



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

SÍLICES NANOPOROSAS CON MIMETISMO DE SUPERFICIES MICROBIANAS- UNA
PROPUESTA PARA FINES DE VACUNACIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARLOS MANUEL VALDEMAR AGUILAR

TUTOR

DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Never at rest
tortured by energy
wasted prodigiously by the sun
poured into space.
A mite makes the sea roar.
Deep in the sea
all molecules repeat
the patterns of another
till complex new ones are formed.
They make others like themselves
and a new dance starts.
Growing in size and complexity
living things
masses of atoms
DNA, protein
dancing a pattern ever more intricate.
Out of the cradle
onto dry land
here it is standing:
atoms with consciousness;
matter with curiosity.
Stands at the sea, wondering: I
a universe of atoms
an atom in the universe.

-Richard Feynman (modificado)

I. Agradecimientos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Nanobio-óptica, del departamento de Nanotecnología en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla.

Agradezco el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de una beca para la realización del Doctorado en Ciencias Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México. También agradezco el apoyo financiero para la realización de mi proyecto a la UNAM, a través del proyecto PAPIIT IT200421, y al CONACyT, a través del proyecto de Fronteras de la Ciencia 2019-53395.

Primeramente, quisiera agradecer a mi tutora principal la Dra. Luz María López Marín por su paciencia, su guía, y apoyo a través de mi posgrado. Es y seguirá siendo una de las mayores influencias en mi forma de trabajar en la ciencia. Su personalidad, curiosidad y honestidad son lecciones de vida, así como la manera de trabajar en el campo de la investigación. Gracias por su tutoría, su ayuda y buen humor en el laboratorio, y por ser la persona que me dio la confianza de perseguir el sueño de ser un investigador.

A mi comité tutor, la Dra. Romina Rodríguez Sanoja y la Dra. Yolanda López Vidal por sus consejos en los tutorales, así como sus palabras de aliento e interés a través de mi posgrado.

A la Dra. Blanca Edith Millan Chiu, Dr. Josué David Mota Morales, Dr. Gonzalo Ramírez García, Dr. Ravichandran Manisekaran, Dr. Edgar Jimenez Cervantes Amieva y al Dr. Jorge

Luis Domínguez Juárez por apoyarme en mis prácticas de tutorales y examen, las discusiones de artículos y por motivarme a avanzar durante mi posgrado.

Al Dr. Miguel De Icaza Herrera y al Dr. Pedro Salas Castillo por esas mañanas y tardes de café. Por enseñarme a cómo preparar y disfrutar una buena taza de café y dejarme participar en las discusiones de diferentes temas de conversación. Gracias infinitas por permitirme ser su amigo.

Al laboratorio de Nanobio-óptica, Armando, Juan, María, Giovana y Damian, por ayudarme en los experimentos, enseñarme protocolos y su amistad, soy afortunado al pertenecer a un laboratorio muy amigable.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo técnico de la Unidad de Microscopía y de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla. Agradezco al personal académico: Ing. Elsa Nydia Hernandez Ríos y M. en C. Ma. Lourdes Palma Tirado y M. en C. Adriana González Gallardo.

A Edgar, Yerry, Charly, Gis, Mando, Pulido, Gilberto, Amir, Lechuga, Gibran, Willy, Jorge, y Luis. Por su amistad y su atención, por creer en mí y en el futuro que estoy intentando alcanzar.

A Ana María Gómez Coutiño, por estar a mi lado durante los procesos más complicados del posgrado, por motivarme a avanzar y ser mejor en cada aspecto de mi vida, y por estar conmigo cuando pensé que todo se desmoronaba. Te debo gran parte de mi salud emocional y mental, a ti mi gratitud infinita.

Finalmente, a mis padres Juan Manuel Valdemar Larrañaga y Carlota Corina Aguilar García-Méndez, y a mis hermanos Fernando Valdemar Aguilar y Raúl Valdemar Muzquiz. Me enseñaron a luchar y me permitieron soñar en lo que puedo llegar a ser. Detrás de mis éxitos y logros están su amor y su apoyo, estos que nunca han dejado de llegar.

Contenido

I. Agradecimientos	3
II. Lista de Figuras y Tablas	9
III. Resumen	12
IV. Abstract	13
V. Capítulo I	14
A. Introducción	14
1. <i>El sistema inmunitario humano</i>	15
2. <i>Vacunas y adyuvantes</i>	18
3. <i>Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs):</i>	22
4. <i>Receptores tipo Toll (TLR)</i>	23
5. <i>Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)</i>	25
6. <i>Fosfatidil-inositol manósidos, ligandos de TLR2</i>	27
7. <i>Vacunas fabricadas mediante nanotecnología</i>	29
VI. Planteamiento del problema	31
VII. Hipótesis	36
VIII. Objetivos	36
A. General	36
B. Particulares.....	36
IX. Material y Métodos.....	38
A. Síntesis de la sílice mesoporosa SBA-15.....	38
B. Funcionalización de partículas SBA-15 aminadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). 39	
C. Obtención de fosfatidil-inositol manósidos (PIMs) de <i>M. tuberculosis</i>	39
D. Cultivo de <i>M. bovis</i> BCG cepa México	40
E. Obtención de fosfatidil-inositol manósidos (PIMs) de <i>M. bovis</i> BCG cepa México	41
F. Preparación de liposomas con PIMs de <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. tuberculosis</i>	41
G. Preparación de partículas híbridas SBA@liposomas.....	43
H. Caracterización estructural de las muestras	43
1. <i>Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	43
2. <i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>	44
3. <i>Potencial Zeta</i>	44
4. <i>Isotermas de adsorción-desorción de N₂ a 77° K</i>	44
5. <i>Caracterización de lípidos de M. bovis BCG cepa México</i>	45

I.	Interacción de partículas híbridas con cultivos celulares.....	46
1.	<i>Cultivo celular de monocitos de origen humano THP-1</i>	46
2.	<i>Microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC)/Nomarski</i>	47
3.	<i>Análisis de expresión de receptores y proteínas en macrófagos THP-1 por fluorescencia y microscopía confocal</i>	47
4.	<i>Análisis de la expresión de TLR2 en macrófagos THP-1 por citometría de flujo</i>	48
5.	<i>Análisis de citocinas generadas en macrófagos THP-1 tratados con partículas híbridas</i> .	49
6.	<i>Caracterización de partículas híbridas mediante espectroscopía infrarroja</i>	49
7.	<i>Síntesis de nanopartículas de oro con Concanavalina A (AuNp@ConA)</i>	50
8.	<i>Caracterización de partículas PIM@SBA15 con AuNp@ConA</i>	51
X.	Capítulo 2	52
A.	Resultados y discusión	52
1.	Caracterización y funcionalización de partículas SBA-15.....	52
a)	Propiedades texturales (XRD, BET)	52
b)	Morfología y Tamaño	54
c)	Cationización de las partículas aSBA-15 (FTIR, Potencial Zeta).....	55
2.	Caracterización estructural de las partículas híbridas SBA 15-liposoma	59
a)	<i>Caracterización de componentes y estructuras membranales (lípidos de BCG, liposomas)</i>	59
b)	<i>Caracterización y funcionalización de partículas SBA-15</i>	65
3.	<i>Producción de partículas híbridas aSBA15-liposomas</i>	68
a)	Desarrollo de estrategias de análisis de partículas híbridas SBA-15-liposomas	68
b)	Detección mediante SERS y partículas funcionales.....	70
4.	<i>Potencial de partículas híbridas SBA-15-liposomas para fines de vacunación</i>	73
a)	Evaluación de biocompatibilidad de las partículas híbridas en cultivos celulares <i>in vitro</i> en línea primaria de fibroblastos gingivales.....	73
b)	Incubación de partículas híbridas con macrófagos derivados de monocitos THP-1 para evaluar expresión de TLR-2	77
c)	Producción de citocinas proinflamatorias de macrófagos derivados de monocitos THP-1.....	82
d)	Destino intracelular del vector adyuvante PIM@SBA-15 en macrófagos derivados de monocitos THP-1	84
XI.	Capítulo 3	90
A.	Conclusiones	90
B.	Perspectivas	92

XII. Capítulo 4.....	93
B. Referencias	93
XIII. Capítulo 5.....	110
A. Producción en Investigación	110

II. Lista de Figuras y Tablas

TABLA 1 DESARROLLO Y CLASIFICACIÓN DE VACUNAS.	20
TABLA 2 PROPORCIÓN DE LÍPIDOS PARA LA FORMACIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMINARES.	42
TABLA 3 BANDAS CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL ANALIZADO POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	64
TABLA 4 BANDAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBOHIDRATOS ENCONTRADOS EN PIM@SBA-15 Y DE LA CONCAVALINA A.....	71
FIGURA 1. ESQUEMA DE HEMATOPOYESIS DEL SISTEMA INMUNITARIO	16
FIGURA 2. GRÁFICO GENERAL DE LA RESPUESTA INMUNITARIA. LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INNATO SON ACTIVADAS 1) AL DETECTAR LA PRESENCIA DEL PATÓGENO Y FAGOCITAN AL PATÓGENO. DESPUÉS LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS, ETC.) QUE HAN FAGOCITADO Y DEGRADADO AL PATÓGENO 2) MIGRAN HACIA LOS NODOS LINFÁTICOS. EN LOS NODOS LINFÁTICOS SE ENCUENTRAN LA MAYORÍA DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA ADAPTATIVO (CÉLULAS B Y T), Y SE INICIA EL PROCESO DE 3) PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO. FINALMENTE, EL SISTEMA ADAPTATIVO MADURA UNA 4) RESPUESTA ESPECIFICA HACIA EL PATÓGENO, MEDIANTE ANTICUERPOS Y CÉLULAS T EFECTORAS.	17
TABLA 1 DESARROLLO Y CLASIFICACIÓN DE VACUNAS.	20
TABLA 2 PROPORCIÓN DE LÍPIDOS PARA LA FORMACIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMINARES.	42
FIGURA 3. A) ISOTERMAS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE N ₂ DE SBA-15 Y B) DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETRO DE PORO DE LAS PARTÍCULAS SBA-15, DE ACUERDO CON EL MÉTODO DE BET	53
FIGURA 4. IMAGEN OBTENIDA POR SEM DE LAS PARTÍCULAS SBA-15 SINTETIZADAS A) INDICANDO CON POLÍGONOS PUNTEADOS UN RODILLO DE FORMA BACILAR DE ALREDEDOR DE 1 μM DE LARGO, Y B) LOS NANOPOROS HEXAGONALES ORDENADOS DE LA SBA-15	55
FIGURA 5. POTENCIAL ZETA PARTÍCULA A) SBA-15 Y B) SBA-15-NH ₂ . CADA COLOR REPRESENTA UN ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE LA MUESTRA BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.	56
FIGURA 6. POTENCIAL Z DE PARTÍCULAS DE SBA-15 DECORADAS CON PIMs DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> , <i>REALIZADOS EN PBS 1X A DIFERENTE PH. LA LÍNEA ROJA REPRESENTA LOS VALORES DEL POTENCIAL ZETA OBTENIDOS DE LAS PARTÍCULAS PIM@SBA-15 Y LA LÍNEA NEGRA LOS VALORES DE PC@SBA-15. LA GRÁFICA MUESTRA LOS VALORES OBTENIDOS DE UN EXPERIMENTO POR TRIPLICADO.</i>	58
FIGURA 7. ESTRATEGIA PARA EL RECUBRIMIENTO DE UNA PARTÍCULA MESOPOROSA CON LIPOSOMAS QUE CONTIENEN PIMs O LIPOSOMAS CONTROL	60
FIGURA 8. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE PIMs DEL BCG CEPA MÉXICO. LA ELUCIÓN SE LLEVÓ A CABO CON UN SOLVENTE POLAR CLOROFORMO/METANOL:AGUA (60:35:8 v/v/v) Y SE REVELÓ LA PLACA A) CON AZUL DE MOLIBDENO Y B) CON ANTRONA. EN LA LÍNEA 1 SE COLOCARON PIMs SIN PURIFICAR Y EN LAS LÍNEAS 2-6 SE COLOCARON LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PURIFICACIÓN DE PIMs. EN EL CARRIL L1 SE MUESTRA UN GLICOLÍPIDO NO FOSFORILADO DE ESTRUCTURA DESCONOCIDA (FLECHA AMARILLA).	62
FIGURAS 9. TEM DE LIPOSOMAS UNILAMINARES DE PC CON PIMs DE BCG	63
TABLA 3 BANDAS CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL ANALIZADO POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	64

FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15. EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN FTIR DE LAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS MUESTRAN SEÑALES DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE LA ESTRUCTURA INORGÁNICA (SÍLICE) Y DE LOS LÍPIDOS. LOS RECUADROS B) Y C) REPRESENTAN LA MAGNIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE ADSORCIÓN DE 1500-1640 Y 2800 A 3200 cm^{-1} DE LA PARTÍCULA ASBA-15. GRÁFICA REPRESENTATIVA DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.	65
FIGURA 11. MAPEO DE RAYOS X EMITIDOS POR LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS PARTÍCULAS A) ASBA-15 Y B) PIM@SBA-15. SE MUESTRA EN ROJO LA SEÑAL DE SILICIO, Y EN VERDE LA SEÑAL DE CARBONO.....	66
FIGURA 12. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15. IMÁGENES DE TEM A) MUESTRA SBA-15 (NO RECUBIERTA), B) PARTÍCULA DE SBA-15 DECORADA CON LIPOSOMAS CON PIMS DESPUÉS DE TINCIÓN NEGATIVA.	67
TABLA 4 BANDAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBOHIDRATOS ENCONTRADOS EN PIM@SBA-15 Y DE LA CONCANAVALINA A.....	71
FIGURA 13. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15 POR SERS. LAS LÍNEAS PUNTEADAS NEGRAS SON LAS BANDAS PARA CARBOHIDRATOS, Y LAS BANDAS DE COLOR MORADO PERTENECEN A LA CONCANAVALINA A. GRÁFICA REPRESENTATIVA DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.....	72
FIGURA 14. ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS A 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON ASBA-15, PC@SBA-15 Y PIM@SBA-15. ENSAYO COLORIMÉTRICO MTT. ANÁLISIS POR T STUDENT $P < 0.05$. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM.	75
FIGURA 15. ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS A 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON ASBA-15, PC@SBA-15 Y PIM@SBA-15. ENSAYO COLORIMÉTRICO MTT. ANÁLISIS POR T STUDENT $P < 0.05$. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM.	76
FIGURA 16. DIAGRAMA DE FLUJO PARA OBTENER MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS THP-1 Y LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS DESARROLLADAS	78
FIGURA 17. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 6 HORAS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), BICAPA LIPÍDICA SUPERFICIAL EN PARTÍCULAS CON RHO-PE (ROJO) Y RECEPTOR TLR2 CON FITC (VERDE). DENTRO DE LOS CÍRCULOS AMARILLOS SE MUESTRA VESÍCULAS DE GRAN TAMAÑO. IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μM	80
FIGURA 18. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 12 HORAS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), BICAPA LIPÍDICA SUPERFICIAL EN PARTÍCULAS CON RHO-PE (ROJO) Y RECEPTOR TLR2 CON FITC (VERDE). DENTRO DE LOS CÍRCULOS AMARILLOS SE MUESTRA VESÍCULAS DE GRAN TAMAÑO. IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μM	80
FIGURA 19. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DEL EFECTO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS EN LA EXPRESIÓN DE TLR2 EN MACRÓFAGOS THP-1. A) ESTRATEGIA DE ANÁLISIS UTILIZADA A PARTIR DE LA POBLACIÓN "MACROPHAGES" EN EL DOT PLOT FSC-A/SSC-A. B) DE ESTA POBLACIÓN SE ANALIZÓ LOS MACRÓFAGOS THP-1 FITC+. C) EL ANÁLISIS DEL INCREMENTO DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA	

SOBRE LOS MACRÓFAGOS THP-1 SIN TRATAMIENTO (CTL) Y CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. D) ANÁLISIS POR T STUDENT $P < 0.05$. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 6 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM.	82
FIGURA 20. EXPRESIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS THP-1 BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS. POR EL MÉTODO ELISA SE EVALUÓ LA PRODUCCIÓN DE TNF- α , IL-1 β , IL-6 COMPARANDO CON LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS SIN NINGÚN TRATAMIENTO Y CON AGONISTAS DE TLR-4 Y TLR-2. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE CUATRO EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM. ANÁLISIS POR ANOVA MEDIANTE EL ENSAYO DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNNETT'S.	84
FIGURA 21. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 15 MINUTOS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), RAB5(ROJO) Y PARTÍCULA HÍBRIDA CON FITC (VERDE). IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μ M. IMAGEN REPRESENTATIVA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.	86
FIGURA 22. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 30 MIN CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), RAB5 (ROJO) Y PARTÍCULA HÍBRIDA CON FITC (VERDE). IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μ M. IMAGEN REPRESENTATIVA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.	87
FIGURA 23. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 3 HORAS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE LAMP1 (AZUL) DENTRO DE LOS CÍRCULOS AMARILLOS Y PARTÍCULA HÍBRIDA CON RHO-PE (ROJO). IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μ M. IMAGEN REPRESENTATIVA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.	89

III. Resumen

El desarrollo de nuevos vectores de vacunas con capacidad adyuvante y seguros es actualmente una necesidad en el campo de la vacunología. El uso de nanopartículas ha generado interés en aplicaciones biomédicas debido a su versatilidad en cuanto a composición química, área superficial, tamaño y propiedades texturales. En este trabajo se diseñó y se desarrolló un nuevo vector vacunal, consistente en partículas de sílice mesoporosas con bicapas lipídicas con fosfatidilinositolmanósidos (PIMs), que son patrones moleculares aislados de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* BCG. Análisis por microscopía electrónica, espectroscopía Raman, FTIR, y potencial zeta fueron utilizados para la caracterización del vector, encontrándose que se obtiene una correcta decoración con una bicapa lipídica. Esta decoración le confiere a la partícula una carga aniónica, la cual se asocia a una baja interacción con membranas celulares; sin embargo, nuestros análisis mostraron que las partículas PIM@SBA-15 condujeron a una rápida interacción con células fagocíticas. Dicha interacción está dada por la unión de las partículas PIM@SBA-15 con el receptor de reconocimiento de patrones TLR2, como era esperado para una estructura con PIMs, los cuales son conocidos como agonistas de TLR2. Por microscopía confocal y marcajes fluorescentes se observó la expresión de marcadores de la vía fagolisosomal, los cuales indican que nuestras partículas PIM@SBA-15 siguen dicha vía, asociadas con vesículas involucradas en la presentación de antígenos. Además, mediante inmunoensayos el vector muestra una sobreexpresión de las citocinas IL-1 β y TNF α , indicando su capacidad para activar una respuesta proinflamatoria. Finalmente, experimentos de viabilidad celular indicaron una alta biocompatibilidad del vector con respecto a células humanas. En conjunto, estos datos revelaron que el vector desarrollado, PIM@SBA-15, constituye un sistema biocompatible pero capaz de activar la respuesta inmunitaria innata, y capaz de conducir cargos al blanco de vacunas proteicas: por la vía fagolisosomal de presentación de antígenos. Considerando el alto poder de encapsulamiento de su núcleo inorgánico nanoporoso, este trabajo incita a la realización de mayores investigaciones de las partículas PIM@SBA-15 como una nueva clase de acarreador vacunal.

IV. Abstract

The use of nanoparticles has generated interest in biomedical applications due to their versatility in terms of chemical composition, surface area, size, and textural properties. In this work, a new vaccine vector was designed and developed, consisting of mesoporous silica particles with lipid bilayers with phosphatidylinositolmanosides (PIMs), which are molecular patterns isolated from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. Analysis by electron microscopy, Raman spectroscopy, FTIR, and zeta potential were used to characterize the vector, results shows that a complete decoration with a surface lipid bilayer is obtained. This surface lipid bilayer gives the particle an anionic charge, which is associated with a low interaction with cell membranes, however, our studies showed that the particle PIM@SBA-15 led to a rapid interaction with phagocytic cells. This interaction is given by the attachment of PIM@SBA-15 particles with the pattern recognition receptor known as TLR2, this is expected for a surface decoration with PIMs, which are known as TLR2 agonists. By confocal microscopy and fluorescent markers, the expression of the phagolysosomal pathway markers was observed, which indicate that our particles PIM@SBA-15 follow this pathway, associated with vesicles involved in antigen presentation. In addition, with immunoassays the vector shows an increment in the expression of the cytokines IL-1 β and TNF α , indicating the ability of the vector to trigger a pro-inflammatory response. Finally, cell viability experiments indicated a high biocompatibility of the vector with respect to human cells. Together, these data showed that the vector developed, PIM@SBA-15, constitutes a biocompatible system but also capable of activating the innate immune response, and able of driving cargo to the protein vaccine's goal: by the phagolysosomal route of antigen presentation. Considering the high encapsulation power of its nanoporous inorganic core, this work encourages further investigation of PIM@SBA-15 particles as a new class of vaccine carrier.

V. Capítulo I

A. Introducción

El concepto de inmunidad es bastante familiar, ya que puede estar asociado a la idea de mantenerse sano o con salud al enfrentarse a diferentes enfermedades infecciosas, pero también es afín a la idea de estar exento de pagar algún impuesto o de hacer alguna tarea desagradable.

La palabra inmunidad deriva del latín “immunis”, integrada por “im” prefijo que denota negación, y “munus” = servicio. Inicialmente hasta el siglo XIX, el término inmunidad se aplicaba usualmente a quien estaba exento de prestar un servicio, carga o condena. Marcus Annaeus Lucanus (39-65 AD) se permitió el uso de licencias poéticas para usar la palabra *immunes* en su poema épico “Pharsalia”, donde describe la resistencia de la tribu Psylli del norte de África a las mordidas de serpiente. La idea pudo haberse derivado de la diferencia entre una persona común la cual era susceptible a una enfermedad, y una persona inusual que estaba protegida o inmune¹ (*From Immunity to Autoimmune Disease, A Historic Trail, s/f*).

El sistema inmunitario nos mantiene con buena salud constantemente, y solo cuando el sistema presenta una falla es que nos volvemos susceptibles a ciertas enfermedades. En general, el sistema inmunitario es notablemente efectivo considerando que infecciones severas o recurrentes son bastante raras. Sin embargo, a veces se presentan infecciones

¹ Antoinette Stettler rastreó el primer uso del término *immunitas o immunis* en contexto de una enfermedad en el siglo XIV, cuando Colle escribió “*Equib us Dei gratia ego immunis evasi*” (*Por la gracia de Dios salí ileso*), refiriéndose a una epidemia de peste la cual él no se podía enfermar de nuevo.

serias, o un daño derivado de la respuesta inmunitaria. De nuestro sistema de defensa humano, el sistema innato se caracteriza por estar presente en todos los organismos metazoos, así como el que presenta una respuesta rápida en contra de los patógenos. La gran mayoría de los organismos sobreviven mediante el mecanismo de defensa del sistema innato; solo los vertebrados evolucionaron un sistema alternativo para la eliminación de patógenos, el cual se denomina el sistema adaptativo (Beutler, 2004). Aun así, existen un puñado de patógenos de difícil control, por poseer mecanismos de virulencia que logran evadir la respuesta inmunitaria, tales como la variabilidad antigénica del virus de la influenza, o el carácter multifactorial de patógenos como el bacilo causante de la tuberculosis. También los nuevos patógenos, o patógenos emergentes (organismos que pueden causar enfermedad), crean un nuevo reto para el sistema, en específico aquellos que saltan de una especie para infectar a humanos (virus del ébola, SARS-CoV 2).

1. El sistema inmunitario humano

El sistema inmunitario se puede considerar como un sistema encargado de mantener la homeostasis en el cuerpo. Por lo tanto, en la presencia de un organismo invasor, este sistema es activado para eliminarlo.

Muchas veces, la primera barrera es constituida por la piel, la cual tiene un rol bastante importante en la defensa del huésped contra bacterias y virus. Por ejemplo, los virus necesitan una célula viva para poder reproducirse, pero en la parte más externa de la piel hay una capa de células muertas que previene el acceso a numerosas infecciones

(Klenerman, 2017). La piel representa una barrera física externa bastante efectiva para algunos patógenos, pero el sistema inmunitario continúa dentro del cuerpo. El tracto respiratorio y los pulmones están protegidos con una membrana mucosa. Los pulmones contienen unas células de revestimiento (epitelio) bastante delgadas para permitir el intercambio de gas. Estas células presentan una característica física la cual es llamada barrera mucociliar, constituida por pequeños pelos los cuales trabajan en grupo, ayudando al movimiento continuo de la mucosa que recubre las vías respiratorias hacia arriba y hacia afuera del pulmón (Abbas et al., 2018).

Las células distintivas del sistema inmunitario (leucocitos, glóbulos blancos) son generadas en la médula ósea, junto con los glóbulos rojos y las plaquetas. Los subtipos de leucocitos son altamente diversos, y cada uno tiene funciones específicas, pero se pueden dividir en dos tipos, los linfocitos y las células mieloides.

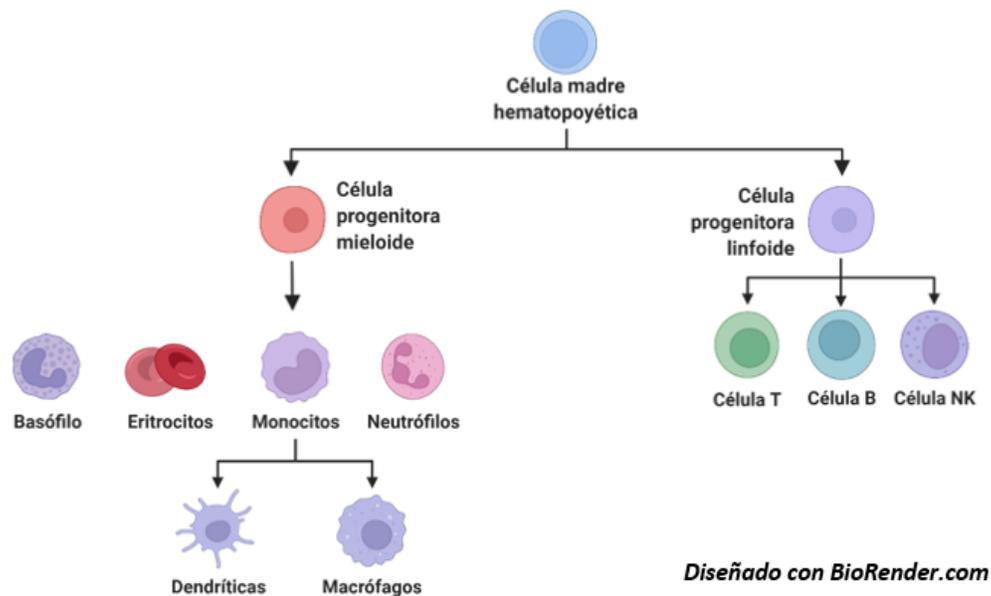


FIGURA 1. ESQUEMA DE HEMATOPOYESIS DEL SISTEMA INMUNITARIO

Las células mieloides son las que se desarrollan en la médula ósea, y los linfocitos son aquellas que se desarrollan en estructuras linfáticas. Los órganos linfáticos incluyen el timo, los nodos linfáticos, y el bazo (Abbas et al., 2018; Sompayrac, s/f). En el caso de las células mieloides, estas se desarrollan en la médula ósea y salen completamente formadas, para transitar por todo el cuerpo con la capacidad de responder a una infección o daño de tejido donde sea que lo encuentren. Las células mieloides son tradicionalmente consideradas como el sistema inmunitario innato. Algunas de las células más estudiadas del sistema innato son los neutrófilos, los macrófagos, células dendríticas y las células asesinas naturales. El sistema innato presenta una función fundamental para la activación del sistema inmunitario, el cual es reconocer lo propio de lo no propio, y de ello lo patogénico vs lo no patogénico.

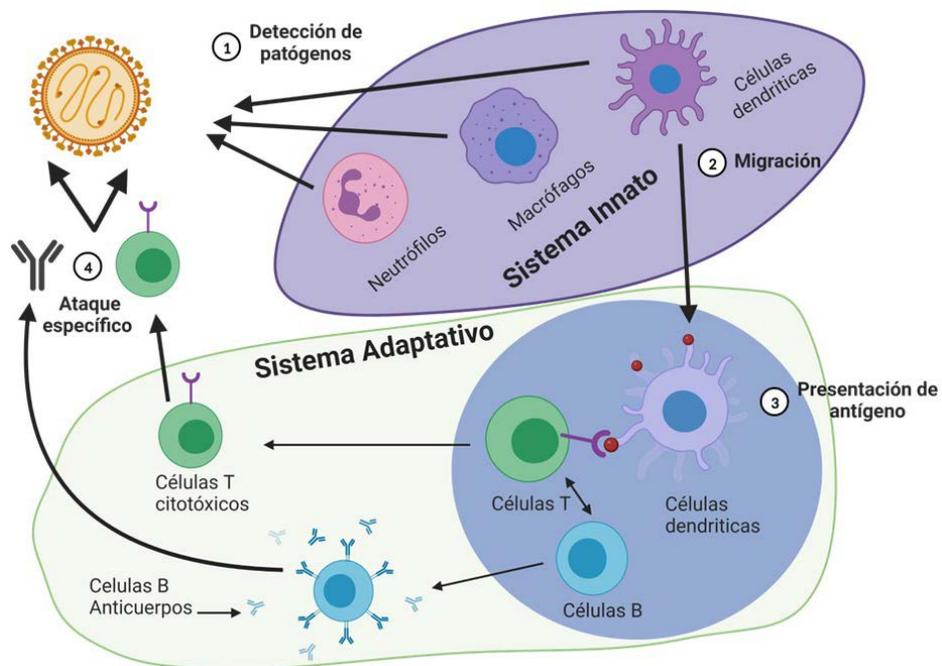


FIGURA 2. GRÁFICO GENERAL DE LA RESPUESTA INMUNITARIA. LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INNATO SON ACTIVADAS 1) AL DETECTAR LA PRESENCIA DEL PATÓGENO Y FAGOCITAN AL PATÓGENO. DESPUÉS LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS, ETC.) QUE HAN

FAGOCITADO Y DEGRADADO AL PATÓGENO 2) MIGRAN HACIA LOS NODOS LINFÁTICOS. EN LOS NODOS LINFÁTICOS SE ENCUENTRAN LA MAYORÍA DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA ADAPTATIVO (CÉLULAS B Y T), Y SE INICIA EL PROCESO DE 3) PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO. FINALMENTE, EL SISTEMA ADAPTATIVO MADURA UNA 4) RESPUESTA ESPECÍFICA HACIA EL PATÓGENO, MEDIANTE ANTICUERPOS Y CÉLULAS T EFECTORAS.

El sistema inmunitario no está limitado a solo unas cuantas células especializadas con funciones discretas, se ha propuesto que el sistema está incorporado en todas las células del cuerpo. Al día de hoy se ha reportado que los glóbulos rojos actúan como centinelas y cuentan con unos receptores para detectar la presencia de ADN libre de células (Lam et al., 2021, p. 9; Lelie, 2021).

2. Vacunas y adyuvantes

El origen de las vacunas usualmente se presenta como el 14 de mayo de 1796, donde Edward Jenner inoculó a un niño de 8 años, llamado James Phipps. Utilizó el fluido de las ampollas de la mano de una lechera llamada Sarah Nelmes infectada con viruela bovina. James Phipps presentó síntomas leves, pero se recuperó sin problema, y para julio del mismo año Jenner retó al niño con una cepa de viruela humana, comprobando su hipótesis de protección. Fue en este momento donde ocurrió el nacimiento de las vacunas y de la inmunología. Phipps no contrajo la enfermedad y este procedimiento eventualmente fue descrito como vacunación por Louis Pasteur, en honor a la vacuna de Edward Jenner. Sin embargo, antes de este gran suceso, la variolización ya estaba establecida como una forma de defensa contra esta enfermedad (Riedel, 2005). La variolización protegía a las personas de la viruela, y consistía en tomar pus de una ampolla del paciente con viruela, y se aplicaba en personas no infectadas en alguna pequeña herida o rasguño. Este procedimiento tiene

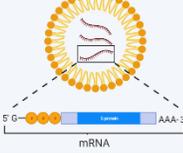
sus inicios en India y China² (Boylston, 2012); sin embargo, fue popularizado por la escritora y poeta Lady Mary Wortley Montagu. Lady Mary presenció y escribió sobre este procedimiento contra la viruela, y en 1718 sometió a su hijo y en 1721 a su hija a la variolización.

La variolización ayudó dramáticamente a reducir la fatalidad inducida por la enfermedad; sin embargo, este procedimiento presenta altos riesgos. Debido a que se necesitaban personas infectadas con viruela para poder inocular a otras personas, esto acarrea riesgo de nuevos brotes en la población. El uso de la variolización también podría causar la enfermedad al paciente, así como la transmisión de otras enfermedades durante este proceso de persona a persona. A pesar de ello, la historia de la variolización eventualmente llevó a uno de los logros médicos más importante para la humanidad, la erradicación de la viruela en 1980, y por supuesto el desarrollo de las vacunas para más enfermedades infecciosas.

El impacto de las vacunas en la salud global es incuestionable; enfermedades como el sarampión, rubéola, paperas, difteria, tétanos, polio y la fiebre amarilla, son controladas gracias a las vacunas (Peek et al., 2008; Zhao et al., 2014). A través de la historia, la mayoría de las vacunas han sido desarrolladas utilizando organismos vivos atenuados, ya que tienen la ventaja de producir una respuesta inmunológica robusta. En las últimas décadas, debido a su seguridad y a su bajo costo, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de subunidades microbianas para vacunación.

² Se sugiere que el origen de la variolización fue en India y China. Sin embargo, algunas afirmaciones reclaman que la inoculación fue inventada alrededor de 1000 a. D. por un monje budista taoísta, al ser una práctica que involucraba mezcla de medicina, con magia y hechizos se consideraba tabú y no hay registro escrito.

TABLA 1 DESARROLLO Y CLASIFICACIÓN DE VACUNAS.

Tipo de vacunas	Año de desarrollo	Usadas contra:	Gráfico:
Vivas atenuadas	1798	Viruela, BCG, MMR	
Inactivadas o muertas	1896	Rabia, tifoidea, Hep A	
Toxoide	1923	Difteria, tétanos	
Subunidad	1970	Hep B, Hep A, Influenza	
Partícula tipo virus, vesículas de capa externa	1986-1987	Hep B, Menigococo Grupo B	
Vector viral	2019	Ébola	
mRNA	2021	SARS-CoV-2	

En general, esta estrategia necesita el uso de componentes adicionales que permitan la inducción de una inmunidad protectora. Estos componentes adicionales, llamados adyuvantes, son estructuras moleculares, macromoleculares o sistemas que despiertan una reacción del sistema inmunitario (Correia-Pinto et al., 2013). Entre los componentes fundamentales para la correcta activación del sistema inmunitario se encuentran las células presentadoras de antígenos (APCs por sus siglas en inglés), cuyas funciones incluyen la identificación de microorganismos vía sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs

por sus siglas en inglés) que reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) (Zhao et al., 2014).

El objetivo general de las vacunas es la activación de una respuesta inmunitaria específica hacia un antígeno. Sin embargo, las vacunas no pueden llegar a este objetivo sin activar adecuadamente el mecanismo de detección de patógenos del sistema inmunitario innato. Por lo tanto, los adyuvantes se añaden en algunas vacunas para aumentar su efectividad activando al sistema inmunitario. La palabra adyuvante procede del latín *adiuvare* que significa ayudar o auxiliar, y se define como cualquier sustancia que mejora o modula una respuesta inmunitaria hacia un antígeno. Los adyuvantes más utilizados hoy en día son las sales de alúmina; sin embargo, nuevos adyuvantes orgánicos han sido aprobados para su uso en vacunas. Las sales de alúmina consisten en precipitados de hidróxidos de aluminio o fosfato de aluminio a los cuales los antígenos son adsorbidos. Este adyuvante promueve una mejor respuesta humoral del huésped hacia la vacuna, pero no promueve una respuesta celular adecuada (Coffman et al., 2010; Karch & Burkhard, 2016). Además, este tipo de adyuvante presenta algunos efectos secundarios como el desarrollo de granulomas, eventos alérgicos, y el estímulo para la producción de anticuerpos IgE (Bastola et al., 2017).

Se han separado los adyuvantes en dos categorías: vectores de entrega y potenciadores inmunológicos (O'Hagan & Valiante, 2003). Los adyuvantes denominados como vectores de acarreo son aquellos que contienen el componente de las vacunas y dirigen la vacuna hacia las células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés *antigen-presenting cells*). Los

adyuvantes denominados como potenciadores inmunológicos son aquellos que activan las células del sistema inmunológico mediante sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*). Este tipo de adyuvantes puede referirse a aquellas sustancias capaces de mimetizar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular pattern*), los cuales activan al sistema inmunitario innato. El sistema inmunitario reconoce y responde al encontrarse a los PAMPs, y al presentarse un antígeno específico, esto promueve una respuesta robusta del sistema inmunitario de tal manera aumentando y modulando la respuesta inmunitaria adaptativa. Ejemplos de estos tipos adyuvantes que activan receptores del sistema inmunitario innato y promueven una respuesta inmunitaria, son algunos componentes que se encuentran en la capa externa de la membrana bacteriana como lipopolisacáridos de Gram-negativas, liposomas, RNA de doble hélice y CpG no-metilados que contienen DNA (Reed et al., 2009). Algunos adyuvantes orgánicos actualmente aprobados para su uso en los Estados Unidos de América son los motivos CpG 1018, la emulsión agua-aceite MF59 c.1, sustancias basadas en escualeno, y liposomas que contienen el monofosforil lípido A (MPLA) y extractos purificados de la planta *Quillaja saponaria* QS-21.

3. *Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs):*

La habilidad de detectar PAMPs está presente en casi todas las células del cuerpo. En células especializadas del sistema inmunitario, algunos conjuntos celulares en este aspecto presentan un arsenal más efectivo que otras (Vijay, 2018). Por ejemplo, los monocitos, los

cuales son muy abundantes y circulan en la sangre, son capaces de migrar al tejido donde se diferencian a macrófagos. Los monocitos también pueden diferenciarse en células dendríticas, las cuales poseen una superficie ondulada e involucrada con un arreglo de detectores de PAMPs para reconocer un sinfín de patógenos (Abbas et al., 2018). Estas células son capaces de detectar el peligro usando múltiples receptores, y una vez que se activan, coordinan efectivamente la respuesta del sistema inmunitario. La detección de PAMPs se lleva a cabo por receptores codificados desde la línea germinal, llamados PRRs (Mogensen, 2009). Actualmente se han identificado una gran variedad de PRRs, de los cuales algunos ejemplos son los receptores de reconocimientos de manosas (MBL, DC-SIGN, MR), los receptores lectina tipo-C (CLR), los receptores tipo toll (TLR), los receptores NOD (dominios de oligomerización de unión a nucleótidos), y los receptores tipo NOD, entre otros (Kumar et al., 2009, 2011). Estos receptores pueden ser expresados en la superficie celular, en compartimentos celulares, secretados a circulación sanguínea o encontrarse en el citoplasma. Los PRRs se encuentran en células del sistema inmunitario y reconocen a los PAMPs como señales de microbios patogénicos. Entre los adyuvantes de mayor potencial inmunológico se encuentran aquellos capaces de activar células presentadoras de antígeno a través de receptores tipo Toll (Leo et al., 2011).

4. *Receptores tipo Toll (TLR)*

Un mecanismo que tiene una gran historia evolutiva y se ha mantenido como un componente crítico para la defensa inmunitaria humana, son los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-Like Receptors*). Estos fueron reconocidos originalmente en la mosca de la

fruta por Nüsslein-Volhard y Wieschaus (*toll* es un vocablo alemán que significa *chido*) (Klenerman, 2017). Estos receptores juegan un rol bastante importante en el desarrollo embrionario de la mosca. Se observó que el insecto era más susceptible a infecciones por hongos al presentarse mutaciones en el gen *toll* que provocaban una ausencia de la proteína Toll. Se encontró que estos receptores iniciaban la respuesta inmunitaria contra hongos mediante la liberación de proteínas antimicrobianas y la activación de células inmunitarias. Esto llevó a la conclusión de que Toll es una proteína capaz de inducir inflamación, y promover una respuesta contra infecciones (Belvin & Anderson, 1996; López Marín & Valdemar Aguilar, 2018). Los humanos presentamos proteínas homólogas de ellas, por lo que se han denominado como los receptores tipo Toll, los cuales activan y señalizan una respuesta inmunitaria.

Los receptores tipo Toll son PRRs que están presentes en diferentes tipos de células, y que ayudan a reconocer diferentes PAMPs de bacterias, hongos, virus y parásitos (Lahiri et al., 2008). El descubrimiento de estos receptores fue el cual le dio una gran importancia al sistema inmunitario innato en el desarrollo de vacunas y adyuvantes. En los humanos se tienen detectados 10 tipos de TLRs, los cuales pueden detectar la presencia de PAMPs y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Tang et al., 2012). Estos receptores se expresan en diferentes tipos de células del sistema inmunitario innato, como los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK y granulocitos. Funcionalmente se pueden dividir los TLR con respecto a donde se encuentran en la célula: existen TLR membranales (heterodímeros de TLR2/1 y TLR2/6, TLR4, TLR5 y TLR10) expresados en la superficie celular (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016), y TLR intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 y

TLR9), los cuales se localizan en el retículo endoplásmico (Johnsen et al., 2006, p. 3; Latz et al., 2004, p. 9), endosomas (Lahiri et al., 2008) y lisosomas (Barton et al., 2006; Chaturvedi & Pierce, 2009).

Los TLR son proteínas transmembranales tipo I, las cuales contienen un motivo rico en leucina extra membranal, encargada del reconocimiento de PAMPs, un motivo transmembranal y una parte con dominio TIR (Receptor Toll-IL-1) en el citosol, que activa la cascada de señalamiento. Una vez activado el TLR por su agonista, se reclutan proteínas coactivadoras, como MyD88 y TRIF las cuales, a través de sus dominios intra citosólicos, inician la cascada hasta la secreción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Kawai & Akira, 2011). El proceso de internalización es suficiente para alterar el mecanismo de señalización proinflamatorio. Los receptores activados son acumulados cuando se forman los fagosomas, resultando en un enriquecimiento de la cascada de señalización (Ozinsky et al., 2000). Algunos reportes han concluido que la activación de TLR2 y TLR4 promueve el reclutamiento de mitocondrias hacia los fagosomas y el incremento de la producción de ROS (West et al., 2011).

5. *Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)*

Entre los PAMPs más potentes se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), los cuales forman parte de la capa externa de algunas especies de bacterias, particularmente de las Gram negativas. Los LPS son detectados incluso en concentraciones bastante bajas a través de los TLRs, específicamente del TLR4 (Chaplin, 2010; Holst et al., 1996; Tang et al., 2012). La

activación del TLR4 es una señal de peligro que induce en las células dendríticas la secreción de citocinas, lo cual produce el reclutamiento de más células del sistema inmunitario e inicia una serie de respuestas llamadas proinflamatorias. Si se elimina la infección de la bacteria en cuestión, y los LPS desaparecen, el sistema regresa rápidamente a la normalidad. En sangre, en el caso de que la situación no esté controlada y la bacteria esté demasiado dispersa, se presenta un cuadro de sepsis. Un ejemplo sería una infección debida a meningococos no controlada efectivamente, desencadenando una respuesta por LPS que puede llevar a consecuencias fatales (Klenerman, 2017). Se ha propuesto utilizar LPS como un adyuvante en vacunas; sin embargo, debido a que es una endotoxina se considera riesgoso debido a su toxicidad. El derivado del lípido A de *Salmonella minnesota* (MPLA), se considera un agonista de TLR4, así como el LPS, pero más seguro y es preferentemente propuesto como adyuvante. A pesar de que el adyuvante MPLA es menos tóxico que el LPS, estos presentan diferentes efectos inmunológicos, y en algunos casos son mucho menos efectivos para despertar correctamente el sistema inmunitario (Demento et al., 2011). Algunos ligandos de TLRs han sido explorados como adyuvantes de nano vacunas (Demento et al., 2011; Leo et al., 2011). Sin embargo, la alta toxicidad de los ligandos más comunes, de tipo lipopolisacáridos, ha originado el interés de explorar ligandos de TLRs distintos.

Los primeros TLRs fueron identificados en el año 1998, entre ellos el TLR2, el cual tiene una gran importancia en la inmunidad de los vertebrados. Hasta la fecha es el único TLRs que presenta heterodímeros funcionales con otros tipos de TLRs, así como con otros receptores. Se ha reportado que los TLR2 tienen una capacidad de detección de una gran variedad de PAMPs, los cuales incluyen moléculas de toda la filogenia microbiana incluyendo a virus,

hongos, bacterias y parásitos. El reconocimiento del ligando específico y señalización en los TLR2 ocurre mediante la heterodimerización con TLR1 y TLR6 (Oliveira-Nascimento et al., 2012). Estos TLRs tiene un módulo de repeticiones ricas en leucinas los cuales, al estar con su heterodímero, forman un complejo de forma “m” con un ligando, el cual estabiliza ambos receptores. Si el ligando entre el TLR2 y TLR1/6 no se presenta, los heterodímeros no podrán interactuar entre ellos y por lo tanto la cascada de señalización no se iniciará (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016; Oliveira-Nascimento et al., 2012; Tang et al., 2012; Vijay, 2018). Los ligandos de TLR2 incluyen fracciones de moléculas con diacil y triacilglicerol, proteínas y polisacáridos. Se han reportado ligandos endógenos para los TLR2, llamados “alarminas”, los cuales indicarían daño en tejido, necrosis o células potencialmente cancerígenas. Dentro de esas alarminas se encuentran las proteínas de choque térmico, fragmentos del ácido hialurónico, y defensinas beta-3 humanas, entre otras (Oliveira-Nascimento et al., 2012). Esta diversidad bioquímica que el TLR2 tiene para reconocer patógenos ha presentado un interés. Nuestra propuesta para activar al sistema inmunitario es la utilización de los fosfoinosítidos con manosas (PIMs), ligandos de TLR2 presentes en micobacterias.

6. *Fosfatidil-inositol manósidos, ligandos de TLR2*

La mayoría de los ligandos de TLR2 son moléculas anfipáticas presentes en pared celular de varios patógenos. Los PIMs representan moléculas que han sido ampliamente utilizadas en la práctica clínica, ya que forman parte del bacilo de Calmette y Guérin (BCG), una micobacteria no patogénica que constituye la actual vacuna contra la tuberculosis, la cual ha sido también utilizada como inmunoterapia contra el cáncer de vejiga (Morales et al.,

2017). En forma aislada, los PIMs han sido descritos como activadores y reguladores de la respuesta inmunológica, además de permitir el reconocimiento de la micobacteria por células fagocíticas, así como de células no-fagocíticas. Dentro del campo de las vacunas, los PIMs resultan interesantes, ya que al ser agonistas de TLR-2 son un factor clave de las células del sistema inmunitario innato para producir una respuesta proinflamatoria, pero menos exacerbada que la promovida por TLR4, y útil para una variedad de respuestas anti-infecciosas. Los receptores del sistema inmunitario innato llevan información acerca de la naturaleza del microorganismo que se está identificando (Stuart & Ezekowitz, 2005). Ciertos receptores como los TLRs modulan la respuesta inmunológica para el tipo de amenaza detectada. La importancia del primer contacto con el objetivo de las células fagocíticas activa dos eventos de suma importancia denominados, “probando y sintiendo” (Underhill & Goodridge, 2012). Por medio de ciertos receptores de membrana, como los TLRs, el fagocito “prueba” el objetivo, mientras que la exploración física del objetivo, “sintiendo”, se debe a la membrana plasmática. Los TLRs activan la cascada de señalización de NF- κ B vía la proteína MyD88 de los receptores y esto es suficiente para promover la producción de citocinas proinflamatorias; sin embargo, la exploración física toma una parte muy importante para la decisión de internalizar el objetivo. Los seudópodos dan información acerca de las propiedades físicas del objetivo y cómo proceder para internalizar (Aderem & Underhill, 1999; Underhill & Goodridge, 2012).

7. *Vacunas fabricadas mediante nanotecnología*

La nanotecnología ofrece la oportunidad de diseñar nanoestructuras conmensurables con sistemas biológicos, variando su composición, tamaño, forma y propiedades superficiales. Diferentes tipos de nanopartículas han sido propuestas para el desarrollo de nano vacunas, tales como nanopartículas inorgánicas, nanopartículas poliméricas, liposomas, complejos inmunoestimulantes, emulsiones y partículas pseudo virales, entre otras (Doherty et al., 2016). A través de la nanotecnología es posible obtener partículas de tamaño comparable con componentes celulares, pudiendo entrar a células por medio del método de endocitosis, por pinocitosis o inclusive a través de interacciones ligando-receptor. Uno de los objetivos buscados a través de la nanotecnología es el mimetismo de bacterias, para generar construcciones capaces de ser fagocitadas de una manera más eficiente por macrófagos, y llegar a los nódulos linfáticos, donde habitan las células T y B del sistema inmunológico, es decir al sitio blanco de una vacuna.

Entre las partículas de materiales inorgánicos que han despertado interés como acarreadores de fármacos destacan las sílices mesoporosas. Estas partículas constituyen un excelente acarreador, ya que han sido utilizadas debido a su alta área superficial, así como a la posibilidad de sintetizarlas con poros de talla adaptable para aplicaciones biomédicas (Mehmood et al., 2017). Por estas razones, las sílices mesoporosas podrían servir como acarreadores de vacunas de subunidad, las cuales presentan ventajas como: aumento en la entrega de antígeno por células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *antigen-presenting cells*), liberación controlada de antígenos y modulación de una respuesta

inmunológica (Baranov et al., 2021; Oyewumi et al., 2010). Formulaciones a base de partículas de sílice ya han sido reconocidas por la administración de alimentos y medicinas de los EE.UU. (FDA) como seguras, y actualmente ya se encuentran en fase clínica para administración intravenosa (Benezra et al., 2011; Diab et al., 2017). Su biocompatibilidad ha sido extensivamente estudiada, llegándose a la conclusión de que estas estructuras se encuentran entre las opciones más seguras para su uso en humanos, aunque cabe mencionar que la toxicidad de las partículas es dependiente de su concentración (Zhou et al., 2018).

Entre las estructuras de sílice, las estructuras mesoporosas (con poros de diámetro de 2 a 50 nm) destacan debido a su gran capacidad de adsorción. Las sílices mesoporosas permiten obtener un alto porcentaje de encapsulamiento, lo cual es muy importante ya que influye sobre la habilidad para retener y proteger el cargo, es decir el producto acarreado hacia un tejido. Hasta ahora, los tipos de sílice mesoporosa reportados para la liberación de fármacos corresponden principalmente a dos tipos, partículas esféricas con diámetros de 100 a 500 nm (partículas MCM-41), y partículas porosas con talla y morfología bacilares (partículas SBA-15) (Mehmood et al., 2017). En los últimos años, algunos fenómenos biológicos complejos han sido fácilmente imitados al exhibir moléculas biológicamente activas en la superficie de sílice mesoporosa. Por ejemplo, la matriz de radicales semiquinona con proteínas imidazoles en sílice permiten la interacción para que los centros de reacciones fotosintéticas puedan ser estudiados (Christoforidis et al., 2008). En otro trabajo, se ha reportado arreglos de membranas con citocromo c oxidasa sobre sílice mesoporosa, los cuales reproducen el intercambio de protones impulsado por redox a través de la

membrana celular, dando lugar a corrientes iónicas hacia el citoesqueleto basado en sílice poroso. Por su parte, Liu y colaboradores (C.-M. Liu et al., 2019) reportaron el uso de nanopartículas de sílice las cuales, al ser decoradas con membranas de células cancerígenas, liberaron satisfactoriamente fármacos quimioterapéuticos en el sitio tumoral. En conjunto, estos ejemplos demuestran la propiedad de la sílice mesoporosa como un soporte para bicapas de membrana en un sistema coloidal biomimético.

Como puede deducirse de esta información, las cualidades de encapsulamiento, variaciones superficiales y la biocompatibilidad de estas estructuras las posiciona como un material prometedor para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, hay pocos estudios encaminados a explotar la versatilidad de la sílice para fines de vacunación.

A medida que la tecnología avanza, el uso de adyuvantes es de suma importancia para estimular la respuesta inmunitaria innata, que a su vez conduce a una mejor inmunidad adaptativa. La inmunidad hacia los patógenos a los cuales estamos expuestos es lograda gracias a la integración de los dos brazos de la respuesta inmunológica. Aunque el objetivo general de las vacunas es la activación de la inmunidad específica a un antígeno, no se puede lograr este objetivo sin antes activar el mecanismo de detección de patógenos de la respuesta innata (O'Hagan & Valiante, 2003).

VI. Planteamiento del problema

Se ha explorado el uso de nanopartículas para vacunación por DNA recombinante, así como para acarrear proteínas en vacunas de subunidad, pero pocos trabajos han explotado el uso

de nanopartículas para vacunación junto con la posibilidad de introducir adyuvantes, es decir elementos que promuevan la respuesta inmunitaria innata a través de nanoestructuras biocompatibles que desplieguen patrones asociados a patógenos.

Los liposomas son conocidos como excelentes vectores de entrega debido a propiedades tales como facilidad de síntesis, alta biocompatibilidad, variabilidad en su formulación, posibilidad de orientar hacia un objetivo específico, y un alto tiempo en circulación. Sin embargo, una vez que se obtienen los liposomas es difícil controlar la fuga del material encapsulado debido a la permeabilidad de la membrana, o por el cambio en la distribución de tamaño. La estabilidad también se ve afectada debido a degradación oxidativa así como hidrolítica al almacenarse (Çağdaş et al., 2014).

Las nano vacunas se componen de partículas las cuales tienen moléculas o antígenos para lo cual se desea una respuesta inmunitaria. Estas vacunas ofrecen algunas ventajas las cuales incluyen la entrega de antígenos a sitios específicos, aumentan la biodisponibilidad de antígenos y reducen un posible efecto secundario. El desarrollo de nano vacunas, o de vacunas utilizando nanopartículas, ha incrementado debido a su capacidad de inducir una inmunización efectiva a través de la activación enfocada de una respuesta inmunitaria. Se enfocan en dos áreas de investigación, en las cuales se utilizan como sistemas de acarreo o para el desarrollo de adyuvantes para vacunas. Los adyuvantes actúan para estimular y aumentar una respuesta inmunitaria hacia un antígeno, en algunos estudios se proponen ciertas nanopartículas capaces de inducir una respuesta similar o mejor que las sales de alúmina (el adyuvante más utilizado en vacunas para humanos). Se sugiere que las propiedades fisicoquímicas tales como tamaño de partículas pueden aumentar la ingesta

de antígeno o estimular a células presentadoras de antígenos. La estrategia de usar partículas las cuales tiendan a ser de tamaño comparable a algunos patógenos, así como nanopartículas que mimetizan a un patógeno ha generado interés en el desarrollo de vacunas. El uso de inmunomoduladores y antígenos encapsulados en nanopartículas de PGLA, ha demostrado aumentar la respuesta celular hacia el antígeno comparado contra la entrega del antígeno soluble (Zaman et al., 2013).

Las vacunas de nueva generación las cuales utilizan mRNA y un vector de entrega de nanopartículas lipídicas presentan un avance en seguridad, así como en su efectividad. Los ácidos nucleicos presentan un gran potencial para modular la expresión de proteínas *in vivo*, pero el uso de ellos sin un vector de entrega presenta algunas desventajas. La entrega de ácidos nucleicos sin un vector de entrega resulta en una baja internalización en células, así como una en una degradación rápida y eliminación vía renal. Debido a que necesitan un vector de entrega, se han utilizado las nanopartículas lipídicas para encapsular y entregar los ácidos nucleicos a su objetivo. Usualmente estas nanopartículas lipídicas están compuestas por un 1) Lípido catiónico, el cual facilita la absorción del vector para entregar el cargo, así como un 2) fosfolípido el cual provee estructura y estabilidad a la nanopartícula, 3) colesterol el cual promueve la fusión con la membrana celular y también 4) un lípido anclado al polietilenglicol el cual reduce el agregado de nanopartículas (Kauffman et al., 2015; Rijkers et al., 2021). La síntesis de estas nanopartículas se ha llevado a cabo con la tecnología de microfluídica. Esta tecnología puede producir una variedad de micro acarreadores (micro geles, partículas core-shell, microesferas, etc.) y nano acarreadores (partículas poliméricas, nano emulsiones, nanopartículas lipídicas) en los cuales diferentes

moléculas se pueden acarrear hasta llegar al destino celular deseado (Khan et al., 2015). A pesar de tener ciertas ventajas en el desarrollo de micro o nano acarreadores, esta tecnología presenta una gran limitante y es la producción a nivel industrial. Debido a que estos equipos por lo general manejan variables a una microescala, esto a menudo indica que las nanopartículas producidas son usualmente algunos mililitros por hora y esto hace que su producción a gran escala no se considere viable (Y. Liu et al., 2022). Una de las partículas candidatas que recientemente han generado interés son las sílices nanoporosas Santa Barbara Amorfa-15 (SBA-15). Estas partículas usualmente son sintetizadas bajo condiciones ácidas promoviendo un auto-ensamble entre especies de silicio y un copolímero de tres bloques como un agente director. Las partículas de sílice mesoporosas presentan ventajas tales como tamaño y forma controlable, alta área superficial, diámetro de porosidad adaptable, además de ser de fácil funcionalización y biocompatibles (J. Liu et al., 2009). Una de las capacidades de estas partículas es la posibilidad de modificar su superficie mediante su funcionalización con componentes orgánicos e inorgánicos. Recientemente, se ha demostrado un gran potencial al decorar su superficie con otros componentes biocompatibles, el cual ajusta la interacción en un ambiente biológico (Davis et al., 2007; C.-M. Liu et al., 2019). Esto permite un control sobre las propiedades físicas y químicas del material, de este modo permitiendo el anclaje de un antígeno, un adyuvante, o un objetivo molecular para el reconocimiento inmunológico innato, y así optimizar la magnitud y la dirección de una respuesta inmunológica (Demento et al., 2011). Se han reportado algunos avances en la investigación de la SBA-15 como un adyuvante, los cuales demostraron que la SBA-15 despertó una respuesta similar o mejor al adyuvante de

incompleto de Freund en ratones BALB/c (Carvalho et al., 2010). También se han utilizado las partículas de sílice mesoporosas como acarreadores de albúmina, y demostraron ser un adyuvante extremadamente efectivo capaz de generar una respuesta humoral y celular de la respuesta inmunitaria. En estos estudios también se abordó la biocompatibilidad de esta partícula para futuros usos en biomedicina (Mahony et al., 2013).

VII. Hipótesis

La construcción de partículas de sílice con recubrimiento biomimético con PIMs del complejo *M. tuberculosis* resultará en una preparación coloidal que incluye un material reconocido por su alto poder de encapsulamiento, y que tendrá la capacidad de activar mecanismos de inmunidad innata a través de TLR-2.

VIII. Objetivos

A. General

Desarrollar un sistema de acarreo de vacunas basado en sílice mesoporosa y en bicapas lipídicas, con mimetismo de superficies bacterianas, biocompatible *in vitro* y que tenga la capacidad para activar la respuesta inmunitaria innata.

B. Particulares

1. Sintetizar partículas de sílice mesoporosa de una talla mayor a 800 nm para provocar la internalización exclusiva en células fagocíticas.
2. Purificar patrones moleculares asociados al complejo *M. tuberculosis* reconocidos como ligandos de TLR2, particularmente glicolípidos de la familia de fosfatidil-inositol-manósidos (PIMs).

3. Diseñar y producir un sistema de sílice mesoporosa cuya superficie despliegue lípidos de envoltura celular de *M. tuberculosis*.
4. Caracterizar las partículas de sílice biomiméticas en cuanto a nanoestructura, morfología, talla, potencial zeta y propiedades texturales.
5. Desarrollar métodos que permitan confirmar la decoración de partículas de sílice con moléculas bioactivas de origen bacteriano.
6. Evaluar la biocompatibilidad de partículas de sílice biomiméticas en cultivos celulares *in vitro* (mediante método MTT en una línea celular primaria de fibroblastos humanos).
7. Evaluar el comportamiento *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos THP-1 con partículas híbridas control (PC@SBA-15) y partículas PIM@SBA-15.
8. Explorar la capacidad del vector para activar la respuesta inmunitaria innata por medio de la activación de los TLR-2.
9. Caracterizar el destino intracelular de las partículas de sílice biomiméticas en macrófagos derivados de monocitos THP-1.

IX. Material y Métodos

A. Síntesis de la sílice mesoporosa SBA-15

El material mesoporoso de sílice SBA-15 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Flodström y Alfredsson (2003), modificado por Nava y colaboradores (2007). Se utilizó el copolímero de tres bloques Pluronic (BASF, EO₂₀-PO₇₀-EO₂₀, P123) como agente director de la estructura y tetraetil ortosilicato (TEOS, 98%, Aldrich) como la fuente de sílice. En una síntesis típica, el copolímero de tres bloques se disolvió en una solución de agua y HCl 4M (HCl, J.T. Baker, 36.6%) con agitación constante y a una temperatura de 35°C. Posteriormente, se agregó a la solución anterior la cantidad de 10 ml de TEOS y la reacción se mantuvo a 35°C con agitación constante durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un bote de polipropileno y se calentó a 80°C durante 24 h sin agitación. Después de la síntesis, el sólido obtenido se recuperó por filtración, se lavó varias veces con agua destilada, se secó a 110°C y finalmente se calcinó a 550°C durante 4 h para eliminar el molde orgánico. La funcionalización superficial de las partículas de SBA-15 para cationizarlas se realizó por el método de post-síntesis (*ex-situ*), es decir a partir de la SBA-15 previamente sintetizada, y se siguió el procedimiento descrito por Hernández-Morales y colaboradores (Hernández-Morales et al., 2012). Brevemente, las partículas de SBA-15 se dispersaron en una solución de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) (precursor de los grupos funcionales -NH₂) en etanol. Se recuperó el sólido por filtración, se lavó con agua desionizada, y se secó, primero a temperatura ambiente, y posteriormente a 110 °C por 18 horas.

B. Funcionalización de partículas SBA-15 aminadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

El fluorocromo FITC se diluyó en DMSO a una concentración de 1 mg/ml, preparando una solución *stock* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (FITC, Sigma-Aldrich). Para la funcionalización, se suspendieron partículas SBA-15 cationizadas en agua destilada estéril a una concentración de 1 mg/ml y se añadió 50 µl de la solución *stock* de FITC. Se agitó suavemente la mezcla de partículas con FITC, y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, la muestra se centrifugó a 4000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Para lavar el producto, se colocó 1 ml de agua destilada estéril y se repitió el proceso de centrifugación 2 veces más. Las partículas de SBA-15 funcionalizadas con FITC se mantuvieron en la oscuridad a 4°C hasta su uso.

C. Obtención de fosfatidil-inositol manósidos (PIMs) de *M. tuberculosis*

Los lípidos de *M. tuberculosis* fueron obtenidos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM a partir de células inactivadas de la cepa H37Rv. A partir de este extracto se obtuvieron los lípidos anfipáticos de *M. tuberculosis*, se separó la muestra total de lípidos por cromatografía de adsorción en columna abierta. Los lípidos se disolvieron en un volumen mínimo de cloroformo. La solución se colocó en una columna de Florisil, malla 100 (Biotech Corp., Miami, FL.). Se eluyeron con cloroformo, seguido por eluciones con porcentajes crecientes de metanol en cloroformo (5, 10 y 12% vol/vol), y cloroformo/metanol/agua (60:12:1 y 60:35:8, v/v/v). Cada fracción fue transferida a un

matraz de bola, el solvente evaporado en rotaevaporador y conservada a -20°C en atmósfera inerte. Se obtuvieron de la fracción más polar los PIMs, los cuales consisten en un conjunto de homólogos que varían en número de residuos de manosas y el número y estructura de sus cadenas de ácidos grasos. Se analizó la fracción por cromatografía en capa fina en placas recubiertas de gel de sílice (0.25 mm de espesor) desarrollados con los siguientes solventes: 1) cloroformo/metanol (9:1 v/v), 2) cloroformo/metanol/agua (60:30:6 v/v/v) y finalmente cloroformo/metanol/agua (60:35:6 v/v/v). Las reacciones se realizaron *in situ* mediante el revelado con antrona al 0.2 % en H₂SO₄ a 110°C para azúcares, 0.2% de ninhidrina en acetona a 110°C para amina primaria, y azul de molibdeno a temperatura ambiente para visualizar los fosfolípidos.

D. Cultivo de *M. bovis* BCG cepa México

Se cultivó *Mycobacterium bovis* BCG cepa México en caldo de cultivo Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, USA, M0178) con glicerol (0.004%, vol/vol) a pH 6.6. Eventualmente, el medio fue suplementado con albúmina, dextrosa y catalasa (Middlebrook ADC, Sigma-Aldrich, USA, M0553). El cultivo se mantuvo durante 25 a 28 días o hasta obtener crecimiento en fase exponencial visualizado por el crecimiento en forma de película en la superficie del medio. Finalmente, los cultivos fueron inactivados por autoclave a una temperatura de 121°C por 25 min.

E. Obtención de fosfatidil-inositol manósidos (PIMs) de *M. bovis* BCG cepa México

Los lípidos se extrajeron de células inactivadas de *M. bovis* BCG cepa México por incubación en una mezcla de cloroformo/metanol (1:2, v/v) a 50°C por 2 horas, seguido de otra extracción con cloroformo/metanol (2:1, v/v) bajo idénticas condiciones. Los extractos combinados fueron secados en rotaevaporador. El residuo se separó en una mezcla de cloroformo/metanol/agua (4:2:1 v/v), después de la separación de fases, se recuperó la fase orgánica que contiene los lípidos y se evaporó por rotavapor. El extracto se suspendió en cloroformo, y se colocó en una columna de Florisil 100 mesh (Biotechna Corp., Miami, FL). Las eluciones se realizaron utilizando cloroformo, y concentraciones en aumento de metanol en cloroformo (5, 10, 12 y 35% v/v), y finalizando con cloroformo/metanol/agua (60:12:1 y 60:35:8 v/v/v).

F. Preparación de liposomas con PIMs de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*

Se prepararon liposomas de PIMs de una fracción obtenida de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* mediante el método de deshidratación/rehidratación. Se mezcló fosfatidilcolina (PC) con los PIMs obtenidos de *M. bovis* BCG en una relación de 1:1 (w/w). Los lípidos fueron disueltos y mezclados usando una solución de cloroformo/metanol (90:10 v/v). La mezcla de lípidos se secó con corriente de nitrógeno en un baño seco a 50°C, y se colocó la muestra en un desecador por 10 min al vacío. Los lípidos fueron suspendidos en

agua a una temperatura de 50°C (1 mg/ml), pasando la suspensión varias veces a través de una aguja calibre 23, para obtener los liposomas multilaminares grandes. Inicialmente se obtuvieron liposomas multilaminares grandes (MLV) con una concentración de 1 mg/ml. Para ello, en un frasco de centelleo de vidrio previamente pesado, se colocaron los lípidos en distintas proporciones, de acuerdo con la **Tabla 1**. Para eliminar rastros del solvente se colocaron las muestras en un desecador por 10 min al vacío. Para la preparación de liposomas marcados con fluorescencia, se utilizó el fosfolípido DHPE-rodamina (Lisamina™ Rodamina B, Life Technologies) a una concentración de 0.01 mol Rho-PE/mol de lípidos. Se mezclaron los lípidos con 500 µl de cloroformo/metanol (90:10 v/v). Una vez terminado este proceso, los liposomas fueron filtrados 8-10 veces a través de un filtro de 0.4 µm a fin de extruir la muestra y obtener liposomas unilaminares grandes (LUV). Cada muestra se mantuvo en refrigeración a 4°C.

TABLA 2 PROPORCIÓN DE LÍPIDOS PARA LA FORMACIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMINARES.

Nombre de muestra	PIMs del complejo <i>M. tuberculosis</i>	Fosfatidilcolina (PC)
PC		5 mg
PC+PIMs	2.5 mg	2.5 mg

G. Preparación de partículas híbridas SBA@liposomas

Se pesaron 2.5 mg de nanopartículas de sílice (aSBA-15), y se les colocó 2.5 ml de agua destilada. Enseguida, se agregaron 2.5 ml de LUV con los lípidos de *M. tuberculosis*, y se agitó suavemente con una punta de micropipeta. Se incubó a temperatura ambiente por 25 min con agitación ocasional, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por un minuto y se descartó el sobrenadante. Se colocaron 2.5 ml de agua destilada para resuspender y se conservó a 4°C. La concentración de sílice en el material resultante es de 1 mg/ml.

H. Caracterización estructural de las muestras

1. *Microscopía Electrónica de Transmisión*

Se tomaron muestras para observación en TEM de liposomas mezclados con lípidos de *M. tuberculosis*; todas fueron diluidas en agua destilada a 1:500 v/v. Las muestras fueron depositadas sobre una rejilla de cobre malla 200, recubierta con Formvar (Cat. 01800-F de Ted Pella, Inc). Las rejillas fueron secadas en un desecador durante 10 min. Se contrastaron las muestras con tetraóxido de osmio el cual fue utilizado para fijar los liposomas y que no perdieran su morfología. La observación fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (Jeol Co., Peabody), trabajando a 200 kv.

2. *Microscopía Electrónica de Barrido*

La morfología superficial de SBA-15 y funcionalización de SBA-15 aminada con liposomas dopados con *M. tuberculosis* se observó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca Hitachi, modelo SU8230. Se prepararon las muestras realizando una dilución de 1:500 en agua destilada, y se colocaron en un portamuestras de cobre, el cual se secó al vacío en un desecador.

3. *Potencial Zeta*

Las muestras fueron diluidas (1:100) en 1 ml de agua destilada las cuales se colocaron en celdas DTS1070 (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Las mediciones de movilidad electroforética fueron realizadas por triplicado en un analizador Malvern Zetasizer Nano Z el cual tiene una potencia de 100 VA, y un Láser He-Ne 633nm, max. 4mW, y un rango de medición de 3.8 nm-100 micras (diámetro).

4. *Isotermas de adsorción-desorción de N₂ a 77° K*

Las propiedades texturales de la SBA-15 se determinaron mediante las isotermas de adsorción-desorción de N₂ a 77° K en el equipo autosorb (Quantachrome iQ2 USA). El área específica de la muestra se calculó con la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T) utilizando los datos de la isoterma de adsorción en el intervalo de presiones relativas de

$0.03 < P/P^\circ < 0.3$ (Brunauer et al., 1938). La distribución del tamaño de poro se calculó por el método de Barret-Joyner-Halenda (B.J.H.), utilizando los datos de la isoterma de desorción. El volumen total de poro se estimó a partir de la cantidad de nitrógeno adsorbido a la presión relativa de 0.98.

5. *Caracterización de lípidos de M. bovis BCG cepa México*

La fracción con PIMs fue suspendida en cloroformo/metanol (9:1 v/v) y eluida en una columna Sep-Pack (Water Corp, Milford MA, USA). Se realizaron eluciones de cloroformo, seguidas de un incremento en porcentajes de metanol en cloroformo (1 y 5% vol) y cloroformo/metanol/agua (60:12:1 y 60:35:8, v/v/v). Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografías en capa fina (CCF) en placas de Sílica-gel 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany) se eluyó con cloroformo/metanol/agua (60:35:8 v/v/v). Se revelaron las placas con antrona al 2% en H₂SO₄ a 110°C para detectar azúcares y azul de molibdeno para detectar los lípidos que contienen fosfato. La fracción con PIMs se analizó con CCF en 2-D para resolver mejor los lípidos de las primeras cromatografías. Se utilizaron dos sistemas de eluyentes perpendiculares a cada corrida, 1) cloroformo/metanol/agua (60:30:6 v/v/v) en la primera dirección y 2) cloroformo/metanol/agua (60:35:8 v/v/v) en la segunda dirección. Se revelaron las placas con antrona al 0.2% H₂SO₄ a 110°C para revelar azúcares, también se utilizó el azul de molibdeno a temperatura ambiente para visualizar los componentes con grupo fosfato.

I. Interacción de partículas híbridas con cultivos celulares

1. *Cultivo celular de monocitos de origen humano THP-1*

Se utilizaron monocitos de origen humano de la línea THP-1, incubados a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.1 mM), HEPES (25mM), 2-mercaptoethanol (0.05mM), 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 IU/ml), y estreptomina (0.1 mg/ml), a 37°C en una atmósfera al 5% en CO₂. Para llevar a cabo los ensayos de interacción celular con partículas híbridas, se cultivaron 2 x 10⁴ células en placas de 24 pozos con cubreobjetos que contenían una capa de gelatina al 0.5 % o de poli-D-lisina al 0.1 mg/ml. Posteriormente, los monocitos fueron diferenciados a macrófagos estimulándolos con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 162 nM durante 72 h. Después del tiempo de incubación, se removió el medio RPMI 1640 suplementado con PMA, cambiándolo por medio fresco por un periodo de 24 horas antes de cada ensayo. Después de cada experimento, las células fueron fijadas con 500 µl de paraformaldehído al 4% durante 15 min, lavadas con PBS 1x, marcadas con anticuerpos y DAPI como se describe más adelante, y montadas sobre un portaobjetos con una solución de montaje (Fluoroshield with DAPI, Sigma F6057). Para los experimentos de interacción células-partículas, se utilizó una densidad de 0.2 mg de partículas híbridas por ml.

2. Microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC)/Nomarski

Las observaciones de microscopía confocal de células vivas fueron realizadas en un dispositivo usando la técnica DIC/Nomarski en un microscopio invertido (Olympus IX81, Tokyo, Japan) con un lente objetivo PlanApo 60x/1.40 NA (Olympus, Japan) de inmersión en aceite, a una temperatura de 37 °C en la platina. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara con dispositivo de acoplamiento multiplicador de carga de electrones (Luca R, Andor, UK) con 1002 x 1004 píxeles. Los ensayos consistieron en una serie de adquisiciones de 31 cuadros consecutivos con intervalos de 5 segundos entre cuadros. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ. Solo se ajustó contraste y luminosidad para visualización óptima.

3. Análisis de expresión de receptores y proteínas en macrófagos THP-1 por fluorescencia y microscopía confocal

La interacción de partículas híbridas con macrófagos THP-1 fue analizada utilizando un microscopio invertido Zeiss Axio Observer 7 Confocal Laser Scanning LSM880 (Carl Zeiss, Jena, Germany), equipado con láser de argón, Diodo Azul y Helio-Neón. Se utilizó un lente objetivo de 63x (EC Plan-Neofluar-Zeiss) con una apertura numérica de 1.4 en aceite. Todas las muestras celulares fueron previamente fijadas con paraformaldehído al 4%, y se marcó con azul fluorescente el DNA por el compuesto 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se utilizó el anticuerpo primario anti-TLR2 (ab9100, Abcam) y un anticuerpo secundario conjugado

con el fluorocromo FITC, ambos diluidos 1:1000 en PBS 1x. Se tomaron imágenes a diferentes planos en el eje Z (Z-Stack). Para las pruebas de internalización de partículas híbridas con macrófagos THP-1 se realizaron ensayos por 15, 30, 60 y 180 min en medio RPMI suplementado y una concentración de 0.2 mg/ml de partículas híbridas. Se realizó una permeabilización de los macrófagos THP-1 con Triton X-100 al 0.1% seguido de lavados con PBS 1x. Se utilizó un anticuerpo anti-Rab5 (ab218624) rabbit anti-mouse como anticuerpo primario, y un anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 nm (ab150084), ambos diluidos 1:1000 en PBS 1x. También se utilizó un anticuerpo anti-LAMP1 (ab25245) como anticuerpo primario, y un anticuerpo secundario Alexa Fluor 405 nm (ab175673), ambos diluidos 1:1000 μ L. Todas las imágenes se analizaron mediante el programa Carl Zeiss Zen 3.0 SR (Black) y se realizaron procesos de imagen de intensidad máxima de proyección, así como reconstrucción en 3-D.

4. Análisis de la expresión de TLR2 en macrófagos THP-1 por citometría de flujo

Para analizar la expresión de los TLR en macrófagos THP-1 en interacción con partículas híbridas, se utilizó el citómetro (BD FACSVerserTM Cell Analyzer, USA). Para llevar a cabo los ensayos de interacción celular con partículas híbridas, se cultivaron 5×10^5 células en placas de 24 pozos para posteriormente, ser diferenciados a macrófagos estimulándolos con PMA 162 nM durante 72 h. Después del tiempo de incubación, se removió el medio RPMI 1640 suplementado con PMA, cambiándolo por medio fresco por un periodo de 24 horas antes de cada ensayo. Se realizó ensayo con diferentes tratamientos, partículas PIM@SBA15 y

control para estimular a los macrófagos THP-1. Como inductor de TLR-4 se utilizó el lipopolisacárido de *Escherichia coli* B55:05 (LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 10 ng/ml. Como inductor de TLR2 se utilizó zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5 ng/ml. Los macrófagos THP-1 fueron tratados con estos agonistas y las partículas híbridas por 6 horas a 37°C con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la expresión de TLR2 en macrófagos THP-1, por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo primario TLR2 (ab9100, Abcam) y un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo FITC, ambos diluidos 1:1000 en PBS 1x.

5. *Análisis de citocinas generadas en macrófagos THP-1 tratados con partículas híbridas*

Se caracterizó la producción de citocinas en los macrófagos THP-1 tratadas con partículas control (PC@SBA-15) y PIM@SBA-15. Se analizaron los sobrenadantes de los macrófagos sin tratamiento, tratadas con LPS, Zymosan, PIM@SBA15 y partículas control. Se utilizaron kits comerciales para la determinación de TNF- α (ab18141), IL-6 (ab178013) e IL-1b (ab214025, Abcam, Cambridge USA,) dentro de las primeras 6 horas de incubación utilizando las instrucciones del fabricante.

6. *Caracterización de partículas híbridas mediante espectroscopía infrarroja*

Se caracterizaron las muestras de las partículas híbridas PIM@SBA-15, PC@SBA-15 y aSBA15 mediante espectroscopía infrarroja. Para la caracterización de muestras por

espectroscopía se depositaron 50 μL de cada muestra en un portamuestras de vidrio recubierto con papel aluminio liso. Posteriormente se secaron las muestras al vacío por 30 min para su análisis en el espectroscopio Senterra II (Brunker, Optik GMBH) con una fuente láser de 785 nm. Se utilizó una potencia de 1 mW con un tiempo de integración de 4 segundos y un total de 8 repeticiones por punto. También se analizaron por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se empleó un equipo Brunker Vector 33 con una configuración ATR para FTIR-MIR de 4000 a 400 cm^{-1} .

7. Síntesis de nanopartículas de oro con Concanavalina A (AuNp@ConA)

Se realizó la síntesis de nanopartículas de oro con Concanavalina A de acuerdo al protocolo ya establecido del laboratorio de nanobio-óptica (Vázquez Ibarra, 2019). Brevemente, se sintetizaron las partículas de oro empleando el método convencional de Turkevich-Frens con algunas modificaciones. La síntesis nos permite obtener nanopartículas de oro de entre 18-25 nm de diámetro. Se utilizó HAuCl_4 como precursor de oro y citrato de sodio al 1% como agente reductor. Para sintetizar las nanopartículas se utilizó un volumen de 15 ml de una solución de HAuCl_4 0.25 mM, y posteriormente se llevó a ebullición. Se agregó 750 μL al 1% de citrato de sodio gota a gota a la solución. La síntesis se llevó a cabo bajo condiciones de agitación constante y ebullición por 10 min. El color de la síntesis cambia de amarillo a un rojo vino, el cual confirma la formación de nanopartículas de oro. Finalmente, la suspensión resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente.

La concanavalina A fue activada al diluirla en PBS 1X suplementado con 1 mM de CaCl₂ y MnCl₂ y mantenida a -20°C hasta su uso. Para la fisorción de la proteína sobre las nanopartículas, se consideró una relación de AuNp:ConA de 1:10 (w/w), incubando la mezcla por 48 h a 4°C.

8. *Caracterización de partículas PIM@SBA15 con AuNp@ConA*

Se estudió la afinidad de las AuNp@ConA con las partículas PIM@SBA15 mediante la espectroscopía Raman y la espectroscopía de superficie mejorada Raman (SERS). Las muestras fueron preparadas incubando las partículas híbridas con AuNp@ConA en una relación 1:1 w/w e incubadas por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la preparación de muestra para espectroscopía.

X. Capítulo 2

A. Resultados y discusión

1. Caracterización y funcionalización de partículas SBA-15

a) Propiedades texturales (XRD, BET)

El desarrollo de nanovacunas ha ganado interés debido a reportes en la habilidad de inducir una inmunización efectiva, mejorando la orientación y activación de una respuesta inmunológica. Se han estudiado sistemas de acarreo y adyuvantes para el desarrollo de vacunas y tratamientos terapéuticos contra el cáncer o enfermedades infecciosas. En este trabajo se propone una vacuna utilizando un acarreador basado en partículas de sílice mesoporosa, decoradas con lípidos de superficie bacteriana para despertar una respuesta inmunitaria.

La sílices mesoporosas la cual posee poros cilíndricos ordenados hexagonales y una pared gruesa en sus poros, así como una estabilidad termal e hidrotermal, se ha propuesto como un acarreador eficiente (Carvalho et al., 2010). Las sílices porosas ordenadas pueden ser sintetizadas con una variedad de tamaño de poro, arreglo de poro, así como con diferentes tamaños y formas. Esto permite que estas partículas presenten una alta área superficial para el cargo de antígenos, y al modificar su carga superficial permite la internalización de diferentes tallas las cuales puedan ser internalizadas por células fagocíticas (Foged et al., 2005). El material mesoporoso de sílice denominado SBA-15 se sintetizó de acuerdo con el

procedimiento descrito por Flodstrom y Alfredsson (2003) y modificado por Nava y colaboradores (2007). Una vez obtenida la síntesis de SBA-15, se realizaron pruebas de caracterización fisicoquímica y morfológica mediante diferentes métodos analíticos. El método de adsorción/desorción de nitrógeno a bajas temperaturas, es una herramienta común para medir el área superficial y distribución de tamaño de poros de un material. El método se basa en el fenómeno de adsorción física de gases en la superficie interna y externa de un material poroso. Además de poder determinar el área superficial, se puede utilizar este método con el análisis de BJH para determinar el área de poro, así como la distribución de tamaño. Esto confirma la presencia de un material ordenado mesoporoso, característico de una partícula de SBA-15. Además, se realizó un análisis mediante el método de BET, el cual indicó un área superficial de 849 m²/g y un volumen total de poro de 1 cm³/g, así como un promedio de diámetro de poro de 4.9 nm.

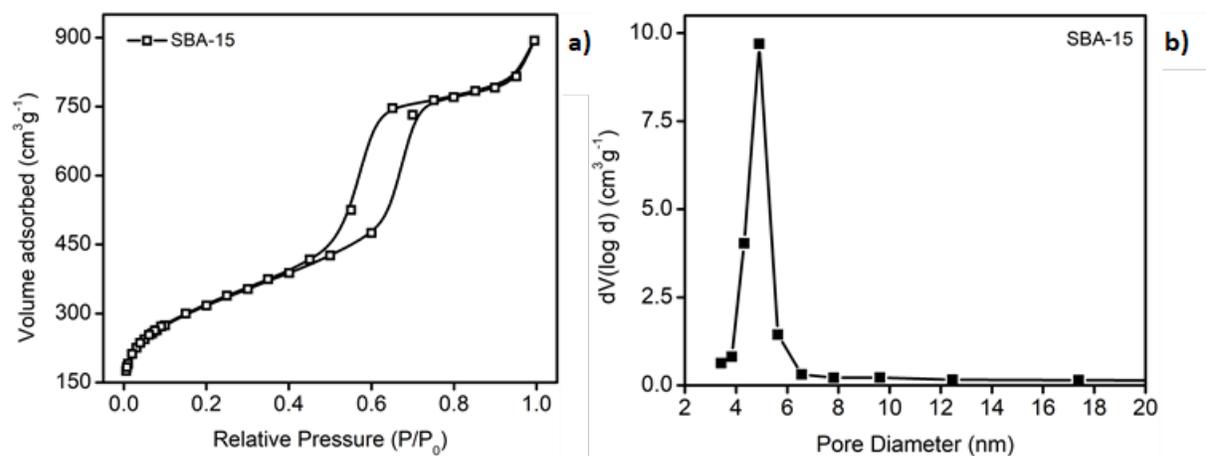


FIGURA 3. A) ISOTERMAS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE N₂ DE SBA-15 Y B) DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETRO DE PORO DE LAS PARTÍCULAS SBA-15, DE ACUERDO CON EL MÉTODO DE BET

b) Morfología y Tamaño

Con la finalidad de comprobar la morfología y formación de una estructura mesoporosa, las partículas SBA-15 se observaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Los resultados que se muestran en la figura 4, en donde se observan partículas con una estructura de forma bacilar y con un tamaño aproximado de 1-1.3 μm de largo (Figura 4a). También se observa la presencia de mesoporos hexagonales, como se esperaba para una estructura típica de la SBA-15 (Figura 4b). Una característica deseada de este material es su alta área superficial y el tamaño de sus poros. Estos poros ofrecen la oportunidad de encapsular o adsorber diferentes tipos de moléculas como DNA, fármacos, proteínas, fluorocromos y péptidos. El tamaño de la partícula es una característica importante ya que, de acuerdo con Zhao et al (2014), partículas de 0.5 a 5 μm tienden a ser internalizadas por células profesionales fagocíticas, entre ellas las células dendríticas o macrófagos (Huang et al., 2020).

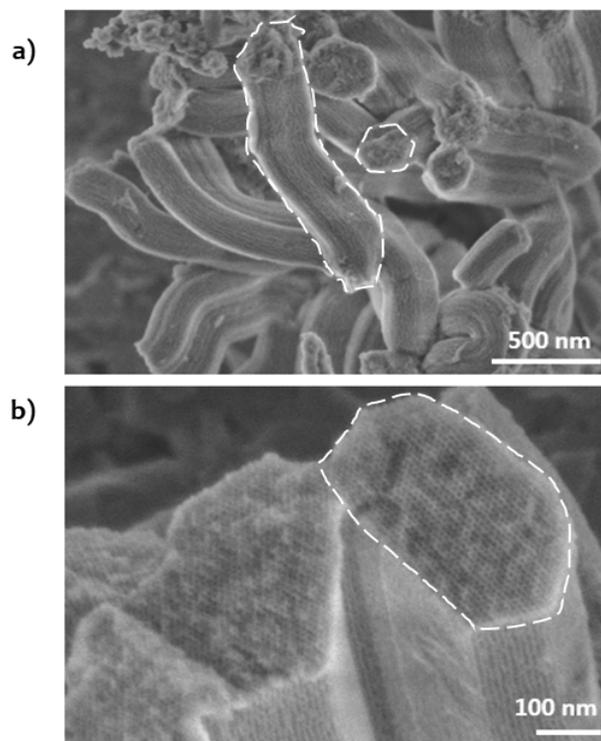


FIGURA 4. IMAGEN OBTENIDA POR SEM DE LAS PARTÍCULAS SBA-15 SINTETIZADAS A) INDICANDO CON POLÍGONOS PUNTEADOS UN RODILLO DE FORMA BACILAR DE ALREDEDOR DE 1 μm DE LARGO, Y B) LOS NANOPOROS HEXAGONALES ORDENADOS DE LA SBA-15

c) Cationización de las partículas aSBA-15 (FTIR, Potencial Zeta)

Uno de los parámetros que afectan la estabilidad y las posibles interacciones de una partícula es el potencial zeta, que es una medida de la movilidad electroforética de las partículas en un medio determinado, y ofrece información sobre la carga de las partículas en la interfase partícula-medio. En este trabajo, para realizar la funcionalización de partículas SBA-15 con lípidos aniónicos, se realizó una funcionalización con grupos amino,

cargados positivamente. En la figura 5a) se muestra el potencial zeta de la partícula de SBA-15 original y de la partícula SBA-15 aminada (figura 5b).

El potencial zeta promedio de la partícula SBA-15 original es de -0.537 mV, es decir una cifra que se aproxima al valor neutral esperado. Como esperado, la funcionalización de la partícula SBA-15 con APTES confirió a las partículas una carga positiva de su potencial, quedando con un valor de potencial zeta de $+11.8$ mV.

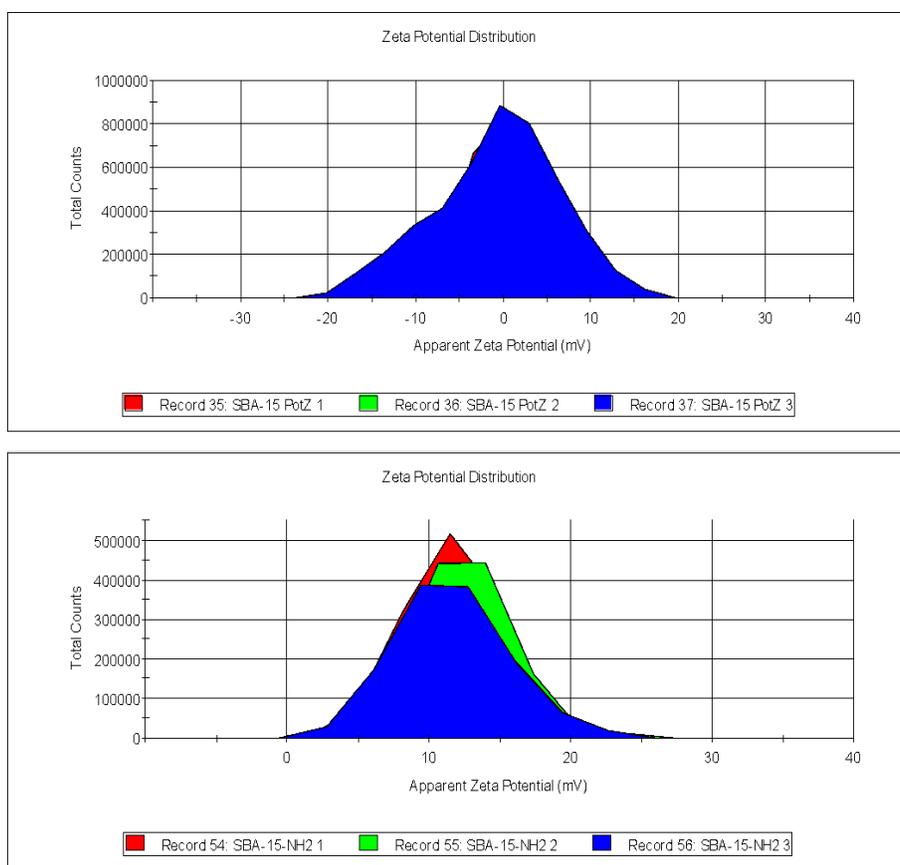


FIGURA 5. POTENCIAL ZETA PARTÍCULA A) SBA-15 Y B) SBA-15-NH₂. CADA COLOR REPRESENTA UN ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE LA MUESTRA BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.

La interacción de las partículas con los liposomas confirió a la estructura supramolecular una carga negativa de su potencial quedando un valor promedio de -8.09 mV. Se ha

reportado el escape endosomal de nanopartículas, por un cambio de carga superficial (de aniónicas a catiónicas) en compartimientos ácidos de endosomas. Uno de los grandes retos para la entrega de fármacos, DNA, o RNA, es evitar que sean degradados en los compartimientos endosomales. Se han desarrollado sistemas de entrega de fármacos que evitan la degradación endosomal mediante el uso de liposomas y materiales poliméricos. Una de las vías de escape endosomal es mediante la desestabilización de membrana, utilizando liposomas catiónicos, los cuales promueven una interacción electrostática con la membrana aniónica del endosoma y de esta manera escapando del endosoma (Lalani & Misra, 2011; Rayamajhi et al., 2020). En general, los liposomas formados con lípidos catiónicos monovalentes tienen una mejor eficiencia de transfección *in vitro* e *in vivo*. De acuerdo con lo reportado, se sugiere que tienen una mayor internalización en células debido a una interacción iónica no específica y que los proteoglicanos en la membrana celular juegan un papel importante en este proceso (Mounkes et al., 1998). Al igual, estos lípidos catiónicos promueven un escape endosomal por el mecanismo de par de iones. En este caso, los lípidos catiónicos forman pares de iones con los lípidos aniónicos (como la fosfatidilserina) que se encuentran en la membrana del endosoma, permitiendo el desensamble y la liberación del cargo. Además, este mecanismo de par iónico promueve la fusión de membrana del endosoma con el liposoma, liberando el cargo en el citoplasma (Rehman et al., 2013; Xia et al., 2016).

La construcción final fue sometida a diferentes pH específicos para evaluar la estabilidad de las partículas híbridas. En la figura 6, se muestran las cargas de su potencial; a pH 5, las partículas híbridas cambian su potencial negativo a uno positivo con un valor promedio de

2.43 mV. Las partículas híbridas pudieran escapar fácilmente al citosol, como ha sido reportado con nanopartículas de PLGA que también contienen grupos protonables que influyen en su carga superficial (Panyam et al., 2002). De acuerdo a lo descrito por Panyman y Labhasetwar, esto causa que las partículas interactúen con la membrana del endosoma y permite el escape de ellas al citosol (Panyam et al., 2002; Panyam & Labhasetwar, 2003).

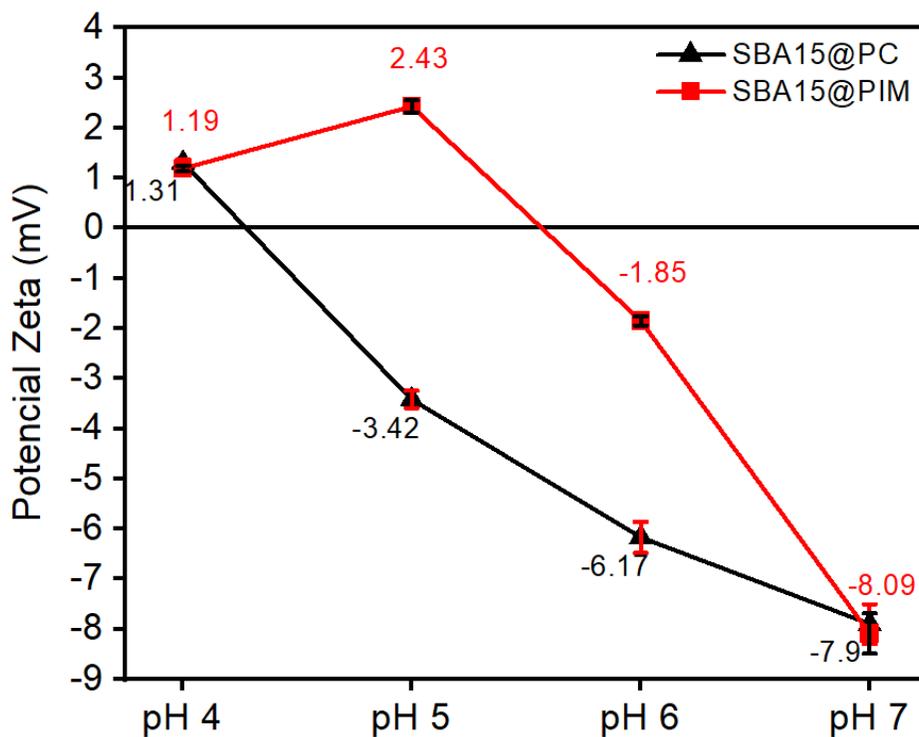


FIGURA 6. POTENCIAL Z DE PARTÍCULAS DE SBA-15 DECORADAS CON PIMs DE *M. TUBERCULOSIS*, REALIZADOS EN PBS 1x A DIFERENTE PH. LA LÍNEA ROJA REPRESENTA LOS VALORES DEL POTENCIAL ZETA OBTENIDOS DE LAS PARTÍCULAS PIM@SBA-15 Y LA LÍNEA NEGRA LOS VALORES DE PC@SBA-15. LA GRÁFICA MUESTRA LOS VALORES OBTENIDOS DE UN EXPERIMENTO POR TRIPLICADO.

2. Caracterización estructural de las partículas híbridas SBA 15-liposoma

a) Caracterización de componentes y estructuras membranales (lípidos de BCG, liposomas)

Las nanoestructuras híbridas son producidas a partir de SBA-15 y liposomas con PIMs obtenidos de *M. bovis* BCG, esquematizado en la figura 7. Los liposomas fueron formulados con una mezcla de PIMs y PC en una relación peso de 1:1, también se formularon liposomas solo de PC como control. Los liposomas de PC mezclados con PIMs se analizaron mediante cromatografía de capa fina, método que demostró la presencia de las señales características de PC, así como de los PIMs de micobacterias. Uno de los métodos más comunes para la adherencia de partículas con una capa bilipídica, es por un recubrimiento espontáneo entre partículas y liposomas. Los liposomas recubren a la superficie de las partículas de sílice debido al intercambio electrostático entre la sílice y cargas opuestas de los liposomas (Butler et al., 2016; J. Liu et al., 2009). Al estar en contacto los liposomas con las partículas de sílice, el área de contacto entre la superficie de los lípidos y del sustrato se incrementa, debido a las fuerzas de adhesión. Esto lleva a la formación de una capa lipídica al presentarse este proceso continuamente, hasta su completa decoración. Las interacciones electrostáticas juegan un papel determinante en la formación de estas capas lipídicas en sustratos como la sílice (Mornet et al., 2005). Se analizó el potencial zeta de los liposomas, el cual presentó un valor negativo de -49.7 mV, atribuido a la presencia de fosfoinosítido aniónico. Debido al potencial zeta de los liposomas, se procedió a cationizar la SBA-15 con

grupos amino para mejorar la interacción entre ellos, dando lugar a enlaces electrostáticos entre el grupo amino, con carga positiva, y los liposomas, con lípidos de carga negativa.

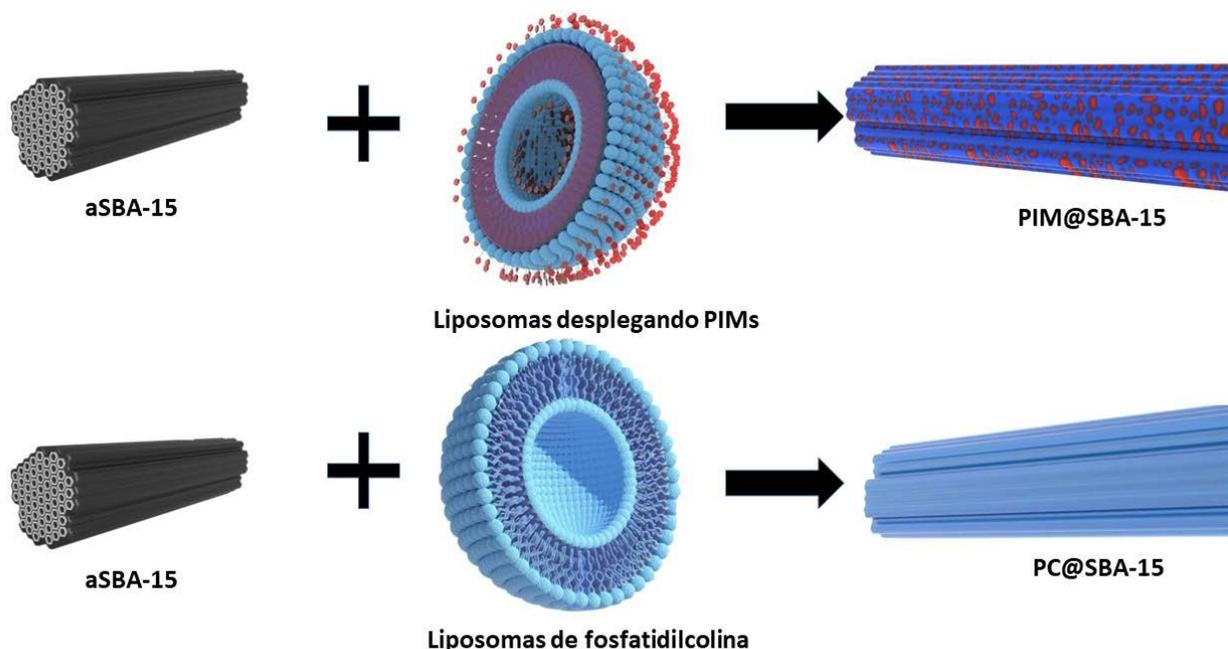


FIGURA 7. ESTRATEGIA PARA EL RECUBRIMIENTO DE UNA PARTÍCULA MESOPOROSA CON LIPOSOMAS QUE CONTIENEN PIMs O LIPOSOMAS CONTROL

El extracto de lípidos totales de BCG fue separado por cromatografía en columna de fase sólida, posteriormente una porción de la fracción la cual contiene los PIMs fue purificada usando una columna de gel de sílice pre-empaquetada (Sep-Pak, Waters Associated, USA). El volumen purificado de PIMs de BCG fue analizado mediante cromatografía en capa fina en 1-D, y las 5 fracciones obtenidas se revelaron con antrona y azul de molibdeno para confirmar la presencia de PIMs purificados. En la figura 8 tenemos en la fila 1 la señal obtenida de los PIMs no purificados, en donde se presentan las señales características de los PIM2 a PIM5 en los dos revelados, e identificado con una flecha amarilla un glicolípido no identificado se presenta sólo en el revelado por antrona. En la fila 2 y 3 tenemos las

eluciones que presentan señales de los PIMs. En la fila 2 se observa las señales características de PIMs (PIM2-PIM5) confirmados por el revelado de antrona y azul de molibdeno. En la fila 3 se presenta una pequeña señal de PIM2 junto con la señal del glicolípido no identificado. De las especies de glicolípidos más predominantes en micobacterias son los PIM2 y PIM6; los PIMs y los fosfatidil-inositol contribuyen casi al 56% de todos los fosfolípidos en la pared celular (Abrahams & Besra, 2018). De acuerdo al patrón de corrimiento previamente reportados de los PIMs de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, se establece que PIM1 y PIM2 son los más preponderantes seguido por PIM6 (Alexander et al., 2004; Gilleron et al., 2001; Kremer et al., 2002; Torrelles et al., 2006; Villeneuve et al., 2005). La síntesis de lípidos de micobacterias como los PIMs se ha descrito para el desarrollo de métodos de diagnóstico, vacunas e inmunoestimulantes (Holzheimer et al., 2021). Se han elaborado PIMs sintéticos (Ainge et al., 2006) o miméticos los cuales han sido reportados y estudiado para evaluar su capacidad en modular la respuesta inmunitaria (Holzheimer et al., 2021).

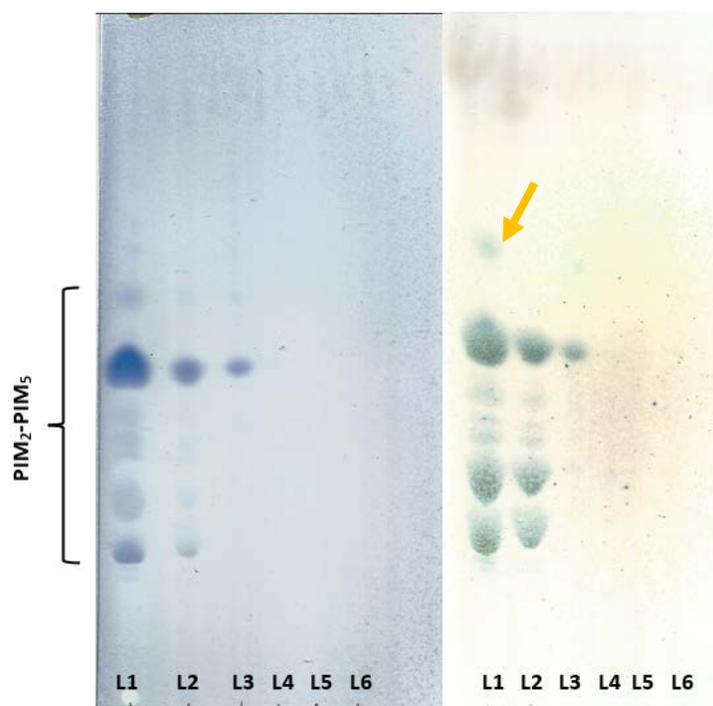
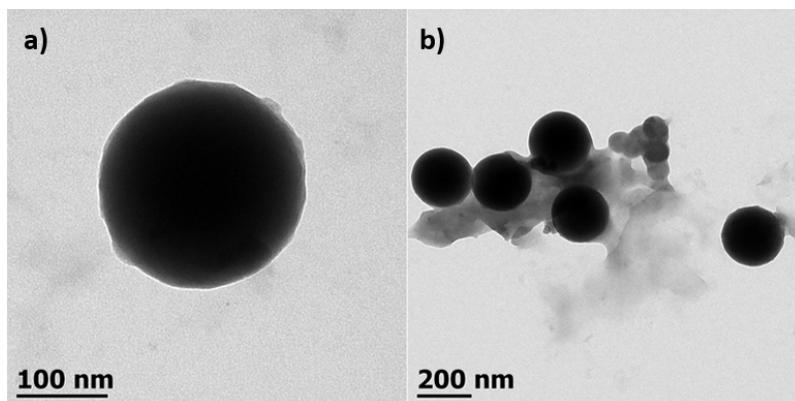


FIGURA 8. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE PIMs DEL BCG CEPA MÉXICO. LA ELUCIÓN SE LLEVÓ A CABO CON UN SOLVENTE POLAR CLOROFORMO/METANOL:AGUA (60:35:8 v/v/v) Y SE REVELÓ LA PLACA A) CON AZUL DE MOLIBDENO Y B) CON ANTRONA. EN LA LÍNEA 1 SE COLOCARON PIMs SIN PURIFICAR Y EN LAS LÍNEAS 2-6 SE COLOCARON LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PURIFICACIÓN DE PIMs. EN EL CARRIL L1 SE MUESTRA UN GLICÓLIPIDO NO FOSFORILADO DE ESTRUCTURA DESCONOCIDA (FLECHA AMARILLA).

Los liposomas fueron los primeros sistemas de entrega de fármacos trasladados exitosamente a aplicaciones clínicas. Los fosfolípidos son lípidos anfipáticos que se ensamblan automáticamente en bicapas lipídicas o liposomas. Dentro de los fosfolípidos comúnmente utilizados en sistemas de entrega de fármacos, la fosfatidilcolina (PC) ha sido reportada como un lípido excelente para la formación de liposomas. Este lípido puede ser mezclado con otros lípidos para modificar las características de los liposomas, tales como la presencia de grupos funcionales, su carga eléctrica, o la introducción de polímeros hidrofílicos que protegen al liposoma de ser degradado o reconocido por leucocitos. Debido a que los liposomas de fosfatidilcolina no activan una respuesta proinflamatoria en el

sistema inmunitario (Treede et al., 2007), al ser dopados con lípidos obtenidos a partir de micobacterias despertarán una respuesta inmunológica. Recientemente algunos lípidos de la pared micobacteriana han sido utilizados como inmunomoduladores en vacunas (Agger, 2016). Esto incluye a los fosfoglicolípidos denominados fosfatidilinositol manósidos (PIMs), son comúnmente encontrados en los lípidos “extraíbles” de la capa externa bacteriana. Además, estudios recientes han demostrado que son capaces de levantar una respuesta celular inmunológica. En condiciones fisiológicas, la capa externa es comúnmente el primer contacto entre la pared bacteriana y el sistema inmunológico. El interés en los PIMs aumentó debido a que se observó que el PIM2 forma el sitio de anclaje para diferentes arreglos de glicolípidos y lipoglicanos (incluyendo a LM y LAM) en la pared celular bacteriana. Los liposomas se construyeron combinando fosfatidilcolina con los PIMs purificados en una relación de masas 1:1. De esta manera se logró la construcción de liposomas con aspecto redondo, muy similar a la estructura que forman los liposomas a partir de PC (Figura 9 a). Al visualizar los liposomas mediante TEM, se observa un diámetro aproximado de 200 a 250 nm (Figura 9 b)).



FIGURAS 9. TEM DE LIPOSOMAS UNILAMINARES DE PC CON PIMs DE BCG

Para saber si las partículas de SBA-15 desplegaban lípidos se realizó un análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Este método utiliza radiación infrarroja la cual se hace incidir sobre una muestra, donde parte de la radiación es adsorbida por la muestra y el resto se transmite. La señal resultante es detectada, y produce un espectro que representa la “huella digital” molecular de la muestra. En esta técnica, las vibraciones de una molécula se deben a la presencia de grupos funcionales específicos. En la figura 10 se observó que las partículas denominadas como PIM@SBA-15 y PC@SBA-15 mostraron señales características del material de sílice, así como señales características de los lípidos, confirmando el recubrimiento de las partículas con estas biomoléculas. En la Tabla 3 se muestra las bandas obtenidas de las partículas híbridas por espectroscopía infrarroja.

TABLA 3 BANDAS CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL ANALIZADO POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

	Bandas	Tipo de vibración
1	950	Si-OH
2	1234	R-PO₂⁻
3	1562	R-NH₂
4	2854	CH₂
5	2962	CH₂

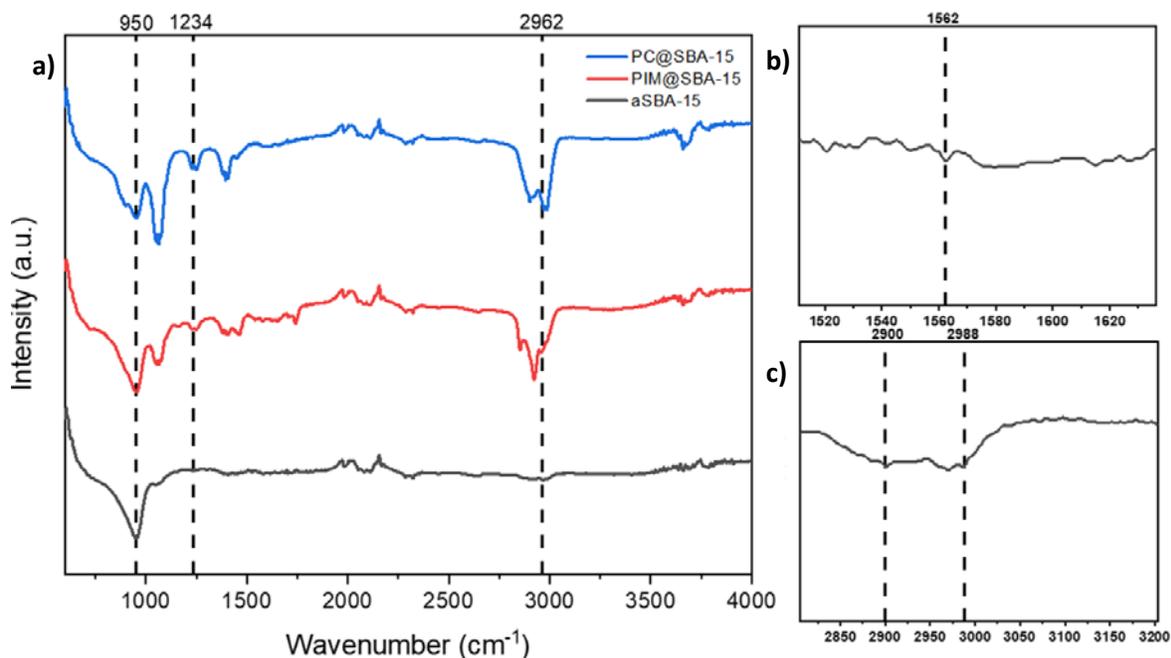


FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15. EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN FTIR DE LAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS MUESTRAN SEÑALES DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE LA ESTRUCTURA INORGÁNICA (SÍLICE) Y DE LOS LÍPIDOS. LOS RECUADROS B) Y C) REPRESENTAN LA MAGNIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE ADSORCIÓN DE 1500-1640 Y 2800 A 3200 cm^{-1} DE LA PARTÍCULA ASBA-15. GRÁFICA REPRESENTATIVA DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

b) Caracterización y funcionalización de partículas SBA-15

La EDS es una técnica analítica semi cuantitativa empleada para el estudio elemental o caracterización química de una muestra. Está basada en el principio de la energía característica de los rayos X emitidos por cada elemento, los cuales son inducidos al someter la muestra a una radiación ionizante, específicamente al haz de electrones en un microscopio electrónico.

Para confirmar la presencia de lípidos sobre la superficie de las partículas se procedió a hacer un análisis por EDS de la muestra, y así revelar la presencia de los elementos

presentes. En la figura 11, se muestra el mapeo de las partículas aSBA-15, así como de las partículas híbridas PIM@SBA-15. La imagen obtenida de las partículas PIM@SBA-15 sugiere fuertemente la presencia de un recubrimiento que contiene carbono en su superficie dado el aumento importante en la señal de este elemento colocalizado con el silicio. En la figura 11 a) se muestra el análisis de los elementos presentes en aSBA-15; se detectó la presencia de carbono en bajas proporciones cuando únicamente el isopropil del grupo funcional aminado está presente, pero significativamente aumentadas cuando se presenta el análisis de partículas con liposomas. En la figura 11 b) se analizó la muestra PIM@SBA-15 la cual se observa que hay mayor abundancia de carbono en las muestras decoradas, los cuales están presentes en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Se observan señales de carbono, cuya abundancia se correlaciona con las estructuras de la SBA15 visualizadas por microscopía. Estos análisis en conjunto sugieren fuertemente una decoración exitosa de la SBA-15 que despliegan en su superficie lípidos con PIMs.

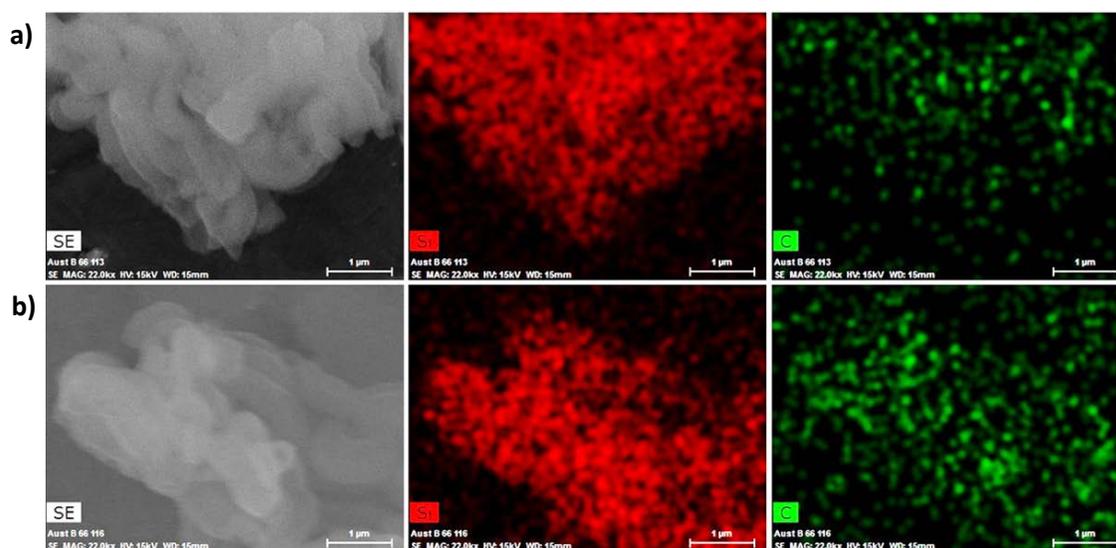


FIGURA 11. MAPEO DE RAYOS X EMITIDOS POR LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS PARTÍCULAS A) ASBA-15 Y B) PIM@SBA-15. SE MUESTRA EN ROJO LA SEÑAL DE SILICIO, Y EN VERDE LA SEÑAL DE CARBONO.

La partícula denominada PIM@SBA-15 se analizó por microscopía electrónica de transmisión (Figura 12), mostrando que la partícula tiene un recubrimiento en su superficie. Debido a este recubrimiento, las características superficiales de la partícula ya no son visibles. Estos análisis en conjunto muestran una decoración exitosa de la SBA-15 que despliegan en su superficie lípidos con PIMs.

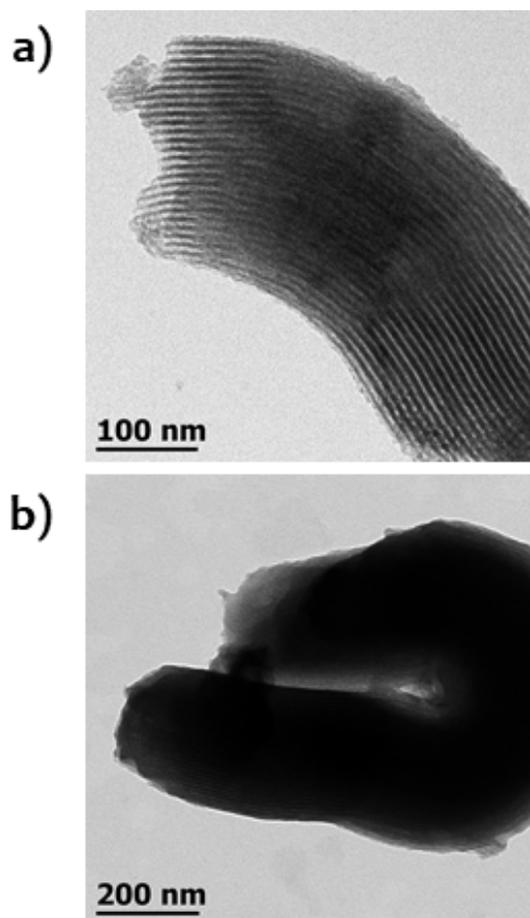


FIGURA 12. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15. IMÁGENES DE TEM A) MUESTRA SBA-15 (NO RECUBIERTA), B) PARTÍCULA DE SBA-15 DECORADA CON LIPOSOMAS CON PIMs DESPUÉS DE TINCIÓN NEGATIVA.

3. *Producción de partículas híbridas aSBA15-liposomas*

a) Desarrollo de estrategias de análisis de partículas híbridas SBA-15-liposomas

Aunque los análisis arriba descritos apoyan fuertemente la decoración exitosa de partículas SBA-15 con liposomas, era necesario contar con mayor evidencia de la decoración de partículas de sílice con lípidos bioactivos (PIMs). Asimismo, el contar con un método capaz de asegurar la funcionalización y calidad de cada lote producido por estas partículas híbridas sería sumamente valioso. Para ello, en este trabajo se implementó un análisis novedoso, basado en la afinidad de PIMs por la lectina Concanavalina A, y unas nanopartículas funcionales previamente desarrolladas en el laboratorio de Nanobio-óptica para análisis de espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS, por sus siglas en inglés Surface Enhanced Raman Spectroscopy): las nanopartículas de oro funcionalizadas con Concanavalina A (Vázquez Ibarra, 2019).

La espectroscopía Raman detecta los modos vibracionales de grupos funcionales en las moléculas, de tal manera que puede funcionar como una herramienta de análisis molecular. El efecto Raman surge de la interacción de un haz de luz (fotones) con la materia que está siendo investigada. Durante esta interacción, los fotones pueden perder o ganar energía igual a la energía vibracional molecular. De los fotones incidentes, solo unos cuantos (1 de cada $\sim 10^8$) experimentan el efecto Raman, al perder energía con los modos vibracionales moleculares de la muestra (Jarvis & Goodacre, 2004). Estos fotones que experimentan este

efecto son los que se detectan para obtener el espectro de la muestra. Toda macromolécula presenta un espectro Raman con señales específicas. Las vibraciones moleculares en algunos grupos funcionales pueden ser típicas de ese grupo en particular, y no se ven afectadas por el resto de las moléculas o por el ambiente. Estas vibraciones características del espectro son utilizadas para la identificación instantánea de ciertos grupos funcionales en biomoléculas. El uso de la espectroscopía Raman para análisis de biomoléculas presenta las ventajas de ser rápido, no destructivo y se necesita poca preparación de la muestra (Niaura, 2000).

Aunque el espectro Raman nos proporciona información estructural, la complejidad de las biomoléculas puede afectar el análisis. El espectro puede contener mucha información consistente de muchas señales o bandas que se superponen, dificultando su interpretación. También debido a que el efecto Raman es bastante débil, usualmente altas concentraciones de las biomoléculas son requeridas para tener un buen espectro. Afortunadamente, el análisis SERS ha generado interés como una técnica bioanalítica prometedora, combinando la información estructural presente en Raman con una detección ultrasensible (Jia et al., 2018). Se han reportado estudios de biomoléculas que algunos nanomateriales proveen un incremento de su señal Raman, incluso a concentración micro y nanomolares (Niaura, 2000). Este incremento de señal se debe al campo electromagnético cercano que ocurre entre moléculas y superficies de nanoestructuras de metales nobles, usualmente oro y plata. Cuando los fotones interactúan con las nanoestructuras metálicas, modos localizados de plasmón de superficie son excitados y se induce un evanescente pero fuerte campo electromagnético en la superficie de las nanoestructuras. Si existe una molécula cerca de la

estructura metálica las señales Raman de esa molécula son aumentadas, esto se debe a que el efecto SERS es dependiente a la distancia (Jarvis & Goodacre, 2004; Nguyen et al., 2017).

El objetivo molecular debe estar muy cerca para poder generar el incremento de la señal.

Consecuentemente, se planteó el diseño y construcción de una nanopartícula de oro y su funcionalización con una lectina que reconoce de manera específica carbohidratos.

Brevemente se sintetizó nanopartículas de oro por el método de Turkevich, y se funcionalizó con Concanavalina A la cual es una lectina de origen vegetal. Las nanopartículas de oro al

estar expuestas a las proteínas tienden a formar una estructura denominada como corona proteica, esto le confiere al nanomaterial una nueva identidad biológica.

b) Detección mediante SERS y partículas funcionales

Se utilizaron estas nanopartículas de oro funcionalizadas con concanavalina A (Au@ConA) para detectar la presencia de carbohidratos (manosas) en las partículas híbridas mediante el análisis por SERS. Se realizaron incubaciones de las partículas PIM@SBA-15 y PC@SBA-15 con las partículas Au@ConA. A pesar de que las manosas tienen una presencia importante en patógenos, es el monosacárido menos estudiado y existe poca literatura del estudio de ellos por espectroscopía.

Basado en los resultados obtenidos y resultados de otros reportes, la región entre 1000-700 cm^{-1} es donde se presenta la señal característicamente de las vibraciones de los grupos funcionales C—C y C—C—H. Esta región es donde se observan las señales características de los carbohidratos. En la figura 13 se observa el promedio de 5 espectros obtenidos

después de la incubación con Au@ConA y las partículas PIM@SBA-15, PC@SBA-15. Se evidencia que dentro del rango donde se detectan los carbohidratos, las partículas PIM@SBA-15 muestran señales características dentro de la región de carbohidratos. En cambio, las partículas PC@SBA-15 y las Au@ConA solas, no presentan señales específicas a los azúcares. Esto confirmando una decoración superficial de las partículas PIM@SBA-15 con un glicolípido y demostrando la diferencia de nuestra partícula control. Las líneas punteadas de color negro muestran las bandas 776, 826 y 893 cm^{-1} pertenecientes a carbohidratos α -piranosas, y se describen en el libro de *Infrared & Raman Characteristic Group Frequencies* de George Sócrates. Las líneas de color morado en 982 y 1147 cm^{-1} son las señales características de la proteína ConA, las cuales pertenecen a el anillo aromático de la fenilalanina y al modo vibracional de C—C respectivamente.

TABLA 4 BANDAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBOHIDRATOS ENCONTRADOS EN PIM@SBA-15 Y DE LA CONCAVALINA A

	Bandas	Tipos de vibración
1	776	Vibración de anillo α-piranosa
2	826	C—H vibración característico de α
3	893	C—H ecuatorial
4	982	Anillo aromático fenilalanina
5	1147	C-C vibración

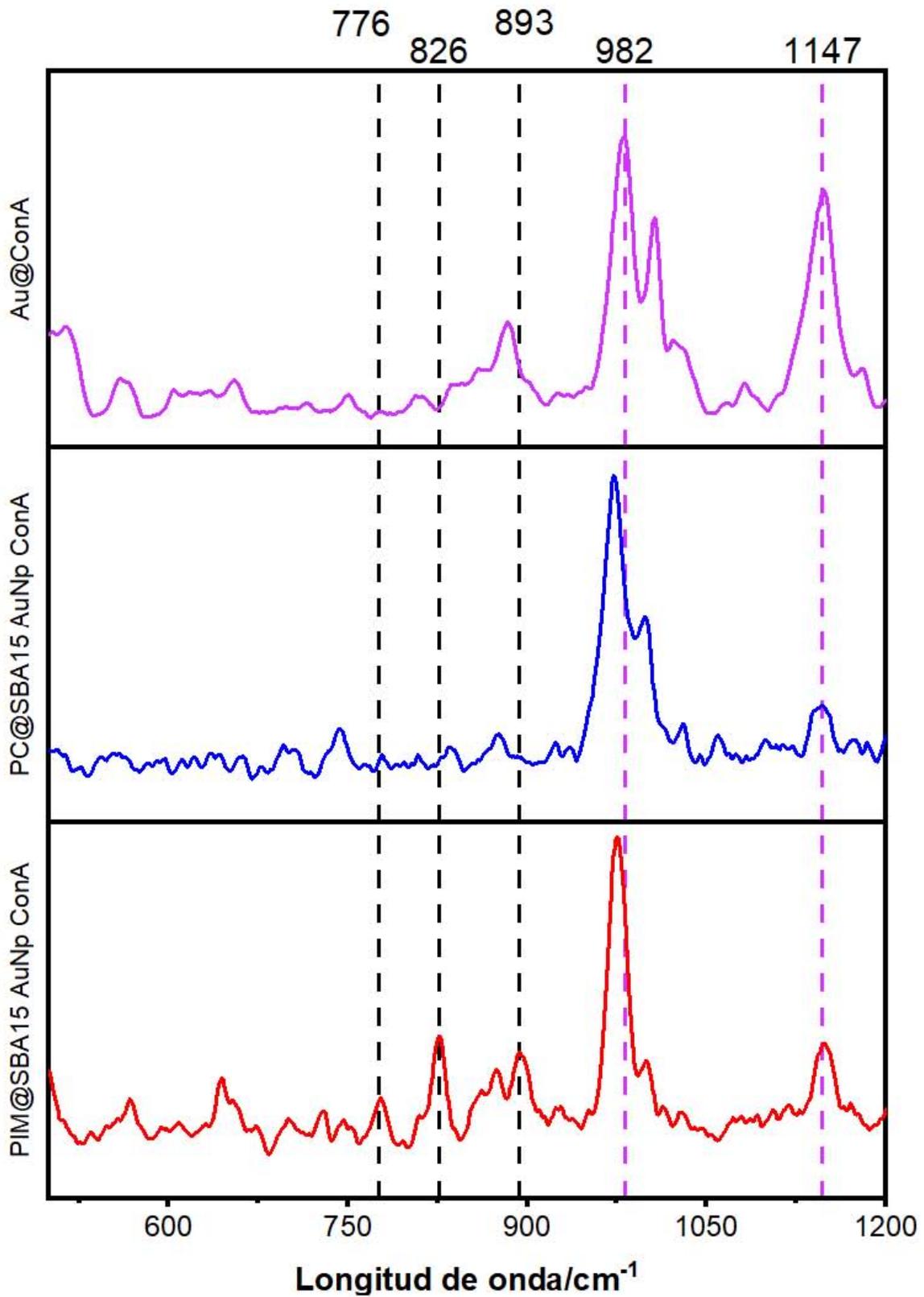


FIGURA 13. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15 POR SERS. LAS LÍNEAS PUNTEADAS NEGRAS SON LAS BANDAS PARA CARBOHIDRATOS, Y LAS BANDAS DE COLOR MORADO PERTENECEN A LA CONCAVALINA A. GRÁFICA REPRESENTATIVA DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

4. *Potencial de partículas híbridas SBA-15-liposomas para fines de vacunación*

- a) Evaluación de biocompatibilidad de las partículas híbridas en cultivos celulares *in vitro* en línea primaria de fibroblastos gingivales

Estudios encontrados en la literatura sugieren que las nanopartículas de sílice son biocompatibles y se degradan con el tiempo en el cuerpo. Estudios de citotoxicidad *In vitro* han concluido que la toxicidad de ellas aumenta conforme a su concentración. La morfología y la carga superficial pudieran ser factores importantes que afecten el destino de las partículas en seres vivos. En este trabajo se evaluó el efecto de la decoración con liposomas que contienen PIMs sobre la citotoxicidad de las partículas SBA-15 aminadas convencionales (aSBA-15).

Se realizó el ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) MTT para evaluar la viabilidad celular. Este compuesto soluble en agua y con color amarillo es reducido debido a la actividad metabólica de las células, las cuales convierten al MTT en formazano (Keong & Halim, 2009). Esta reacción es catalizada en su mayoría en la membrana externa de la mitocondria e involucra las enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H (Berridge & Tan, 1993; Mosmann, 1983, p.); solo las células metabólicamente viables pueden reducir el MTT. Por lo tanto, la producción de formazano es proporcional al número de células viables y se mide la absorbancia de la solución de formazano por métodos espectroscópicos (Morgan, 1997).

Para los estudios de biocompatibilidad se utilizó un cultivo primario de fibroblastos humanos (Contreras et al., 2010). Estas células son los residentes abundantes en tejido conectivo, y son comúnmente utilizadas para evaluar la toxicidad de los materiales (Pizzoferrato et al., 1994; Soares et al., 2018).

El uso de nanopartículas de sílice se ha propuesto debido a su biocompatibilidad y a que se degradan en el cuerpo con el tiempo. Los efectos de nanopartículas mesoporosas sobre células han mostrado que dosis mayores o iguales a 0.5 mg/ml arrojan resultados de alta toxicidad al usar este modelo en monocapa, mientras que la mortalidad causada por dosis menores han sido consideradas como aceptable (Hudson et al., 2008). En este trabajo, las partículas aminadas sin recubrimiento de liposomas, aSBA-15, presentaron una toxicidad dependiente de la dosis, como esperado. En cambio, los ensayos mostraron que las partículas recubiertas con liposomas (PIM@SBA-15 y PC@SBA-15) resultaron de una biocompatibilidad mucho mayor (Figura 14) (Durfee et al., 2016; LaBauve et al., 2018).

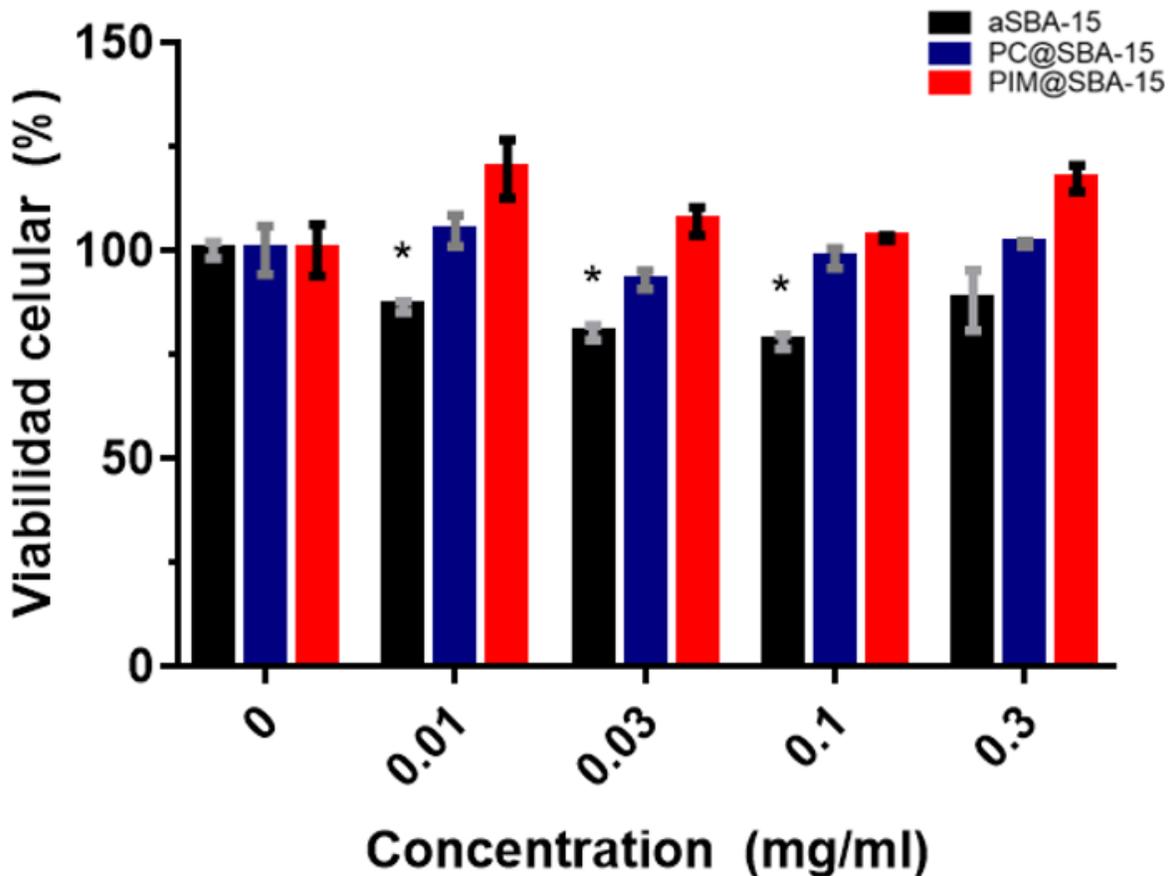


FIGURA 14. ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS A 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON aSBA-15, PC@SBA-15 Y PIM@SBA-15. ENSAYO COLORIMÉTRICO MTT. ANÁLISIS POR T STUDENT $P < 0.05$. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos después de 48 horas de incubación con las partículas híbridas y la partícula aSBA-15. La partícula aSBA-15 muestra una disminución en la viabilidad celular dependiente de su concentración. Estos resultados concuerdan con otros estudios de la biocompatibilidad *in vitro* de la SBA-15, donde a concentraciones mayores a 0.5 mg/ml inhiben el crecimiento celular (Lu et al., 2010). Sin embargo, las partículas PIM@SBA-15 y las partículas control continúan mostrando una buena biocompatibilidad. A las 48 h de exposición con partículas híbridas vemos un decremento

en el porcentaje de viabilidad celular, aunque en comparación con las partículas no decoradas, el resultado muestra menor porcentaje de toxicidad. Se ha reportado que una decoración superficial con lípidos de las partículas de sílice, mejora la biocompatibilidad así como su posible uso para una liberación de fármacos controlada (Han et al., 2016).

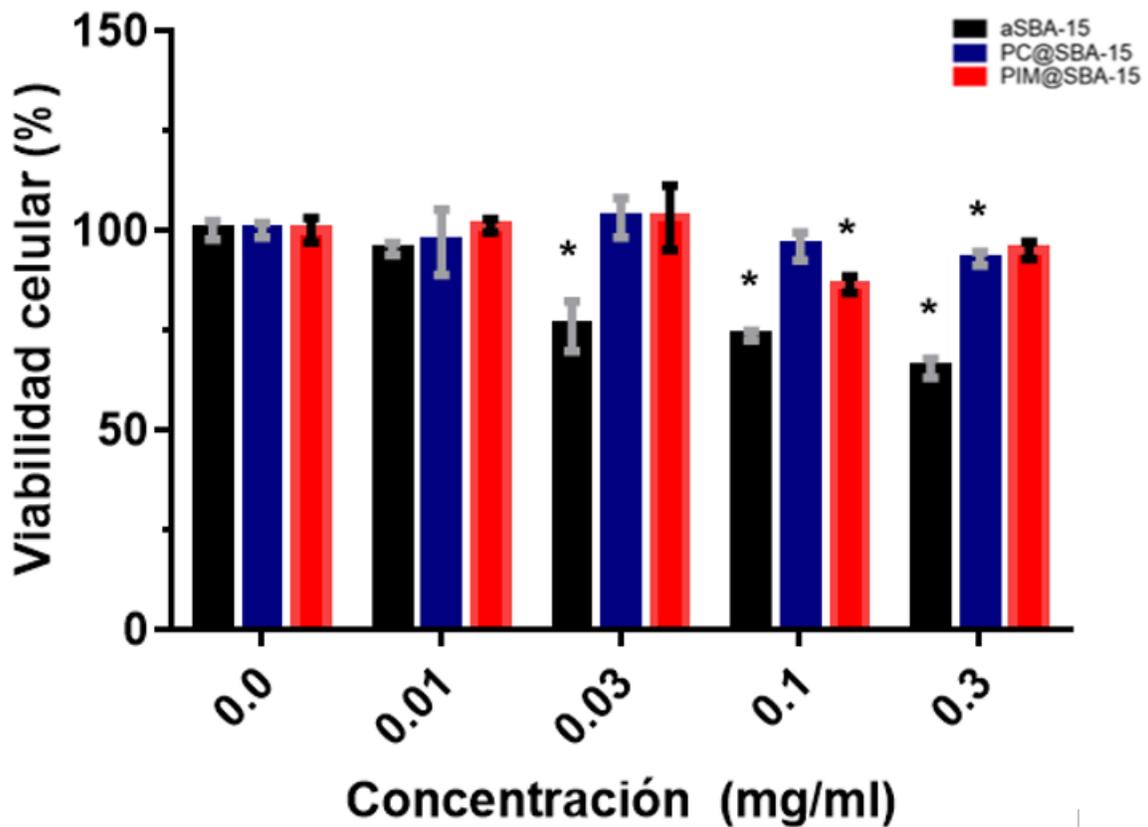


FIGURA 15. ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS A 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON aSBA-15, PC@SBA-15 Y PIM@SBA-15. ENSAYO COLORIMÉTRICO MTT. ANÁLISIS POR T STUDENT $P < 0.05$. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM.

b) Incubación de partículas híbridas con macrófagos derivados de monocitos THP-1 para evaluar expresión de TLR-2

Los macrófagos son células heterogéneas que mediante diferentes mecanismos varían su respuesta a un estímulo, y usualmente se pueden caracterizar como M1 (activación clásica) o M2 (activación alternativa) (Chanput et al., 2014a). La caracterización de la activación de los macrófagos se puede realizar mediante diferentes ensayos como el aumento en la expresión de factores de transcripción (NFkB, AP-1, INF, etc.), la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-8 e IL-12), el aumento en la expresión de PRRs (como los TLR y los NOD), además de por su actividad fagocítica y la actividad de especies reactivas de oxígeno (Chanput et al., 2014a; Genin et al., 2015).

Los receptores TLR2 reconocen una variedad de PAMPs, como de bacterias Gram-positivas y negativas, lipoproteínas y peptidoglicanos, entre otras moléculas (Akira et al., 2006). Se ha descrito que, tras la infección de micobacterias, el receptor TLR2 que se encuentra expresado en células del sistema inmunitario innato, detecta la presencia de los PIMs (Vijay, 2018). Los PIMs han demostrado ser una de las estructuras moleculares principales en micobacterias. Esta activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del sistema inmunitario innato promueven la activación de eventos celulares, tales como el estallido respiratorio, la internalización por fagocitosis, y la producción de citocinas pro-inflamatorias (Guerin et al., 2010; X. Liu et al., 2006). En este trabajo se realizaron ensayos para determinar la producción de citocinas proinflamatorias, la expresión de PRRs

específicamente los TLR2, y la internalización por fagocitosis para determinar si los PIMs promueven eventos celulares previamente descritos.

Los monocitos THP-1 son tratados con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) para iniciar adherencia a la caja de cultivo y diferenciación a macrófagos THP-1. Esto permite obtener macrófagos derivados de monocitos THP-1, para utilizarlos como un modelo de macrófagos humanos derivados de monocitos circulantes, ya que presentan una capacidad fagocítica y expresión de receptores y un perfil de expresión de comparable después de estar expuesto a un agonista de TLR (Chanput et al., 2014b, 2015).

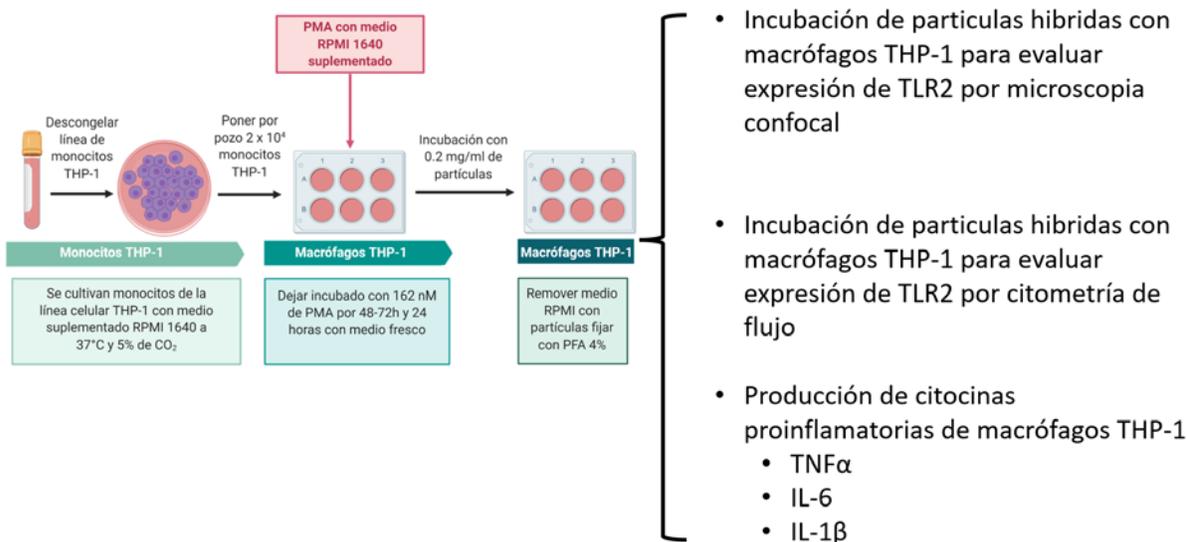


FIGURA 16. DIAGRAMA DE FLUJO PARA OBTENER MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS THP-1 Y LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS DESARROLLADAS

La construcción de partículas biomiméticas PIM@SBA-15 fue diseñada para desplegar en su superficie PIMs. Con el objetivo de evaluar la interacción de las partículas híbridas con fagocitos, macrófagos derivados de monocitos THP-1, se utilizaron partículas de aSBA-15

que desplegaban PIMs en liposomas que recubrían las partículas, y el fosfolípido PE conjugado con rohdamina fue también añadido para fines de marcaje por microscopía de fluorescencia.

Se realizó un análisis confocal para observación de partículas (marcadas con Rho-PE) y se utilizó un anticuerpo anti-TLR2 para detectar la presencia de este receptor en los macrófagos. En la figura 17 y 18, se muestra una microscopia de macrófagos THP-1 en presencia de partículas con lípidos bacterianos (PIM@SBA-15) y partículas control (PC@SBA-15) durante seis y doce horas, respectivamente. Se observa en la figura 17 que, en presencia de partículas PIM@SBA-15, hay una mayor expresión de los receptores TLR2 de los macrófagos. Los macrófagos muestran una clara colocalización de las señales de los TLR2 con las partículas PIM@SBA-15. Por otro lado, la expresión de TLR2 en los macrófagos tratados con partículas PIM@SBA-15 es incrementada después de 6 y 12 h (figura 18), con respecto a lo encontrado en las partículas control PC@SBA-15. Más aun, los macrófagos incubados con partículas PIM@SBA-15 muestran vesículas de gran tamaño (resaltadas en círculos amarillos), sugiriendo una actividad lisosomal importante.

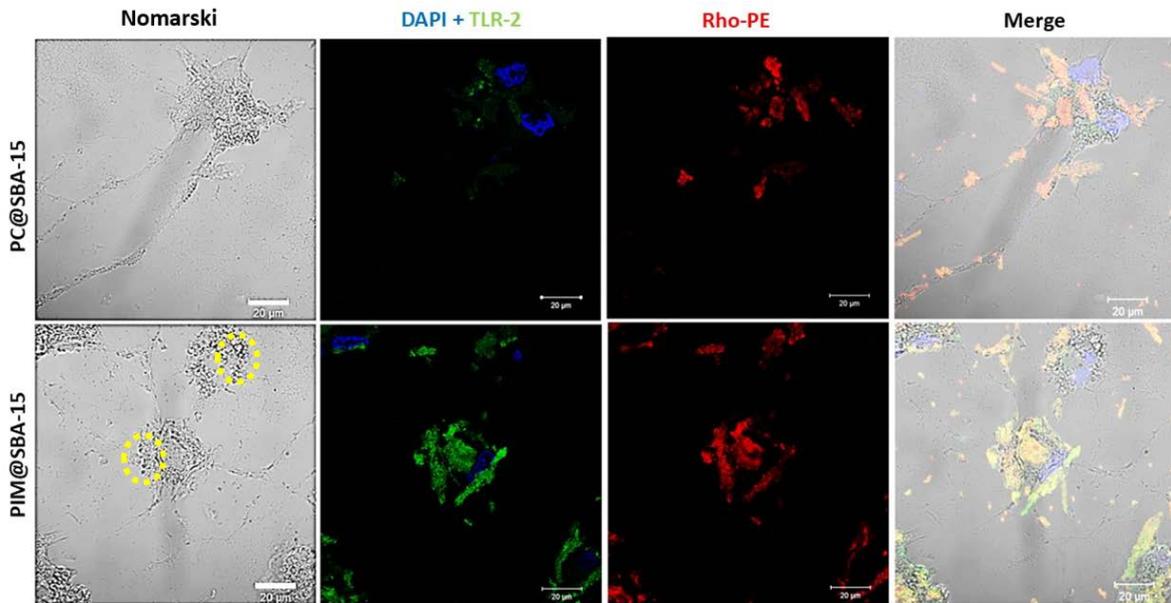


FIGURA 17. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 6 HORAS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), BICAPA LIPÍDICA SUPERFICIAL EN PARTÍCULAS CON RHO-PE (ROJO) Y RECEPTOR TLR2 CON FITC (VERDE). DENTRO DE LOS CÍRCULOS AMARILLOS SE MUESTRA VESÍCULAS DE GRAN TAMAÑO. IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 µM.

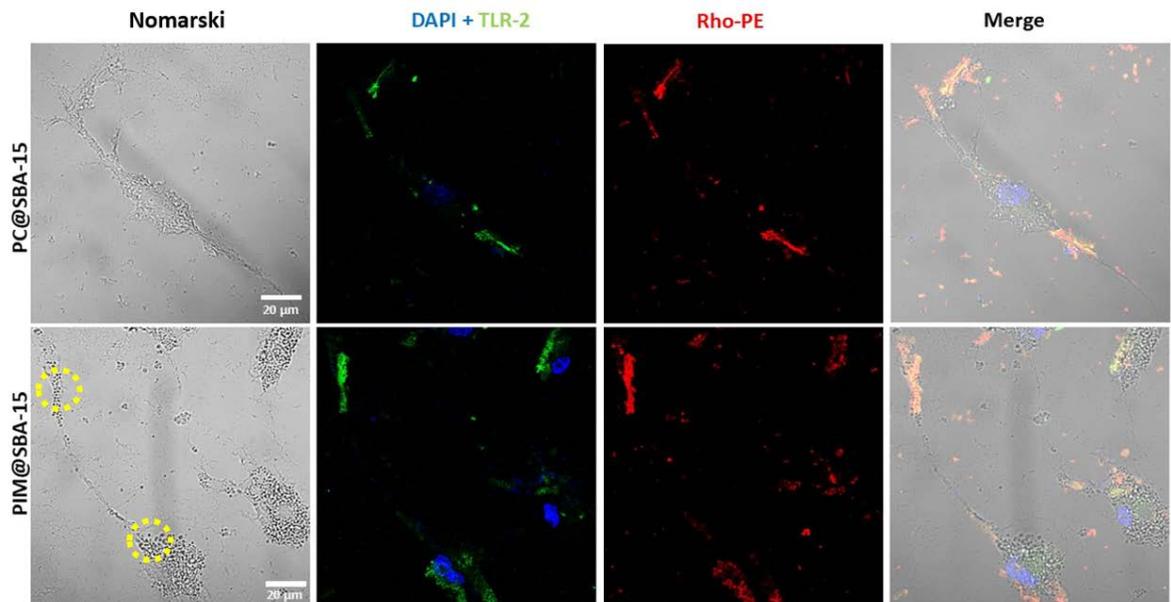


FIGURA 18. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 12 HORAS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), BICAPA LIPÍDICA SUPERFICIAL EN PARTÍCULAS CON RHO-PE (ROJO) Y RECEPTOR TLR2 CON FITC (VERDE). DENTRO DE LOS CÍRCULOS AMARILLOS SE MUESTRA VESÍCULAS DE GRAN TAMAÑO. IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 µM.

Para confirmar el aumento en la expresión de TLR2 en macrófagos THP-1 en interacción con PIM@SBA15, se analizó por citometría de flujo. Como criterio de elección se evaluó el índice medio de fluorescencia (IMF) para evaluar la expresión de TLR2 en macrófagos THP-1. Para realizar este análisis se obtuvo una ventana de tamaño (FSC-H) vs granularidad (SSC-H) para delimitar nuestra población y excluir restos celulares. En la población de interés se realizó el análisis de la intensidad de fluorescencia para TLR2. Se evaluó la expresión de TLR2 en macrófagos THP-1 tratados con con LPS, Zymosan, PIM@SBA-15 y PC@SBA-15. En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos de la incubación de macrófagos THP-1 con partículas PIM@SBA-15. Se observa un incremento significativo de la expresión de TLR2 con respecto al grupo control, y también con respecto a las partículas PC@SBA-15. Se ha reportado que los TLR2 y TLR4 contribuyen significativamente en la interacción y respuesta inmunitaria contra *M. tuberculosis*. La activación de estos receptores vía PAMPs, como los PIMs aquí utilizados, activan cascadas de señalización las cuales subsecuentemente pueden activar factores de transcripción como NFκB y genes asociados a citocinas pro inflamatorias (Talat Iqbal & Hussain, 2014).

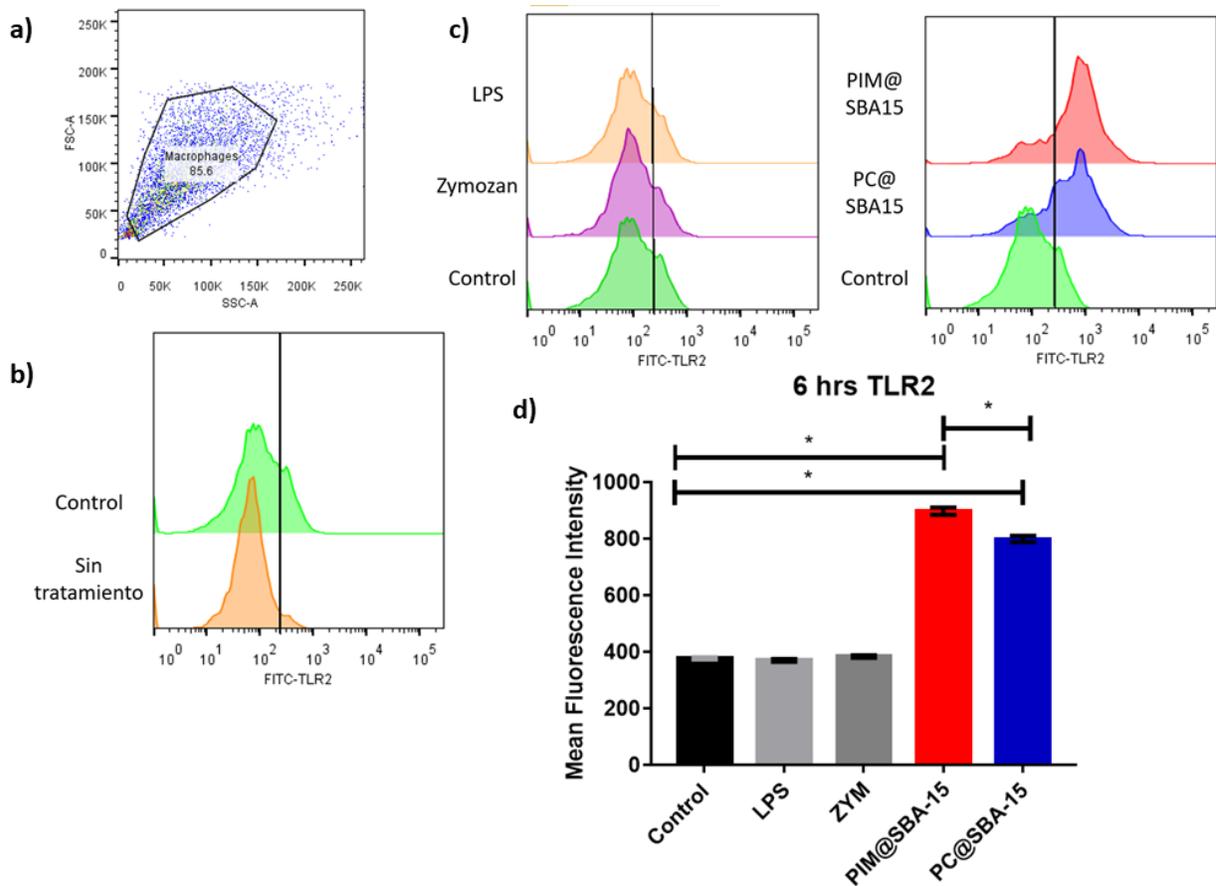


FIGURA 19. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DEL EFECTO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS EN LA EXPRESIÓN DE TLR2 EN MACRÓFAGOS THP-1. A) ESTRATEGIA DE ANÁLISIS UTILIZADA A PARTIR DE LA POBLACIÓN “MACROPHAGES” EN EL DOT PLOT FSC-A/SSC-A. B) DE ESTA POBLACIÓN SE ANALIZÓ LOS MACRÓFAGOS THP-1 FITC+. C) EL ANÁLISIS DEL INCREMENTO DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA SOBRE LOS MACRÓFAGOS THP-1 SIN TRATAMIENTO (CTL) Y CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. D) ANÁLISIS POR T STUDENT $P < 0.05$. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 6 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM.

c) Producción de citocinas proinflamatorias de macrófagos derivados de monocitos THP-1

La activación de TLR por sus respectivos agonistas, es un evento que desencadena vías de señalización que resulta en la producción de citocinas. Estas citocinas pueden activar a otras células del sistema inmunitario y modular la respuesta de la inmunidad adaptativa.

Se analizó la producción de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β por el método de ELISA en macrófagos THP-1 tratados con partículas híbridas y se comparó con la producción de citocinas inducida por agonistas de TLR. Se evaluó la producción de citocinas tomando el sobrenadante después de 6 horas de incubación con los diferentes tratamientos. Los resultados en la figura 20 están expuestos como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. La diferencia significativa en la concentración de citocinas fue evaluada por análisis de varianza (ANOVA) con el ensayo comparativo múltiple de Dunnett. Para TNF- α se observó que las partículas PIM@SBA-15 indujeron una producción de este factor con una diferencia significativa comparada contra el grupo control. Así mismo se ve que el agonista de TLR-4, el LPS también induce un aumento en la producción en las primeras 6 horas ($p < 0.0001$, ANOVA). Se ha demostrado la importancia del TNF- α para la inducción temprana de quimiocinas y el reclutamiento de leucocitos. El TNF- α también contribuye en la formación de granulomas y se expresa altamente dentro de granulomas en individuos con tuberculosis (Roach et al., 2002). Se observó también la expresión de la citocina IL-1 β con las partículas PIM@SBA-15, así como con las partículas control (PC@SBA-15). Otros autores han reportado que las partículas de sílice inducen la liberación de IL-1 β por la vía dependiente de la caspasa-1 vía la activación del inflamasoma NALP3 (Carvalho et al., 2010). La citocina IL-1 β se ha asociado con el reclutamiento de neutrófilos; además, esta interleucina está encargada de regular la expresión de E-selectina en ellos para iniciar procesos de migración (Lee et al., 2010). La secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF α e IL-1 β son requeridas para la activación de una respuesta inmunitaria innata, la cual modula el reclutamiento, activación y adherencia de células fagocíticas (Ott et al., 2007). En

conjunto, estas citocinas proinflamatorias modulan la respuesta innata lo cual podría llevar a la activación de una respuesta inmunitaria adaptativa.

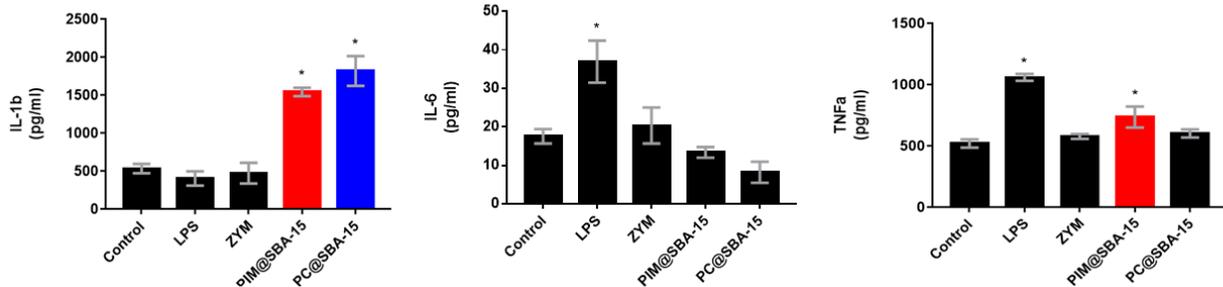


FIGURA 20. EXPRESIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS THP-1 BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS. POR EL MÉTODO ELISA SE EVALUÓ LA PRODUCCIÓN DE TNF-A, IL-1B, IL-6 COMPARANDO CON LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS SIN NINGÚN TRATAMIENTO Y CON AGONISTAS DE TLR-4 Y TLR-2. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE CUATRO EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES EXPRESADOS COMO MEDIA \pm SEM. ANÁLISIS POR ANOVA MEDIANTE EL ENSAYO DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNNETT'S.

d) Destino intracelular del vector adyuvante PIM@SBA-15 en macrófagos derivados de monocitos THP-1

La endocitosis involucra la formación de vesículas intracelulares las cuales se pueden transformar en diferentes compartimentos endocíticos. Estos compartimentos se transforman de endosomas tempranos a endosomas tardíos y luego a lisosomas, y esto debido a una serie de pasos de maduración y fusión. Existe una teoría que explica el proceso de internalización, llamado el modelo de maduración. En este se propone que los endosomas y su contenido permanecen juntos y maduran para luego fusionarse con lisosomas (Shearer & Petersen, 2019).

La internalización de patógenos en los endosomas fagocíticos es un componente de importancia de la respuesta inmunitaria innata. Después de formarse el endosoma, estos

adquieren propiedades microbicidas mediante el proceso de maduración de fusión secuencial. Se piensa que las proteínas Rab GTPasas inician la secuencia de eventos de maduración y fusión de endosomas. Rab5 se ha detectado en endosomas tempranos, donde reside de manera transitoria y Rab7 se presenta en etapas posteriores de maduración, en los endosomas tardíos. Rab 5 se propone como la proteína que direcciona la fusión al endosoma temprano, y también se ha descrito que las señales que activan a receptores fagocíticos direccionan a Rab5 a fagosomas nacientes. La supervivencia de *M. tuberculosis* en células fagocíticas se debe a la habilidad del bacilo para bloquear la maduración del fagolisosoma. Se ha reportado que los PIMs estimula la fusión a endosoma temprano, estimulando la producción de Rab5 (Garcia-Vilanova et al., 2019; Vergne et al., 2004). Aún no se han identificado proteínas Rab que se localicen después del endosoma tardío, en los fagolisosomas; sin embargo; la proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP-1, por sus siglas en inglés) se conoce como un marcador de lisosomas (Vieira et al., 2003). En este trabajo se utilizaron anticuerpos contra Rab5 y LAMP-1 para estudiar la localización de ellos cuando están macrófagos THP-1 en contacto con partículas híbridas. Se utilizaron partículas de SBA-15 recubiertas con liposomas. Las partículas PIMs@SBA-15 fueron evaluadas *in vitro*. Se utilizó el anticuerpo anti-Rab 5 para detectar la presencia de esta proteína intracelular en macrófagos y su expresión al estar con partículas híbridas marcadas con FITC. En la figura 21 y 22, se observa una microscopía de macrófagos THP-1 en presencia de partículas PIM@SBA-15 y partículas control, durante 15 y 30 min, respectivamente. En los primeros 15 min de interacción con partículas PIM@SBA-15, los macrófagos muestran un aumento en la expresión de Rab 5 al estar interactuando con

partículas PIM@SBA-15, en cambio, los macrófagos con las partículas control muestran poca expresión de Rab5. Después de 30 min de interacción los macrófagos con partículas PIM@SBA-15 siguen mostrando una señal intensa de Rab5 en comparación con las partículas control.

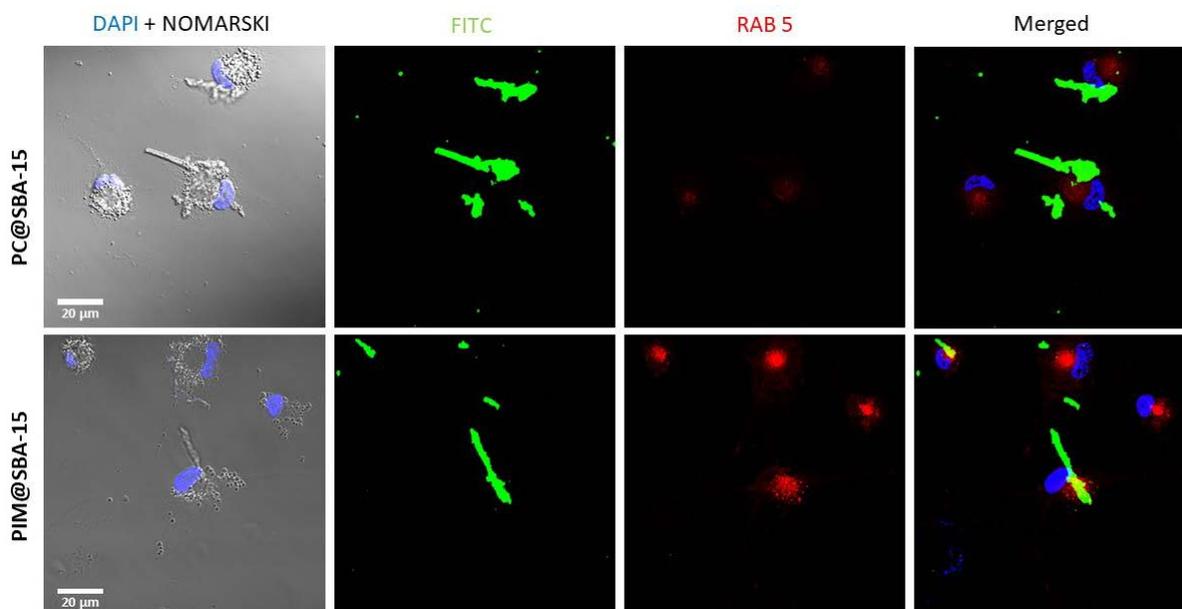


FIGURA 21. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 15 MINUTOS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), RAB5(ROJO) Y PARTÍCULA HÍBRIDA CON FITC (VERDE). IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μm. IMAGEN REPRESENTATIVA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

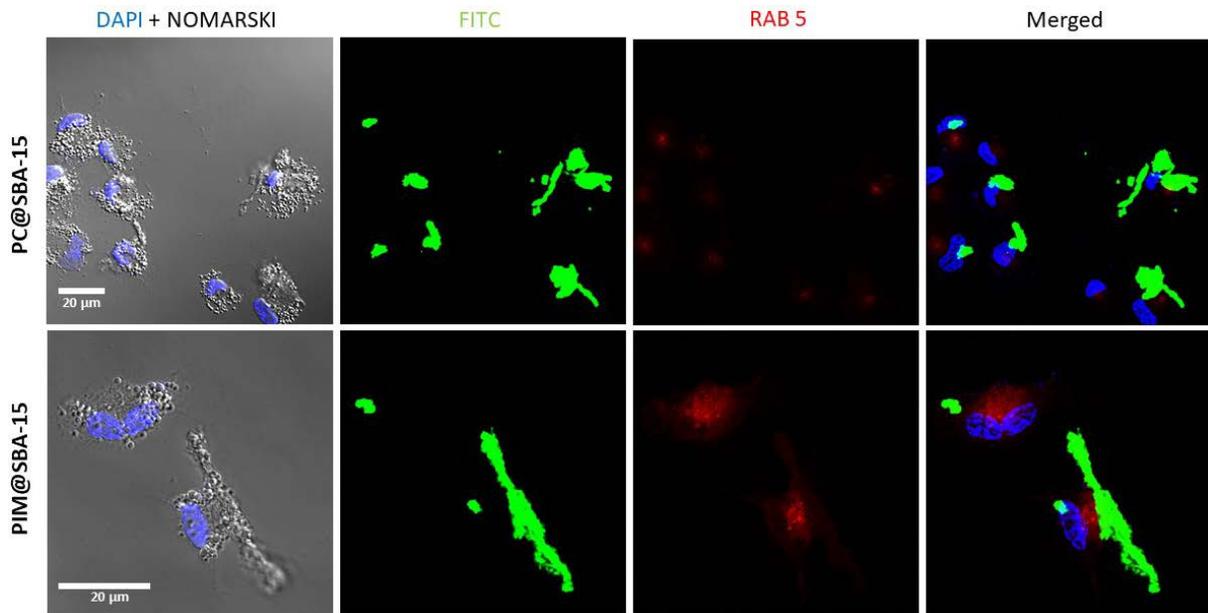


FIGURA 22. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 30 MIN CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE NÚCLEO CELULAR CON DAPI (AZUL), RAB5 (ROJO) Y PARTÍCULA HÍBRIDA CON FITC (VERDE). IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μ M. IMAGEN REPRESENTATIVA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

Se observó también la expresión de la proteína LAMP-1 en macrófagos THP-1 en interacción con partículas híbridas PIM@SBA-15. Se realizó este experimento incubando las partículas PIM@SBA-15 por 3 horas con los macrófagos THP-1, en donde se observó un incremento en la señal de LAMP-1. En la figura 23 se observa cómo la señal de LAMP-1 colocaliza con la partícula PIM@SBA-15, la cual contenía Rho-PE en su bicapa lipídica superficial para su identificación por microscopía confocal. En macrófagos THP-1 los resultados obtenidos con las partículas PIM@SBA15 muestran que se expresa el marcador de endosoma temprano a 15 min de incubación; sin embargo, a 3 horas de incubación con las partículas PIM@SBA15 aumentan la expresión del marcador del endosoma tardío. La expresión de esta proteína asociada a endosomas tardíos nos presenta una perspectiva de dirección del sistema de adyuvante PIM@SBA-15 hacia la presentación de antígenos vía el complejo mayor de

histocompatibilidad-II (MHC-II, por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex-II).

Las células presentadoras de antígeno presentan un antígeno que ha sido fagocitado. Para ellos los patógenos (o sus antígenos) son fagocitados y procesados por la vía endocítica, es decir que son fragmentados dentro de vacuolas hasta generarse péptidos pequeños, los cuales son cargados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (Irvine et al., 2015). Mediante el MHC-II se presentan los epítomos a células T cooperadoras, las cuales son capaces de activar al sistema innato y adaptativo mediante la producción de citocinas (Karch & Burkhard, 2016). La presentación de antígenos peptídicos por las moléculas MHC-II hacia los linfocitos cooperadores CD4⁺ es una función crítica, ya que los linfocitos CD4⁺ producen citocinas, las cuales modularán otras funciones del sistema inmunitario adaptativo (Wu et al., 1995). Tomando en cuenta los resultados anteriores, del potencial zeta de la partícula PIM@SBA15 a diferentes pH, el destino intracelular permitió analizar la posible vía de entrega de moléculas de la partícula. Como observamos en estos resultados, la partícula al ser internalizada y encontrada en endosomas tardíos, donde el pH se encuentra entre 4 y 5, la entrega de péptidos es posible considerando el destino intracelular. En contraste, si la partícula hubiera escapado del endosoma, péptidos, DNA, o RNA podrían ser liberados en el citoplasma y ser presentados mediante el MHC-I a células T citotóxicas (Jahanafrooz et al., 2020).

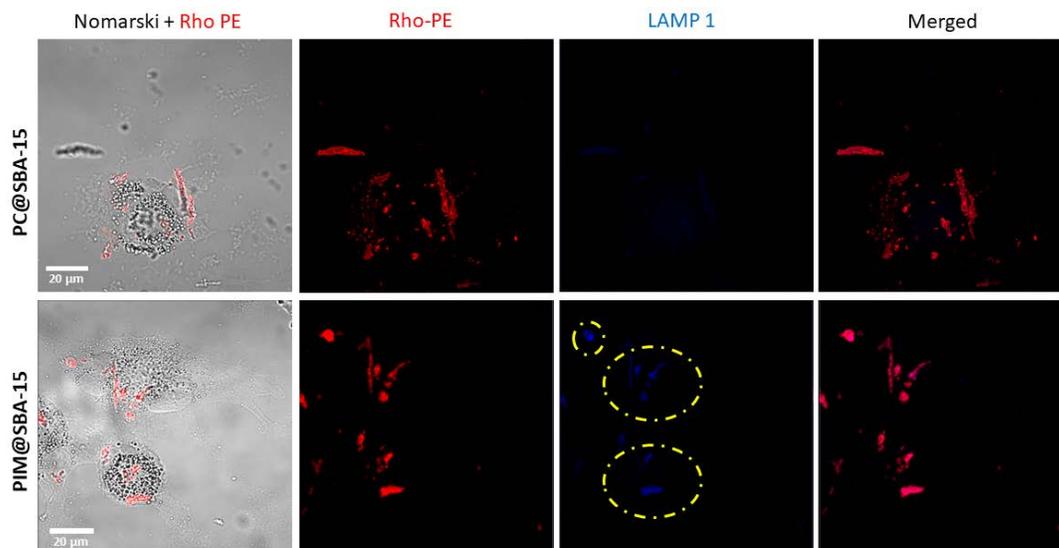


FIGURA 23. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS PIM@SBA-15/ PC@SBA-15 DURANTE 3 HORAS CON MACRÓFAGOS THP-1. MARCAJE DE LAMP1 (AZUL) DENTRO DE LOS CÍRCULOS AMARILLOS Y PARTÍCULA HÍBRIDA CON RHO-PE (ROJO). IMAGEN DE MACRÓFAGOS THP-1 UTILIZANDO MICROSCOPIA DE NOMARSKI (DIC) CON LENTE OBJETIVO 63X. LA BARRA BLANCA CORRESPONDE A 20 μ M. IMAGEN REPRESENTATIVA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

XI. Capítulo 3

A. Conclusiones

Se sintetizaron partículas SBA-15 de un tamaño aproximado de 1 a 1,3 μm de largo, de forma y talla similares a las de un bacilo.

A partir de los lípidos totales de *Mycobacterium tuberculosis* y de *Mycobacterium bovis* BCG se obtuvieron fracciones con lípidos anfipáticos. Se identificaron lípidos característicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, y se obtuvieron PIMs del extracto total de lípidos. Estos lípidos han sido reconocidos como PAMPs, y son capaces de activar células del sistema inmunológico innato.

Utilizando fosfolípidos convencionales (PC) y lípidos de micobacterias (PIMs), se encontró una proporción adecuada para la formación de liposomas unilaminares bioactivos de manera reproducible.

Mediante cambios químicos superficiales en las partículas SBA-15 (cationización mediante la introducción de grupos amina), se promovió el ensamblaje de liposomas con PIMs (aniónicos) para la formación de partículas híbridas.

Los ensayos de biocompatibilidad en células primarias de fibroblastos humanos gingivales (HGF), muestran biocompatibilidad de las partículas híbridas y una menor toxicidad con respecto a las partículas sin recubrimiento.

Se mostró que las partículas PIM@SBA-15 interactúan con receptores TLR2 de macrófagos THP-1, promoviendo la sobre-expresión de los mismos en la superficie.

Se mostró que la presencia de PIMs en la decoración de partículas SBA15 induce claramente la producción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1b y TNF α , a 6 horas de incubación.

Los análisis por microscopía confocal de fluorescencia de partículas PIM@SBA-15 en macrófagos derivados de monocitos THP-1 mostraron que el destino intracelular de esta nanoconstrucción coincide con la ruta típica para el procesamiento de antígenos fagocitados: a los 15 min de incubación, las partículas colocalizan con Rab5, indicando un aumento en la expresión de este marcador de endosomas tempranos, mientras que a las 3 h de incubación, las señales mostraron una colocalización con la proteína LAMP-1, típica de endosomas tardíos.

Los resultados obtenidos durante este trabajo soportan la idea de un posible uso de la partícula PIM@SBA-15 como un sistema inmunoestimulante que podría ser utilizado como vector de entrega con actividad adyuvante.

B. Perspectivas

La vacunación es una de las armas más poderosas contra enfermedades infecciosas. Es indudable el efecto que ha tenido en el ser humano, y cómo ha ayudado a la longevidad de la especie. En el área de vacunas, existe la necesidad de vacunas de subunidad que pudieran ser utilizadas para poblaciones en riesgo, así como de vacunas y/o refuerzos vacunales que permitan reducir costos, para ser aplicadas a poblaciones amplias. La nanotecnología permite el desarrollo de opciones libres de agentes viables, es decir de mayor seguridad, pero capaces de incluir la variedad de elementos necesarios para montar una respuesta inmunitaria efectiva: antígenos presentados en un formato coloidal, biomimético, y patrones reconocidos por el sistema innato. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, es necesario seguir evaluando los efectos que se pudieran presentar al usar estas nuevas partículas. Entre los eventos a evaluar se incluyen la capacidad del vector para entregar su contenido, determinar la eficacia para la entrega de distintos antígenos, así como definir la dosis ideal para tener un efecto protector in vivo (empleando modelos animales de patologías definidas). Esto permitiría dar pautas sobre la posible vía de entrega de las partículas híbridas, así como explorar posibles reacciones colaterales. La ruta para poder obtener un vector vacunal o un adyuvante es usualmente bastante riguroso, pero es a través de estos proyectos que nuevas opciones podrán salir a la luz.

XII. Capítulo 4

B. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L., & Baker, A. (2018). *Cellular and molecular immunology* (Ninth edition). Elsevier.
- Abrahams, K. A., & Besra, G. S. (2018). Mycobacterial cell wall biosynthesis: A multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, *145*(2), 116–133.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016002377>
- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, *17*, 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Agger, E. M. (2016). Novel adjuvant formulations for delivery of anti-tuberculosis vaccine candidates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *102*, 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.012>
- Ainge, G. D., Parlane, N. A., Denis, M., Hayman, C. M., Larsen, D. S., & Painter, G. F. (2006). Phosphatidylinositol mannosides: Synthesis and adjuvant properties of phosphatidylinositol di- and tetramannosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*(22), 7615–7624. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.07.003>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alexander, D. C., Jones, J. R. W., Tan, T., Chen, J. M., & Liu, J. (2004). PimF, a Mannosyltransferase of Mycobacteria, Is Involved in the Biosynthesis of Phosphatidylinositol Mannosides and Lipoarabinomannan. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18824–18833.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400791200>

- Baranov, M. V., Kumar, M., Sacanna, S., Thutupalli, S., & van den Bogaart, G. (2021). Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape. *Frontiers in Immunology*, *11*, 607945. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607945>
- Barton, G. M., Kagan, J. C., & Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology*, *7*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/ni1280>
- Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.-E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y., & Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants: Smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, *40*(11), 1238–1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
- Belvin, M. P., & Anderson, K. V. (1996). A CONSERVED SIGNALING PATHWAY: The *Drosophila* Toll-Dorsal Pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *12*(1), 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.393>
- Benezra, M., Penate-Medina, O., Zanzonico, P. B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., DeStanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., Wolchok, J., Larson, S. M., Wiesner, U., & Bradbury, M. S. (2011). Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2768–2780. <https://doi.org/10.1172/JCI45600>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *303*(2), 474–482. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, *40*(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>

- Boylston, A. (2012). The origins of inoculation. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *105*(7), 309–313. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2012.12k044>
- Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, *60*(2), 309–319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>
- Butler, K. S., Durfee, P. N., Theron, C., Ashley, C. E., Carnes, E. C., & Brinker, C. J. (2016). Protocells: Modular Mesoporous Silica Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers for Drug Delivery. *Small*, *12*(16), 2173–2185. <https://doi.org/10.1002/sml.201502119>
- Çağdaş, M., Sezer, A. D., & Bucak, S. (2014). Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. En A. D. Sezer (Ed.), *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech. <https://doi.org/10.5772/58459>
- Carvalho, L. V., Ruiz, R. de C., Scaramuzzi, K., Marengo, E. B., Matos, J. R., Tambourgi, D. V., Fantini, M. C. A., & Sant'Anna, O. A. (2010). Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine*, *28*(50), 7829–7836. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.087>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014a). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, *23*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014b). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, *23*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. En K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers

- (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 147–159). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_14
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chaturvedi, A., & Pierce, S. K. (2009). How Location Governs Toll-Like Receptor Signaling. *Traffic*, *10*(6), 621–628. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00899.x>
- Christoforidis, K. C., Louloudi, M., Rutherford, A. W., & Deligiannakis, Y. (2008). Semiquinone in Molecularly Imprinted Hybrid Amino Acid–SiO₂ Biomimetic Materials. An Experimental and Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, *112*(33), 12841–12852. <https://doi.org/10.1021/jp800430n>
- Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, *33*(4), 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Contreras, R. G., Sakagami, H., Nakajima, H., & Shimada, J. (2010). Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblasts. *In Vivo (Athens, Greece)*, *24*(4), 513–517.
- Correia-Pinto, J. F., Csaba, N., & Alonso, M. J. (2013). Vaccine delivery carriers: Insights and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, *440*(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.047>
- Davis, R. W., Flores, A., Barrick, T. A., Cox, J. M., Brozik, S. M., Lopez, G. P., & Brozik, J. A. (2007). Nanoporous Microbead Supported Bilayers: Stability, Physical Characterization, and Incorporation of Functional Transmembrane Proteins. *Langmuir*, *23*(7), 3864–3872. <https://doi.org/10.1021/la062576t>

- Demento, S. L., Siefert, A. L., Bandyopadhyay, A., Sharp, F. A., & Fahmy, T. M. (2011). Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: A paradigm for engineering new vaccines. *Trends in Biotechnology*, *29*(6), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.02.004>
- Diab, R., Canilho, N., Pavel, I. A., Haffner, F. B., Girardon, M., & Pasc, A. (2017). Silica-based systems for oral delivery of drugs, macromolecules and cells. *Advances in Colloid and Interface Science*, *249*, 346–362. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.005>
- Doherty, M., Buchy, P., Standaert, B., Giaquinto, C., & Prado-Cohrs, D. (2016). Vaccine impact: Benefits for human health. *Vaccine*, *34*(52), 6707–6714. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.025>
- Durfee, P. N., Lin, Y.-S., Dunphy, D. R., Muñiz, A. J., Butler, K. S., Humphrey, K. R., Lokke, A. J., Agola, J. O., Chou, S. S., Chen, I.-M., Wharton, W., Townson, J. L., Willman, C. L., & Brinker, C. J. (2016). Mesoporous Silica Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers (Protocells) for Active Targeting and Delivery to Individual Leukemia Cells. *ACS Nano*, *10*(9), 8325–8345. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02819>
- Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., & Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *International Journal of Pharmaceutics*, *298*(2), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.035>
- From Immunity to Autoimmune Disease, A Historic Trail: Part I - ProQuest.* (s/f). Recuperado el 4 de febrero de 2022, de <https://www.proquest.com/docview/231703933?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true>
- Garcia-Vilanova, A., Chan, J., & Torrelles, J. B. (2019). Underestimated Manipulative Roles of Mycobacterium tuberculosis Cell Envelope Glycolipids During Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02909>

- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, *15*(1), 577. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Gilleron, M., Ronet, C., Mempel, M., Monsarrat, B., Gachelin, G., & Puzo, G. (2001). Acylation State of the Phosphatidylinositol Mannosides from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin and Ability to Induce Granuloma and Recruit Natural Killer T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(37), 34896–34904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103908200>
- Guerin, M. E., Korduláková, J., Alzari, P. M., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2010). Molecular Basis of Phosphatidyl-myo-inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(44), 33577–33583. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.168328>
- Han, N., Wang, Y., Bai, J., Liu, J., Wang, Y., Gao, Y., Jiang, T., Kang, W., & Wang, S. (2016). Facile synthesis of the lipid bilayer coated mesoporous silica nanocomposites and their application in drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, *219*, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.08.006>
- Hernández-Morales, V., Nava, R., Acosta-Silva, Y. J., Macías-Sánchez, S. A., Pérez-Bueno, J. J., & Pawelec, B. (2012). Adsorption of lead (II) on SBA-15 mesoporous molecular sieve functionalized with –NH₂ groups. *Microporous and Mesoporous Materials*, *160*, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.05.004>
- Holst, O., Ulmer, A. J., Brade, H., Flad, H.-D., & Rietschel, E. Th. (1996). Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *16*(2), 83–104. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00126.x>

- Holzheimer, M., Buter, J., & Minnaard, A. J. (2021). Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Reviews*, 121(15), 9554–9643.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00043>
- Huang, X., Cavalcante, D. P., & Townley, H. E. (2020). Macrophage-like THP-1 cells show effective uptake of silica nanoparticles carrying inactivated diphtheria toxoid for vaccination. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(1), 23. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4720-1>
- Hudson, S. P., Padera, R. F., Langer, R., & Kohane, D. S. (2008). The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials*, 29(30), 4045–4055.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.007>
- Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K., & Tokatlian, T. (2015). Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chemical Reviews*, 115(19), 11109–11146.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00109>
- Jahanafrooz, Z., Baradaran, B., Mosafer, J., Hashemzaei, M., Rezaei, T., Mokhtarzadeh, A., & Hamblin, M. R. (2020). Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. *Drug Discovery Today*, 25(3), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.003>
- Jarvis, R. M., & Goodacre, R. (2004). Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76(1), 40–47. <https://doi.org/10.1021/ac034689c>
- Jia, M., Li, S., Zang, L., Lu, X., & Zhang, H. (2018). Analysis of Biomolecules Based on the Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Nanomaterials*, 8(9), 730.
<https://doi.org/10.3390/nano8090730>
- Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E., & Adamopoulos, I. E. (2016). The critical role of toll-like receptors — From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.009>

- Johnsen, I. B., Nguyen, T. T., Ringdal, M., Tryggestad, A. M., Bakke, O., Lien, E., Espevik, T., & Anthonsen, M. W. (2006). Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *The EMBO Journal*, *25*(14), 3335–3346.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601222>
- Karch, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology*, *120*, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>
- Kauffman, K. J., Dorkin, J. R., Yang, J. H., Heartlein, M. W., DeRosa, F., Mir, F. F., Fenton, O. S., & Anderson, D. G. (2015). Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, *15*(11), 7300–7306. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02497>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, *34*(5), 637–650.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Keong, L. C., & Halim, A. S. (2009). In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(3), 1300–1313. <https://doi.org/10.3390/ijms10031300>
- Khan, I. U., Serra, C. A., Anton, N., & Vandamme, T. F. (2015). Production of nanoparticle drug delivery systems with microfluidics tools. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *12*(4), 547–562.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.974547>
- Klenerman, P. (2017). *The immune system: A very short introduction* (First edition). Oxford University Press.
- Kremer, L., Gurcha, S. S., Bifani, P., Hitchen, P. G., Baulard, A., Morris, H. R., Dell, A., Brennan, P. J., & Besra, G. S. (2002). Characterization of a putative α -mannosyltransferase involved in

- phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*.
Biochemical Journal, 363(3), 437–447. <https://doi.org/10.1042/bj3630437>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621–625.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34.
<https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- LaBauve, A. E., Rinker, T. E., Nouredine, A., Serda, R. E., Howe, J. Y., Sherman, M. B., Rasley, A., Brinker, C. J., Sasaki, D. Y., & Negrete, O. A. (2018). Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles for the Delivery of the ML336 Antiviral to Inhibit Encephalitic Alphavirus Infection. *Scientific Reports*, 8(1), 13990. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32033-w>
- Lahiri, A., Das, P., & Chakravorty, D. (2008). Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine*, 26(52), 6777–6783.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.045>
- Lalani, J., & Misra, A. (2011). Gene Delivery Using Chemical Methods. En *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (pp. 127–206). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384964-9.00004-9>
- Lam, L. K. M., Murphy, S., Kokkinaki, D., Venosa, A., Sherrill-Mix, S., Casu, C., Rivella, S., Weiner, A., Park, J., Shin, S., Vaughan, A. E., Hahn, B. H., Odom John, A. R., Meyer, N. J., Hunter, C. A., Worthen, G. S., & Mangalmurti, N. S. (2021). DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia. *Science Translational Medicine*, 13(616), eabj1008. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj1008>

- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., & Golenbock, D. T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, *5*(2), 190–198.
<https://doi.org/10.1038/ni1028>
- Lee, D. J., Li, H., Ochoa, M. T., Tanaka, M., Carbone, R. J., Damoiseaux, R., Burdick, A., Sarno, E. N., Rea, T. H., & Modlin, R. L. (2010). Integrated Pathways for Neutrophil Recruitment and Inflammation in Leprosy. *The Journal of Infectious Diseases*, *201*(4), 558–569.
<https://doi.org/10.1086/650318>
- Lelie, M. (2021). *Red blood cells may be immune sentinels* [Data set].
<https://doi.org/10.1126/science.acx9372>
- Leo, O., Cunningham, A., & Stern, P. L. (2011). Vaccine immunology. *Perspectives in Vaccinology*, *1*(1), 25–59. <https://doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.002>
- Liu, C.-M., Chen, G.-B., Chen, H.-H., Zhang, J.-B., Li, H.-Z., Sheng, M.-X., Weng, W.-B., & Guo, S.-M. (2019). Cancer cell membrane-cloaked mesoporous silica nanoparticles with a pH-sensitive gatekeeper for cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *175*, 477–486.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.038>
- Liu, J., Jiang, X., Ashley, C., & Brinker, C. J. (2009). Electrostatically Mediated Liposome Fusion and Lipid Exchange with a Nanoparticle-Supported Bilayer for Control of Surface Charge, Drug Containment, and Delivery. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(22), 7567–7569.
<https://doi.org/10.1021/ja902039y>
- Liu, X., Stocker, B. L., & Seeberger, P. H. (2006). Total Synthesis of Phosphatidylinositol Mannosides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(11), 3638–3648. <https://doi.org/10.1021/ja0565368>

- Liu, Y., Yang, G., Hui, Y., Ranaweera, S., & Zhao, C. (2022). Microfluidic Nanoparticles for Drug Delivery. *Small*, 2106580. <https://doi.org/10.1002/sml.202106580>
- López Marín, L. M., & Valdemar Aguilar, C. M. (2018). Patrones moleculares asociados a patógenos – ¿héroes o villanos en Nanomedicina? *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 11(20), 53.
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.62595>
- Lu, J., Liong, M., Li, Z., Zink, J. I., & Tamanoi, F. (2010). Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small*, 6(16), 1794–1805. <https://doi.org/10.1002/sml.201000538>
- Mahony, D., Cavallaro, A. S., Stahr, F., Mahony, T. J., Qiao, S. Z., & Mitter, N. (2013). Mesoporous Silica Nanoparticles Act as a Self-Adjuvant for Ovalbumin Model Antigen in Mice. *Small*, 9(18), 3138–3146. <https://doi.org/10.1002/sml.201300012>
- Mehmood, A., Ghafar, H., Yaqoob, S., Gohar, U. F., & Ahmad, B. (2017). Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review. *Journal of Developing Drugs*, 06(02).
<https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000174>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Morales, A., Eiding, D., & Bruce, A. W. (2017). Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *Journal of Urology*, 197(2S).
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.10.101>
- Morgan, D. M. L. (1997). Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. En D. M. L. Morgan, *Polyamine Protocols* (Vol. 79, pp. 179–184). Humana Press.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-448-8:179>

- Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E., & Brisson, A. (2005). The Formation of Supported Lipid Bilayers on Silica Nanoparticles Revealed by Cryoelectron Microscopy. *Nano Letters*, 5(2), 281–285. <https://doi.org/10.1021/nl048153y>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mounkes, L. C., Zhong, W., Cipres-Palacin, G., Heath, T. D., & Debs, R. J. (1998). Proteoglycans Mediate Cationic Liposome-DNA Complex-based Gene Delivery in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 26164–26170. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.26164>
- Nguyen, A. H., Peters, E. A., & Schultz, Z. D. (2017). Bioanalytical applications of surface-enhanced Raman spectroscopy: De novo molecular identification. *Reviews in Analytical Chemistry*, 36(4). <https://doi.org/10.1515/revac-2016-0037>
- Niaura, G. (2000). Raman Spectroscopy in Analysis of Biomolecules. En R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (p. a0212). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0212>
- O'Hagan, D. T., & Valiante, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(9), 727–735. <https://doi.org/10.1038/nrd1176>
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 3, 79. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>
- Ott, L. W., Resing, K. A., Sizemore, A. W., Heyen, J. W., Cocklin, R. R., Pedrick, N. M., Woods, H. C., Chen, J. Y., Goebel, M. G., Witzmann, F. A., & Harrington, M. A. (2007). Tumor Necrosis Factor- α - and Interleukin-1-Induced Cellular Responses: Coupling Proteomic and Genomic

Information. *Journal of Proteome Research*, 6(6), 2176–2185.

<https://doi.org/10.1021/pr060665l>

Oyewumi, M. O., Kumar, A., & Cui, Z. (2010). Nano-microparticles as immune adjuvants:

Correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Review of Vaccines*,

9(9), 1095–1107. <https://doi.org/10.1586/erv.10.89>

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L.,

& Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate

immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 97(25), 13766–13771.

<https://doi.org/10.1073/pnas.250476497>

Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to

cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 329–347.

[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)

Panyam, J., Zhou, W.-Z., Prabha, S., Sahoo, S. K., & Labhasetwar, V. (2002). Rapid endo-lysosomal

escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Implications for drug and gene

delivery. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for*

Experimental Biology, 16(10), 1217–1226. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0088com>

Peek, L. J., Middaugh, C. R., & Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced*

Drug Delivery Reviews, 60(8), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.017>

Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C. R., Granchi, D., & Lucia. (1994). Cell

culture methods for testing Biocompatibility. *Clinical Materials*, 15(3), 173–190.

[https://doi.org/10.1016/0267-6605\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0267-6605(94)90081-7)

- Rayamajhi, S., Marchitto, J., Nguyen, T. D. T., Marasini, R., Celia, C., & Aryal, S. (2020). PH-responsive cationic liposome for endosomal escape mediated drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *188*, 110804. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110804>
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, *30*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
- Rehman, Z. ur, Hoekstra, D., & Zuhorn, I. S. (2013). Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano*, *7*(5), 3767–3777. <https://doi.org/10.1021/nn3049494>
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Baylor University Medical Center Proceedings*, *18*(1), 21–25. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>
- Rijkers, G. T., Weterings, N., Obregon-Henao, A., Lepolder, M., Dutt, T. S., van Overveld, F. J., & Henao-Tamayo, M. (2021). Antigen Presentation of mRNA-Based and Virus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccines. *Vaccines*, *9*(8), 848. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080848>
- Roach, D. R., Bean, A. G. D., Demangel, C., France, M. P., Briscoe, H., & Britton, W. J. (2002). TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *The Journal of Immunology*, *168*(9), 4620–4627. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4620>
- Shearer, L. J., & Petersen, N. O. (2019). Distribution and Co-localization of endosome markers in cells. *Heliyon*, *5*(9), e02375. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02375>
- Soares, A. S. L. S., Scelza, M. Z., Spoladore, J., Gallito, M. A., Oliveira, F., Moraes, R. de C. M., & Alves, G. G. (2018). Comparison of primary human gingival fibroblasts from an older and a

- young donor on the evaluation of cytotoxicity of denture adhesives. *Journal of Applied Oral Science*, 26(0). <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0594>
- Sompayrac, L. (s/f). *How the Immune System Works*. 153.
- Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). Phagocytosis. *Immunity*, 22(5), 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002>
- Talat Iqbal, N., & Hussain, R. (2014). Non-specific immunity of BCG vaccine: A perspective of BCG immunotherapy. *Trials in Vaccinology*, 3, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.trivac.2014.08.002>
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: Signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
- Torrelles, J. B., Azad, A. K., & Schlesinger, L. S. (2006). Fine Discrimination in the Recognition of Individual Species of Phosphatidyl- myo -Inositol Mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-Type Lectin Pattern Recognition Receptors. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1805–1816. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1805>
- Treede, I., Braun, A., Sparla, R., Kühnel, M., Giese, T., Turner, J. R., Anes, E., Kulaksiz, H., Füllekrug, J., Stremmel, W., Griffiths, G., & Ehehalt, R. (2007). Anti-inflammatory Effects of Phosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27155–27164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704408200>
- Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 492–502. <https://doi.org/10.1038/nri3244>
- Vázquez Ibarra, M. (2019). *Nanopartículas de oro decoradas con Concanavalina A para la detección de glicoconjugados* [Universidad Nacional Autónoma de México].

https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/LD9ERP1E25XVHX2G2SED3NIGT8V5MM883IHGUI9XFY8EY4XADD-53632?func=full-set-set&set_number=525851&set_entry=000003&format=999

- Vergne, I., Fratti, R. A., Hill, P. J., Chua, J., Belisle, J., & Deretic, V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* Phagosome Maturation Arrest: Mycobacterial Phosphatidylinositol Analog Phosphatidylinositol Mannoside Stimulates Early Endosomal Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 751–760. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0307>
- Vieira, O. V., Bucci, C., Harrison, R. E., Trimble, W. S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A. D., Stahl, P. D., & Grinstein, S. (2003). Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2501–2514. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2501-2514.2003>
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology*, 59, 391–412. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>
- Villeneuve, C., Gilleron, M., Maridonneau-Parini, I., Daffé, M., Astarie-Dequeker, C., & Etienne, G. (2005). Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *Journal of Lipid Research*, 46(3), 475–483. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400308-JLR200>
- West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M. C., Choi, Y., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 472(7344), 476–480. <https://doi.org/10.1038/nature09973>
- Wu, T. C., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Viscidi, R. P., Levitsky, H. I., Hedrick, L., Cho, K. R., August, J. T., & Pardoll, D. M. (1995). Engineering an intracellular pathway for major

- histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(25), 11671–11675. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11671>
- Xia, Y., Tian, J., & Chen, X. (2016). Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery. *Biomaterials*, 79, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.056>
- Zaman, M., Good, M. F., & Toth, I. (2013). Nanovaccines and their mode of action. *Methods*, 60(3), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.014>
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
- Zhou, Y., Quan, G., Wu, Q., Zhang, X., Niu, B., Wu, B., Huang, Y., Pan, X., & Wu, C. (2018). Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007>

XIII. Capítulo 5

A. Producción en Investigación

Biointerphases
A Journal of Biomaterials and Biomedical Interfaces

Pathogen associated molecular pattern-decorated mesoporous silica—A colloidal model for studying bacterial-host cell interactions

Cite as: *Biointerphases* 15, 041003 (2020); <https://doi.org/10.1116/6.0000168>
Submitted: 03 March 2020 • Accepted: 25 June 2020 • Published Online: 15 July 2020

Carlos M. Valdemar-Aguilar, Ravichandran Manisekaran, Remy Avila, et al.

[View Online](#) [Export Citations](#) [CrossMark](#)

ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN

[Production and characterization of alginate bilayer membranes for releasing simvastatin to treat wounds](#)
Biointerphases 15, 041002 (2020); <https://doi.org/10.1116/6.0000167>

[Plasma-immersion ion implantation surface oxidation on a cobalt-chromium alloy for biomedical applications](#)
Biointerphases 15, 041004 (2020); <https://doi.org/10.1116/6.0000278>

[Synthesis and characterization of molybdenum disulfide nanoparticles in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms](#)
Biointerphases 15, 041006 (2020); <https://doi.org/10.1116/6.0000199>



Advance your science and career as a member of



LEARN MORE >

Biointerphases 15, 041003 (2020); <https://doi.org/10.1116/6.0000168>

© 2020 Author(s).

15, 041003

Pathogen associated molecular pattern-decorated mesoporous silica—A colloidal model for studying bacterial-host cell interactions

Cite as: *Biointerphases* 15, 041 003 (2020); doi: 10.1116/6.0000168

Submitted: 5 March 2020 · Accepted: 25 June 2020 ·

Published Online: 15 July 2020



Carlos M. Valdemar-Aguilar,¹ Ravichandran Manisekaran,¹ Remy Avila,¹ Vicente D. Compeán-García,^{1,a)} Rufino Nava-Mendoza,² and Luz M. Lopez-Marín^{1,b)}

AFFILIATIONS

¹Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico

²División de Investigación y Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, 76000 Querétaro, Mexico

^{a)}Current address: Cátedra CONACYT al Coordinación para la Innovación y la Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Álvaro Obregón 64, 78000 San Luis Potosí, S. L. P., Mexico.

^{b)}Author to whom correspondence should be addressed: lmim@uram.univ.mx

ABSTRACT

Tuberculosis is the top infectious disease worldwide and the development of a vaccine and diagnostic tools to control the disease is a priority that requires a better understanding of the factors involved in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*, the infectious agent. It is known that bacterial cell surface components are released, interact with immune cell receptors, and may traffic toward host cell structures. Many of these compounds are lipids that have been associated with mycobacterial virulence. However, their hydrophobic nature has frequently hampered their biological study. In this work, silica particles were coated with functional lipids to obtain a colloidal bioinspired system based on nonhydro-soluble glycolipids. *Mycobacterium tuberculosis* phosphatidylinositol mannosides (PIMs), known to interact with receptors of innate immune cells, were purified from the *M. tuberculosis* H37Rv type strain, and used to prepare large unilamellar liposomes in combination with zwitterionic phosphatidyl choline. Then, bacillary-like Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15) silica particles were cationized and the vesicle fusion method was used to promote the attachment of anionic PIM-containing lipid bilayers. Thermogravimetric analysis, x-ray diffraction, N₂ adsorption-desorption isotherm analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, electron microscopy, and zeta potential analyses were used to characterize the materials obtained. The as-prepared PIM-containing colloids, named PIM@SBA-15, showed biocompatibility toward human fibroblasts and were found to colocalize with Toll-like receptor (TLR)2 upon their incubation with THP1-derived macrophages. Furthermore, the particles induced the formation of pseudopods and were internalized into phagocytic cells. In all, these data suggest the usefulness of PIM@SBA-15 particles to better comprehend the interactions between immune cells and PIMs.

Published under license by AVS. <https://doi.org/10.1116/6.0000168>

1. INTRODUCTION

Infectious diseases cause hundreds of millions of disabilities each year, along with most infant deaths around the world.¹ At present, the most deadly infectious killer is *Mycobacterium tuberculosis*, the causal agent of tuberculosis, a disease linked to thousands of deaths each day.² Many efforts are underway for the development of tools against tuberculosis, including new vaccine formulations and friendly diagnostics. However, a better understanding of

the biology of *M. tuberculosis* is still necessary. The main feature of this microbe is its cell envelope, an assembly of complex glycoconjugates, proteins, and lipids of high original structures.^{3,4} It has been demonstrated that distinct strains of *M. tuberculosis* have different lipid backgrounds, which are related to different immunogenicity and virulence.^{5–7} Up to 40% of the *M. tuberculosis* cell dry mass corresponds to cell envelope lipids,⁸ including free components that are released from the bacilli and traffic into host cell

membranes.⁶ One of the main lipid classes in mycobacteria corresponds to the cell surface phosphatidyl-inositol mannosides (PIMs), which are known to be distributed virtually all over the bacterial genre.⁷ According to multiple studies, PIMs represent a key factor in the crosstalk between mycobacteria and host immune cells. They are identified as some of the most appealing immune activators for the development of vaccines and immunotherapies, though contradictory effects have been reported as well.^{10–13} It has been established that PIMs are recognized and bound by Toll-Like Receptor (TLR)2, a protein located at the surface of phagocytic cells, thereby activating intracellular signals and leading to robust proinflammatory responses.¹⁴ Similarly, PIMs are believed to strongly influence the fate of phagocytosed bacteria upon their interaction with various cell surface receptors.^{15–17} A better understanding of PIMs as activators of innate immunity is therefore needed, especially due to their involvement in current developments of vaccines and immunotherapies.^{18,19} In this regard, the interest of PIMs as biologically active compounds is impeded by the unavailability of advanced model systems allowing their study within a biomimetic context. Up to now, most functional studies of mycobacterial lipids have not been addressed in natural settings, such as in cells preincubated onto lipid-coated polymers or with lipids added using toxic solvents.^{14,17–19} In this work, the preparation of PIM-displaying biomimetic constructs was considered by using supported lipid bilayers, i.e., hybrid particles composed of an inorganic core surrounded by preformed lipid bilayers.²⁰ While different materials have proved to be useful for supporting lipid bilayers, mesoporous silica was herein selected because of the unique features in supporting biomimetic coats, namely, (1) a mesocellular scale, i.e., a structure bridging the nanometer scale of pores with the micrometer cell-like scale, (2) biocompatibility, as demonstrated by numerous experimental studies *in vitro* and *in vivo*, as well as by the emergence of silica-based nanodrugs under clinical human trials,^{21–23}

(3) the easy functionalization of silica surfaces to optimize loading and adsorption, giving rise to particles that largely exceed the loading capacity of traditional liposomes,²⁴ and (4) low cost.

In recent years, some complex biological phenomena have been readily mimicked through lipid bilayers supported on mesoporous silica.²⁴ To name a few examples, Nordlund and colleagues used arrays of cytochrome c oxidase to reproduce the redox-driven proton exchange across cell membranes, allowing the transport of ions from the particle surface toward the cytoskeleton-like porous silica.²⁵ For their part, Liu and co-workers reported the use of silica nanoparticles that, wrapped with cancer cell membranes, effectively delivered chemotherapeutic drugs in a tumor site.²⁶ The colloidal PIM-displaying construct was prepared as schematized in Fig. 1. Briefly, PIMs were purified from mycobacteria and used to prepare liposomes; then, the vesicle fusion method was used to support the lipid bilayer on mesoporous silica. Because the new construct was developed for the mimicry of bacterial surfaces, the bacillary-like Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15) mesoporous silica was used as the inorganic support.²⁷ Characterization of silica, liposome, and hybrid materials was performed through electron microscopy, dynamic light scattering (DLS), zeta potential measurements, FTIR spectroscopy, and x-ray diffractometry. Finally, the biocompatibility of the hybrid particles was assessed and their interaction with human immune cells was investigated by Nomarski and confocal microscopy.

II. EXPERIMENT

A. Synthesis of mesoporous SBA-15

The SBA-15 mesoporous silica was synthesized using the triblock copolymer Pluronic EO20-PO70-EO20, P123 (BASF, Ludwigshafen, Germany) as the directing agent and tetraethyl orthosilicate (TEOS), according to the method of Flodström and

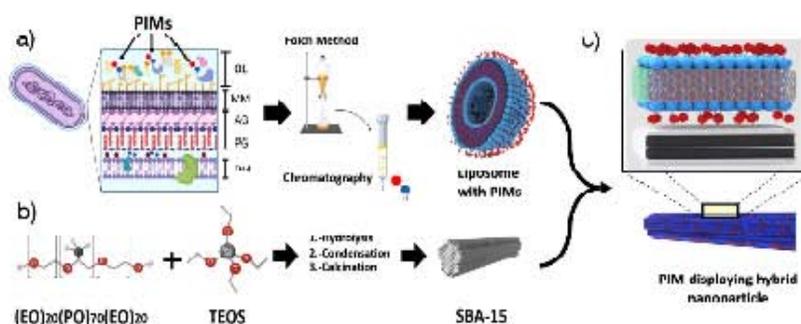


FIG. 1. Preparation of biomimetic mesoporous silica particles with PIMs. (a) Bacterial-mimicking liposomes were prepared with lipid bilayers of phosphatidyl-inositol mannosides (PIMs) (mannoses depicted as red hexagons) and phosphatidylcholine (polar heads depicted as blue spheres). Mycobacterial cell envelopes are composed of multiple layers that include a plasma membrane (PM), peptidoglycan (PG), arabinogalactan (AG), a more external lipid bilayer known as mycomembrane (MM), and an outer layer (OL), where PIMs are typically displayed.²⁵ PIMs were purified from *M. tuberculosis* cells and used to prepare liposomes. (b) SBA-15 silica particles were synthesized and (c) a self-assembly approach was used for the construction of hybrid PIM-displaying particles.

Alfredsson as modified by Hernández-Morales *et al.*^{27,28} Briefly, the polymer was dissolved in a mixture composed of 112.5 ml of water and 75 ml of 4M HCl and incubated under stirring at 35 °C. Then, 8 ml of TEOS was added dropwise to the mixture, shaken for 1 min, and allowed to react for 24 h at 35 °C under gentle stirring. The obtained gel was transferred to a polypropylene bottle and autoclaved for 24 h at 80 °C. The product was washed with water and dried in air at room temperature for 72 h. Finally, the organic template was removed through calcination at 500 °C for 4 h, and washed in 4% peroxide/4% ammonium hydroxide and 4% peroxide/0.4N HCl, as described by Davis and colleagues,²⁴ to promote the formation of stable bilayers onto the resulting hydrophilic surface.

B. Amine functionalization of SBA-15

The SBA-15 particles were cationized by a previously described procedure.²⁷ Briefly, 1.0 g of the particles was dispersed in a solution of 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) in absolute ethanol at an APTES/TEOS ratio of 0.3/1 (mol/mol). Then, the reaction was stopped by gently adding de-ionized water and was kept under agitation for 45 min. The resultant cationized silica was filtered, washed with deionized water, dried at room temperature, and then heated at 110 °C for 24 h.

C. PIMs from *Mycobacterium tuberculosis*

Inactivated cells of *M. tuberculosis* H37Rv were obtained from the Biosafety Level-III laboratory at the Institute of Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México. Total lipids were obtained through the Folch extraction using chloroform/methanol mixtures, as previously described.²⁹ The pooled and concentrated lipid extracts were fractionated by adsorption chromatography in an open column of Florisil and eluted with 3-column volume-elutions of chloroform, followed by mixtures of methanol in chloroform (5, 10, and 12% v/v) and chloroform:methanol:water (60:12:1 and 60:35:8, v/v/v). Each fraction was evaporated to dryness in a rotary evaporator and stored in an inert atmosphere at -20 °C until use. The PIMs, consisting of a set of homologs varying in the number of mannose residues and the number and structure of fatty acyl chains, were obtained in the most polar fraction, as confirmed by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-coated plates (0.25 mm thickness) developed with the following solvent systems: (1) chloroform:methanol (90:10, vol/vol), (2) chloroform:methanol:water (60:30:6, vol/vol/vol), and (3) chloroform:methanol:water (60:35:8, vol/vol/vol). *In situ* reactions were performed with 0.2% anthrone in H₂SO₄ at 110 °C for sugars, 0.2% ninhydrin in acetone at 110 °C for primary amines; the molybdenum blue spray reagent was used at room temperature for visualizing phosphate-containing lipids. TLC analysis of lipids extracted from the hybrid particles was developed in the solvent (3) and visualized using the molybdenum blue spray reagent.

D. Liposome preparation

Liposomes were prepared with egg yolk phosphatidylcholine (PC) + purified PIMs (at a weight ratio of 50:50) or with PC alone (control liposomes). Multilamellar vesicles were prepared using the

dehydration-rehydration method. Briefly, the lipids were dissolved in chloroform:methanol (9:1, vol/vol) and evaporated to dryness under a nitrogen stream, followed by a vacuum desiccator treatment for 30 min. Liposomes intended for cell culture experiments were prepared in sterile conditions within a laminar flow cabinet. Then, the lipids were suspended in water (1 mg/ml) at a temperature of 50 °C and passed several times through a 22-gauge needle. Large unilamellar vesicles were obtained by repetitive extrusion (6–7 times) through 0.45 μm polycarbonate pore membranes using a mini-extruder (Avanti Products Inc., St. Doral, FL, USA). The samples were kept at 4 °C until use. Fluorescent labeled liposomes were prepared by the addition of 0.1% rhodamine B coupled to glycerophosphatidyl ethanolamine (Rho-PE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

E. Preparation of liposome-coated silica particles

The SBA-15 particles (2.5 mg) were suspended in 2.5 ml of distilled water. Then, 2.5 ml of liposomes were added. The sample was gently shaken with a micropipet tip and incubated at room temperature for 25 min with occasional shaking. Afterwards, the incubation medium was eliminated after centrifugation at 4000 rpm for 1 min. The resulting hybrid particles were resuspended in 2.5 ml of distilled water and kept at 4 °C until use. Liposomes composed of either PC or a mixture of PC and PIMs were used.

F. X-ray diffraction

Small-angle x-ray diffraction (XRD) was used to determine the phases present in the SBA-15 particles. Diffraction patterns were recorded using a MiniFlex, Rigaku Diffractometer (Rigaku, Co., Tokyo, Japan) with a 2θ scanning in the 2θ range of 0.5°–3.0° at 30 kV and 15 mA.

G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

FTIR spectroscopy was conducted in a Spectrum Two Instrument (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) by the transmittance technique in the wavenumber region between 400 and 4000 cm⁻¹. The samples were prepared by drop-casting the samples onto aluminum foils, allowed to dry at room temperature. The samples were washed with D₂O, in order to eliminate infrared absorption by H₂O, and deposited onto the attenuated total reflectance cell with no further preparation.

H. Electron microscopy

High-resolution scanning electron microscopy (SEM) analyses were conducted by placing dried samples onto aluminum specimen stubs and observed in a Hitachi SU8230 instrument (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Transmission electron microscopy (TEM) was carried out with a JEM-1010 equipment (JEOL, Peabody, MA) coupled to a 729 Bioscan 1 × 1 wide angle multiscan CCD camera (Gatan Inc., Oxon, UK). All samples (approximately 5 μl) were placed on Formvar-coated copper grids (Ted Pella, Inc., Redding, CA), treated for negative staining with 2% uranyl acetate at 80 °C for 15 min, washed with distilled water, and dried before their observation.

I. Physicochemical characterization

Thermogravimetric analysis of bare SBA-15 particles was conducted in a Q500 TGA instrument (TA Instruments, New Castle, DE, USA) at a heating rate of 10 °C/min, from 20 °C to 500 °C, using an N₂ atmosphere with a flow rate of 60 ml/min. The Brunauer-Emmett-Teller (BET) specific surface area, S_{BET} , of SBA-15 particles was measured using the adsorption-desorption isotherms of N₂ at -196 °C in a Quantachrome iQ2 equipment (Anton Paar, FL, USA). The pore size distribution was calculated by the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method. Zeta potential measurements of bare and functionalized SBA-15 particles were determined by electrophoretic mobility at 25 °C using a Zetasizer NanoZS instrument (Malvern Instruments Ltd., UK). The same equipment was used to measure the hydrodynamic diameter of control and PIM-containing LUVs. Three replicate measurements were performed for each sample.

J. Cytotoxicity tests

To get insight into the biocompatibility of the construct, control, and PIM-functionalized SBA-15 particles were tested using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich). Primary human gingival fibroblasts²³ were cultured at 37 °C in 24-well plates in the Dulbecco-modified Eagle medium supplemented with fetal bovine serum (10% vol/vol), penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (0.1 mg/ml) in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were grown for 24 h, using an initial density of 15 000 cells in 1 ml per well. Then, SBA-15 particles were added at increasing concentrations, as indicated below. After a 68 h-incubation period, the medium was discarded and replaced with a solution of MTT in the supplemented medium (500 μ l \times 0.5 mg/ml), incubated for 4 h at 37 °C, and the colorimetric reaction was measured at 514 nm following the manufacturer's instructions.

K. Macrophage culture

The immortal human monocyte-derived THP-1 cell line was used to obtain TLR2-expressing macrophage-like adherent cells. Monocytes were cultured in RPMI 1640 supplemented medium with sodium pyruvate (1 mM), nonessential amino acids (0.1 mM), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (75 mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM), 10% inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (0.1 mg/ml) at 37 °C in an incubator with 5% CO₂. The nonadherent THP-1 cells were grown to a cell density of up to 10⁶ cells/ml. The medium was removed by centrifugation at 1500 rpm for 4 min, and 5 \times 10⁵ cells were allowed to mature onto 25-mm diameter, gelatinized coverslips by adding 162.1 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 72 h. Afterwards, the medium was discarded and macrophages were incubated in the fresh supplemented medium for 24 h.

L. TLR2 expression assessment in THP-1 derived macrophages

To analyze the expression of TLR2 due to PIM@SBA-15 interactions, 1.2 \times 10⁵ nonadherent THP-1 cells were allowed to mature on 10 mm-diameter gelatinized coverslips by adding 162.1 nM

PMA for 72 h. Afterwards, the medium was discarded and macrophages were incubated in the fresh supplemented medium for 24 h. Then, Rho-PE labeled silica particles were added at a concentration of 0.2 mg/ml, and incubated for 1, 6, or 12 h. After incubation, cells were washed with PBS, fixed with 500 μ l of paraformaldehyde at 4% for 15 min, washed twice with PBS, labeled with anti-TLR2 antibody (ab9100, Abcam, Cambridge, UK), and goat anti-mouse FITC secondary antibody (ab7064, Abcam). Samples were kept in PBS at 4 °C until analyzed in a laser scanning confocal microscope Zeiss LSM 50 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a multilineal argon/2 laser. Images were obtained with data of differential interference contrast (DIC)/Nomarski, green fluorescence (FITC-labeled TLR2) and red fluorescence (Rho-PE labeled particles) analyses using the Z-stack mode. Mean fluorescence images of different cells were analyzed by *FIJI-IMAGEJ* software, using an Autothreshold plugin. Then, a semiquantitative analysis of TLR2 expression was obtained from cells at various incubation periods in the presence of control or PIM@SBA-15 particles.

M. Macrophage pseudopodia extension and phagocytosis of particles

THP1-derived macrophages were grown in 25 mm-diameter coverslips at an initial density of 25 000 cells/ml and incubated with particles at a concentration of 0.2 mg/ml. Then, cell-particle interactions were assessed using a thermostatic holder at 37 °C for microscopic observation. The differential interference contrast (DIC)/Nomarski technique was performed on an inverted microscope (Olympus IX81, Tokyo, Japan) with a PlanApo 60 \times /1.40 NA oil immersion objective lens (Olympus, Japan). The images were acquired with an electron-multiplying charge-coupled device camera (Luca R, Andor, UK) with 1002 \times 1004 pixels. The observations consisted of a series of 31-frame-long time-lapse acquisitions with a 5-s interval between consecutive frames. The images were analyzed using the *IMAGEJ* software. Only the contrast and luminosity were adjusted for optimal visualization.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. SBA-15 particles

For SBA-15 preparation, the triblock copolymer Pluronic 123 was used as the directing agent, and TEOS was used as the silica precursor. Due to the fine tunability of mesoporous silica, particles were characterized to confirm that size, morphology, and textural properties such as the pore diameter were in line with the expected structure.^{22,24} The two first parameters are important because they are known to direct particle internalization into phagocytic cells only. On the other hand, the textural properties of mesoporous silica are of special interest if a lipid bilayer is to be adhered.²⁵ For the reported structure, TGA showed a first inflection point at 45 °C, corresponding to the physical desorption of water molecules,²¹ and a second, more subtle loss of material weight, above 200 °C, attributed to silica dehydroxylation [Fig. 2(a)].²¹ To confirm the well-ordered honeycomb-like array of pores, a small-angle XRD analysis was performed. The resulting diffractogram shows three diffraction peaks at $2\theta \approx 0.94^\circ$, 1.55° , and 1.8° , assigned as the (100), (110), and (200) hkl reflections, respectively

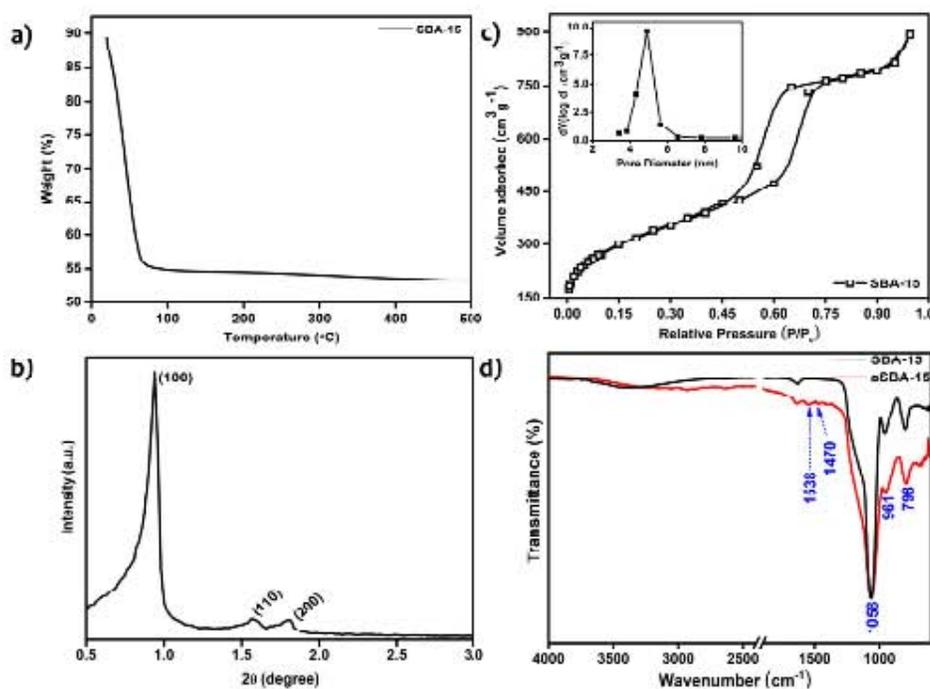


FIG. 2. Physicochemical characterization of SBA-15 particles. (a) TGA. (b) Small angle x-ray diffractogram. (c) Nitrogen adsorption and desorption isotherms at -196°C with the calculated pore size distribution according to BET (inset). (d) FTIR spectra of bare (SBA-15) and amine-functionalized (aSBA-15) particles (black and red lines, respectively).

[Fig. 2(b)], indicating the presence of $p6$ mm bidimensional plane groups.³² Nitrogen sorption-desorption isotherms were performed in order to determine the textural properties of the particles. This analysis showed a type IV isotherm curve, with a hysteresis loop showing parallel adsorption/desorption branches [Fig. 2(c)]. These data also confirmed the presence of well-ordered two-dimensional mesopores, which are typical of SBA-15 silica, and the BET analysis of N_2 adsorption/desorption data indicated a surface area of $849\text{ m}^2/\text{g}$, a total pore volume of $1.1\text{ cm}^3/\text{g}$, and an average mesopore diameter of 4.9 nm [Fig. 2(c), inset]. Although variations in the synthetic procedures may allow the preparation of particles with different porosities, it has been observed that very large pores, such as those of porous gold, may prevent a proper fusion of liposomes, giving rise to heterogeneous lipid bilayers through the vesicle fusion method.³³ Therefore, the analyses of particles indicated the presence of standard SBA-15 features, which are in line with the application of mesoporous silica as a lipid bilayer support.

FTIR analysis was employed to further characterize the SBA-15 particles. Bare SBA-15 particles yielded the expected FTIR bands for unmodified silica structures [Fig. 2(d), black line]. Signals assigned to symmetric and asymmetric Si—O—Si stretching were observed at 801.7 cm^{-1} and 1069.3 cm^{-1} , respectively. A band at 1634.6 cm^{-1} was attributed to the bending vibration of physisorbed water, whereas a broad band with maximal absorption at approximately 3360 cm^{-1} was assigned to hydroxyl groups. Because the particles were designed to support anionic lipid bilayers, a surface cationization was performed through APTEs functionalization. The resulting aminated silica (aSBA-15) showed absorption bands of NH_2 groups, at 1470 and 1583 cm^{-1} , following APTEs—Si linkage.³¹

The morphology of SBA-15 was analyzed by SEM. As shown in Fig. 3(a), the material is composed of uniform bacillary-shaped rods with average sizes of approximately $1\text{--}1.3\text{ }\mu\text{m}$ in length and $300\text{--}400\text{ nm}$ in width. Additionally, the SEM images also

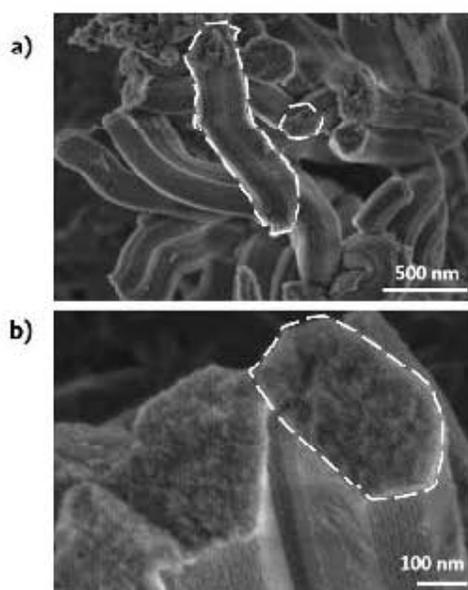


FIG. 3. SEM micrographs at different magnifications of SBA-15. A bacillary-shaped rod of ca. 1 μm -length (a) and the SBA-15 hexagonal order of pores (b) are indicated by dotted polygons.

confirmed the presence of hexagonal mesopores [Fig. 3(b)]. Noteworthy, postsynthesis silica functionalization with APTES is known to increase the size of the material in a nonsignificant way in regard to pore and particle dimensions, as the length of the attached aminopropyl group is only 0.5 nm length.¹⁸

B. Preparation of PIM-containing liposomes

To get PIMs, a lipid extract of *M. tuberculosis* was fractionated through normal phase chromatography. Five fractions of increasing polarity were obtained, as visualized by TLC analyses (Fig. 4). A high-polar eluate (fraction No. 5), revealed the typical TLC pattern for the whole family of PIMs, consisting of homologs bearing two to six sugar moieties and di- and tetra-*O*-acylated variants.¹⁹ The unequivocal identification of PIMs was achieved through *in situ* chemical reactions specific for phosphate and for sugar moieties (Fig. 4, bottom). Nonantigenically active phosphatidyl ethanolamine was also identified as a minor component of the fraction, as revealed by both the mobility and the positive reactivity to ninhydrin (Fig. 4 bottom, first lane). This mixture of phospholipids was used as the *M. tuberculosis* PIM-rich fraction.

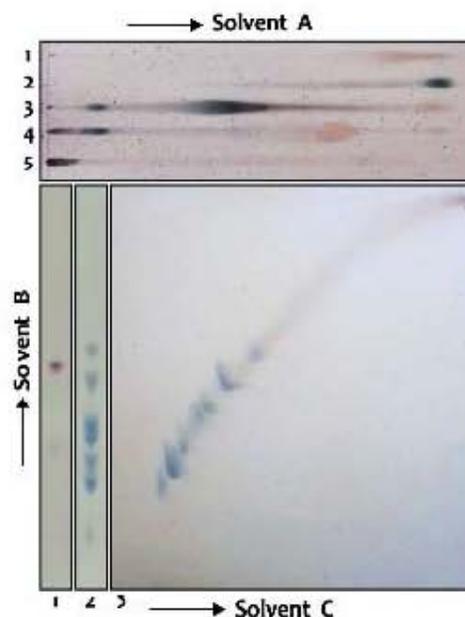


FIG. 4. TLC analysis of lipids from *M. tuberculosis* H37Rv. Top: fractions of increasing polarity eluted with solvent A (apolar). Bottom: the bioactive high-polarity fraction contains PIMs eluted with a polar solvent system; fraction No. 5 gave ninhydrin (lane 1) and anthrone (lane 2) reactive spots. The typical chromatography pattern of PIMs was visualized on a two-dimensional solvent system on a plate revealed with the anthrone reagent (run 3).

As part of a highly heterogeneous family of lipids, with a varying number of sugars and fatty acyls, PIMs are known to present geometrical shapes other than cylinders. Most of them belong to inverse cone-shaped lipids.¹⁹ For this reason, the formation of liposomes with pure PIMs may be hampered, as we confirmed after failed attempts to produce vesicles using the pure lipids. PIM-displaying vesicles were thus prepared using a mixture of egg yolk PC and PIMs at a 1:1 weight ratio. The TEM analysis of the PIM-containing liposomes [Fig. 5(a)] exhibited large unilamellar vesicles (LUVs) of approximately 350 nm diameter. Interestingly, PIM-containing liposomes exhibited an atypical rough surface, which was attributed to the heterogeneous sizes of polar heads. Their average hydrodynamic diameter was estimated through DLS analysis at 295 nm [Fig. 5(b)].

Further confirmation of the presence of PIMs in the lipid vesicles was obtained through FTIR and zeta potential analyses. Composed of a mixture of PIMs and PC, the FTIR spectrum of liposomes showed absorption bands corresponding to both lipids

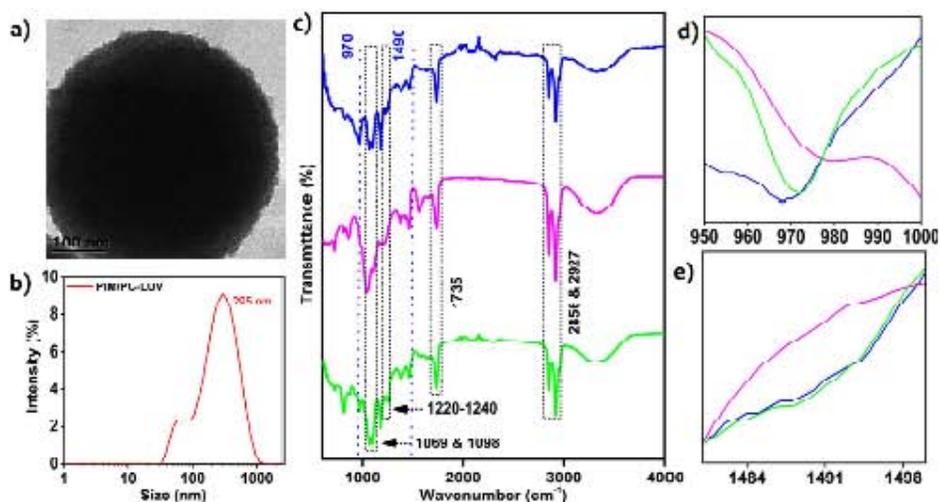


FIG. 5. Characterization of PIM-containing liposomes. (a) TEM image of a PIM-containing liposome. (b) DLS analysis of PIM-containing liposome population. (c) FTIR spectra of PC (blue), PIMs (magenta), and large unilamellar vesicles composed of PC and PIMs (green). (d) and (e) Magnification of PC absorption bands at 970 and 1490 cm^{-1} .

[Fig. 5(c)]. The assignment of peaks to vibrations due to specific functional groups was made according to general FTIR absorption catalogs using pure PIMs and PC samples [Fig. 5(c), magenta and blue spectra]. For both lipids, signals at approximately 2855 and 2920 cm^{-1} were attributed to the acyl CH_2 antisymmetric and symmetric vibrations, whereas the signal at 1735 cm^{-1} was interpreted as the $\text{C}=\text{O}$ stretching band. The spectrum of standard PC showed absorption bands at 1069/1098 cm^{-1} and 1220/1240 cm^{-1} , which were attributed to the PO_2^- symmetrical and anti-symmetrical stretching, respectively. The absorption signal at 970 cm^{-1} and the weak shoulder peak at 1490 cm^{-1} were assigned to the $\text{N}-\text{CH}_3$ asymmetric vibration of PC. When liposomes formed of PC + PIMs were analyzed, the combined FTIR signals of PIMs and PC were observed [Figs. 5(c)-5(e)], thus confirming the presence of both lipids in the vesicles. Furthermore, the presence of PIMs was confirmed by zeta potential analyses, which showed vesicles with a negative charge at -49.7 mV, due to the highly anionic nature of phosphoinositide groups in PIMs (Fig. 6, blue bar). Finally, TLC analysis was performed with lipids extracted from liposomes, showing that both mycobacterial PIMs and PC were released from vesicle lipid extracts (Fig. S1 in the supplementary material¹⁵).

C. PIM-displaying SBA-15 particles

The vesicle fusion approach was employed to attach PIM-containing lipid bilayers to silica surfaces. Using this method,

the formation of supported lipid bilayers can be easily performed, provided that a number of conditions are fulfilled in terms of particle topography and surface energy. In particular, it has been noticed that the presence of attractive forces between the inorganic core and the vesicles is of special interest so that a sufficient tension in the liposome can exceed the lysis threshold for vesicle rupture.²⁵ To address this, the amine functionalization of SBA-15 particles was performed to promote a strong electrostatic interaction between the protonated amines on mesoporous silica and the negatively charged PIMs.²⁷ An additional concern for preparing supported lipid bilayers has been the formation of disrupted membrane patches when large pores are present in the support surface, as has been evidenced using porous gold.³¹ As presented above, SBA-15 silica bears 4.9 nm-diameter-pores, thus providing a suitable topography for the formation of PIM-liposome coating. In spite of this, there exists the possibility that unbroken liposomes and/or heterogeneous lipid compositions are present in the final lipid coat, which may influence the particles biological features, such as biocompatibility.³⁰ The use of complementary characterization approaches, such as quartz crystal microbalance with dissipation or atomic force microscopy, could provide further clues on these issues.

Among the various characterization techniques herein employed, the determination of particle zeta potential, the presence of PIMs optical signals (by FTIR spectroscopy), and ultrastructural changes were used in order to confirm the identity of

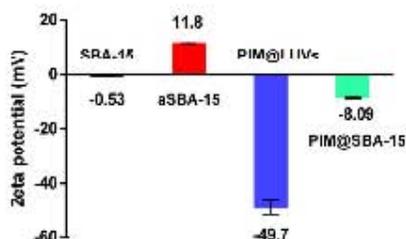


FIG. 6. Zeta potential analysis of bare SBA-15 particles (black bar), amine-functionalized SBA-15 particles (red bar), PIM-containing liposomes (blue bar), and PIM@SBA-15 hybrid constructs (green bar).

PIM-displaying colloids. Zeta potential analysis of bare, amine-functionalized, liposome coated SBA15 particles is shown in Fig. 6. Bare SBA-15 particles showed a zeta potential value close to zero after the washing procedures used to obtain protonated silanols.²⁴ As expected, the functionalization of SBA-15 with amine groups produced a change of zeta potential to +11.8 mV, demonstrating the cationic nature of the functionalized particles. After the coating with liposomes, the loss of exposed cationic charges was clearly transduced into zeta potential values of -0.53 mV for PC-bilayer coating, and -8.1 mV in the case of PIM-containing coating, further confirming the presence of negatively charged phosphoinositides in PIM@SBA-15 particles.

FTIR analysis of lipid-coated particles confirmed the presence of functional groups of silica, including signals at 798 and 961 cm^{-1} attributed to Si—O—Si and Si—OH vibrations, and peaks of amine groups at 1470 and 1538 cm^{-1} [Figs. 7(c)–7(d)]. The presence of lipids was also confirmed by signals attributed to CH_2 antisymmetric and symmetric vibrations of liposome acyl chains at 2854 and 2925.8 cm^{-1} , featuring molecular fingerprints of both PC and PIMs. Finally, ultrastructural analyses of bare and lipid-coated SBA-15 particles are shown in Fig. 7, where the ordered pore arrays can be visualized for bare particles [Fig. 7(a)], whereas the coating of liposomes in PIM@SBA-15 particles clearly covered the silica pores, which were not visible anymore [Fig. 7(b)].

D. Biocompatibility of PIM@SBA-15 particles

To the best of our knowledge, this is the first time that any silica structure has been used as a support for lipid bilayers with mycobacterial lipids. As stated above, PIMs have been described with various biological effects, and biocompatibility tests of the novel construct were needed. We used primary human gingival fibroblasts and the MTT cytotoxicity assay. The amine-functionalized SBA-15 was found to induce a decrease in the viability of human cells in a dose-dependent manner, with mortality rates above 25% at a concentration of 0.3 mg/ml (Fig. 8). This finding agreed with other biocompatibility reports of mesoporous silica, where toxic effects of silica have been found at doses above 0.2 mg/ml.²⁵ Contrasting with this, liposome-coated particles showed far less significant effects on cell

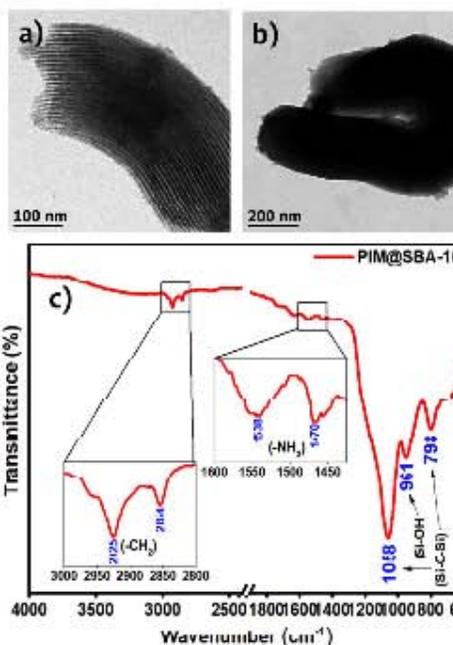


FIG. 7. Characterization of PIM@SBA-15 particles. TEM image of bare (a) and PIM liposome-coated SBA-15 (b) after negative staining. The FTIR spectrum (c) exhibits the typical absorption bands of amine-functionalized SBA-15 core and methylene vibrations of the liposome coating (insets).

activity, which is not surprising, since the modification of surfaces has been clearly identified as one of the main factors influencing nanoparticle biocompatibility.²⁶ It has been found, for instance, that the adsorption of proteins from biological fluids may greatly enhance the cellular uptake and the safety of inorganic particles. Although there are a few reports about the effects of liposome coating on the properties of mesoporous silica, their biocompatibility has been found to be increased upon lipid-coating, a fact attributed to the concealing of the silanol groups.^{25,29} Also importantly, the presence of PIMs did not change the mitigation of particle toxicity observed with the control liposome, thus suggesting good biocompatibility of PIM@SBA-15.

E. Interaction of PIM@SBA-15 particles with immune cells

It has been established that, upon an infection, mycobacterial PIMs bind TLR2, a receptor of innate immunity in macrophages,

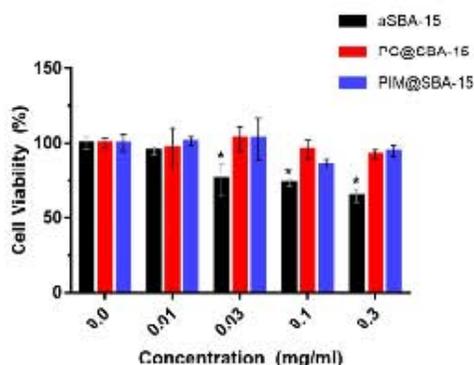


FIG. 8. Biocompatibility assessment of SBA-15 constructs in primary human fibroblasts. Cells were cultured for 24 h and exposed for 72 h to increasing concentrations of amine-functionalized particles (aSBA-15), control liposome-coated silica (PC@SBA-15), or PIM-liposome-coated silica (PIM@SBA-15). Cell viability was estimated through colorimetric MTT assays and reported as the percentage relative to untreated cells. Data represent the mean of the percentage of cell survival \pm standard deviation ($n = 3$). The statistical analysis was performed using the *statview* TM software and one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance is indicated as * ($p < 0.05$).

myeloid-derived dendritic cells, and microglia.⁴⁰ As a consequence, immune cells produce a set of proinflammatory mediators, leading to the launch of immune protective mechanisms.^{13,41} In this study, we planned to explore whether PIM-displaying particles (PIM@SBA-15) could differentially upregulate the expression of TLR2, as compared to control particles, and whether colocalization of TLR2 and PIM@SBA-15 could indicate the interaction between the receptor and its cognate ligand. For this purpose, a kinetics of TLR2 expression was obtained through confocal microscopy, by analyzing fluorescence Z-stack images using the *IMAGEJ* software. Supported lipid bilayers were labeled by adding fluorescent Rho-PE in the liposome composition, while FITC-labeled anti-TLR2 antibodies were used to visualize the cell surface receptor. The results showed that the expression of TLR2 increased over time during the incubation of macrophages with PIM-containing particles, reaching a maximal level after a 6 h-incubation time (Fig. S2 in the supplementary material⁴²). This kinetic behavior was in agreement with previous reports, where macrophage-like cell lines overexpressed TLR2 after 1 h in the presence of bacterial patterns.⁴³ We therefore analyzed the expression of TLR2 in macrophages treated with a control or PIM-containing particles after a 6 h-incubation period (Fig. 9). As expected, red-labeled particles were visualized in cell samples treated with a control or PIM-containing particles. However, TLR2 proteins were clearly overexpressed and colocalized with red-fluorescent particles only in the presence of PIM@SBA-15 constructs (Fig. 9, bottom). Altogether, these results strongly indicated that TLR2 interacts with PIM-displaying particles, leading to the increased expression of the innate immune receptors as well.

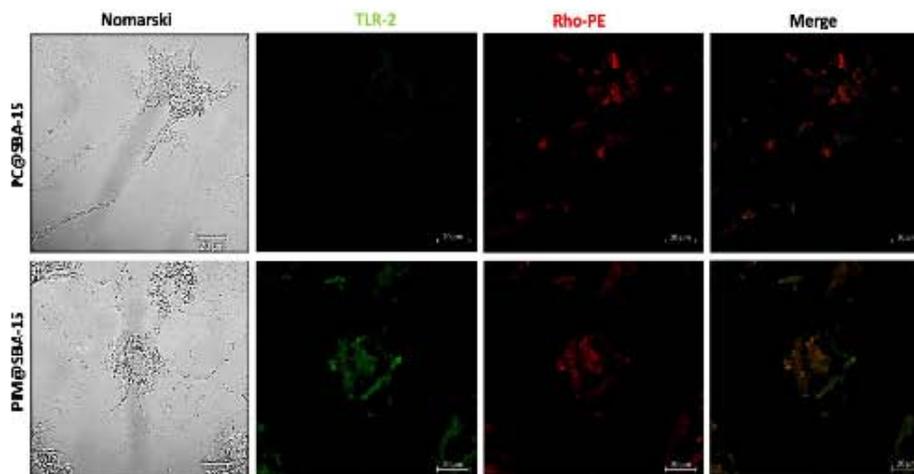


FIG. 9. Nomarski and fluorescence confocal Z-stack images of THP-1-derived macrophages after treatment with PC@SBA-15 and PIM@SBA-15 particles for 6 h. Red fluorescent Rho-PE was used to prepare labeled particles. FITC-labeled anti-TLR2 monoclonal antibodies were used to visualize TLR2 receptors.

Finally, live-cell imaging was performed in order to look for possible changes in the morphology and phagocytic behavior of macrophages exposed to PIM-containing particles. Nomarski/DIC microscopy analysis is shown for macrophages exposed to control PC@SBA-15 particles (Fig. S3, video 1 in the supplementary material³³) and to bioactive PIM@SBA-15 particles (Fig. S3, video 2 in the supplementary material³³). These recordings support a differential activity of PIM-displaying particles on the innate behavior of macrophages, which displayed the formation of pseudopods, along with phagocytic processes in a matter of minutes, whereas no interactions were observed between macrophages and control PC@SBA-15 constructs.

IV. CONCLUSIONS

PIMs, the bioactive molecular signatures of *M. tuberculosis*, were successfully prepared within biomimetic lipid bilayers supported on mesoporous silica. The hybrid constructs, named PIM@SBA-15, were found to colocalize with TLR2 proteins, also provoking the increase in the expression of these receptors in THP-1 derived macrophages. As suggested by this, PIM@SBA-15 particles were found to induce the formation of pseudopods in living macrophages, leading to particle phagocytosis in a matter of minutes upon their incubation. Altogether, these data support the usefulness of PIM@SBA-15 particles in modeling the interaction of mycobacterial PIMs and immune cells within a biomimetic approach. Further research is encouraged to explore the adjuvant potential of PIM@SBA-15 in the development of vaccine carriers.

ACKNOWLEDGMENTS

Carlos M. Valdemar-Aguilar is a CONACYT fellow (CVU 665176) at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ravichandran Manisekaran was supported by a postdoctoral fellowship of DGAPA-UNAM. The authors wish to acknowledge financial support from DGAPA-UNAM through Grant No. IT203518 and the excellent technical assistance from Lourdes Palma and Nydia Hernández (INB, UNAM), Carmen Peza (CFATA, UNAM), and Luz María Avilés (CINVESTAV-IPN). Nanossemblies' schemes were designed by Regina Villareal-González. Kendra M. Lyons revised the manuscript.

REFERENCES

¹M. Roser and H. Ritchie, "Burden of Disease Publication," OurWorldInData.Org, 2020, retrieved from February 10, 2020, <https://OurWorldInData.Org/Burden-of-Disease>.
²World Health Organization, *Global Tuberculosis Report 2019* (World Health Organization, Geneva, 2019).
³L. Chirradis, C. Lefebvre, J. Pizar, J. Marcoux, O. Burlet-Schultz, G. Etienne, M. Tropis, and M. Daffé, *Sci. Rep.* **7**, 1 (2017).
⁴R. Kalscheuer, A. Palacios, I. Anzo, J. Cifuentes, J. Anguita, W. R. Jacobs, M. E. Guerin, and R. Prados-Rosales, *Biochem. J.* **476**, 1995 (2019).
⁵A. Ortalo-Magné, A. Lemoussu, M.-A. Lanzelle, F. Bardou, G. Sève, P. Gounin, G. Marchad, and M. Daffé, *J. Bacteriol.* **178**, 456 (1996).
⁶L. M. Rocha-Ramírez et al., *Tuberculosis* **88**, 212 (2008).
⁷E. Bruset, C. Martin, and J. Gonzalo-Arenato, *Milieu* **6**, 1 (2015).
⁸M. Jackson, *Cobé Spring Harbor Perspect. Med.* **4**, 1 (2014).

⁹W. L. Beatty, E. R. Rhoades, H. Ullrich, D. Chatterjee, J. E. Heuser, and D. G. Russell, *Traffic* **1**, 235 (2000).
¹⁰R. A. Fratti, J. Chao, J. Vergne, and V. Deretic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5437 (2003).
¹¹N. A. Parlane, M. Denis, W. B. Severn, M. A. Skinner, G. F. Painter, A. C. La Flamme, G. D. Ainge, D. S. Larsen, and B. M. Buddle, *Immunol. Invest.* **37**, 129 (2008).
¹²N. A. Parlane, B. J. Goupton, C. M. Hayman, G. F. Painter, R. J. Basaraba, A. Heuser, and B. M. Buddle, *Vaccine* **30**, 580 (2012).
¹³G. Killenius, M. Correia-Neves, H. Duteme, B. Hamasur, and S. B. Svenson, *Tuberculosis* **96**, 120 (2016).
¹⁴J. S. Kim, Y. R. Kim, and C. S. Yang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1506 (2019).
¹⁵H. C. Hoppe, B. J. M. De Wet, C. Cywes, M. Daffé, and M. R. W. Ehlers, *Infect. Immun.* **65**, 3896 (1997).
¹⁶B. W. Jones, T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keem, P. J. Hill, J. T. Befide, and M. J. Fenton, *J. Leukoc. Biol.* **69**, 1036 (2001).
¹⁷N. N. Drissen et al., *Infect. Immun.* **77**, 4538 (2009).
¹⁸M. Gilleron, F. J. Quesnau, and G. Puzo, *J. Biol. Chem.* **278**, 29880 (2003).
¹⁹J. Chus, I. Vergne, S. Master, and V. Deretic, *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 71 (2004).
²⁰T. K. Lind and M. Cárdenas, *Biointerphases* **11**, 020801 (2016).
²¹M. Benerra et al., *J. Clin. Invest.* **121**, 2768 (2011).
²²Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosny, J. F. Stoddart, and J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2590 (2012).
²³J. Liu, X. Jiang, C. Ashley, and C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7567 (2009).
²⁴R. W. Davis, A. Flores, T. A. Barrick, J. M. Cox, S. M. Brozik, G. P. Lopez, and J. A. Brzdek, *Langmuir* **25**, 3864 (2007).
²⁵G. Neodlund, J. B. Sing Ng, L. Bergström, and P. Brzezinski, *ACS Nano* **3**, 2639 (2009).
²⁶C.-M. Lin, G.-B. Chen, H.-H. Chen, J.-B. Zhang, H.-Z. Li, M.-X. Sheng, W.-B. Weng, and S.-M. Guo, *Colloids Surf. B* **175**, 477 (2019).
²⁷V. Hernández-Morales, R. Nava, Y. I. Acosta-Silva, S. A. Macías-Sánchez, I. I. Pérez-Bueno, and B. Pantelec, *Microporous Mesoporous Mater.* **160**, 133 (2012).
²⁸K. Elodström and V. Alfredsson, *Microporous Mesoporous Mater.* **59**, 167 (2003).
²⁹L. M. López-Marín, E. Segura, C. Hermida-Escobedo, A. Lemassu, and M. C. Salinas-Carmona, *FEBS J. Immunol. Med. Microbiol.* **36**, 47 (2003).
³⁰A. Mera-Rodríguez, O. Martínez-Álvarez, L. Acosta-Torres, J. de la Fuente-Hernández, and R. García-Contreras, *J. Oral Res.* **5**, 194 (2016).
³¹B. Liu and S. Zhou, *Prog. Org. Coat.* **106**, 145 (2017).
³²S. Abbaspour, A. A. Nourbakhsh, R. Javad Kalbasi, and K. J. D. Mackenzie, *Ceram. Int.* **39**, 6293 (2013).
³³P. Losada-Pérez, O. Polat, A. N. Parikh, E. Seker, and E. U. Renner, *Biointerphases* **13**, 011002 (2018).
³⁴N. Majoul, S. Aouada, and B. Bessafi, *Appl. Surf. Sci.* **331**, 388 (2015).
³⁵M. Zhu, M. Z. Lerum, and W. Chen, *Langmuir* **28**, 416 (2012).
³⁶D. E. Mimmikin et al. in *Tuberculosis—Expanding Knowledge* edited by W. I. Ribbon (Intech Open, London, 2016), pp. 145–175.
³⁷J. Lu, M. Liang, Z. Li, J. I. Zink, and F. Tamanoi, *Small* **6**, 1794 (2010).
³⁸J. L. Paria, A. Baza, and M. Vallet Regí, *Expert Opin. Drug Delivery* **16**, 1095–1112 (2019).
³⁹N. Han, Y. Wang, J. Bai, J. Liu, Y. Wang, Y. Gao, T. Jiang, W. Kang, and S. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.* **219**, 209 (2016).
⁴⁰K. Vijay, *Int. Immunopharmacol.* **59**, 391 (2018).
⁴¹P. S. Patil, T. J. R. Cheng, M. M. L. Zubeta, S. T. Yang, L. S. Lico, and S. C. Hung, *Nat. Commun.* **6**, 2239 (2015).
⁴²L. E. Cole, K. A. Shirey, E. Barry, A. Santiago, P. Balabhandi, K. I. Fikins, A. C. Pache, S. M. Michalek, and S. N. Vogel, *Infect. Immun.* **75**, 4127 (2007).
⁴³See supplementary material at <https://doi.org/10.1116/0000168> for supplemental figures and particle-live cell imaging.

Finally, live-cell imaging was performed in order to look for possible changes in the morphology and phagocytic behavior of macrophages exposed to PIM-containing particles. Nomarski/DIC microscopy analysis is shown for macrophages exposed to control PC@SBA-15 particles (Fig. S3, video 1 in the supplementary material⁴²) and to bioactive PIM@SBA-15 particles (Fig. S3, video 2 in the supplementary material⁴²). These recordings support a differential activity of PIM-displaying particles on the innate behavior of macrophages, which displayed the formation of pseudopods, along with phagocytic processes in a matter of minutes, whereas no interactions were observed between macrophages and control PC@SBA-15 constructs.

IV. CONCLUSIONS

PIMs, the bioactive molecular signatures of *M. tuberculosis*, were successfully prepared within biomimetic lipid bilayers supported on mesoporous silica. The hybrid constructs, named PIM@SBA-15, were found to colocalize with TLR2 proteins, also provoking the increase in the expression of these receptors in THP-1 derived macrophages. As suggested by this, PIM@SBA-15 particles were found to induce the formation of pseudopods in living macrophages, leading to particle phagocytosis in a matter of minutes upon their incubation. Altogether, these data support the usefulness of PIM@SBA-15 particles in modeling the interaction of mycobacterial PIMs and immune cells within a biomimetic approach. Further research is encouraged to explore the adjuvant potential of PIM@SBA-15 in the development of vaccine carriers.

ACKNOWLEDGMENTS

Carlos M. Valdemar-Aguilar is a CONACyT fellow (CVU 665176) at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ravichandran Manisekaran was supported by a postdoctoral fellowship of DGAPA-UNAM. The authors wish to acknowledge financial support from DGAPA-UNAM through Grant No. IT203518 and the excellent technical assistance from Lourdes Palma and Nydia Hernández (INR, UNAM), Carmen Peza (CFATA, UNAM), and Luz María Avilés (CINVESTAV-IPN). Nanoassemblies' schemes were designed by Regina Villareal-González. Kendra M. Lyons revised the manuscript.

REFERENCES

¹M. Roser and H. Ritchie, "Burden of Disease Publication," OurWorldInData.Org, 2020, retrieval from February 10, 2020, <https://OurWorldInData.Org/Burden-of-Disease>.
²World Health Organization, *Global Tuberculosis Report 2019* (World Health Organization, Geneva, 2019).
³L. Chiaradin, C. Lefebvre, J. Parra, J. Marcoux, O. Burlet-Schultz, G. Etienne, M. Tropic, and M. Daffé, *Sci. Rep.* **7**, 1 (2017).
⁴R. Kalscheuer, A. Palacios, L. Anso, J. Cifuerre, J. Anguita, W. R. Jacobs, M. E. Goerni, and R. Prados-Rosales, *Biochem. J.* **476**, 1995 (2019).
⁵A. Ortalo-Magné, A. Lemasson, M.-A. Lanéelle, J. Bardon, G. Silve, P. Gounon, G. Marchal, and M. Daffé, *J. Bacteriol.* **178**, 456 (1996).
⁶L. M. Rocha-Ramírez et al., *Tuberculosis* **88**, 212 (2008).
⁷E. Broset, C. Martín, and J. Gonzalo-Aseredo, *MBo* **6**, 1 (2015).
⁸M. Jackson, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **4**, 1 (2014).

⁹W. L. Beatty, E. R. Rhoads, H. Ullrich, D. Chatterjee, J. E. Henser, and D. G. Russell, *Traffic* **1**, 235 (2000).
¹⁰R. A. Frattí, J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5437 (2003).
¹¹N. A. Parlani, M. Denis, W. B. Severn, M. A. Skinner, G. F. Painter, A. C. La Hamme, G. D. Aingo, D. S. Larsen, and B. M. Buddle, *Immunol. Invest.* **37**, 129 (2008).
¹²N. A. Parlani, B. J. Gooty, C. M. Hayman, G. F. Painter, R. J. Basaraha, A. Henser, and B. M. Buddle, *Vaccine* **30**, 580 (2012).
¹³G. Kallénus, M. Correia-Neves, H. Buteme, B. Hamastr, and S. B. Svenson, *Tuberculosis* **96**, 120 (2016).
¹⁴S. Kim, Y. B. Kim, and C. S. Yang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1506 (2019).
¹⁵H. C. Hoppe, B. J. M. De Wet, C. Cyses, M. Daffé, and M. R. W. Ehlers, *Infect. Immun.* **65**, 3896 (1997).
¹⁶B. W. Jones, T. K. Means, K. A. Heikweim, M. A. Koos, P. J. Hill, J. T. Befide, and M. J. Fenton, *J. Leukoc. Biol.* **69**, 1036 (2001).
¹⁷N. N. Driessen et al., *Infect. Immun.* **77**, 4538 (2009).
¹⁸M. Galleron, F. J. Quesniaux, and G. Puzo, *J. Biol. Chem.* **278**, 29880 (2003).
¹⁹J. Chua, I. Vergne, S. Master, and V. Deretic, *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 71 (2004).
²⁰T. K. Lind and M. Cárdenas, *Biointerphases* **11**, 020801 (2016).
²¹M. Benezra et al., *J. Clin. Invest.* **121**, 2768 (2011).
²²Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, and J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2590 (2012).
²³J. Liu, X. Jiang, C. Ashley, and C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7567 (2009).
²⁴B. W. Davis, A. Flores, T. A. Barrick, J. M. Cox, S. M. Brown, G. P. Lopez, and J. A. Brink, *Langmuir* **23**, 3864 (2007).
²⁵G. Nordlund, J. B. Sing Ng, I. Bertram, and P. Brzezinski, *ACS Nano* **3**, 2639 (2009).
²⁶C.-M. Liu, G.-B. Chen, H.-H. Chen, J.-B. Zhang, H.-Z. Li, M.-X. Sheng, W.-B. Weng, and S.-M. Guo, *Colloids Surf. B* **175**, 477 (2019).
²⁷V. Hernández-Morales, R. Nova, Y. J. Acosta-Silva, S. A. Macías-Sánchez, J. J. Pérez-Buena, and B. Panek, *Microporous Mesoporous Mater.* **160**, 133 (2012).
²⁸K. Hodström and V. Alfrésson, *Microporous Mesoporous Mater.* **59**, 167 (2003).
²⁹I. M. López-Marín, E. Sapara, C. Hermida-Escobedo, A. Lemasson, and M. C. Salinas Carmona, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **36**, 47 (2003).
³⁰A. Meza-Rodríguez, O. Martínez-Alvarez, L. Acosta-Torres, J. de la Fuente-Hernández, and R. García-Contreras, *J. Oral Res.* **5**, 194 (2016).
³¹B. Lin and S. Zhou, *Prog. Org. Coat.* **106**, 145 (2017).
³²S. Abbaspour, A. A. Nourbakhsh, R. Javad Kalbasi, and K. J. D. Mackenzie, *Ceram. Int.* **39**, 6293 (2013).
³³P. Losada-Pérez, O. Polat, A. N. Parikh, E. Seker, and F. U. Renner, *Biointerphases* **13**, 011002 (2018).
³⁴N. Majoul, S. Aouida, and B. Besaïk, *Appl. Surf. Sci.* **331**, 388 (2015).
³⁵M. Zhu, M. Z. Lerum, and W. Chen, *Langmuir* **28**, 416 (2012).
³⁶D. E. Minnikin et al. in *Tuberculosis—Expanding Knowledge* edited by W. I. ribbon (InTech Open, London, 2016), pp. 145–175.
³⁷J. Lu, M. Liang, Z. Li, J. I. Zink, and F. Tamanoi, *Small* **6**, 1794 (2010).
³⁸J. L. Paris, A. Baeza, and M. Vallet Regí, *Expert Opin. Drug Delivery* **16**, 1095–1112 (2019).
³⁹N. Han, Y. Wang, J. Bai, J. Liu, Y. Wang, Y. Guo, T. Jiang, W. Kang, and S. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.* **219**, 209 (2016).
⁴⁰K. Vijay, *Int. Immunopharmacol.* **59**, 391 (2018).
⁴¹P. S. Patil, T. J. R. Cheng, M. M. L. Zuheta, S. T. Yang, L. S. Lico, and S. C. Hung, *Nat. Commun.* **6**, 2239 (2015).
⁴²L. E. Cole, K. A. Shively, E. Barry, A. Santiago, P. Ballabhadra, K. L. Elkins, A. C. Pache, S. M. Michalek, and S. N. Vogel, *Infect. Immun.* **75**, 4127 (2007).
⁴³See supplementary material at <https://doi.org/10.1116/0.0000168> for supplementary figures and particle-live cell imaging.



Spotlight on mycobacterial lipid exploitation using nanotechnology for diagnosis, vaccines, and treatments

Carlos M. Valdemar-Aguilar, MSc^{a,b}, Ravichandran Manisekaran, PhD^{c,*},
Laura S. Acosta-Torres, PhD^c, Luz M. López-Marín, PhD^{a,*}

^aCentro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico

^bPrograma de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^cInterdisciplinary Research Laboratory (LII), Nanostructures and Biomaterials Area, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, Predio el Sauzillo y el Potrero, Comunidad de los Tepetates, 37689 León, Mexico

Revised 24 December 2022

Abstract

Tuberculosis (TB), historically the most significant cause of human morbidity and mortality, has returned as the top infectious disease worldwide, under circumstances worsened by the COVID-19 pandemic's devastating effects on public health. Although *Mycobacterium tuberculosis*, the causal agent, has been known of for more than a century, the development of tools to control it has been largely neglected. With the advancement of nanotechnology, the possibility of engineering tools at the nanoscale creates unique opportunities to exploit any molecular type. However, little attention has been paid to one of the major attributes of the pathogen, represented by the atypical coat and its abundant lipids. In this review, an overview of the lipids encountered in *M. tuberculosis* and interest in exploiting them for the development of TB control tools are presented. Then, the amalgamation of nanotechnology with mycobacterial lipids from both reported and future works are discussed.

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Tuberculosis; Nanomedicine; COVID-19; Mycobacterial lipids

Introduction

With the decline of COVID-19 cases and deaths, tuberculosis (TB), the deadliest disease in human history, is once again the major infectious killer worldwide. According to the last report of the World Health Organization (WHO) on TB, *M. tuberculosis*, the causal agent of TB, caused 10 million new cases and 1.6 million deaths in 2021, just below those attributed to COVID-19 during its deadliest year.¹ Unfortunately, with the focus on halting coronavirus infection, control measures against TB have been seriously neglected, with devastating effects. Deaths caused by TB increased for the first time in a decade, while the number of diagnoses, reports and treatments fell to unexpected levels.² One of the major obstacles to the control of TB is the complexity of the life cycle of *M. tuberculosis*: in most people, *M. tuberculosis* infection is efficiently confined inside a lung

granuloma, resulting in a latent stage that may last for decades or until death; however, under immunosuppressive conditions, the infective node turns into a highly contagious respiratory disease.³ Although *M. tuberculosis* was identified more than a century ago, tools to prevent, diagnose and treat the disease at its multiple stages are scarce. On the other hand, *M. tuberculosis* is only the main species involved in human TB, as closely related species, namely *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, and *M. caprae*, are being identified more and more in human TB cases in various countries.^{4,5} It is noteworthy that the different lineages of these species, which are part of the *M. tuberculosis* complex (MTC),⁴ display phenotypic differences that should be considered in the design of control measures.

The current vaccine consists of a live attenuated mycobacterial strain, the so-called Bacillus Calmette-Guérin (BCG), which induces protection against the most severe forms of TB, especially in children, but it is highly ineffective against adult TB in the highly infectious, spreading stage.⁶ New vaccine candidates are currently being explored, with proposals ranging from recombinant BCG or promising attenuated mycobacterial

* Corresponding authors.

E-mail addresses: manisekaran@enes.unam.mx (R. Manisekaran),
lm@unam.mx (L.M. López-Marín).

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2023.102653>

1549-9634/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

strains,^{7,8} to nucleic acids carried by novel nanostructured platforms.⁹ It is expected that new vaccines may be available during the next decade, for which nanotechnology would represent an important component. Regarding diagnostics, more efforts are needed to address the detection of both latent and active TB promptly in the most affected populations. While the development of affordable methods for detecting active cases is one of the top targets in public health, since it would significantly impact the spread of the disease,¹⁰ diagnosis of the latent infective form is also needed to focus on personalized medicine and epidemiological measures.¹¹ As pointed out above, millions of cases of active TB go undiagnosed each year, leading to unacceptable preventable deaths. Some survey reports indicate that only 20 % of active TB cases are currently diagnosed.¹² At present, the most common methodology used to detect active TB is sputum smear microscopy, a traditional smear test that requires skilled personnel and the manipulation of the pathogen. With no appropriate methodologies for diagnosis, the most affected settings worldwide frequently misinterpret TB symptoms (such as fever, chest pain, weight loss or night sweats) with those of other common diseases. One of the top priorities in TB research is therefore the development of friendly and low-cost diagnostic platforms, a challenge to which nanotechnology seems the natural alternative. On another side, a poor understanding of the interactions between *M. tuberculosis* and host cells is now limiting the engineering of tools to fight against TB. The biology of the bacillus is extremely complex: both activators and suppressors of immunity are expressed by the pathogen in a still poorly comprehended spatiotemporal way. In this regard, the potential of nanotechnology to engineer biomimetic tools at the appropriate sizes, textures, and forms would be of the highest interest as well.

Fat: the molecular key feature in the tubercle bacillus

TB disease is probably as old as humans are. Tuberculosis-like pathologies have been found in ancient mastodons, and *M. tuberculosis* DNA has been identified in a Pleistocene bison.^{13,14} In hominids, there is data supporting that early *M. tuberculosis* progenitors might have been infecting individuals as long as three million years ago.¹⁵ The question arises, therefore, about the basis for such infective success, with the tubercle bacilli apparently surpassing mankind's evolution. From a molecular point of view, *M. tuberculosis* is a highly complex microorganism that involves multiple pathogenesis factors, with proteins, lipids and glycans of the highest specificity.^{16–18} Although all molecular types in *M. tuberculosis* have been found to be involved in pathogenesis, we can affirm that the most outstanding feature of the bacillus is, with no doubt, the unusual waxy composition of the cell coat. Indeed, the extremely fatty coat of *M. tuberculosis* importantly delayed the consistent staining (and visualization) of the bacilli for Robert Koch to finally report his discovery in 1882.¹⁹ Again, it is because of the highly impermeable cell wall that most common antibiotics fail to kill the bacilli, leading to late use of chemotherapy against TB, as compared to other bacterial diseases. In 1998, the first annotated genomic sequence had revealed that *M. tuberculosis* contains examples of every known lipid and polyketide biosynthetic

system, including all those found in bacteria, mammals and plants.¹⁶ The amount of fatty material in *M. tuberculosis* is huge as well: as a basis for comparison, the variety of enzymes involved in fatty acid metabolism in the tubercle bacillus is 5-fold greater than that in *E. coli*, giving rise to lipid content (ca. 40 % of the cell dry mass²⁰) paralleled only by oleaginous microalgae when subjected to stress.²¹ Many studies have addressed the ultrastructure of *M. tuberculosis* cell-walls through various microscopy techniques.^{18,20} To date, we know that mycobacteria are coated by a structure with a thick polysaccharide network and at least two lipid bilayers. Importantly, lipids with no covalent linkage to this structure are known to be exported outside of the bacterial cell during infection.²² In Fig. 1, a model based on those reports is depicted.

From a structural point of view, mycobacterial lipids show some of the most atypical features, including skeletons up to 80C in length, polymethyl branches, or fatty esters whose rupture must be achieved through unusually heavy lytic procedures.²⁰ That is why the presence of mycobacterial lipids has been used as a hallmark, along with DNA, in the identification of TB in ancient remains.²³ Not surprisingly, the encounter between such original chemicals and human cells allows a set of interactions such as their recognition by cell surface receptors, the rise in antibodies during active infections, or the disruption of cell membranes upon the liberation of the so-called “free” lipids.²⁴ While the mechanisms linked to biological effects of mycobacterial lipids on host cells are poorly understood, growing evidence highlights their importance in pathogenicity (see Box 1). For instance, the delipidation of mycobacterial cells has been associated with both immune activation and suppression²⁵; from gene manipulation experiments, we know that the impairment of biosynthetic lipid pathways may lead to a tremendous decline in virulence of mycobacterial strains^{26,27}; regarding individual lipids, some of them have been recognized for activating innate immune mechanisms (through the involvement of pattern recognition receptors), and others are specifically recognized by T cells via the CD1 antigen presenting molecule.^{28,29} Altogether, these cumulative data have shaped mycobacterial lipids as central actors in TB disease.

From this knowledge, the applicability of lipids in tools against TB appears evident, especially for the development of diagnostics, vaccines or immune stimulators. Mycobacterial lipids have been described as among the most valuable reagents for TB immunodiagnosis.³⁰ They have also been proposed as valuable biomarkers of infection.³¹ Opportunities to obtain mycobacterial lipids either from alternative bacterial sources^{32–34} or through synthetic approaches^{35–37} have been described, and chemical probes for tagging mycobacterial lipids are available as well.³⁸ However, working with lipids has not been an easy task, especially at bench-to-bedside levels or large-scale applications. For many years, the biological studies of lipids have involved cumbersome procedures. In some studies, lipids were put in contact with cells in the form of films at the bottom of cell culture dishes.^{39,40} Other strategies had included the use of either detergent-containing media,⁴¹ or toxic solvents such as dimethylsulfoxide and ethanol.⁴² Now, with the advancement of nanotechnology, a myriad of possibilities has arisen for the design of lipid-displaying materials. In this review, pioneering

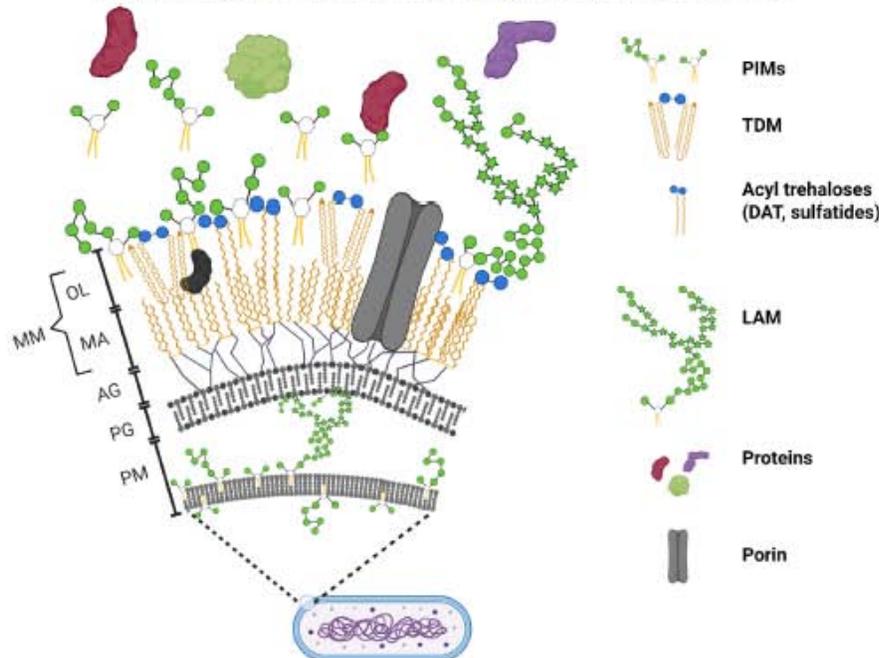


Fig. 1. A model of the cell-wall of *M. tuberculosis*. The multiple layers of mycobacterial cell walls include: the plasma membrane (PM), a polysaccharide network composed of peptidoglycan (PG) and arabinogalactan (AG), which are highly immunogenic structures. Very long fatty acyls, the mycolic acyls (MA) are covalently linked to AG. MA feature an extremely hydrophobic inner leaflet where a set of mycobacteria-specific, amphiphatic lipids are assembled non-covalently, forming an outer leaflet (OL). This atypical outer membrane is also known as mycomembrane (MM). Image created with Biorender.

works using nanotechnology to explore the biomedical applications of mycobacterial lipids will be overviewed. General advances in nanotechnology to fight against TB will be briefly presented, and the opportunities to exploit lipids will be discussed.

Nanotechnology, nanomedicine, and TB

Nanomedicine is the subcategory and application of nanotechnology to medicine, a field that represents one of the major interests in materials science. One of the main factors allowing these two disciplines to interact easily is the nanostructured nature of biology: every biomolecule (protein, lipid, sugar) or biological structure in the cell is at the nanometric scale.⁴³ Therefore, the potential to obtain synthetic structures at commensurable scales to those found in cells, and to engineer materials at the molecular level, constitutes a unique opportunity. Nanotechnology allows for the development of materials sized from 1 to 100 nm in size, with made-to-measure features: structures with very large surface-to-volume ratios, nanoporous carriers, or particles showing a highly controlled biodegradation; their physicochemical properties can be controlled by tailoring sizes, shapes, chemical composition, structure, morphology, and textural properties. For instance, nanoparticles used in nano-

medicine can be readily fabricated from either soft (organic and polymeric) or hard (inorganic) materials, and the interactions between such materials and cells can be controlled through functional chemistries (Fig. 2). Examples are the use of specific antibodies for targeting organs or tissues and the use of coatings that provide stealthiness vis-à-vis the reticuloendothelial system, both having clear applications in drug delivery.⁴⁴ Another application of nanotechnology enables the design of materials with electrochemical conductivity or with optical activity useful in the development of biosensors. Related to this, the combined search for DDS and optical activity within a unique nanomaterial is a promising strategy being explored for diagnostics, including that intended for simultaneous in-vivo sensing and therapy, an approach known as theragnostics.⁴⁵ Altogether, these possibilities have pushed nanomedicine as an emerging field in TB research, with expectations for improvements in drug-delivery, diagnosis, treatment, and monitoring of infection.^{46–49}

The past two decades have witnessed an increasing interest in the development of nanotech-based tools against TB, especially for drug delivery, biosensing and vaccine applications. Nanotech-devices for TB control can be categorized as follows:

- (1) Vaccine or vaccine subunits composed of powerful immune protective protein antigens,

Box 1

Top-ten facts about mycobacterial fats.

- *M. tuberculosis* genome encodes for 5-fold more lipid metabolism enzymes than *Escherichia coli*, and contains lipid metabolic pathways encountered in bacteria, mammals and plants.¹⁶
- *M. tuberculosis* produces the largest fatty acids known in nature (with lengths up to 90C atoms).^{18,20}
- Mutations in lipid synthases strongly decrease the virulence of *M. tuberculosis* strains.²⁶
- Differences of cell-surface lipid profiles in strains from distinct genomic backgrounds significantly influence *M. tuberculosis* pathogenicity.^{10,27}
- During infection, *M. tuberculosis* lipids with no covalent attachment to cell-wall polysaccharides are exported to human cell membranes of infected and bystander cells.²²
- During infection, the so-called free mycobacterial lipids interact with pattern-recognition receptors, allowing them to activate the innate immune response.²⁸
- Through still poorly understood mechanisms,²⁸ mycobacterial lipids induce the production of specific antibodies, useful as biomarkers in TB diagnosis.^{30,32,33,39,60}
- A set of amphipathic lipids from *M. tuberculosis* are recognized as specific T-cell antigens, through the involvement of essentially nonpolymorphic, non-canonical CD1 class of antigen presenting molecules.²³
- Mycobacterial fatty coats are the preferential target for anti-tuberculous drugs.⁶¹
- Most bioactive lipids of *M. tuberculosis* are not addressable in aqueous milieu for biological interactions to occur, but only through nanotechnology approaches.

- (2) Drug carriers intended to improve the pharmacological features of anti-TB treatments, as compared to traditional systems.
- (3) Biosensors based on proteins, peptides or nucleic acids known to bind human biomarkers, including molecular targets from *M. tuberculosis* or anti-*M. tuberculosis* antibodies.

Nanotechnology-based vaccines against TB

BCG, the only vaccine approved against TB was developed more than a century ago. However, the immune response to mycobacteria is not always associated with protection. No better options than BCG have been found, and a search for novel strategies is urgently needed. The use of nanotechnology in anti-TB vaccine development seems promising, as non-replicative and safe, though immunogenic formulations may be obtained by engineering materials composed of selected antigens, adjuvants and nanocarriers. Moreover, the possibilities to target specific cells, tissues and trafficking pathways through nanotechnology have been extended to non-protein biomolecules, such as sugars.⁵⁰ Vaccine developments have recently included only a handful of proteins; a 30–31 kDa protein (also known as Ag85A), the PPE44 antigen, a heat shock protein (HspX), and two secreted, short-length proteins known as Culture Filtrate Protein (CFP)-10 and ESAT-6.^{51–53} Interestingly, the unexpected success of nanotech-based vaccines developed against COVID-19 might represent a tour-de-force for the development of novel formulations against other important diseases, including TB. At present, a variety of vaccine strategies are under exploration, including carriers based on viral capsids or virus-like

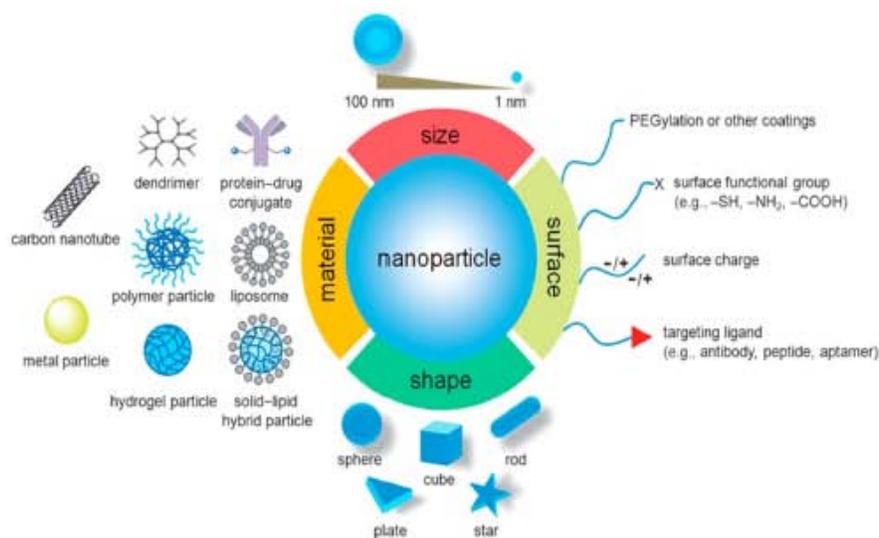


Fig. 2. Nanotechnology makes it possible to obtain structures with controlled physicochemical properties, including size, shape, charge, textural properties, or specific bioactivities. Figure reproduced with permission by.⁶²

particles (VLP), biomimetic nanoassemblies, and DNA or mRNA vaccines.^{51–55} Most of these non-living vaccine alternatives include adjuvant components, such as oligonucleotides, antimicrobial peptides, monophosphoryl lipid A (MPLA) or the mycobacterial incomplete Freund adjuvant (IFA).⁵⁶

Drug carriers for anti-TB treatments

With nanotechnology, the free form of a drug can be formulated into nano/microstructures leading to more efficient treatments than conventional pharmaceutical forms. Many types of nanostructures have been explored for antituberculous DDS, including liposomes, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, nano and microemulsions, as well as various kinds of nanoparticles for encapsulating first- or second-line antituberculosis drugs.^{46–49} Importantly, all these nanostructures may be modified on their surfaces in order to avoid side-effects or increase efficacy. Targeting agents such as DNA probes, proteins, peptides, saccharides, or lipids, as well as molecular mimics (aptamers or peptide mimotopes) have been used to improve pharmacokinetics. These decorations allow nanotech-based DDS to increase the uptake of drugs in the bloodstream, to overcome microbial resistance and to address drug treatments through different administration routes.^{63,64} Nanostructured lipid carriers were the firstly DDS approved and have been widely explored in treatments against TB. At present, other platforms are being extensively studied, including polymeric and protein nanoparticles, micelles and lipid complexes.⁶⁵ Some systems have been approved for clinical use in the treatment of other diseases, thus leading to their interest in the field of TB; this is the case of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) particles, which represent one of the most promising options for drug delivery and have even started undergoing clinical trials.⁶⁶ Another interesting construct was proposed by Trousil et al., where rifam-

picin, a first line anti-TB drug, was encapsulated in polymer nanoparticles that also contained a Förster resonance energy transfer (FRET) system to measure drug release in real time.⁶⁷ In conclusion, the availability of efficient DDS for TB treatment would be a breakthrough, given that the durations and schedules of conventional treatments (3–4 drugs must be given for a 6–9 month-period) frequently lead to poor patient compliance and adherence to treatments.⁶⁸

Biosensors for TB diagnosis

A very active area for the application of nanotechnology against TB is in the development of biosensors. Virtually all the protein antigens involved in vaccine development have also been explored as reagents for diagnostic purposes, along with some valuable diagnostic antigens, namely the Ag85B, the MPB83 antigen, and a lipoglycan molecule, the lipoarabinomannan.³⁰ Two major strategies for active TB diagnosis have been proposed (Fig. 3): (i) the detection of secreted mycobacterial components either in biological fluids (sputum, urine, saliva) or in exhaled breath particles, and (ii) the search for human biomarkers associated with the disease, which mainly include tuberculosis-associated antibodies.

The detection of molecules secreted by *M. tuberculosis* is promising, since an essential set of compounds is known to be secreted at the early stages of the disease. This is the case of the early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) and the 10 kDa culture filtrate protein (CFP10), which are highly specific antigens of *M. tuberculosis* with genes in loci that have been deleted from mycobacteria other than *M. tuberculosis*.¹¹ Not surprisingly, various efforts are being undertaken in the development of CFP10-ESAT6-detecting biosensors. Importantly, the same antigens are currently used to look for the presence of blood memory T-cells in the diagnosis of latent TB (a method usually

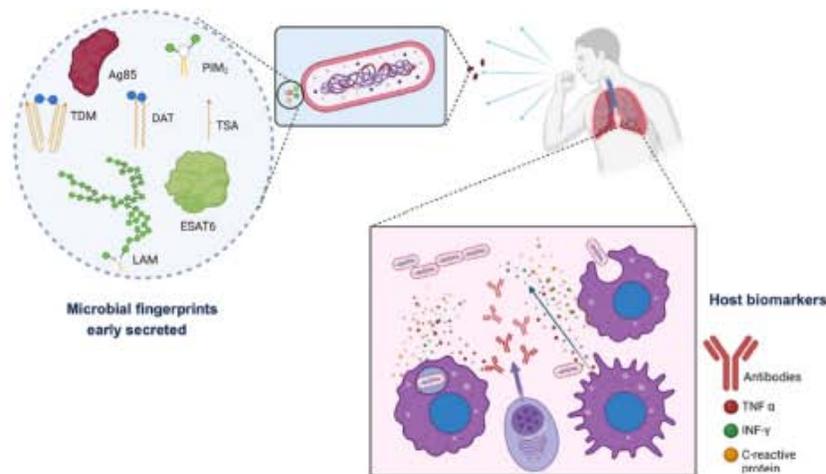


Fig. 3. Biosensors to diagnose active TB cases are based on the identification of either molecular fingerprints secreted early on by the pathogen (proteins, lipids), or biomarkers secreted by host cells during an active infection, such as inflammation-associated mediators or antibodies. Figure created with Biorender.

performed through conventional cell assays).¹¹ As mentioned in the following section, alternative molecular signatures secreted by *M. tuberculosis* at early stages of infections are the cell-surface free lipids, though only one of them, the liparabinomannan, has been thoroughly explored and used in commercially available tests.⁶⁹ Most sensors that detect mycobacterial molecules are based on the detection of antigen-antibody reactions, i.e. they use specific antibodies for capturing the target molecule. Nanotechnology has allowed the development of very interesting methods to evidence antigen-antibody reactions. Applied to TB diagnosis, transduction strategies include naked-eye detection through nanogold-based lateral immunochromatography,⁶⁹ optical immunosensors fabricated on liquid crystals or plasmonic surfaces,^{70–72} and a set of electrochemical immunosensors, which have been based on amperometric, impedimetric, potentiometric and conductometric measurements, sometimes fabricated on innovative substrates.^{73–77} For their part, DNA-based tests are expensive and less likely to be suitable in point-of-care settings; regardless, the use of whole genome sequencing has led to the identification of regions associated with resistance to multiple drugs in *M. tuberculosis* clinical isolates, including single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions and deletions.⁷⁸ Recent studies have proposed a targeted sequencing approach for the identification of such mutations, which has been successfully achieved in sputum samples.^{79,80} Therefore, the development of nanotechnology-based sequencing methods to address this approach constitutes a worthy challenge.

On the other hand, the detection of biomarkers secreted by host cells is an attractive strategy, especially for point-of-care settings where biosafety facilities are absent and bacterial-containing samples would pose a risk. Because the spreading and most common presentation of active TB is a chronic pulmonary disorder associated to inflammation, various proinflammatory markers have been explored as a signature of the disease. According to original and systematic analyses, good diagnostic performances are achieved only with multiple markers,^{81–83} which have been detected through proteomic technologies.⁸¹ The development of rapid tests based on these markers seems very attractive; however, because other inflammatory diseases give rise to increased levels of inflammatory molecules as well, the specificity of the tests can be compromised. Incidentally, two recent studies have shown that the diversity of gut microbiota is clearly altered during pulmonary TB,⁸⁴ leading to discriminatory metabolic profiles in faecal samples between healthy and infected individuals.^{84,85} Although more research is needed to identify the metabolites with the highest prognostic value, the diagnostic/monitoring potential is relevant, especially for smear- and culture-negative patients.

Among the many molecular interactions known in biology, antigen recognition by antibodies represents one of the most specific. During active TB, the constant release of *M. tuberculosis* antigens gives rise to antibody responses of little value for fighting the disease, though they present a great opportunity for diagnostics. Antibody responses against the bacilli are known to be a hallmark of TB disease, and there have been antibody signatures specifically associated with active TB infection.^{30,32,33,59,60,81} As for some other diseases, gold-based

lateral flow immunochromatography has been a common point-of-care platform in the search for serum antibodies. The naked-eye test is based on the use of colloidal (colored) gold for tagging the total antibodies of a human sample, and the immobilization of control and test antibodies onto functional lines of lateral flow chromatography (Fig. 3). The technique is rapid and simple, and has been used in the development of commercial serological tests for the diagnosis of TB.⁸⁶ Unfortunately, the early spread of such tests without international guidelines led to terrible misdiagnosis problems. The tests were unable to consistently achieve enough sensitivity or specificity, and a policy statement published by the WHO encouraged further research to identify new alternatives for serological tests before they can be recommended.⁸⁶ At present, antibody signatures against some selected antigens appear among the best biomarkers to achieve the sensitivity and specificity combination accepted by the WHO for a point-of-care diagnostic test.⁸¹ However, important issues remain to be addressed. Some of the best protein antigens for inducing antibodies are those known to evoke strong protective responses. This is the case, for instance, with the CFP10 and the ESAT-6 (as pointed out above). Thus, the search of antibodies against potential components of future vaccines restrains the development of new diagnostics based on these markers. The heterogeneity of antibody responses to proteins in human populations represents another problem: it is known that the high polymorphic nature of antigen-presenting molecules (the MHC molecules) leads to very different anti-protein antibody responses,^{87–89} hampering the selection of signatures for new tests. Finally, although the use of nanotechnology could significantly improve the sensitivity of serological tests, until now only a few attempts have addressed the development of novel platforms in the search for tuberculosis-associated antibodies.

Monitoring of TB treatment outcome

Most of the technologies mentioned above have also been explored to monitor the outcomes of TB drug treatments,⁹⁰ with one of the top interests being the prevention of contact exposure to highly infectious aerosols from active TB. At present, nanotechnology strategies are emerging to allow the implementation of friendly techniques for TB monitoring. One of the most promising approaches is the use of nanodevices to concentrate biomarkers without requiring special equipment. A great example is the use of copper & polymer nanocages that selectively harvest biomarkers before the application of conventional immunoassays.⁹¹ Additional studies are still needed to specify a molecular fingerprint of TB treatment success,⁹⁰ but lipids will probably be part of the basis of such a predictive signature.

Current advances in nanomedicine to exploit mycobacterial lipids

As described in the last section, the possibilities offered by nanotechnology for fighting TB are expanding rapidly. However, most of the explored approaches were based on molecular hydrosoluble components of the bacilli, while the outstanding variety and originality of lipids has been largely neglected. Mycobacterial lipids have qualities that allow them to be useful

in different products, as they constitute important drug targets, highly specific markers of disease and well-described modulators of innate immunity, or highly specific antigens. Moreover, the exploitation of lipids as modulators of the immune response may lead to developments against additional infectious or chronic diseases, well beyond the field of TB research. During the past decades, the use of polar compounds easily managed in aqueous solutions has dominated in biomedical research. Now, the advances in nanotechnology allow for controlled design of non-hydro-soluble materials. In the following sections, we overview the strategies used to exploit *M. tuberculosis* lipids in distinct applications. We present different sections about pioneering works to exploit lipids through nanotechnology, according to the type of application intended. Then we discuss trending nanotechnology approaches that should open the gates to combating TB in the future.

Lipids for vaccines and immunotherapies – modulators of the immune response

The capacity for mycobacteria to activate the immune response has been recognized since the discovery of the bacillus. Preparations from killed bacteria and cell-wall mycobacteria are commonly used as adjuvants in research and animal immunizations,⁵⁶ i.e. as boosters of vaccine immunogenicity. The chemical structure of mycobacterial cell-wall components is particularly original, sometimes with poor likelihood of enzymatic degradation by human cells. They have, for instance, arabinosyl and galactosyl residues of 5- instead of 6-member rings (as is common in mammalian cells), lipopeptides with D-aminoacids, unique sugar moieties, and very atypical fatty acyl tails.^{17,93} Including these molecular features, various amphipathic, free lipids have been identified as ligands of innate immune receptors linked to proinflammatory signaling pathways, such as the Toll-like receptor (TLR)-2, Dectin-2, the DC-SIGN family of receptors and the Mannose Receptor (MR). *M. tuberculosis* lipids identified as ligands of these mannose-recognizing receptors are the lipoarabinomannan (LAM), the lipomannan (LM) and the phosphatidyl-inositolmannosides (PIMs), all located in the *M. tuberculosis* cell-wall and known to be trafficked into phagocytic and toward bystander cell-membranes.^{2,2,94} Other lipids, namely a dimycoloyl trehalose (DMT) and some simpler synthetic analogs, are known to bind the C-type lectin receptor Mincle, another proinflammatory receptor of innate immunity.^{95,96} On the contrary, some other amphipathic lipids from *M. tuberculosis* (or structural variants of those known as immune activators) are known to downmodulate immune response mechanisms such as T-cell proliferation, the release of proinflammatory cytokines, the expression of cellular receptors, or the phagosomal maturation pathway.^{39,94,97–99} These molecules are therefore thought to act as virulence factors during *M. tuberculosis* infections, and they offer applications for therapeutics/vaccine interventions, either to increase or downmodulate the immune response. In contrast to heavily proinflammatory bioactive lipids, such as the lipopolysaccharides from *E. coli*,¹⁰⁰ mycobacterial proinflammatory lipids are part of therapeutic preparations currently in use, including the BCG vaccine, which is widely used to vaccinate newborns and as

immunotherapy against bladder cancer.¹⁰¹ While the macromolecular lipoglycans, LAM and LM, are easily manipulated in water, special methodologies are needed to use the more hydrophobic molecules in biological systems.

At present, some studies have been done to exploit mycobacterial lipid immunomodulators through nanotechnology. Using purified lipids, our group proposed a biomimetic vaccine carrier composed of a PIM-decorated silica-based mesoporous structure.¹⁰² In this work, PIMs were extracted from *M. tuberculosis* H37Rv type strain and purified to formulate large unilamellar liposomes along with phosphatidylcholine. Then, colloidal PIM-displaying silica was prepared by the vesicle fusion method (Fig. 5). The resulting particles were found to interact readily with antigen-presenting cells (THP1-derived macrophages). Both TLR-2 involvement and a rapid particle internalization process were promoted with this colloidal preparation, showing its potential as a subunit vaccine carrier.

Lipids and vaccines – antigens that specifically activate the cellular immune response

Contrary to what was thought for many decades, the variety of antigens recognized by T-cells to specifically activate the immune response importantly includes non-protein microbial molecules, namely amphipathic lipids.¹⁰³ The recognition of these nonprotein antigens is mediated by CD1, a noncanonical antigen-presenting molecule, and is involved in the response against a set of microbial pathogens. In *M. tuberculosis*, the lipids identified as CD1-restricted T-cell antigens are mycolic acids (MA), glucose- and glycerol-monomycolates (GMM, GroMM), LAM, PIMs, diacyltrehalose (DAT) and mannosyl-phosphomycoketide (MPM),^{56,37,95,103} with fine specificities for precise structures of the lipid tails.^{36,104–106} We know now that lipid-specific T-cells are activated and proliferate upon *M. tuberculosis* infection, or after BCG vaccination, suggesting the usefulness of mycobacterial lipids as vaccine subunits, along with the possibility of monitoring latent TB through the detection of memory T cell responses to particular lipids.^{107–109} In view of this, various nanotechnology approaches are being explored to develop preparations for properly displayed lipids. Shang et al. prepared micellar nanocarriers comprised of polyethyleneglycol-polypropylene sulfide copolymers to deliver the highly hydrophobic lipid antigens MAs.¹¹⁰ A potent T cell response to the lipid was found using this approach, although a mixture with hydrophilic antigens could not be achieved. The design of mycobacterial lipid-displaying liposomes has been one of the most explored and promising strategies, especially since the description of synthetic approaches to obtain mycobacterial lipid analogs. Liposomes composed of various antigenic mycobacterial lipids, also known as mycosomes, have been widely explored. Mycosomes have included sulfatides, PIMs and MA synthetic analogs, sometimes in combination with protein antigens.^{111–115}

All the studies using mycosomes have led to strong immune responses due to the lipid components, either *in vitro*¹¹³ or *in vivo*,^{111,116,117} Liposomes decorated with dendritic cell-targeting molecules have been reported as well.¹¹⁸ Moreover, the use of mycobacterial lipids has been shown to induce a stronger immune response than that achieved with currently used

adjuvants, such as monophosphoryl lipid A (MPLA) or alumina.¹¹⁶ With another approach, Das et al. prepared *M. tuberculosis* lipid-loaded chitosan nanoparticles, where isolated lipids were physisorbed to the polysaccharide matrix, to obtain highly immunogenic constructs.¹¹⁹ Finally, a combination of mycobacterial lipid-containing liposomes with inorganic nanostructured carriers has been proposed by our group. The resulting hybrid material has interesting advantages, namely increased stability of the lipid-displaying assemblies, as compared to liposomes, and the ease of cargo encapsulation through a simple adsorption process.¹⁰²

TB diagnosis – lipids as markers of disease

As mentioned above, *M. tuberculosis* lipids have unique structural features which may lead to the unequivocal detection of the bacilli in human samples (Fig. 4). Lipids are known to be secreted by infected cells,²² and recent reports have highlighted the interest in detecting MA, tuberculostearic acid (TSA) and a phosphatidylinositol as biomarkers of *M. tuberculosis* infection.^{120–124} The identification of these lipids can be performed rapidly in blood, sputum or exhaled breath aerosols; however, their analyses require sophisticated equipment, such as mass spectrometers, as well as highly trained personnel. Current technologies are not suitable in the search for hydrophobic molecules, which are commonly released within lipid micro- and nanovesicles. That is why only LAM, a hydrosoluble lipoglycan, has been used as a biomarker of TB disease in rapid tests. During an infection, LAM is released in urine, thus serving as an efficient marker for urinary LAM-based tests.¹²⁵ Commercial point-of-care tests, based on lateral flow assays are available from Abbott Diagnostics (Lake Bluff, USA), the AlereLAM test, and from Fujifilm (Tokyo, Japan), the “FujiLAM”. These tests use one or two drops of urine on a strip, and polyclonal or monoclonal antibodies tagged with nanogold to allow naked-eye detection (Fig. 6). Until now, the search for LAM in urine samples has been the only method recommended by the WHO for TB diagnosis, specifically in HIV-positive patients. Meta-analyses involving the urine AlereLAM test have shown specificities up to 98 %, but poor sensitivities (<50 %).¹²⁵ Therefore the development of improved LAM-based tests is underway, with the “FujiLAM” as the first, advanced, next-generation LAM test. “FujiLAM” is based on the combination of two high-affinity

antibodies, along with a silver-based amplification step, which significantly increases test sensitivity (Fig. 6).¹²⁶ One of the main approaches for improving the LAM-based test in urine is identifying determinants of LAM immunogenicity. Because sugar heterogeneity is common throughout *M. tuberculosis* genotypes, the search of key glycan epitopes and high-affinity antibodies is currently an objective.¹²⁷

Using a distinct approach, Hiatt & Cliffel developed a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor, where anti-LAM rabbit antibodies were immobilized to capture the lipoglycan antigen, and mass changes were detected through the oscillation of the piezoelectric material. Preliminary binding studies showed that using this method, LAM can be detected in <20 min.⁷¹ For their part, Crawford et al. developed a sandwich immunoassay by immobilizing monoclonal antibodies against mannose-capped LAM on a glass-supported 200 nm-thick gold layer. Then, the capture lipoglycan was detected through surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)-active nanoparticles via a second antibody (Fig. 7). The method showed promising results in a small collection of sera from TB-positive and healthy individuals.¹²⁸

Recently, a novel interferometry platform was developed to detect LAM in undiluted urine. The specific capture of LAM is carried out by using a monoclonal antibody and a Mach Zehnder interferometer chip, integrated within a microfluidic chamber, is used to detect the macromolecular binding. By optimizing several parameters, this system reached a limit of detection in the range of picograms (475 pg/mL), encouraging its further exploration as a point-of-care system.¹²⁹ Finally, a strategy for enhancing the sensitivity of LAM detection was proposed through a copper complex dye within a hydrogel nanocage, able to sequester the lipoglycan with a very high affinity, allowing its further characterization through an immunoassay. The technology was able to detect LAM in urinary samples from HIV negative individuals with active TB.¹³⁰

The interest in LAM as a useful biomarker of active TB has promoted the development of interesting techniques for harvesting the glycan biomarker to obtain highly concentrated samples: using a copper complex dye within polymeric nanocages, Paris et al. developed a bait-chemistry technique to harvest LAM from urine samples, leading to highly sensitive detection, which has been applied to other mycobacterial and host disease biomarkers.¹³⁰ For their part, Zheng et al. identified

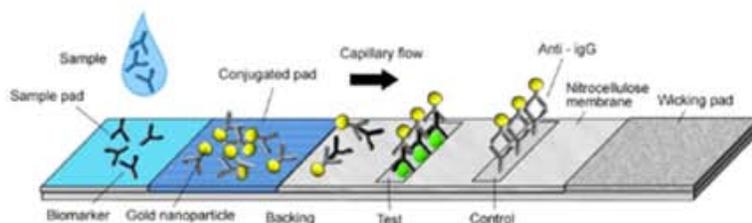


Fig. 4. The lateral flow immunochromatography test for the detection of tuberculosis-associated antibodies. In this test, antibody-containing samples are placed on a nitrocellulose strip, where the antibodies are labelled with gold nanoparticles. After labelling, the colored molecules follow a capillary-induced flow through the pad, where functional lines will immobilize biomarker and/or control antibodies, allowing a result visible to the naked-eye. Figure reproduced with permission by.⁹²

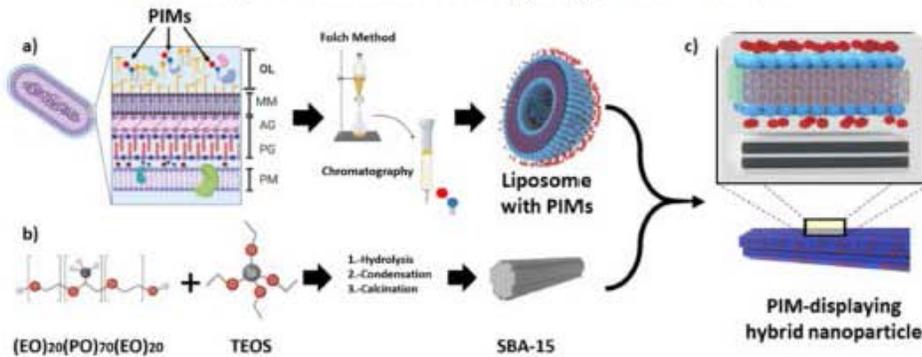


Fig. 5. *M. tuberculosis* phosphatidylinositol mannosides (PIMs), activators of innate immunity, were displayed in lipid bilayers to decorate mesoporous SBA-15 silica, to obtain biocompatible particles with adjuvant activity for vaccine purposes. Figure reproduced with permission from.¹⁰²

the presence of LAM in the surface of extracellular vesicles (EVs) released from bacteria during active TB, then used conventional EV-recovery techniques to obtain concentrated samples where conventional assays were performed with great sensitivity results.¹³¹

In addition to the developments described for detecting LAM, some other studies have addressed optical detection methods for MA, the long-chain specific carboxylic acids of mycobacteria, with highly atypical chemical structures.

Interestingly, MA has been shown to give specific Raman signals when using surface enhanced Raman spectroscopy methods. Mühlgr et al.¹³² demonstrated that silver nanoparticle-mediated SERS analysis of whole bacteria gives rise to specific Raman signals of MA bearing different functional groups. Furthermore, the authors proposed a closed system for easily disrupting mycobacterial cells, followed by an optical analysis within a lab-on-a-chip device (Fig. 8). Using isolated bacteria to obtain lipid samples, the identification of MA using silver nanoparticle-mediated SERS has been confirmed by Perumal and coworkers.¹³³ Nonetheless, these SERS-

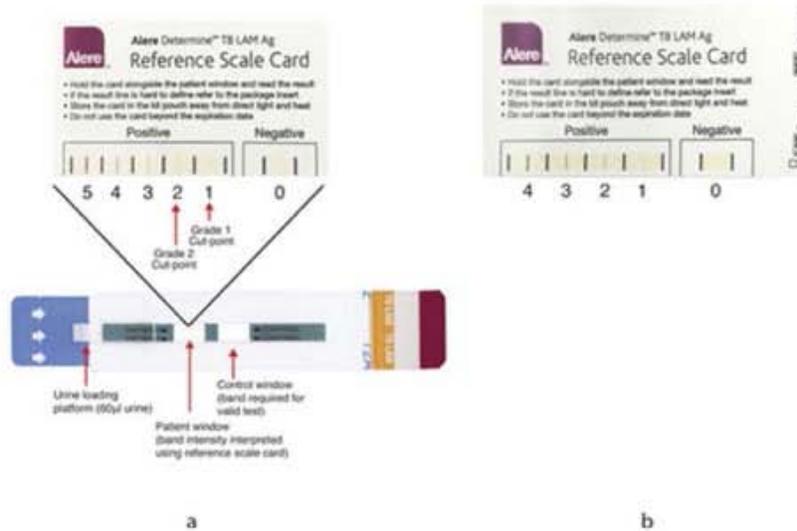


Fig. 6. (a) Pre-January 2014 LAM strip test manufacturer's reference card illustrating visual intensity grades 0-5; (b) January 2014 new LAM strip test manufacturer's reference card illustrating visual intensity grades 0-4. In this reference card, the first positive band corresponds to the grade-2 intensity band in the old, pre-January 2014 reference card. Permission granted by Abbot Corporation to publish this figure.

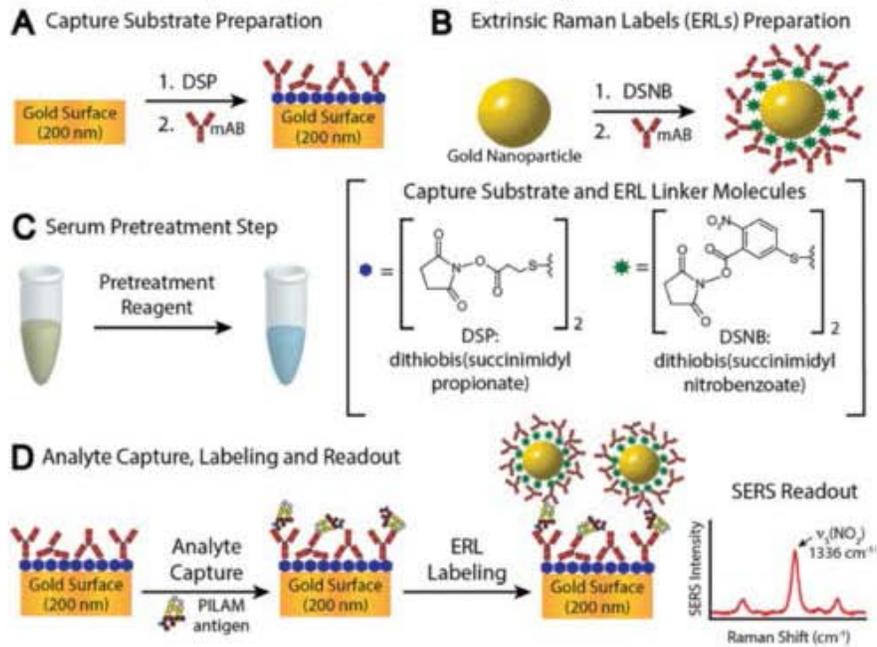


Fig. 7. Detection of LAM through a SERS-double sandwich immunoassay. LAM is captured on an antibody-functionalized gold surface (A). Then, SERS-active gold nanoparticles (B, C) are bound to LAM through a second anti-LAM antibody to promote the generation of LAM-specific Raman shifts (D). Figure reproduced with permission by.¹²⁰

related techniques have not been validated in clinical specimens yet, where the number of bacterial cells and complexity of the samples may be restrictive.

TB diagnosis – the search for TB-associated antibody responses against lipids

The identification of antibodies in blood or serum from individuals with active TB stands out as one of the most suitable diagnostic techniques for point-of-care settings. Antibody

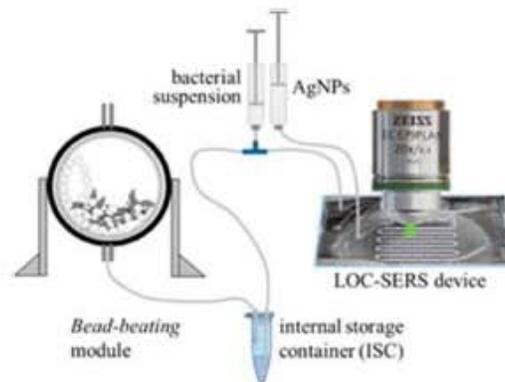


Fig. 8. A promising closed system for the identification of mycobacterial MAs has been developed through the combination of a module to disrupt bacterial cells with a lap-on-a-chip (LOC)-SERS device. Figure reproduced with permission by.¹²²

detection may be adapted to a variety of nanotechnologies, through different transduction biosensing methods, such as electrochemistry, a variety of optical techniques (visible and Raman spectroscopies, interferometry) and microbalances. Methods can be easily adapted to measure antibody classes found in distinct samples, such as serum or saliva. However, diagnostic approaches using antibodies as biomarkers have failed so far to fit the requirements for sensitivity and specificity needed to replace the traditional microscopy observation of stained smears.⁸¹ In our opinion, two main issues are responsible for such demotivating results: (a) the antigens used as immunoreagents for antibody tests are either nonspecific or insufficient to provide sensitivity by themselves, and (b) there is still a scarcity of technologies for exploiting the variety of non-protein mycobacterial antigens to which antibody responses are known to appear. Most serological studies have pointed to the convenience of using multiple antigen cocktails, instead of individual reagents. Anti-protein antibodies are extremely variable between individuals, in part due to the polymorphism of the antigen-presenting molecules involved in their production.⁸⁷ In contrast to these facts, antibody response to non-protein lipid antigens relies on processes that are non-significantly polymorphic across human populations,²⁸ and antibody responses during TB are stronger against lipids than proteins.¹³⁴ In spite of this, the use of nanotechnology to exploit the large variety of lipid antigens from the tubercle bacillus has been poor. Although glycolipids have been identified among the best reagents to capture antibodies associated to active TB,^{30,32,33,59,60} there is a lack of methods aimed at exploiting the non hydro-soluble reagents. Regarding this, the following section briefly describes a set of emerging nanotechnologies through which lipids can be assessed for the development of TB control tools.

Emerging nanotechnologies – an opportunity to exploit M. tuberculosis lipids

The classical definition of lipid was “Hydrophobic compounds, which are soluble in organic solvents as chloroform, ethers or alcohols”. At present, although lipids are defined according to their biosynthetic and functional issues,¹³⁵ most of them are indeed hydrophobic. While this feature represents the basis of cell individuality and compartmentalization (with lipid membranes as our structural divisions), dealing with lipids in the laboratory has not been easy, as common methodologies for cell biology and biochemistry studies occur in aqueous environments. With advances in nanotechnology, the possibility of obtaining synthetic materials or self-assembled arrays to produce well controlled nanostructures is greatly enhancing the potential to exploit lipids. Pioneering works with mycobacterial lipid-containing liposomes have resulted in powerful immunogenic structures, also known as mycosomes.^{112–117,119} A set of advances in biophysics and nanotechnology are opening up novel possibilities for the study of lipid-protein interactions. One example is the use of bicelle systems i.e., lipid bilayer-containing disc-like particles produced in the presence of detergents.¹³⁶ Bicelle structures are useful for nuclear magnetic resonance (NMR) studies and were useful in studying the location of proteins in the bilayer and the effect of different lipids on enzyme

binding in *Escherichia coli* membranes.¹³⁷ A recent work by Patrick et al. demonstrated the great potential of novel bicelle structures in the study of protein-lipid interactions in mycobacterial mimetic membranes.¹³⁸ Supported lipid bilayers (SLBs) constitute another promising approach to the display of lipids in either fundamental studies or technological applications, such as diagnostics or targeted therapies.^{139,140} Recent advances have led to friendly and scalable procedures for obtaining SLBs with different lipid compositions and a wide variety of solid surfaces, including porous, conducting or optical active materials.^{140–142} Using this approach, our group developed PIM-containing mycosomes on the surface of SBA15-type mesoporous silica, a biocompatible material, to generate a stable lipid-displaying construct with high loading capabilities, leading to specific interactions with cells from the innate immune system.¹⁰² In recent years, the use of SLBs had been extended to biogenic extracellular vesicles (EVs) i.e., nanosized lipid vesicles that, secreted by cells, better represent the complexity of natural membranes.¹⁴³ This approach has facilitated the development of natural vesicle-supported lipid bilayers, where the study of lipid interfaces seems promising, and interesting technological applications of mycobacterial EVs¹⁴⁴ may be readily exploited.

Finally, the exploration of specific materials for the simple immobilization of mycobacterial lipids (through physisorption or chemisorption) is worthy of mention. Cano-Velázquez et al. proposed a method to monitor anti-mycobacterial antibodies with drop-casted antigenic lipids on polydimethylsulfide (PDMS), a hydrophobic transparent polymer commonly used in miniaturizable devices, along with interferometric measurements.¹⁴⁵ For their part, Das et al. demonstrated the successful immobilization of *M. tuberculosis* lipids on chitosan nanoparticles, allowing the production of a powerful immunogenic material for vaccine applications.¹¹⁹

Conclusions

Current knowledge about the biology of *M. tuberculosis* has pointed to lipids as the key molecular features of the microbe. Outstandingly abundant and structurally unique, lipid-containing compounds of *M. tuberculosis* are involved in cell recognition, activation or suppression at various steps of the immune response and antigenicity. Biogenic or synthetic lipid analogs have a great potential in the development of tools against TB. Nonetheless, if the search for tools against TB has been neglected for decades (with a >100-year-old vaccine, an increasing number of multidrug resistant strains, and no friendly diagnostic tests for the most affected populations), the study of lipids is in an even worse situation. Working with hydrophobic, bioactive molecules has been associated with cumbersome steps and techniques which are not easily implemented at the large scale. In contrast, nanotechnology provides a variety of strategies allowing for easy management of lipids: from the production of colloidal structures, where lipids can be displayed and managed in aqueous milieus, to the design of hybrid particles where lipid bioactivities may determine the fate of nanoconstructs intended for biological systems. Molecular engineering, as achieved through bottom-up nanotechnology, may therefore represent a solution to finally

making use of lipids, the most neglected useful markers of the tubercle bacillus.

Financial support

The authors thank the financial support from CONACyT (Mexico) through Grant CF2019-53395, and from DGAPA (UNAM) through Grants IT200421 (PAPIIT) & PE201622 (PAPIME).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

CMVA was a CONACyT fellow (CVU 665176) at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Kendra Lyons revised the manuscript.

References

- Geneva: World Health Organization, Global tuberculosis report 2022. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> (accessed December 15, 2022).
- Pai M, Kasaeva T, Swaminathan S. COVID-19's devastating effect on tuberculosis care — a path to recovery. *N Engl J Med* 2022;386:1490-3. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2118145>.
- Mir MA, Mir B, Kumawat M, Alkhanani M, Jan U. Manipulation and exploitation of host immune system by pathogenic Mycobacterium tuberculosis for its advantage. *Future Microbiol* 2022;17:1171-98. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0026>.
- Osei-Wusu S, Ocheje ID, Asare P, Ntsumi F, Zamba A, Asante-Poku A, et al. Relevance of genomic diversity of mycobacterium tuberculosis complex in Africa. *Int J Infect Dis* 2022;124:S47-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.03.016>.
- Sun L, Chen Y, Yi P, Yang L, Yan Y, Zhang K, et al. Serological detection of mycobacterium tuberculosis complex infection in multiple hosts by one universal ELISA. *PLoS ONE* 2021;16:e0257920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257920>.
- Zhang W, Zhang Y, Zheng H, Pan Y, Liu H, Du P, et al. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS ONE* 2013;8:e71243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071243>.
- Nieuwenhuizen NE, Kaufmann SHE. Next-generation vaccines based on Bacille Calmette-Guérin. *Front Immunol* 2018;9:121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00121>.
- Martin C, Marinova D, Aguiló N, Gonzalo-Asensio J. MTB VAC, a live TB vaccine poised to initiate efficacy trials 100 years after BCG. *Vaccine* 2021;39:7277-85. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.049>.
- Ansari MA, Zubair S, Mahmood A, Gupta P, Khan AA, Gupta UD, et al. RD antigen based nanovaccine imparts long term protection by inducing memory response against experimental murine tuberculosis. *PLoS ONE* 2011;6:e22889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022889>.
- Shah HD, Nuzli Khatib M, Syed ZQ, Guidhane AM, Yasobant S, Narkhede K, et al. Gaps and interventions across the diagnostic care Cascade of TB patients at the level of patient, community and health system: a qualitative review of the literature. *Trop Med* 2022;7:136. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7070136>.
- Arlehamm CSLindstrom, Sidney J, Henderson R, Greenbaum JA, James EA, Moutafsi M, et al. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (EsxJ). *J Immunol* 2012;188:5020-31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103556> n/a-n/a.
- Xu K, Liang ZC, Ding X, Hu H, Liu S, Narmik M, et al. Nanomaterials in the prevention, diagnosis, and treatment of Mycobacterium tuberculosis infections. *Adv Healthc Mater* 2018;7:1700509. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700509>.
- Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:537-44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2165>.
- Lee OY-C, Wu HHT, Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Bull ID, et al. Mycobacterium tuberculosis complex lipid virulence factors preserved in the 17,000-year-old skeleton of an extinct bison, *Bison antiquus*. *PLoS ONE* 2012;7:e41923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041923>.
- Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg* 2017;58:E9-E12.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44. <https://doi.org/10.1038/51159>.
- Lopez-Marin LM. Nonprotein structures from mycobacteria: emerging actors for tuberculosis control. *Clin Dev Immunol* 2012;2012. <https://doi.org/10.1155/2012/917860>.
- Daffé M, Marrakchi H. Unraveling the structure of the mycobacterial envelope. *Microbiol Spectr* 2019;7:7.4.1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>.
- Vikhèze C, Kremer L. Acid-fast positive and acid-fast negative Mycobacterium tuberculosis: the Koch paradox. *Microbiol Spectr* 2015;5:1-14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTT2-0003-2015>.
- Batt SM, Minnikin DE, Beara GS. The thick waxy coat of mycobacteria, a protective layer against antibiotics and the host's immune system. *Biochem J* 2020;477:1983-2006. <https://doi.org/10.1042/BJC20200194>.
- Axelsson M, Gentili F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS ONE* 2014;9:e89643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089643>.
- Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Rawell DG. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages: trafficking of mycobacterial lipids. *Traffic* 2000;1:235-47. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010306.x>.
- Donoghue H, Taylor G, Stewart G, Lee O, Wu H, Beara G, et al. Positive diagnosis of ancient leprosy and tuberculosis using ancient DNA and lipid biomarkers. *Diversity* 2017;9:46. <https://doi.org/10.3390/d9040046>.
- Dalberger CL, Rubin EJ, Boute CC. The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nat Rev Microbiol* 2020;18:47-59. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>.
- Moura ACN, Leonardo PS, Henriques MGMO, Cordeiro RSB. Opposite effects of *M. leprae* or *M. bovis* BCG delipidation on cellular accumulation into mouse pleural cavity. Distinct accomplishment of mycobacterial lipids in vivo. *Inflamm Res* 1999;48:308-13. <https://doi.org/10.1007/s000110050465>.
- Brosch R, Martin C, Gonzalo-Asensio J. Evolutionary landscape of the Mycobacterium tuberculosis complex from the viewpoint of phoPR: implications for virulence regulation and application to vaccine development. *MBio* 2015;6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01289-15>.
- Liu J, Nikiado H. A mutant of Mycobacterium smegmatis defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4011-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4011>.
- Joesten SA, Ottenhoff THM, Lewinsohn DM, Hoff DF, Moody DB, Seshadri C. Harnessing donor unrestricted T-cells for new vaccines against tuberculosis. *Vaccine* 2019;37:3022-30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.050>.