utilizado en este trabajo radica en que en esta tesis el marcaje fue realizado posterior al proceso de microencapsulación, además de la utilización de un medio buffer (PBS) para la conjugación esperada; tras finalizado el proceso se tomaron fotografías bajo microscopía de fluorescencia con alícuotas de cada lote, una alícuota obtenida inmediatamente terminado el marcaje, y otra tras un proceso de sonicación de los lotes para evitar aglomeraciones en las MP, que se deben a la utilización del medio buffer ya mencionado (Fig. 4).

Como se muestra en las fotografías de la figura 4, se logró una adecuada conjugación entre ambos reactivos, obteniendo MP-*f* para cada tipo de Q: MPQC-*f*, MPQT-*f* y MPQS-*f*. Si bien en primeras instancias se apreció una pequeña diferencia en la intensidad de fluorescencia entre MPQC-*f* y MPQT-*f* (datos no mostrados), ésta se mejoró en procesos de marcaje posteriores.

Posterior al marcaje con FITC se realizó una caracterización de éstas partículas bajo los mismos parámetros previamente utilizados para verificar el efecto de este proceso sobre las MP. Los cambios se registraron a nivel del potencial Z de las MPQ-*f*, los cuales se pueden explicar principalmente por el tipo de reacción que se produce entre el Q y FITC, en la cual

el conjugado FITC-*g*-quitosano tendrá un carácter más aniónico respecto al quitosano indicando que la funcionalización de las moléculas de Q no se lleva a cabo en todos los grupo amino de la cadena del polímero (Ge *et al.*, 2009).

La presencia de grupos aminos íntegros en la estructura de Q permiten su marcaje con tinciones fluorescentes como el FITC. Sin embargo, no se puede afirmar que la reacción de conjugación con el fluoróforo sea total, es decir, que se produzca en todos los grupos amino disponibles, considerando que el protocolo utilizado en este estudio utiliza MP ya formuladas, por lo que en este caso el polisacárido no estaba totalmente expuesto físicamente. Finalmente, la variación producida por el FITC puede repercutir durante la etapa de contacto del mecanismo que gobierna el proceso de mucoadhesión, sin embargo no debiese afectar la etapa final de consolidación, por lo tanto no se espera una variación similar al comportamiento previsto para las MPQS, donde se espera una dinámica diferente tanto durante la etapa de contacto inicial así como en la etapa de consolidación, donde incluso se prevé la formación de enlaces mucoadhesivos de distinta composición con respecto a MPQ sin funcionalizar.

Este cambio durante la etapa de contacto inicial en el mecanismo de bioadhesión se debe principalmente al tipo de reacción que conduce a la producción de MPQ-*f*, ya que esta nueva molécula tendrá un carácter más aniónico en comparación al polímero por sí solo o funcionalizado.

Resulta interesante señalar el marcaje de MPQS con FITC, ya que se aprecia una mayor fluorescencia en estas MP en comparación el resto. Si bien no se puede establecer completamente el carácter de esta unión en particular, este fenómeno podría estar relacionado con la polaridad de ambos compuestos junto con el pH del medio en el cual ocurre este proceso, así el mayor rendimiento evidenciado puede atribuirse a una mayor reactividad de ambas moléculas durante la conjugación de éstas (Jian *et al.*, 2017; Palazzo *et al.*, 2017).

También es importante destacar, que posterior al proceso de marcaje con FITC y previo a los ensayos de bioadhesión en los cultivos celulares, se evidenció como el proceso de funcionalización mejora la solubilidad del Q (datos nos mostrados).

En cuanto al ensayo final de bioadhesión, se propone realizarlo en un medio cuyo pH sea igual o cercano a un valor neutro, similar al que se encontrarían las MPQ en su sitio blanco (sistema intestinal) al ser utilizadas en una vacuna mucosa. De esta forma se logra ejemplificar las importancias y beneficios del proceso de funcionalización donde no sólo se busca mejorar las capacidades bioadhesivas del polímero sino que también soslayar los inconvenientes que se han descrito para la variante sin funcionalizar, principalmente su poca eficiencia al actuar en medios donde ocurran cambios dramáticos de pH que provocan que las MP se aglomeren, afecten el estado protonado del polímero, e interfiera con el efecto potenciador de transporte que ejerce este polisacárido, condiciones a las cuales estarán expuestas al ser utilizadas en este tipo de vacunas las cuales repercuten finalmente en la dinámica del mecanismo de bioadhesión (Bravo-Osuna *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Men-Lund *et al.*, 2014; Palazzo *et al.*, 2017).

De los resultados obtenidos llama la atención que los mayores porcentajes de adhesión se hayan producido en la monocapa de los cultivos sin diferenciar, siendo que se esperaba que una mayor unión en los cultivos diferenciados. Ésta diferencia se puede atribuir a la distribución de proteínas y glicanos en la membrana celular tras el proceso de diferenciación, ya que al adquirir polaridad estos componentes se ordenan de tal manera pudiendo afectar su disponibilidad para establecer contacto con las micropartículas, al contrario de lo que ocurriría en un cultivo no diferenciado. Por otro lado, sería interesante plantear esta diferencia de adhesión como una herramienta de seguimiento al proceso de diferenciación, de forma análoga a los marcadores de las uniones intercelulares estrechas; sin embargo se debe tener presente que aún se desconoce el efecto del FITC en los mecanismos de adhesión y si existe una diferencia significativa entre los protocolos de marcaje encontrados en la bibliografía y el utilizado en esta tesis.

Finalmente cabe recalcar que los experimentos expuestos se realizaron en más de una ocasión en post de estandarizar los protocolos para realizar la comparación de la bioadhesión *in vitro* de las MPQ. No obstante el tamaño de las muestras utilizados no permitieron establecer diferencias estadísticamente significativas para la bioadhesión de cada tipo de MPQ, sin embargo, los resultados obtenidos junto con su interpretación permiten apreciar el comportamiento bioadhesivo de cada tipo MPC utilizadas, evidenciando que MPQC cuales un mejor rendimiento bioadhesivo en ambos tipos de matriz.

De esta manera se tiene un contexto claro que puede marcar una pauta al momento de repetir o generar nuevos estudios necesarios para determinar completamente estas diferencias. Además se deben tener presente otros factores, como la presencia y porcentaje de mucina y de glicocáliz en las células intestinales, los cuales cumplen un rol fundamental en la actividad de vacunas mucosas (Amidi *et al.*, 2010; Kesimer *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

- Es posible marcar MPQ funcionalizado con grupos sulfato (MPQS), tiol (MPQT) y las MPQ comercial sin funcionalizar con FITC.
- Se produce adhesión de los distintitos tipos MPQ-*f* en la línea celular tipo Caco-2 en cultivos con y sin diferenciar, donde se registró un mayor rendimiento en las monocapas sin diferenciar.
- No hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las propiedades bioadhesivas de las distintas MP, sin embargo debido a la relación directa entre la fluorescencia y la capacidad de adhesión de las MPQ se podría prever su eficiencia en futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- **AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E.** 2010. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 62(1):59-82.
- **ANON.** 2011. Conteo y evaluación de la viabilidad de células mononucleares. Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de San Luís de Potosí. San Luís de Potosí, México.
- **BEHRENS, I.; VILA PENA, A. I.; ALONSO, M. J.; KISSEL, T.** 2002. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: The effect of mucus on particle Adsorption and Transport. *Pharm. Res.* 19(8):1185-1193.
- **BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G.** 2007. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials.* 28(13):2233-2243.
- **BUCAREY, S. A.; NORIEGA, J.; REYES, P.; TAPIA, C.; SÁENZ, L.; ZÚÑIGA, A.; TOBAR, J. A.** 2009. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine.* 27(42):5781-5790.
- **BUCAREY, S A.; NEIRA-CARRILLO, A.; NEIRA, V.** 2017. Vaccine for treating and controlling infectious pathologies that use heparan sulphate (hs) as a cell receptor. International patent WO2017075730 (050058).
- **GAGNON, M.; ZIHLER BERNER, A.; CHERVET, N.; CHASSARD, C.; LACROIX, C.** 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *J. Microbiol. Methods.* 94(3):274-279.

- **GE, Y.; ZHANG, Y.; HE, S.; NIE, F.; TENG, G.; GU, N.** 2009. Fluorescence modified Chitosan-coated magnetic nanoparticles for High Efficient Cellular imaging. *Nanoscale Res. Lett.* 4(4):287-295.
- **HUANG, M.; MA, Z.; KHOR, E.; LIM, L. Y.** 2002. Uptake of FITC-Chitosan nanoparticles by A549 Cells. *Pharm. Res.* 19(10):1488-1494.
- **HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y.** 2004. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.* 21(2):344-353.
- **ISLAM, M. A.; FIRDOUS, J.; CHOI, Y. J.; YUN, C. H.; CHO, C. S.** 2012. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: An updated review. *Int. J. Nanomedicine.* 7:6077-6093.
- **JIA, X.; CHEN, X.; XU, Y.; HAN, X.; XU, Z.** 2009. Tracing transport of chitosan nanoparticles and molecules in Caco-2 cells by fluorescent labeling. *Carbohydr. Polym.* 78(2):323-329.
- **JIANG, W. H.; CAI, Y.; LI, H. L.** 2017. Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technol.* 312:124-132.
- **KESIMER, M.; EHRE, C.; BURNS, K. A.; DAVIS, W.; SHEEHAN, J. K.; PICKLES, R. J.** 2013. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol.* 6(2):379-392.
- **KIM, K.; KIM, K.; RYU, J.H.; LEE, H.** 2015. Chitosan-catechol: A polymer with long-lasting mucoadhesive properties. *Biomaterials.* 52:161-170.
- **LEHR, C.-M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E.** 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* 78(1):43-48.

- **LIN, Y. H.; SONAJE, K.; LIN, K. M.; JUANG, J. H.; MI, F. L.; YANG, H. W.; SUNG, H. W.** 2008. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J Control Release*. 132(2):141-149.
- **MAHMOOD, A.; LANTHALER, M.; LAFFLEUR, F.; HUCK, C. W.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A.** 2017. Thiolated chitosan micelles: Highly mucoadhesive drug carriers. *Carbohydr Polym*. 167:250-258.
- **MARTÍN-VILLENA, M. J.; MORALES HERNÁNDEZ, M. E.; GALLARDO LARA, V.; RUÍZ MARTÍNEZ, M.A.** 2009. Técnicas de Microencapsulación: Una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars. Pharmaceutica*. 50(1):43-50.
- **MASUDA, K.; KAJIKAWA, A.; IGIMI, S.** 2011. Establishment and Evaluation of an in vitro M Cell Model using C2BBel Cells and Raji Cells. *Biosci. Microflora*. 30(2):37-44.
- **MENG-LUND, E.; MUFF-WESTERGAARD, C.; SANDER, C.; MADELUNG, P.; JACOBSEN, J.** 2014. A mechanistic based approach for enhancing buccal mucoadhesion of chitosan. *Int. J. Pharm*. 461(1-2):280-285.
- **NATOLI, M.; LEONI, B. D.; D'AGNANO, I.; ZUCCO, F.; FELSANI, A.** 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. In Vitro*. 26(8):1243-1246.
- **PALAZZO, C.; TRAPANI, G.; PONCHEL, G.; TRAPANI, A.; VAUTHIER, C.** 2017. Mucoadhesive properties of low molecular weight chitosan- or glycol chitosan- and corresponding thiomers-coated poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 117:315-323.
- **SEVIN, E.; DEHOUCK, L.; FABULAS-DA COSTA, A.; CECHELLI, R.; DEHOUCK, M. P.; LUNDQUIST, S.; CULOT, M.** 2013. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 68(3):334-339.
- **SMART, J. D.** 2005. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 57(11):1556-1568.

