



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Influencia de proteínas del plasma humano sobre partículas biomiméticas de sílice nanoporosa y lípidos bioactivos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta

América Eileen Mendoza Rojas

Dirigido por:

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández

Co-Director:

Dra. Luz María López Marín

Querétaro, Qro. a 29 de Noviembre 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Influencia de proteínas del plasma humano sobre partículas biomiméticas de sílice nanoporosa y lípidos bioactivos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta
América Eileen Mendoza Rojas

Dirigido por:
Director interno: Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández

Co-dirigido por:
Director externo: Dra. Luz María López Marín

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández
Presidente

Dra. Luz María López Marín
Secretario

Dr. Rufino Nava Mendoza
Vocal

Dra. Daniela Edith Salado Leza
Suplente

Dr. Héctor Paul Reyes Pool
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre 2019
México

Dedicatoria

*A mi bebé, te amo desde el mismo instante que
supe que venías en camino.*

Agradecimientos

A mis padres, por todo el apoyo que me brindaron para poder culminar esta etapa de mi vida profesional.

A mis hermanas, *Katya* y *Karla*, que siempre me han apoyado en el camino.

A mi esposo, *Juan Manuel*, por el apoyo que me brindó para ingresar a la maestría a pesar de la distancia, por la confianza y el aliento que me brindó para terminar este proyecto.

A mis amigos, *Linda*, *Cape*, y *Óscar*, por escucharme siempre y darme aliento para continuar.

Agradezco el apoyo económico al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca para la realización de la maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), por permitirme forjarme profesionalmente en sus aulas, especialmente a la Facultad de Ingeniería (FI), y a la División de Investigación de Posgrado de la Facultad de Ingeniería (DIPFI), así como al cuerpo académico de la Maestría en Ciencias línea terminal en Nanotecnología.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), especialmente al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) y a su director el Dr.

Eric Rivera, que me abrieron sus puertas para desarrollar parte de este proyecto, y por el apoyo financiero a la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM, Proyecto PAPIIT IT203518.

A los Dres., *Ángeles Cuán, Luz Marín y Rufino Nava*, por los conocimientos brindados dentro y fuera de las aulas de clase y los laboratorios, por la atención brindada al desarrollo y revisión de este proyecto.

A los Dres. *Daniela Salado y Héctor Reyes*, por el tiempo, las aportaciones, y por la revisión de este trabajo.

Al Dr. *Carlos Cortés*, por las aportaciones y el tiempo que brindó al desarrollo de este trabajo.

A los profesores de la maestría, por todo el valioso conocimiento brindado dentro y fuera de las aulas de clase.

A mis compañeros de la maestría, *Ireri, Lalo, Victoria, Ale, Margarita, Ana y Fer*, por compartir las aulas conmigo y por los momentos fuera de clase.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a *Carlos, Alex, María, Ravi Mariana y Ana*, por el apoyo y los conocimientos que me brindaron en el área.

Al Dr. *Edgar Jiménez* de CFATA, y la Dra. *Luz María Avilés* del CINVESTAV, Querétaro, por el apoyo en los análisis de potencial Z.

A las Dras. *Carmen Peza y Beatriz Milán*, por su apoyo en el análisis de difracción de Rayos X, del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM.

A la M. en C. *Lourdes Palma* por su apoyo en microscopía electrónica de transmisión en el Instituto de Neurobiología, UNAM.

A la M. en C. *Alicia del Real*, por los análisis de microscopía electrónica de barrido y espectrometría.

Al Dr. *José Santos* y el M.C. *Bruno Flores*, por apoyarme con los análisis Raman, los cuales se realizaron en el Laboratorio de Materiales Avanzados de la Facultad de Química, UAQ.

A todas las personas que intervinieron en el desarrollo de este trabajo.

Gracias...

Contenido

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
CONTENIDO	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS Y SIGLAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES	
2.1 NANOTECNOLOGÍA	5
2.2 NANOMEDICINA	6
2.3 SBA-15	7
2.3.1 EMPLEO DE LA SBA-15 EN LA ACTUALIDAD.....	8

2.4 VACUNAS	16
2.4.1 PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS (PAMPS).....	16
2.5 LIPOSOMAS	18
2.6 PARTÍCULAS EN EL ORGANISMO	20
2.6.1 BIOMIMETISMO	20
CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS	22
CAPÍTULO 4 OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
CAPÍTULO 5 MATERIAL Y METODOLOGÍA	
5.1 SÍNTESIS DE LA SÍLICE NANOPOROSA SBA-15	24
5.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LA SBA-15	25
5.3 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS	25
5.4 PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS	26
5.5 INCUBACIÓN DE PARTÍCULAS EN PLASMA HUMANO	26
5.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	27
5.6.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	27
5.6.2 TERMOGRAVIMETRÍA	28
5.6.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (SEM-HR-EDS)	28

5.6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	28
5.6.5 ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	29
5.6.6 ESPECTROSCOPIA MICRO RAMAN.....	29
5.6.7 POTENCIAL Z	30
5.7.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)	30
5.7.9 ENSAYOS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA).....	32
CAPÍTULO 6 RESULTADOS	
6.1 ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	34
6.2 ANÁLISIS DE TERMOGRAVIMETRÍA	35
6.3 MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE BARRIDO Y MAPEO POR ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X	37
6.4 MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE TRANSMISIÓN	39
6.5 ESPECTRO DE INFRARROJO	41
6.6 ESPECTROS RAMAN	45
6.7 POTENCIAL Z.	48
6.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	50
6.9 ENSAYOS DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA)	51
6.10 TRABAJOS FUTUROS	52
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES	54

BIBLIOGRAFÍA58

ANEXOS

ANEXO I UNA APRECIACIÓN SIMPLE DE LA INMUNOLOGÍA65

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de Tablas

TABLA 1. PROPIEDADES MORFOLÓGICAS DE LA SBA-15.....	7
TABLA 2. EMPLEO DE LA SBA-15 EN LA ACTUALIDAD	9
TABLA 3. PROTOTIPOS DE VACUNAS DESARROLLADAS EN LA ACTUALIDAD	12
TABLA 4. DILUCIONES DE BSA	30
TABLA 5. DATOS DEL ESPECTRO IR DE LA SBA-15 PURA	42
TABLA 6. DATOS DEL ESPECTRO IR DE LA SBA-15 AMINADA	42
TABLA 7. DATOS DE LOS ESPECTROS IR DE LAS CONSTRUCCIONES SUPRAMOLECULARES DE PC Y PC-PIMS.....	44
TABLA 8. DATOS DE LOS ESPECTROS IR DE LAS CONSTRUCCIONES SUPRAMOLECULARES DE PC Y PC-PIMS CON PLASMA TABLA 9. DATOS DEL ESPECTRO IR DE LA SUPRAMOLECULAR PC CON PLASMA.....	45
TABLA 9. DATOS DEL ESPECTRO RAMAN DE LA SBA-15 CORTA PURA	46
TABLA 10. DATOS DEL ESPECTRO RAMAN DE LA SBA-15 AMINADA	47

Índice de Figuras

FIGURA 1. NANOTECNOLOGÍA EN LA ACTUALIDAD	6
FIGURA 2. MECANISMO DE LA SÍNTESIS DE LA SBA-15	8
FIGURA 3. ESQUEMA DE LA UBICACIÓN DE LOS PRRS EN LA MEMBRANA CELULAR	17
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA RESPUESTA INMUNE EMPLEANDO PAMPS.....	18
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA FORMACIÓN DEL LIPOSOMA	19
FIGURA 6. TIPOS Y TAMAÑOS DE LIPOSOMAS.....	19
FIGURA 7. ESQUEMA DE LA FORMACIÓN DE LA BIO-CORONA	20
FIGURA 8. DIAGRAMA DE LA SÍNTESIS DE LA SBA-15	24
FIGURA 9. ESQUEMA DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE LA SBA-15 CON EL GRUPO AMINO.....	25
FIGURA 10. ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS.	26
FIGURA 11. ARREGLO DE DILUCIONES EN MICROPLACA	31
FIGURA 12. ESQUEMA DEL ELISA DESARROLLADO.....	33
FIGURA 13. PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LA SBA-15 CORTA AMINADA.....	35
FIGURA 14. TGA DE LA SBA-15 CORTA	36
FIGURA 15. TGA DE LA SBA-15 CORTA AMINADA	37
FIGURA 16. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE BARRIDO DE LA SBA-15	38
FIGURA 17. MAPEO POR ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X DE LA SBA-15 AMINADA	39

FIGURA 18. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE TRANSMISIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN SUPRAMOLECULAR CON LIPOSOMAS DE PC A) ANTES DE INCUBARSE EN PLASMA, B) DESPUÉS DE INCUBARSE EN PLASMA	40
FIGURA 19. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE TRANSMISIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN SUPRAMOLECULAR CON LIPOSOMAS DE PC-PIMS A) ANTES DE INCUBARSE EN PLASMA, B) DESPUÉS DE INCUBARSE EN PLASMA	40
FIGURA 20. ESPECTRO IR DE LA SBA-15 PURA Y AMINADA	42
FIGURA 21. ESPECTROS INFRARROJOS DE LAS CONSTRUCCIONES SUPRAMOLECULARES DE PC Y PC-PIMS.....	43
FIGURA 22. ESPECTROS INFRARROJOS DE LAS CONSTRUCCIONES SUPRAMOLECULARES DE PC Y PC-PIMS CON PLASMA.	45
FIGURA 23. ESPECTRO RAMAN DE LA SBA-15 CORTA PURA	46
FIGURA 24. ESPECTRO RAMAN DE LA SBA-15 CORTA AMINADA	47
FIGURA 25. POTENCIAL Z DE LA SBA-15 AMINADA	48
FIGURA 26. POTENCIAL Z DE LA SBA-15 FUNCIONALIZADA Y RECUBIERTA CON LIPOSOMAS DE PC.....	49
FIGURA 27. POTENCIAL Z DE LA SBA-15 FUNCIONALIZADA Y RECUBIERTA CON LIPOSOMAS DE PC-PIMS.....	49
FIGURA 28. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA.....	50
FIGURA 29. DENSIDADES ÓPTICAS A 415 NM DE LAS CONSTRUCCIONES SUPRAMOLECULARES EN EL PRIMER ELISA	51
FIGURA 30. DENSIDADES ÓPTICAS A 415 NM DE LAS CONSTRUCCIONES SUPRAMOLECULARES EN EL SEGUNDO ELISA	52

Abreviaturas y siglas

APTES	Aminopropil trietoxisilano
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
IR	Infrarrojo
LUV	Large Unilamellar Vesicle
MLV	Multilamellar Vesicle
PC	Phosphatidylcholine
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PIMs	Phosphatidylinositol Mannosides
SBA-15	Santa Bárbara Amorfo No.15
SEM	Scanning Electron Microscopy
SUV	Small Unilamellar Vesicle
TEM	Transmission Electron Microscopy
TEOS	Tetraetil ortosilicato
TGA	Termogravimetría
XRD	X-Ray Diffraction

Resumen

En este trabajo se desarrolló una construcción supramolecular con el fin de mimetizar una superficie celular bacteriana de *M. tuberculosis* utilizando una base inorgánica como acarreador, conocida como sílice nanoporosa SBA-15 (Santa Bárbara Amorfo No.15), un potencial vehículo de vacunación, específicamente contra la tuberculosis (TB). Se realizó una modificación en la talla de la base inorgánica SBA-15 haciéndola más corta (300x500 nm) que en el caso de la síntesis tradicional el tamaño promedio alcanzado es de 300x800 nm. La SBA-15 se caracterizó mediante la técnica SEM, con lo que se comprobó que la modificación de la síntesis no alteró la estructura típica de la SBA-15. Posteriormente la SBA-15 se funcionalizó con grupos amino 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), esto con la finalidad de modificar la superficie de la SBA-15 y crear sitios activos para la adherencia de liposomas preparados a partir de lípidos bioactivos. La adherencia de los liposomas se logró con éxito, generando así la biomimetización de la partícula de SBA-15 al antígeno de *M. tuberculosis*. Esto se corroboró mediante análisis de EDS, TGA, FTIR, Raman y potencial Z. Para la construcción supramolecular de la SBA-15 funcionalizada los ensambles se realizaron por etapas, esto es, la SBA-15 funcionalizada fue recubierta con liposomas de fosfatidilcolina (PC) obtenida a partir de yema de huevo (construcción supramolecular tomada como control). La segunda construcción supramolecular fue realizada con liposomas de fosfatidilcolina en combinación con manósidos de fosfatidilinositol (PC-PIMs), en donde los manósidos de fosfatidilinositol (PIMs) fueron extraídos de la micobacteria. Estos recubrimientos con liposomas pudieron comprobarse mediante TEM, FTIR y potencial Z. Una vez listas las construcciones supramoleculares se incubaron en plasma humano durante 24 horas y se comprobaron cambios en las propiedades fisicoquímicas mediante diversas técnicas de caracterización. Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) detectaron la presencia de anticuerpos en la bio-corona formada en las construcciones supramoleculares.

Palabras clave: Vacuna, SBA-15, liposomas, *M. tuberculosis*, plasma humano.

Abstract

In this project, a supramolecular construction was developed with the aim of mimicking a bacterial cell surface of *M. tuberculosis* using an inorganic base as a vehicle, i.e. SBA-15 nanoporous silica (Santa Barbara Amorphous-15), a potential vaccination vehicle, specifically against tuberculosis (TB). A modification was made in the size of the inorganic base SBA-15 making it shorter (300x500 nm) than in the case of traditional synthesis the average size reached is 300x800 nm. The SBA-15 was characterized by the SEM technique, which showed that the modification of the synthesis did not alter the typical structure of the SBA-15. Subsequently, the SBA-15 was functionalized with amino groups 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES), this in order to modify the surface of the SBA-15 and create active sites for adhesion of liposomes prepared from bioactive lipids. Adhesion of the liposomes was successfully achieved, thus generating the biomimetization of the SBA-15 particle to the *M. tuberculosis* antigen. This was corroborated by the analysis of the potential EDS, TGA, FTIR, Raman and Z. For supramolecular construction of the functionalized SBA-15, assemblies were performed in stages, first the functionalized SBA-15 was covered with phosphatidylcholine (PC) liposomes, which was obtained from the egg yolk (this supramolecular construction was taken as a reference). The second supramolecular construction was performed with phosphatidylcholine liposomes in combination with phosphatidylinositol mannosides (PC-PIMs), where phosphatidylinositol mannosides (PIMs) were extracted from mycobacteria TB. The final construction was checked by TEM, FTIR and Z potential. Once the supramolecular constructions were ready, they were incubated in human plasma for 24 hours and changes in physicochemical properties were checked using various characterization techniques. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detected the presence of antibodies in the bio-corona formed by the supramolecular constructions.

Key words: Vaccine, SBA-15, liposomes, *M. tuberculosis*, human plasma.

Capítulo 1

Introducción

La medicina es una ciencia en constante desarrollo en donde continuamente se demandan mejores tratamientos, que sean más específicos y eficientes en la cura de enfermedades, por lo que se han desarrollado nuevas herramientas y procesos que permiten controlar, modificar, preparar, observar y manipular estructuras biológicas a una escala comparable al tamaño de una célula, la escala nanométrica.

Una rama dentro de la medicina es la Nanomedicina, la cual se define como la aplicación de la nanotecnología para la preservación y mejora de la salud, que utiliza estructuras moleculares de tamaño nanométrico, y éstas pueden o no ser revestidas con moléculas orgánicas de diferente índole, de manera que se puedan asemejar algún componente de nuestro organismo, también conocidas como partículas biomiméticas, por lo cual pueden interactuar como si fueran parte de un organismo vivo, pudiendo dirigirse a tejidos o células específicas. Estas partículas pueden llevar algún cargo específico, lo cual permite tratar diversas patologías, manipulando células o moléculas dentro del cuerpo (Andrés D., 2015 y Freitas R. Jr., 1999). Aprovechando las bondades en tamaño que ofrece el nivel nanométrico y de los conocimientos que se han alcanzado para la manipulación molecular de diferentes sistemas, el uso de la nanotecnología en el desarrollo de vacunas es cada vez mayor, ya que éstas se pueden fabricar con propiedades específicas. Esto es, se puede variar su composición, tamaño, forma y propiedades superficiales, permitiendo así, el desarrollo de nanovacunas. Una de las ventajas que presentan

este tipo de vehículos es que producen una respuesta inmune efectiva, debido a la orientación mejorada y la activación de respuestas inmunológicas. Se sabe que debe garantizar la estimulación de los efectos óptimos hacia un antígeno y que es necesaria una entrega sostenida o repetitiva a las células inmunes para activar una respuesta inmune en el organismo. Por lo que es necesaria la producción de un vehículo de vacunación, que facilite la entrega de antígenos y que al mismo tiempo actúe como potenciador inmunológico en las células del sistema inmune (Demento et al., 2009). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de estos vehículos influyen en la interacción con las proteínas plasmáticas y las células inmunológicas.

Por lo tanto, en esta investigación se propone evaluar la interacción de las proteínas del plasma humano con una partícula diseñada para la administración de una vacuna de subunidad contra la tuberculosis, basada en la partícula de sílice nanoporosa SBA-15 (Santa Bárbara Amorfo No.15) y recubierta con liposomas de lípidos bioactivos de *M. tuberculosis* para biomimetizarla. Estos lípidos son estructuras reconocidas por macrófagos, células del sistema inmune, considerados uno de los blancos principales de vacunación, por lo que promoverían una respuesta del sistema inmune al desplegarse en la superficie de la partícula.

1.1 Planteamiento del problema

Actualmente las investigaciones se enfocan en las vacunas de subunidad. Este tipo de vacuna es más segura, pura y fácil de producir que las vacunas clásicas. Sin embargo, dependen de adyuvantes que asisten para promover una respuesta inmune robusta (Peek et al., 2008).

En el desarrollo de vacunas subunitarias ha sido un reto la entrega en partículas y la capacidad de las partículas para activar la respuesta inmune, lo cual depende de la interacción entre la partícula y las células dedicadas a iniciar esta respuesta, es decir, de las células presentadoras de antígeno. Uno de los principales tipos celulares presentadores de antígeno son los macrófagos, que

podrían degradar rápidamente la construcción sin desencadenarse los mecanismos necesarios para una respuesta inmune eficiente. Se han descrito una serie de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), capaces de activar señales intracelulares del macrófago y de desencadenar procesos para el desarrollo de una respuesta inmune. Una alternativa para la activación de macrófagos es el uso de patrones moleculares compartidos por microorganismos patógenos (Mogensen, 2009). Algunos reportes han hecho uso de lipopolisacáridos para este efecto adyuvante en vacunas basadas en la Nanotecnología (Demento et al., 2009).

El diseño de vacunas con PAMPs específicos de un determinado patógeno, y más particularmente del bacilo tuberculoso, se ha estudiado poco. Por lo tanto, el diseño de una vacuna subunitaria basada en una partícula nanoporosa sintética debe considerar la integración de elementos capaces de activar los macrófagos.

1.2 Justificación

Dentro del cuerpo humano, cualquier antígeno, como una bacteria o una partícula serán reconocidos como algo extraño por el sistema inmune, y en unos cuantos segundos serán destruidos por células del sistema inmune (Sompayrac, 2012; Puentes y Saldaña, 2015). Debido a esto se recurre al llamado biomimetismo, al ser recubierta una partícula le permitirá desplazarse por el organismo inadvertidamente (López et al., 2013). Lo cual representa una oportunidad de aplicación de la nanotecnología, debido a que emplea estructuras moleculares de tamaño nanométrico, comparable con componentes celulares. Además, el mimetismo a partir de la integración de lípidos bioactivos provenientes de bacterias puede generar partículas capaces de ser fagocitadas de una manera más eficiente por los macrófagos, y llegar a los nodos linfáticos, donde habitan las células T y B del sistema inmunológico, es decir al sitio blanco de una vacuna. Aunado a esto, se ha descubierto que los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), del

inglés pathogen-associated molecular patterns) logran activar una respuesta inmune y se pueden emplear para generar nuevas vacunas.

En este sentido, se podría desarrollar una partícula biomimética capaz de activar al sistema inmune, y al mismo tiempo encapsular biomoléculas que funcionen como nanovacunas, eliminando todo riesgo de infección.

La sílice nanoporosa ha sido ampliamente utilizada para el acarreo de fármacos Wan et al. (2016), Van Speybroeck et al. (2009), Halamova et al. (2010), Song et al. (2005), e Izquierdo et al. (2009), han empleado el SBA-15 como transportador y sistema de liberación controlada de fármacos debido a propiedades estructurales y rendimiento, así como, para el desarrollo de nanovacunas debido a su biocompatibilidad, bajo costo, facilidad de síntesis y características estructurales.

Basado en estas aplicaciones en este trabajo se propone utilizar la SBA-15 pero ahora con fines específicos para un vehículo de vacunación contra la tuberculosis. La motivación se basa en que la tuberculosis (TB) ocasiona muchas muertes a escala mundial y que la vacuna actual, bacilo de Calmette-Guérin (BCG) tiene una baja eficiencia (Pai et al., 2016).

Capítulo 2

Antecedentes

En este capítulo se presentan los temas a tratar en este trabajo, así como algunos conceptos y una breve revisión bibliográfica de diversos trabajos relacionados con el presente trabajo.

2.1 Nanotecnología

La nanotecnología se define como el desarrollo de la ciencia y la tecnología a niveles atómicos y moleculares en la escala de 1-100 nm, y se emplea para crear estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades y funciones. La manipulación de la materia a esta escala de reducidas dimensiones provee cambios radicales en las propiedades físicas y químicas de la materia, promovidas porque a esta escala se presentan fenómenos relacionados con la cuantización de la energía y los estados electrónicos.

La nanotecnología está cada vez más presente en la vida diaria, productos y procesos utilizan la nanotecnología debido a su potencial para resolver problemas, como la obtención de recursos energéticos, descontaminación de aguas y alimentos. Es una ciencia emergente multidisciplinaria, en ella participan físicos, ingenieros, químicos, biólogos, médicos, etc., por lo tanto, lo podemos encontrar en diversas áreas (ver Figura 1), como la industria textil, en la construcción, elaboración de cosméticos, la electrónica, la energía, y particularmente en la medicina, donde se han presentado grandes avances en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

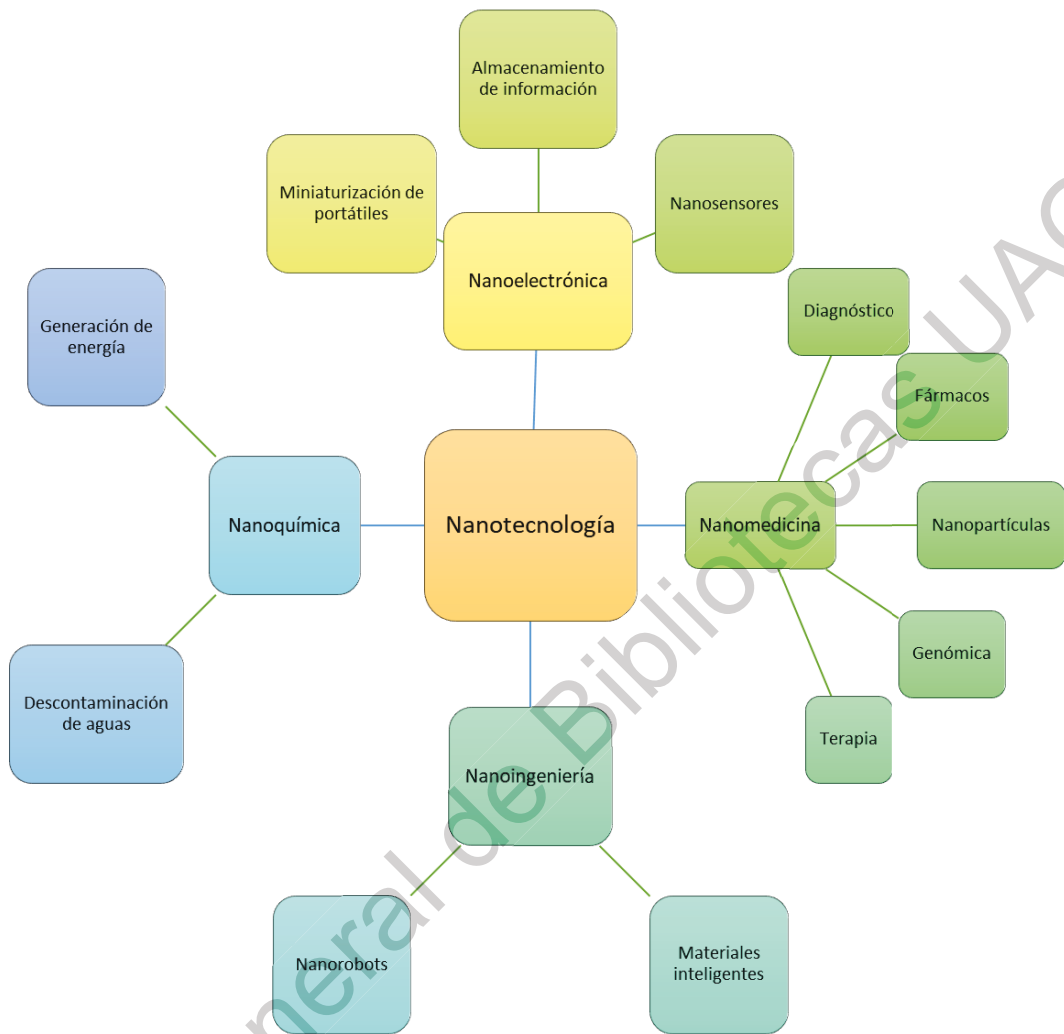


Figura 1. Nanotecnología en la actualidad.

2.2 Nanomedicina

Una rama dentro de la medicina es la nanomedicina, la cual se define como la aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud, con el objetivo de preservar y mejorar la salud. Durante la última época, la nanotecnología ha sido parte de los avances en este campo, debido a la efectividad de la pequeña escala, esto da lugar a nuevos sistemas de prevención, diagnóstico y tratamientos terapéuticos de mayor eficacia que los existentes, y para ello utiliza sistemas capaces de interactuar a escala celular. Tal es el uso de las partículas como óxidos

metálicos (SiO_2 , TiO_2), nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, platino, plata, etc., ya que pueden imitar y modificar procesos biológicos que pueden brindar soluciones a las diversas patologías, además de funcionar como vehículos y soporte, también estas partículas pueden ser manipuladas física y químicamente, por ejemplo, la Santa Bárbara Amorfo No.15 (SBA-15), objeto de este trabajo, que se expondrá a continuación.

2.3 SBA-15

La sílice nanoporosa Santa Bárbara Amorfo No.15, mejor conocida como SBA-15, es una de las partículas de mayor interés en el área de nanomedicina gracias a sus innumerables ventajas, como su gran capacidad de almacenamiento debido a su estructura, alta área superficial, biocompatibilidad, estabilidad térmica, facilidad de síntesis y bajo costo de producción. Otra de sus grandes ventajas es modificar sus propiedades superficiales, como el tamaño de poro (4.6 a 30 nm), el espesor de pared (3.1 a 6.4 nm), y debido a todas estas propiedades es que se ha empleado como sistema de acarreo y liberación controlada de fármacos; así como, para el desarrollo de nanovacunas. En la Tabla 1 se listan algunas de las propiedades morfológicas importantes de la típica SBA-15.

Tabla 1. Propiedades morfológicas de la SBA-15

Propiedad	Característica
Estructura	Hexagonal
Área superficial	800-940 g/m^2
Tipo de poro	Canales
Diámetro de poro	4.6-30 nm
Volumen de poro	1 cm^3/g
Espesor de pared de poro	3.1-6.4 nm

La sílice nanoporosa es un material cerámico y se sintetiza mediante el método sol-gel, utilizando como surfactante el ácido pluronic P123, el cual es un copolímero de tres bloques y consta de dos partes dentro de la misma molécula, un grupo de cabeza hidrofílico y una larga cola hidrofóbica, las cuales se agregan y

organizan de manera que evitan el contacto con sus extremos incompatibles, por lo que actúa como agente director del crecimiento de la estructura de la sílice; y con la adición del agente precursor inorgánico de la sílice, el tetraetil ortosilicato (TEOS), las especies inorgánicas interaccionan con los grupos de cabeza hidrofílica del surfactante, generando así la estructura hexagonal inorgánico-surfactante.

En la etapa de madurado la estructura se consolida y finalmente se elimina el exceso de surfactante por calcinación para obtener una estructura hexagonal de poros uniformes de tipo panel, como muestra el esquema de la Figura 2.

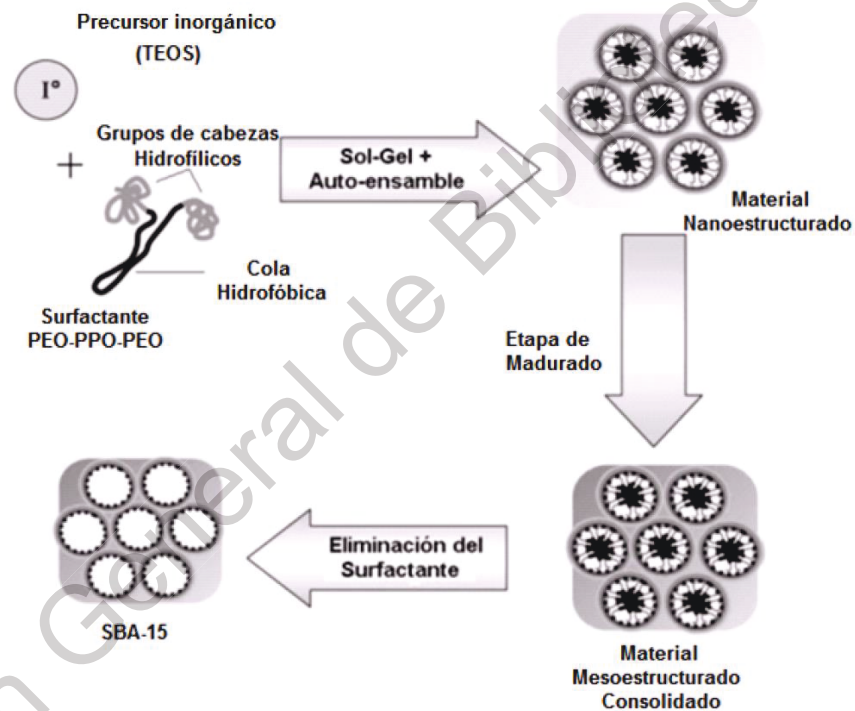


Figura 2. Mecanismo de la síntesis de la SBA-15. Fuente: Flodström y Alfredsson, (2003).

2.3.1 Empleo de la SBA-15 en la actualidad

La SBA-15 se ha consolidado como uno de los materiales más versátiles en la nanotecnología, debido a sus propiedades que pueden explotarse en las distintas áreas, como se mencionó anteriormente en este capítulo. Actualmente una de las áreas de mayor avance científico es la nanomedicina. A continuación, en la Tabla 2

se mencionan diversos trabajos en lo que se ha empleado la SBA-15 dentro de esta rama.

Tabla 2. Empleo de la SBA-15 en la actualidad

	Autor (es)	Descripción
Administración de fármacos	Song et al. (2005)	En este trabajo la SBA-15 fue funcionalizada post-síntesis con grupos amino, posteriormente fue analizada como matriz para la administración controlada de fármacos (ibuprofeno y albúmina de suero bovino) antes y después de la funcionalización. Se observó la capacidad de adsorción y la liberación, ambas dependientes de las diferentes propiedades superficiales de la SBA-15. Respecto al ibuprofeno se determinó una liberación controlada en la SBA-15 funcionalizada en comparación con la SBA-15 pura, esto debido a la interacción iónica de los grupos carboxilo del ibuprofeno y el grupo amino en la superficie de la SBA-15. Por otro lado, respecto a la albúmina de suero bovino se observó una adsorción y liberación más favorable debido al equilibrio de interacción electrostática e hidrofílica entre la albúmina y la SBA-15 funcionalizada.
	Szewczyk y Prokopowicz (2018)	Se investigó la SBA-15 modificada con amino (SBA-NH ₂) como un posible sistema de administración de fármacos bifuncional para la cefazolina con propiedades de liberación prolongada y mineralización. La SBA-15 pura se sintetizó usando el método sol-gel y la funcionalización de la superficie se llevó a cabo post-síntesis. La SBA-NH ₂ obtenida se caracterizó por una mayor eficiencia de adsorción de cefazolina con liberación de fármaco prolongada a 7 días en comparación con el SBA-15 pura. La SBA-15 modificada con amino también mostró potencial de mineralización después de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF), con la formación retardada de hidroxicarbonato de apatita en comparación con la SBA-15 que no liberó la cefazolina de manera controlada. También se mostró la formación de una capa de apatita en la superficie de la SBA-NH ₂ que imita los minerales óseos después de 28 días en SBF.
Inmovilización de enzimas	Li et al. (2009)	Prepararon una enzima inmovilizada mediante la incorporación de lipasa de páncreas porcino (PPL, 4,6 nm × 2,6 nm × 1,1 nm) en los canales de SBA-15 similar. Se estudiaron las adsorciones físicas de PPL en el material SBA-15 con diferentes valores de pH (pH 5–10) y tiempos (0–36 h). Se determinó que se puede obtener una alta carga de lipasa (926 mg de enzima por gramo de sílice), pero no concuerda con la alta actividad catalítica. Las máximas adsorciones se observaron a pH 6,0 y 3 h. El pH óptimo de la hidrólisis de triacetina para la PPL inmovilizada y libre fue de 7,0. La PPL inmovilizada mostró una adaptabilidad mucho mejor de la hidrólisis de triacetina en comparación con la PPL libre durante un pH de 6.0-9.0. Mientras tanto, la estabilidad térmica del catalizador y su reutilización se probaron realizando ciclos de reacción posteriores de hidrólisis de triacetina. La actividad de la PPL inmovilizada se redujo rápidamente al 40% de su actividad original después de cinco reacciones discontinuas sucesivas, porque la PPL débilmente adsorbida se lixivió de los canales.
	Humphrey et al. (2001)	Prepararon la SBA-15 con tamaños de poro en el rango de 51-56 Å utilizando copolímeros de bloque no iónicos y utilizados para la inmovilización de la enzima tripsina. Los grupos funcionales tiol, cloruro, amina y ácido carboxílico se adjuntaron mediante siloxipropano a la superficie de la SBA-15 mediante dos métodos, post-síntesis e in situ. Los grupos fenilsiloxano también se incorporaron utilizando estos dos métodos. Los sólidos resultantes se volvieron porosos y se usaron para inmovilizar la tripsina, dando una retención variable de las moléculas de enzima pero en general mayor que en la SBA-15 no funcionalizada. Se demostró que los resultantes catalizadores enzimáticos soportados son catalizadores activos y estables para la hidrólisis de N- α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida (BAPNA). Los sólidos preparados al soportar la enzima en SBA-15 funcionalizada con tiol preparado por síntesis in situ fueron los más prometedores. Y se demostró que la tripsina soportada en SBA-15 funcionalizada con tiol es reciclable.

Vacunas	Rasmussen et al. (2019)	<p>En este trabajo se presentó el caso particular de la hepatitis B, la formulación oral en la SBA-15 en un enfoque viable, ya que es capaz de proteger y liberar el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), utilizado en el esquema de vacunación. Además, en comparación con el método de administración basado en inyección utilizado actualmente, se ha observado una respuesta de anticuerpos mejor o similar. Sin embargo, la información sobre la organización de la proteína antigénica sigue siendo desconocida. Por ejemplo, HBsAg es demasiado grande para entrar en los poros ordenados de 10 nm de la SBA-15 y tiene tendencia a aglomerarse cuando está protegido por el sistema de administración. Aquí informan sobre la dependencia del pH de la agregación de HBsAg en solución salina usando dispersión de rayos X de ángulo pequeño que resultó en una optimización de las condiciones de encapsulación. Además, la microscopía de rayos X combinada con tomografía de neutrones y rayos X proporcionó información 3D completa de la agrupación de HBsAg (es decir, aglomeración) dentro de los macroporos SBA-15. Este método permite la visualización de la organización del antígeno en el interior del sistema de administración, donde el HBsAg aglomerado coexiste con su contraparte, inmunológicamente eficaz y distribuida uniformemente. Este nuevo enfoque, que debe tenerse en cuenta al preparar la formulación, puede ser de gran ayuda para comprender los estudios clínicos y avanzar en nuevas formulaciones.</p>
	Alves et al. (2013)	<p>Las vesículas de membrana externa (OMV) son nanopartículas liberadas en medio de cultivo durante el crecimiento meningocócico resultante de los pliegues en una membrana celular externa (evaginaciones) y se han indicado como objetivo potencial para la producción de vacunas. Este estudio tuvo como objetivo analizar el uso de <i>Neisseria meningitidis</i> B2443, como vacuna que utiliza un proceso de fermentación semisólido basado en ultrafiltración para el aislamiento de estos OMV y también verificar el efecto de las sílices (SBA-15 y SBA-16). La preparación de OMV sigue el método sin la ultracentrifugación que se sustituyó por el método de ultrafiltración usando un filtro de nitrocelulosis que muestra un poro de 0.025 µm. Para la detección de la producción de anticuerpos se utilizó el método inmunológico de ELISA y el efecto bactericida en suero utilizando sueros de ratones inmunizados con OMV y nanopartículas inorgánicas adyuvantes. Además, el uso de la prueba de citotoxicidad se realizó en función de la captación roja neutra para la seguridad del uso de la vacuna asociada en la línea celular NIH-3T3. Se comparó con la producción de OMV de cepas de <i>N. meningitidis</i> cepas B2443 y C2135. Los resultados mostraron que diferentes cepas de <i>N. meningitidis</i> tienen una cinética de producción de OMV de diferente tiempo y cantidad. El uso de la SBA-15 y SBA-16 como adyuvante a 250 µg para cada ratón fue suficiente para inducir un aumento de la capacidad de la vacuna (para otros serogrupos) usando un solo OMV extraído de las cepas B2443. El estudio mostró que la metodología utilizada para la producción de OMV es ventajosa desde el punto de vista de la cantidad, el costo y el uso de esta nanopartícula biológica. Tanto la sílice SBA-15 como la SBA-16 utilizadas en este trabajo fueron capaces de aumentar el reconocimiento del anticuerpo contra diferentes cepas que <i>N. meningitidis</i> mostró usando el OMV extraído de una única cepa vacunal.</p>

2.4 Vacunas

La vacunación es una parte importante de la salud pública, ya que gracias a las vacunas se ha logrado erradicar, prevenir y controlar enfermedades contagiosas y mortales.

Las vacunas son productos biológicos compuestos por microorganismos destinados a generar una respuesta inmune, cuando el cuerpo detecta los

microorganismos invasores (antígenos) estimula la producción de anticuerpos que actuarán como defensas cuando entren en contacto con el microorganismo que produce la enfermedad para así evitar la infección y la propagación. Y si en alguna otra ocasión el cuerpo se encuentra expuesto al antígeno el cuerpo lo combatirá y será inmune a la enfermedad.

Existen tres tipos de vacuna: la viva o atenuada, muerta o inactiva, y de subunidad. La vacuna viva o atenuada consiste en debilitar al patógeno pasándolo a través de una serie de cultivos celulares o embriones animales, el patógeno crece en serie, y con cada pasada mejora su replicación en los cultivos o los embriones, por lo que va perdiendo la capacidad de reproducirse en células humanas, hasta que pueda usarse en una vacuna, porque entonces ya no podrá replicarse lo suficiente como para provocar la enfermedad, sin embargo, aún podrá ser reconocido por el sistema inmune y provocar la respuesta para que pueda proteger en contactos posteriores al patógeno. Por otro lado, existe riesgo de mutaciones que podrían surgir si el patógeno de la vacuna llegara a reproducirse en el cuerpo y generar una cepa más resistente. La vacuna muerta o inactiva consiste en destruir la capacidad del patógeno para replicarse, esto se hace mediante la aplicación de calor o productos químicos, pero de tal manera que el sistema inmune aún pueda reconocer al patógeno. Por lo tanto, el patógeno no puede replicarse en absoluto ni crear una cepa más resistente. Sin embargo, este tipo de vacunas brinda protección por menos tiempo que en el caso de la vacuna viva o atenuada, por lo que se requeriría de algún refuerzo posteriormente. Y por último están las vacunas de subunidad, estas consisten en tomar sólo fragmentos del patógeno y presentarlos como antígeno, por lo que es más segura y sencilla de producir. Sin embargo, existe la posibilidad de no tener una respuesta inmune efectiva, por lo que este tipo de vacunas necesita de adyuvantes o potenciadores inmunológicos para crear una respuesta inmune robusta, sostenida y repetitiva.

A continuación, se presentan en la Tabla 3 diversas vacunas que se han desarrollado específicamente para combatir la tuberculosis.

Tabla 3. Prototipos de vacunas desarrolladas en la actualidad

Autores	Material	Naturaleza de la vacuna o antígeno	Animal/Ruta/Dosis	Descripción
Zhu et al. (2007)	Microesferas de quitosano	Proteína/Fusión de proteínas	Hambras de ratón C57BL/6 / Subcutánea / Tres dosis (semana 1, 3 y 5)	Para desarrollar un nuevo sistema de administración de la vacuna de subunidad de tuberculosis prepararon microesferas de quitosano biodegradables y se utilizaron para administrar una proteína de fusión, Ag85B-MPT64 (190-198) -Mtb8.4 (AMM para abreviar), hecha de tres genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Las microesferas cargadas de AMM se caracterizaron primero por su morfología, tamaño, potencial zeta, eficiencia de carga y liberación in vitro. Se inmunizaron ratones en las semanas 1, 3 y 5 por vía subcutánea con AMM formulado en microesferas de quitosano. Tres semanas después de la última inmunización, se examinaron las respuestas inmunes humorales y mediadas por células. Se demostró que las microesferas unían AMM de manera eficiente (eficiencia de carga > 99%). Después de la administración subcutánea se produjeron niveles altos de IFN-gamma. Los niveles de IgG específica de Ag85B (H + L), IgG1 e IgG2a en sueros de ratones inmunizados con AMM en microesferas de quitosano también fueron altos. Estos resultados indicaron que las microesferas de quitosano cuando se usan como vehículo para la proteína de fusión AMM podrían provocar fuertes respuestas inmunes humorales y mediadas por células.
De Paula et al. (2007)	Microesferas de PLGA	DNA	Ratones y conejillos de indias / Intramuscular / Tres dosis con intervalos de dos semanas	Para inducir respuestas inmunes protectoras y terapéuticas contra la tuberculosis coencapsularon el ADNhsp65 y el adyuvante trehalosa dimilato (TDM) en microesferas de poli (ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA) biodegradables. También se desarrollaron una formulación de vacuna de refuerzo principal de un solo disparo basada en una mezcla de dos microesferas PLGA diferentes, que presentan una liberación más rápida y lenta de DNAhsp65 y la proteína hsp65 recombinante, respectivamente. Estas formulaciones se probaron en ratones y en conejillos de indias en comparación con la eficacia y la toxicidad inducida por la preparación de ADN desnudo o BCG. La formulación de refuerzo único de un solo disparo presentó claramente una buena eficacia y una patología pulmonar disminuida tanto en ratones como en conejillos de indias.
Lima et al. (2003)	Microesferas de oro	DNA	Ratones BALB/c / Pistola génica e intramuscular / Tres dosis con intervalos de dos semanas	En este trabajo determinaron un mejor método de introducción de hsp65 (gen que codifica la proteína micobacteriana) para la eficacia de la vacuna contra la tuberculosis, evaluaron la inmunogenicidad y la protección del ADN-hsp65 administrado por bombardeo con pistola génica o inyección intramuscular de ADN desnudo. Obtuvieron como resultado que la inmunización por pistola génica indujo una respuesta inmune con dosis de plásmido 100 veces más bajas que las requeridas para la inmunización intramuscular. Sin embargo, en contraste con la inmunización intramuscular, que fue protectora en estos estudios, la inmunización con pistola génica

				no protegió a los ratones BALB/c contra la infección por provocación.
Wang et al. (2010)	Liposomas	DNA	Ratones C57BL / 6 / Oral / Tres dosis con intervalos de dos semanas	<p>Para aclarar que la vacuna de ADN encapsulado en liposomas funciona eficazmente como un sistema de administración de vacunas para evocar respuestas inmunes intestinales de la mucosa, en este trabajo se construyó un ADN de Mycobacterium pcDNA3.1 (+) (vector de expresión) / Ag85A y se encapsuló en un liposoma. Se observó que el antígeno de proteína Ag85A se expresaba sustancialmente en el epitelio, las células microfold (células M), las células dendríticas (DC) y los parches de Peyer (pp) del intestino delgado, respectivamente, después de la administración oral en ratones 3 veces con intervalos de 14 días. Los datos indicaron que la vacunación oral con el ADN liposomal-pcDNA 3.1 (+) / Ag85A es capaz de inducir respuestas inmunitarias humorales y celulares de la mucosa específica de antígeno. Especialmente, el compartimento celular en el epitelio del intestino delgado juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune para eliminar la tuberculosis. Estos hallazgos tienen una comprensión importante y posibles implicaciones para el diseño de nuevas estrategias basadas en la vacuna oral de ADN sobre la regulación de la respuesta inmune en la protección contra la tuberculosis. Es claramente necesario un estudio adicional para mejorar la efectividad de las vacunas de ADN Ag85A contra la TB en comparación con BCG.</p>

De la Torre et al. (2009)	Liposomas	DNA	<p>Ratones BALB/c / Intramuscular / Cuatro dosis con intervalos de dos semanas</p> <p>Presentan un estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas, la citotoxicidad in vitro y la producción de anticuerpos in vivo de ADN con complejos de superficie en liposomas EPC Egg Phosphatidylcholine / DOTAP (1,2-oleoil-3-trimetil amonio propano) / DOPE (L-α-dioleoil fosfatidil dietanol amina), 50/25/25% molar, respectivamente, y DOTAP / DOPE (50/50% molar). El estudio tuvo como objetivo correlacionar el comportamiento biológico y las propiedades estructurales de los portadores de lípidos. Usaron DNA-hsp65, cuya acción desnuda como vacuna genética contra la tuberculosis ya ha sido demostrada. Además, el ADN-hsp65 con complejo de superficie en liposomas EPC / DOTAP / DOPE (50/25/25% molar) fue eficaz como una vacuna antituberculosa de dosis única. Los resultados obtenidos mostraron que la inclusión de EPC estabilizó la estructura DOTAP / DOPE, produciendo una temperatura de fusión más alta y un potencial zeta más bajo. Se identificaron semejanzas en las morfologías en ambas estructuras, aunque una fracción mayor de ADN cargado no se unió electrostáticamente en EPC / DOTAP / DOPE. EPC también indujo una importante reducción en la citotoxicidad, similar al DNA-hsp65 desnudo. La respuesta inmune adecuada conduce a una producción de anticuerpos del isotipo IgG2a, incluso para el DOTAP / DOPE citotóxico. Sin embargo, la producción de anticuerpos se detectó a los 15 y 30 días para DOTAP / DOPE y EPC / DOTAP / DOPE, respectivamente. Por lo tanto, la producción de anticuerpos in vivo no se correlaciona con la citotoxicidad in vitro ni con la estabilidad estructural sola. El efecto sinérgico de la estabilidad estructural y la unión electrostática del ADN sobre la superficie de las estructuras explican los efectos inmunológicos. Al ajustar la composición para generar el empaquetamiento adecuado y la interacción catiónica de lípidos / ADN, permitieron la optimización de las formulaciones de liposomas para la inmunización requerida o la terapia génica. De manera específica, los resultados contribuyen a los estudios sobre la terapia de tuberculosis y la vacunación.</p>
---------------------------	-----------	-----	--

<p>Sosunov et al. (2007)</p>	<p>Liposomas</p>	<p>Péptido</p>	<p>Ratones C57BL/6JCit (B6) / Intravenosa / Diariamente durante 5 días</p>	<p>Las bacteriocinas (Bcn) son péptidos naturales que son secretados por varias bacterias taxonómicamente distantes y ejercen actividad bactericida contra otras especies bacterianas. En este estudio se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv virulento. Se aislaron y purificaron cinco Bcn diferentes de sobrenadantes de cultivo bacteriano, se determinó su secuencia de aminoácidos y se evaluó la actividad contra micobacterias en tres modelos diferentes: cultivos de micobacterias in vitro, infección in vitro de macrófagos de ratón e infección de dosis altas in vivo de ratones endogámicos. En el modelo in vitro, cuatro de cada cinco Bcn exhibieron una actividad antimicobacteriana más fuerte que concentraciones iguales de un antibiótico antituberculoso ampliamente utilizado, la rifampicina. Estos Bcn no eran tóxicos para los macrófagos de ratón a una concentración de 0.1 mg / L. Pura Bcn no inhibió el crecimiento de micobacterias dentro de los macrófagos cuando se agregó a 0.01-0.1 mg / L, lo que sugiere que a concentraciones fisiológicamente tolerables estas moléculas no penetran a través de la membrana de las células eucariotas. Sin embargo, cuando se administra como un complejo con liposomas de fosfatidilcolina-cardiolipina, Bcn5 (seleccionado como compuesto modelo debido a su citotoxicidad y actividad antimicobacteriana) demostró capacidad tanto para inhibir el crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> como para prolongar la supervivencia de los ratones en un modelo de tuberculosis aguda. Dado que el mecanismo de la actividad bactericida de Bcn difiere del de todos los antibióticos de uso común, su posible participación en terapias complejas de TB merece un estudio más profundo.</p>
------------------------------	------------------	----------------	--	---

Dirección General de Biotecnología

Meerak et al. (2013)	Nanopartículas de quitosano	DNA	Ratones BALB/c / Subcutánea y refuerzo intranasal /Tres dosis, una subcutánea y dos intranasales de refuerzo con intervalos de dos semanas	Las vacunas de ADN son una nueva generación prometedora de vacunas que pueden provocar una respuesta inmune usando ADN codificando el antígeno de interés. Sin embargo, la eficacia de estas vacunas todavía necesita ser mejorada. En este estudio investigaron el efecto de la autofagia, el cual es un mecanismo esencial para la supervivencia celular y para mantener la homeostasis celular durante el estrés a través de la descomposición de componentes citosólicos y orgánulos dañados para analizar el aumento de la eficacia de una vacuna de ADN candidata contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB). Se empleó quitosano de bajo peso molecular para encapsular el ADN plasmídico que contiene un gen que codifica el antígeno MTB 85B (Ag85B) para inducir la autofagia tras la vacunación con ADN. Para ello coencapsularon el plásmido que contiene Ag85B con un plásmido codificador. Los plásmidos encapsulados por partículas de quitosano se usaron para la inmunización subcutánea y como refuerzo intranasal en ratones. Después de la vacunación de refuerzo, se midió la respuesta inmune humoral en los sueros de los ratones. La vacuna de ADN con la construcción inductora de autofagia produjo niveles de anticuerpos específicos de Ag85B significativamente más altos que el grupo de control tratado con el plásmido Ag85B solo. Con base en la evidencia presentada, concluyeron que incorporar un elemento inductor de autofagia en una vacuna de ADN puede ayudar a mejorar la respuesta inmune.
Aguilo et al. (2015)	MTBVAC	Viva atenuada	Ratones recién nacidos C57 / BL6 / Intranasal / Dos dosis con intervalo de cuatro semanas /	MTBVAC es la primera y única vacuna viva atenuada basada en un aislado humano de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> desarrollado como estrategia de reemplazo de BCG en recién nacidos que ha entrado en los primeros ensayos clínicos en adultos humanos. En este trabajo, caracterizaron la seguridad, inmunogenicidad y eficacia protectora de MTBVAC en un modelo de ratones recién nacidos. Los datos indican claramente que MTBVAC es seguro para ratones recién nacidos y no afecta el crecimiento de los animales o el desarrollo de órganos. Además, los ratones vacunados con MTBVAC al nacer mostraron una inmunogenicidad mejorada y una mejor protección contra el desafío de <i>M. tuberculosis</i> en comparación con BCG.

2.4.1 Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs)

Recientes investigaciones han sugerido que una alternativa en el diseño de vacunas para lograr la activación de macrófagos del sistema inmune es el uso de patrones moleculares compartidos por microorganismos patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*), capaces de activar señales

intracelulares y de desencadenar procesos para el desarrollo de una respuesta inmune, ya que el sistema inmune cuenta con receptores especializados en la detección de patógenos tales como bacterias y virus llamados receptores que reconocen patrones (PRRs). Estas proteínas se expresan en células presentadoras de antígeno como las dendríticas y macrófagos, y son un punto clave en el sistema inmune innato. Los PRRs se clasifican en cuatro tipos:

- Receptores tipo Toll (TRL)
- Receptores tipo NOD (NLR)
- Receptores de lectinas tipo C (CLR)
- Receptores tipo RIG-1 (RLR)

Estos se localizan estratégicamente en la membrana celular (ver Figura 3), donde hacen el reconocimiento de bacterias, en el endosoma, donde reconocen invasores intracelulares como virus, y en el citoplasma.

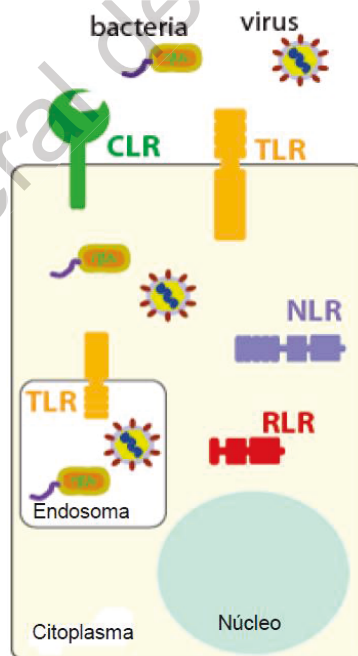


Figura 3. Esquema de la ubicación de los PRRs en la membrana celular. Fuente: Zaru (2018).

Hasta el momento se conocen en mamíferos 11 tipos de TRLs, cada uno especializado en el reconocimiento de PAMPs de bacterias, hongos, parásitos y virus:

- TRL1, 2, 4 y 6 unen lípidos bacterianos
- TRL3, 7 y 8 detectan ARN viral
- TRL9 reconoce ADN bacteriano
- TRL5 y 10 detectan proteínas bacterianas o de parásitos

Cada TRL adapta la respuesta inmune a el tipo de patógeno que reconoce (Zaru, 2018), por lo que una estrategia en el desarrollo de nanovacunas es el despliegue de PAMPs en la superficie. Algunos autores como Willey et al. (2012) han sugerido el empleo de vesículas como los liposomas que contengan PAMPs de tal forma que la presentación del antígeno ocurra en un contexto biomimético (López y Valdemar, 2018), y así asegurar la activación del sistema inmune innato. En la Figura 4 se muestra el esquema de respuesta de este principio.

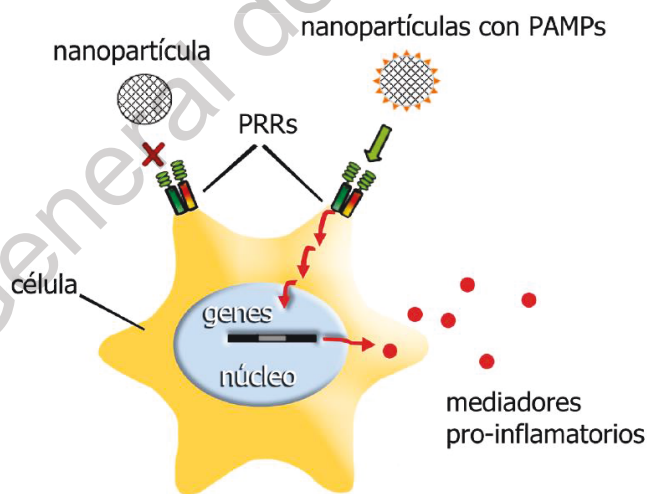


Figura 4. Esquema de la respuesta inmune empleando PAMPs. Fuente: López y Valdemar (2018).

2.5 Liposomas

El uso de liposomas en la actualidad es amplio, uno de los usos más relevantes es la administración de medicamentos y moléculas debido a su

funcionalidad y versatilidad que le proporcionan su centro acuoso, multicapas, forma, etc., como se pudo observar anteriormente en este capítulo (ver sección 2.4). Esos sistemas son vesículas esféricas formadas por un núcleo acuoso y rodeadas por una bicapa de fosfolípidos, como se muestra en la Figura 5. Los fosfolípidos cuentan con una cola hidrocarbonada e hidrofóbica, y una cabeza polar hidrofílica, que ayudan a crear esa estructura de bicapa.

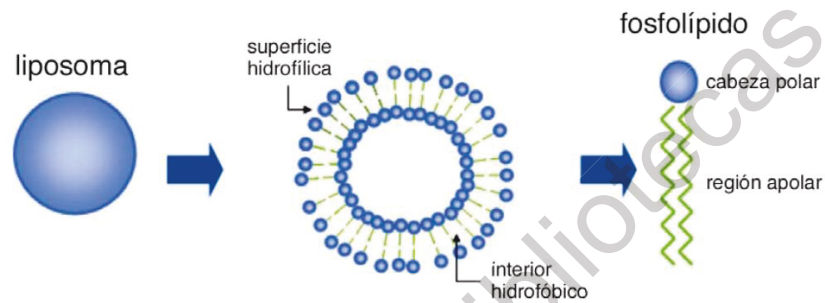


Figura 5. Esquema de la formación del liposoma. Fuente: Diaz (2011).

Se pueden producir liposomas de tamaño variado, por lo cual se les pueden dar diferentes aplicaciones. En la Figura 6, se pueden apreciar los tamaños en lo que se pueden variar los liposomas y el nombre que se les asigna, para vesículas de 1 a 5 micras se les conoce como MLV (del inglés Multilamellar Large Vesicles), de 80 a 400 nm se les conoce como LUV (Large Unilamellar Vesicles) y por último están los SUV (Small Unilamellar Vesicles).

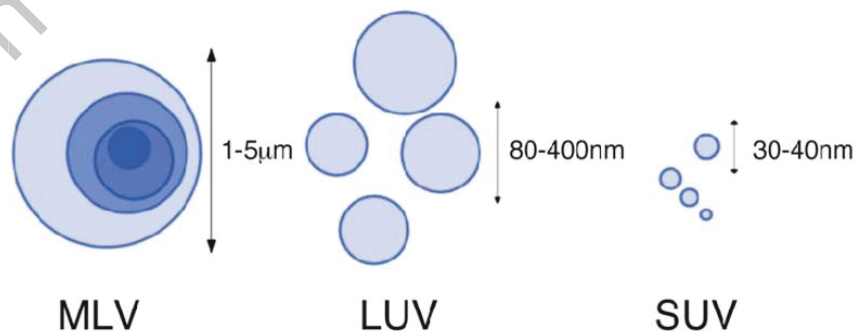


Figura 6. Tipos y tamaños de liposomas. Fuente: Diaz (2011).

Los liposomas tienen la ventaja de fusionarse con otras bicapas, como la membrana celular, lo que permite la liberación de su carga al interior de una célula en regiones específicas del organismo a lo largo de cierto tiempo (Díaz, 2011).

2.6 Partículas en el organismo

El destino de una partícula en el interior de un organismo depende de la respuesta del hospedero (López y Valdemar, 2018). Para aplicaciones biomédicas, el reconocimiento de éstas por el sistema inmune constituye uno de los principales problemas, ya que el sistema inmune reconoce fácilmente y destruye el material extraño (antígenos) que entra en la circulación del cuerpo en cuestión de segundos. Además, otro evento que influye en el destino de la partícula es la formación de la llamada bio-corona de proteínas (ver Figura 7), ya que al entrar la partícula al organismo interactúa con las moléculas presentes en los fluidos biológicos y éstas pueden llegar a alterar las propiedades fisicoquímicas de las partículas drásticamente. También, en este sentido, se han desarrollado partículas inspiradas en la naturaleza, llamadas partículas biomiméticas.

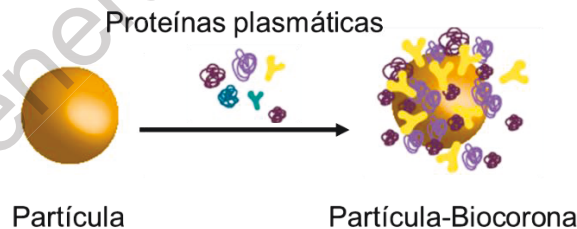


Figura 7. Esquema de la formación de la bio-corona. Fuente: Modificado de Corbo et al. (2016).

2.6.1 Biomimetismo

Hoy en día se han desarrollado materiales biomiméticos, estos imitan estructuras y funciones biológicas, ya que, en ausencia de camuflaje, las partículas interactúan con proteínas de la sangre que reducen drásticamente la vida media de la partícula (Banu et al., 2014). Por lo tanto, para evitar una rápida destrucción es

necesario el mimetismo, para así evitar ser reconocidas al instante y puedan llegar a cumplir su objetivo dentro del organismo. Como se mencionó anteriormente, el empleo de liposomas con fines médicos ha sido altamente estudiada, debido a que este tipo de sistemas se asemeja a una membrana celular, ya que cuenta con capas lipídicas que funcionan como interfases separando un interior acuoso de un exterior también acuoso, además, los componentes lipídicos son comunes en todos los seres vivos, por lo tanto, los liposomas pueden ayudar a biomimetizar una partícula dentro del organismo.

Dirección General de Bibliotecas UFG

Capítulo 3

Hipótesis

El plasma humano contiene proteínas capaces de adherirse a todo tipo de superficies; de ocurrir, la unión de proteínas plasmáticas sobre una construcción supramolecular, diseñada para vacunación, provocará cambios drásticos en sus propiedades superficiales, lo cual tendrá un efecto crítico sobre la interacción partículas y las células.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Capítulo 4

Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la influencia del plasma humano sobre las propiedades superficiales de una construcción supramolecular, diseñada para activación de células del sistema inmune, basada en sílice nanoporosa y lípidos bioactivos.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar SBA-15 corta mediante el proceso de sol-gel.
- Sintetizar liposomas unilaminares grandes (LUVs) a partir de lípidos de *M. tuberculosis*.
- Obtener una estructura biomimética basada en partículas nanoporosas SBA-15, y que despliegue en su superficie lípidos bioactivos de *M. tuberculosis*.
- Caracterización de la estructura biomimética.
- Analizar los efectos en la superficie de la partícula biomimética con la formación de la bio-corona sobre la estructura cuando ha sido expuesta a plasma sanguíneo.

Capítulo 5

Material y Metodología

5.1 Síntesis de la sílice nanoporosa SBA-15

En el presente trabajo se emplea la metodología desarrollada por Flodström y Alfredsson (2003) para la síntesis de la SBA-15, en donde se utiliza como agente director de la estructura el surfactante Pluronic P123, el cual se disuelve en una solución de ácido clorhídrico (75 ml) 4M y agua desionizada (112.5 ml), con agitación constante a 35°C. Una vez disuelto el P123, se inicia el proceso de sol-gel mediante la adición del precursor de la sílice, el tetraetil ortosilicato TEOS (8 ml). Esta reacción se realiza por 24 horas a 35°C y con agitación constante. Transcurridas las 24 horas se efectúa el proceso de madurado, colocando el gel obtenido en un recipiente de polipropileno (PP), se tapa y se coloca en la mufla durante 24 horas a una temperatura de 80°C sin agitación. Al terminar se deja enfriar y se recupera el sólido por filtración. Se seca a temperatura ambiente y posteriormente a 110°C por 18 horas a una rampa de calentamiento de 2°C/min. Finalmente, se calcina a 550°C por 4 horas a una rampa de calentamiento de 1°C/min. En la Figura 8 se muestra un esquema del proceso de síntesis de la SBA-15.

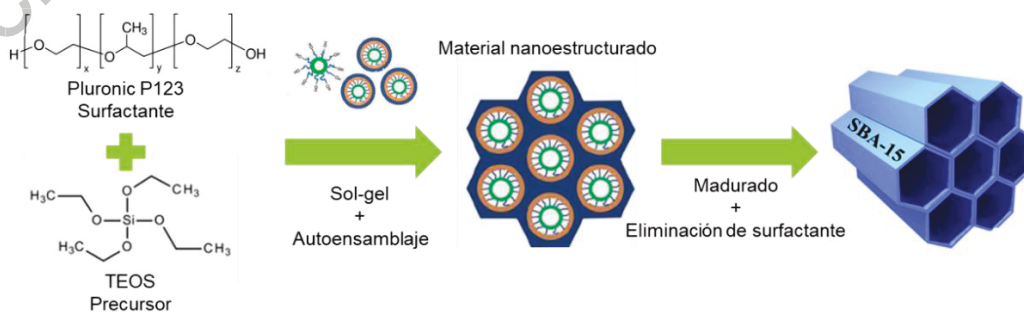


Figura 8. Diagrama de la síntesis de la SBA-15.

5.2 Funcionalización de la SBA-15

Una vez obtenida la SBA-15 se funcionaliza con grupos amino, como lo describe Hernández et al. (2012). La SBA-15 (2.3 g) se dispersa en una solución de 3-aminopropil trietóxisilano (APTES, 2.9 ml) precursor de los grupos funcionales -NH₂ en etanol (31 ml). La cantidad de APTES se calcula para obtener 0.3 moles de APTES por cada mol de TEOS. La reacción se realiza a temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, se adiciona agua desionizada (44 ml) y se mantiene en agitación por 60 minutos más. Se recupera el sólido por filtración y se deja secar a temperatura ambiente, y posteriormente a 110°C por 18 horas. En la Figura 9 se muestra un esquema de la interacción de la SBA-15 con el grupo amino.



Figura 9. Esquema de la funcionalización de la SBA-15 con el grupo amino. Fuente: Doustkhah et al. (2019).

5.3 Preparación de liposomas

Los lípidos son suspendidos en agua a una temperatura de 50°C (1 mg/ml), pasando la suspensión varias veces a través de una jeringa con aguja calibre 23, así obteniendo los liposomas multilaminares grandes (MLV). Una vez terminado este proceso, los liposomas son filtrados 9 veces a través de un filtro de 0.4 µm a fin de extruir la muestra y obtener liposomas unilaminares grandes (LUV), los liposomas se mantienen en refrigeración a 4°C, en la Figura 10 se esquematiza el proceso de preparación de liposomas.

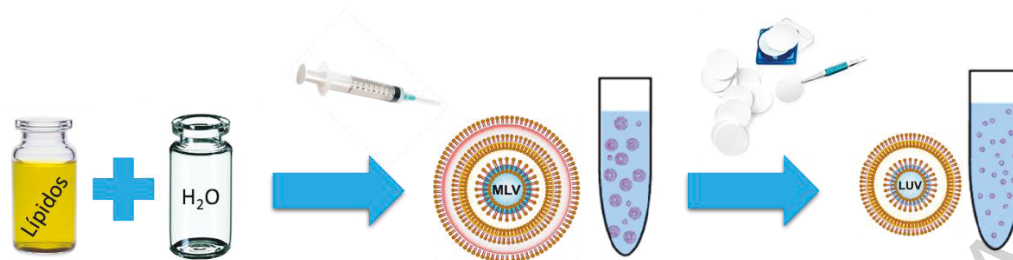


Figura 10. Esquema de preparación de liposomas.

5.4 Preparación de partículas biomiméticas

Las partículas de SBA-15 aminadas son incubadas con los liposomas para la obtención de la partícula biomimética. Para ello se agregan en la misma proporción, miligramos de SBA-15 aminada y mililitros de liposomas (1:1). Luego se incuban a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación ocasional.

Pasados los 20 minutos se centrifuga a 4000 rpm durante un minuto. Se extrae el sobrenadante y se suspende el pellet en tantos mililitros de agua destilada estéril como al inicio. Se refrigera a 4°C. Todo este procedimiento se lleva a cabo en condiciones de esterilidad en campana de bioseguridad. Posteriormente estas partículas biomiméticas se ponen en contacto con el plasma humano.

5.5 Incubación de partículas en plasma humano

Se procede a centrifugar plasma a 14000g por 5 minutos en un tubo Falcon, enseguida se depositan 500 µl del plasma centrifugado en una placa de cultivo estéril con 24 pozos y se agregan 500 µl de la suspensión de SBA-15 recubierta de liposomas a una concentración 2 mg/ml y se incuban durante 24 horas a 37°C. Este procedimiento se realiza en condiciones estériles, utilizando material esterilizado en autoclave y manipulando dentro de una campana de bioseguridad.

Pasadas las 24 horas de incubación se procede a remover la bio-corona suave de las construcciones supramoleculares. Para ello se toman las

suspensiones que se encontraban en los pozos y se trasvasan a tubos eppendorf estériles, se centrifugan a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se extraen con cuidado de la centrifugadora y se lleva a la campana de bioseguridad para retirar el sobrenadante, se agrega PBS 1X estéril para el lavado, se hacen tres lavados. Al final se resuspenden las construcciones en PBS 1X y se trasvasan a otro tubo eppendorf.

5.6 Técnicas de caracterización

Se emplean diversas técnicas de caracterización en este trabajo, como son:

- Difracción de Rayos X (XRD).
- Termogravimetría (TGA).
- Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de dispersión de energía de Rayos X (HRSEM-EDS).
- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).
- Espectroscopía micro-Raman.
- Potencial Z.
- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

A continuación, se presenta una breve explicación de cada técnica empleada.

5.6.1 Difracción de Rayos X

Este análisis se llevó a cabo en un difractómetro Rigaku, modelo Ultima IV, a bajos ángulo para confirmar que la estructura de la SBA-15 no es afectada al hacer la modificación en la síntesis para hacerla más corta y tampoco al incorporar el grupo amino APTES a su superficie. En este tipo de análisis no es necesario hacerle nada a la muestra.

5.6.2 Termogravimetría

El análisis de termogravimetría (TGA) se empleó para ayudar a determinar las moléculas presentes en la superficie de la estructura a partir de las temperaturas de degradación.

Mediante esta técnica se analizaron la SBA-15 y la SBA-15 aminada.

5.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido y Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (SEM-HR-EDS)

Mediante esta técnica se analizaron las estructuras SBA-15 en un microscopio JEOL JSM-6060 LV para observar su morfología. Para ello se espolvorea un poco de la muestra en un porta-muestras de cobre previamente pulido y limpio, para eliminar contaminantes se sumerge el porta-muestras en un baño de acetona y se sonica durante 5 minutos, al término se extrae del vaso con ayuda de unas pinzas y se pone a secar al ambiente por algunos minutos.

Posteriormente se coloca cinta de carbón doble cara o pegamento líquido sobre alguna de las caras del porta-muestras y se fija la muestra. Enseguida se coloca en el porta-muestras en el portaobjetos del equipo para el análisis.

5.6.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se analizaron las partículas biomiméticas y posteriormente estas mismas después de ser incubadas en el plasma humano para observar los recubrimientos, las muestras fueron diluidas (1/200) en agua.

Para el análisis se depositan 5 μ l de la muestra sobre una rejilla de cobre y posteriormente ésta se coloca en el desecador al vacío por 15 minutos para fijar la muestra. Se utilizó acetato de uranilo al 2% como agente de tinción para obtener un mayor contraste en las imágenes de TEM. Para teñir las rejillas se sumergen en una solución de acetato de uranilo a 80°C durante 10 minutos dentro de placas Mazzini.

Posteriormente se lavan las rejillas en agua desionizada para retirar el exceso del acetato de uranilo, y se deja secar.

Las muestras fueron observadas en un microscopio Hitachi SU8230.

5.6.5 Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se empleó para caracterizar todas las construcciones, para obtener las bandas de los grupos funcionales presentes en la superficie de las construcciones a partir de sus frecuencias de vibración.

Para este análisis se coloca una película de aluminio sobre un porta-muestras de vidrio y se vierten 50 μl de la muestra a analizar, se añaden 50 μl de óxido de deuterio (proporción 1:1) para minimizar la señal de agua en el análisis. Se pone a secar en el desecador al vacío durante 10 minutos para fijar la muestra.

El espectrómetro es de mediano infrarrojo ($600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) modelo Spectrum two Perkin Elmer.

5.6.6 Espectroscopía micro Raman

Esta técnica ayuda a complementar la información obtenida mediante la espectroscopía de infrarrojo, ya que proporciona información química y estructural de las moléculas presentes en la superficie de la estructura a partir de los modos vibracionales detectados al hacerle incidir un haz de luz a la muestra. Para este análisis no es necesario hacerles ningún tratamiento previo a las muestras. En el caso de las muestras en polvo (SBA-15 corta pura y SBA-15 corta aminada), sólo se espolvorea un poco de la muestra con ayuda de una espátula sobre un porta-muestras de vidrio, se aplana y se lleva al equipo. Para el análisis se empleó un haz de luz roja de 633 nm, con un nivel de potencia del láser de 7 mW, un tiempo de exposición de 10 segundos y 3 exposiciones para cada una.

5.6.7 Potencial Z

Se analizaron las construcciones para obtener su potencial eléctrico, para lo cual se diluyeron las muestras (1:100) en 1ml de agua destilada. Este análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agua como medio dispersante con un pH de 7. Las diluciones se colocaron en celdas DTS1070 (Malvern Instruments), que posteriormente se colocan en el equipo para las mediciones. Las mediciones se realizaron por triplicado en un analizador Malvern Zetasizer Nano Z.

5.6.8 Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconónico (BCA)

Mediante este análisis se determinarán las cantidades de proteínas presentes en cinco muestras diferentes de plasmas humanos.

Para realizar curva de calibración de la albúmina sérica bovina (BSA), la cual es una proteína estándar, primero se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos, se pesan 2 mg de la BSA, y se disuelve en 1 ml de solución salina isotónica (SSI= NaCl al 0.9%) y se procede a elaborar las diluciones que se indican en la Tabla 4 en tubos eppendorf:

Tabla 4. Diluciones de BSA

No. De tubo	µl de H ₂ O	µl de BSA (2 mg/ml)	Concentración (mg/ml)
0	100.0	0.0	0.000
1	93.8	6.2	0.125
2	87.5	12.5	0.250
3	75.0	25.0	0.500
4	62.5	37.5	0.750
5	50.0	50.0	1.000
6	25.0	75.0	1.500
7	0.0	100.0	2.000

Posteriormente se prepararán las diluciones de los plasmas (1/50) en tubos eppendorf, los plasmas y estas diluciones deben estar a 4°C mientras se realiza el procedimiento.

Una vez listas todas las diluciones (BSA y plasma) se colocan 10 µl de cada dilución en los pozos de una microplaca de titulación de 96 pozos Thermo NUNC maxisorp, de acuerdo con el arreglo de la Figura 11, cada dilución se hace por triplicado. Enseguida se prepara la solución de color, 4.9 ml de ácido bicinónico (BCA) Sigma B9643 + 100 µl de solución de sulfato de cobre (II) al 4% Sigma C2284, se agregarán 200 µl a cada pozo, por lo tanto, se prepara al doble esta solución.

Después de haber agregado el ácido bicinónico a cada pozo, se incuba por 30 minutos a 37°C, y se cubre la placa con papel aluminio. Posteriormente se lee la placa a 562 nm para obtener la densidad óptica en cada pozo.

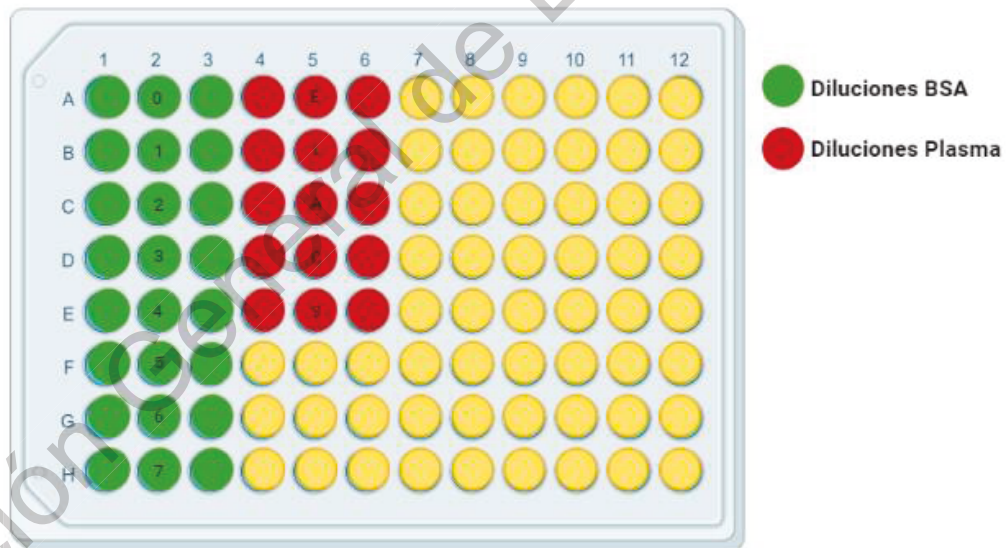


Figura 11. Arreglo de diluciones en microplaca.

5.6.9 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

El ensayo ELISA ayuda a determinar la presencia de anticuerpos en las construcciones supramoleculares, lo cual indicará la formación de la bio-corona de proteínas, y la posible respuesta inmune que se busca.

Estos ensayos se realizan en microplacas Thermo Nunc MaxiSorp de 96 pozos. Lo primero es preparar BSA al 3% en PBS 1X (1.5 g de BSA en 50 ml de PBS 1X, se disuelve sin agitar) para bloquear los pozos con la BSA, la cual se incubará durante una hora a 37°C. Luego de la incubación se procede a retirar la BSA y realizar 3 lavados con PBS 1X. Después de esto se agregan 100 µl de la suspensión con construcciones supramoleculares (diluciones si así lo requiere). Posteriormente la placa se centrifuga a 2500 rpm durante 6 minutos, esto para lograr fijar las partículas en los pozos. Una vez centrifugada la placa se procede a extraer el sobrenadante para descartarlo, y se agregan 100 µl de anti-IgG conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP, enzima) diluido con BSA al 0.3% en PBS 1X (1:50, 000 o 1:25 000, 1 µl en 50 ml o 25 ml) en cada pozo empleado. Después de agregarse el conjugado se procede a incubar durante 2 horas a 37°C. Transcurridas las dos horas se centrifuga nuevamente a 2500 rpm durante 6 minutos, se extrae el sobrenadante y se agregan 100 µl de BSA al 0.3% en PBS 1X para el lavado (x3), y se centrifuga a las mismas condiciones cada vez. Después del último lavado se procede a agregar 100 µl del sustrato ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), solución 9.1 mM en el buffer de ABTS, el cual se prepara inmediatamente antes de usar. Se incuba al abrigo de la luz durante el tiempo necesario, y posteriormente se lee la microplaca a 415 nm en un lector de microplacas Varioskan. En la Figura 12 se muestra un esquema del proceso en que consiste un ELISA.

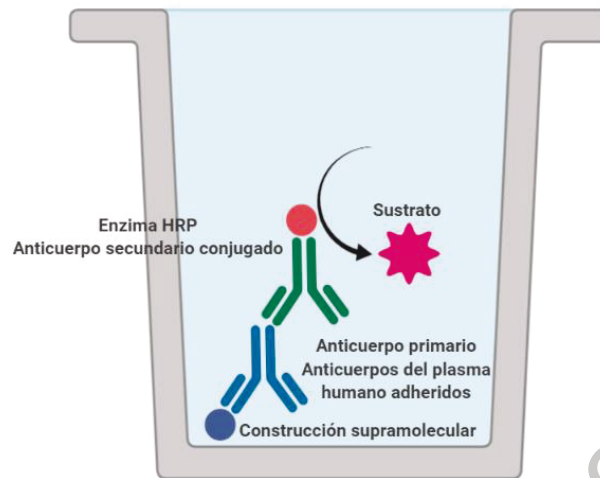


Figura 12. Esquema del ELISA desarrollado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Capítulo 6

Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los diversos resultados obtenidos mediante las técnicas de caracterización mencionadas en el capítulo anterior, así como una breve discusión de los resultados basándose en resultados obtenidos por otros autores en trabajos similares encontrados en la literatura.

6.1 Análisis de difracción de Rayos X

Se realizó el análisis de rayos X a bajos ángulos a la estructura aminada para comprobar si la estructura típica de la SBA-15 no es alterada a partir de la modificación de la síntesis ni de la funcionalización, en la Figura 13 se muestran los resultados de este análisis. Se observa una difracción de mayor intensidad alrededor $2\theta \approx 1^\circ$, y otras dos de muy baja intensidad aproximadamente a $2\theta \approx 1.7$ y 1.9° , estas tres difracciones corresponden a las reflexiones con índices hkl (100), (110) y (200), respectivamente, los cuales son característicos de la SBA-15, asociados con una simetría hexagonal bidimensional $p6mm$ de sus poros, como indican Hernández et al. (2012) en su trabajo.

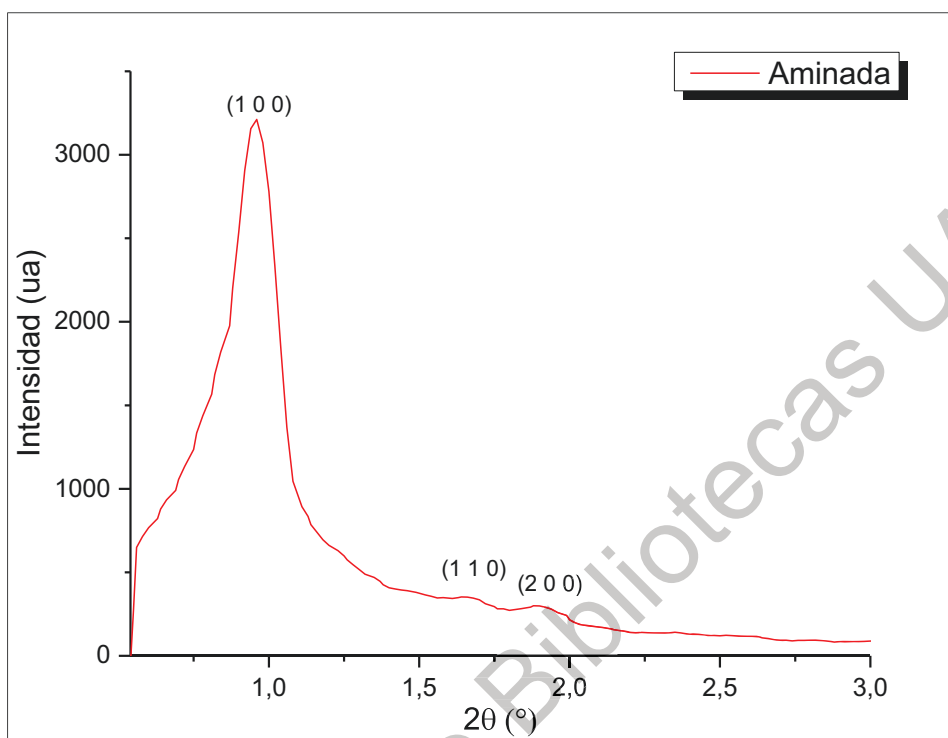


Figura 13. Patrón de difracción de Rayos X a bajos ángulos de la SBA-15 corta aminada.

6.2 Análisis de termogravimetría

En la Figura 14 se puede apreciar el resultado del análisis de termogravimetría de la SBA-15 aminada, en donde se observa una pérdida de peso del 12% aproximadamente, la cual inicia inmediatamente con el incremento de la temperatura. En la curva de la segunda derivada se muestran 2 puntos de inflexión a 45 y 250°C, los cuales se deben a la deshidratación y deshidroxilación de la SBA-15, respectivamente, como mencionan Hernández et al. (2012) en su trabajo.

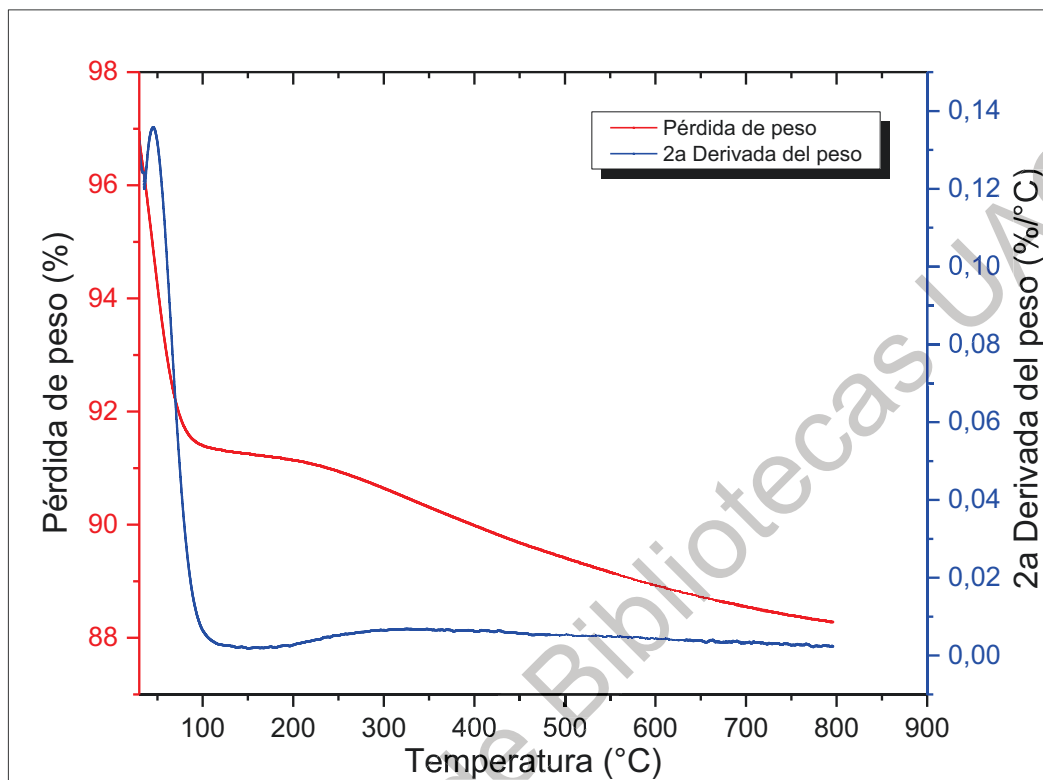


Figura 14. TGA de la SBA-15 corta pura.

En la Figura 15 se muestra el TGA de la SBA-15 aminada, este análisis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que la SBA-15 pura. Se presentó una pérdida de peso considerable de alrededor del 20%, también se muestran tres puntos de inflexión a 60, 300 y 400°C aproximadamente, los primeros dos puntos podrían deberse a la deshidratación y deshidroxilación, como en el caso de la SBA-15 pura, y el punto a 400°C debido a la descomposición los grupos amino y etileno como lo reportan Hernández et al. (2012), sin embargo, en comparación con este trabajo los puntos están desfasados hacia la derecha, este desfasamiento podría deberse a que en el caso del trabajo de Hernández et al. (2012) emplean la SBA-15 típica, y no la corta como en el presente trabajo, lo cual podría estar afectando la estabilidad térmica de la estructura.

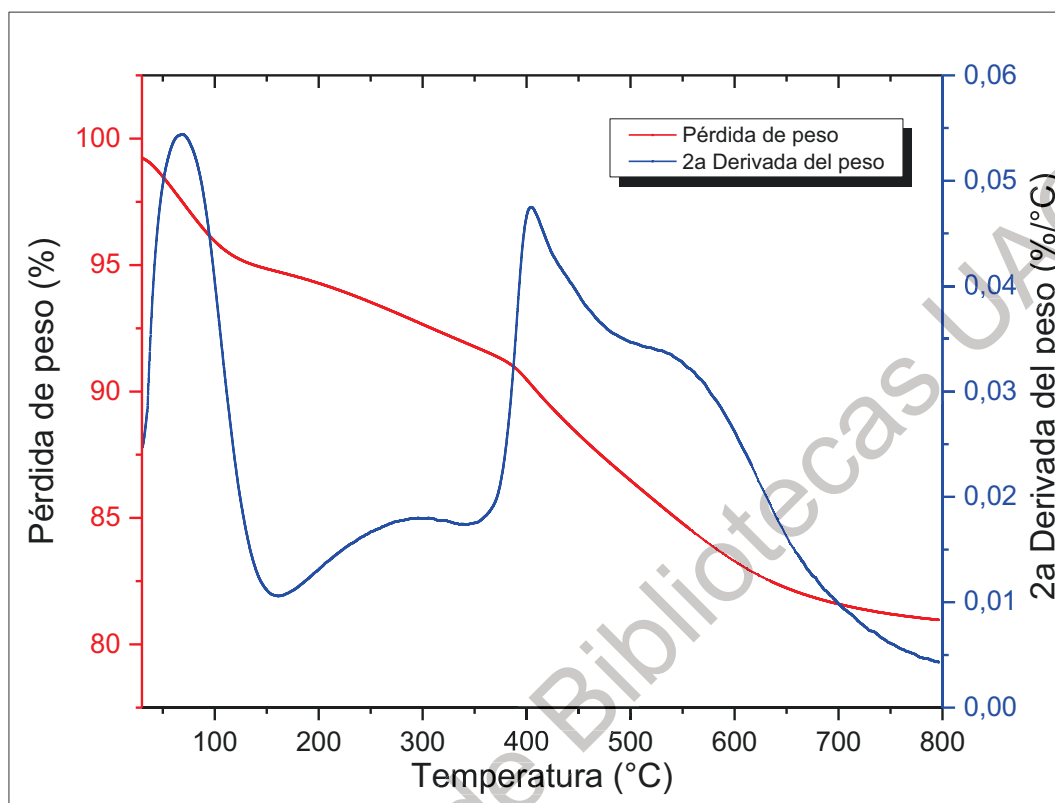


Figura 15. TGA de la SBA-15 corta aminada.

6.3 Micrografías electrónicas de barrido y mapeo por espectrometría de dispersión de energía de Rayos X

En las micrografías de barrido de la Figura 16 se puede apreciar la estructura típica de la SBA-15, la cual no es alterada al acortar la partícula, ni al incorporar el grupo amino a la superficie, continúa teniendo el arreglo hexagonal de poros y los canales.

El largo de las partículas es de aproximadamente 300 nm, mientras que el ancho es menor a los 100 nm.

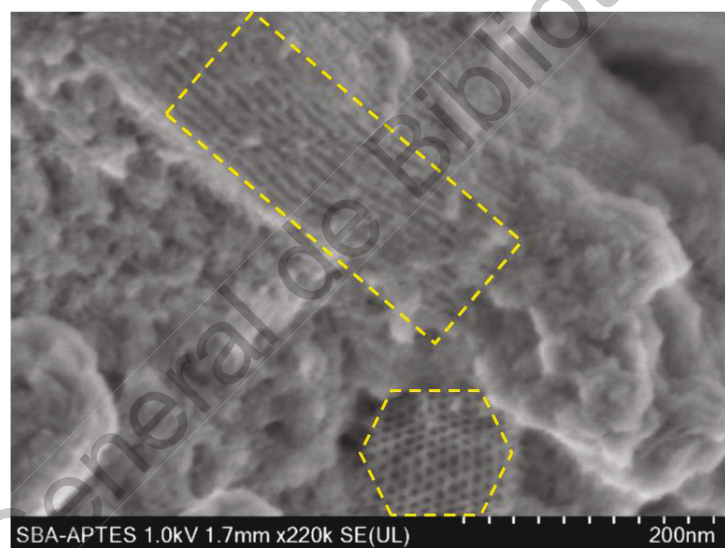
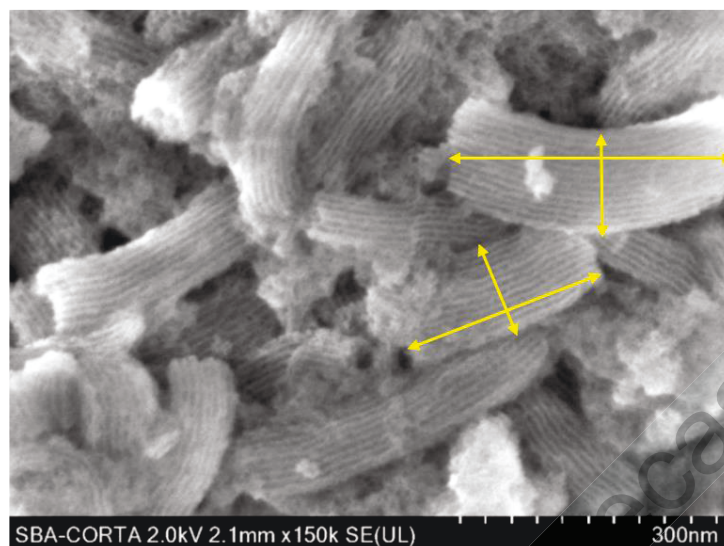


Figura 16. Micrografías electrónicas de barrido de la SBA-15.

En la Figura 17 mediante la espectrometría de dispersión de energía de Rayos X se puede observar la presencia de silicio y oxígeno en la superficie de la SBA-15, como se esperaba, además se mostró la presencia de nitrógeno y también se detectó la presencia de carbono, debida al grupo amino (3-aminopropil-trietoxisilano) de la funcionalización, sin embargo, este último elemento no se mapeó.

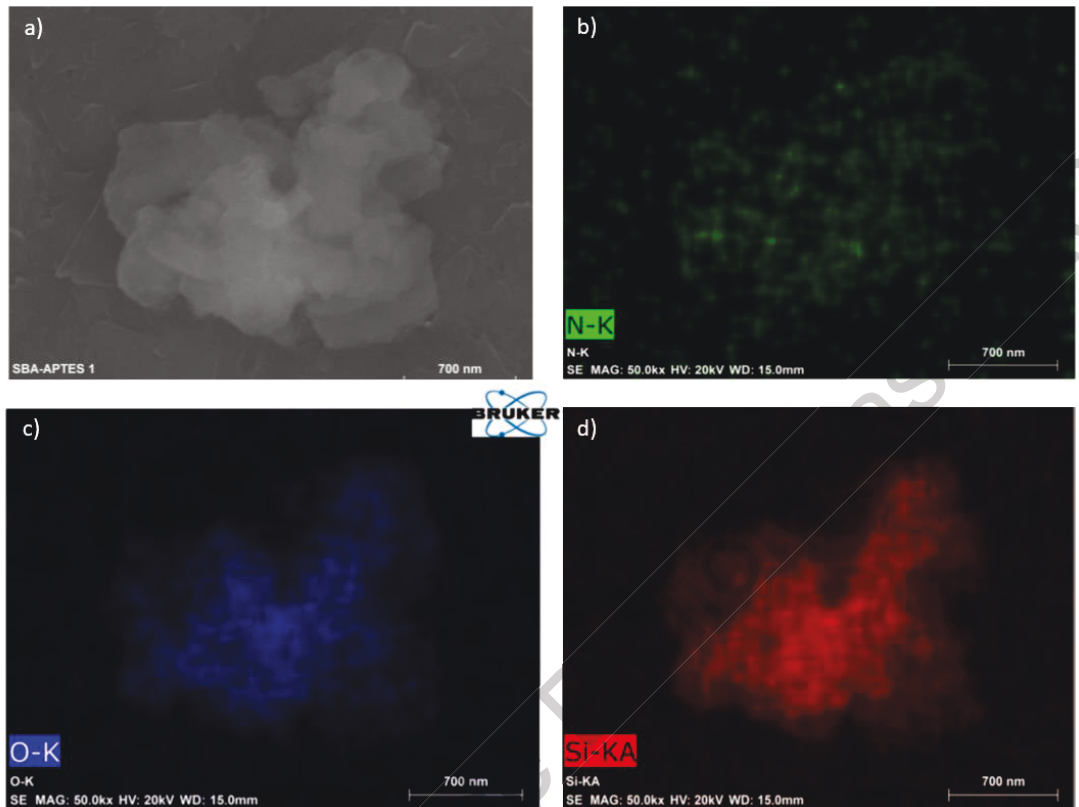


Figura 17. Mapeo por espectrometría de dispersión de energía de Rayos X de la SBA-15 aminada.

6.4 Micrografías electrónicas de transmisión

En la Figura 18 se aprecian las micrografías obtenidas por microscopio de transmisión de electrones de las construcciones con liposomas de fosfatidilcolina PC antes y después de incubarse en plasma, en la figura a) se logra ver en contraste la SBA-15 y el exitoso recubrimiento de ésta, en la figura b) se observa ya una aglomeración de construcciones con material biológico adherido, lo cual nos da un indicio de la formación de la bio-corona.

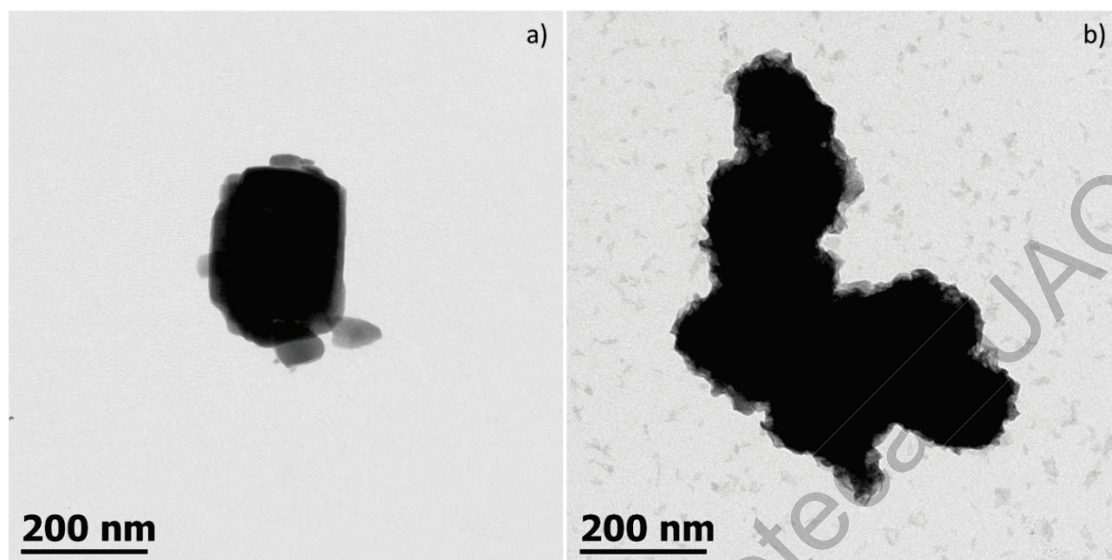


Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión de la construcción supramolecular con liposomas de PC a) antes de incubarse en plasma, b) después de incubarse en plasma.

En la Figura 19 se muestran las micrografías de transmisión de electrones de las construcciones con liposomas de PC-PIMs antes y después de incubarse en plasma en la figura a) se observa en contraste la SBA-15 y el recubrimiento, en la figura b) se observa el material biológico adherido a las construcciones y aglomeración de estas.

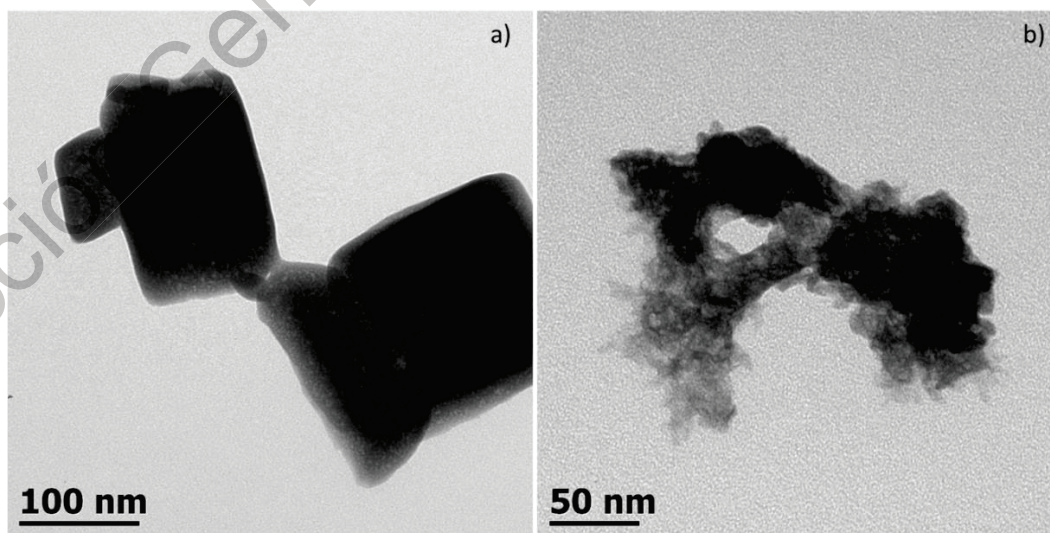


Figura 19. Micrografías electrónicas de transmisión de la construcción supramolecular con liposomas de PC-PIMs a) antes de incubarse en plasma, b) después de incubarse en plasma.

6.5 Espectro de infrarrojo

En el espectro de infrarrojo se observa el resultado de la interacción entre la radiación infrarroja y la muestra analizada. El espectro es una representación de los estados perturbados (modos vibracionales) producidos al hacer un barrido en todo el intervalo de longitudes de onda en el infrarrojo medio. En el eje de las abscisas (o de las X) están representados todos los valores del intervalo de longitud de onda del infrarrojo medio, en número de onda (cm^{-1}). Mientras que en el eje de las ordenadas (o de las Y) están representados los valores de la intensidad de absorción.

Cada señal en el espectro de infrarrojo representa un modo vibracional específico de grupos libres en la superficie del material.

En la Figura 20 se presentan los espectros IR obtenidos para la SBA-15 pura y la SBA-15 funcionalizada con el grupo amino. En el espectro de la SBA-15 pura se presentan las bandas típicas en 800 y 1080 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones simétricas y anti-simétricas del enlace Si–O–Si, además de la banda en 960 cm^{-1} , la cual se asigna a la vibración del grupo silanol (Si–OH). También se muestran señales de agua en 1640 cm^{-1} (H–O–H), y en 3350 cm^{-1} en donde el agua interactúa con los grupos silanol por puente de hidrógeno, como mencionan Hernández et al. (2012) en su trabajo.

En el espectro de la SBA-15 aminada podemos observar un cambio en el perfil del gráfico, por lo que intuye que existen cambios en la superficie de la estructura de la partícula aminada. Las bandas esperadas para el grupo amino se lo reportado por Hernández et al. (2012) e Imbert et al. (2009), son en 950 , 1558 y 3270 cm^{-1} . Mientras que para los grupos metilenos se esperan en 1927 y 1882 cm^{-1} aproximadamente. Cabe mencionar que, dada la forma de adquisición de datos del gráfico, no son perceptibles las señales para estos grupos. El ensanchamiento de la banda alrededor de 960 cm^{-1} , así como la disminución en la intensidad de las señales de las bandas correspondiente a 1080 cm^{-1} y en 800 cm^{-1} indica que los

estiramientos -Si-O-Si- son menos importantes debido al recubrimiento por los grupos amino.

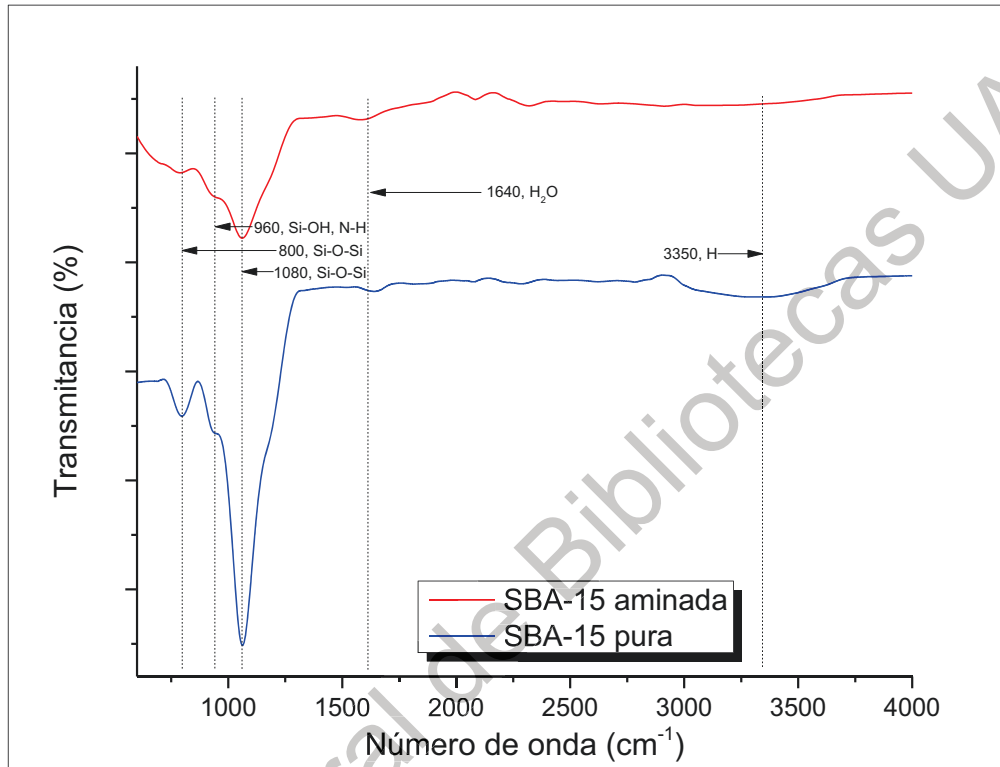


Figura 20. Espectro IR de la SBA-15 pura y aminada.

Tabla 5. Datos del espectro IR de la SBA-15 pura

Número de onda [cm ⁻¹]	Vibración característica
800, 1080	Si-O-Si
960	Si-OH
1640	H ₂ O
3350	H

Tabla 6. Datos del espectro IR de la SBA-15 aminada

Número de onda [cm^{-1}]	Vibración característica
800, 1080	Si-O-Si
960	N-H
1640	H ₂ O

En la Figura 21 se muestran los espectros IR de las construcciones recubiertas con liposomas de PC y PC-PIMs, donde se detectaron bandas características de lípidos (ver Tabla 7), las aparentes diferencias entre ambos espectros es el desfasamiento de la banda $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ (PO_2^-), y las transmitancias que en el caso de la construcción con liposomas de PC son mayores. La asignación de las bandas se hizo en base a lo reportado por Soliman et al. (2015) y Socrates (2001).

Cabe señalar que en estos espectros ya no se muestran bandas características de la SBA-15 ni el grupo amino, por lo que las estructuras han quedado totalmente recubiertas con los liposomas, tal como se mostraron en las imágenes de TEM.

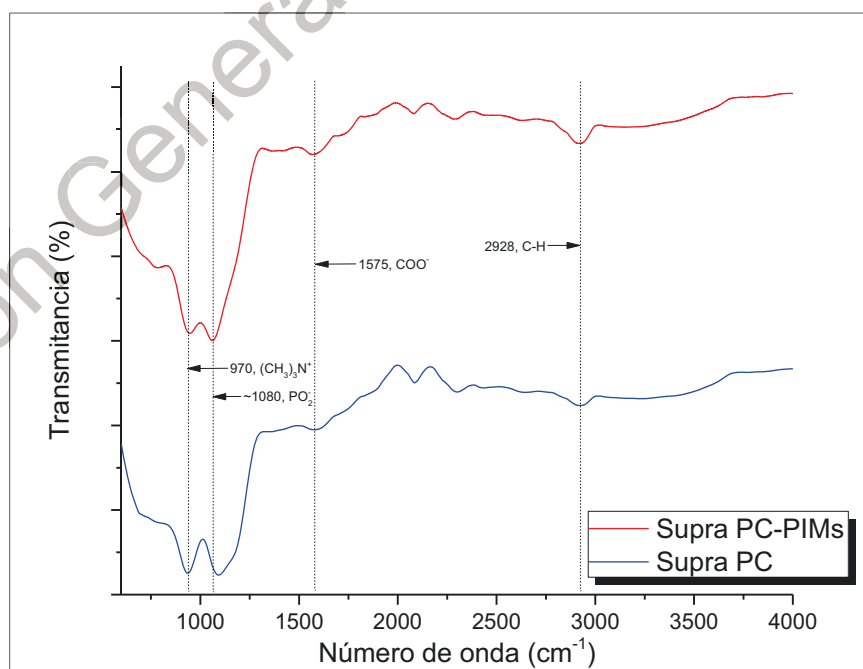


Figura 21. Espectros infrarrojos de las construcciones supramoleculares de PC y PC-PIMs.

Tabla 7. Datos de los espectros IR de las construcciones supramoleculares de PC y PC-PIMs

Número de onda [cm^{-1}]	Vibración característica
970	$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$
1080	PO_2^- estiramiento asimétrico
1575	COO^- estiramiento asimétrico
2928	C-H estiramiento

A continuación, en la Figura 22 se muestran los espectros IR de las construcciones supramoleculares incubadas en plasma.

Las asignaciones de las bandas se hicieron en base a lo reportado por Peraman et al. (2014), Vijaya et al. (2016), Hashad et al. (2017) y Socrates, (2001), Se puede observar que ambos espectros son muy similares, y todas las señales pertenecen a proteínas del plasma humano, ya no se detectan señales pertenecientes a lípidos, por lo que podemos inferir un buen recubrimiento de las construcciones con proteínas del plasma humano y la formación de la bio-corona, en la Tabla 8 se enlistan las bandas identificadas.

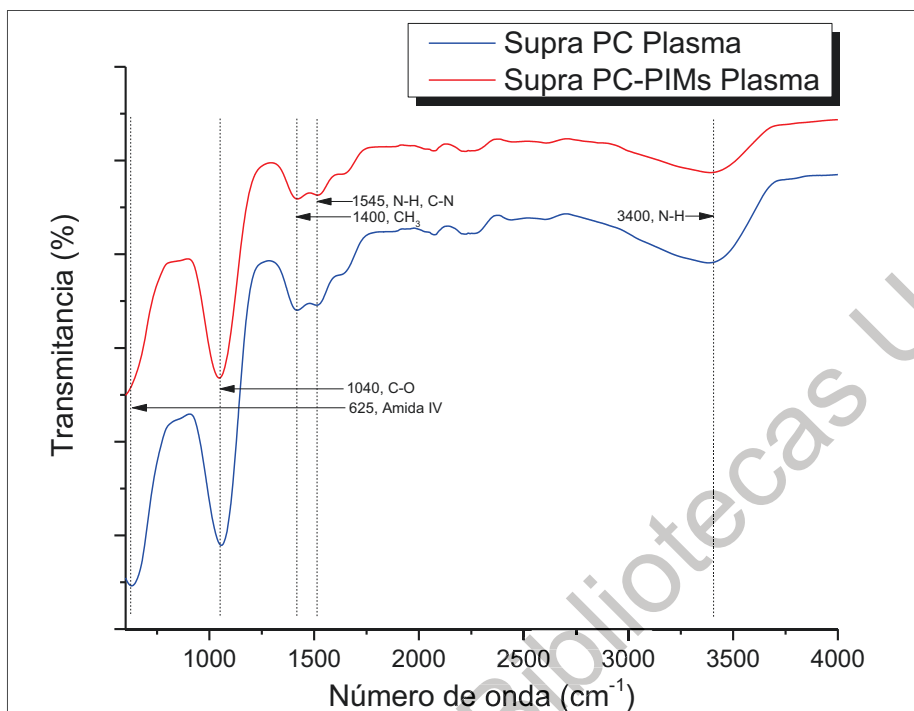


Figura 22. Espectros infrarrojos de las construcciones supramoleculares de PC y PC-PIMs con plasma.

Tabla 8. Datos de los espectros IR de las construcciones supramoleculares de PC y PC-PIMs con plasma

Número de onda [cm ⁻¹]	Vibración característica
625	Amida IV
1040	Amida IV
1400	CH ₃ vibración de flexión simétrica de proteínas
1545	Amida II N-H, C-O
3400	N-H estiramiento asimétrico de amidas secundarias de proteínas

6.6 Espectros Raman

A continuación, se presentan los espectros Raman obtenidos para las nanoestructuras.

En la Figura 23 se muestra el espectro Raman obtenido para la SBA-15, en donde se pueden observar las señales características de las principales moléculas presentes en la superficie de la SBA-15, en la Tabla 9 se enlistan estas señales, las cuales se determinaron a partir de los reportado por Cattaneo et al. (2016), Zhaohua et al. (1999) y Valdemar (2017).

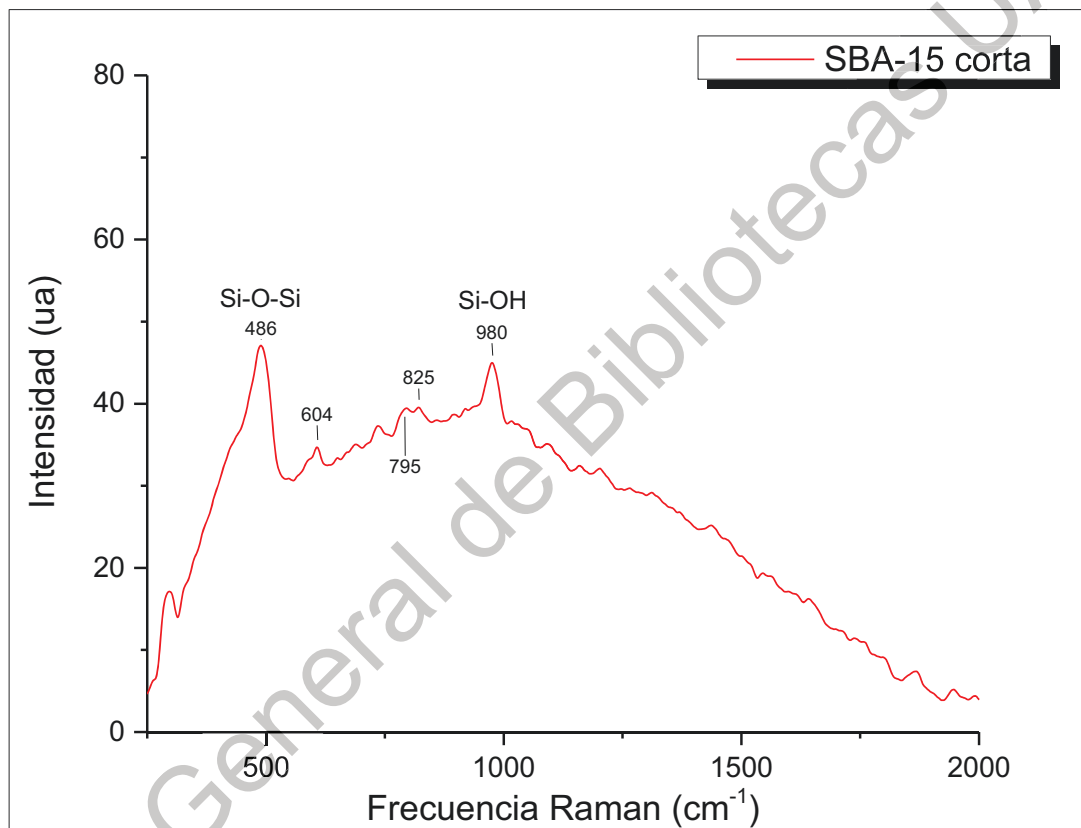


Figura 23. Espectro Raman de la SBA-15 corta pura.

Tabla 9. Datos del espectro Raman de la SBA-15 corta pura

Número de onda [cm^{-1}]	Vibración característica
486 y 604	Anillos siloxano (Si-O-Si)
795 y 825	Enlaces siloxano (Si-O-Si)
980	Silanoles (Si-OH)

En la Figura 24 se muestra el espectro Raman de la SBA-15 aminada, en donde se detectaron bandas características de la SBA-15 pura y bandas pertenecientes al grupo amino, en la Tabla 10 se listan estas bandas, las cuales fueron asignadas en base a lo reportado por Larkin (2017), Cattaneo et al. (2016), Hernández et al. (2012) y Zhaohua et al. (1999)

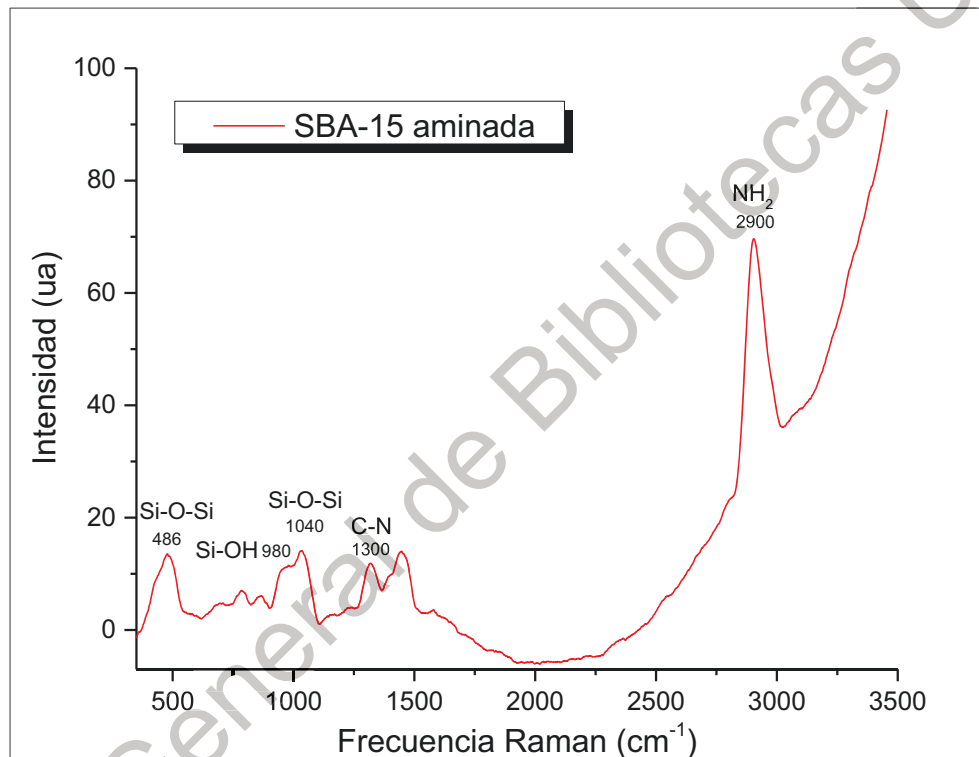


Figura 24. Espectro Raman de la SBA-15 corta aminada.

Tabla 10. Datos del espectro Raman de la SBA-15 aminada

Número de onda [cm ⁻¹]	Vibración característica
486	Anillos siloxano (Si-O-Si)
980	Silanoles (Si-OH)
1040	Si-O-Si
1300	C-N
2900	Estiramiento NH ₂

6.7 Potencial Z

La SBA-15 es una partícula de carga neutra, como indica Valdemar (2017) en su trabajo; al incorporarse el grupo amino a la superficie de la partícula se protona y su potencial eléctrico después de esta funcionalización es de aproximadamente 10.0 mV como se puede observar en la Figura 25, donde se muestra el resultado del análisis de potencial Z de la SBA-15 aminada.

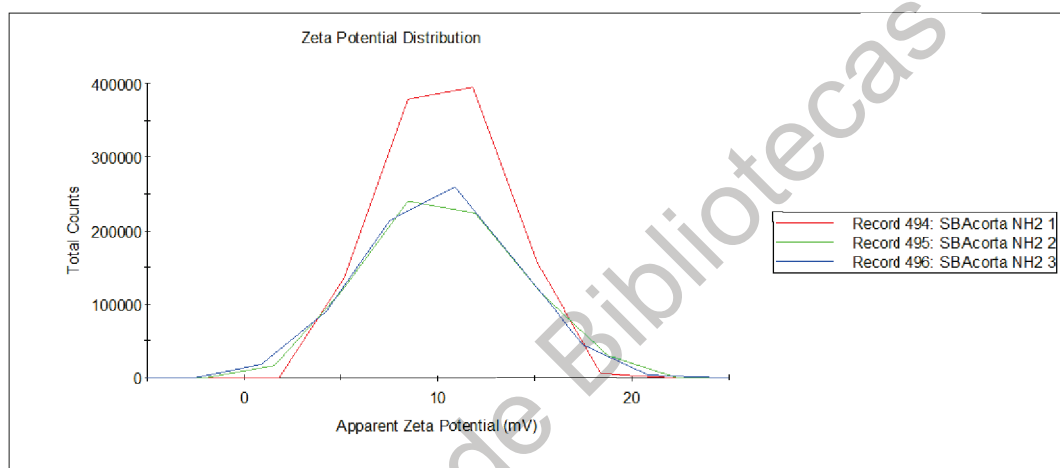


Figura 25. Potencial Z de la SBA-15 aminada.

Posteriormente, cuando la partícula aminada se incuba con liposomas y de PC y PC-PIMs para biomimetizarla, el potencial eléctrico de la partícula cambia, se obtienen potenciales eléctricos negativos, en la Figura 26 se muestra el resultado del potencial Z de partícula recubierta con liposomas de PC, el cual es de -30.4 mV.

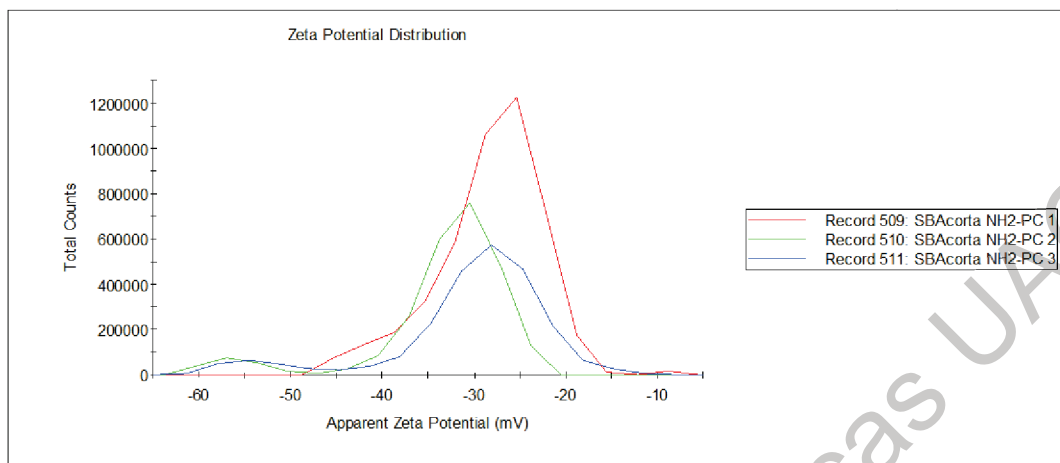


Figura 26. Potencial Z de la SBA-15 funcionalizada y recubierta con liposomas de PC.

Cuando la partícula funcionalizada se recubre con liposomas de PC-PIMs el potencial eléctrico de la partícula es de -43.9 mV , como se muestra en la Figura 27 que aparece a continuación.

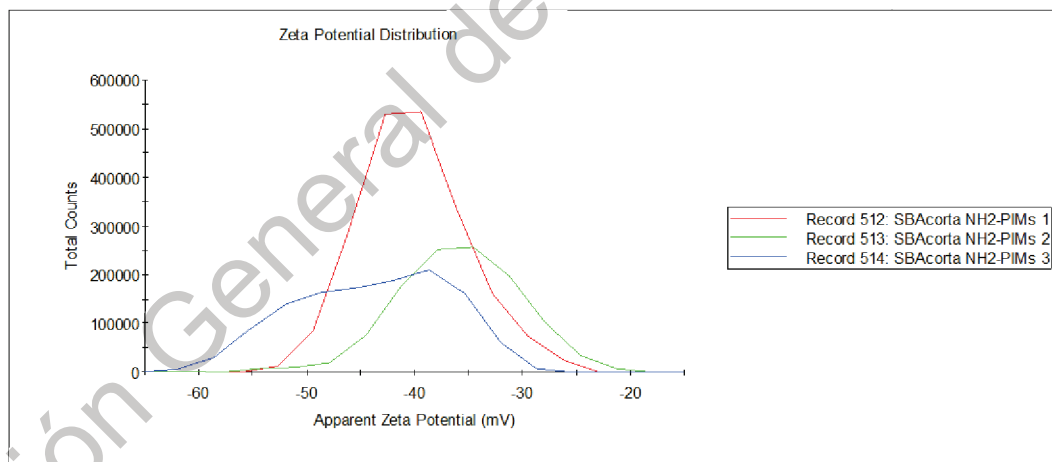


Figura 27. Potencial Z de la SBA-15 funcionalizada y recubierta con liposomas de PC-PIMs.

Los cambios obtenidos en el potencial eléctrico por la presencia de PC o PC-PIMs indican cambios en la superficie de la partícula de SBA-15 aminada, haciéndose más negativo el potencial eléctrico cuando los PIMs están presentes, sugiriendo así la construcción supramolecular del sistema.

6.8 Cuantificación de proteínas

Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico como se describió en el capítulo 5. El análisis se realizó a cinco diferentes muestras humanas, en dilución 1/50, en la Figura 28 se muestra el análisis, y posteriormente se presenta la determinación de la cantidad de proteínas presentes en cada una de las muestras.

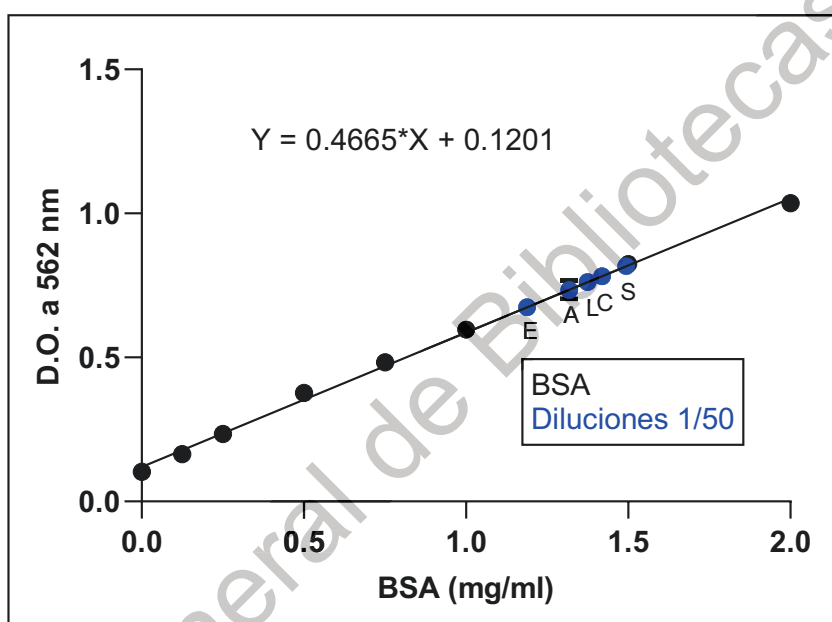


Figura 28. Cuantificación de proteínas por BCA.

E 1/50: 59.39 g/L

A 1/50: 65.90 g/L

S 1/50: 74.67 g/L

L 1/50: 68.74 g/L

C 1/50: 70.94 g/L

La cantidad normal de proteínas totales en plasma humano es de alrededor de 60 hasta 88 g/L, como indican Simon et al. (2016) en su libro, por lo que estas cantidades de proteínas se encuentran dentro del rango.

6.9 Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Inicialmente se realizó un ELISA de diferentes diluciones de las suspensiones con las construcciones supramoleculares (diluciones 1mg/ml, 1/2, 1/4 y 1/8), donde se procedió como se indicó en el capítulo anterior. La lectura de la microplaca mostró las densidades ópticas que se muestran en la Figura 29. En este análisis se observó una nula respuesta colorimétrica debida a la ausencia de anticuerpos en los pozos de control, SBA-15 pura incubada en plasma para la formación de bio-corona, y en las construcciones supramoleculares recubiertas solo con liposomas, tanto en el caso de PC, como PC-PIMs. Por otro lado, como se esperaba, hubo una respuesta colorimétrica debida a la presencia de anticuerpos en los pozos con construcciones supramoleculares de PC y PC-PIMs después de haberse incubado en plasma para la formación de la bio-corona.

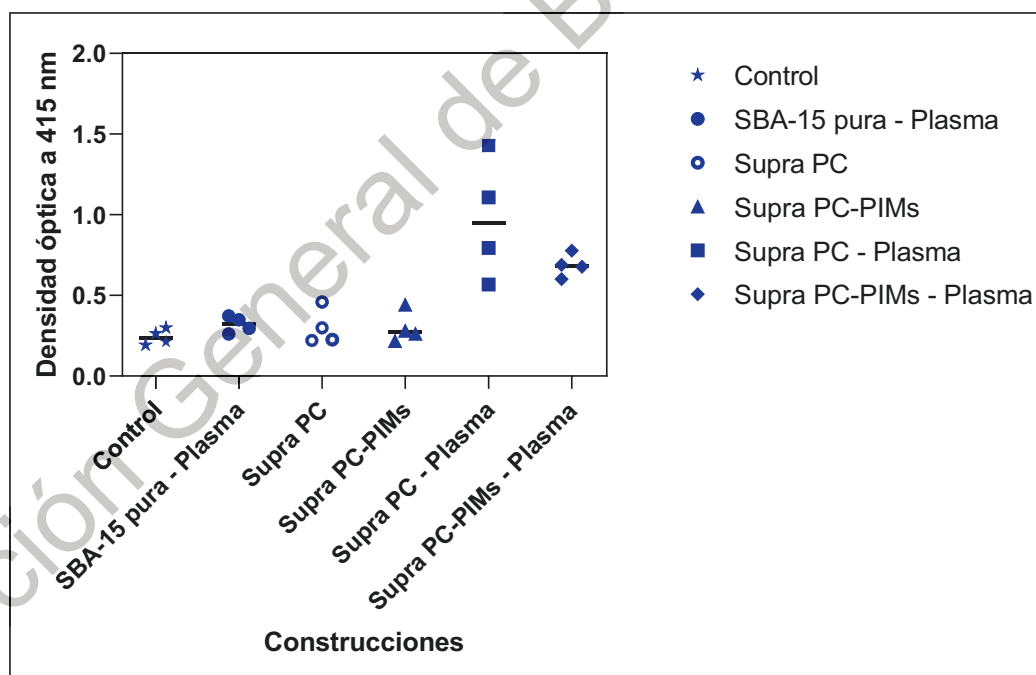


Figura 29. Densidades ópticas a 415 nm de las construcciones supramoleculares en el primer ELISA.

Posteriormente se realizó un segundo ELISA, en donde se emplearon sólo diluciones a 1/2 de las diferentes suspensiones con construcciones

supramoleculares, y se realizaron por triplicado. En la Figura 30 se muestran las densidades ópticas obtenidas de la lectura de la microplaca, en donde nuevamente se mostró una respuesta colorimétrica debida a los anticuerpos en el caso de las construcciones supramoleculares PC con plasma, y PC-PIMs con plasma.

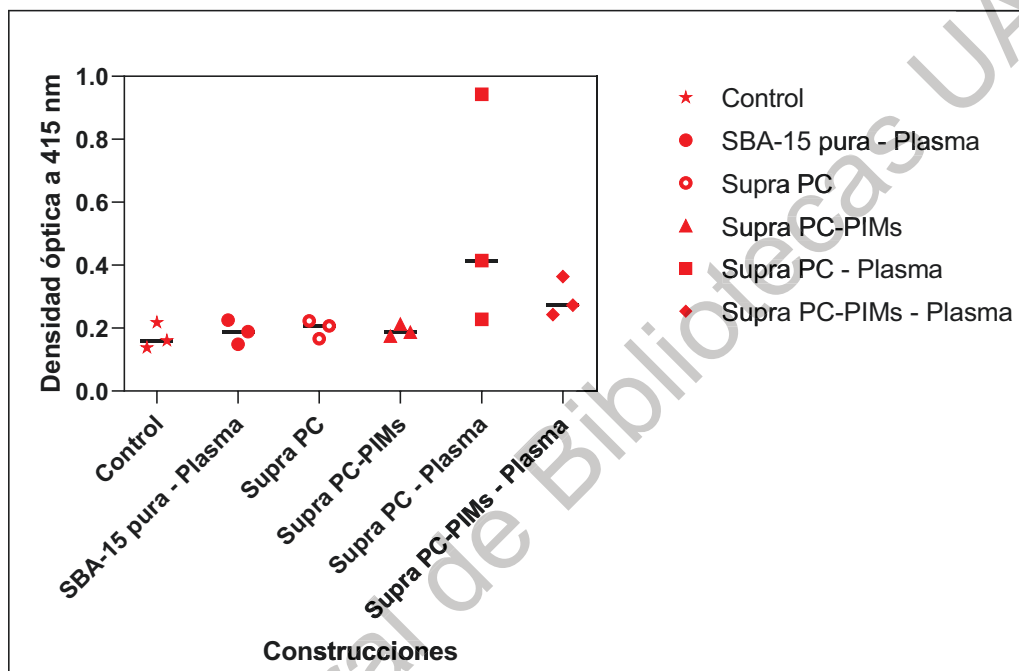


Figura 30. Densidades ópticas a 415 nm de las construcciones supramoleculares en el segundo ELISA.

En base a estos resultados podemos confirmar la adherencia de una gran cantidad de proteínas, entre ellas anticuerpos, además los resultados de TEM anteriormente mostrados también nos dan información de la formación de esta bio-corona de proteínas.

6.10 Trabajos futuros

Sin lugar a duda existe muchísimo trabajo por delante para lograr el desarrollo de la vacuna, existen numerosas técnicas por emplear para definir a detalle este sistema supramolecular, desde cómo es que se va ensamblando, su

comportamiento en distintos medios, su carga eléctrica, el tamaño de la partícula, pruebas in vitro, pruebas in vivo, etc. Por ejemplo:

El análisis de DLS será necesario para determinar el tamaño de las construcciones, además que también dará un indicio del espesor del recubrimiento de liposomas y del espesor de la bio-corona.

El uso de la electroforesis podrá ayudar a determinar las proteínas que se están adhiriendo a la construcción supramolecular.

Una herramienta importante que también podrá ayudar a definir el ensamblaje de este sistema es la simulación mediante algún software como el LAMMPS o Gaussian.

El empleo de marcadores biológicos una vez que se inicie con pruebas in vitro.

Todo esto generará nuevo conocimiento y quizá nuevos caminos para llegar a la meta de este proyecto

Además, todo este trabajo es relevante para publicaciones en revistas indizadas, lo cual será uno de los siguientes pasos.

Capítulo 7

Conclusiones

A partir del análisis de Rayos X a bajos ángulos se logró determinar que a pesar de la modificación a la síntesis tradicional de la SBA-15 su estructura de canales hexagonales no fue alterada aún después de la funcionalización con el grupo amino.

En el análisis TGA de la SBA-15 pura se observó una leve pérdida de peso debido a la presencia de agua. Por otro lado, en el TGA de la SBA-15 aminada se observaron tres puntos de inflexión que no han sido definidos claramente, al parecer existe un desfase de estos puntos, lo cual podría deberse a una mayor estabilidad térmica de la SBA-15 corta en comparación con la SBA-15 tradicional.

A pesar de haber hecho una modificación a la síntesis de la SBA-15 para hacerla más corta, su estructura típica no es afectada, como se pudo observar en las imágenes de SEM, donde se observan los canales y los poros hexagonales, además, se pudo observar un tamaño de partícula de alrededor de 300 nm, y ancho menor a los 100 nm.

En las imágenes de EDS se detectó la presencia de silicio y oxígeno, debido a la SBA-15, además se detectó nitrógeno y carbono, debido al grupo amino, aunque este último no se mapeó. Cabe destacar que la funcionalización de la SBA-15 es de suma importancia, ya que al ser una partícula de carga neutra la funcionalización, en este caso con los grupos amino, ayudó a que los liposomas tuvieran una mejor interacción con la SBA-15.

En las micrografías de TEM se observaron en contraste los recubrimientos bien definidos de la SBA-15 aminada con los liposomas de PC y PC-PIMs. Y después de la incubación en plasma se observó en las micrografías la aglomeración de las construcciones.

En los análisis de IR se pudieron detectar bandas características de la SBA-15 y del grupo amino en las estructuras funcionalizadas. Por otro lado, después del recubrimiento con liposomas todas esas señales desaparecieron y se detectaron bandas pertenecientes a los fosfolípidos, como se esperaba. En el caso de las partículas incubadas en plasma se detectaron bandas características de proteínas, por lo que se determinó la formación de la bio-corona de proteínas, además de lo que se pudo observar en las micrografías de TEM.

Los análisis de microRaman de la SBA-15 y la SBA-15 aminada complementaron la información que se había obtenido inicialmente en los análisis de infrarrojo, donde se detectaron señales características de ciertos grupos funcionales presentes en la superficie de estas estructuras.

El análisis de potencial Z nos ayudó también a confirmar la presencia del grupo amino en la superficie, debido a que la SBA-15 es una partícula de carga neutra y al incorporarle el grupo amino post-síntesis, su potencial eléctrico cambia a 10mV. Además, en los resultados de este análisis se observó un cambio en el potencial eléctrico después de incubar las partículas con los liposomas, ya que pasó de un potencial eléctrico positivo a un potencial negativo, en el caso de las partículas con sólo PC el potencial eléctrico fue de -30.4, y en las partículas con PC-PIMs fue de -43.9.

Los ELISA permitieron detectar la presencia de anticuerpos en la bio-corona formada en las construcciones supramoleculares, sin embargo, para explorar diferencias de proteínas que forman la bio-corona en las construcciones con PC y PC-PIMs se requeriría de análisis proteicos por electroforesis y/o espectrometría de

masas. También se podrían explorar diferencias de comportamiento ante células, por ejemplo, toxicidad y farmacocinética.

El tema de la vacunación es un tema muy polémico, debido a las diversas posturas que se asumen a partir de la situación mundial que se ha vivido a lo largo de la historia, algunas situaciones se han convertido en mitos, pero para otros se han vuelto realidades. La vacunación es un descubrimiento sumamente importante, gracias a esto se han salvado millones de vidas, debido a la erradicación y control, sin embargo, algunos individuos se rehúsan a tomar éstas como medida preventiva a las enfermedades infecciosas que pueden llegar incluso a una pandemia, se debe tomar conciencia de que siempre existe un riesgo de contagio y de diseminación. Recientemente se ha sabido de epidemias en algunos países, países que no toman la suficiente importancia a este tema, es entonces cuando el problema se hace más grave y se convierte en un problema mundial.

Una de las mayores dificultades para encontrar vacunas eficaces contra las enfermedades es que no existe una herramienta inmunológica que pueda predecir la eficacia de una nueva vacuna en estudio, lo que obliga a que sean probadas en largos y costosos estudios, tanto en animales como con miles de voluntarios, especialmente en países endémicos con alta incidencia de enfermedades.

El empleo de PAMPs en la generación de nuevas vacunas es una excelente alternativa, ya que es más seguro y sencillo emplearlos, además de que es posible lograr la respuesta inmune que se busca.

El empleo de liposomas es también una gran herramienta en el área de nanomedicina, y este conocimiento está siendo explotado debido a sus innumerables propiedades, como el biomimetismo, el acarreo y encapsulamiento de moléculas, y en este mismo sentido también el empleo de nanopartículas, como la SBA-15, también ayudan a crear sistemas de administración terapéutica, ya que gracias a sus tamaños nano se tiene una mejor interacción a escala celular.

Finalmente, la Nanotecnología es una ciencia con gran potencial en muchísimas áreas, este trabajo se enfocó en el área de nanomedicina, sin embargo, también se han hecho grandes avances científicos en diversas áreas, como la electrónica, ambiental, en materiales, y las innumerables aplicaciones para cada uno de ellos, ya que es una ciencia multidisciplinaria, por lo que seguramente seguirán surgiendo nuevos inventos que ayuden mejorar y encontrar soluciones en los diversos ámbitos.

Dirección General de Bibliotecas UAG

Bibliografía

Aguilo, Nacho & Uranga, Santiago & Marinova, Dessislava & Monzón, Marta & Badiola, Juan & Martin, Carlos. (2015). MTBVAC vaccine is safe, immunogenic and confers protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis in newborn mice. *Tuberculosis*. 96. 10.1016/j.tube.2015.10.010.

Andrés D. (2015). *Cultura científica 1º Bachillerato*. Madrid: Editex.

Alves, D.A., Mattos, I.B., Hollanda, L.M., & Lancellotti, M. (2013). Use of Mesoporous Silica SBa-15 and SBa-16 in Association of Outer Membrane Vesicles - OMV from *Neisseria meningitidis*.

Banu A., Templeton A., Munshi A., Ramesh R. (2014). Nanodrug Delivery Systems: A Promising Technology for Detection, Diagnosis, and Treatment of Cancer. *PharmSciTech*, vol. 15(3), pp. 709–72.

Corbo, C., Molinaro, R., Parodi, A., Furman, N.E., Salvatore, F., & Tasciotti, E. (2016). The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine*, 11 1, 81-100.

De la Torre, L.G., Rosada, R.S., Trombone, A.P., Frantz, F.G., Coelho-Castelo, A.A., Silva, C.L., Santana, M.H., 2009. The synergy between structural stability and DNA binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE liposomes and DOTAP/DOPE lipoplexes. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 73 (2), 175–184.

De Paula, Lucia & Silva, Celio & Carlos, Daniela & Buzalaf, Camila & Sorgi, Carlos & G Soares, Edson & Souza, Patricia & Zárata-Bladés, Carlos & C S Galleti, Fábio & Bonato, Vania & D C Gonçalves, Eduardo & V G Silva, Erika & Faccioli, Lúcia

Helena. (2007). Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Genetic vaccines and therapy*. 5. 2. 10.1186/1479-0556-5-2.

Demento, S. L., Eisenbarth, S. C., Foellmer, H. G., Platt, C., Caplan, M. J., Mark Saltzman, W., ... Fahmy, T. M. (2009). Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine*, 27(23), 3013-3021. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.034>.

Diaz, Jordi. (2011). Análisis de productos cosméticos mediante técnicas nanoscópicas (SPM). *Revista NCP-Noticias de cosmética y perfumería*. Sociedad española de químicos cosméticos. NCP.

Doustkhah, E., Baghban, A., Assadi, M.H.N. et al. *Catal Lett* (2019) 149: 591. <https://doi.org/10.1007/s10562-018-2643-6>.

Flodström K., Alfredsson V., *Micropor. Mesopor. Mater.* 59 (2003) 167.

Freitas R. Jr. (1999). Section 1.2.2 Volitional Normative Model of Disease. *Nanomedicine, Vol. 1: Basic capabilities*, Landes Bioscience., Pag. 18-20.

Halamová D., Badaničová M., Zeleňák V., Gondová T., Vainio U.. (2010). Naproxen drug delivery using periodic mesoporous silica SBA-15, *Appl. Surf. Sci.* 256, 6489–6494. doi:10.1016/j.apsusc.2010.04.044.

Hashad, Rania & Ishak, Rania & Geneidi, Ahmed & Mansour, Samar. (2017). Surface Functionalization of Methotrexate-loaded Chitosan Nanoparticles with Hyaluronic acid/Human serum albumin: Comparative characterization and in vitro cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 522. 10.1016/j.ijpharm.2017.03.008.

Hernández-Morales V., R. Nava, Y.J. Acosta-Silva, S.A. Macías-Sánchez, J.L. Pérez-Bueno, B. Pawelec. (2012). Adsorption of lead (II) on SBA-15 mesoporous molecular sieve functionalized with –NH₂ groups. *Microporous and Mesoporous Materials* 160 133-142.

Humphrey H.P Yiu, & A Wright, Paul & P Botting, Nigel. (2001). Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 15. 81-92. 10.1016/S1381-1177(01)00011-X.

Imbert F., Guerrero Y., García E., Rodríguez P., Uzcátegui A. y Villarroel M. (2009). Síntesis de SBA-15 y su modificación mediante incorporación de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (mptms). *FARAUTE Ciens. y Tec.*, 4(2): 28-36. ISSN 1698 – 7418.

Izquierdo-Barba I., Sousa E., Doadrio J.C., Doadrio A.L., Pariente J.P., Martínez A., Babonneau F., Vallet-Reg M. (2009). Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 50, 421–429. doi:10.1007/s10971-009-1932-3.

Larkin P. (2017). *Infrared and Raman Spectroscopy, Principles and Spectral Interpretation*. ELSEVIER: 2nd Edition. ISBN: 9780128042090.

Li, Yanjing & Zhou, Guowei & Qiao, Wenting & Wang, Yanyan. (2009). Immobilization of Porcine pancreas lipase on fiber-like SBA-15 mesoporous material. *Materials Science and Engineering: B*. 162. 120-126. 10.1016/j.mseb.2009.03.016.

Lima, K.M., dos Santos, S.A., Santos, R.R., Brandao, I.T., Rodrigues Jr., J.M., Silva, C.L., 2003. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *Vaccine* 22 (1), 49–56.

López L. y Valdemar C. (2018). Patrones moleculares asociados a patógenos: ¿héroes o villanos en nanomedicina? *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* Vol 11, No 20: 53-63. dx.doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.62595.

Martin, Carlos & Aguilo, Nacho & Gonzalo-Asensio, Jesus. (2018). Vacunación frente a tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 36. 10.1016/j.eimc.2018.02.006.

Meerak, J., Wanichwecharungruang, S.P., Palaga, T., 2013. Enhancement of immune response to a DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B by incorporation of an autophagy inducing system. *Vaccine* 31 (5), 784–790.

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240-273, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>.

Pai M., M.A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C.C. Boehme, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies, Tuberculosis, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2 (2016) 1–23. doi:10.1038/nrdp.2016.76.

Peek L. J., Middaugh C. R., Berkland C. (2008). Nanotechnology in Vaccine Delivery. *Advance Drugs Delivery Reviews*. 60, 915-928.

Puentes, V. y Saldaña, J. (2015). Nano-oncology, the turning point: Discover the wave of knowledge that makes fighting cancer with nanotechnology real. Barcelona, España. nanowiki.info / ebook series #4.

Peraman, Ramalingam & Padmanabha, Reddy & Kumar, K & RAO, CH & Kuppusamy, Rajendran. (2014). Evaluation of metformin hydrochloride in Wistar rats by FTIR-ATR spectroscopy: A convenient tool in the clinical study of diabetes. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 5. 288-92. 10.4103/0976-9668.136168.

Rasmussen, Martin & Kardjilov, Nikolay & L. P. Oliveira, Cristiano & Watts, Benjamin & Villanova, Julie & Fongaro Botosso, Viviane & Sant'Anna, Osvaldo & Fantini, Marcia & Bordallo, Heloisa. (2019). 3D visualisation of hepatitis B vaccine in the oral delivery vehicle SBA-15. *Scientific Reports*. 9. 6106. 10.1038/s41598-019-42645-5.

Shi, X., Festa, R. A., Ioerger, T. R., Butler-Wu, S., Sacchettini, J. C., Darwin, K. H., & Samanovic, M. I. (2014). The Copper-Responsive RicR Regulon Contributes to Mycobacterium tuberculosis Virulence. *MBio*, 5(1), e00876-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00876-13>.

Silvia Cattaneo, Alice & Ferrara, Chiara & Carlo Villa, Davide & Angioni, Simone & Milanese, Chiara & Capsoni, Doretta & Grandi, Stefania & Mustarelli, Piercarlo & Allodi, Valentina & Mariotto, Gino & Brutti, Sergio & Quartarone, Eliana. (2016). SBA-15 mesoporous silica highly functionalized with propylsulfonic pendants: A thorough physico-chemical characterization. *Microporous and Mesoporous Materials*. 219. 219. 10.1016/j.micromeso.2015.08.011.

Simon, T. L., McCullough, J., Snyder, E. L., Solheim, B. G., & Strauss, R. G. (2016). *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. John Wiley & Sons.

Socrates G. (2001). *Infrared and Raman characteristics Group Frequencies*. John Wiley & Sons, LTD: England. ISBN 0 470 09307 2.

Soliman, Ghareb & Fathalla, Dina & Fouad, Ehab. (2015). Development and in vitro/in vivo Evaluation of Liposomal Gels for the Sustained Ocular Delivery of Latanoprost. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*. 6. 10.4172/2155-9570.1000390.

Sompayrac L.M., (2012). "How the Immune System Works". United Kingdom: John Wiley & Sons, 3-13.

Song S.-W., Hidajat K., Kawi S. (2005). Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix-Drug Interactions, *Langmuir*. 21, 9568-9575. doi:10.1021/la051167e.

Sosunov, V., Mischenko, V., Eruslanov, B., Svetoch, E., Shakina, Y., Stern, N., Majorov, K., Sorokoumova, G., Selishcheva, A., Apt, A., 2007. Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (5), 919-925.

Szewczyk, Adrian & Prokopowicz, Magdalena. (2018). Amino-modified mesoporous silica SBA-15 as bifunctional drug delivery system for cefazolin: Release profile and mineralization potential. *Materials Letters*. 227. 136-140. 10.1016/j.matlet.2018.05.059.

Valdemar C. (2017). Tesis de maestría: "Nanoestructura de sílice en construcción supramolecular para vacunación". Universidad Autónoma de Querétaro.

Van Speybroeck M., Barillaro V., Thi T.D., Mellaerts R., Martens J., Van Humbeeck J., Vermant J., Annaert P., Van den Mooter G., Augustijns P. (2009). Ordered mesoporous silica material SBA-15: a broad-spectrum formulation platform for poorly soluble drugs, *J. Pharm. Sci.* 98, 2648–2658. doi:10.1002/jps.21638.

Vijaya U., Ahmed K., Ahmad A. (2016). A study on infrared spectroscopy of human blood. *International Journal of Science, Environment and Technology*, Vol. 5, No 3, 2016, 1189 – 1192. ISSN 2278-3687.

Wan M.M., Li Y.Y., Yang T., Zhang T., Sun X.D., Zhu J.H. (2016). In Situ Loading of Drugs into Mesoporous Silica SBA-15, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 22, 6294–6301. doi:10.1002/chem.201504532.

Wang, D., Xu, J., Feng, Y., Liu, Y., McHenga, S.S., Shan, F., Sasaki, J., Lu, C., 2010. Liposomal oral DNA vaccine (mycobacterium DNA) elicits immune response. *Vaccine* 28 (18), 3134–3142.

Willey, N. J., Madhankumar, A. B., Mitchell, R. M., Neely, E. B., Rizk, E., Douds, G. L. et al. (2012). Lipopolysaccharide modified liposomes for amyotrophic lateral sclerosis therapy: Efficacy in SOD1 mouse model. *Adv. Nanopart.*, 1: 44-53. doi:10.4236/anp.2012.13007.

Zaru R. Receptores que reconocen patrones (PRRs). (2018). British Society for Immunology (BSI), Universidad de Dundee, Reino Unido.

Zhaohua Luan, Estelle M. Maes, Paul A. W. van der Heide, Dongyuan Zhao, Roman S. Czernuszewicz, and Larry Kevan. (1999). Incorporation of Titanium into

Mesoporous Silica Molecular Sieve SBA-15. Chem. Mater.199911123680-3686.
Publication Date:November 25, 1999. <https://doi.org/10.1021/cm9905141>.

Zhu, B. dong, Qie, Y. qing, Wang, J. ling, Zhang, Y., Wang, Q. zhong, Xu, Y., & Wang, H. hai. (2007). Chitosan microspheres enhance the immunogenicity of an Ag85B-based fusion protein containing multiple T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 66(3), 318-326. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.028>.

Dirección General de Bibliotecas UAO

Anexo I

Una apreciación simple de la inmunología

Yo: “Inmunidad, ¿qué pasa? ¿Por qué tengo 40 grados de fiebre?”

Inmunidad: “Puse pirógenos al torrente sanguíneo que alcanzaron el centro de termorregulación en el hipotálamo, y eso cambió el punto de equilibrio hacia la producción de calor”.

Yo: “¡Al diablo con la fisiología! ¿Para qué tanto?”

Inmunidad: “Se ha detectado una invasión de un virus que no puede existir durante mucho tiempo a una temperatura de 40 grados, por lo que puse pirógenos al torrente sang...”

Yo: “¿Y yo? ¡Tampoco puedo existir durante mucho tiempo con 40 grados de fiebre!”

Inmunidad: “Se ha detectado una invasión de un virus que...”

Cerebro: “Terminen la conversación, apago la conciencia como el proceso que consume más energía en el cuerpo, todavía necesitamos calentarnos hasta 41 grados”.

Yo: “¿Para qué?”

Inmunidad: “Se ha detectado una invasión de un virus que...”

Cerebro: “Inmunidad, ya no puede oírte. Solo esto... no voy a calentar hasta los 42”.

Inmunidad: “Se ha detectado una invasión del cerebro que...”

Cerebro: “Bueno, me has convencido, parlanchín”.



Yo: “Hola chicos”.

Cerebro e inmunidad en coro: “Pero, ¿cómo es eso?”

Yo: “Les presento a paracetamol”.

Paracetamol: “Hipotálamo, ¿podrías reducir la sensibilidad de tus receptores a los pirógenos?”

Hipotálamo: “Fácil”.

Inmunidad: “Y qué, ¿podrías hacerlo?”

Virus: “¡Síiii! 37.2! Viviréeee!”

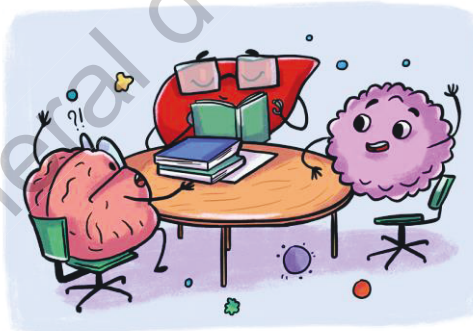
Inmunidad: “¡Pero no! ¡Hígado!”

Hígado (se distrae del ahorro de glucógeno): “¿Qué?”

Inmunidad: “Activa el citocromo P450”.

Hígado (bostezando): “¿Cuál?”

Inmunidad (aturdido): “¿Hay varios?”



Hígado (poniéndose gafas, hablando en un tono de mentor): “Los citocromos se encuentran en todos los reinos de organismos vivos, se conocen más de 50 mil variantes diferentes de la enzima, y ahora voy a nombrar a todos...”

Inmunidad: “Para, no hables de todo. ¿Qué hay en contra del paracetamol?”

Hígado (revisando los manuales): “Bueno... CYP2E1 y CYP3A4, pero depende de lo que hagamos: glucuronización, sulfatización o N- hidroxilación, porque si debemos tener en cuenta los siguientes puntos...”

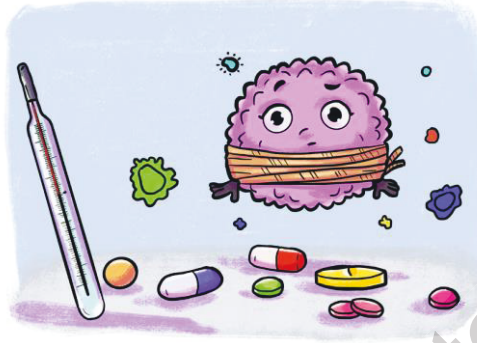
Inmunidad: “¿Te estás burlando de mí? Activa todo”.

Hígado: “¿Estás seguro?”

Cerebro: “Mmm... Inmunidad, el hígado tiene razón, hablémoslo”.

Inmunidad: “¡Cállense los dos! Yo estoy a cargo de la Operación ‘Infección’. Entonces, hígado, activa los citocromos. Cerebro, desconecta a este idiota”.

Yo: “No funcionará: ya tengo 36.6”.



N-acetil-p-benzoquinoneimina: Hola a todos. (Saca unas tijeras y comienza a cortar los hepatocitos).

Inmunidad: “¿Y este quién es?”

Hígado: “... y en este caso, alrededor del 15 % del paracetamol irá por este camino, como resultado de lo cual obtendremos un metabolito alquilante extremadamente activo y poderoso llamado... Ah, ya está aquí. Inmunidad, resuélvelo”.

Inmunidad: “¿Por qué estoy?”

Hígado: “Bueno, tú insististe”.

Inmunidad: “No sé nada de esto, tengo un virus, tengo mi tarea”.

Hígado: “Oye, cerebro, ¿quieres una insuficiencia hepática aguda?”

Cerebro: “¿Eres tonto? ¡Por supuesto que no!”

Hígado: “Entonces piensa qué haremos con la N-acetil-p-benzoquinoneimina”.

Cerebro (revisando la memoria a largo plazo en el hipocampo): “¡Activemos glutatión!”

Hígado (mirando los manuales): “Oh, ¡verdad! Hay grupos sulfhidrilo allí. ¡Excelente!”

N-acetil-p-benzoquinoneimina: “Eh, paren, es irreversible”.

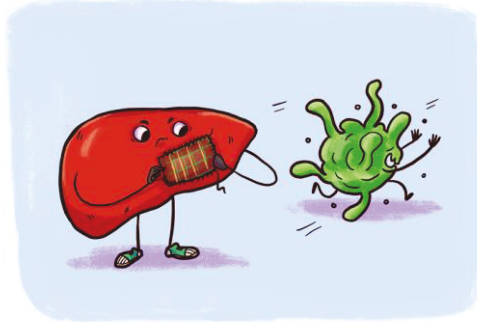
Hígado: “Lo sé. Glutatión, ¡ataca!”

Glutatión: ¡Muerdo!

Virus: “Ya estoy en cardiomiocitos”.

Yo: “Inmunidad, ¿qué pasa?”

Inmunidad: “No sé nada, tengo las manos atadas, la temperatura es normal, resuélvanlo ustedes mismos”.



Yo: “¿Y cuánto necesitas?”

Inmunidad: “Al menos 38.5”.

Yo: “Cerebro, ¿podemos devolverlo como estaba?”

Cerebro: “Bueno... ¿Hipotálamo?”

Hipotálamo: “Sí, ya podemos, el hígado ha desarmado todo el paracetamol”.

Hígado (cosiéndose otro parche): “Me esforcé mucho, por cierto”.

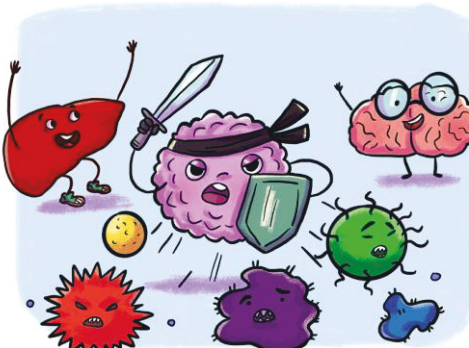
Yo: “Bueno, cuando me recupere, te daré glucosa de unos pasteles”.

Hígado (soñador): “Me hago otra bodega para glucógeno”.

Páncreas: “Escucho todo”.

Hipotálamo: “38.5”.

Inmunidad: “Bueno, ¡ahora termino con él!”. *(Acelera la síntesis de anticuerpos, activa los linfocitos asesinos).*



Virus: “¡Oh!”.

Anticuerpos (cubriéndolo al Virus): “Nuestro tesoro”.

Macrófagos: “¡Muerdo!”

Linfocitos asesinos: “¡Bam!”

Virus: “Volveré...”.

Inmunidad: “Ni lo sueñes, me acuerdo de ti”.

Hipotálamo: “Bueno, ¿se puede devolver el punto de equilibrio?”

Todos en coro: “¡Se debe!”

Yo: “Uh. Lo lograron”.

Inmunidad: “Invasión de bacterias detectada. ¡Pirógenos, prepárense!”

Todos: “¿Pero será posible?”

¿Cómo luchas contra un resfriado? ¿Inmediatamente comienzas a tomar los antipiréticos o esperas a que el sistema inmunitario haga frente a la enfermedad?

Autor: Alexey Vodovozov
Ilustradora: Anna Syrovatkina