



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**BIODISTRIBUCIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN CON ACTIVIDAD  
INMUNOESTIMULANTE POR LA VÍA MUCOSA EN RATONES BALB/C**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. NATHALY VASQUEZ MARTÍNEZ

ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DRA. GOHAR GEVORGYAN  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN  
[Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada](#)

Ciudad de México. Agosto, 2017- mayo 2023

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada en el **Instituto de Investigaciones Biomédicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, bajo la tutoría de la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja**.

El Comité Tutor que asesoró y supervisó el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por las doctoras **Luz María López Marín** del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM y **Gohar Gevorgyan** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

El jurado de examen de grado asignado para la aprobación de esta tesis estuvo conformado por:

**Dr. Armando Hernández García.** Instituto de Química. UNAM

**Dr. Rogelio Hernández Pando.** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.** Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

**Dr. Karen Manoutcharian.** Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera.** Instituto de Biotecnología, UNAM

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) (CVU. 707771) para realizar el doctorado en el Programa de **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas** de la Facultad de Química de la UNAM.

La autora recibió apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para participación en congresos.

Los proyectos de los Programas de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/DGAPA/UNAM) (número IN216419 e IN216722) y Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) y el CONAHCYT (proyecto A1-S-9849) financiaron este proyecto y apoyaron la conclusión de las actividades del proyecto con las becas para obtención de grado a la autora.

**Mis más sinceros agradecimientos**

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Realizar esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración y acompañamiento de múltiples personas e instituciones que facilitaron el proceso. Por tanto, me gustaría aprovechar este espacio para mostrar mi inmensa gratitud.

Este viaje comenzó con la afirmativa respuesta a mi correo de la Dra. Romina Rodríguez a la solicitud para un lugar en la maestría. Ese día encontré a la tutora más solidaria que podría haber pedido. Estoy muy agradecida por su amabilidad, confianza, orientación, innumerables asesorías y consejos. Su disposición a ofrecerme su tiempo e intelecto, a escuchar mis problemas personales y académicos, son una de las razones por la que se completaron las publicaciones y la tesis. Muchas gracias Doc.

Agradezco a mi comité tutor, las doctoras Luz María López y Gohar Gevorgyan por enriquecer con sus recomendaciones y discusión crítica este proyecto. Igualmente, agradezco a los miembros del jurado de examen; sus preguntas, comentarios y correcciones fueron de gran valor para mejorar esta tesis.

Extiendo mis agradecimientos a aquellos que ayudaron de diferentes formas a los experimentos que de otro modo no hubieran sido posibles. A los doctores Eduardo San Martín y Rocío Casañas del CICATA Unidad Legaria-IPN, por la colaboración que inició con los estudios de trazabilidad en el IVIS. Al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina-UNAM, por el préstamo y la asistencia técnica en el uso del espectrofluorómetro. Al Dr. Miguel Ángel Morales y su grupo, por las facilidades brindadas para usar sus instalaciones y equipos durante tanto tiempo. A la Dra. Sandra Luz Hernández del IIB-UNAM por permitirme usar el lector de fluorescencia y sacarme de apuros en medio de las correcciones del artículo.

Expreso mi más profunda gratitud al señor Pedro Medina, quien a pesar de su apretada agenda siempre tuvo un espacio para compartirme su valiosa experiencia. La continua y amable enseñanza de las diversas técnicas para el manejo y disección animal aseguraron el buen progreso de este proyecto. Su entusiasmo con los hallazgos de este trabajo y su gran compromiso desinteresado fueron motivacionales.

Agradezco también al Dr. Miguel Tapia de la Unidad de Microscopia del IIB. Su amable asistencia técnica, la capacitación y supervisión con los microscopios, su orientación y consejo son muy valorados y apreciados.

Agradezco a la Unidad de Modelos Biológicos del IIB-UNAM, a la MZV Rubí Elizabeth Zabala y demás miembros de la Unidad, quienes procuraron todo el tiempo que los animales estuvieran en las mejores condiciones para los experimentos.



Debo mi especial agradecimiento a cada uno de los amigos y compañeros del laboratorio C-034 del IIB. Gracias por su compañerismo más allá de la academia. Entre las comidas, los festejos, las salidas, el compartir sobre el microondas, las discusiones serias y también las extravagantes, los tips de cine, hicieron de mi estancia en México una experiencia memorable. Agradezco al Dr. Daniel Guillén por la capacitación en los diferentes equipos del laboratorio, la paciente asistencia técnica y la disposición a resolver cada una de mis dudas. Gracias también a la Dra. Silvia Andrea Moreno, siempre presta a enriquecer con sus sugerencias e ideas este proyecto, además de brindarme motivación y aliento en los momentos más críticos.

Muchas gracias al Dr. Sergio Sánchez, a la Dra Beatriz Ruíz y a los compañeros que han pasado por el laboratorio C-106 durante los últimos años. Sus aportes durante los seminarios mejoraron sustancialmente esta tesis.

Gracias a las diferentes generaciones de compañeros y amigos del laboratorio Manoutcharian por su simpatía, amabilidad y disposición. El trabajo que no se ve, también se agradece. Por eso, agradezco especialmente al Dr. Allán Noe Domínguez por la excelente asistencia técnica en citometría de flujo.

El bienestar emocional y la motivación para terminar esta tesis no solo se ha debido a los muchos académicos mencionados anteriormente, sino también a la hermosa red de amigos con quien tengo la suerte de compartir el camino. Les agradezco por su solidaridad en los momentos más difíciles, por el acompañamiento, por estar atentos a escuchar las dificultades y a compartir los éxitos de este doctorado. A Leidy y LuisFe, que han ido más allá para asegurar incontables veces mi bienestar. A Felipe, mi entrañable amigo, dándole color y una visión optimista a la vida. A Lili, Yura y Wali, les amo. A mis “amigos de Evaristo”, porque no importa en donde estemos siempre tengo la fortuna de contar con ustedes. A Eleazar, por el invaluable tiempo dedicado a escuchar pacientemente cada historia de este proceso y estar siempre atento a sacarme de tantos apuros ... ¡No habría tesis sin compu!. Ustedes son un tesoro.

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi amada familia. A mis padres, mis hermanos, mi sobrino por pacientemente acompañarme en este largo proceso, animándome y dándome una visión optimista en medio de las dificultades. Admiro y sigo aprendiendo de su resiliencia, fortaleza y fe, porque me hacen ver que al final todo será posible. Sus palabras me ayudaron a enfrentar los retos cada día. A mi abuelita, tíos, tías, primas, primos por siempre animarme, mostrarme su amor y apoyarme a perseverar. Estoy infinitamente agradecida.

Gracias vida por ponerme en este camino...

הזה לזמן והגיענו וקיימנו שהחיינו העולם מלך אלוהינו 'ה אתה ברוך

Baruj Atá Adonai, Eloheinu Melej HaOlam, shehejeianu, vekiemanu vehiguianu lazman hazé

## DEDICATORIA

*"Te amo, lo mismo  
en el día de hoy que en la eternidad,  
en el cuerpo que en el alma,  
y en el alma del cuerpo  
y en el cuerpo del alma,  
lo mismo en el dolor  
que en la bienaventuranza,  
para siempre"*

*Cintio Vítier*



*A mí Santi  
Por tu sensibilidad, nobleza y bondad  
A tu luz y sonrisa eterna  
A tu tenacidad y esfuerzo.  
Por tu voz que trasciende*

# TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VIII
RESUMEN .....	XI
ABSTRACT .....	X

## CAPÍTULOS

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1. Administración de vacunas vía mucosas .....	5
2.2. Inducción de respuesta inmune tras la vacunación vía mucosa .....	8
2.3. Sistema inmune de las mucosas .....	11
2.4. Composición de la mucosa intestinal .....	12
2.4.1. Células epiteliales intestinales .....	12
2.4.2. Tejido linfoide asociado a intestino .....	13
2.5. Composición de la mucosa nasal .....	14
2.5.1. Células epiteliales nasales .....	14
2.5.2. Tejido linfoide asociado a la nasofaringe .....	16
2.6. Características de la barrera mucosa .....	18
2.6.1. Generalidades del moco .....	18
2.6.2. Mucina .....	19
2.6.3. Barrera de moco intestinal .....	21
2.6.4. Barrera de moco nasal .....	22
2.7. Algunos desafíos de la administración de vacunas en las mucosas .....	23
2.7.1. Importancia de la mucoadhesión en la vacunación vía mucosa .....	23
2.7.1.1. Mucoadhesión .....	23

2.7.1.2. <i>Partículas poliméricas mucoadhesivas y mucopenetrantes usadas en la vacunación vía mucosas</i> .....	24
<b>2.8. Almidón en la vacunación vía mucosa</b> .....	<b>27</b>
2.8.1. Almidón modificado .....	28
2.8.2. Almidón crudo .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
5.1. Objetivo general .....	32
5.2. Objetivos específicos .....	32
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>7.1. Preparación de la suspensión de almidón crudo</b> .....	<b>34</b>
<b>7.2. Preparación del almidón crudo teñido con FITC</b> .....	<b>34</b>
<b>7.3. Caracterización del almidón crudo</b> .....	<b>35</b>
7.3.1. <i>Tamaño y potencial zeta</i> .....	35
7.3.2. <i>Estabilidad del almidón teñido con FITC</i> .....	36
<b>7.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la mucoadhesión del almidón crudo</b> .....	<b>36</b>
7.4.1. <i>Preparación de las soluciones de mucina</i> .....	36
7.4.2. <i>Ensayos de adsorción de mucina a las micropartículas de almidón crudo</i> .....	37
7.4.3. <i>Evaluación del poder de hinchamiento del almidón crudo</i> .....	38
<b>7.5. Tiempo de residencia <i>in vivo</i> y biodistribución de las micropartículas de almidón crudo</b> .....	<b>38</b>
7.5.1. <i>Animales</i> .....	38
7.5.2. <i>Análisis de microscopía confocal de barrido láser</i> .....	39
7.5.2.1. <i>Extracción de la cavidad nasal</i> .....	39
7.5.2.2. <i>Recuento de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en la cavidad nasal</i> .....	40

7.5.2.3. Localización de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en el tejido linfoide asociado a la nasofaringe .....	41
7.5.2.4. Localización de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en el intestino delgado .....	42
7.5.3. Microscopía electrónica de barrido .....	43
<b>7.6. Biodistribución <i>in vivo</i> de las micropartículas de almidón crudo .....</b>	<b>43</b>
7.6.1. Imágenes de fluorescencia de todo el cuerpo .....	43
7.6.2. Imágenes de fluorescencia de órganos .....	44
<b>7.7. Toxicidad del almidón crudo sobre los glóbulos rojos humanos .....</b>	<b>44</b>
<b>7.8. Análisis estadístico .....</b>	<b>45</b>
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>8.1. Caracterización del almidón crudo .....</b>	<b>46</b>
8.1.1. Tinción del almidón crudo teñido con FITC .....	46
8.1.2. Tamaño y potencial zeta .....	46
8.1.3. Estabilidad del almidón teñido con FITC .....	47
<b>8.2. Mucoadhesión <i>in vitro</i> del almidón crudo .....</b>	<b>48</b>
<b>8.3. Tiempo de residencia y distribución <i>in vivo</i> del almidón crudo en la cavidad nasal .....</b>	<b>54</b>
<b>8.4. Alcance de las micropartículas de almidón crudo a los tejidos linfoides asociados a la mucosa .....</b>	<b>58</b>
8.4.1. Localización en el tejido linfoide asociado a la nasofaringe después de la administración nasal .....	58
8.4.2. Localización en la mucosa intestinal y placas de Peyer después de la administración intraduodenal .....	59
<b>8.5. Biodistribución del almidón crudo .....</b>	<b>61</b>
<b>8.6. Hemocompatibilidad del almidón crudo .....</b>	<b>63</b>
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>

<b>11.PERSPECTIVAS .....</b>	<b>76</b>
<b>12.BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>78</b>
<b>13.ANEXOS .....</b>	<b>91</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de transporte en la barrera epitelial .....	9
<b>Figura 2.</b> Organización de las placas de Peyer .....	14
<b>Figura 3.</b> Distribución del epitelio en la cavidad nasal de roedores .....	15
<b>Figura 4.</b> Cavidad nasal y tejido linfoide asociado a la nasofaringe murina .....	17
<b>Figura 5.</b> Organización de la red de mucina sobre las superficies mucosas .....	18
<b>Figura 6.</b> Diagrama esquemático de la estructura de la mucina .....	21
<b>Figura 7.</b> Niveles supramoleculares del grano de almidón .....	27
<b>Figura 8.</b> Esquema de la anatomía de la cavidad nasal murina .....	40
<b>Figura 9.</b> Distribución de tamaño y morfología de las micropartículas de almidón crudo .....	46
<b>Figura 10.</b> Emisión de fluorescencia de las micropartículas de almidón teñidas con FITC en función del pH .....	48
<b>Figura 11.</b> Espectros de emisión de fluorescencia de la mucina como función de la concentración de las micropartículas de almidón crudo .....	50
<b>Figura 12.</b> Mucoadhesión <i>in vitro</i> de las micropartículas de almidón crudo .....	51
<b>Figura 13.</b> Potencial zeta de las suspensiones de mucina con la adición de almidón crudo .....	52
<b>Figura 14.</b> Poder de hinchamiento de las micropartículas de almidón crudo .....	53
<b>Figura 15.</b> Secciones transversales de la cabeza de ratones Balb/c, desde niveles anteriores a posteriores .....	54
<b>Figura 16.</b> Localización de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en el pasaje nasal luego de la administración nasal .....	55
<b>Figura 17.</b> Tiempo de retención de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en la cavidad nasal de ratones Balb/c .....	56
<b>Figura 18.</b> Paso de micropartículas de almidón crudo a través del epitelio de la cavidad nasal en ratones Balb/c .....	57
<b>Figura 19.</b> Micropartículas de almidón crudo en la cavidad nasal de ratones Balb/c 24 horas después de la administración nasal .....	58

<b>Figura 20.</b> Localización de las micropartículas de almidón teñidas con FITC en el tejido linfoide asociado a nariz de ratones Balb/c .....	<b>59</b>
<b>Figura 21.</b> Localización de las micropartículas de almidón teñidas con FITC en el intestino de ratones Balb/c .....	<b>60</b>
<b>Figura 22.</b> Microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de almidón crudo sobre células M y vellosidades intestinales de ratones Balb/c .....	<b>61</b>
<b>Figura 23.</b> Imágenes <i>in vivo</i> de ratones Balb/c administrados con micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC vía nasal e intragástrica .....	<b>62</b>
<b>Figura 24.</b> Biodistribución de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC .....	<b>63</b>
<b>Figura 25.</b> Actividad hemolítica del almidón crudo sobre glóbulos rojos humanos .....	<b>64</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Vacunas para las mucosas autorizadas en humanos .....	6
<b>Tabla 2.</b> Componentes celulares del epitelio intestinal .....	12
<b>Tabla 3.</b> Descripción del moco y las mucinas en sitios mucosos de ratones .....	20
<b>Tabla 4.</b> Impacto de la mucoadhesión de adyuvantes poliméricos particulados en la inmunogenicidad después de la vacunación vía mucosa .....	26

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo I</b> .....	92
<b>Anexo A.</b> Cirugía abdominal .....	92
<b>Anexo B.</b> Protocolo de prueba de hemólisis de glóbulos rojos <i>ex vivo</i> .....	93
<b>Anexo C.</b> Estandarización de la tinción de almidón crudo con FITC .....	94
<b>Anexo D.</b> Estandarización de la concentración de las mucinas comerciales para espectroscopía de fluorescencia .....	95
<b>Anexo E.</b> Micropartículas de almidón crudo en el epitelio intestinal de ratones Balb/c .....	96
<b>Anexo F.</b> Biodistribución de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC a los 30 minutos .....	97
<b>Anexo II. Artículos publicados</b> .....	99
<i>In vivo</i> tracing of immunostimulatory raw starch microparticles after mucosal administration	
Role of mucoadhesion and mucopenetration in the immune response induced by polymer-based mucosal adjuvants	

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Acr</b>	$\alpha$ -cristalina de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>DLS</b>	Dispersión de luz dinámica
<b>FAE</b>	Epitelio asociado a folículo (del inglés " <i>Follicle associated epithelium</i> ")
<b>FITC</b>	Fluoresceína-5-isotiocianato
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado a intestino (del inglés " <i>Gut-associated lymphoid tissue</i> ")
<b>GAPs</b>	Pasajes de antígeno asociado a células caliciformes (del inglés " <i>Goblet cell-associated antigen passages</i> ")
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IF</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>IL</b>	Interleucina
<b>NALT</b>	Tejido linfoide asociado a la nasofaringe (del inglés " <i>Nasal-associated lymphoid tissue</i> ")
<b>MALT</b>	Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés " <i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i> ")
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>MCBL</b>	Microscopía confocal de barrido láser
<b>MPG</b>	Mucina porcina gástrica
<b>MSB</b>	Mucina submaxilar bovina
<b>MPAs</b>	Micropartículas de almidón crudo
<b>PB</b>	Buffer fosfato (del inglés " <i>Phosphate buffered</i> ")
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino (del inglés " <i>Phosphate buffered saline</i> ")
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>pIgR</b>	Receptor de Ig polimérico (del inglés " <i>Polymeric Ig-receptor</i> ")
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PPs</b>	Placas de Peyer (del inglés " <i>Peyer's patches</i> ")
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>SED</b>	Domo subepitelial (del inglés " <i>Subepithelial dome</i> ")
<b>sIgA</b>	Inmunoglobulina A secretora
<b>TALT</b>	Tejido linfoide asociado al conducto lagrimal (del inglés " <i>Testis-associated lymphoid tissue</i> ")
<b>TetC</b>	Fragmento C de la toxina tetánica
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal

---

## **RESUMEN**

---

Los sistemas particulados poliméricos representan una estrategia prometedora para la vacunación vía mucosa al proteger la carga de antígenos, aumentar la inmunogenicidad y la eficacia protectora. En trabajos previos, las micropartículas de almidón crudo (MPAs) mostraron ser vehículos eficientes para la administración de antígenos vía mucosa con propiedades adyuvantes; sin embargo, se desconocen los mecanismos subyacentes asociados a esta respuesta. En este trabajo se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de las MPAs, su mucoadhesión y su impacto en la capacidad para superar las barreras biológicas de la cavidad nasal e intestino delgado. Las MPAs con tamaño promedio de 4.77  $\mu\text{m}$  y potencial zeta negativo, se localizaron y retuvieron en la mucosa nasal e intestinal de los roedores. La retención del almidón en los tejidos mucosos se correlacionó con la interacción entre las MPAs y las mucinas comerciales. *In vivo*, la mucoadhesión estuvo acompañada de la rápida permeación a través de la capa de moco y la translocación a través del epitelio hacia los tejidos linfoides asociados a la respuesta inmune de la mucosa. Estos hallazgos explican en parte, la capacidad adyuvante de las MPAs previamente informada en vacunas para las mucosas. Los estudios de biodistribución desde nariz y boca confirman el paso al sistema gastrointestinal, con baja toxicidad sistémica. Por tanto, el almidón sin modificaciones fisicoquímicas constituye un sistema de micropartículas seguro y eficiente para la administración de vacunas para las vías mucosas.

---

## ***ABSTRACT***

---

Polymeric-based particulate systems represent a promising strategy for mucosal vaccination by protecting antigen cargo, increasing immunogenicity, and protective efficacy. In previous work, raw starch microparticles (SMPs) have been shown to be efficient vehicles for the delivery of antigens via mucosa with adjuvant properties; however, the underlying mechanisms associated with this response remain unknown. In this work, the physicochemical properties of SMPs and their impact on the ability to overcome the biological barriers of the nasal cavity and small intestine were studied. The SMPs with a mean particle size of 4.77  $\mu\text{m}$  and negative zeta potential were localized and retained in the nasal and intestinal mucosa of rodents. Starch retention in mucosal tissues was correlated with the interaction between MPAs and commercial mucins. In vivo, mucoadhesion was accompanied by rapid permeation through the mucus layer and translocation across the epithelium into mucosa-associated lymphoid tissue responses. This explains the previously reported role of SMPs as mucosal vaccine adjuvants. Biodistribution studies confirm passage to the gastrointestinal system with low systemic toxicity. Thus, starch without physicochemical modifications constitutes a safe and efficient microparticle system for mucosal vaccine administration.

---

# 1. INTRODUCCIÓN

---

El epitelio que reviste la mucosa protege extensas superficies del tracto orogastrointestinal, respiratorio, ocular y genitourinario. Debido a la continua exposición ambiental, la mucosa constituye el punto de entrada para una gran parte de microorganismos patógenos, antígenos, partículas medioambientales y toxinas. Por tanto, los tejidos de la mucosa desempeñan un rol fundamental en la vigilancia e inducción de inmunidad.

La barrera epitelial actúa como una barrera física protectora que impide la adhesión y colonización de microorganismos potencialmente patógenos a través de diversos mecanismos, incluidos la secreción continua de moco, la liberación de péptidos antimicrobianos, la producción de inmunoglobulina A (IgA), la tasa de renovación celular rápida y las uniones estrechas celulares (Takiishi *et al.*, 2017; Arike *et al.*, 2020). Por su parte, el sistema inmune de las mucosas conecta los sitios inductores, responsables de iniciar y establecer las respuestas inmunitarias específicas de antígeno, con los sitios efectores, donde las células efectoras ejercen su acción (Brandtzaeg *et al.*, 2008).

La vacunación continúa siendo la estrategia de salud pública más eficaz para neutralizar las enfermedades infecciosas. La mayoría de las vacunas actualmente autorizadas para uso en humanos se administran vía parenteral. Si bien esta ruta es exitosa para inducir respuesta inmune sistémica protectora, cuando los microorganismos patógenos tienen como ruta de entrada las superficies mucosas, la eficiencia de la vacunación se ve reducida o anulada a causa de la incapacidad de la inmunización parenteral para inducir respuesta inmune de mucosa. Por esta razón, se reconoce la necesidad de continuar en la búsqueda de vacunas para las mucosas (Lavelle *et al.*, 2022; Mouro & Fischer, 2022).

A pesar de las múltiples ventajas conferidas por la inmunización mucosal (Wang *et al.*, 2015; Skwarczynski & Tothl, 2020), las rutas de administración plantean importantes desafíos. Disminución en la absorción y captación de la formulación luego de la exposición al ambiente

hostil del tracto gastrointestinal (TGI), el movimiento peristáltico o el aclaramiento mucociliar limitan el transporte subsecuente del antígeno de interés a través de la barrera epitelial para alcanzar los sitios inductores de la respuesta inmune. Estos desafíos han llevado a los investigadores a explorar varias estrategias para mejorar la efectividad de la inmunización vía mucosa.

Las vacunas para las mucosas basadas en nanopartículas y micropartículas poliméricas como adyuvantes y sistemas de administración han sido ampliamente estudiadas (Jin *et al.*, 2019). En primer lugar, por las propiedades inmunoestimulantes intrínsecas que confieren mayor inmunogenicidad al antígeno co-administrado en comparación con su forma soluble (Weiss *et al.*, 2022), pero también por la capacidad adhesiva de la mayoría de los polímeros al moco. La mucoadhesión amplía el tiempo de residencia de las vacunas en el sitio de administración, lo cual se asocia con el incremento en la eficiencia de liberación del antígeno y la mejora en la respuesta frente al antígeno (Gondil *et al.*, 2020; Cho *et al.*, 2021; Hanson *et al.*, 2021).

El almidón, un polímero abundante en la naturaleza, se ha usado ampliamente en sistemas farmacéuticos (Lemieux *et al.*, 2015; Jelkmann *et al.*, 2019; Nouri *et al.*, 2020) y como adyuvante de vacunas (Coucke *et al.*, 2009; Guillen *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014; Jun *et al.*, 2020; Guktur *et al.*, 2021). Sin embargo, debido a la estructura semicristalina de los gránulos de almidón crudo, relacionada con su baja solubilidad e hinchamiento, la mayoría de las aplicaciones biomédicas utilizan el almidón soluble con modificaciones fisicoquímicas o unido con otros biopolímeros (García *et al.*, 2020).

Los tratamientos físicos, como el calentamiento y la introducción de ciertos grupos funcionales, destruyen y rompen la estructura de los gránulos de almidón, eliminan los dominios amorfos y modifican la hidrofobicidad, entre otros cambios. Así mismo, la combinación del almidón con otros biopolímeros o polímeros sintéticos altera irreversiblemente la estructura del almidón crudo y sus propiedades fisicoquímicas (Lawal, 2019; Torres *et al.*, 2019) incluida la biodegradabilidad, biocompatibilidad, toxicidad, capacidad de hinchamiento, junto con la capacidad de adherirse a las superficies mucosas (Thakore *et al.*, 2013; Soe *et al.*, 2020).

En consecuencia, es de esperar que los resultados obtenidos con el uso de los almidones modificados difieran entre sí, de acuerdo con la modificación introducida al almidón crudo. En el presente trabajo se utilizaron solo micropartículas de almidón crudo, no estudiadas previamente. Se usa el término MPAs para diferenciarlas del almidón soluble, con tratamientos fisicoquímicos o funcionalizado, referido como “polímeros con base en almidón”.

Las MPAs se usaron previamente para la administración de antígenos vía mucosas e inducción de respuesta inmune sistémica (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014). A diferencia de otros sistemas particulados para la entrega de antígenos, el antígeno se inmoviliza sobre el almidón crudo por adsorción directa, no covalente. La inmovilización de los antígenos sobre el almidón es mediada por un módulo de unión a carbohidratos a través de interacciones hidrófobas, interacciones polares principalmente puentes de hidrogeno e interacciones CH- $\pi$ ; estas últimas ocurren entre un átomo de hidrogeno unido covalentemente a un átomo de carbono y un sistema  $\pi$  rico en electrones (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000, Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2009; Armenta *et al.*, 2018; Armenta *et al.*, 2019). De esta manera, con el uso de las MPAs se elimina la necesidad de modificaciones fisicoquímicas y funcionalización, necesarias para la carga del antígeno y/o manufactura de la partícula en la mayoría de los otros polímeros.

La administración oral del fragmento C de la toxina tetánica (TetC) inmovilizado sobre MPAs en ratones Balb/c indujo niveles superiores de anticuerpos IgG contra TetC comparado con los animales que recibieron el antígeno sin inmovilizar. Esta respuesta se reflejó en el retraso de la aparición de síntomas de tétanos cuando los ratones fueron retados con una dosis letal de la toxina tetánica (Guillen *et al.*, 2014). Igualmente, la capacidad inmunoestimulante de las MPAs se demostró al inmovilizar la proteína recombinante  $\alpha$ -cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* (Acr). La inmovilización de Acr sobre MPAs indujo preferencialmente respuesta inmune celular (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

Las MPAs también han mostrado tener un efecto inmunoestimulante sin presencia de antígenos. Las MPAs solas o combinadas con Acr administradas nasalmente como refuerzo a la vacuna BCG en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva redujeron la carga pulmonar de *M. tuberculosis* y el área pulmonar afectada por neumonía, con incremento de la sobrevida,

comparado con los animales que solo recibieron la vacuna BCG (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017). Hallazgos similares se encontraron cuando las MPAs se usaron como adyuvante directo de la vacuna BCG, con mejoras en la eficacia protectora de la vacuna en los animales infectados con diferentes cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Moreno-Mendieta *et al.*, 2019).

En conjunto, los hallazgos previos proporcionan evidencia sobre el potencial inmunoestimulante de las MPAs; sin embargo, conducen a múltiples interrogantes que no han sido abordados hasta la fecha por la literatura científica, incluida la comprensión de las interacciones del almidón crudo entregado por vía mucosa con las superficies mucosas. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar las propiedades mucoadhesivas de las MPAs y su distribución luego de la administración nasal y oral, para obtener un mejor entendimiento del mecanismo de la actividad inmunoestimulante reportada previamente. Se estudió la interacción de las MPAs con la mucina *in vitro*, para explicar el incremento en el tiempo de residencia en los tejidos mucosos *in vivo*. Se postula, además, la mucopenetración de las MPAs, seguida de la capacidad de atravesar la barrera epitelial y dirigirse a los sitios inductores de las respuestas inmunitarias de la mucosa. La evidencia existente sobre la caracterización del almidón crudo demuestra que es un adyuvante seguro y eficiente para la administración oral e intranasal de vacunas para las mucosas.



---

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. Administración de vacunas vía mucosas

La exposición constante de las superficies mucosas al medio ambiente convierte a la mucosa en la ruta de entrada de un gran número de microorganismos potencialmente patógenos. Las infecciones desencadenadas por estos microorganismos plantean un enorme desafío para el desarrollo de vacunas para las vías mucosas, las cuales tienen como objetivo inducir inmunidad que evite la adhesión, la colonización y la penetración en el epitelio de patógenos (Lavelle *et al.*, 2022).

La inmunización a través de la mucosa ha mostrado simplificar la administración, incrementar el apego a los esquemas de vacunación y reducir los costos asociados al personal calificado necesario para vacunaciones masivas (Skwarczynski & Toth, 2020). Igualmente, ha sido ampliamente demostrada su capacidad de inducir inmunidad local en la mucosa, con protección en las superficies mucosas distales mediada por la inmunoglobulina A secretora (sIgA), junto con la inducción de respuesta inmune sistémica, en comparación con la controversial evidencia sobre la respuesta en mucosas generada luego de inmunización parenteral (Su *et al.*, 2016).

Se han revisado otras ventajas potenciales de la vacunación para las mucosas, como la protección de la barrera epitelial con anticuerpos neutralizantes IgA e IgG frente a los efectos agudos de infecciones bacterianas y virales incluidos *V. cholerae*, *E. coli* enteropatógena y el SARS-Cov-2, (Baker *et al.*, 2022). La vacunación para las mucosas también reduce la carga de microorganismos patógenos en la superficie mucosa (Nemattalab *et al.*, 2020) y logra inducir inmunidad a largo plazo gracias a las células T de memoria residentes en el tejido (Wilk & Mills, 2018). A pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas para el desarrollo de vacunas para las mucosas solo pocas vacunas están autorizadas para la administración en humanos por esta vía, en comparación con la ruta parenteral (Tabla 1).

**Tabla 1.** Vacunas para las mucosas autorizadas en humanos

Microorganismo	Vacuna	Características generales	Ruta	Referencias
<i>Vibrio cholerae</i>	Dukoral®	<u>Inactivada monovalente:</u> <i>V. cholerae</i> O1 (Inaba + Ogawa) inactivado por calor y formaldehído + Rctb	Oral	Karlsson <i>et al.</i> , 2014
	ShanChol™, Euvichol-Plus®/Euvichol®, mORC-Vax™, ORC-Vax™	<u>Inactivada bivalentes:</u> <i>V. cholerae</i> O1 y O139 (Inaba + Ogawa) inactivado por calor y formaldehído	Oral	Capeding <i>et al.</i> , 2017; Lee <i>et al.</i> , 2018; Anh <i>et al.</i> , 2014
	Vaxchora™	<u>Viva atenuada monovalentes:</u> <i>V. cholerae</i> O1 (Inaba) inactivado por calor y formaldehído – atenuación ctxA	Oral	Saluja <i>et al.</i> , 2020
<b>Poliovirus</b>	mOP, tOPV	<u>Viva atenuada:</u> atenuación de serotipo 1 y 1, 2, 3 poliovirus	Oral	Miquel-Clopés <i>et al.</i> , 2019
	BIOPOLIO™ B1/3 (b(OPV))	<u>Viva atenuada bivalentes:</u> serotipos de poliovirus 1 Y 3 atenuados	Oral	Zhao <i>et al.</i> , 2021
<b>Influenza A Influenza B</b>	FluMist®, Fluenz Tetra™	<u>Viva atenuada cuadrivalente:</u> combinaciones de genes HA y NA de cepas de tipo A (A/H1N1 y A/H3N2) y dos cepas de tipo B (Victoria y Yamagata) en un genoma del virus de influenza, atenuados por la adaptación al crecimiento en temperaturas más frías	Nasal	McNaughton <i>et al.</i> , 2016; Mallory <i>et al.</i> , 2018
	Nasovac™	<u>Viva atenuada monovalente:</u> combinaciones de genes HA y NA de cepas de tipo A (H1N1) en un genoma del virus de influenza, atenuados por la adaptación al crecimiento en temperaturas	Nasal	Kulkarni <i>et al.</i> , 2013

Microorganismo	Vacuna	Características generales	Ruta	Referencias
<b>Rotavirus</b>	RotaRix®,	<i>Viva atenuada monovalente:</i> cepa atenuada 82-12 del rotavirus humano atenuado (G1 con expresión de P1A)	Oral	Varghese <i>et al.</i> , 2022
	RotaTeq®	<i>Viva atenuada pentavalente:</i> cuatro rotavirus reordenados (G1-G4) expresan la proteína VP7 de la cepa de rotavirus humano y la proteína de unión P7 de la cepa de rotavirus bovino WC3. El quinto rotavirus humano G6, expresa la proteína de unión P1A	Oral	Varghese <i>et al.</i> , 2022
	Rotavac®/ Rotavin-M1	<i>Viva atenuada monovalente:</i> cepa atenuada G9P/GP1 de rotavirus humano atenuado	Oral	Varghese <i>et al.</i> , 2022
	BRV-PV ROTASIIL	<i>Viva atenuada pentavalente:</i> cinco rotavirus humanos/bovinos recombinantes (G1-G4 y G9)	Oral	Varghese <i>et al.</i> , 2022
<b>Salmonella typhimurium</b>	Vivotif®	<i>Viva atenuada:</i> cepa Ty21a atenuada con desarrollo incompleto del LPS	Oral	Amicizia <i>et al.</i> , 2017
<b>Adenovirus</b>	Vacuna de Adenovirus Tipo 4 and Tipo 7	<i>Viva no atenuado:</i> serotipos Ad4 y Ad7	Oral	Gray <i>et al.</i> , 2018

\**Abreviaturas.* rCTB: subunidad B de la toxina del cólera; OPV: del inglés “oral polio vaccine” HA: hemaglutinina, NA: neuraminidasa; LPS: lipopolisacárido.

## 2.2. Inducción de respuesta inmune tras la vacunación vía mucosa

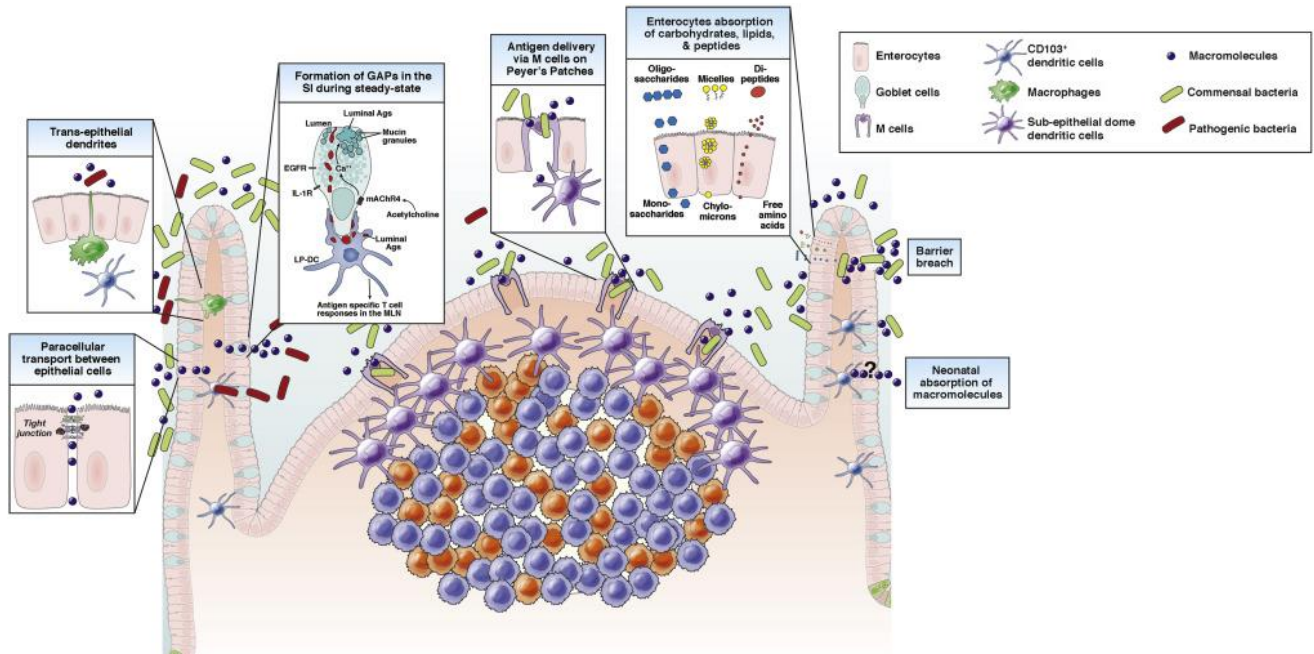
El objetivo de la inmunización mucosal dirigida a combatir enfermedades infecciosas es el de activar la respuesta inmune innata y adaptativa. Las respuestas inmunitarias en las mucosas están rigurosamente controladas, a fin de mantenerse tolerogénicas a antígenos inofensivos y conservar la homeostasis (Kurashima & Kiyono, 2017).

La activación de la respuesta inmune innata inicia con la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) por las células de la superficie mucosa para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, fagocitosis y liberación de moléculas efectoras antimicrobianas y proinflamatorias. La expresión de los PRRs condiciona la respuesta de poblaciones celulares en la mucosa tales como las células dendríticas y macrófagos, así como la presentación y diferenciación de las células T en células efectoras (Dwivedy & Aich, 2011).

Diferentes mecanismos median el transporte de antígenos solubles, microorganismos y partículas a través de la barrera epitelial mucosa, con la participación de varios tipos celulares (Figura 1). Las células M, células epiteliales especializadas en transportar antígenos y partículas, captan al antígeno desde su cara apical orientada hacia la luz de la mucosa, para luego exocitarlo a través de su membrana basolateral (Dillon & Lo, 2019). Se ha demostrado la presencia de células M en sitios de inducción de la mucosa de varios tejidos linfoides asociados a la mucosa (MALT) incluidos el epitelio asociado a folículo (FAE) de las placas de Peyer (PPs), las vellosidades intestinales del tejido linfoide asociado a intestino (GALT), el domo subepitelial (SED) y el FAE del tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT) o el tejido linfoide asociado al conducto lagrimal (TALT) (Kimura, 2018; Oya *et al.*, 2021). Adicionalmente, las células M pueden inducirse ectópicamente en condiciones inflamatorias e infecciosas (Kobayashi *et al.*, 2019).

En ciertos MALT como en las PPs, las células dendríticas se encuentran asociadas con las células M y absorben los antígenos liberados por estas. Las células dendríticas de los tejidos mucosos tienen la capacidad de extender sus dendritas sin comprometer la integridad de la barrera epitelial, para la captación y el transporte transepitelial de antígenos desde la luz de la

mucosa o bien, “arrastrarse” sobre la membrana basal de los enterocitos (Kulkarni & Newberry, 2019).



**Figura 1.** Mecanismos de transporte en la barrera epitelial. 1) Transporte paracelular entre células epiteliales; 2) Extensión de dendritas de las células presentadoras de antígeno entre las células epiteliales desde la lámina propia; 3) Absorción por células caliciformes a través de los GAPs (pasajes asociados a células caliciformes); 4) Transcitosis mediada por células M; 5) Absorción por enterocitos de moléculas pequeñas. Tomado de Kulkarni & Newberry, 2019.

Específicamente en la lámina propia intestinal, se ha descrito que los macrófagos residentes (CX3CR1<sup>+</sup>) también participan en la captura del contenido luminal mediante la extensión de las dendritas transepiteliales (Vallon-Eberhard *et al.*, 2006). Por otro lado, McDole y colaboradores señalaron que algunas proteínas de bajo peso molecular (<70 kDa) y el dextrano son captados por las células caliciformes y entregados preferencialmente al subconjunto de células dendríticas CD103<sup>+</sup> residentes, formando lo que se denominó “pasajes de antígeno asociado a células caliciformes” (GAPs, por sus siglas en inglés) (McDole *et al.*, 2012). El transporte mediante GAPs facilita el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en estado estacionario (Kulkarni *et al.*, 2020).

Finalmente, a pesar de la permeabilidad selectiva de la barrera epitelial a causa de las uniones estrechas entre las células epiteliales, es posible que ocurra fuga paracelular mediada por la expresión de diferentes proteínas claudinas, con la subsecuente formación de poros. La fuga paracelular permite el paso de macromoléculas, entre ellas proteínas y carbohidratos como el dextrano a través del epitelio mucoso (Kulkarni & Newberry, 2019).

Los antígenos lumbinales transportados al MALT son procesados por las células presentadoras de antígeno de los tejidos mucosos y presentados a las células linfoides en el epitelio que recubre los folículos linfoides. Las células sensibilizadas con el antígeno inducen preferencialmente el desarrollo de células B comprometidas con IgA en el centro germinal de los folículos linfoides. Además, las células inmunes inducidas por el antígeno migran desde los sitios inductores de la respuesta inmune en la mucosa hacia los sitios efectores. Para ello, las células B IgA<sup>+</sup> circulan vía vasos linfáticos de drenaje, pasan a ganglios linfáticos y estimulan la respuesta de células T. Las células T CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno junto con las células B IgA<sup>+</sup> terminan en el ducto torácico desde donde entran a circulación sanguínea para retornar a la lámina propia de la mucosa gracias a la expresión de receptores de alojamiento en la mucosa (Kiyono & Fukuyama, 2004; Gorfú *et al.*, 2009), para diferenciarse en células efectoras o de memoria.

La producción de sIgA en la lámina propia y su liberación al lumen epitelial es la característica distintiva de la vacunación de la mucosa, además de ser un mecanismo efector de la inmunidad mucosa. Estructuralmente, la sIgA contiene dos monómeros de IgA ensamblados con una cadena de unión (cadena J) para formar IgA dimérica. Luego de la secreción en los sitios efectores de la mucosa, la IgA dimérica se une al receptor de Ig polimérico (pIgR) presente en la membrana basolateral de las células epiteliales. El transporte de la IgA dimérica por pIgR a la superficie apical de las células epiteliales y la escisión del ectodominio o componente secretor de la pIgR libera la sIgA en la mucosa (Kumar *et al.*, 2020). La sIgA media su función como anticuerpo neutralizante al unirse a toxinas y microorganismos patógenos para bloquear la adhesión mediada por receptores en la superficie de las células epiteliales de la mucosa. Al mismo tiempo, microorganismos, partículas y toxinas quedan atrapados en la capa de moco de la mucosa, lo cual facilita su eliminación (Mantis *et al.*, 2010).

La compartimentalización del sistema inmune de las mucosas, es decir, la inmunidad específica de tejido (Brown & Esterházy, 2021), restringe la elección de la vía de administración para obtener la respuesta inmune deseada. Así, mientras la inmunización oral provoca respuestas de anticuerpos en las glándulas salivares, el segmento proximal del intestino delgado y las glándulas mamarias, induce poca o ninguna respuesta de anticuerpos IgA en el recto y mucosa genital femenina (Kozlowski *et al.*, 1997). Sin embargo, la inmunización nasal induce protección en vías respiratorias superiores e inferiores, vagina e intestino (Johansson *et al.*, 2001; Ruane *et al.*, 2013; Americo *et al.*, 2022).

## 2.2. Sistema inmune de las mucosas

El sistema inmune de la mucosa está compuesto por sitios inductores y sitios efectores para la inducción de respuestas inmunitarias, los cuales son funcional y anatómicamente distintos. Los sitios inductores de la respuesta inmune, llamados MALT, comprenden una red inmunológica compleja a lo largo de la superficie de varios tejidos de mucosa. Estos incluyen el GALT, el NALT, el TALT, el tejido linfode asociado a órganos genitales (GOALTs), entre otros (Kimura, 2018; Chuluunbaatar *et al.*, 2022; Silva-Sanchez & Randall, 2019).

Los MALT poseen diferencias entre especies, así como diferencias según su localización anatómica y organogénesis. Sin embargo, estos tejidos comparten estructuras básicas tales como la superficie epitelial cubierta con células M que recubre los folículos linfoides ricos en células B, las regiones interfoliculares ricas en células T, las regiones del SED y el FAE también ampliamente infiltrado por linfocitos (Ahlawat *et al.*, 2014). Los linfocitos intraepiteliales convencionales ( $\text{TCR}\alpha\beta^+$ ) y no convencionales ( $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta^+$ ,  $\text{CD4}^- \text{CD8}\alpha\beta^- \text{TCR}\alpha\beta^+$ ) que se ubican en el epitelio de barrera, tienen contacto inmediato con los antígenos en la luz del epitelio previniendo la invasión de microorganismos patógenos y manteniendo la tolerancia (Ma *et al.*, 2019).

Por otra parte, los sitios efectores de la respuesta inmune en la mucosa son tejidos menos organizados y contienen células efectoras dispersas. La lámina propia en el TGI, respiratorio y genitourinario, el pasaje nasal y los tejidos glandulares secretores como las glándulas mamarias, salivales y lagrimales albergan plasmoblastos, células plasmáticas IgA e IgM, escasas células B

principalmente IgA<sup>+</sup> y grupos de células T especializadas de la mucosa (CD4<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> o CD8αβ<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup>). Estas células median las respuestas inmunes dirigida al antígeno mediante la secreción de anticuerpos para neutralizar y eliminar microorganismos patógenos, la producción de citocinas, el estímulo para la producción de proteínas antimicrobianas y la contribución a la formación de uniones estrechas entre células epiteliales (Spencer & Sollid, 2016; Ma *et al.*, 2019).

## 2.4. Composición de la mucosa intestinal

### 2.4.1. Células epiteliales intestinales

La mucosa intestinal es el principal sitio de absorción *in vivo*. Los nutrientes, fármacos y otros xenobióticos, partículas, antígenos, oligoelementos y macroelementos deben pasar a través de la capa mucosa y transportarse a través de la barrera epitelial intestinal para ser absorbidos. El TGI está organizado en vellosidades que se extienden y criptas que se invaginan, cuya longitud varia en los diferentes segmentos del intestino (Mowat & Agace, 2014). Generalidades de la composición celular del epitelio intestinal se describe en la Tabla 2.

**Tabla 2.** *Componentes celulares del epitelio intestinal* Se describen las características generales, función y localización de las células epiteliales intestinales.

Célula	Características	Función	Localización
<b>Enterocitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Epitelio cilíndrico simple</li> <li>▪ Superficie apical compuesta de microvellosidades y glucocálix</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Barrera física</li> <li>▪ Internalizar antígenos</li> <li>▪ Secretar AMPs</li> <li>▪ Digestión y absorción</li> </ul>	Superficie interna del intestino delgado y grueso
<b>Células de Paneth</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Células secretoras</li> <li>▪ Contienen abundantes gránulos citoplasmáticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Limitar el acceso a microorganismos patógenos</li> <li>▪ Secretar AMPs</li> <li>▪ Modular la respuesta inmune</li> </ul>	Base de la cripta del intestino delgado, entre las células madre intestinales



<b>Células caliciformes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Células secretoras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Secretar moco</li> <li>▪ Capturar antígenos lumbinales</li> <li>▪ Restaurar el epitelio intestinal</li> <li>▪ Proteger las membranas mucosas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Todo el TGI</li> <li>▪ Cubre las vellosidades y criptas</li> </ul>
<b>Células enteroendocrinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Secretan hormonas peptídicas activas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Modular la respuesta inmune y mantener la homeostasis</li> <li>▪ Secretar hormonas que regulan la motilidad intestinal, saciedad, secreción de insulina, entre otros.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Todo el TGI</li> <li>▪ Membrana apical de la luz intestinal</li> </ul>
<b>Células de Tuft</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Células secretoras</li> <li>▪ Células quimiosensoriales, pero no producen hormonas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inmunidad intestinal</li> <li>▪ Respuesta contra helmintos y protistas</li> <li>▪ Mantenimiento de las ILC2</li> <li>▪ Expresar componentes necesarios para percepción del gusto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Intestino delgado y grueso</li> <li>▪ Vellosidades y criptas</li> </ul>
<b>Células M</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pueden o no tener microvellosidades cortas en la superficie apical</li> <li>▪ "Bolsillo" basolateral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Captación y transcitosis de antígenos desde el lado luminal al lado basal</li> <li>▪ Inmunidad intestinal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cubre vellosidades y criptas del intestine</li> <li>▪ GALT (FAE, PPs, ILF)</li> </ul>

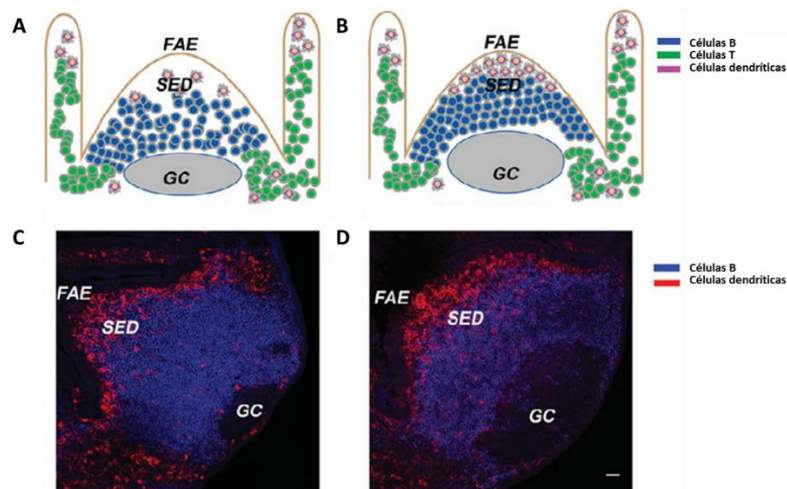
\***Abreviaturas.** AMPs, péptidos antimicrobianos, ILC2, células linfoides innatas del grupo 2; ILF, folículos linfoides aislados (del inglés "*isolated lymphoid follicles*"). Allaire *et al.*, 2018; Bonis *et al.*, 2021.

#### 2.4.2. Tejido linfoide asociado a intestino

El GALT, sitio inductor de la respuesta inmune en intestino, está constituido por tejidos linfoides multifoliculares como las PPs, las cuales están unidas al epitelio intestinal para la captura de antígenos y conectadas al sistema linfático vía vasos eferentes. Además, cuenta con numerosos tejidos linfoides terciarios inducibles, denominados tejidos linfoides intestinales

solitarios, tales como los folículos linfoides maduros y los criptoparches aislados (Eberl & Lochner, 2009).

Las PPs se encuentran íntimamente asociadas a la luz intestinal a través del FAE, un epitelio compuesto predominantemente por células M, pocas vellosidades intestinales y una fina capa de moco. En comparación con las vellosidades intestinales, en las PPs ocurre la captación preferencial de antígenos particulados (Da Silva *et al.*, 2017). Las células M que se superponen a las PPs capturan y transportan los antígenos solos o en complejo anticuerpo/antígeno desde el lumen hacia el SED (Rochereau *et al.*, 2013). Poblaciones de células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos del SED extienden sus dendritas para muestrear directamente los antígenos particulados lumbinales e interactúan con las células M (Kolesnikov *et al.*, 2020). Adicionalmente, el SED contiene el folículo de células B, la zona marginal y el centro germinal que contribuyen a la inducción de respuesta inmune luego de la exposición a los antígenos, incluida la producción de sIgA en la mucosa (Figura 2).



**Figura 2.** Organización de las placas de Peyer. Representación esquemática y MCBL de las PPs en (A y C) estado estacionario y (B y D) después de tratamiento con el adyuvante para mucosa toxina de cólera. GC, centro germinal. Tomado y adaptado de Ahlawat *et al.*, 2013.

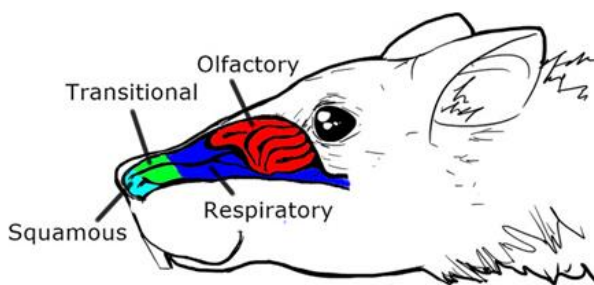
## 2.5. Composición de la mucosa nasal

### 2.5.1. Células epiteliales nasales

La cavidad nasal se extiende desde las fosas nasales hasta la nasofaringe dividida por un tabique medio en dos conductos simétricos. El aire inhalado fluye a través de las fosas nasales

hacia el vestíbulo, revestido por epitelio escamoso. Los cornetes en la cavidad nasal se proyectan desde las paredes laterales o dorsales hacia la luz (Alvites *et al.*, 2018). Los cornetes nasales, el tabique medio, las paredes laterales de la cavidad nasal y el techo de la nariz, así como las estructuras linfoides menos organizadas incluidas el conducto lacrimal, la lámina propia y el epitelio nasal, se consideran parte del pasaje nasal (Chamanza & Wright, 2015).

Las poblaciones epiteliales en la cavidad nasal difieren de acuerdo con su localización y función (Figura 3). Mientras que en el vestíbulo nasal el epitelio es escamoso, el epitelio respiratorio ubicado entre la cámara principal y la nasofaringe es cilíndrico pseudoestratificado ciliado (Harkema *et al.*, 2006). Adicionalmente, Kim y colaboradores evidenciaron en las superficies laterales de los cornetes en el epitelio respiratorio, una monocapa de células epiteliales columnares ciliadas compuesta exclusivamente por células M (Kim *et al.*, 2011). Debido a la alta vascularización, la baja permeabilidad epitelial, el rápido recambio de moco y la abundancia de células M, el epitelio respiratorio es ideal para la liberación de vacunas y fármacos hacia la circulación sistémica y proporciona el mayor tiempo de residencia en cavidad nasal (Kumar *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Distribución del epitelio en la cavidad nasal de roedores. Cuatro poblaciones de células recubren la mucosa nasal desde la región anterior en el vestíbulo hasta la región posterior hacia la nasofaringe. Epitelio escamoso, epitelio de transición, epitelio respiratorio y epitelio olfatorio. Figura tomada de Alvites *et al.*, 2018.

El epitelio de transición se encuentra distal al epitelio escamoso y proximal al epitelio respiratorio. Varía entre epitelio cuboidal y cilíndrico, escasamente ciliado, cubierto de microvellosidades, con mayor cantidad de células caliciformes y, por ende, con mayor cantidad de moco. Finalmente, el neuroepitelio olfativo pseudoestratificado, que en roedores ocupa casi el 50% de la cavidad nasal, recubre la mayor parte de los cornetes etmoidales, el techo, la pared lateral y el tabique de las vías respiratorias nasales distales (Harkema *et al.*, 2006; Alvites *et al.*,

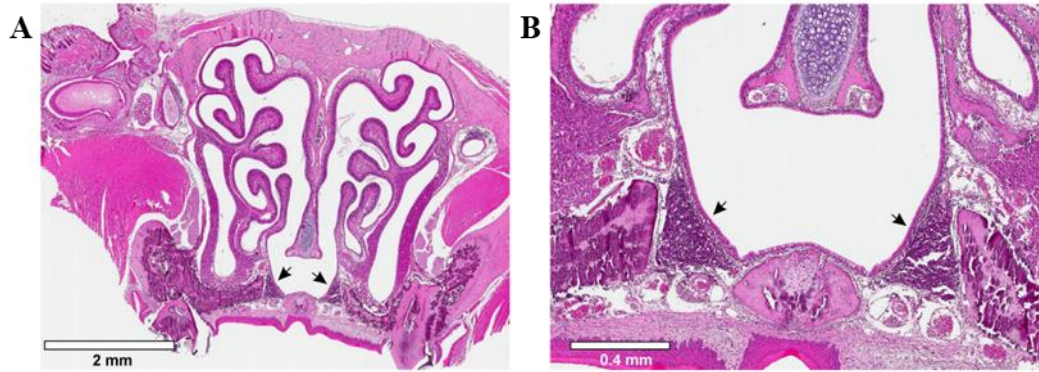
2018). Contrario al epitelio respiratorio, la baja vascularidad relativa con permeabilidad endotelial alta favorece el drenaje hacia ganglios linfáticos desde la lámina olfatoria (Kumar *et al.*, 2016).

La morfología de las células M difiere de acuerdo con su localización en la cavidad nasal. Las células M en el epitelio respiratorio tienen su superficie deprimida y están cubiertas con microvellosidades cortas e irregulares, tal como las células M clásicas presentes en el NALT. Estudios ultraestructurales revelaron que en la región de mucocapa del epitelio respiratorio las células M carecen de la invaginación o el “bolsillo” de las células M clásicas. No obstante, estas células M conservan la capacidad de capturar proteínas solubles y antígenos bacterianos (Kim *et al.*, 2011).

El sistema mucociliar de la cavidad nasal, encargado de la remoción de la mayoría de los antígenos particulados, tiene dos componentes: las células epiteliales ciliadas del epitelio respiratorio y el moco que reviste las superficies lumbinales, secretado por las células caliciformes de la superficie del epitelio y las glándulas subyacentes en la lámina propia (Harkema *et al.*, 2006). Los cilios de las células ciliadas impulsan el flujo de moco. La dirección del latido ciliar tiende a alinearse a lo largo de la dirección del flujo de moco hacia la nasofaringe y la orofaringe para ser deglutido (Harkema *et al.*, 2018). Debido a la ausencia de cilios en ciertas porciones de la cavidad nasal, hay regiones en donde el tránsito es más lento, lo cual influye en la tasa de aclaramiento mucociliar (Rogers *et al.*, 2022).

#### 2.5.2. Tejido linfoide asociado a la nasofaringe

El NALT y el pasaje nasal representan los sitios inductor y efector de la respuesta inmune en la cavidad nasal, respectivamente (Hiroi *et al.*, 1998). El NALT, como tejido linfoide organizado, ha sido descrito en diversos vertebrados incluidos los humanos (Debertin *et al.*, 2003). En roedores, este tejido se encuentra en ambos lados del ducto nasofaríngeo, dorsal al paladar blando cartilaginoso (Velin *et al.*, 1997) (Figura 4).



**Figura 4.** Cavity nasal y tejido linfoide asociado a la nasofaringe murina. Secciones transversales teñidas con hematoxilina-eosina de la región media de la cavity nasal. A. Las flechas de indican la localización bilateral del NALT en la cavity nasal. B. Ampliación de figura A mostrando el NALT. Imágenes tomadas de Gogos & Federle, 2019.

El tejido está constituido por las vénulas del endotelio alto, el FAE y las células inmunes necesarias para el inicio y la estabilización de las respuestas específicas de antígeno (Kiyono & Fukuyama, 2004). Heritage y colaboradores definieron la composición celular del NALT en ratones hembra Balb/c de 6-8 semanas de edad, observando un predominio de células B, seguido de células T y macrófagos (Heritage *et al.*, 1997). En un trabajo posterior, Fukuyama y colaboradores demostraron que la organogénesis del NALT ocurre a partir de la primera semana de nacimiento, con un tejido desarrollado a partir de la octava semana, independiente del estímulo antigénico y con crecimiento continuo conforme avanza la edad de los animales. Se sugiere que la diferencia en la organogénesis del NALT respecto a las PPs se asocia a las diferencias en las señales de activación proporcionadas por antígenos ambientales inhalados después del nacimiento (Fukuyama *et al.*, 2002).

Aunque fenotípicamente las células M del FAE en el NALT (GP2<sup>+</sup>, CCL9<sup>+</sup>, CXCL16<sup>-</sup>) difieren de las células M de PPs (GP2<sup>+</sup>, CCL9<sup>+</sup>, CXCL16<sup>+</sup>), en respuesta a estímulos antigénicos comparten la capacidad de capturar antígenos particulados luminales para iniciar la respuesta inmune de mucosa (Date *et al.*, 2017). Al igual que en PPs, se induce la formación de centros germinales, la diferenciación a células T efectoras y la producción de sIgA e IgG sérica (Pabst, 2015).

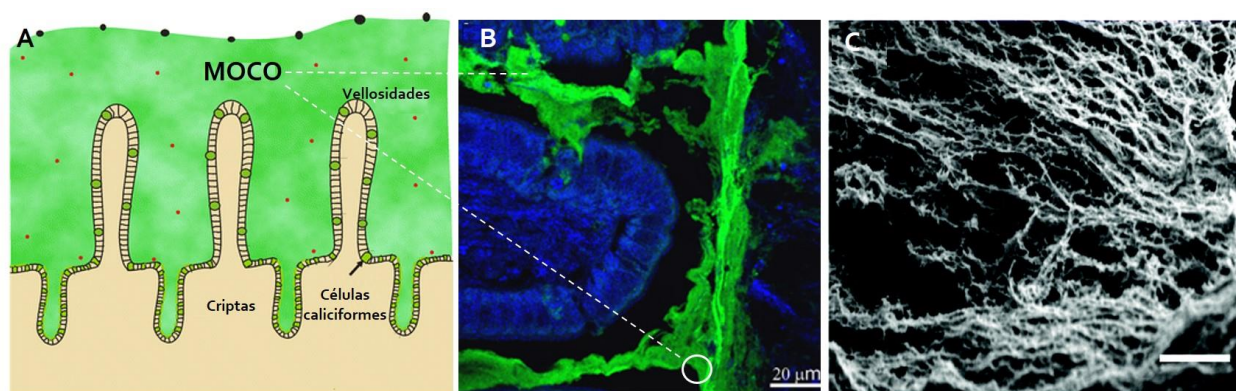
## 2.6. Características de la barrera mucosa

La capa de moco es la primera barrera común en toda la superficie mucosa para los microorganismos patógenos, partículas o formulaciones que se administran vía mucosa.

### 2.6.1. Generalidades del moco

El moco que recubre las membranas mucosas es sintetizado y secretado principalmente por las células caliciformes ubicadas entre el epitelio mucoso. El moco está compuesto de agua (~90-95%), electrolitos (1% p/v), enzimas, sales, ADN, lípidos (1-2%), factores de crecimiento, péptidos antimicrobianos, proteínas y mucina, la glicoproteína más abundante (~1-5%) (Leal *et al.*, 2017; Bansil & Turner, 2018).

El grado de organización de la mucina sobre las superficies mucosas le confiere al moco diversas funciones basadas principalmente en su capacidad para formar geles (Figura 5). Entre otras funciones, el moco establece un filtro selectivo para la difusión de partículas, la captura de microorganismos potencialmente patógenos, partículas, células inflamatorias y detritos celulares, evitando la adhesión al epitelio y libera moléculas tales como péptidos antimicrobianos y citocinas (Pelaseyed *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Organización de la red de mucina sobre las superficies mucosas. A. Representación esquemática de la organización del gel de moco en mucosa del íleon. B. Se detectó la mucina-2 (verde) mediante inmunotinción de secciones del íleon de ratones Balb/c. La tinción de ADN de Hoeschst se muestra en azul. La línea punteada indica el gel de moco continuo sobre la punta de las vellosidades intestinales. C. Imagen de microscopía electrónica de barrido muestra un gel mucoso, compuesto de redes fibrilares de mucina (200 nm). Imagen tomadas y adaptadas de Johansson *et al.*, 2011; Loonen *et al.*, 2014; Petrou & Cruzier, 2018.

La estructura de la capa de moco entre los tejidos mucosos varía ampliamente en su composición, grosor, viscosidad y propiedades reológicas (Tabla 3). Por ejemplo, en roedores, el moco nasal es más delgado (10  $\mu\text{m}$  de grosor) que en TGI ( $\sim 180$   $\mu\text{m}$  de grosor), lo que lo hace altamente permeable (Atuma *et al.*, 2001; Pelaseyed *et al.*, 2014). Igualmente, la expresión de las mucinas difiere en los diferentes órganos (Tabla 3).

#### 2.6.2. *Mucina*

Las mucinas son una familia de glicoproteínas complejas de alto peso molecular (10-40 MDa) con cadenas polipeptídicas organizadas en dos regiones, como se muestra en la Figura 6. La región central tiene dominios ricos en prolina/treonina/serina (dominios PTS) con un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), las cuales varían en número de repeticiones, longitud y secuencia de aminoácidos según el tipo de mucina. Estos dominios están altamente glicosilados a través de enlaces O-glicosídicos entre la N-acetilgalactosamina y los grupos hidroxilo de los residuos de serina y treonina del núcleo de la proteína (Bansil & Turner, 2006). Las mucinas también tienen sitios para N-glicosilación, C-manosilación y dimerizaciones postraduccionales (Cao *et al.*, 2012).

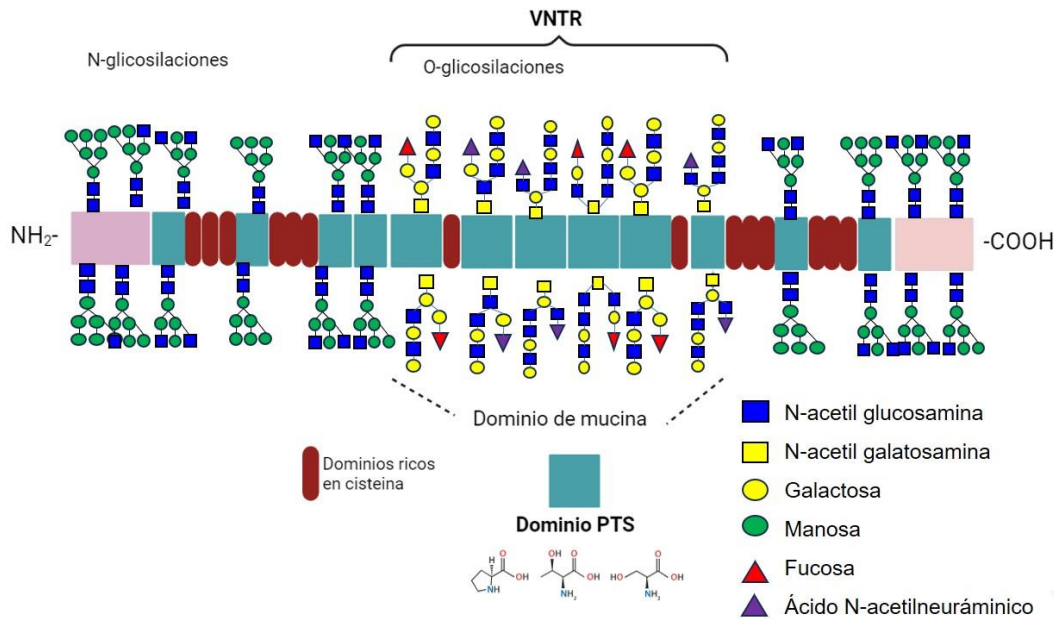


**Tabla 3.** Descripción del moco y las mucinas en sitios mucosos de ratones.

Sitio mucoso	Grosor del moco	Tiempo de aclaramiento mucociliar	Tamaño del poro	pH del moco	Tipo de mucinas	
					Formadoras de gel/secretadas	Asociadas a la superficie celular
<b>Boca</b>	10–100 $\mu\text{m}$	0.1–1.85 mL/min	$\geq 100$ nm a varios $\mu\text{m}$	6.8–7.4	Muc 5B, 7*, 19	Muc 1, 4, 16, 21
<b>Nariz</b>	10-15 $\mu\text{m}$	5–10 min	150 $\pm$ 50 nm	5.5-6.7	Muc 5AC	Muc1, 4
<b>Pulmones</b>	5–55 $\mu\text{m}$	5–10 cm/min	NE	6.5-7.9	Muc 5B	Muc 1, 4, 16
<b>Estómago</b>	170 $\mu\text{m}$	4–5 h	500 nm	1.0–3.0	Muc 5AC, 6	Muc1, 12, 13, 17
<b>Duodeno</b>	~500 $\mu\text{m}$			5.9–7.5	Muc 2, 6	Muc 1, 12, 15, 17
<b>Yeyuno</b>	~250 $\mu\text{m}$	47–270 min	200-220 nm		Muc 2	Muc 1, 12, 15, 17
<b>Íleon</b>	~200 $\mu\text{m}$				Muc 2	Muc 1, 12, 15, 17
<b>Colón</b>	~100-150 $\mu\text{m}$	270–300 min	<200 nm	6.2–7.6	Muc 2, 5B	Muc 3, 4, 12, 15, 17, 20, 21
<b>Vaginal</b>	20 $\mu\text{m}$	6 mL/d	60 nm	3.5–4.5	Muc2, 5AC, 5B, 6	Muc 1, 4, 16, 22

\***Abreviaturas.** Muc, mucina; NE, no encontrado. Tomado de Leal *et al.*, 2017; Chatterjee *et al.*, 2020; Paone & Cani, 2020; Vagios & Mitchell, 2021; Zhao *et al.*, 2022. La segunda región de las mucinas tiene poca O-glicosilación, pocos sitios de N-glicosilación y una alta proporción de dominios de cisteínas situados en los extremos amino y carboxilo y en menor proporción, entre los dominios PTS, lo cual promueve la formación de enlaces disulfuro. Estos dominios ricos en cisteína participan en la formación de dímeros y posteriormente se polimerizan para formar multímeros (Bansil & Turner, 2006; Bansil & Turner, 2018).





**Figura 6.** Diagrama esquemático de la estructura de la mucina. Monómero lineal de mucina constituido por repeticiones en tándem (VNTR) en la región central ricas en prolina (Pro), treonina (Thr) y serina (Ser) –PTS (verde) altamente glicosiladas. Las regiones amino y carboxilo terminal tienen mayor número de dominios ricos en cisteína (rojo) para la formación de dímeros. Patrón de glicosilación de las mucinas adaptado de Qu *et al.*, 2021.

Los carbohidratos representan el 40-80% de la mucina y consisten básicamente en N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa, ácido siálico, trazas de manosa y azúcares sulfatados. La estructura anfifílica de la mucina le permite atrapar de manera eficiente partículas extrañas a través de interacciones adhesivas polivalentes (Lai *et al.*, 2009).

Las mucinas se clasifican de acuerdo con el tipo de célula productora. Las mucinas secretadas, principalmente son sintetizadas por las células caliciformes y tienen la capacidad de formar geles, a excepción de la mucina 7, secretada abundantemente en saliva y en menor cantidad en tracto respiratorio, la cual es incapaz de formar geles. Por otra parte, las mucinas transmembranales se sintetizan, secretan y cubren la superficie apical de las células epiteliales, formando el glucocálix (Pelaseyed *et al.*, 2014; Paone & Cani, 2020).

### 2.6.3. Barrera de moco intestinal

La capa de moco intestinal desempeña funciones protectoras mecánicas, químicas y biológicas al mismo tiempo que contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal. Para desempeñar estas funciones, las células caliciformes cambian a lo largo del TGI y aumentan

proporcionalmente con el incremento en el número de microorganismos. En consecuencia, en humanos, el grosor del moco del intestino delgado es menor que en el colón (Paone & Cani, 2020).

De este modo, gran parte de los nutrientes pueden ser absorbidos por el epitelio mientras se limita el paso de microorganismos patógenos gracias a los péptidos antimicrobianos secretados por las células epiteliales intestinales de las criptas (Ermund *et al.*, 2013). En animales, los estudios sobre el grosor del moco intestinal aún son muy limitados y hay discrepancias en los datos informados. El grosor estimado de la capa de moco intestinal en ratones se muestra en la Tabla 3.

La mucina formadora de gel MUC-2 es la más abundante en intestino delgado y forma una capa discontinua sobre las células epiteliales (Pelaseyed *et al.*, 2014). El tamaño del poro en la malla de moco del intestino delgado incrementa desde la punta de las vellosidades hacia la cripta, lo que permite la permeación (Camilleri *et al.*, 2019). Sin embargo, las mucinas transmembranales continúan la protección frente a microorganismos que superan la capa de moco y median las interacciones huésped-microorganismos. Del mismo modo, la secreción de otras glicoproteínas como RELM- $\beta$ , Fcgbp, Agr2, ZG16, Lypd8 y Tff3, contribuyen a la protección y mantenimiento de la homeostasis (Allaire *et al.*, 2018).

La síntesis y secreción de las mucinas por las células caliciformes son procesos altamente regulados que, al igual que la degradación, dependen del peristaltismo y la ruptura enzimática microbiana. La tasa de recambio del moco intestinal es aproximadamente 240  $\mu\text{m}/\text{h}$  en humanos y 100  $\mu\text{m}/\text{h}$  en ratones. (Paone & Cani, 2020).

#### 2.6.4. Barrera de moco nasal

Al igual que en intestino, el moco nasal funciona como una barrera física e inmunológica protectora. Sin embargo, a diferencia de la capa de moco del TGI, el grosor en cavidad nasal es mucho más delgado (10 a 15  $\mu\text{m}$ ) (Beule, 2010) y la tasa de renovación es más rápida (10 min), con una velocidad de recambio en humanos aproximada de 100  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Cone *et al.*, 2009). La mucina formadora de gel MUC5AC, producida por las células secretoras y las glándulas de la submucosa, es el componente principal del moco en cavidad nasal. MUC1 y MUC4, mucinas transmembranales

con alto contenido de ácido siálico y sulfato, confieren carga fuertemente negativa al epitelio de las vías respiratorias, evitando la invasión del epitelio subyacente por patógenos (Chatterjee *et al.*, 2020).

Sin embargo, otras características son comunes entre la cavidad nasal y el intestino delgado, como el pH o el tamaño promedio del poro de la red de moco, por lo que ambos permiten la difusión de partículas y moléculas de menor viscosidad, mientras que limitan la movilidad de partículas conforme incrementa el tamaño de las mismas (Yildiz *et al.*, 2015).

## **2.7. Algunos desafíos de la administración de vacunas en las mucosas**

Las vacunas administradas vía mucosa, al igual que los microorganismos patógenos, se enfrentan a múltiples desafíos al intentar alcanzar los epitelios mucosos. Las formulaciones pueden degradarse enzimáticamente, diluirse en las secreciones mucosas, quedar atrapadas por la red de moco y ser eliminadas antes de alcanzar el epitelio. Por tanto, para inducir eficazmente respuesta inmune local de mucosa y realizar tránsito efectivo en el MALT, las formulaciones deben superar estas barreras.

### *2.7.1. Importancia de la mucoadhesión en la vacunación vía mucosa*

Dentro de las estrategias de administración de fármacos, uno de los fundamentos básicos es la adhesión y retención mejorada como un método eficaz para incrementar la biodisponibilidad de los componentes activos (Zhao *et al.*, 2022). Asimismo, en el diseño de vacunas para las mucosas se ha sugerido la relevancia de materiales más mucoadhesivos en las formulaciones para incrementar la eficacia.

#### *2.7.1.1. Mucoadhesión*

La mucoadhesión es la capacidad que tienen algunos materiales naturales o sintéticos, para adherirse al moco o al tejido epitelial y permanecer juntos durante un período prolongado de tiempo por fuerzas interfaciales. La interacción entre el material mucoadhesivo y el moco generalmente se describe en dos fases. En el "estado de contacto" el material y el moco se acercan, humectan e hinchan, con la subsecuente expansión y exposición de los sitios disponibles para la formación de enlaces químicos. Luego, en el "estado de consolidación" las cadenas de polímero se difunden en la

capa de moco y se movilizan, permitiendo la interpenetración e interdifusión, lo que resulta en adhesión prolongada (Leung y Robinson, 1990).

La literatura se refiere a seis teorías fisicoquímicas adaptadas para explicar las interacciones mucoadhesivas: electrónica, de adsorción, de humectación, de difusión, de fractura y mecánica. En todas ellas, las moléculas deben unirse a través de la interfaz, una capa formada entre el material bioadhesivo y el tejido mucoso, pero el tipo de enlace es diferente en cada caso (Shaikh *et al.*, 2011).

#### 2.7.1.2. *Partículas poliméricas mucoadhesivas y mucopenetrantes usadas en la vacunación vía mucosas*

Se ha reportado ampliamente que las vacunas para las mucosas podrán ser más exitosas cuando imitan los microorganismos, tal como lo hacen las vacunas multiméricas y/o particuladas. Se considera que las partículas son más accesibles a las células M, lo que facilita el transporte al MALT (Neutra & Kozlowski, 2006). Adicionalmente, los polímeros con capacidad mejorada de adhesión a la mucosa se retienen por tiempos prolongados, lo que puede aumentar la captación antigénica. Sin embargo, en la actualidad aún no hay un consenso en la literatura científica sobre el tiempo mínimo de retención en la mucosa que los sistemas adyuvantes basados en partículas poliméricas deban permanecer para impactar positivamente la respuesta inmune luego de la vacunación vía mucosa. En ensayos de trazabilidad *in vivo*, se han reportado tiempos de retención de las partículas en la mucosa que varían de acuerdo con el tipo de polímero entre 90 a 240 min y hasta 24 horas en estudios con tejidos *ex vivo* (Pawar *et al.*, 2016; Vyas *et al.*, 2020).

Las partículas son atrapadas en la red de moco a través de interacciones adhesivas polivalentes (Lai *et al.*, 2009). El ácido siálico y los grupos sulfato le confieren carga negativa a la mucina en la mayoría de las condiciones de pH; por tanto, las partículas con carga tendrán efecto de atracción o repulsión en la mucosa. Mientras que las partículas hidrofílicas se adhieren a los restos de la mucina cargados negativamente, principalmente en las regiones glicosiladas, las partículas hidrófobas se adhieren mediante enlaces de baja afinidad entre el núcleo de proteína de la mucina y la superficie de las partículas (Petrou & Crouzier, 2018).

La posibilidad de adherirse y difundir a través de la malla de moco también depende de las características fisicoquímicas de las partículas poliméricas. El tamaño del poro de la malla de moco restringe el paso de las partículas de acuerdo con su tamaño (Martău *et al.*, 2019; Lamson *et al.*, 2020);

sin embargo, partículas del mismo tamaño penetran la red de moco de acuerdo a la química de su superficie. De este modo, las partículas con carga neutra se difunden de forma más eficiente que las partículas funcionalizadas con grupos carboxilo o amino (Yildiz *et al.*, 2015; Bandi *et al.*, 2020). Igualmente, las partículas hidrofílicas pueden transportarse más rápido en el moco. Por tal razón, las estrategias para mejorar la adhesión y la mucopenetración en las vacunas para las mucosas incluyen polímeros que confieran hidrofiliidad, como el polietilenglicol (Serra *et al.*, 2006). En el desarrollo de vacunas para las mucosas es necesario, por tanto, incrementar el tiempo de residencia en la mucosa para permitir la difusión de las partículas en el moco, antes que las partículas sean eliminadas o removidas.

Hasta la fecha, se han construido y/o evaluado múltiples partículas poliméricas mucoadhesivas para la administración de vacunas para las mucosas. La mucoadhesión tiene un rol importante en la mejora de las respuestas inmune antígeno específica. Algunos ejemplos de sistemas de partículas poliméricas usados como adyuvantes mucosos cuya mucoadhesión se relaciona con la eficacia inmunogénica se muestran en la Tabla 4.

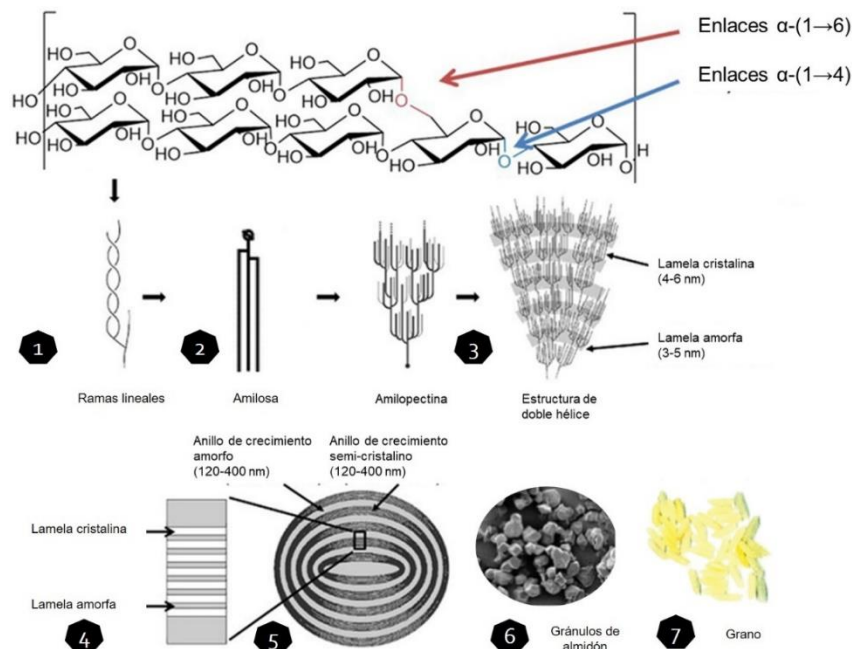
Tabla 4. Impacto de la mucoadhesión de adyuvantes poliméricos particulados en la inmunogenicidad después de la vacunación vía mucosa.

Tipo de partícula	Adyuvante/ inmuno- estimulante	Antígeno	Propiedades mucoadhesivas	Respuesta inmune	Ruta
<b>Obleas de carboximetil celulosa (CMC) y alginato (ALG)</b> Hanson <i>et al.</i> , 2021	$\alpha$ -GalSer	gp140 del VIH	CMC/ALG (2:1 and 1:1) mostraron mayor <i>Wad</i> y penetración a mucosa sublingual en comparación a BSA libre	Obleas más mucoadhesivas generaron mayor respuesta de células T en pulmones y ganglios linfáticos cervicales	sl
<b>NPs de xiloglucano</b> Vyas <i>et al.</i> , 2020	<i>Quillaja saponaria</i>	LPS de <i>B. abortus</i>	<i>Wad</i> de la vacuna fue mayor a la del vehículo y se retuvo más de 24h en tejido mucoso de cabra	NPs estimularon 1.5 veces más la respuesta inmune, con niveles más altos de IgG, IgG2a/IgG1 e IgA que el grupo que recibió solo el LPS	in
<b>NPs de quitosano aminado y quitosano aminado tiolado</b> Sinani <i>et al.</i> , 2019	-	BSA	<i>Wad</i> fue mayor para NPs de quitosano aminado y quitosano aminado tiolado, que para quitosano solo	Niveles superiores de IgG, IgG1, IgG2a sérica e sIgA vaginal con las NPs de quitosano aminado y quitosano aminado tiolado, comparado con BSA libre o CpG ODN-BSA	in
<b>MPs de quitosano recubiertas con alginato</b> Mangal <i>et al.</i> , 2014	-	rPA de <i>B. anthracis</i>	MPs-BSA se retuvieron más tiempo en yeyuno de rata que el BSA solo. MPs fueron captadas por células M	MPs-rPA indujeron títulos superiores de IgG séricos neutralizantes y sIgA en secreciones mucosas, comparado con rPA solo	in
<b>NPs de glicol quitosano</b> Pawar & Jaganathan, 2016	-	HBsAg	NPs de glicol quitosano se retuvieron por más tiempo (240 min) en la cavidad nasal de conejos, que el quitosano (180 min) o HBsAg (90 min) solos. Solo las NPs de glicol quitosano y quitosano se depositaron en el NALT de Balb/c (30 min)	NPs de glicol quitosano indujeron títulos mayores de IgG sérica e IgA salival, nasal y vaginal que las NPs de quitosano solo	in
<b><math>\gamma</math>-PGA</b> Noh <i>et al.</i> , 2015	MPL QS-21	OVA sM2HA2 de influenza	$\gamma$ -PGA aumento el tiempo de residencia de OVA en cavidad nasal de ratones hasta 12 h, comparado con OVA solo (6h)	Animales que recibieron las NPs tuvieron altos títulos de IgG, IgG, IgG2 séricos, IgA local y distal y mayores poblaciones de células productoras de IL-4 e IFN- $\gamma$ en bazos estimulados con antígenos, en comparación con los que recibieron los antígenos solos. Se incrementó el tiempo de supervivencia y se redujo la carga viral en pulmón, después del reto con influenza A	In

\***Abreviaturas.** NPs, nanopartículas; MPs, micropartículas. MPL, monofosfolil lípido-A; QS-21, derivado de *Q. saponaria*. BSA, albumina de suero humano; HBsAg, antígeno de superficie de hepatitis B; sM2HA2, proteína de matriz conservada 2 (sM2) y dominio del tallo de la hemaglutinina (HA2); OVA, ovoalbumina. *Wad*, trabajo de adhesión. CpG ODN, oligodesoxinucleótido (ODN) de citosina-fosfato-guanosina (CpG). sl, sublingual; in, intranasal.

## 2.8. Almidón en la vacunación vía mucosa

El almidón, principal polisacárido de reserva de las plantas, está compuesto de dos polímeros, la amilosa y amilopectina. La amilosa está formada por moléculas de  $\alpha$ -D-glucopiranososa ( $\alpha$ -D-glucosa) unidas linealmente por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), y con pocas ramificaciones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), separadas por largas distancias, lo cual genera un polímero prácticamente lineal. La mayoría de los almidones contienen 20-30% de amilosa. La amilopectina también se forma por moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa ligadas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), pero con aproximadamente 4-5% de ramificaciones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Las cadenas de amilopectina mayores a 10 residuos de glucosa se organizan en dobles hélices levógiras paralelas con 6 residuos de glucosa por giro, que se propone se pueden arreglar en formas cristalinas y que se estabilizan por puentes de hidrógeno (Preiss, 2009; Copeland *et al.*, 2009). Ambos polímeros se organizan en los gránulos de almidón formando una estructura densa e insoluble formada por capas radiales alternas con regiones cristalinas y amorfas (Cornejo-Ramírez, 2018). En la Figura 7 se muestra una representación esquemática de los diferentes niveles de organización del almidón en un grano



**Figura 7.** Niveles supramoleculares del grano de almidón. Las ramas lineales individuales de moléculas de almidón (1 nm) (1) se unen mediante enlaces glucosídicos para formar amilosa con pocas ramas largas o amilopectina hiperamificadas con ramas cortas (2). El empaquetamiento permite el entrelazamiento para formar dobles hélices (3) y luego bloques dispuestos con capas alternas de láminas cristalinas y amorfas (4). Estas láminas forman anillos de crecimiento con capas semicristalinas y amorfas (5) que forman un gránulo de almidón (6). Los gránulos interactúan con proteínas, lípidos y otros polisacáridos no amiláceos para formar el grano. Adaptada de O'Neil & Field, 2015.

### 2.8.1. Almidón modificado

A pesar de la abundancia, bajo costo y biodegradabilidad del almidón crudo, su uso se considera inapropiado en la industria de alimentos, fármacos y productos agrícolas debido a sus limitaciones funcionales como la insolubilidad, rápida retrogradación, pobre termoestabilidad o alta viscosidad (Egharevba & Emeje, 2019; Adewale 2022). Además, la liberación rápida de fármacos y moléculas bioactivas debido a la capacidad de hinchazón y degradación enzimática del almidón crudo, constituye un desafío. Por tal razón, se introducen grupos funcionales mediante modificaciones fisicoquímicas, orientadas a superar estas limitaciones, mejorar la estabilidad, reducir las propiedades no deseadas como la degradación y/o adicionar atributos (Bhatt *et al.*, 2022).

Diferentes almidones modificados se han estudiado como adyuvantes para la administración de vacunas por la vía mucosas. Por ejemplo, el grupo de investigación de McDermott sintetizó micropartículas conjugando almidón de papa soluble con polidimetilsiloxano, para la administración intragástrica y nasal de albumina de suero humano (HSA). Los animales que recibieron las micropartículas de almidón modificado mostraron títulos de anticuerpos IgG superiores comparado con el antígeno soluble o el control de vehículo, junto con la activación y proliferación de linfocitos de PPs y del NALT, respectivamente (Heritage *et al.*, 1998a, 1998b).

Por su parte, el grupo de investigación de Sjöholm preparó micropartículas mediante la polimerización de almidón hidrolizado con grupos acrílico. La inmunización oral y nasal de las micropartículas con el derivado no tóxico de la toxina diftérica, CRM197, indujo mayor producción de IgA en heces comparado con los que recibieron una vacuna comercial. La



administración oral favoreció la producción de anticuerpos neutralizantes (Rydell & Sjöholm 2004, Rydell *et al.*, 2005).

Recientemente, Fasquelle y colaboradores evaluaron la inmunogenicidad sobre células epiteliales de vías respiratorias de nanopartículas catiónicas preparadas con maltodextrina reticulada con epíclorhidrina y cargadas con albumina. A diferencia del antígeno libre y la nanopartícula cargada con el antígeno, la nanopartícula vacía no indujo la secreción de citocinas o quimiocinas. Los autores sugieren que las nanopartículas entregan los antígenos de forma más eficiente mejorando la inmunogenicidad del antígeno, sin tener el efecto inmunoestimulante descrito para la mayoría de adyuvantes (Fasquelle *et al.*, 2022)

Igualmente, se han diseñado almidones con propiedades mucoadhesivas mejoradas. Por ejemplo, almidón con alto contenido de amilosa diaminado, soluble y catiónico exhibió adhesión superior (5 días y 3 h) a la del quitosano (80 min) y a tabletas de almidón sin modificar (10 min), mediada por interacciones electrostáticas entre el polímero y el moco. Sin embargo, los tiempos de retención en la mucosa en ensayos *ex vivo* fueron menores (3 h para almidón modificado y quitosano), sin retención del almidón crudo (Nouri *et al.*, 2020). Almidón tiolado (Jelkmann *et al.*, 2018) o reticulado con polímeros sintéticos como el ácido poliacrílico (Gök *et al.*, 2016) son otros ejemplos de almidones modificados con propiedades mucoadhesivas mejoradas.

### **2.8.2. Almidón crudo**

A la fecha, solo nuestro grupo de investigación ha reportado el uso de un almidón crudo, es decir, sin ninguna modificación fisicoquímica, para la administración de vacunas vía mucosas. La inmovilización del antígeno se lleva a cabo a través de la fusión con un dominio de unión al almidón (DFA<sub>tag</sub>), lo que permite la adsorción del antígeno a la superficie de la micropartícula a través de puentes de hidrogeno, interacciones hidrófobas e interacciones CH- $\pi$ , en las que el plano del anillo aromático de los aminoácidos se orienta en forma perpendicular a los enlaces C-H de los carbohidratos en una geometría de apilamiento (Armenta *et al.*, 2019).

Guillen y colaboradores observaron niveles superiores de anticuerpos IgG contra TetC después de la administración intragástrica de la proteína inmovilizada en las MPAs, comparado

con los animales que recibieron el antígeno sin inmovilizar. Esta respuesta se correlacionó con el retraso en la aparición de los síntomas luego del reto con la toxina (Guillen *et al.*, 2014).

Paralelamente, Moreno-Mendieta y colaboradores observaron que fusionar el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* Acr al DFA<sub>tag</sub> e inmovilizarlo sobre las MPAs se promovía la inmunogenicidad de un antígeno pobremente inmunogénico luego de su administración nasal u oral. Además, la inmovilización a MPAs permitió la modulación de la respuesta inmune, con predominio de IgG2a sistémica y producción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos estimulados con Acr (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

A continuación, las MPAs se usaron como refuerzo nasal de la vacuna BCG en un modelo murino de tuberculosis experimental crónica. Las micropartículas de almidón solas o en combinación con el antígeno Acr prolongaron la supervivencia, redujeron la carga bacilar en pulmón y el porcentaje de área pulmonar con neumonía comparado con los animales solamente vacunados. Contrario a lo reportado con sistemas de almidón modificado, los hallazgos de este estudio sugieren la capacidad inmunoestimulante del almidón crudo (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017).

Con estos antecedentes se decidió adicionar directamente a las MPAs como adyuvante de la vacuna BCG, realizando la administración simultánea de estas por la vía subcutánea. La administración parenteral de MPAs sorprendentemente tuvo un impacto en el tracto respiratorio inferior, con reducción de la carga de *M. tuberculosis* e incremento en la tasa de supervivencia de los animales dependiendo de la virulencia de la cepa usada para el reto (Moreno-Mendieta *et al.*, 2019).

La comprensión del mecanismo detrás del efecto inmunoestimulante observado requiere muchos y diversos estudios, pero pasa en primera instancia por entender la interacción con la primera barrera que encuentran las MPAs y, por la distribución *in vivo* de estas después de su entrada por las vías mucosas.

---

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

Los polímeros con base en almidón han sido ampliamente explorados para su uso en la industria farmacéutica y en menor proporción, para la liberación de antígenos en formulaciones de vacunas. Previamente, se demostró que la inmunización vía mucosas con antígenos inmovilizados sobre almidón crudo induce respuesta inmune específica y contribuye en la eficacia protectora; sin embargo, se desconocen aún los mecanismos subyacentes.

Como parte de la comprensión de los mecanismos adyuvantes del almidón crudo en vacunación para las mucosas, este proyecto establecerá las interacciones entre el almidón crudo y los tejidos de la mucosa. Se estudian las propiedades mucoadhesivas y mucopenetrantes, la capacidad de alcance a los tejidos linfoides asociados a mucosa, la biodistribución y la inocuidad, como procesos iniciales involucrados en la inmunogenicidad lograda con su uso. La integración de los hallazgos obtenidos en la caracterización del almidón crudo, permitirá consolidar el uso del sistema DFAtag-almidón para el desarrollo de vacunas para las mucosas.

---

### 4. HIPÓTESIS

---

Las propiedades inmunoestimulantes de las micropartículas de almidón crudo se explican por la retención y la mucoadhesión inicial del almidón en los tejidos mucosos, así como por su capacidad de alcanzar los sitios inductores de la respuesta inmune de la mucosa.

---

## 5. OBJETIVOS

---

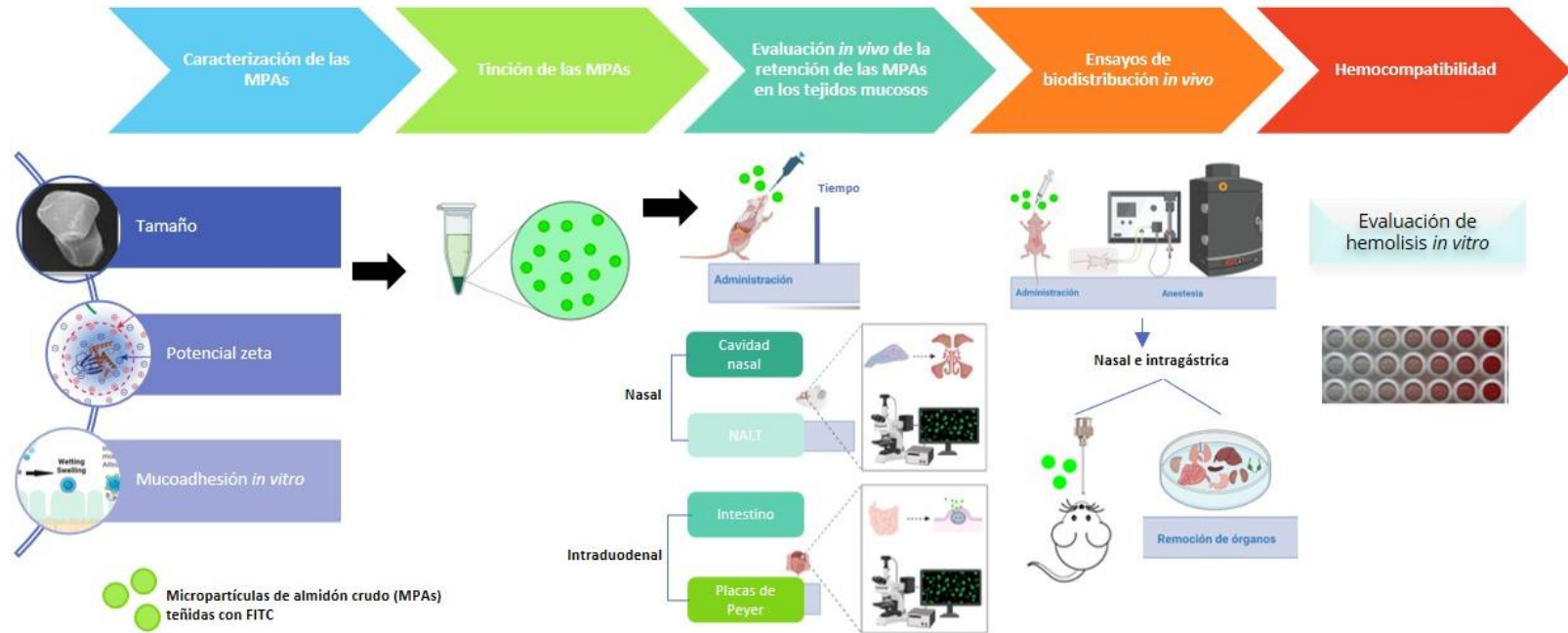
### 5.1. Objetivo general

Estudiar las propiedades mucoadhesivas y la biodistribución de las micropartículas de almidón crudo luego de la administración por vías mucosas en un modelo murino.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* la mucoadhesión de las micropartículas de almidón crudo.
2. Evaluar la retención de las micropartículas de almidón crudo en vías mucosas luego de la administración nasal e intraduodenal.
3. Determinar la capacidad de las micropartículas de almidón crudo para alcanzar los sitios inductores de la respuesta inmune en mucosa luego de la administración nasal e intraduodenal.
4. Describir la distribución *in vivo* de las micropartículas de almidón crudo del almidón crudo luego de su administración por vías mucosas.
5. Evaluar la hemocompatibilidad de las micropartículas de almidón crudo.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



---

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 7.1. Preparación de la suspensión de almidón crudo

Micropartículas de almidón de arroz (MPAs) insoluble se lavaron tres veces con agua desionizada estéril fría, centrifugando cada vez a  $2.570 \times g$  durante 3 min. Suspensiones de MPAs en agua desionizada estéril o PBS (solución amortiguadora de fosfatos 10 mM y NaCl 150 mM) se prepararon al inicio de cada experimento, ajustando el pH de acuerdo con el experimento.

### 7.2. Preparación del almidón crudo teñido con FITC

El almidón se tiñó con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) (F7250-50 MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU) mediante adsorción, siguiendo las recomendaciones del fabricante con menores modificaciones al protocolo. 10 mg de MPAs se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y se suspendieron en solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.1 M, pH 9. Para la tinción, 50  $\mu$ L de una solución fresca de FITC en dimetilsulfóxido (0.5 mg/mL) fueron adicionados a la suspensión de MPAs (10 mg/mL). La suspensión fue incubada durante 8-12 horas a 4°C en agitador rotatorio (Mini LabRoller™ Rotator, Labnet, NJ, EE. UU.), protegida de la luz para evitar el fotoblanqueo del FITC. Una vez terminada la incubación, para extinguir la reacción de tinción se adicionó a la mezcla cloruro de amonio a una concentración final de 50 mM y se incubó en refrigeración (4°C) durante 2 horas. Luego, para remover el FITC no unido a las MPAs, la muestra se centrifugó a  $2.570 \times g$  durante 3 min y se lavó con agua desionizada estéril 6 veces, hasta obtener una solución transparente en el sobrenadante del lavado. Finalmente, las MPAs se suspendieron en PBS pH 7.4.

La captura de imágenes de las MPAs teñidas con FITC (MPAs-FITC) se realizó en el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EE. UU.) a una longitud de onda de excitación de 488 nm, en la Unidad de Microscopía del Instituto de

Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM. El análisis de imágenes se realizó con la versión libre del programa para análisis de Image J.

### 7.3. Caracterización del almidón crudo

#### 7.3.1. *Tamaño y potencial zeta*

La distribución de tamaño y morfología de las MPAs sin tinción se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) usando el microscopio JEOL-JSM-6390LV (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, EE. UU.). Las MPAs en polvo se sujetaron al porta-muestra con una cinta conductora adhesiva de doble cara y se recubrieron con oro en el cobertor iónico Denton Vacuum Desk IV (NJ, EE. UU.) durante 2 min. Las imágenes de electrones secundarios se obtuvieron excitando la muestra con voltajes de aceleración de 20 kV y una magnificación de 1.000X y 5.000X, en el Laboratorio de Microscopía del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). La distribución del tamaño de partícula se calculó analizando al menos 500 partículas, usando el software OriginLab® 2021 (versión de prueba).

A su vez, el tamaño de las MPAs-FITC se determinó mediante difracción láser (DL) utilizando el equipo Mastersizer 2000 con el sistema de dispersión húmeda Hydro 2000 S (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). El tamaño promedio de las partículas se expresó como la media ponderada por volumen. Adicionalmente, la distribución del tamaño de las partículas se expresó en términos del factor SPAN, calculado como:

$$SPAN = d90 - d10 \times d50 \quad (1)$$

donde las distribuciones de tamaño de partículas  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$  corresponden a los percentiles (10%, 50%, 90%) de partículas por debajo del tamaño de partícula informado. Un valor SPAN alto indica una distribución de tamaño de partícula más disperso. Las mediciones se realizaron 6 veces.

Por otra parte, se determinó el potencial zeta ( $\zeta$ ) de la suspensión de MPAs y MPAs-FITC en agua desionizada estéril (100  $\mu\text{g/mL}$ ) mediante microelectroforesis de láser Doppler y

dispersión de luz para análisis de fase (M3-PALS), utilizando el instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, Reino Unido). Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### 7.3.2. Estabilidad del almidón teñido con FITC

Para determinar la estabilidad de la fluorescencia de las MPAs-FITC, se evaluó la emisión de fluorescencia en función del tiempo y del pH. Para ello, MPAs-FITC en una concentración de 0.5 mg/mL fueron suspendidas en 100  $\mu$ L de PBS (0.1 M, pH 7.4), fluido gástrico simulado (FGS) (3.2 mg/ml de pepsina, NaCl 30 mM y HCl 86 mM, pH 2) y fluido intestinal simulado (FIS) (10 mg/ml de pancreatina,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M y NaOH 0.2 N, pH 6.8) (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, 2004), e incubadas a 37°C en agitación continua (100 r.p.m) en oscuridad. Después de los tiempos de incubación específica (0, 60, 240 y 480 min) las MPAs se centrifugaron a 2.570  $\times$  g por 3 min y se suspendieron en su buffer fresco. Se registro la emisión de fluorescencia de las MPA en suspensión comparándola con el tiempo 0. Además, se obtuvo la emisión de la fluorescencia después del lavado de las MPAs con PBS (0.1 M, pH 7.4), para confirmar la recuperación de la fluorescencia dependiente de pH. Del mismo modo, se evaluó la estabilidad de la tinción con FITC tras el proceso de digestión simulada, incubando la suspensión de MPAs-FITC con FGS durante 2 horas, seguido de la incubación de la mezcla con FIS durante 2 h, ajustando el pH a 7.0.

Cada suspensión se midió por triplicado usando 100  $\mu$ L de muestra en microplacas de 96 pozos de fondo sólido negro (Thermo Fisher, Dinamarca). La emisión de fluorescencia del FITC se registró a 525 nm, utilizando la longitud de onda de excitación de 495 nm en el lector de placas Biotek Synergy H4™ Hybrid (VT, EE. UU.).

### 7.4. Evaluación *in vitro* de la mucoadhesión del almidón crudo

#### 7.4.1. Preparación de las suspensiones madre de mucina

Se prepararon soluciones madre (10 mg/mL) de mucina submaxilar bovina (MSB o tipo I-S, Sigma Aldrich) y mucina gástrica porcina (MPG o tipo III, Sigma Aldrich), suspendiendo cada mucina en solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.1 M, pH 5.8, pH 6.8 o agua desionizada pH 2 ajustada con ácido clorhídrico para simular las condiciones de fluido gástrico. Para la



homogenización de las suspensiones de mucina, las soluciones fueron agitadas (200 r.p.m) durante 12 horas a temperatura ambiente, seguido de 5 ciclos de sonicación de 10 segundos a una frecuencia de 30 Hz (1 pulso cada 50 segundos) (Vibra-Cell™, VCX 130 PB/VCX 130 FSJ, Sonic, CT, EE. UU.) y filtradas con filtro de 0.45 µm (MF-Millipore™, Darmstadt, Alemania). Las soluciones madre de mucina se almacenaron a 4°C protegidas de la luz, repitiendo el paso de agitación y sonicación previo a cada uso.

#### 7.4.2. Ensayos de adsorción de mucina a las micropartículas de almidón crudo

Para este ensayo, se adaptó un protocolo utilizando las metodologías de adsorción de proteínas al almidón (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000) y la espectroscopía de fluorescencia para la evaluación de la mucoadhesión (Ouellette *et al.*, 2018). En primer lugar, se prepararon suspensiones madre de MPAs (5 g suspendidos en 40 mL) y se lavaron como se describe en la sección 7.1. Suspensiones secundarias de MPAs se prepararon en PB 0.1 M, pH 5.8, pH 6.8 o agua destilada ajustada a pH 2 (1.5 g suspendidos en 40 mL). Simultáneamente, se prepararon soluciones de trabajo de mucina de 0.4 mg/mL. Una curva estándar de mucina (0.01 a 0.5 mg/mL) se realizó para cada ensayo, leyendo el pico máximo de absorbancia a 220 nm, con el objetivo de verificar la correcta disolución de las mucinas.

Para cada ensayo (pH 2, 5.8 y 6.8), cantidades crecientes de MPAs (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 5.0, 10, 20, 40, 80 y 100 mg) se mezclaron con las soluciones de MSB o MPG (0.4 mg/mL) y se incubaron durante 60 min a 37°C en agitación rotatoria constante. Suspensiones con MPAs, MSB o MPG solas se incubaron en las mismas condiciones como controles. Subsecuentemente, las muestras se centrifugaron a  $3.075 \times g$  durante 3 min, a 4° y se separó cuidadosamente la mucina no unida de las MPAs.

La fluorescencia intrínseca de las mucinas no unidas, emitida predominantemente por los residuos de triptófano y tirosina (Ouellette *et al.*, 2018), se registró usando el espectrofluorómetro de recuento de fotones PC1 (ISS Ins., EE. UU.) en el Laboratorio de Química e Ingeniería de Proteínas de la UNAM. Las muestras fueron excitadas a 287 nm (MPG) y 289 nm (MSB) y el espectro de emisión fue registrado en el rango de 310-500 nm a 25°C. Se empleó una rendija

espectral (slit), tanto de emisión como de excitación, de 1 cm. Los resultados reportados son el promedio de dos mediciones independientes.

Adicionalmente, se utilizó potencial- $\zeta$  para evaluar las propiedades mucoadhesivas de las MPAs. Se escogieron las suspensiones de 1 mg de almidón y mucinas (0.4 mg/mL y 10 mg/mL) en PB, pH 5.8 y pH 6.8 para el análisis.

#### 7.4.3. Evaluación del poder de hinchamiento del almidón crudo

El poder de hinchamiento de las MPAs se determinó siguiendo el protocolo previamente reportado por Li y Yeh (2001) con ligeras modificaciones. Suspensiones de MPAs (10 mg/mL) en agua destilada, PBS (0.1 M, pH 7.4), FGS o FIS se incubaron durante 5, 60, 120 y 240 min a 37 °C en un agitador rotatorio. MPAs calentadas a 70°C en un baño de agua con agitación se usaron como control positivo de hinchamiento. A continuación, las muestras se centrifugaron a 17.709  $\times$  g durante 20 min y se pesó tanto el sedimento de MPAs ( $W_s$ ) como el sobrenadante ( $W_1$ ) secos. El poder de hinchamiento se calculó con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice de absorción de agua (WSI)} = [W_1/0.1] \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Poder de hinchamiento} = W_s[0.1(100\% - WSI)](\text{g/g}) \quad (3)$$

Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### 7.5. Tiempo de residencia *in vivo* y biodistribución de las micropartículas de almidón crudo

#### 7.5.1. Animales

Ratones hembra Balb/c de 10 a 14 semanas de edad fueron obtenidos en la Unidad de Modelos Biológicos del IIB. Los animales se alojaron bajo condiciones de temperatura y humedad controlada, con ciclos de luz/oscuridad, en condiciones libres de patógenos y con acceso *ad libitum* a alimento y agua. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IIB, UNAM (Protocolo 193) y las especificaciones técnicas mexicanas para el cuidado y experimentación animal.

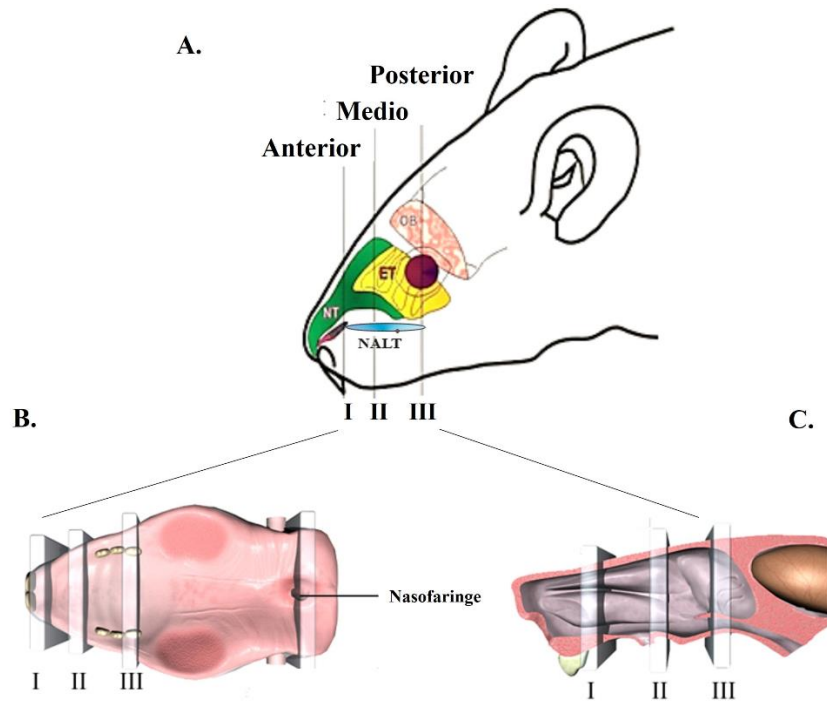
## 7.5.2. Análisis de microscopía confocal de barrido láser

### 7.5.2.1. Extracción de la cavidad nasal

Con el objetivo de evaluar el depósito y la distribución de las MPAs en la cavidad nasal, 1 mg de MPAs-FITC suspendidas en 20  $\mu$ L de PBS (10 mM, pH 7.4) se administraron vía nasal a ratones Balb/c mediante goteo nasal con una micropipeta (n=15). Los animales fueron sacrificados a los 5, 60, 240, 480 min y 24 horas después de la administración. Asimismo, animales control fueron administrados vía nasal con PBS (10 mM, pH 7.4) y sacrificados a los 60 min (n=3), siguiendo en todos los casos el protocolo de fijación por perfusión vascular descrito a continuación (Gage *et al.*, 2012). Brevemente, los ratones fueron anestesiados profundamente mediante una inyección subcutánea con Ketamina (Anesket®, PiSA Agropecuaria, Ciudad de México, México) /Xilacina (Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania) (K/X: 100 y 10 mg/kg, respectivamente) y luego se perfundieron por gravedad a través del ventrículo izquierdo con solución lavadora (PB 10 mM, 5.96 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.35 mM KCl, 0.145 M NaCl, pH 7.4 frío), seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en PBS (0.1 M pH 7.4, fresco). Las cabezas se removieron, se retiró la piel que rodea el cráneo junto con la mandíbula inferior y los ojos, para postfijación a 4°C durante 24 horas en ~20 mL de PFA 4% sin agitación y protegidas de la luz. Luego de la fijación, las cabezas se transfirieron a un vial con ~20 mL de soluciones de sacarosa del 10 al 30% (p/v) en PB (0.1 M, pH 7.4) durante 3 días con permanencia de 24 horas en cada solución.

A continuación, las cabezas se lavaron con agua desionizada estéril, se sumergieron en un vial con ~20 mL de solución de descalcificación (EDTA 10%, pH 7.4; St. Louis, MO, EE. UU.) y se mantuvieron a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 15-18 días, siguiendo el protocolo descrito por Guibas (2014) con ligeras modificaciones. La solución de descalcificación se reemplazó cada 24-48 horas. Una vez descalcificadas, las cabezas se lavaron minuciosamente con agua desionizada estéril durante 2 horas y se seccionaron transversalmente, inicialmente bajo el microscopio estereoscópico en tres partes: región anterior (inmediatamente posterior a los dientes incisivos), región media (a nivel de la papila incisiva) y región posterior (la mitad del segundo diente molar) con la ayuda de una cuchilla de acero reutilizable para criostato (Figura

8). Cada espécimen se embebió en medio de congelación (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems, Alemania), se congeló inmediatamente en hielo seco y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 8.** Esquema de la anatomía de la cavidad nasal murina. A) Representación esquemática de regiones de la cavidad nasal de ratones Balb/c, B) con vista transversal y C) parasagital del cráneo. B y C, imágenes tomadas y adaptadas de las guías revisadas para el muestreo y corte de órganos en ratas y ratones del NIH (del inglés "National Institute of Environmental Health Sciences").

#### 7.5.2.2. Recuento de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en la cavidad nasal

Para cada tiempo muestreado, se realizaron cortes transversales de  $6\ \mu\text{m}$  de grosor de las regiones anterior, media y posterior de la cavidad nasal, a un intervalo constante de  $150\ \mu\text{m}$ , con un criostato marca Leica modelo CM1850 (Leica Biosystems, Alemania), los cuales se adhirieron a portaobjetos recubiertos con gelatina ( $75 \times 25\ \text{mm}$ ). Los cortes transversales se usaron para cuantificar las MPAs-FITC en la cavidad nasal después de teñir los núcleos celulares con DAPI (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

La captura de las imágenes y el conteo de las MPAs se realizó usando el modo confocal del microscopio BX51-WI (Olympus, Center Valley, PA, EE. UU.) acoplado a la unidad de disco giratorio (DSU) y equipado con el software Stereo Investigator (v9 MBF Bioscience, Vermont, EE. UU.g). Se usaron los filtros para FITC-GFP;  $\lambda_{ex}$  (475/42) y  $\lambda_{em}$  (534/30) y DAPI  $\lambda_{ex}$  (365/50) y  $\lambda_{em}$  (450/58) para la captura de imágenes de fluorescencia multicolor. Para ello, se realizó la reconstrucción de la cavidad nasal mediante el trazado del área total de cada corte de tejido utilizando el software Stereo Investigator (MBF Bioscience, Vermont, EE, UU.). Se observaron cinco cortes de cada región de la cavidad nasal, para un total de 750  $\mu\text{m}$  analizadas por cada región. Las imágenes reconstruidas se evaluaron en el programa NeuroExplorer (MBF Bioscience, Vermont, EE. UU.) en la Unidad de Microscopía del IIB de la UNAM. El análisis de imágenes se realizó utilizando ImageJ. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### *7.5.2.3. Localización de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en el tejido linfoide asociado a la nasofaringe*

Animales del grupo de MPAs-FITC ( $n= \geq 5$ ) y control ( $n=3$ ) recibieron en dosis única vía nasal, 1 mg MPAs-FITC suspendidas en 20  $\mu\text{L}$  de PBS (10 mM, pH 7.4) y 20  $\mu\text{L}$  de PBS (10 mM, pH 7.4), respectivamente, mediante goteo nasal con micropipeta. El NALT, el tejido localizado bilateralmente en la región anterior del paladar duro (Velin *et al.*, 1997) se aisló a los 5, 120 o 240 min posteriores a la administración nasal, siguiendo la metodología descrita por Cisney y colaboradores (2012).

Para esto, después de la anestesia descrita en la sección 7.5.2.1, se removió la cabeza del ratón a lo largo de la línea entre la mandíbula superior e inferior. Después de retirar cuidadosamente la piel facial de la cabeza, los músculos y huesos subyacentes, la lengua y cortar la punta de la nariz, usando el filo de una aguja calibre 18 se removió el paladar duro bajo el microscopio estereoscópico (Olympus) y con la ayuda de un fórceps, se separó el tejido de los dientes incisivos y molares. A fin de aplanar el tejido, se presionó entre dos portaobjetos durante la postfijación con PFA al 4% (24 horas) y luego, se incubó a 4°C con recambios en soluciones de sacarosa (10%, 20% y 30%) por al menos 24 horas en cada solución. Finalmente, el tejido fue

embebido en medio de congelación (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems, Alemania), se congeló en hielo seco y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Crio secciones longitudinales de 10 µm fueron preparadas con un criostato (Leica CM 1850, Alemania) sobre portaobjetos gelatinizados. Las imágenes fueron observadas con el microscopio BX51-WI en el IIB de la UNAM. El análisis de las imágenes se realizó en Image J. Los experimentos se realizaron al menos tres veces.

#### *7.5.2.4. Localización de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en el intestino delgado*

Para determinar la localización de las partículas en el intestino delgado, los animales se mantuvieron en ayuno con agua *ad libitum* aproximadamente durante doce horas y se dividieron al azar en dos grupos: animales que recibieron las MPAs-FITC (n=9) y animales control administrados con PBS (10 mM, pH 7.4) (n=3). Después del período de ayuno, los ratones fueron anestesiados siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.5.2.1 y se realizó una cirugía para la inyección intraduodenal de una dosis única MPAs-FITC (1 mg de almidón suspendido en 100 µL de PBS (10 mM, pH 7.4) en el lumen del intestino delgado, la cual se describe en detalle en el Anexo A.

A los 5, 120 o 240 min después de la inyección intraduodenal, los animales fueron nuevamente anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal (200 mg/kg) para perfusión vascular como se describió anteriormente (sección 7.5.2.1). El intestino delgado fue desenrollado, separado cuidadosamente del mesenterio y transferido a una caja de Petri. Bajo el microscopio estereoscópico, los segmentos del intestino que contenían las PPs se localizaron y cortaron en segmentos de ~0.5-1 cm (4-5 por animal). Los restos fecales intestinales fueron removidos mediante lavado con PBS (10 mM, pH 7.4) frío con una jeringa.

Previo a la crio sección, las PPs se sumergieron en PFA 4% para potsfijación durante 24 horas, seguido de gradientes de sacarosa durante 3 días (10%, 20%, and 30%, al menos 24 horas en cada solución). Cada segmento del intestino se embebió en medio de congelación (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems, Alemania), se congeló inmediatamente en hielo seco y se

almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Cortes transversales de un grosor de  $10\ \mu\text{m}$  se realizaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  usando el criostato. Las imágenes fueron capturadas en el microscopio confocal BX51-WI (Olympus, Center Valley, PA, EE. UU.). El análisis de imágenes fue hecho usando Image J. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### 7.5.3. *Microscopía electrónica de barrido*

Cavidades nasales y PPs fueron obtenidas como se describe para los análisis de microscopía confocal de barrido láser (MCBL) en los apartados previos. Los tejidos almacenados en medio de congelación fueron descongelados a temperatura ambiente y lavados en PBS (10 mM, pH 7.4). Las regiones anterior, media y posterior de la cavidad nasal se seccionaron transversalmente en segmentos más pequeños ( $\sim 1\ \text{cm}$ ) usando una cuchilla afilada. Por su parte, el segmento del intestino que contenía las PPs se cortó longitudinalmente con unas tijeras para exponer las vellosidades intestinales y se mantuvo extendido, sujetado por sus cuatro extremos a una caja de Petri. Ambos tejidos fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %), secados, puestos en un porta-muestras de metal usando cinta de carbono de doble cara y recubiertos con oro por pulverización catódica (Denton Vacuum Desk IV, EE. UU.). Las preparaciones se examinaron por MEB en el equipo JEOL-JSM-6390LV (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, EE. UU.) del Laboratorio de Microscopía del CICATA, IPN, empleando voltajes de aceleración de 20 kV y diferentes magnificaciones según el análisis de interés.

## 7.6. Biodistribución *in vivo* de las micropartículas de almidón crudo

### 7.6.1. *Imágenes de fluorescencia de todo el cuerpo*

El patrón de biodistribución *in vivo* de las MPAs-FITC se examinó en ratones que recibieron las partículas vía mucosa. Los animales se alojaron aleatoriamente en grupos de tres ratones por caja para el experimento. El día previo a la administración, se retiró completamente el pelo de los animales con crema depilatoria (Veet® Sensitive Skin, Slough, Reino Unido) bajo anestesia, con el fin de minimizar la interferencia con las señales de imagen. Se administró una dosis única de MPAs-FITC vía intragástrica (1 y 5 mg suspendidos en  $100\ \mu\text{L}$  de 10 mM PBS, pH 7.4) o nasal (1 y 3 mg suspendidos en  $20\ \mu\text{L}$  de 10 mM PBS, pH 7.4). Para discriminar la señal de

fluorescencia endógena a lo largo del tiempo, en cada experimento se incluyó un animal control administrado con PBS (10 mM, pH 7.4). Las imágenes de cuerpo completo se adquirieron bajo anestesia con isoflurano al 2% utilizando el sistema de anestesia con gas XGI-8 (Caliper Life Sciences Inc., Hopkinton, MA, EE. UU.). Las imágenes de fluorescencia se capturaron a los 20, 45, 90, 240 y 420 min en el sistema de imágenes *in vivo* IVIS Lumina XR III (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) del CICATA, IPN. Los ratones se recuperaron de la anestesia entre cada captura de imagen, permitiendo el acceso a alimento y agua *ad libitum*.

La emisión de fluorescencia del FITC se registró a una longitud de onda de 520 nm luego de la excitación a 480 nm, 0.75 - 1 segundos de exposición, binning medio, F/stop: 1 y campo de visión de 12.5 cm<sup>2</sup> (D). La IF se determinó por la medida de la fluorescencia dentro de la región de interés (ROI) seleccionadas para cada animal usando el software Living Image® 4.5.2 (IVIS Spectrum, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Cada ensayo se realizó al menos dos veces.

#### 7.6.2. Imágenes de fluorescencia de órganos

Debido a la capacidad limitada del FITC para penetrar los tejidos (3-4 mm) (Chin *et al.*, 2012), se usaron ratones en experimentos independientes para la administración nasal (1 y 3 mg MPAs-FITC en 10 mM PBS, pH 7.4) y oral (1 mg y 5 MPAs-FITC en 10 mM PBS, pH 7.4). Después de 30 y 60 min, los ratones fueron anestesiados para eutanasia siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.5.2.1 y el corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, vejiga, estómago, intestino delgado y nódulos linfáticos cervicales fueron colectados. Imágenes de fluorescencia *ex vivo* de los órganos completos fueron capturadas usando el sistema de imágenes del IVIS Lumina XR III, bajo las mismas condiciones descritas para los experimentos de captura de imágenes de cuerpo completo. Los datos fueron expresados usando Living Image Software 4.5.2 (IVIS Spectrum).

### 7.7. Toxicidad del almidón crudo sobre los glóbulos rojos humanos

En un ensayo *ex vivo*, se probó la actividad hemolítica de las MPAs sobre glóbulos rojos humanos siguiendo el protocolo descrito previamente por Evans y colaboradores (2013). Para esto, se obtuvieron muestras de sangre anticoaguladas con EDTA de un voluntario sano bajo



consentimiento informado del uso de su sangre con fines de investigación. Suspensiones de eritrocitos con MPAs en diferentes concentraciones se adicionaron en placas de fondo plano de 96 pozos como se describe en el Anexo B. A continuación, las muestras se incubaron en un agitador orbital a 37 °C durante 1 hora. Los sobrenadantes removidos luego de centrifugación (500  $\times$  g por 5 min), se transfirieron a una nueva placa de 96 pozos para su lectura en un espectrofotómetro Biotek Epoch <sup>TM</sup> 2 (Agilent, CA, EE. UU.), a una longitud de onda de 400-541 nm. Se realizó una curva de hemólisis con detergente Tritón X-100 (0-180  $\mu$ g/mL). El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(\text{Abs de la muestra}) - (\text{Abs control negativo})}{(\text{Abs control Positivo}) - (\text{Abs control negativo})} \quad (4)$$

### 7.8. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media de tres experimentos  $\pm$  desviación estándar (DE). Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism 8.0 para Windows. El análisis de comparación se realizó mediante análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni o Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de  $p < 0.05$ .

---

## 8. RESULTADOS

---

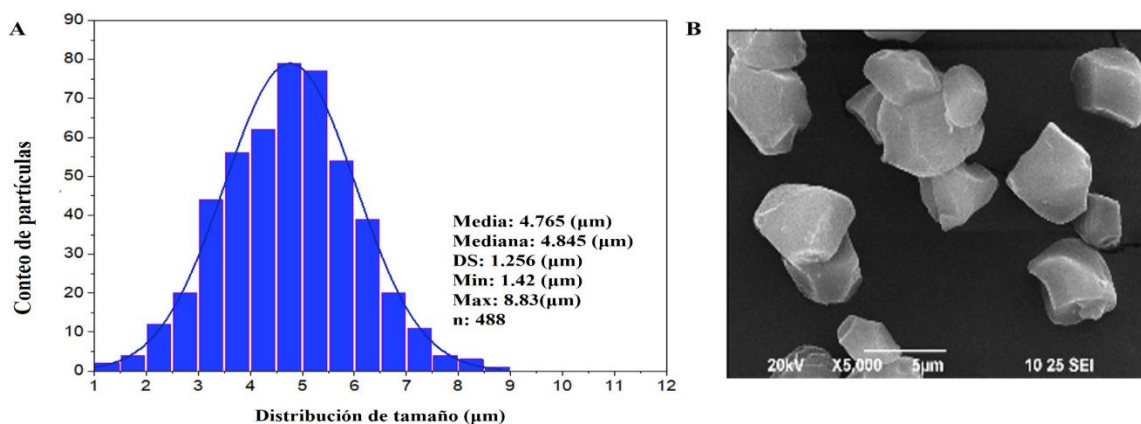
### 8.1. Caracterización del almidón crudo

#### 8.1.1. Tinción del almidón crudo teñido con FITC

La concentración de FITC requerida para que el 100% de las MPAs en suspensión estuvieran teñidas se determinó mediante la observación de la fluorescencia independiente de cada micropartícula en imágenes de microscopía confocal. La concentración mínima para la tinción del total de 10 mg de MPAs fue 0.5 mg/mL de FITC (Anexo C).

#### 8.1.2. Tamaño y potencial zeta

Inicialmente, la evaluación del tamaño medio de las MPAs suspendidas en agua desionizada se realizó mediante dispersión de luz dinámica (DLS). El alto índice de polidispersión de la muestra (PDI >1.0) indicó una distribución de tamaño de partícula muy amplia y, por tanto, que la muestra no era adecuada para analizarse por este método, razón por la que se escogió MEB para las mediciones. El histograma de distribución de los diámetros del área proyectada de las partículas mostró que las partículas tienen un tamaño entre 1.42 a 8.83  $\mu\text{m}$ , con un tamaño promedio de  $4.77 \pm 1.26 \mu\text{m}$  (Figura 9). Las micrografías obtenidas por MEB para MPAs, mostraron micropartículas irregulares y poligonales, con superficies horizontales lisas, tal como se ha reportado previamente para el almidón de arroz (Wani *et al.*, 2012).



**Figura 9.** Distribución de tamaño y morfología de las micropartículas de almidón crudo. (A) Histograma de distribución de tamaño de MPAs obtenido a partir de imágenes de MEB en una cuadrícula de  $1280 \times 960$  píxeles y aumento 1000X. (B) Imagen MEB de MPAs 5000X, 20 kV. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ .

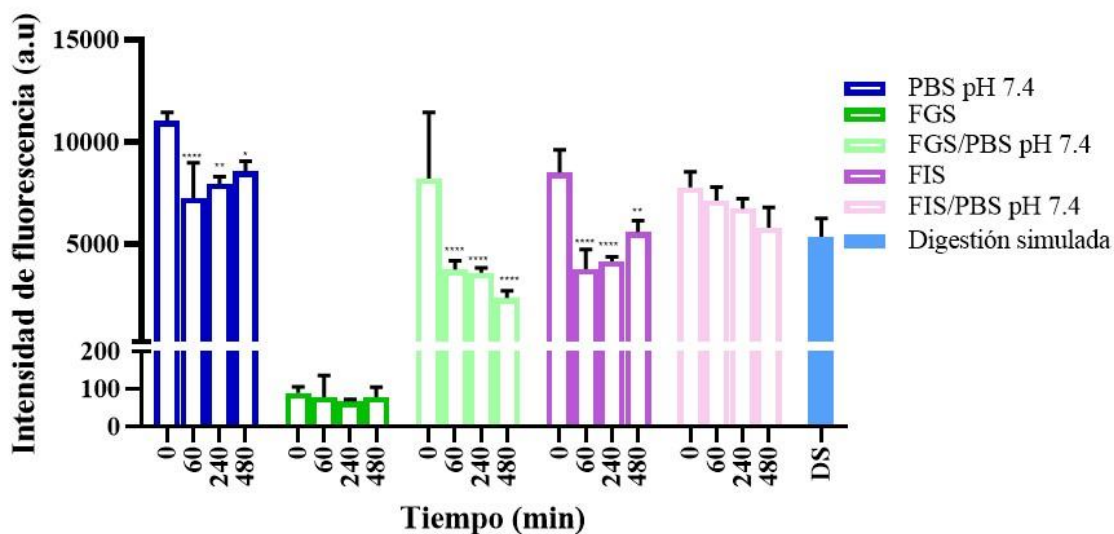
Por su parte, la distribución de tamaño de las MPAs-FITC evaluadas mediante difracción láser indicó que el 90% ( $D_{90}$ ) de las partículas miden menos de  $9.78 \pm 3.06 \mu\text{m}$  y el 10% ( $D_{10}$ ) menos de  $1.48 \pm 0.71 \mu\text{m}$ , con tamaño de partícula medio ponderado por volumen de  $5.86 \pm 1.17 \mu\text{m}$  y una dispersión de la población (Span) de 1.4. Con esta misma técnica, las partículas no teñidas tuvieron un tamaño promedio de  $4.84 \pm 0.83 \mu\text{m}$ .

El potencial- $\zeta$  de las MPAs fue negativo ( $-13.5 \pm 0.4 \text{ mV}$ ) en concordancia con lo reportado para algunos almidones crudos (McNamee *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2020), al igual que el de las MPAs teñidas con el fluorocromo ( $-14.3 \pm 0.7 \text{ mV}$ ), sin observar una diferencia significativa. En general, estos datos sugieren que la tinción con FITC no introduce modificaciones en el tamaño y potencial zeta que pudiera suponer cambios en las interacciones *in vivo* con mucosa en experimentos posteriores.

### 8.1.3. Estabilidad del almidón teñido con FITC

La fluorescencia del FITC depende en gran medida del pH de su entorno y de la temperatura. Para investigar si ocurría el desprendimiento del fluorocromo en las condiciones fluctuantes de pH que ocurren al interior de un organismo, se evaluó la fluorescencia de las MPAs-FITC en condiciones simuladas del TGI y en PBS 10 mM, pH 7.4 en los mismos tiempos en los que se observó la fluorescencia de las micropartículas en los experimentos *in vivo*. El exceso de iones  $\text{H}^+$  en pH ácido conduce a la protonación de los anillos aromáticos conjugados, lo cual se refleja en la pérdida de emisión de luz (Salari *et al.*, 2019). La Figura 10 muestra la IF de 0.5 mg/mL de MPAs-FITC en PBS pH 7.4 y en condiciones de fluido gástrico e intestinal simulado. Antes de la incubación, la mayor IF de las MPAs-FITC se obtuvo con la solución amortiguadora a pH 7.4. Como era esperado, se observó una reducción drástica de la IF en FGS (pH 2) que fue reversible y se recuperó al lavar el almidón con PBS pH 7.4.

La incubación de las MPAs-FITC a 37°C redujo la IF en todas las condiciones de pH respecto a la IF al inicio del ensayo. No obstante, si se analiza por condición, la IF se mantuvo después de los 60 min y hasta las 8 horas sin diferencias estadísticamente significativas, lo cual evidencia que el FITC permanece unido a las MPAs al menos en las condiciones probadas. La IF de las MPAs-FITC sometidas a condiciones intestinales simuladas se recuperó luego del lavado con PBS pH 7.4, con una IF cercana a la de las MPAs en PBS pH 7.4 ( $5.352 \pm 903$  au). Aun cuando la IF de las MPAs-FITC incubadas a 37°C en condiciones gástricas también se recupera luego de los lavados con PBS pH 7.4, la IF fue más baja comparada con la incubación en condiciones intestinales (sin significancia estadística). Estos resultados permitieron demostrar la pertinencia del FITC para los estudios de localización y distribución *in vivo* de las MPAs hasta los 480 min.



**Figura 10.** Emisión de fluorescencia de las micropartículas de almidón teñidas con FITC en función del pH. Se comparan los cambios en la intensidad de fluorescencia de las MPAs teñidas con FITC en diferentes condiciones de pH. La IF de las MPAs en PBS pH 7.4, fluido gástrico simulado (FGS) pH 2 y fluido intestinal simulado (FIS) pH 6.8 se comparó con la IF de las muestras incubadas a 37°C entre 60 y 480 min. Luego de la incubación en FGS o FIS, se realizó un lavado con PBS pH 7.4, para asegurar la recuperación de la fluorescencia.  $\lambda_{ex}$ : 495, nm,  $\lambda_{em}$ : 525 nm. La significancia estadística se determinó mediante dos ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Tukey, \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , \*\*,  $P < 0.001$ , \*,  $P < 0.01$ .

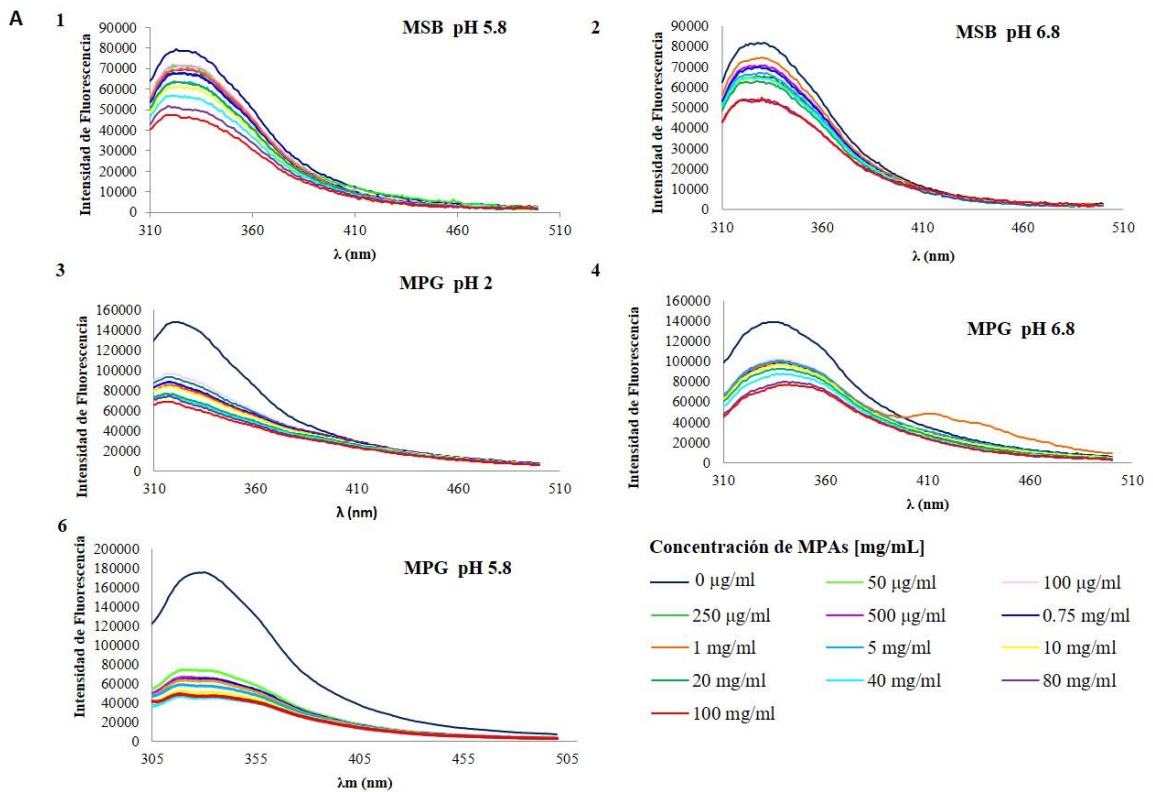
## 8.2. Mucoadhesión *in vitro* del almidón crudo

Existen diferentes pruebas analíticas basadas en el conocimiento actual sobre los mecanismos de mucoadhesión y adaptadas para cada tipo de polímero. Estas evalúan el rendimiento mucoadhesivo de los sistemas poliméricos, desde la interacción inicial con el moco (estado de contacto), hasta el establecimiento de las interacciones adhesivas (estado de consolidación).

En este trabajo, se adaptó un ensayo *in vitro* que pretendía imitar las condiciones de pH, temperatura, concentraciones de polímero y tipo de mucina de la cavidad nasal y gastrointestinal, para establecer las posibles interacciones adhesivas. Para ello, se realizó espectroscopía de fluorescencia luego de la adsorción de las MPAs a las mucinas comerciales MPG y MSB.

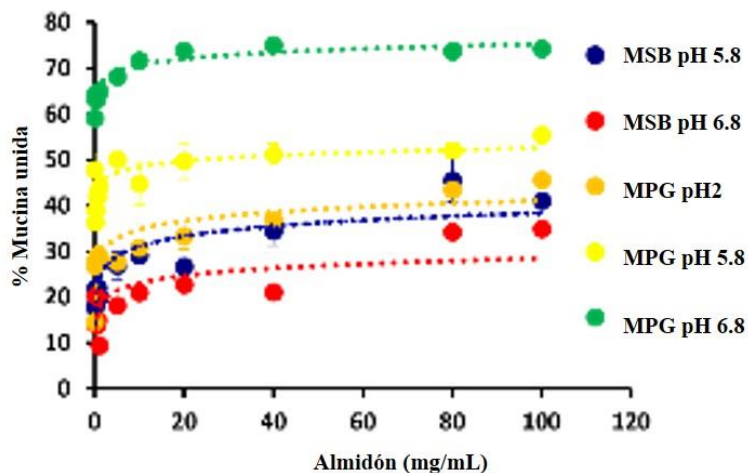
En primer lugar, se determinó la longitud de onda de excitación de las mucinas comerciales. Se observó una modificación en el espectro de emisión de fluorescencia intrínseco, con un ligero corrimiento en la longitud de onda máxima dependiente de la concentración de mucina (Anexo D). De acuerdo a los espectros obtenidos la máxima intensidad de fluorescencia de las mucinas a una concentración de 0.4 mg/mL se alcanza a una longitud de onda de excitación de 287 nm para MPG y 289 nm para MSB. El registro de la emisión de fluorescencia se realizó entre 310-510 nm.

Una vez establecidas las condiciones para el ensayo de absorción, concentraciones crecientes de MPAs se incubaron con las mucinas en diferentes condiciones de pH gástricas e intestinales simuladas, como se describe en materiales y métodos. Se encontró que la adición de cantidades crecientes de MPAs indujo la disminución gradual de la fluorescencia intrínseca de las mucinas no unidas (Figura 11), lo cual indica que hubo una disminución en las concentraciones de la mucina soluble debido a su interacción con las MPAs. El cambio de la intensidad de la señal de emisión de fluorescencia y de la longitud de onda de emisión máxima también se observó luego del ensayo post-adsorción de la mucina a las MPAs en todas las condiciones de pH y tipo de mucina.



**Figura 11.** Espectros de emisión de fluorescencia de las mucinas incubadas con diferentes concentraciones de micropartículas de almidón crudo. Espectro de emisión de fluorescencia de la (A) MSB en PBS pH 5.8, (B) MSB en PBS pH 6.8, (C) MPG a pH 2, (D) MPG en PBS pH 6.8 y (E) MPG en PBS pH 5.8.  $\lambda_{ex}$ : 287 nm MPG y 289 nm MSB,  $\lambda_{em}$ : 310-500 nm. MSB, mucina submaxilar bovina; MPG, mucina porcina gástrica.

Las MPAs se unieron de forma más eficiente a la MPG (hasta 74.2% a pH 5.8, 55.4% a pH 2 y 45.6% a pH 6.8) que la MSB (hasta 41.1% a pH 5.8 y 34.9% a pH 6.8) (Figura 12). La curva del sistema mucina-almidón, muestra, además, que se alcanza la saturación a una concentración mayor de 20 mg de MPAs. Estos resultados demuestran que las MPAs se adhieren a la mucina, pero esta mucoadhesión depende del tipo de mucina. Las MSB y MPG representan un modelo relevante para el estudio de mucinas presentes en tracto oral-nasal y gastrointestinal, respectivamente. Por tanto, se espera que un porcentaje mayor de MPAs se adhiera en la mucosa gastrointestinal que en la cavidad nasal *in vivo*.



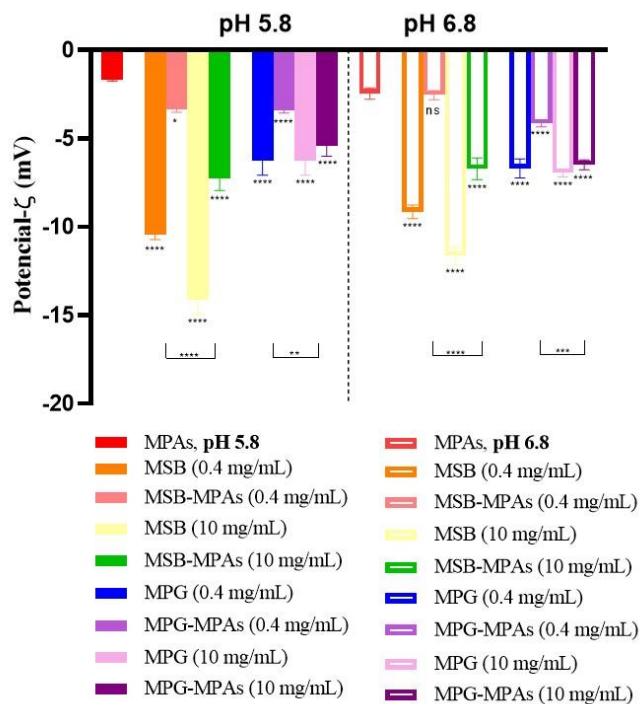
**Figura 12.** Mucoadhesión in vitro de las micropartículas de almidón crudo. Porcentaje de mucina unida calculada a partir de datos de espectroscopía de fluorescencia. Se midió la fluorescencia intrínseca de las mucinas en los sobrenadantes luego de la adsorción entre mucina porcina gástrica (MPG) o mucina submaxilar bovina (MSB) y concentraciones crecientes de MPAs (de 50  $\mu\text{g/mL}$  a 100  $\text{mg/mL}$ ) en condiciones gástricas e intestinales simuladas.

Con el fin de profundizar en el entendimiento las propiedades mucoadhesivas del almidón, se investigaron las interacciones de las MPAs con las mucinas a través monitoreo del potencial- $\zeta$ . Se ha reportado que si los materiales tienen propiedades mucoadhesivas el potencial- $\zeta$  de las partículas con la mucina adsorbida en la superficie se modificará con respecto al potencial- $\zeta$  de las partículas solas y los controles de mucina (Mangiacotte *et al.*, 2020). Los valores de potencial- $\zeta$  obtenidos de los controles de mucinas y las MPAs con y sin mucina en condiciones de pH simuladas se muestran en la Figura 13.

El análisis potencial- $\zeta$  de las MPAs en soluciones amortiguadoras mostró reducción de su potencial- $\zeta$  respecto a su en agua destilada. Así, el potencial- $\zeta$  de las MPAs suspendidas en PB pH 5.8 y pH 6.8 fue  $-1.69 \pm 0.06$  mV y  $-2.46 \pm 0.26$  mV, respectivamente. Por otro lado, al analizar el potencial- $\zeta$  de las mucinas se observó en concordancia con lo que otros autores han reportado, que el potencial- $\zeta$  fue negativo, con variaciones de acuerdo con el pH (Sogias *et al.*, 2008) y la concentración de mucina.

Posteriormente, se midieron los cambios en el potencial- $\zeta$  de las mucinas luego de la adición de las MPAs (Figura 13). La concentración del polímero probada (1  $\text{mg/mL}$ ) corresponde

a la utilizada en los experimentos posteriores *in vivo*. La adición de dos concentraciones diferentes de mucinas comerciales provocó que el potencial- $\zeta$  de la muestra disminuyera significativamente en todas las condiciones respecto al potencial- $\zeta$  de las MPAs, pero no respecto al control de mucina. Los valores de potencial- $\zeta$  dependen de las concentraciones y pasaron a valores más negativos con un aumento en la concentración de mucina.

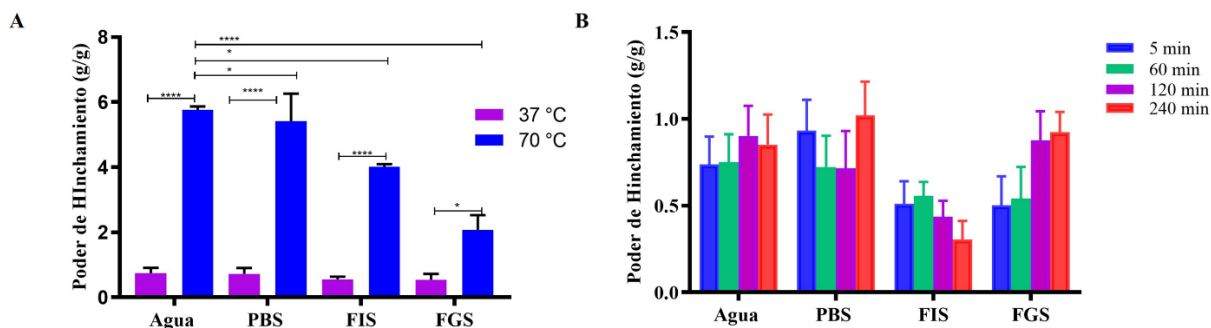


**Figura 13.** Potencial zeta de las suspensiones de mucina con la adición de almidón crudo La capacidad de adhesión se evaluó mediante la medición del potencial- $\zeta$  de 1 mg de MPAs en soluciones de mucina (0.4 mg/mL y 10 mg/mL) después de 60 min de incubación a 37°C. La significancia estadística se determinó mediante una ANOVA con test post hoc de Tukey. \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; ns, no significativo. Los datos se expresan como la media de 3 experimentos  $\pm$  DE. MSB, mucina submaxilar bovina; MPG, mucina porcina gástrica; MPAs, micropartículas de almidón crudo.

Como parte de la comprensión de la interacción mucina-almidón, se evaluó el hinchamiento de las MPAs, es decir la capacidad de retención de agua. La Figura 14 muestra los resultados de hinchamiento de las MPAs a 37°C y 70°C en agua destilada estéril, PBS (0.1 M, pH 7.4), FGS o FIS. El hinchamiento de los gránulos de almidón es un proceso que depende del incremento de la temperatura e inicia cercano a la temperatura de gelatinización (alrededor de



65-70°C según la fuente botánica) (Vandeputte *et al.*, 2003). Los resultados ponen en evidencia que a temperaturas inferiores (37°C) no hay hinchamiento del almidón crudo en ninguno en los tiempos y condiciones probadas.

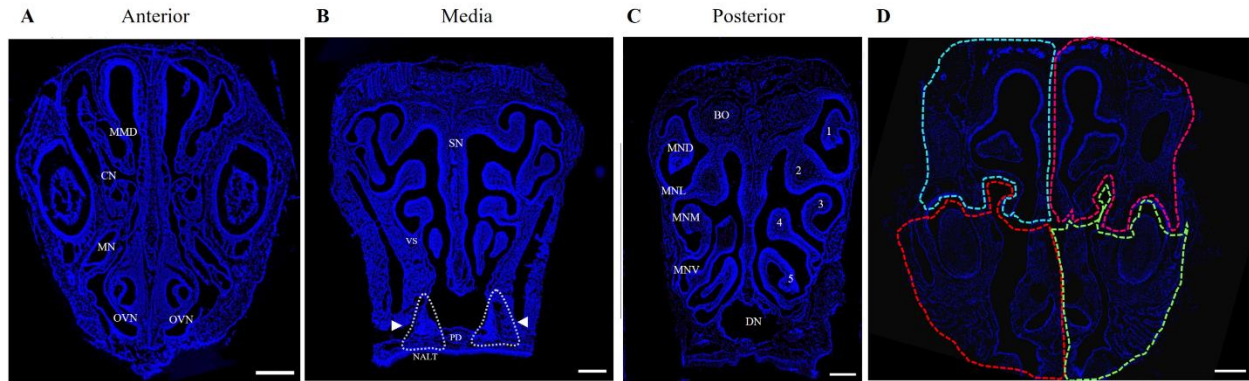


**Figura 14.** Poder de hinchamiento de las micropartículas de almidón crudo. (A) Hinchamiento de las MPAs en función de la temperatura (37°C y 70°C) en agua destilada, PBS pH 7.4, fluido intestinal simulado (FIS) y fluido gástrico simulado (FGS) a los 60 min. (B) Hinchamiento de las MPAs a 37°C a diferentes tiempos. La significancia estadística se determinó mediante dos ANOVA con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ , \*\*,  $P < 0,05$ , \*,  $P < 0,002$ .

A diferencia de lo descrito para otros polímeros (Suksamran *et al.*, 2013, Stie *et al.*, 2020), las MPAs *in vitro* mostraron ser mucoadhesivas sin necesidad de hincharse en la etapa de contacto. La ausencia de hinchamiento podría facilitar *in vivo* el paso de las micropartículas a través del poro de la red de moco sin el impedimento estérico ocasionado por el incremento de tamaño.

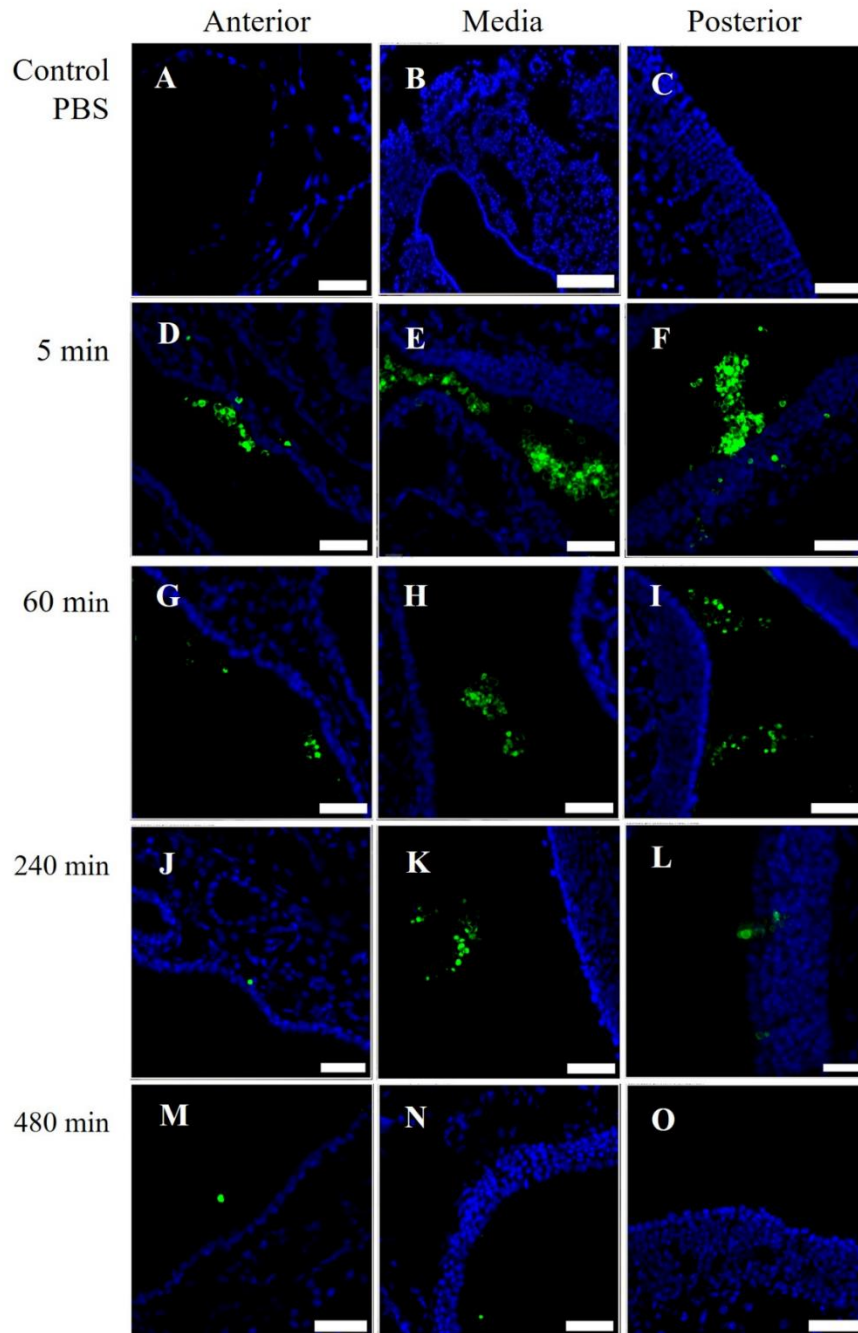
### 8.3. Tiempo de residencia y distribución *in vivo* del almidón crudo en la cavidad nasal

El siguiente objetivo fue estudiar el potencial mucoadhesivo *in vivo* de las MPAs evaluando el tiempo de retención de las MPAs-FITC en la mucosa nasal. La trazabilidad de las micropartículas se realizó mediante la visualización de los tejidos en MCBL, seguido de la estimación del número de partículas en cada región de la cavidad nasal. Para el conteo de las MPAs, se observaron previamente los cortes de tejido garantizando la localización anatómica deseada y la integridad del tejido. Las regiones anterior, media y posterior fueron ubicadas, así como los epitelios transicional, respiratorio y olfativo, respectivamente (Alvites *et al.*, 2018) (Figura 15).



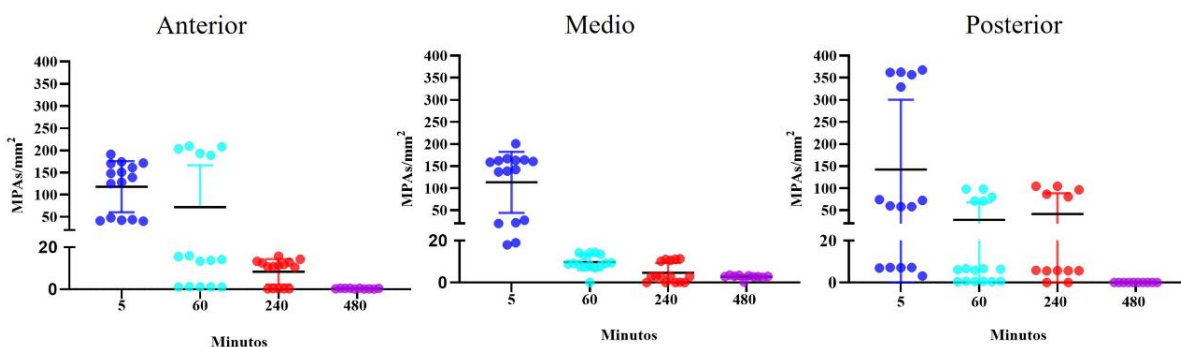
**Figura 15.** Secciones transversales de la cabeza de ratones Balb/c, desde niveles anteriores a posteriores. Imágenes de MCBL de cortes transversales de tejido que muestran la disposición de la estructura nasal desde (A) la región anterior y (B) media, hasta la (C) posterior de la cavidad nasal de ratones Balb/c. MMD: meato medial dorsal, CN: cornete nasal, MN: maxilocornete nasal, OVN: órgano vomeronasal, SN: septo nasal, VS: ventana septal, NALT: tejido linfóide asociado a la nariz, PD: paladar duro, BO: bulbo olfatorio, MND: meato nasal dorsal; MNL: meato nasal lateral; MNM: meato nasal medio; MNV: meato nasal ventral; DN: conducto nasofaríngeo; 1-5: cornetes nasales. D) Representación de la subdivisión en secciones en el software Stereo Investigator. Núcleos celulares teñidos con DAPI (azul). Barra de escala: 500  $\mu$ m.

Posteriormente, se realizó un muestreo aleatorio sistemático garantizando que las imágenes consecutivas no permitieran el mismo campo de visión. El color azul en las imágenes muestra el núcleo en cada célula teñido con DAPI en la región de la submucosa, con una aparente integridad del epitelio después de la exposición a las partículas. La señal fluorescente verde correspondiente a las MPAs, mostró la distribución heterogénea en todas las regiones de la cavidad nasal, los pasajes del aire, así como el depósito sobre los cornetes nasales y las superficies epiteliales (Figura 16).



**Figura 16.** Localización de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en el pasaje nasal luego de la administración nasal. Imágenes de MCBL de secciones de cornetes nasales de la región anterior (A, D, G, J, M), la región media (B, E, H, K, N) y la región posterior (C, F, I, L, O) de la cavidad nasal en diferentes puntos de tiempo. FITC-MPAs (verde), núcleo de las células teñidas con DAPI (azul). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

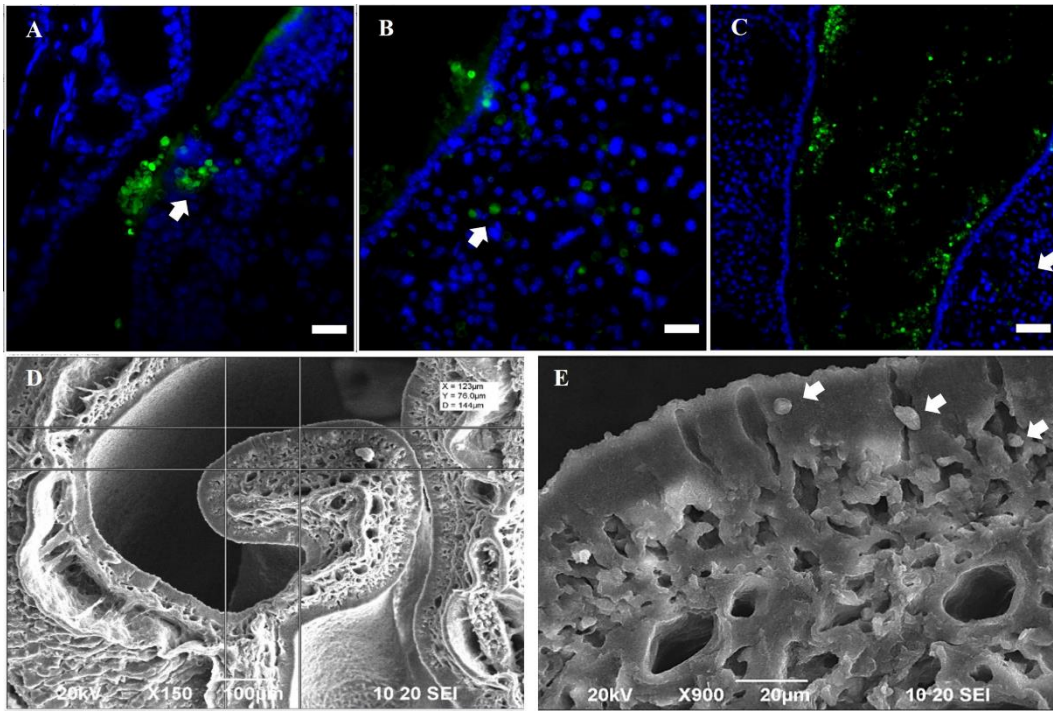
Se contaron las MPAs en 5 cortes por región en cada periodo de tiempo. Se encontró un descenso gradual del número de MPAs por mm<sup>2</sup> en el tiempo hasta los 480 min, sin observar un patrón de depósito en ninguna región de la cavidad nasal (Figura 17).



**Figura 17.** Retención a distintos tiempos post-administración de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC en la cavidad nasal de ratones Balb/c. El número de FITC-MPAs por unidad de área (mm<sup>2</sup>) se calculó en la región anterior, media y posterior de la cavidad nasal. Cada punto (•) representa un corte (30 cortes/tiempo). Las barras representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos.

Aunque se observó una tendencia en la distribución espacial de las partículas mayoritaria en los cornetes nasales y paredes septales y menor en los extremos laterales e inferiores, no tuvo una diferencia estadísticamente significativa en el conteo de MPAs.

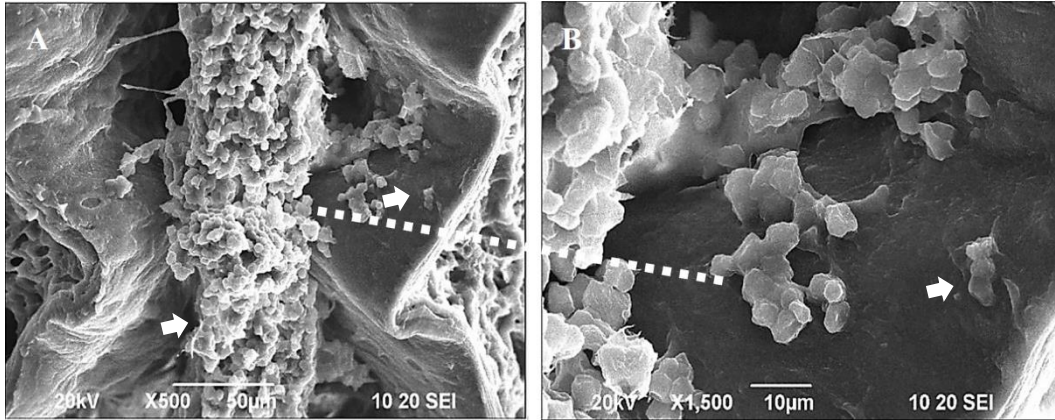
Otro hallazgo relevante observado en las imágenes de microscopía confocal fue la capacidad de las MPAs para moverse rápidamente y translocarse desde el lumen a través de los diferentes epitelios de la cavidad nasal hacia el tejido subyacente (Figura 18). Las MPAs cruzaron el epitelio nasal sin evidencia de internalización por las células epiteliales y se alojaron en diferentes localizaciones anatómicas, incluidos tejidos glandulares, órgano vomeronasal, tabique nasal y otros tejidos de la submucosa. Se confirmó el paso de las MPAs en las observaciones de MEB en el epitelio olfativo 60 min después de la exposición a una dosis única. Las MPAs se localizaron en los espacios intercelulares entre las células epiteliales, por lo que los mecanismos de transporte de las partículas deben ser estudiados en experimentos posteriores.



**Figura 18.** Paso de micropartículas de almidón crudo a través del epitelio de la cavidad nasal en ratones *Balb/c*. Imágenes de MCBL de las regiones (A) anterior, (B) media y (C) posterior de la cavidad nasal después de 5 min de administración nasal. Las flechas blancas apuntan hacia las MPAs-FITC (verdes) que han cruzado la barrera epitelial. Núcleo celular teñido con DAPI (azul). Barras de escala: 50  $\mu$ m. El rectángulo en la imagen (D) de MEB muestra la ubicación en el cornete nasal del epitelio respiratorio, donde las MPAs fueron observadas atravesando el epitelio a los 60 min en la imagen magnificada en (E).

Una imagen representativa de secciones transversales del tejido muestra, además, la distribución de las MPAs atrapadas a la red moco (Figura 19). La MEB permitió evidenciar la retención de las MPAs en las regiones anterior, media y posterior de la cavidad nasal hasta por 24 h, mayoritariamente en el septo nasal, a diferencia de los tiempos menores reportados mediante MCBL.



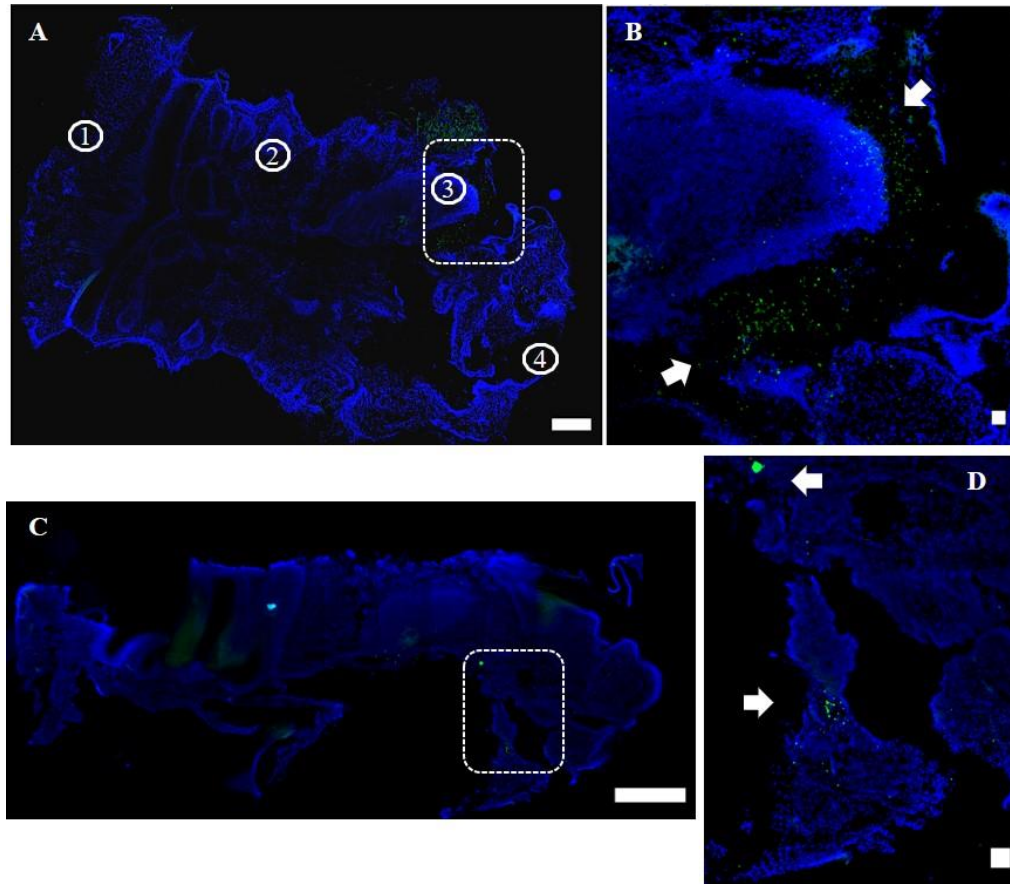


**Figura 19.** *Micropartículas de almidón crudo en la cavidad nasal de ratones Balb/c 24 horas después de la administración nasal.* Imágenes de MEB muestran secciones transversales de la cavidad nasal con (A) las MPAs (flechas blancas) en el tabique nasal. (B) Ampliación original 1500X.

#### **8.4. Alcance de las micropartículas de almidón crudo a los tejidos linfoides asociados a la mucosa**

##### *8.4.1. Localización en el tejido linfóide asociado a la nasofaringe después de la administración nasal*

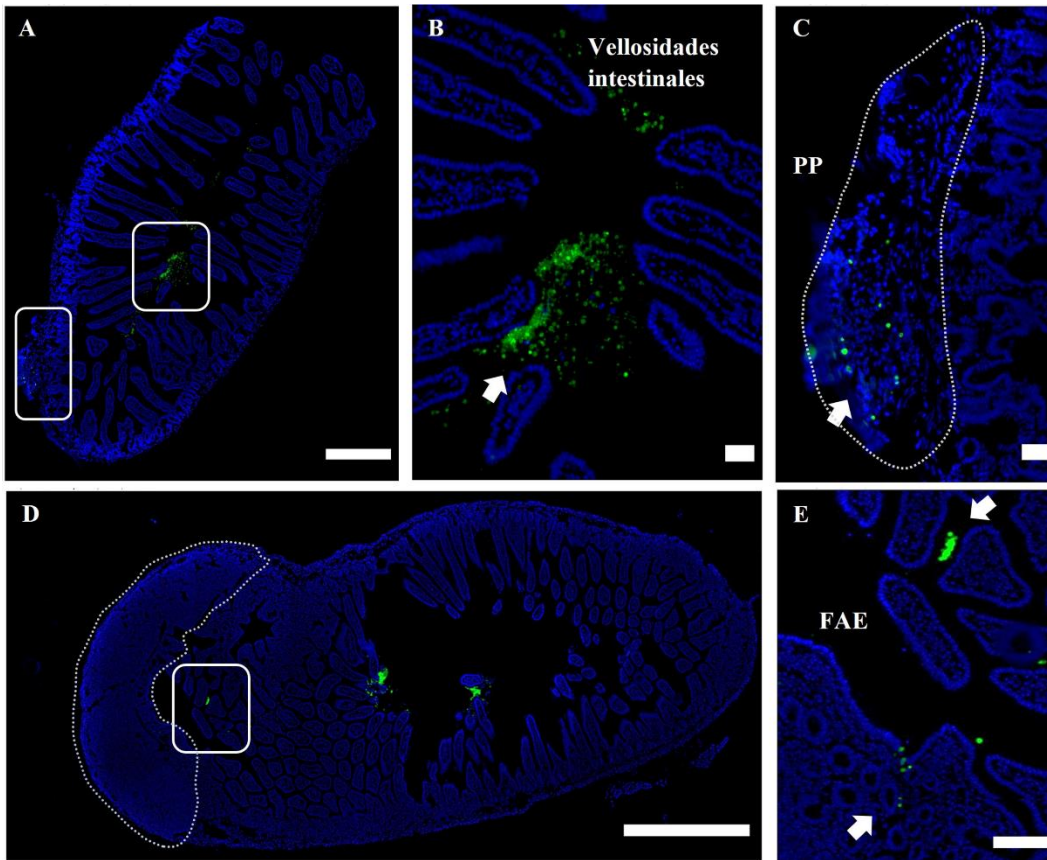
Con el objetivo de explicar si las respuestas adyuvantes e inmunoestimulantes observadas en trabajos previos con MPAs eran facilitadas por la capacidad de alcanzar los sitios inductores de la respuesta inmune de mucosa, en este trabajo se evaluó el alcance de las MPAs-FITC al NALT luego de la administración nasal. Imágenes representativas de secciones longitudinales del NALT se muestran en la Figura 20 luego del monitoreo de ausencia/presencia de las MPAs en el tejido. Si bien, a los 5 min no se observaron micropartículas en el tejido, cantidades apreciables de MPAs-FITC se localizaron a las 2 y 4 horas entre los estantes palatinos elevados del paladar adyacentes al NALT.



**Figura 20.** Localización de las micropartículas de almidón teñidas con FITC en el tejido linfoide asociado a nariz de ratones *Balb/c*. MCBL del paladar duro a (A-B) las 2h y (C-D) y 4h después de la administración. Los rectángulos en las figuras (A) y (C) indican áreas de aumento en las figuras (B) y (D), respectivamente, donde se observan las FITC-MPAs (flechas blancas).

#### 8.4.2. Localización en la mucosa intestinal y placas de Peyer después de la administración intraduodenal

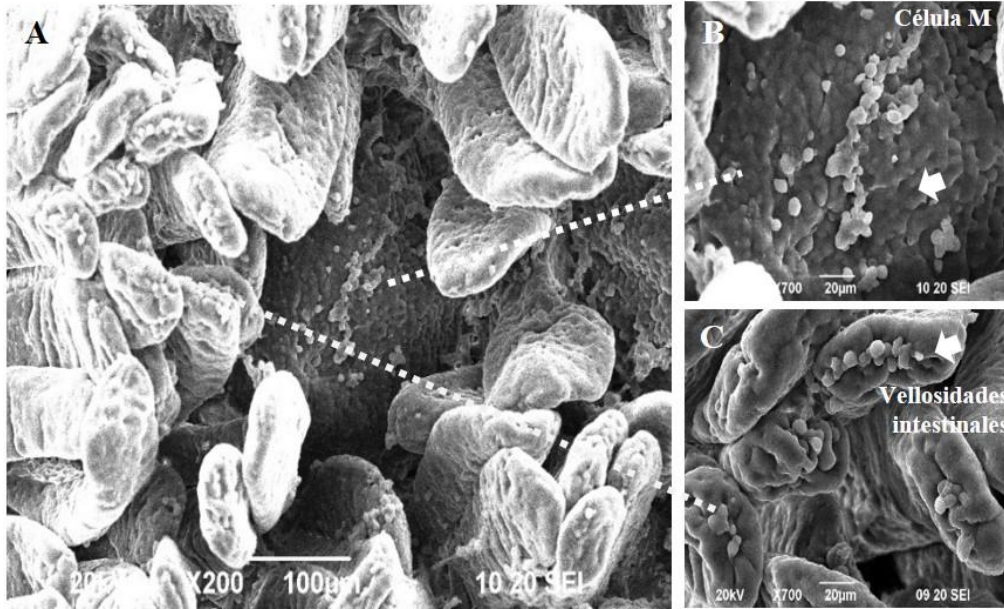
Igualmente, se evaluó la capacidad del almidón para alcanzar los sitios inductores de la respuesta inmune en intestino. Cuando se realizaron los experimentos, se desconocía el tiempo de tránsito gastrointestinal del almidón. Por tal razón, se realizó la administración directa intraduodenal de las MPAs-FITC. Como se muestra en la Figura 21, gran parte de las micropartículas se visualizaron en la luz intestinal, adyacentes a las microvellosidades del epitelio. Algunas MPAs se translocaron hacia el FAE y alcanzaron las PPs.



**Figura 21.** Localización de las micropartículas de almidón teñidas con FITC en el intestino de ratones *Balb/c*. (A-C) MPAs en el intestino delgado a las 2 h y (D-E) 4 h después de la administración intraduodenal. Rectángulos en las figuras (A) y (D) muestran las áreas de aumento en las figuras (B), (C) y (E), indicando la ubicación de las MPAs (flechas blancas) en la luz del intestino delgado, la PP y cerca de la FAE, respectivamente. FITC-MPAs (verde) y núcleo teñido con DAPI (azul). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (E), 100  $\mu\text{m}$  (B-C), 500  $\mu\text{m}$  (D) y 1.000  $\mu\text{m}$  (A).

Las imágenes de MEB confirmaron la presencia de MPAs adheridas a las vellosidades intestinales y permitieron evidenciar las MPAs alojadas en los folículos, sobre células M de las vellosidades intestinales (Figura 22). Se observaron MPAs asociadas a la red de moco intestinal, pero también depositadas en la base de la cripta (Anexo E), lo que sugiere el tránsito desde la parte apical de las vellosidades para superar la barrera de moco.





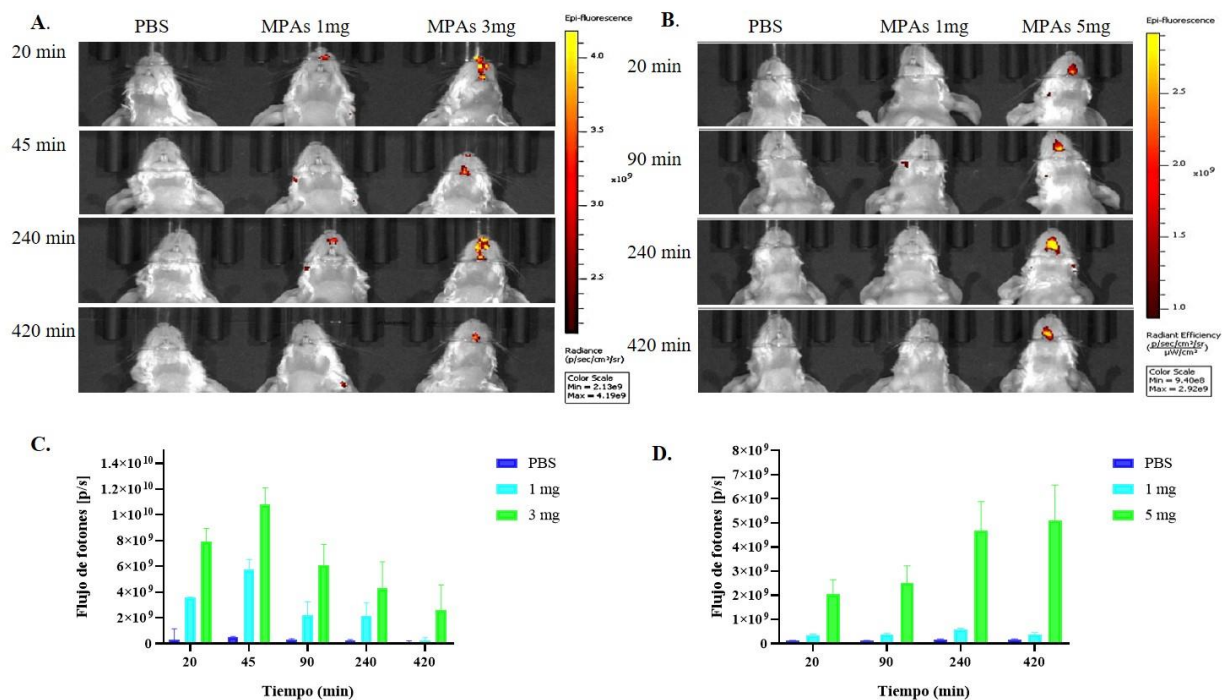
**Figura 22.** Microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de almidón crudo sobre células M y vellosidades intestinales de ratones Balb/c. (A) MEB muestra una célula M del epitelio veloso caracterizada por su borde deprimido y oscuro, con microvellosidades cortas en forma de “muñón”. Ampliación original X700 de las MPAs sobre (B) la célula M y (C) las vellosidades intestinales.

En resumen, los hallazgos observados en esta sección muestran que las MPAs se localizan en los tejidos de mucosa, interactúan con el moco, se translocan a través de la barrera epitelial y finalmente, migran hacia los sitios inductores de la respuesta inmune de mucosa asociados al sitio de la administración.

### 8.5. Biodistribución del almidón crudo

Con el objetivo de investigar otro aspecto crítico de los sistemas particulados diseñados para administración a la mucosa, se evaluó la biodistribución de las partículas usando un sistema de imágenes *in vivo*. En las imágenes de fluorescencia de cuerpo completo, se observó que los animales que recibieron la dosis más alta de MPAs vía nasal (3 mg en 20 µL de PBS) mantuvieron una señal de fluorescencia mayor en el sitio de administración hasta los 420 min, comparado con la desaparición de la señal a partir de los 90 min en los animales que recibieron la dosis más baja (1 mg en 20 µL de PBS) (Figura 23). Por otra parte, en los animales que recibieron 5 mg de MPAs teñidas con FITC vía intragástrica se observaron señales de fluorescencia más brillantes en la

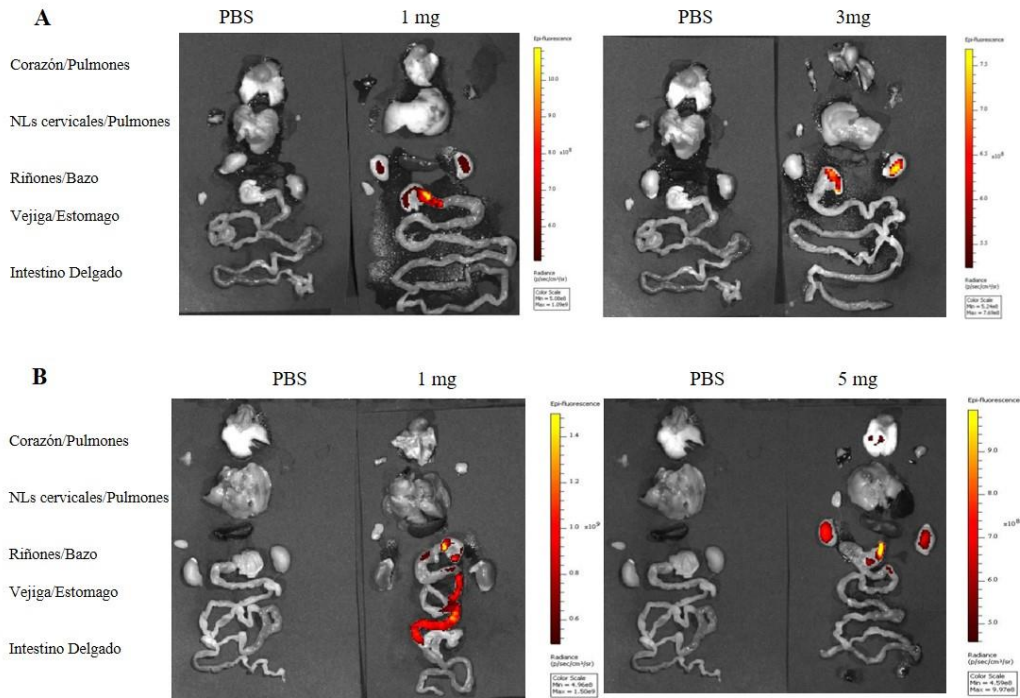
cavidad oral, con incremento en la señal de fluorescencia conforme aumentaba el tiempo. No se observó ninguna señal de fluorescencia en ninguna otra parte del cuerpo en los animales que recibieron MPAs-FITC, ni en los animales control.



**Figura 23.** Imágenes *in vivo* de ratones Balb/c administrados con micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC vía nasal o intragástrica. Imágenes de fluorescencia de animales que recibieron MPAs-FITC (A) vía nasal o (B) vía intragástrica. (C y D) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia.  $\lambda_{ex}$ : 480 nm,  $\lambda_{em}$ : 520 nm, 1-2 segundos de exposición, binning medio, F/stop: 1 y campo de visión 12.5 cm<sup>2</sup>.

En ensayos independientes, se tomaron imágenes de fluorescencia de los órganos extraídos a los 30 y 60 min luego de la administración nasal o intragástrica de las MPAs-FITC. Ambos tipos de administración indujeron el tránsito de las MPAs a través del intestino delgado (Figura 24). La señal fluorescente del FITC se observó desde los 30 min en el intestino delgado de roedores, con un alcance aparentemente más rápido en los animales que recibieron las dosis más altas de MPAs (Anexo F). A los 60 min una fracción de las MPAs permanecen en el estómago independientemente de la dosis y ruta administración. No hubo evidencia de señal fluorescente en corazón, nódulos linfáticos cervicales, hígado, bazo o vejiga después de la administración nasal (1 y 3 mg) o intragástrica (1 mg y 5 mg). Se observó incremento en la señal fluorescente del FITC

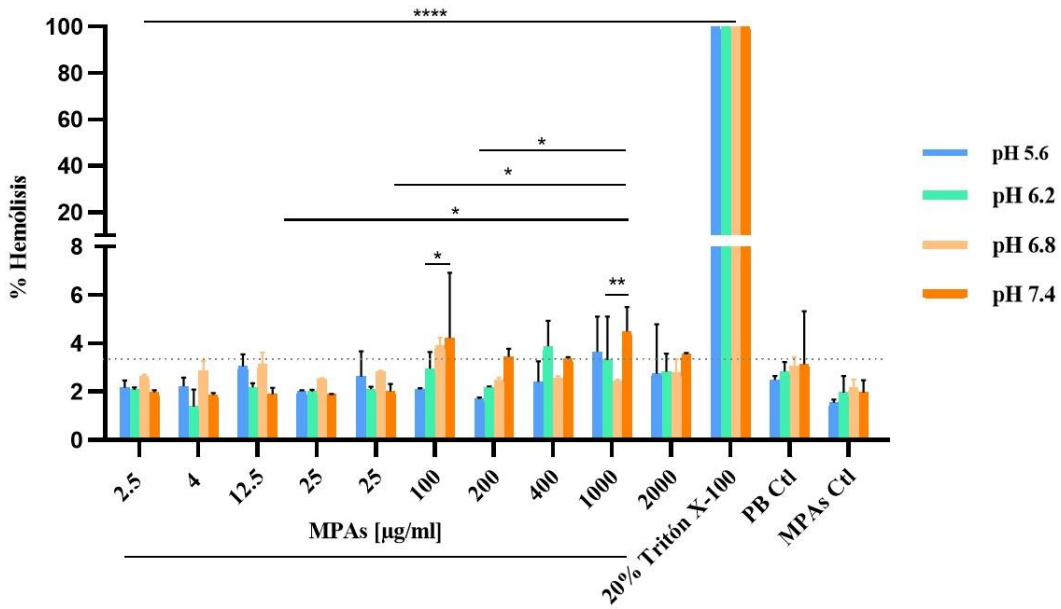
en riñones con el incremento de las concentraciones de MPAs en animales administrados vía intragástrica. Los resultados de este estudio indican que la distribución de las MPAs administradas vía mucosas es preferencialmente gastrointestinal y depende de la dosis usada.



**Figura 24.** Biodistribución de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC. Imágenes *in vivo* de órganos de ratones obtenidos 60 min después de la administración nasal (A) o intragástrica (B) de MPAs-FITC. IVIS-Lumina®III configurado en  $\lambda_{ex}$ : 480nm,  $\lambda_{em}$ : 520nm, 0.75-1 segunda exposición; binning medio, F/stop: 1 y campo de visión de 12,5 cm<sup>2</sup>.

### 8.6. Hemocompatibilidad del almidón crudo

Debido al posible paso de los polímeros nano y microparticulados administrados por vía nasal hacia la circulación sanguínea sistémica (Türker *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2021), se decidió estudiar la hemólisis de eritrocitos humanos como una medida de la citotoxicidad sistémica que podrían inducir las MPAs. Como se ve en la Figura 25, ninguna concentración de MPAs, sin influencia del valor de pH indujo la hemólisis.



**Figura 25.** *Actividad hemolítica del almidón crudo sobre glóbulos rojos humanos.* Porcentaje de hemólisis reportado en comparación con una curva estándar de Tritón X-100 a  $\lambda_{\max}$  410 nm. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante dos ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Tukey y se indicó de la siguiente manera: \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  DE.

---

## 9. DISCUSIÓN

---

Las vacunas para la vía mucosa enfrentan desafíos relacionados con la ruta de administración como la presencia de diversas hidrolasas, los cambios de pH y el aclaramiento mucociliar. Entre las estrategias efectivas para superar estos retos se destaca el uso de vehículos para la liberación de antígenos y de adyuvantes basados en polímeros con propiedades mucoadhesivas. La mucoadhesión de los polímeros se asocia a su retención y/o depósito en las superficies mucosas, lo que prolonga el tiempo de residencia en el sitio de la aplicación. Una vez ahí, las partículas poliméricas necesitan mucopenetrar rápidamente para evitar ser atrapadas por la capa de moco poco adherida al epitelio y ser eliminadas durante la renovación del moco. Por tanto, el balance entre la mucoadhesión y la mucopenetración de los polímeros es crucial para alcanzar el epitelio subyacente.

En estos fenómenos intervienen factores relacionados con los polímeros (peso molecular, concentración, longitud y flexibilidad de las cadenas, carga, conformación espacial, entre otros) y factores fisiológicos (tipo de mucina, grosor de la mucosa, tasa de recambio del moco, viscosidad del moco, pH del medio, etc) (Shaikh *et al.*, 2011) Además, para que la adhesión a la mucosa se lleve a cabo se han informado dos pasos que describen la interacción. En el primer paso ocurre el contacto íntimo entre el polímero y el moco. En esta fase, la humectación y el hinchamiento aumentan el área de contacto entre las superficies. En el segundo paso, ocurre el entrelazamiento de los polímeros. Las cadenas interpenetradas por difusión interactúan formando enlaces químicos y/o físicos (Serra *et al.*, 2008).

En este estudio se evaluaron las propiedades mucoadhesivas de un almidón crudo utilizado como adyuvante para la administración por vías mucosas (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2019). La mucoadhesión del almidón crudo en condiciones fisiológicas simuladas ocurrió sin hinchamiento con la MSB, una alternativa del moco nativo en cavidad oral y nasal y con la MPG para el TGI. Un porcentaje de adhesión mayor se observó cuando el almidón crudo interactuó con la MPG comparado con la adhesión a la MSB.

Este resultado es atribuible a la proporción de glicanos en estas mucinas ya que la MSB contienen entre 9 a 24% de ácido siálico y la MPG solo tiene del 0.5-1.5% (Sarkar *et al.*, 2019). De manera general, el porcentaje de mucina unida a las MPAs fue similar a los reportados en ensayos de cuantificación de mucina adsorbida para otros polímeros mucoadhesivos (entre el 41 y 70%) (Amin & Boateng, 2022; Karim *et al.*, 2023).

Apoyados en la estructura del almidón, se sugiere el entrelazamiento e interpenetración de las cadenas de amilosa y amilopectina con las glicoproteínas de las mucinas mediante enlaces físicos. Igualmente, enlaces químicos secundarios podrían permitir la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos hidroxilo de cada unidad de glucosa en el almidón y el ácido siálico terminal o los grupos sulfato de las cadenas de oligosacáridos en la mucina. Además, las regiones proteicas no glicosiladas de la mucina proporcionan sitios para las interacciones con el almidón como puentes de hidrógeno y apilamiento entre los aminoácidos aromáticos presentes en los anillos de piranosa del almidón, tal como se ha descrito en las interacciones proteína-carbohidrato (Zhang *et al.*, 2021).

En este sistema particulado, la incapacidad para retener agua a 37°C puede estar relacionada con su capacidad de mucopenetrar desde los primeros minutos (5 min) y atravesar el epitelio nasal *in vivo* (Figura 18). Lo anterior, debido a la difusión de las MPAs a través de la red de moco sin el impedimento estérico descrito para partículas en el orden micrométrico que provocaría el paso del almidón hinchado (Zhao *et al.*, 2023).

Las mediciones del potencial- $\zeta$  realizadas ofrecen una explicación alternativa sobre la mucoadhesión y mucopenetración de las MPAs. Otros autores han descrito una correlación entre el potencial- $\zeta$  de las partículas y su movilidad en el moco. Mientras la alta densidad de glicoproteínas cargadas negativamente en las mucinas permite formar interacciones de alta afinidad con los restos de los polímeros cargados positivamente lo que conduce a su inmovilización en las fibras de moco, la difusión de partículas neutras o con residuos cargados negativamente se favorece (Crater & Carrier, 2010). En este estudio, el potencial- $\zeta$  de las MPAs solas en soluciones amortiguadoras modificó la composición de la capa difusa y en consecuencia

el potencial- $\zeta$  respecto a su potencial- $\zeta$  en agua destilada ( $-13.5$  mV vs  $-1.69$  mV, PB pH 5.8 y  $-2.46$  mV, PB pH 6.8), tal como se describe en la literatura para algunos almidones crudos (McNamee *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2020). El potencial-  $\zeta$  de la MSB y MPG también fue negativo, con diferencia en la magnitud del potencial atribuible a la composición de glicanos como el ácido siálico en dichas mucinas. La incorporación de MPAs a la suspensión de mucinas registró un potencial-  $\zeta$  diferente al de sus componentes por separado. Aunque la reducción en el potencial- $\zeta$  en el sistema MPAs-mucinas sugiere su interacción, la magnitud del cambio no permite suponer que estas interacciones sean electrostáticas.

Estas observaciones respaldan varias hipótesis propuestas para explicar la adhesión y mucopenetración de las MPAs *in vivo*. Primero, el potencial- $\zeta$  cercano a la neutralidad de las MPAs solas apoya la idea de una interacción reducida con los glicanos de la mucina cargados negativamente, mientras facilita su difusión en el moco. Segundo, la ausencia de atracción electrostática entre las MPAs y las mucinas, sugiere que la mucoadhesión esta mediada inicialmente por el entrelazamiento y enredo físico entre las MPAs y el moco como se ha descrito para otros polímeros (Bogataj *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2005). Por tanto, se plantea la posibilidad de que mucoadhesión de las MPAs es menor que su capacidad para penetrar el moco. Esto concuerda con las observaciones de los pocos trabajos que estudian la interacción mucina-almidón, los cuales coinciden en que la fuerza adhesiva es muy baja (Phan *et al.*, 2021).

Entender la mucopenetración de las MPAs ( $4.77 \pm 1.26$   $\mu\text{m}$ ) representa un desafío ya que implica su difusión a través de los poros de la malla de moco. Sin embargo, tanto el tamaño del poro del moco como el grosor de la mucosa son características dinámicas que varían a lo largo de la capa de moco, según la localización anatómica y en el tiempo (Paone & Cani, 2020; Vagios & Mitchell, 2021). Partiendo de este hecho, es probable que la amplia distribución de tamaño de las MPAs ( $D_{10}$ :  $1,4$   $\mu\text{m}$ ,  $D_{50}$ :  $4,7$   $\mu\text{m}$ ,  $D_{90}$ :  $8,2$   $\mu\text{m}$ ) permita su retención o difusión *in vivo* en el moco de forma diferencial, en función de estas características.

Con respecto a la evaluación del tiempo de retención de las MPAs en los tejidos mucosos, existen varios aspectos a considerar previamente que explican la selección de la metodología



seleccionada y pueden afectar el correcto análisis e interpretación de las observaciones. En primer lugar, no hay un consenso en la literatura científica sobre el tiempo ideal de retención en la mucosa asociado a la mejora en la inmunogenicidad y/o calidad de la respuesta inmune, reportándose tiempos variables que oscilan entre 120 min y 48 horas. Varma y colaboradores, por ejemplo, demostraron recientemente mediante sistema de imágenes *in vivo*, que el hidrogel de polietilenimina ramificada (PEI) combinado con dextrano oxidado (Ox-DEX) e incorporado con OVA-AF-647 era visible en la cavidad nasal de ratones C57BL/6 hasta por 144 horas. La capacidad adhesiva *ex vivo* de esta formulación mostró ser 1.4 veces mayor que la del quitosano e indujo la producción de anticuerpos IgG específicos, una vez coadministrada como vehículo para H1N1 recombinante con el adyuvante cGAMP (Varma *et al.*, 2022). Por el contrario, con otros polímeros como el pululano, la adhesión en forma de nanogeles al epitelio nasal durante 10 horas fue suficiente para inducir altos títulos de anticuerpos IgG séricos e IgA en mucosa al mezclarse con el fragmento de unión al receptor no tóxico recombinante de la neurotoxina tipo-A de *Clostridium botulinum*, además de conferir protección tras el reto con la toxina (Nochi *et al.*, 2010).

En segundo lugar, siendo este estudio el primer informe sobre la localización y el depósito de almidón crudo administrado mediante goteo por vía nasal en ratones, existen aparentes limitaciones para comparar los resultados con estudios previos. Illum y Ridley reportaron el depósito y el tiempo de vida media de eliminación (aclaramiento) en cavidad nasal humana de almidón radiomarcado, parcialmente hidrolizado y reticulado (Spherex), con un tamaño hinchado de 45-48  $\mu\text{m}$  a los 240 min y 90 min, respectivamente (Illum *et al.*, 1987; Ridley *et al.*, 1995). Mientras que Illum y colaboradores administraron el Spherex en capsulas de Lomudal mediante un insuflador nasal, Ridley y colaboradores usaron un catéter de Rhinolin. Ambos grupos concluyeron que el aclaramiento de las microesferas estaba influenciado por la posición de la cabeza de los individuos y el ángulo de inhalación de la formulación durante la técnica de administración.

Alternativamente, Soane y colaboradores administraron a voluntarios humanos almidón radiomarcado, reticulado con epíclorhidrina (45–90  $\mu\text{m}$ ), utilizando un dispositivo en polvo de única dosis para la inhalación profunda. El aclaramiento fue a los 68 min, con depósito de las



micropartículas en las regiones anterior y posterior de la cavidad nasal. Igualmente, hubo variación entre individuos en la distribución de la dosis depositada en la región anterior, dependiente de la administración (Soane *et al.*, 1999).

En tercer lugar, debe señalarse también que la capacidad para medir con precisión el aclaramiento en roedores representa en sí mismo un reto a causa de, 1) la posibilidad de usar una variedad de técnicas y métodos de administración (Rusznak *et al.*, 1994), 2) el uso y tipo de anestésico durante los experimentos que modifica los hallazgos (Rogers *et al.*, 2018), 3) la edad de los animales (Grubb *et al.*, 2016), 4) el polímero trazador, 5) la cepa de ratones usada, entre otros. En consecuencia, los datos reportados en la literatura son heterogéneos.

En consecuencia, los ensayos con animales fueron diseñados para determinar la presencia y el tiempo de retención de las MPAs en la cavidad nasal seccionada en regiones anterior, media y posterior siguiendo un protocolo descrito previamente, sin considerar el aclaramiento de las partículas (Kumar *et al.*, 2016). Se seleccionó la administración por goteo nasal sin anestesia, para permitir el contacto de las MPAs desde el vestíbulo nasal (región anterior). Además, se estableció la retención del almidón en la mucosa nasal cuando las MPAs se visualizaron más allá del tiempo de aclaramiento mucociliar (10-15 min, Beule, 2010). Para facilitar este seguimiento en el tiempo, las MPAs se tiñeron con FITC.

La caracterización fisicoquímica de las MPAs teñidas con FITC permitió descartar modificaciones en la interacción con la mucosa y la biodistribución de las partículas asociadas a tinción., pues no hubo cambios significativos en el tamaño y el potencial- $\zeta$  comparado con las MPAs sin tinción. Además, la intensidad de fluorescencia de las MPAs-FITC se mantuvo estable en condiciones fisiológicas simuladas durante al menos 8 horas (Figura 10), aun cuando el método de tinción no fue covalente. Sin embargo, el seguimiento de las MPAs teñidas con FITC más allá de las 8 horas o la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia, deben interpretarse con cautela debido a la liberación del FITC adsorbido a las MPAs que podría llevar a desestimar la presencia de MPAs en los tejidos.

Con las condiciones experimentales seleccionadas, se observó la retención del almidón crudo en la mucosa nasal más allá del tiempo estimado para el aclaramiento mucociliar. Las MPAs permanecieron en la cavidad nasal al menos por 8 horas, localizándose desde el vestíbulo nasal hasta la región olfatoria (Figura 16). Los mecanismos por los que las MPAs se depositaron en toda la cavidad nasal a pesar de su tamaño, ausencia de anestesia (que facilita el transporte) o características inherentes a la cavidad nasal incluidas las diferencias entre epitelios y la complejidad de los cornetes nasales, no fueron objetivo de este estudio. Sin embargo, trabajos previos apoyan la hipótesis de que más de un mecanismo interviene en la retención y difusión de las MPAs a lo largo de la cavidad nasal.

Por ejemplo, Jian y colaboradores reportan la difusión de las partículas en la cavidad nasal de acuerdo con su tamaño, disminuyéndose la eficiencia de depósito en toda la cavidad nasal con el aumento en el tamaño (Jiang & Zhao, 2010). En ratas, por ejemplo, se determinó computacionalmente que 92% de las partículas de 5  $\mu\text{m}$  se depositan en la región vestibular (Kimbell, 2006). Tsuda y colaboradores además describieron el transporte de partículas mediado por fuerzas inerciales, brownianas y gravitacionales. De este modo, mientras la difusión disminuye con el aumento del tamaño de las partículas, el depósito aumenta debido al transporte gravitacional e inercial (Tsuda *et al.*, 2013). Por otra parte, Dong y colaboradores determinaron mediante un estudio computacional que el patrón de distribución de partículas en la cavidad nasal es independiente de su tamaño (Dong *et al.*, 2018). Estudiar en trabajos posteriores estos mecanismos de transporte para las MPAs en la cavidad nasal será valioso para apoyar a la comprensión tanto de nuestro sistema particulado como del transporte de micropartículas en el tracto respiratorio.

En lo concerniente a la discrepancia entre el tiempo de retención en cavidad nasal obtenido mediante microscopía confocal de barrido láser (hasta por 8 horas) y con MEB (a las 24 horas) (Figura 19), una posible explicación puede ser la liberación del FITC mencionada previamente. Las limitaciones asociadas a la estabilidad, solubilidad y extinción de la fluorescencia con el uso de fluorocromos *in vivo* en ocasiones exigen el acople covalente para incrementar el tiempo de visibilidad de los polímeros (Roussel *et al.*, 2023).

Ahora bien, si se comparan las técnicas microscópicas con el seguimiento de imágenes en el IVIS, el tiempo de retención de las MPAs en la mucosa nasal fue cercano al observado en MEB (entre 4 y 8 horas, Figura 24). Sin embargo, se han reportado desventajas al usar del FITC para la adquisición de imágenes ópticas *in vivo*. En primer lugar, disminuye la sensibilidad y el contraste de las imágenes debido a las longitudes de onda de excitación y emisión en el rango visible (400-650 nm) en las que los tejidos absorben y dispersan la luz, lo que resulta en baja penetración del FITC en los tejidos (<3 mm). Segundo, la corrección de la señal de fondo causada por la autofluorescencia de moléculas endógenas como las flavinas, lipofuscina, entre otras, limita la detección de moléculas teñidas con FITC en niveles bajos (Chin *et al.*, 2012). Por tanto, se debe considerar el posible sesgo en los tiempos de retención de las MPAs informados en este estudio con el sistema de imágenes *in vivo*. Se sugiere para investigaciones futuras la búsqueda y/o desarrollo de sondas fluorogénicas o colorantes de unión covalente al almidón, idealmente con emisión en el infrarrojo cercano, que permita superar las limitaciones descritas para el FITC y a su vez, realizar la trazabilidad en tiempos posteriores a los ya estudiados aquí sin introducir modificaciones fisicoquímicas que alteren la biodistribución de las MPAs.

Una consideración final, es que este estudio fue diseñado para apoyar la comprensión de las MPAs como adyuvante de vacunas para la mucosa. Aunque en este trabajo no se evaluó la respuesta inmune específica de antígeno con el uso de las MPAs como adyuvante, algunos de los resultados apoyan las observaciones previas sobre el potencial inmunoestimulante del almidón crudo luego de la administración vía nasal (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2019). Por ejemplo, la localización mayoritaria de las MPAs sobre los cornetes nasales observada, ha sido un fenómeno descrito para otros polímeros particulados. Hageraars y colaboradores, informaron una correlación entre la adhesión del virus de influenza completo inactivado conjugado con N, N, N-trimetil quitosano (TMC) a la superficie epitelial de los cornetes nasales y maxilares inferiores después de la inmunización vía nasal a ratones C57-BL/6 y la respuesta inmune al antígeno coadministrado. Ese patrón de depósito se correlacionó con el incremento en la inmunogenicidad y la eficacia protectora, además de considerarse un mecanismo de acción adyuvante vía nasal (Hageraars *et al.*, 2010). Con esta observación es posible

plantear la hipótesis de que la localización de las MPAs en los cornetes nasales está relacionada con la respuesta inmune reportada en nuestros trabajos previos. En futuras investigaciones, será útil diferenciar la localización de los antígenos solos e inmovilizados sobre las MPAs en la cavidad nasal, con el objetivo de confirmar dicha hipótesis.

Se encontró, además, que las MPAs pasaron rápidamente desde el lumen a través de la barrera epitelial hacia la submucosa y los sitios inductores de la respuesta inmune de la mucosa sin aparente toxicidad sistémica. El paso de partículas a través del epitelio ha sido reportado por varios autores (Illum, 2007; Formica *et al.*, 2022); sin embargo, se estudian con mayor frecuencia sistemas particulados más pequeños (entre 100 y 700 nm) que pueden experimentar transporte paracelular o transcelular (Spindler *et al.*, 2021). Para ciertos carbohidratos, se ha descrito el transporte vía paracelular entre las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas (O'Rourke *et al.*, 1995; Pappenheimer, 1990).

Particularmente para polímeros con base en almidón, Björk y colaboradores informaron que la administración intranasal de microesferas de almidón hidrolizado reticulado con epíclorhidrina (DSM) (20-45  $\mu\text{m}$ ) cargado con insulina reduce los niveles plasmáticos de glucosa en ratas (Björk & Edman, 1990). En un trabajo posterior, las DSM hidratadas e hinchadas añadidas a monocapas de células Caco-2 rápidamente condujeron al aumento reversible de la permeabilidad epitelial sin comprometer la función de barrera. De forma similar, cuando las DSM fueron acopladas a insulina, la separación inmediata de las uniones estrechas (14-54%) permitió la absorción del fármaco (Björk *et al.*, 1995). Los autores han propuesto que, tras la exposición de las DSM al agua se crea un entorno hiperosmolar que lleva al encogimiento celular por cambios en la presión hidrostática y subsecuente separación de las uniones estrechas (Han *et al.*, 2019). Debido a que pocos trabajos describen el paso a través del epitelio para carbohidratos insolubles como el almidón crudo y tampoco se ha estudiado la captación epitelial de micropartículas para favorecer el transporte a través del epitelio, la interpretación que se puede dar a las observaciones en este trabajo es limitada, por lo que actualmente para dar explicación a los hallazgos de este trabajo, se desarrollan estudios *in vitro* para caracterizar estos procesos.

La investigación actual encontró también que después de atravesar el epitelio, las MPAs alcanzan la lámina propia subyacente, incluido el sitio inductor de la respuesta inmune mucosa en el tracto respiratorio superior de los roedores (Figura 20). Con el alcance al NALT de las MPAs se respaldan los hallazgos previos en los que las MPAs con antígenos inmovilizados administrados vía nasal inducen respuesta inmunológica específica de antígeno (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

Una vez en lámina propia, las MPAs podrán ser absorbidas por los vasos sanguíneos para entrar a circulación sistémica, drenar a ganglios linfáticos cervicales o acceder directamente a las vías extracelulares que conducen al sistema nervioso central (Formica *et al.*, 2022). La señal fluorescente de las FITC-MPAs en los riñones luego de administración nasal, junto con la observación de MPAs en la lámina propia de la cavidad nasal en sitios adyacentes a vasos sanguíneos y en el órgano vomeronasal, sugieren el ingreso del almidón al torrente sanguíneo. Experimentos posteriores en los que se evaluó la posibilidad de hemotoxicidad, no mostraron rastro de hemólisis aun con concentraciones de 2 mg/mL de almidón.

Paralelamente, el estudio de la biodistribución *in vivo* estimando la fluorescencia del FITC luego de la administración vía nasal permitió evidenciar la deglución de una fracción de la dosis de MPAs, un resultado consistente con la observación de otros autores sobre el paso rápido de las formulaciones a lo largo del piso de la cavidad nasal durante los primeros minutos, que no entran en contacto con la mucosa nasal (Furubayashi *et al.*, 2007). La deglución luego de la administración nasal se asocia al tipo de formulación y ocurre con mayor frecuencia con el uso de goteo nasal (Vidgren & Kublik, 1998). Además de la absorción primaria en cavidad nasal, las partículas que indirectamente son ingeridas pasarán a absorción por tránsito TGI, contribución que ha sido calculada en trabajos previos (Furubayashi *et al.*, 2007).

En cuanto a las retención y distribución de las MPAs luego de la administración vía intragástrica e intraduodenal, es importante considerar que debido a las condiciones hostiles del TGI, la mayoría de las partículas no tienen la capacidad de retenerse, por lo que ocurre el tránsito directo. Sin embargo y, a pesar de la mayor actividad enzimática en intestino, las MPAs

administradas intraduodenalmente se retuvieron en el intestino delgado (Figura 21), lo que es concordante con la mayor adhesión a la MPG, homóloga a la Muc-2 predominante en intestino (Schneider *et al.*, 2018; Jessberger *et al.*, 2019).

La retención de las MPAs durante al menos 4 horas en el intestino delgado puede relacionarse con su adhesión a las vellosidades intestinales observada en la MEB. Además, se destaca la presencia de las MPAs en las células M del epitelio vellosito intestinal. Algunas partículas lumbinales pueden ser captadas preferencialmente por estas células M y no por las células M de la FAE; en estos casos, la inducción de la respuesta inmune será independiente de las PPs (Jang *et al.*, 2004). La mucoadhesividad de las micropartículas no solo evitó el aclaramiento por peristalsis intestinal, sino que también permitió la presencia de MPAs en las PPs. Similar a la cavidad nasal, la traslocación a través de la barrera epitelial de partículas en intestino delgado puede ocurrir vía transcelular y paracelular (Kulkarni & Newberry, 2019). Los hallazgos aquí descritos, corroboran las observaciones sugeridas previamente sobre el alcance de las MPAs a las PPs en el GALT para favorecer la inducción de las respuestas específicas de antígeno después de la vacunación intragástrica con antígenos inmovilizados sobre las MPAs (Guillen *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

También se visualizó *in vivo* la biodistribución del almidón crudo después de la administración intragástrica de una dosis única de MPAs. La fluorescencia observada en la cavidad oral de los roedores, aunque inesperada, indica la retención de las MPAs en la mucosa oral a causa del contacto de la cánula de administración intragástrica con la cavidad oral de los animales. Encontrar las señales de fluorescencia de las FITC-MPAs en estómago e intestino delgado a los 60 min está en contraposición con los trabajos previos que consideran el almidón sin modificaciones fisicoquímicas como inapropiado para la administración vía TGI debido a la limitada mucoadhesión a causa de sus propiedades de hidratación e hinchamiento y ausencia de grupos cargados que permitan las interacciones electrostáticas con la mucina (Chen *et al.*, 2019). Este trabajo muestra que los cambios inducidos por el entorno, específicamente por la exposición al pH gástrico, no impidieron la retención de las MPAs como lo muestra la prueba de

mucoadhesión *in vitro* en donde se observó que reducir el pH de 6.8 a un valor ácido (pH 2) no impacto significativamente la adhesión.

Finalmente, los resultados de este trabajo proporcionan evidencia de la capacidad adhesiva de las MPAs a la mucina *in vitro*, así como el incremento en el tiempo de retención *in vivo* en los tejidos mucosos luego de la administración vía nasal y oral. Los hallazgos, indican que la mucoadhesión es un mecanismo facilitador del paso de las MPAs a través de los tejidos mucosos. De este modo, las MPAs penetraron la capa de moco, se translocaron a través del epitelio y migraron a los sitios inductores de la respuesta inmune mucosa local, luego de su administración como dosis única, a pesar del tamaño microparticulado y heterogéneo del almidón crudo. Este tránsito inicial de las MPAs se considera esencial para el rol inmunoestimulante del almidón crudo.

Destacamos qué contrario a las limitaciones reportadas para el almidón crudo en aplicaciones biofarmacéuticas, las MPAs administradas vía mucosa no necesitaron modificaciones fisicoquímicas para distribuirse eficientemente, a travesar las barreras biológicas y entrar a circulación sistémica, conservando su inocuidad.

---

## 10.CONCLUSIONES

---

En este estudio se demostró que la localización y retención de micropartículas de almidón crudo en la mucosa de la cavidad nasal e intestino delgado en ratones Balb/c, está mediada por la adhesión entre la mucina y el almidón crudo que se observó *in vitro*. Las MPAs penetraron el moco y se translocaron a través de la barrera epitelial desde tiempos tempranos. Este paso a la lámina propia ofrece posibilidades múltiples de particular importancia para el desarrollo de vacunas para las mucosas. Se observó, además, que no es necesario introducir modificaciones fisicoquímicas al almidón crudo para superar las barreras biológicas como se suponía anteriormente.

Observar las MPAs en el NALT y las PPs, sitios inductores de la respuesta inmune de mucosa en nasofaringe e intestino, respectivamente, ayudan a explicar la capacidad adyuvante e inmunoestimulante del almidón crudo inducida que se ha observado en trabajos previos luego de la administración vías mucosas de antígenos inmovilizados o como refuerzo a la vacunación. Los resultados de distribución *in vivo* reportados en este estudio destacan el tránsito gastrointestinal de las MPAs, sin aparente toxicidad sistémica aun en dosis altas, como lo indica el ensayo de hemocompatibilidad *in vitro*. Por lo tanto, se sugiere que las micropartículas de almidón crudo son un sistema seguro y eficiente para la administración de antígenos y para otras aplicaciones biomédicas que requieran el depósito en la mucosa, mejorar la respuesta inmune y minimicen la toxicidad.



---

## 11. PERSPECTIVAS

---

La vacunación vía mucosa es una estrategia de especial relevancia para el control de enfermedades infecciosas que tengan como vía de entrada la mucosa. Dentro de las numerosas plataformas propuestas usando sistemas particulados poliméricos para la entrega de antígenos, las MPAs constituyen un candidato para el desarrollo de vacunas seguras y eficaces por las propiedades descritas hasta ahora. No obstante, aún quedan cuestionamientos, desafíos de seguridad y calidad. Actualmente se encuentra en estudio la correlación entre el papel inmunoestimulante y la eficacia protectora, conocimiento que necesario para avanzar exitosamente a etapas preclínicas. Será importante considerar y adoptar las estrategias que permitan mantener la velocidad y rendimiento adquiridos en los últimos años en la lucha contra la pandemia y los brotes epidémicos, incluido la incorporación de múltiples antígenos, inmunoestimulantes y mejora de las condiciones del almacenamiento.

A continuación, se sugieren algunos protocolos de investigación que podrían tenerse en cuenta para continuar la caracterización de las MPAs como sistemas de administración de vacuna mucosas o para diseñar estudios de liberación de fármacos que involucren la vía mucosa:

- Estudiar el mecanismo de mucopenetración y traslocación de las MPAs a través del epitelio mucoso.
- Evaluar la biodegradabilidad y biocompatibilidad de las MPAs en líneas celulares mucosas.
- Evaluar la localización, tiempo de retención en la mucosa y biodistribución de las MPAs acopladas a antígenos.
- Estandarizar un método de liberación de antígenos/fármacos *in vivo*, para establecer la biodisponibilidad.
- Evaluar el transporte de las partículas a sistema nervioso central, junto con las preocupaciones descritas para los sistemas basados en partículas relacionadas con su seguridad.

---

## 12. BIBLIOGRAFÍA

---

- Adewale P, Yancheshmeh MS, Lam E. Starch modification for non-food, industrial applications: Market intelligence and critical review. *Carbohydr Polym.* 2022; 291:119590. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119590.
- Ahlawat S, De Jesus M, Khare K, Cole RA, Mantis NJ. Three-dimensional reconstruction of murine Peyer's patches from immunostained cryosections. *Microsc Microanal.* 2014; 20(1):198-205. doi: 10.1017/S1431927613013640.
- Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 2018; 39(9):677-696. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002.
- Alvites RD, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho ME, Varejão ASP, Maurício AC. The Nasal Cavity of the Rat and Mouse-Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anat Rec (Hoboken).* 2018; 301(10):1678-1689. doi: 10.1002/ar.23844.
- Americo JL, Cotter CA, Earl PL, Liu R, Moss B. Intranasal inoculation of an MVA-based vaccine induces IgA and protects the respiratory tract of hACE2 mice from SARS-CoV-2 infection. 2022; 119 (24), e2202069119. doi: 10.1073/pnas.2202069119
- Amicizia D, Arata L, Zangrillo F, Panatto D, Gasparini R. Overview of the impact of Typhoid and Paratyphoid fever. Utility of Ty21a vaccine (Vivotif®). *J Prev Med Hyg.* 2017; 58(1):E1-E8.
- Amin MK, Boateng JS. Enhancing Stability and Mucoadhesive Properties of Chitosan Nanoparticles by Surface Modification with Sodium Alginate and Polyethylene Glycol for Potential Oral Mucosa Vaccine Delivery. *Mar Drugs.* 2022; 20(3):156. doi: 10.3390/md20030156
- Anh DD, Lopez AL, Tran HT, Cuong NV, Thiem VD, Ali M, Deen JL, von Seidlein L, Sack DA. Oral cholera vaccine development and use in Vietnam. *PLoS Med.* 2014; 11:e1001712. doi: 10.1371/journal.pmed.1001712.
- Arike L, Seiman A, van der Post S, Rodriguez Piñeiro AM, Ermund A, Schütte A, Bäckhed F, Johansson MEV, Hansson GC. Protein Turnover in Epithelial Cells and Mucus along the Gastrointestinal Tract Is Coordinated by the Spatial Location and Microbiota. *Cell Rep.* 2020; 30(4):1077-1087.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.068.
- Armenta S, Sánchez-Cuapio Z, Farrés A, Manoutcharian K, Hernandez-Santoyo A, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. Data concerning secondary structure and alpha-glucans-binding capacity of the LaCBM26. *Data Brief.* 2018; 21:1944-1949. doi: 10.1016/j.dib.2018.11.056
- Armenta S, Sánchez-Cuapio Z, Munguia ME, Pulido NO, Farrés A, Manoutcharian K, Hernandez-Santoyo A, Moreno-Mendieta S, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. The role of conserved non-aromatic residues in the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase CBM26-starch interaction. *Int J Biol Macromol.* 2019; 121:829-838. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.061.

- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280(5), G922–G929. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922
- Baker JR Jr, Farazuddin M, Wong PT, O'Konek JJ. The unfulfilled potential of mucosal immunization. *J Allergy Clin Immunol*. 2022; 150(1):1-11. doi: 10.1016/j.jaci.2022.05.002
- Bandi SP, Kumbhar YS, Venuganti VVK. Effect of particle size and surface charge of nanoparticles in penetration through intestinal mucus barrier. *J Nanopart Res*. 2020; 22: 62. doi: 10.1007/s11051-020-04785-y
- Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface*. 2006; 11(2-3), 164-170. doi: 10.1016/j.cocis.2005.11.001
- Bansil R, Turner BS. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 124:3-15. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.023.
- Copeland L, Blazek J, Salman H, Tang MC. Form and functionality of starch. *Food Hydrocoll*. 2009; 23(6): 1527-1534. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.09.016
- Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 9: Doc07. doi: 10.3205/cto000071.
- Bhatt P, Kumar V, Goel R, Sharma SK, Kaushik S, Sharma S, Shrivastava A, Tesema M. Structural Modifications and Strategies for Native Starch for Applications in Advanced Drug Delivery. *Biomed Res Int*. 2022; 2022: 2188940. doi: 10.1155/2022/2188940.
- Björk E, Edman P. Characterization of degradable starch microspheres as a nasal delivery system for drugs. *Int J Pharm*. 1990; 62(2-3), 187-192. doi:10.1016/0378-5173(90)90232-S
- Björk E, Isaksson U, Edman P, Artursson P. Starch microspheres induce pulsatile delivery of drugs and peptides across the epithelial barrier by reversible separation of the tight junctions. *J Drug Target*. 1995; 2(6):501-7. doi: 10.3109/10611869509015920.
- Bogataj M, Vovk T, Kerec M, Dimnik A, Grabnar I, Mrhar A. The correlation between zeta potential and mucoadhesion strength on pig vesical mucosa. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(5):743-6. doi: 10.1248/bpb.26.743.
- Bonis V, Rossell C, Gehart H. The Intestinal Epithelium - Fluid Fate and Rigid Structure From Crypt Bottom to Villus Tip. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:661931. doi: 10.3389/fcell.2021.661931.
- Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol*. 2008; 1(1):31-7. doi: 10.1038/mi.2007.9.
- Brown H, Esterházy D. Intestinal immune compartmentalization: implications of tissue specific determinants in health and disease. *Mucosal Immunol*. 2021; 14, 1259–1270. doi: 10.1038/s41385-021-00420-8.
- Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*. 2019; 68(8):1516-1526. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427.
- Cao R, Wang TT, DeMaria G, Sheehan JK, Kesimer M. Mapping the protein domain structures of the respiratory mucins: a mucin proteome coverage study. *J Proteome Res*. 2012; 11(8):4013-23. doi: 10.1021/pr300058z.

- Capeding MRZ, Gonzales MLAM, Dhingra MS, D'Cor NA, Midde VJ, Patnaik BN, Thollot Y, Desauziers E. Safety and immunogenicity of the killed bivalent (O1 and O139) whole-cell cholera vaccine in the Philippines. *Hum Vaccin Immunother.* 2017; 13(10):2232-2239. doi: 10.1080/21645515.2017.
- Chamanza R, Wright JA. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *J Comp Pathol.* 2015; 153(4):287-314. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.08.009.
- Chatterjee M, van Putten JPM, Strijbis K. Defensive Properties of Mucin Glycoproteins during Respiratory Infections-Relevance for SARS-CoV-2. *mBio.* 2020; 11(6): e02374-20. doi:10.1128/mBio.02374-20.
- Chen, J., Chen, L., Xie, F., Li, X.. Starch-Based DDSs with Physiological Interactions. In: Drug Delivery Applications of Starch Biopolymer Derivatives. Springer, Singapore. 2019, pp 101-132. doi: 10.1007/978-981-13-3657-7\_.
- Chin PT, Beekman CA, Buckle T, Josephson L, van Leeuwen FW. Multispectral visualization of surgical safety-margins using fluorescent marker seeds. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2012; 2(2):151-62.
- Cho CS, Hwang SK, Gu MJ, Kim CG, Kim SK, Ju DB, Yun CH, Kim HJ. Mucosal Vaccine Delivery Using Mucoadhesive Polymer Particulate Systems. *Tissue Eng Regen Med.* 2021; 18(5):693-712. doi: 10.1007/s13770-021-00373-w.
- Chuluunbaatar T, Ichii O, Masum MA, Namba T, Islam MR, Otani Y, Elewa YHA, Kon Y. Genital organ-associated lymphoid tissues arranged in a ring in the mucosa of cow vaginal vestibules. *Res Vet Sci.* 2022; 145:147-158. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.02.011.
- Cisney ED, Fernandez S., Hal, SI, Krietz GA., Urlich RG.. Examining the role of nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) in mouse responses to vaccines. *J. Vis. Exp.* 2012; 1, e3960. <http://doi.org10.3791/3960>
- Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61:75–85. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.008.
- Cornejo-Ramírez YI, Martínez-Cruz O, Del Toro-Sánchez CL, Wong-Corral FJ., Borboa-Flores J, Cinco-Moroyoqui FJ. The structural characteristics of starches and their functional properties. *CYTA J Food.* 2018; 16:1, 1003-1017. doi: 10.1080/19476337.2018.1518343.
- Coucke D, Schotsaert M, Libert C, Pringels E, Vervaeke C, Foreman P, Saelens X, Remon JP. Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine.* 2009; 27(8):1279-86. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.12.013.
- Crater JS, Carrier RL. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromol Biosci.* 2010. 10(12):1473-83. doi: 10.1002/mabi.201000137.
- Da Silva C, Wagner C, Bonnardel J, Gorvel JP, Lelouard H. The Peyer's Patch Mononuclear Phagocyte System at Steady State and during Infection. *Front Immunol.* 2017; 8:1254. doi: 10.3389/fimmu.2017.01254.
- Date Y, Ebisawa M, Fukuda S, Shima H, Obata Y, Takahashi D, Kato T, Hanazato M, Nakato G, Williams IR, Hase K, Ohno H. NALT M cells are important for immune induction for the common mucosal immune system. *Int Immunol.* 2017; 29(10):471-478. doi: 10.1093/intimm/dxx064. P
- Debertin AS, Tschernig T, Tönjes H, Kleemann WJ, Tröger HD, Pabst R. Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clin Exp Immunol.* 2003; 134(3):503-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2003.02311.x.

- Dillon A, Lo DD. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Front Immunol.* 2019; 10:1499. doi:10.3389/fimmu.2019.01499
- Dong J, Shang Y, Tian L, Inthavong K, Tu J. Detailed deposition analysis of inertial and diffusive particles in a rat nasal passage. *Inhal Toxicol.* 2018; 30(1):29-39. doi: 10.1080/08958378.2018.1439549.
- Dwivedy A, Aich P. Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds. *Int J Gen Med.* 2011; 4:299-311. doi: 10.2147/IJGM.S17525.
- Eberl G, Lochner M. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol.* 2009; 2(6):478-85. doi: 10.1038/mi.2009.114.
- Egharevba HO. Chemical Properties of Starch and Its Application in the Food Industry. 2019. Emje M (Ed). IntecOpen, 1-164 doi: 10.5772/intechopen.87777. Ebook ISBN: 978-1-78985-697-2
- Ermund E, Schütte A, Johansson MEV, Gustafsson JK, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013; 305(5): G341-7. doi: 10.1152/ajpgi.00046.2013
- Evans BC, Nelson CE, Yu SS, Beavers KR, Kim AJ, Li H, Nelson HM, Giorgio TD, Duvall CL. *Ex vivo* red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J Vis Exp.* 2013; (73):e50166. doi: 10.3791/50166.
- Fasquelle F, Dubuquoy L, Betbeder D. Starch-based NP act as antigen delivery systems without immunomodulating effect. *PLoS One.* 2022; 17(7):e0272234. doi: 10.1371/journal.pone.0272234.
- Formica ML, Real DA, Picchio ML, Catlin E, Donnelly RF, Paredes AJ. On a highway to the brain: A review on nose-to-brain drug delivery using nanoparticles. *Appl Mater Today.* 2022; 29. doi: 10.1016/j.apmt.2022.101631
- Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, Rennert PD, Yanagita M, Kinoshita N, Terawaki S, Shikina T, Yamamoto M, Kurono Y, Kiyono H. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LTbetaR, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3(-)CD4(+)CD45(+) cells. *Immunity.* 2002; 17(1):31-40. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00339-4.
- Furubayashi T, Kamaguchi A, Kawaharada K, Masaoka Y, Kataoka M, Yamashita S, Higashi Y, Sakane T. Evaluation of the contribution of the nasal cavity and gastrointestinal tract to drug absorption following nasal application to rats. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(3):608-11. doi: 10.1248/bpb.30.608.
- Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp.* 2012; (65):3564. doi: 10.3791/3564.
- Garcia MAVT, Garcia CF, Faraco AAG. Pharmaceutical and biomedical applications of native and modified starch: A review. *Starch/Staerke.* 2020; 72(7-8) doi:10.1002/star.201900270.
- Gogos A, Federle MJ. Modeling *Streptococcus pyogenes* Pharyngeal Colonization in the Mouse. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9:137. doi: 10.3389/fcimb.2019.00137.
- Gök MK, Özgümüş S, Demir K, Cirit Ü, Pabuccuoğlu S, Cevher E, Özsoy Y, Bacinoğlu S. Development of starch based mucoadhesive vaginal drug delivery systems for application in veterinary medicine. *Carbohydr Polym.* 2016; 136:63-70. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.08.079.
- Gondil VS, Dube T, Panda JJ, Yennamalli RM, Harjai K, Chhibber S. Comprehensive evaluation of chitosan nanoparticle based phage lysin delivery system; a novel approach to counter *S. pneumoniae* infections. *Int J Pharm.* 2020; 573:118850. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118850.

- Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of  $\beta 7$  integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med*. 2009; 9(7):836-850. doi:10.2174/156652409789105525.
- Gray GC, Erdman DD. Adenovirus Vaccines. *Plotkin's Vaccines*. 2018; 121-133.e8. doi:10.1016/B978-0-323-35761-6.00010-9.
- Grubb BR, Jones JH, Boucher RC. Mucociliary transport determined by in vivo microdialysis in the airways of normal and CF mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286(3):L588-95. doi: 10.1152/ajplung.00302.2003.
- Grubb BR, Livraghi-Butrico A, Rogers TD, Yin W, Button B, Ostrowski LE. Reduced mucociliary clearance in old mice is associated with a decrease in Muc5b mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016; 310(9):L860-7. doi: 10.1152/ajplung.00015.2016.
- Guibas GV, Lakis S, Gkimpas C, Manda M, Kapoukranidou D, Spandou E. Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: an attempt at standardization. *Exp Toxicol Pathol*. 2014; 66(9-10):469-75. doi: 10.1016/j.etp.2014.09.001.
- Guillén D, Moreno-Mendieta S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydr Polym*. 2014; 112:210-5. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.089.
- Guktur RE, Nep EI, Asala O, Olorunfemi PO, Ngwuluka NC, Ocheke NA, Sagay AS. Carboxymethylated and acetylated xerogel derivatives of *Plectranthus esculentus* starch protect Newcastle disease vaccines against cold chain failure. *Vaccine*. 2021; 39, 4871-4884. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.06.062
- Hagenaars N, Mania M, de Jong P, Que I, Nieuwland R, Slütter B, Glansbeek H, Heldens J, van den Bosch H, Löwik C, Kaijzel E, Mastrobattista E, Jiskoot W. Role of trimethylated chitosan (TMC) in nasal residence time, local distribution and toxicity of an intranasal influenza vaccine. *J Control Release*. 2010; 144(1):17-24. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.027.
- Han X, Zhang E, Shi Y, Song B, Du H, Cao Z. Biomaterial-tight junction interaction and potential impacts. *J Mater Chem B*. 2019; 7(41):6310-6320. doi: 10.1039/c9tb01081e.
- Hanson SM, Singh S, Tabet A, Sastry KJ, Barry M, Wang C. Mucoadhesive wafers composed of binary polymer blends for sublingual delivery and preservation of protein vaccines. *J Control Release*. 2021; 330:427-437. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.029.
- Harkema JR, Carey SA, Wagner JG, Dintzis SM, Liggitt D. 6 - Nose, Sinus, Pharynx, and Larynx. *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, Academic Press, 2018, Pages 89-114, ISBN 9780128029008. doi: 10.1016/B978-0-12-802900-8.00006-3.
- Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol*. 2006; 34(3):252-69. doi: 10.1080/01926230600713475.
- Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider DP, McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156(4 Pt 1):1256-62. doi: 10.1164/ajrccm.156.4.97-03017.

- Heritage PL, Brook MA, Underdown BJ, McDermott MR. Intranasal immunization with polymer-grafted microparticles activates the nasal-associated lymphoid tissue and draining lymph nodes. *Immunology*. 1998; 93(2):249-56. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00420.x.
- Heritage PL, Underdown BJ, Brook MA, McDermott MR. Oral administration of polymer-grafted starch microparticles activates gut-associated lymphocytes and primes mice for a subsequent systemic antigen challenge. *Vaccine*. 1998; 16(20), 2010-2017. doi:10.1016/S0264-410X(98)00085-1
- Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, Kodama S, Yanagita M, Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol*. 1998;28(10): 3346-53. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3346::AID-IMMU3346>3.0.CO;2-P.
- Illum L. Nanoparticulate systems for nasal delivery of drugs: a real improvement over simple systems? *J Pharm Sci*. 2007; 96(3):473-83. doi: 10.1002/jps.20718. PMID: 17117404.
- Illum L, Jørgensen H, Bisgaard H, Krogsgaard O, Rossing N. Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. *Int J Pharm*. 1987; 39(3), 189-199. doi:10.1016/0378-5173(87)90216-X.
- Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, Suzuki T, Nochi T, Yokota Y, Rennert PD, Hiroi T, Tamagawa H, Iijima H, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(16):6110-5. doi: 10.1073/pnas.0400969101.
- Jelkmann M, Bonengel S, Menzel C, Markovic S, Bernkop-Schnürch A. New perspectives of starch: Synthesis and in vitro assessment of novel thiolated mucoadhesive derivatives. *Int J Pharm*. 2018; 546(1-2), 70-77. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.028.
- Jelkmann M, Leichner C, Menzel C, Kreb V, Bernkop-Schnürch A. Cationic starch derivatives as mucoadhesive and soluble excipients in drug delivery. *Int J Pharm*. 2019; 570, 118664. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118664.
- Jessberger N, Dietrich R, Mohr AK, Da Rioli C, Märtilbauer E. Porcine Gastric Mucin Triggers Toxin Production of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infect Immun*. 2019; 87(4): e00765-18. doi: 10.1128/IAI.00765-18.
- Ji Y, Lin X, Yu J. Preparation and characterization of oxidized starch-chitosan complexes for adsorption of procyanidins. *LWT*. 2020; 117, 108610. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108610.
- Jiang J, Zhao K. Airflow and nanoparticle deposition in rat nose under various breathing and sniffing conditions: a computational evaluation of the unsteady effect. *J Aerosol Sci*. 2010;41(11):1030-1043. doi: 10.1016/j.jaerosci.2010.06.005. PMID: 21076632;
- Jin Z, Gao S, Cui X, Sun D, Zhao K. Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *Int J Pharm*. 2019; 572:118731. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118731.
- Johansson ME, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, Subramani DB, Holmén-Larsson JM, Thomsson KA, Bergström JH, van der Post S, Rodriguez-Piñero AM, Sjövall H, Bäckström M, Hansson GC. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(22):3635-41. doi: 10.1007/s00018-011-0822-3.
- Johansson EL, Wassén L, Holmgren J, Jertborn M, Rudin A. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect Immun*. 2001; 69(12):7481-7486. doi:10.1128/IAI.69.12.7481-7486.2001.

- Jun JW, Kang JW, Giri SS, Yun S, Kim HJ, Guen Kim S, Kim SW, Han SJ, Kwon J, Oh WT, Park SC. Immunostimulation by starch hydrogel-based oral vaccine using formalin-killed cells against edwardsiellosis in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Vaccine*. 2020; 38(22):3847-3853. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.046.
- Karim N, Liu S, Rashwan AK, Xie J, Mo J, Osman AI, Rooney DW, Chen W. Green synthesis of nanolipofibersomes using Nutriose® FB 06 for delphinidin-3-O-sambubioside delivery: Characterization, physicochemical properties, and application. *Int J Biol Macromol*. 2023; 247:125839. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125839.
- Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, Benktander J, Holmgren J, Lebens M. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. *PLoS One*. 2014; 9(11):e108521. doi: 10.1371/journal.pone.0108521.
- Keller LA, Merkel O, Popp A. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug Deliv Transl Res*. 2022; 12(4):735-757. doi: 10.1007/s13346-020-00891-5.
- Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG, Goda K, Nochi T, Kunisawa J, Sato S, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H. The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol*. 2011; 186(7):4253-62. doi: 10.4049/jimmunol.0903794.
- Kimbell JS. Nasal dosimetry of inhaled gases and particles: where do inhaled agents go in the nose? *Toxicol Pathol*. 2006;34(3):270-3. doi: 10.1080/01926230600695607.
- Kimura S. Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat Sci Int*. 2018; 93(1):23-34. doi: 10.1007/s12565-017-0418-6.
- Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(9):699-710. doi: 10.1038/nri1439.
- Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, Kimura S, Hase K. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2019; 10:2345. doi: 10.3389/fimmu.2019.02345.
- Kolesnikov M, Curato C, Zupancic E, Florindo H, Shakhar G, Jung S. Intravital visualization of interactions of murine Peyer's patch-resident dendritic cells with M cells. *Eur J Immunol*. 2020; 50(4):537-547. doi: 10.1002/eji.201948332.
- Kozlowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR, Flanigan TP. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun*. 1997; 65(4):1387-94. doi: 10.1128/iai.65.4.1387-1394.1997.
- Kulkarni DH, Newberry RD. Intestinal Macromolecular Transport Supporting Adaptive Immunity. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019; 7(4):729-737. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.01.003.
- Kulkarni PS, Raut SK, Dhare RM. A post-marketing surveillance study of a human live-virus pandemic influenza A (H1N1) vaccine (Nasovac (®)) in India. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(1):122-124. doi:10.4161/hv.22317.
- Kulkarni DH, Gustafsson JK, Knoop KA, McDonald KG, Bidani SS, Davis JE, Floyd AN, Hogan SP, Hsieh CS, Newberry RD. Goblet cell associated antigen passages support the induction and maintenance of oral tolerance. *Mucosal Immunol*. 2020; 13(2):271-282. doi: 10.1038/s41385-019-0240-7.



- Kumar NN, Gautam M, Lochhead JJ, Wolak DJ, Ithapu V, Singh V, Thorne RG. Relative vascular permeability and vascularity across different regions of the rat nasal mucosa: implications for nasal physiology and drug delivery. *Sci Rep*. 2016; 6: 31732. doi: 10.1038/srep31732.
- Kumar Bharathkar S, Parker BW, Malyutin AG, Haloi N, Huey-Tubman KE, Tajkhorshid E, Stadtmueller BM. The structures of secretory and dimeric immunoglobulin A. *Elife*. 2020; 9:e56098. doi: 10.7554/eLife.56098.
- Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annu Rev Immunol*. 2017; 35:119-147. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052424.
- Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61(2):158-71. doi: 10.1016/j.addr.2008.11.002.
- Lamson NG, Berger A, Fein KC, Whitehead KA. Anionic nanoparticles enable the oral delivery of proteins by enhancing intestinal permeability. *Nat Biomed Eng*. 2020; 4(1):84-96. doi: 10.1038/s41551-019-0465-5.
- Lavelle EC, Ward RW. Mucosal vaccines - fortifying the frontiers. *Nat Rev Immunol*. 2022; 22(4):236-250. doi: 10.1038/s41577-021-00583-2. Erratum in: *Nat Rev Immunol*.
- Lawal MV. Modified starches as direct compression excipients – effect of physical and chemical modifications on tablet properties: A review. *Starch/Staerke*. 2019; 71(1-2) doi:10.1002/star.201800040.
- Leal J, Smyth HDC, Ghosh D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm*. 2017; 532(1):555-572. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.018.
- Lee EY, Lee S, Rho S, Kim JO, Choi SK, Lee YJ, Park JY, Song M, Yang JS. *et al.* Immunogenicity of a bivalent killed thimerosal-free oral cholera vaccine, Euvichol, in an animal model. *Clin Exp Vaccine Res*. 2018; 7(2):104-110. doi:10.7774/cevr.2018.7.2.104.
- Lemieux M, Gosselin P, Mateescu MA. Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres as gastroretentive dosage form. *Int J Pharm*. 2015; 496(2):497-508. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.027.
- Leung SHS., Robinson J R. Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II. *J Control Release*. 1990; 12(3), 187-194. doi:10.1016/0168-3659(90)90099-F.
- Li J, Yeh A. Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *J Food Eng*. 2001; 50(3), 141-148. doi:10.1016/S0260-8774(00)00236-3.
- Loonen LM, Stolte EH, Jaklofsky MT, Meijerink M, Dekker J, van Baarlen P, Wells JM. REG3 $\gamma$ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunol*. 2014; 7(4):939-47. doi: 10.1038/mi.2013.109.
- Ma H, Tao W, Zhu S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2019; 16, 216–224. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0208-2>.
- McNamee CE, Sato Y, Wiege B, Furikado I, Marefati A, Nylander T, Kappl M, Rayner M. Rice Starch Particle Interactions at Air/Aqueous Interfaces–Effect of Particle Hydrophobicity and Solution Ionic Strength. *Front Chem*. 2018; 6:139. doi: 10.3389/fchem.2018.00139.

- Mallory RM, Yu J, Kameo S, Tanaka M, Rito K, Itoh Y, Dubovsky F. *et al.* The safety and efficacy of quadrivalent live attenuated influenza vaccine in Japanese children aged 2-18 years: Results of two phase 3 studies. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12(4):438-445. doi:10.1111/irv.12555.
- Mangal S, Pawar D, Agrawal U, Jain AK, Vyas SP. Evaluation of mucoadhesive carrier adjuvant: toward an oral anthrax vaccine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2014; 42(1):47-57. doi: 10.3109/21691401.2013.769447.
- Mangiacotte N, Prosperi-Porta G, Liu L, Dodd M, Sheardown H. Mucoadhesive Nanoparticles for Drug Delivery to the Anterior Eye. *Nanomaterials (Basel)*. 2020; 10(7):1400. doi: 10.3390/nano10071400.
- Mantis NJ, Forbes SJ. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):383-406. doi: 10.3109/08820131003622635.
- Martău GA, Mihai M, Vodnar DC. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector-Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers (Basel)*. 2019; 11(11):1837. doi: 10.3390/polym11111837.
- McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 2012; 483(7389):345-9. doi: 10.1038/nature10863.
- McNaughton R, Lynn E, Osborne V, Coughtrie A, Layton D, Shakir S. Safety of Intranasal Quadrivalent Live Attenuated Influenza Vaccine (QLAIV) in Children and Adolescents: A Pilot Prospective Cohort Study in England. *Drug Saf*. 2016; 39(4):323-333. doi:10.1007/s40264-015-0384-7.
- Miquel-Clopés A, Bentley EG, Stewart JP, Carding SR. Mucosal vaccines and technology. *Clin Exp Immunol*. 2019; 196(2):205-214. doi: 10.1111/cei.13285.
- Moreno-Mendieta SA, Guillén D, Espitia C, Hernández-Pando R, Sanchez S, Rodríguez-Sanoja R. A novel antigen-carrier system: the *Mycobacterium tuberculosis* Acr protein carried by raw starch microparticles. *Int J Pharm*. 2014; 474(1-2):241-8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.041.
- Moreno-Mendieta S, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Sánchez S, Hernández-Pando R, Rodríguez-Sanoja R. Raw starch microparticles have immunostimulant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. 2017; 35(38):5123-5130. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.012.
- Moreno-Mendieta S, Barrera-Rosales A, Mata-Espinosa D, Barrios-Payán J, Sánchez S, Hernández-Pando R, Rodríguez-Sanoja R. Raw starch microparticles as BCG adjuvant: Their efficacy depends on the virulence of the infection strains. *Vaccine*. 2019; 37(38):5731-5737. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.027.
- Mouro V, Fischer A. Dealing with a mucosal viral pandemic: lessons from COVID-19 vaccines. *Mucosal Immunol*. 2022; 15(4):584-594. doi: 10.1038/s41385-022-00517-8.
- Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(10):667-85. doi: 10.1038/nri3738.
- Nemattalab M, Shenagari M, Taheri M, Mahjoob M, Nazari Chamaki F, Mojtahedi A, Hasan-Alizadeh E, Ashrafkhani B, Mousavi Niri N. Co-expression of Interleukin-17A molecular adjuvant and prophylactic *Helicobacter pylori* genetic vaccine could cause sterile immunity in Treg suppressed mice. *Cytokine*. 2020; 126:154866. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154866.

- Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(2):148-58. doi: 10.1038/nri1777.
- Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater.* 2010; 9(7):572-8. doi: 10.1038/nmat2784.
- Noh HJ, Chowdhury MY, Cho S, Kim JH, Park HS, Kim CJ, Poo H, Sung MH, Lee JS, Lim YT. Programming of Influenza Vaccine Broadness and Persistence by Mucoadhesive Polymer-Based Adjuvant Systems. *J Immunol.* 2015; 195(5):2472-82. doi: 10.4049/jimmunol.1500492.
- Nouri A, Jelkmann M, Khoe S, Bernkop-Schnürch A. Diaminated starch: A competitor of chitosan with highly mucoadhesive properties due to increased local cationic charge density. *Biomacromolecules.* 2020; 21(2), 999-1008. doi: 10.1021/acs.biomac.9b01665.
- O'Rourke M, Shi X, Gisolfi C, Schedl H. Effect of absorption of D-glucose and water on paracellular transport in rat duodenum-jejunum. *Am J Med Sci.* 1995; 309(3):146-51. doi: 10.1097/00000441-199503000-00005.
- Ouellette M, Masse F, Lefebvre-Demers M, Maestracci Q, Grenier P, Millar R, Bertrand N, Prieto M, Boisselier E. Insights into gold nanoparticles as a mucoadhesive system Insights into gold nanoparticles as a mucoadhesive system. *Sci Rep.* 2018; 8, 14357. doi: 10.1038/s41598-018-32699-2.
- Oya Y, Kimura S, Nakamura Y, Ishihara N, Takano S, Morita R, Endo M, Hase K. Characterization of M Cells in Tear Duct-Associated Lymphoid Tissue of Mice: A Potential Role in Immunosurveillance on the Ocular Surface. *Front Immunol.* 2021; 12:779709. doi: 10.3389/fimmu.2021.779709.
- Pabst R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)-Structure, function and species differences. *Vaccine.* 2015; 33(36):4406-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.022.
- Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut.* 2020; 69(12):2232-2243. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322260.
- Pappenheimer JR. Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: relation to body size. *Am J Physiol.* 1990; 259(2 Pt 1):G290-9. doi: 10.1152/ajpgi.1990.259.2.G290.
- Pawar D, Jaganathan KS. Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: enhancement of mucosal and systemic immune response. *Drug Deliv.* 2016; 23(1):185-94. doi: 10.3109/10717544.2014.908427.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014; 260(1):8-20. doi: 10.1111/imr.12182.
- Petrou G, Crouzier T. Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. *Biomater Sci.* 2018; 6, 9, 2282-2297, doi:10.1039/c8bm00471d.

- Phan VHG, Duong HTT, Tran PT, Thambi T, Ho DK, Murgia X. Self-Assembled Amphiphilic Starch Based Drug Delivery Platform: Synthesis, Preparation, and Interactions with Biological Barriers. *Biomacromolecules*. 2021; 22(2):572–585. doi: 10.1021/acs.biomac.0c01430.
- Preiss J. Biochemistry and Molecular Biology of Starch Biosynthesis. BeMiller J, Whistler R (Ed) Chapter 4. In Food Science and Technology, *Starch* (Third Edition). 2009, 83-149. SBN 9780127462752. doi: 10.1016/B978-0-12-746275-2.00004-5.
- Qu D, Wang G, Yu L, Tian F, Chen W, Zhai Q. The effects of diet and gut microbiota on the regulation of intestinal mucin glycosylation. *Carbohydr Polym*. 2021; 258:117651. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117651.
- Ridley D, Perkins AC, Washington N, Wilson CG, Wastie ML, O'Flynn P, Blattman A, Ponchel G, Duchene D. The effect of posture on nasal clearance of bioadhesive starch microspheres. *S.T.P. Pharma Pratiques*. 1995; 5(6), 442-446.
- Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinguys P, Brown GD, Tiraby G, Roblin X, Verrier B, Genin C, Corthésy B, Paul S. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol*. 2013; 11(9):e1001658. doi: 10.1371/journal.pbio.1001658.
- Rodríguez-Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N, Guyot JP. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(8), 3350-3356. doi: 10.1128/AEM.66.8.3350-3356.2000
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B, Sánchez S. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009; 36(3):341-6. doi: 10.1007/s10295-008-0502-y.
- Rogers TD, Button B, Kelada SNP, Ostrowski LE, Livraghi-Butrico A, Gutay MI, Esther CR Jr, Grubb BR. Regional Differences in Mucociliary Clearance in the Upper and Lower Airways. *Front Physiol*. 2022; 13:842592. doi: 10.3389/fphys.2022.842592.
- Rogers TD, Ostrowski LE, Livraghi-Butrico A, Button B, Grubb BR. Mucociliary clearance in mice measured by tracking trans-tracheal fluorescence of nasally aerosolized beads. *Scientific Reports*. 2018; 8(1) doi:10.1038/s41598-018-33053-2.
- Roussel S, Grenier P, Chénard V, Bertrand N. Dual-Labelled Nanoparticles Inform on the Stability of Fluorescent Labels *In Vivo*. *Pharmaceutics*. 2023; 15(3):769. doi: 10.3390/pharmaceutics15030769.
- Ruane D, Brane L, Reis BS, Cheong C, Poles J, Do Y, Zhu H, Velinzon K, Choi JH, Studt N, Mayer L, Lavelle EC, Steinman RM, Mucida D, Mehandru S. Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2013; 210(9):1871-88. doi: 10.1084/jem.20122762.
- Rusznak C, Devalia JL, Lozewicz S, Davies RJ. The assessment of nasal mucociliary clearance and the effect of drugs. *Respir Med*. 1994; 88(2):89-101. doi: 10.1016/0954-6111(94)90020-5.
- Rydell N, Sjöholm I. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. *Vaccine*. 2004; 22(9-10):1265-74. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.09.034.
- Rydell N, Sjöholm I. Mucosal vaccination against diphtheria using starch microparticles as adjuvant for cross-reacting material (CRM197) of diphtheria toxin. *Vaccine*. 2005; 23(21):2775-83. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.11.049.

- Salari M, Bitounis D, Bhattacharya K, Pyrgiotakis G, Zhang Z, Purington E, Gramlich W, Grondin Y, Rogers R, Bousfield D, Demokritou P. Development and Characterization of Fluorescently Tagged Nanocellulose for Nanotoxicological Studies. *Environ Sci Nano*. 2019; 6(5):1516-1526. doi: 10.1039/C8EN01381K.
- Saluja T, Mogasale VV, Excler JL, Kim JH, Mogasale V. An overview of Vaxchora™, a live attenuated oral cholera vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2020; 16(1):42-50. doi: 10.1080/21645515.2019.1644882.
- Sarkar A, Xu F, Lee S. Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases - similarities and differences. *Adv Colloid Interface Sci*. 2019; 273:102034. doi: 10.1016/j.cis.2019.102034.
- Schneider H, Pelaseyed T, Svensson F, Johansson MEV. Study of mucin turnover in the small intestine by *in vivo* labeling. *Sci Rep*. 2018; 8(1):5760. doi: 10.1038/s41598-018-24148-x.
- Serra L, Doménech J, Peppas NA. Design of poly(ethylene glycol)-tethered copolymers as novel mucoadhesive drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006; 63(1):11-8. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.10.011.
- Serra L, Doménech J, Peppas NA. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 71(3):519-28. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.022
- Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011; 3(1):89-100. doi: 10.4103/0975-7406.76478.
- Silva-Sanchez A, Randall TD. Anatomical Uniqueness of the Mucosal Immune System (GALT, NALT, iBALT) for the Induction and Regulation of Mucosal Immunity and Tolerance. *Mucosal Vaccines*. 2020; 21-54. doi:10.1016/B978-0-12-811924-2.00002-X.
- Sinani G, Sessevmez M, Gök MK, Özgümüş S, Alpar HO, Cevher E. Modified chitosan-based nanoadjuvants enhance immunogenicity of protein antigens after mucosal vaccination. *Int J Pharm*. 2019; 569:118592. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118592.
- Singh I, Rana V. Techniques for the Assessment of Mucoadhesion in Drug Delivery Systems: An Overview. *J Adhes Sci*. 2012; 26:18-19, 2251-2267. doi: 10.1163/156856111X610171
- Skwarczynski M, Toth I. Non-invasive mucosal vaccine delivery: advantages, challenges and the future. *Expert Opin Drug Deliv*. 2020; 17(4):435-437. doi: 10.1080/17425247.2020.1731468.
- Soane RJ, Frier M, Perkins AC, Jones NS, Davis SS, Illum L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int J Pharm*. 1999; 178(1):55-65. doi: 10.1016/s0378-5173(98)00367-6.
- Soe MT, Chitropas P, Pongjanyakul T, Limpongsa E, Jaipakdee N. Thai glutinous rice starch modified by ball milling and its application as a mucoadhesive polymer. *Carbohydr Polym*. 2020; 232:115812. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115812.
- Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 2008; 9(7):1837-42. doi: 10.1021/bm800276d.
- Spencer J, Sollid L. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol*. 2016; 9, 1113–1124. doi: 10.1038/mi.2016.59
- Spindler LM, Feuerhake A, Ladel S, Günday C, Flamm J, Günday-Türelı N, Türelı E, Tovar GEM, Schindowski K, Gruber-Traub C. Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles

- Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa. *Front Pharmacol.* 2021; 12:732954. doi: 10.3389/fphar.2021.732954.
- Stie MB, Gätke JR, Wan F, Chronakis IS, Jacobsen J, Nielsen HM. Swelling of mucoadhesive electrospun chitosan/polyethylene oxide nanofibers facilitates adhesion to the sublingual mucosa. *Carbohydr Polym.* 2020; 242:116428. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116428.
- Su F, Patel GB, Hu S, Chen W. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12(4):1070-9. doi: 10.1080/21645515.2015.1114195.
- Suksamran T, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Sajomsang W, Pitaksuteepong T, Opanasopit P. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminocinnamyl) chitosan-coated electrospray OVA-loaded microparticles for oral vaccination. *Int J Pharm.* 2013; 448(1):19-27. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.015.
- Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* 2017; 5(4):e1373208. doi:10.1080/21688370.2017.1373208.
- Takeuchi H, Thongborisute J, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57(11):1583-1594. doi:10.1016/j.addr.2005.07.008
- Tang J, Cai L, Xu C, Sun S, Liu Y, Rosenecker J, Guan S. Nanotechnologies in Delivery of DNA and mRNA Vaccines to the Nasal and Pulmonary Mucosa. *Nanomaterials (Basel).* 2022; 12(2):226. doi: 10.3390/nano12020226.
- Thakore S, Valodkar M, Soni JY, Vyas K, Jadeja RN, Devkar RV, Rathore PS. Synthesis and cytotoxicity evaluation of novel acylated starch nanoparticles. *Bioorg Chem.* 2013; 46:26-30. doi: 10.1016/j.bioorg.2012.10.001.
- Torres FG, Troncoso OP, Pisani A, Gatto F, Bardi G. Natural Polysaccharide Nanomaterials: An Overview of Their Immunological Properties. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(20):5092. doi: 10.3390/ijms20205092.
- Tsuda A, Henry FS, Butler JP. Particle transport and deposition: basic physics of particle kinetics. *Compr Physiol.* 2013; 3(4):1437-71. doi: 10.1002/cphy.c100085.
- Türker S, Onur E, Ozer Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharm World Sci.* 2004; 26(3):137-42. doi: 10.1023/b:phar.0000026823.82950.ff.
- United States Pharmacopeia Convention Council of Experts, 2004. Simulated gastric and intestinal fluids, TS, in: Board of Trustees, Editor, The United States Pharmacopeia 27, The National Formulary vol. 22, Rockville, MD, pp. 2728.
- Vagios S, Mitchell CM. Mutual Preservation: A Review of Interactions Between Cervicovaginal Mucus and Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:676114. doi: 10.3389/fcimb.2021.676114.
- Vallon-Eberhard A, Landsman L, Yogev N, Verrier B, Jung S. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J Immunol.* 2006; 176(4):2465-9. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2465.
- Vandeputte GE, Derycke V, Geeroms J, Delcour JA. Rice starches. II. structural aspects provide insight into swelling and pasting properties. *J Cereal Sci.* 2003; 38(1), 53-59. doi:10.1016/S0733-5210(02)00141-8.
- Varghese T, Kang G, Steele AD. Understanding Rotavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness in Countries with High Child Mortality. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(3):346. doi: 10.3390/vaccines10030346.

- Varma DM, Batty CJ, Stiepel RT, Graham-Gurysh EG, Roque JA 3rd, Pena ES, Hasan Zahid MS, Qiu K, Anselmo A, Hill DB, Ross TM, Bachelder EM, Ainslie KM. Development of an Intranasal Gel for the Delivery of a Broadly Acting Subunit Influenza Vaccine. *ACS Biomater Sci Eng.* 2022; 8(4):1573-1582. doi: 10.1021/acsbomaterials.2c00015.
- Velin D, Fotopoulos G, Luthi F, Kraehenbuhl JP. The nasal-associated lymphoid tissue of adult mice acts as an entry site for the mouse mammary tumor retrovirus. *J Exp Med.* 1997; 185(10):1871-6. doi: 10.1084/jem.185.10.1871.
- Vidgren MT, Kublik H. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998; 29(1-2):157-177. doi: 10.1016/s0169-409x(97)00067-7.
- Vyas S, Dhoble S, Ghodake V, Patravale V. Xyloglucan based mucosal nanovaccine for immunological protection against brucellosis developed by supercritical fluid technology. *Int J Pharm X.* 2020; 2:100053. doi: 10.1016/j.ijpx.2020.100053.
- Wang S, Liu H, Zhang X, Qian F. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. *Protein Cell.* 2015; 6(7):480-503. doi: 10.1007/s13238-015-0164-2.
- Wani AA, Singh P, Shah MA, Schweiggert-Weisz U, Gul K, Wani IA. Rice starch diversity: Effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties-A review. *CRFSFS.* 2012; 11(5), 417-436. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00193.x
- Weiss AM, Hossainy S, Rowan SJ, Hubbell JA, Esser-Kahn AP. Immunostimulatory Polymers as Adjuvants, Immunotherapies, and Delivery Systems. *Macromolecules.* 2022; 55 (16), 6913-6937, doi: 10.1021/acs.macromol.2c00854.
- Wilk MM, Mills KHG. CD4 TRM Cells Following Infection and Immunization: Implications for More Effective Vaccine Design. *Front Immunol.* 2018; 9:1860. doi: 10.3389/fimmu.2018.01860.
- Yildiz HM, McKelvey CA, Marsac PJ, Carrier RL. Size selectivity of intestinal mucus to diffusing particulates is dependent on surface chemistry and exposure to lipids. *J Drug Target.* 2015; 23(7-8):768-74. doi: 10.3109/1061186X.2015.1086359.
- Zhang S, Chen KY, Zou X. Carbohydrate-Protein Interactions: Advances and Challenges. *Commun Inf Syst.* 2021; 21(1):147-163. doi: 10.4310/cis.2021.v21.n1.a7.
- Zhao K, Xie Y, Lin X, Xu W. The Mucoadhesive Nanoparticle-Based Delivery System in the Development of Mucosal Vaccines. *Int J Nanomedicine.* 2022; 17:4579-4598. doi: 10.2147/IJN.S359118.
- Zhao T, Li J, Shi H, Ye H, Ma R, Fu Y, Liu X, Li G, Yang X, Zhao Z, Yang J. Reduced mucosal immunity to poliovirus after cessation of trivalent oral polio vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 2021;17(8):2560-2567. doi: 10.1080/21645515.2021.1911213.

---

## 13.ANEXOS

---

### **Anexo A. Cirugía abdominal**

- 1) Realizar una incisión de la piel abdominal de ~2 cm usando pinzas de disección y tijeras, a fin de exponer los músculos abdominales y el intestino.
- 2) Cuidadosamente, identificar el estómago y el extremo proximal del intestino delgado donde se unen el estómago/intestino.
- 3) Con un par de pinzas, sostener el intestino delgado mientras se desenrolla suavemente la porción proximal separándola del tejido conectivo mesentérico.
- 4) Con una jeringa de 1 mL, inyectar 1 mg de MPAs-FITC suspendidas en 100  $\mu$ L de 10 mM PBS, PH 7.4 dentro del segmento proximal intestinal.
- 5) Asegurarse de volver a colocar con cuidado el intestino delgado en la cavidad intestinal.
- 6) Realizar una sutura de la capa musculoperitoneal con puntos separados utilizando de nailon monofilamento para cerrar la herida. Una vez completada la sutura, limpiar con una gasa empapada con solución de yodopovidona 1%.
- 7) Observar a los animales después de la cirugía durante los primeros 15 min. Una vez el animal esta despierto, trasladarlo a una caja individual para recuperación completa.



## **Anexo B. Protocolo de prueba de hemólisis de glóbulos rojos**

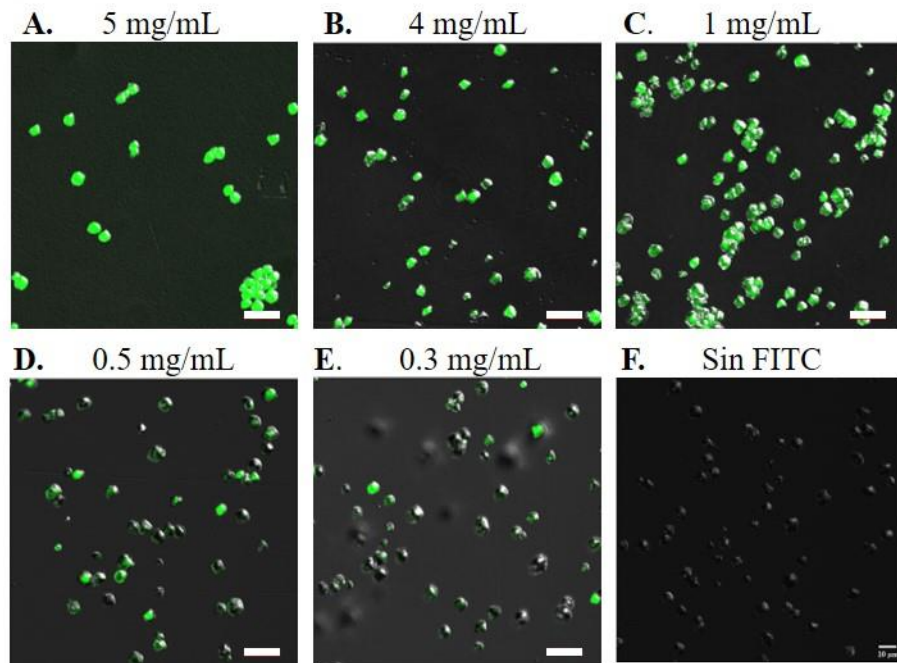
### *I. Preparación de los glóbulos rojos:*

- 1) Obtener 25 mL de sangre de donante anónimo en tubos con K<sub>2</sub>-EDTA.
- 2) Retirar el plasma, luego de centrifugar la muestra a 500 x g durante 5 min. Marcar el nivel de plasma removido.
- 3) Lavar dos veces los glóbulos rojos con NaCl 150 mM, reemplazando con el mismo volumen de plasma retirado, centrifugando cada vez (500 x g durante 5 min). Retirar al final el sobrenadante y resuspender en PBS 100 mM, pH 7.4.
- 4) Dividir la sangre uniformemente en 4 tubos, correspondientes a los cuatro pH a probar: PBS 100 mM pH 5.6, 6.2, 6.8 y 7.4.
- 5) Centrifugar los tubos a 500 x g durante 5 min, retirar el sobrenadante y reemplazar con el buffer de pH correspondiente. Homogenizar la muestra.
- 6) Realizar diluciones 1:50 de los eritrocitos en el buffer correspondiente (1 mL de eritrocitos en 49 mL de buffer).

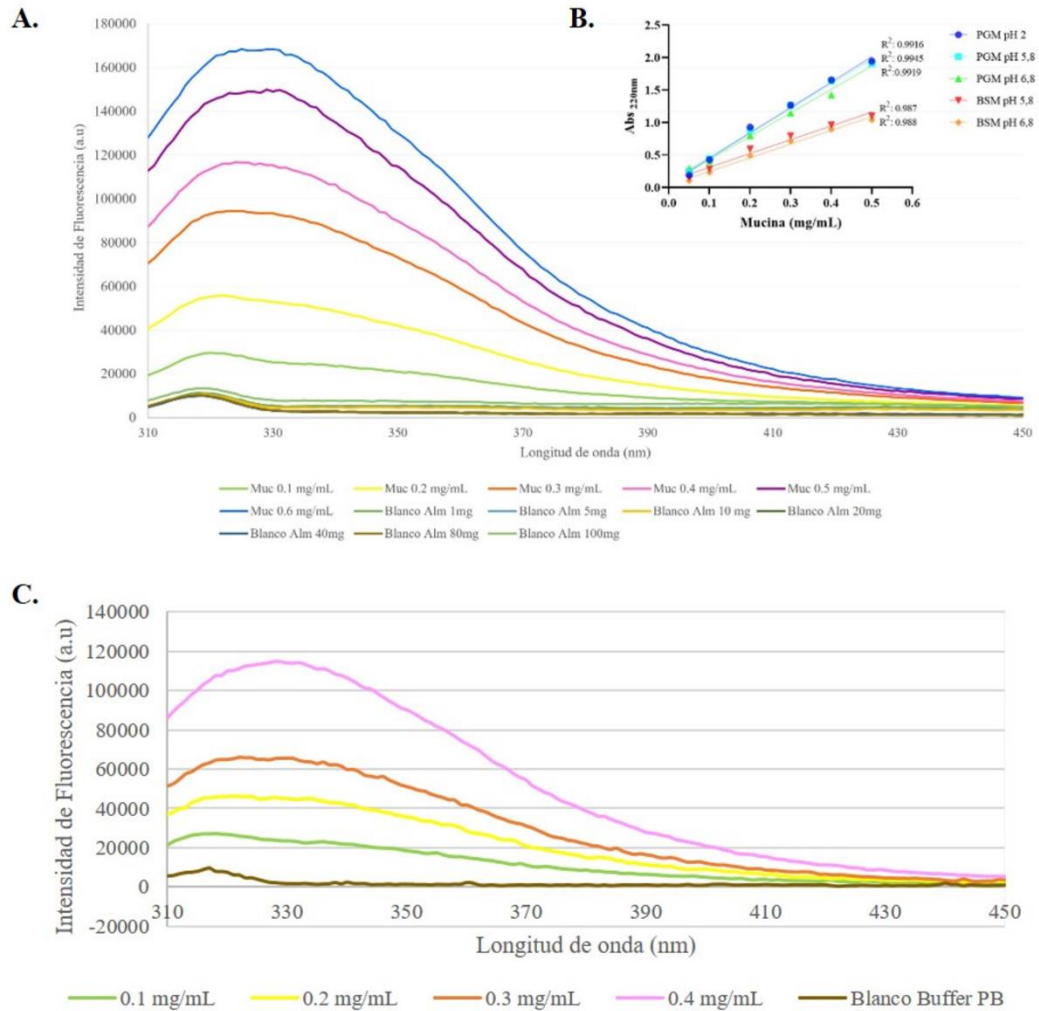
### *II. Preparación de las MPAs:*

- 1) Preparar las soluciones madre de las MPAs, 20 veces más concentrados que la solución final deseada a analizar, a fin de tomar 10 µL de MPAs y 190 µL de glóbulos rojos diluidos (dilución 1:20). De este modo, se realizan stock de 0.050, 0.08, 0.25, 0.5, 2, 8, 20, 40 mg/mL para concentraciones finales de 2.5, 4, 12.5, 25, 100, 200, 400, 1000, 2000 µg/mL.
- 2) Adicionar las MPAs en el fondo de una microplaca de 96 pozos por triplicado.
- 3) Adicionar Tritón X-100 al 20% en los pozos para control positivo y el buffer fosfato correspondiente en los pozos para control negativo.
- 4) Centrifugar las microplacas durante 5 min a 500 x g luego de incubación a 37°C en un agitador orbital para sedimentar los glóbulos rojos intactos
- 5) Remover con cuidado los sobrenadantes a una placa nueva de 96 pozos, teniendo precaución de no mezclar el sedimento.
- 6) Medir la absorbancia de los sobrenadantes con el lector de placas en un rango de longitud de ondas entre 400-541 nm.

**Anexo C. Estandarización de la tinción de almidón crudo con FITC.** Evaluación de la intensidad de fluorescencia de las MPAs (1mg/mL) teñidas con diferentes concentraciones de FITC. Microscopio confocal Nikon A1R+ STORM. A-E, Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ , F, Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

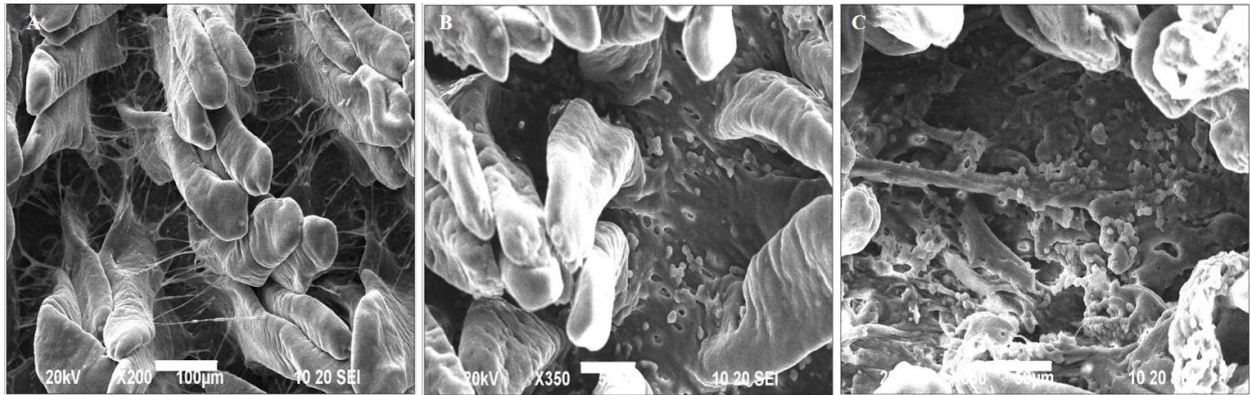


**Anexo D. Estandarización de la concentración de las mucinas comerciales para espectroscopía de fluorescencia.** (A) Espectros de fluorescencia de la MPG en diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mg/mL) y blancos de micropartículas de almidón suspendidas en buffer fosfatos en concentraciones crecientes;  $\lambda_{ex}=287nm$  (B) Curvas de calibración representativas de las mucinas usadas en los ensayos de espectroscopía de fluorescencia; C. Espectros de fluorescencia de la MSB en diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL) y blancos de micropartículas de almidón suspendidas en buffer fosfatos en concentraciones crecientes;  $\lambda_{ex}=289nm$ .

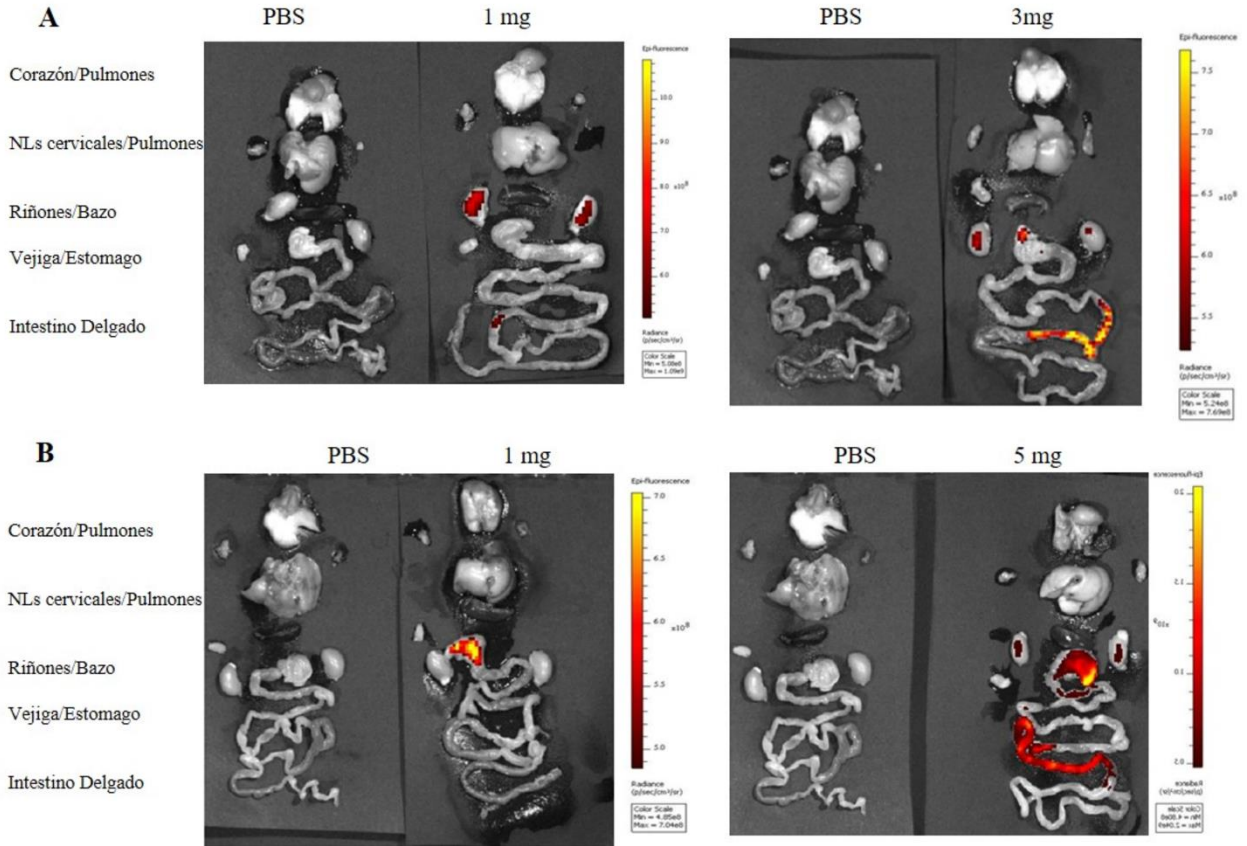


**ANEXO E. Micropartículas de almidón crudo en el epitelio intestinal de ratones Balb/c.**

(A) Imagen de MEB donde se observa la red de moco entre las vellosidades intestinales (X350).  
(B) Las MPAs se depositaron en la base de las vellosidades intestinales y (C) fueron atrapadas entre el moco (X350) 60 min después de la administración intraduodenal.



**Anexo F.** Biodistribución de las micropartículas de almidón crudo teñidas con FITC a los 30 minutos. Imágenes *in vivo* de órganos de ratones, obtenidos 30 min después de la administración nasal (A) u oral (B) de MPAs-FITC. IVIS-Lumina®III configurado en  $\lambda_{ex}$ : 480nm,  $\lambda_{em}$ : 520nm, 0.75-1 segunda exposición; binning medio, F/stop: 1 y campo de visión de 12,5 cm<sup>2</sup>.



**Anexo II. Artículos publicados**



## Research paper

## *In vivo* tracing of immunostimulatory raw starch microparticles after mucosal administration



Nathaly Vasquez-Martínez<sup>a,b</sup>, Daniel Guillén<sup>a</sup>, Silvia Andrea Moreno-Mendieta<sup>a,c</sup>, Pedro Medina-Granados<sup>a</sup>, Rocío Guadalupe Casañas-Pimentel<sup>d</sup>, Eduardo San Martín-Martínez<sup>d</sup>, Miguel Ángel Morales<sup>a</sup>, Sergio Sanchez<sup>a</sup>, Romina Rodríguez-Sanoja<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito, Mario de La Cueva s/n, C.U., Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencia Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito de Posgrado, C.U., Coyoacán 04510, CDMX, Mexico

<sup>c</sup> Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico

<sup>d</sup> Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Calzada Legaria 694, Irrigación, Miguel Hidalgo, 11500 Ciudad de México, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Starch microparticles  
Mucoadhesion  
NALT  
Peyer's patches  
Mucosal adjuvant, mucosal delivery  
Mucosal vaccine

## ABSTRACT

Raw starch microparticles (SMPs) proved efficient antigen carriers with adjuvant properties when administered via the mucosal route; however, the underlying mechanisms associated with this bioactivity are unknown. In the present study, we explored the mucoadhesion properties, fate, and toxicity of starch microparticles after mucosal administration. Nasally administered microparticles were mainly retained in nasal turbinates, reaching the nasal-associated lymphoid tissue; this step is facilitated by the ability of the microparticles to penetrate through the mucous epithelium. Likewise, we found intraduodenally administered SMPs on the small intestinal villi, follicle-associated epithelium, and Peyer's patches. Furthermore, under simulated gastric and intestinal pH conditions, we detected mucoadhesion between the SMPs and mucins, regardless of microparticle swelling. SMPs' mucoadhesion and translocation to mucosal immune responses induction sites explain the previously reported role of these microparticles as vaccine adjuvants and immunostimulants.

## 1. Introduction

Mucosal surfaces constitute the main entry point for many pathogenic microorganisms and function as the first line of defense against invading pathogens. Mucus represents a protective physical barrier, while mucosa-associated lymphoid tissues are responsible for initiating the antigen-specific immune response. Anatomically, nasal-associated lymphoid tissue (NALT) is the major inductive site of immune responses in the upper respiratory tract, similar to gut-associated lymphoid tissue, including the Peyer's patches (PPs) in the gastrointestinal tract [1]. Vaccination continues to be the most effective strategy to neutralize infections. Most vaccines that are currently licensed for human use are administered via the parenteral route; however, mucosal

vaccination is necessary for the efficient induction of mucosal immune responses [2], including the SARS-CoV2 virus [3].

Although nasal and oral vaccination has several advantages [4,5], mucosal vaccination involves challenges, such as the decrease in absorption and uptake due to mucociliary clearance in the respiratory tract or peristaltic forces in the intestine, antigenic degradation, and the inability of the antigen to overpass the mucus barrier. These challenges have led researchers to explore several strategies to improve the effectiveness of mucosal immunization.

Polymeric nanoparticles and microparticles have been widely investigated to develop new-generation vaccines [6]. In addition to the intrinsic adjuvant and immunostimulatory properties of several polymers [7] the adhesive attachment between polymer-based adjuvants

*Abbreviations:* SMPs, raw starch microparticles; NALT, nasal-associated lymphoid tissue; PPs, Peyer's patches; BCG, Bacille Calmette-Guérin; FITC-SMPs, FITC-stained raw starch microparticles.

\* Corresponding author.

*E-mail addresses:* [vasquezmarnathaly@gmail.com](mailto:vasquezmarnathaly@gmail.com) (N. Vasquez-Martínez), [dguillen@biomedicas.unam.mx](mailto:dguillen@biomedicas.unam.mx) (D. Guillén), [moreno.sa@ibiomedicas.unam.mx](mailto:moreno.sa@ibiomedicas.unam.mx) (S.A. Moreno-Mendieta), [pedrogrm@live.com](mailto:pedrogrm@live.com) (P. Medina-Granados), [rcasanas@ipn.mx](mailto:rcasanas@ipn.mx) (R.G. Casañas-Pimentel), [esanmartin@ipn.mx](mailto:esanmartin@ipn.mx) (E. San Martín-Martínez), [mamm@biomedicas.unam.mx](mailto:mamm@biomedicas.unam.mx) (M.Á. Morales), [sersan@biomedicas.unam.mx](mailto:sersan@biomedicas.unam.mx) (S. Sanchez), [romina@biomedicas.unam.mx](mailto:romina@biomedicas.unam.mx) (R. Rodríguez-Sanoja).

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.04.013>

Received 15 November 2022; Received in revised form 8 March 2023; Accepted 18 April 2023

Available online 23 April 2023

0939-6411/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



and mucus (mucoadhesion) plays a significant role in antigen-specific immune responses enhanced after mucosal immunization. Several authors propose that the improvement in the immune response occurs because mucoadhesion increases the residence time of the particle formulations, prevents removal from the mucosa, increases the efficiency of antigen release, and promotes subsequent vaccine uptake by different cells [8,9].

Starch from various botanical sources has been used extensively in pharmaceutical delivery [10,11,12], and as vaccine adjuvants [13,14,15,16,17,18]. However, due to the semicrystalline structure and insolubility of raw starch granules most applications use soluble starch with physicochemical modifications [19]. Physicochemical treatments not only destroy and breakdown the structure of the granules but also cause irreversible changes that alter the physicochemical properties of starch [20,21], including biodegradability, swelling, biocompatibility, and toxicity along with the ability to adhere to mucous surfaces [22,23,24].

Consequently, different results are expected depending on the modification of the starch and even more so for raw starch. Therefore, in the present study, we refer to raw starch microparticles (SMPs) to differentiate them from functionalized or physicochemically treated soluble starch that we refer to as “starch-based polymers” such as polyacryl-starch microparticles and silicone polymer-grafted starch [25,26].

SMPs were used to administer antigens by the mucosal route and induce a specific immune response [13,14]. Unlike other particulate antigen-delivery systems, the antigen is immobilized on raw starch by direct, noncovalent adsorption. The immobilization occurs through hydrophobic, CH- $\pi$  interactions and hydrogen bonds via a carbohydrate-binding module [27,28,29]. In this way, with the use of SMPs, the necessity of physicochemical modifications for particle manufacturing, functionalization, and antigen conjugation is eliminated.

Oral administration of the nontoxic fragment C of tetanus toxin (TetC) immobilized on SMPs induced a higher level of IgG antibodies against TetC in BALB/c mice than in mice that received the non-immobilized antigen; this result was consistent with the delay in the onset of tetanus symptoms when the mice were challenged subcutaneously with a lethal dose of tetanus toxin [13]. The immunostimulatory capacity of SMPs was further demonstrated by the recombinant alpha-crystallin (Acr) protein from *Mycobacterium tuberculosis* immobilized on raw starch. The preferential induction of the cell-mediated immunity response was observed when the antigen was immobilized [14].

Interestingly, in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis, the nasal administration of SMPs as a BCG booster vaccine, both alone and in combination with the Acr antigen, induced a decrease in the pulmonary bacillary load and the percentage of lung area affected by pneumonia; consequently, the mice survival rate improved compared to that received just the BCG vaccination [16]. Later, SMPs were administered as a direct adjuvant of BCG. An improvement in the protective efficacy of the BCG vaccine was observed in the animals infected with different virulent strains of *M. tuberculosis*, thus confirming the immunostimulatory activity of these microparticles [17].

This paper aims to evaluate the mucoadhesive properties of raw starch microparticles and study its distribution *in vivo* as a part of the mechanism underlying the formerly reported immunostimulatory activity. We propose that SMPs will be mucoadhesive and consequently their residence time in mucosal tissues after nasal and oral administration will be increased. Furthermore, we postulate that SMPs will traverse mucus layers and cross the epithelium to reach immune response-inducing sites, which explains the previously observed systemic immune responses after mucosal immunization. This work provides new evidence on the ability of insoluble carbohydrates, such as raw starch, to cross epithelial tissues.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Rice raw starch (5.4 % moisture, 0.4 % ash, 1.7 % ethereal extract and 0.2 % protein), 5-Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC), mucin from porcine stomach type III (PGM), mucin from bovine submaxillary glands type I-S (BSM), paraformaldehyde (PFA), ammonium chloride, and EDTA were purchased from Merck Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, US). Dimethyl sulfoxide was purchased from Fluka (Charlotte, North Carolina, US). Fluoroshield mounting medium with DAPI was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Tissue Freezing Medium was purchased from Leica Biosystems (Wetzlar, Germany). Xylazine (Rompun® 2 %) was purchased from Bayer Vital GmbH (Leverkusen, Germany). Ketamine (Anesket®), isoflurane (Sofluran®/Vet), and sodium pentobarbital (Pisabental®) were obtained from PiSA Agropecuaria (México City, México).

### 2.2. Preparation of raw starch microparticle suspension

SMPs suspensions were prepared by washing the raw starch three times with cold deionized sterile water and once with phosphate-buffered saline (PBS, phosphate buffer 10 mM, and NaCl 150 mM), as previously reported [30]. The pH used is indicated in each experiment. SMPs suspensions were prepared immediately before every experiment.

### 2.3. Preparation of FITC-stained raw starch microparticles

SMPs were stained with FITC in accordance with the manufacturer's recommendations, with slight modifications to the protocol. Briefly, 10 mg of SMPs was washed with deionized sterile water and suspended in 1 ml of 0.1 M sodium carbonate buffer pH 9. Then, the supernatant was decanted. FITC was dissolved in DMSO (0.5 mg/mL) and mixed with SMPs. The suspension was incubated in the dark for 8–12 h at 4 °C with continuous stirring. After incubation, NH<sub>4</sub>Cl was added to a final concentration of 50 mM to quench and stop the reaction and was incubated for 2 extra hours at 4 °C. FITC-stained raw starch microparticles (FITC-SMPs) were separated from the free FITC by washing with deionized sterile water (five times) and suspended in PBS, pH 7.4. Images of the fluorescent microparticles were obtained under a Nikon A1R-STORM confocal microscope (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, US) at an excitation wavelength of 488 nm at the Microscopy Facility. Image analysis was performed using the open-source software ImageJ.

### 2.4. Characterization of raw starch microparticles

Scanning electron microscopy (SEM) was performed to assess the morphology and size distribution of the microparticles. Dry SMPs were spread on double-sided carbon tape, mounted on stubs of metal, and sputter-coated with gold in Denton Vacuum Desk IV equipment (Moorestown, NJ, US) for 2 min. SEM image acquisition was performed with a JEOL-JSM-6390LV microscope (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, USA) at 20 kV voltage, secondary electron (SE) imaging mode, and X1,000 magnification.

The particle size distribution was calculated using ImageJ and OriginLab® 2021 software (trial version). Laser diffraction (LD) using Mastersizer 2000 with the wet dispersion system Hydro 2000 S (Malvern Instruments, Malvern, UK) was used to confirm the size distribution of SMPs and FITC-SMPs in suspension. The sample was dispersed in water. The resulting suspension was added dropwise into the sample cell to achieve the obscuration range of 10–20 %. The sample was measured fivefold. The size range in each sample was analyzed with reference refractive indices of (1.5) and (1.3) for particles and dispersant, respectively. The average particle size was expressed as the volume-weighted mean. The particle size distribution is expressed in terms of the SPAN factor, which is calculated as:



$$SPAN = d90 - d10 \times d50$$

where d10, d50, and d90 are the diameter sizes of a given percentage of particles smaller than the specified size. A high SPAN value indicates a wider particle size distribution.

On the other hand, a suspension of SMPs (100 µg/mL) was prepared in deionized sterile water to determine zeta (ζ)-potential by Laser Doppler microelectrophoresis and Phase Analysis Light Scattering (M3-PALS) using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Each measurement was performed in triplicate.

#### 2.4.1. Stability of FITC-staining on SMPs

Emission properties of FITC-SMPs as a function of time and pH were assessed. Suspensions of FITC-SMPs (0.5 mg/mL) were suspended in PBS (pH 7.4), simulated gastric fluid (SGF), and simulated intestinal fluid (SIF). Simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) were prepared according to US Pharmacopeia [31]. SGF – 3.2 mg/mL (w/v) pepsin, 30 mM NaCl, and 86 mM HCl, pH 1.2. SIF – 10 mg/mL (w/v) pancreatin (which contains many enzymes, including amylase, trypsin, lipase, ribonuclease, and protease though only the amylase, protease, and lipase activities are specified in the USP), 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.2 N NaOH, pH 6.8.

Fluorescence emissions were collected immediately and after incubation at 37 °C for 60, 240, and 480 min under continuous shaking (100 rpm) using a Biotek Synergy H4™ Hybrid plate reader (Winooski, VT, USA). The fluorescence intensity was further obtained after washing with PBS (pH 7.4) to evaluate the fluorescence recovery. To get an indication of the stability of the formulations in the gastrointestinal tract, FITC-SMPs were exposed to SGF for 2 h, followed by 2 h incubation in SIF. The fluorescence intensity of the FITC-SMPs in the mixture of the digestion phases was evaluated. Each suspension was measured in triplicate using 100 µL. Measurements were performed with black solid bottom 96-well micro-plates. Fluorescence intensity data at FITC emission wavelength are reported ( $\lambda_{ex} = 495$  nm,  $\lambda_{em} = 525$  nm).

### 2.5. Mucoadhesion and swelling of raw starch microparticles

#### 2.5.1. Preparation of mucin solution

Stock solutions (10 mg/mL) of BSM or type I-S and PGM or type III were prepared by dissolving them in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 6.8 and 5.8, or deionized sterile water adjusted the pH to 2 with hydrochloric acid to simulate the pH of gastric fluid. The solutions were stirred at 200 rpm for 12 h at room temperature, sonicated for 5 min at 30 % amplitude (Vibra-Cell™ VCX 130, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, US). Mucin suspensions were stored and protected from light at 4 °C. Before use, the mucin suspension is sonicated again until clarified, then filtered through a 0.45 µm disc filter (MF-Millipore™, Merck KGaA Darmstadt, Germany).

#### 2.5.2. Adsorption of mucin to raw starch microparticles

For this assay, we adapted the methodologies developed for protein raw starch adsorption [27] and fluorescence spectroscopy measurements for mucoadhesion [32]. Briefly, starch was washed five times with cold deionized sterile water and suspended in 0.1 M PB, pH 5.8 and 6.8, or adjusted to pH 2. Increasing starch concentrations (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 5.0, 10, 20, 40, 80, and 100 mg/mL) were added to a constant concentration (0.4 mg/mL) of BSM or PGM. The mixture was incubated at 37 °C for 1 h with constant agitation. Next, the mixture was centrifuged at 3075 × g for 3 min, and the supernatants were recuperated and used to measure unbound mucin. Intrinsic fluorescence emission of mucin solutions was recorded before and after incubation with starch in an accounting spectrofluorometer (ISS Ins., USA). The samples were all excited at 285 nm, and the emission spectrum was recorded between 300 and 500 nm at 25 °C, with 1 cm spectral slit widths. The results are the average of two independent experiments.

#### 2.5.3. Determination of the swelling power of the raw starch microparticles

The swelling power was determined according to the protocol previously reported by Li & Yeh [33] with slight modifications. Briefly, 10 mg of SMPs were suspended in distilled water, PBS pH 7.4, SGF, or SIF. Suspended SMPs were incubated at 37 °C for 5, 60, 120, and 240 min with constant stirring. As a positive swelling control, the SMPs were heated to 70 °C in a shaking water bath. The tubes were then centrifuged for 20 min at 17709 × g, and both sediment (Ws) and supernatant were air-dried (W1) and weighed. The swelling power was calculated by the following equations [33]:

$$\text{Watersolubleindex (WSI)} = [W1/0.1] \times 100\%$$

$$\text{Swellingpower} = Ws[0.1(100\% - WSI)]$$

### 2.6. In vivo retention time and distribution of raw starch microparticles

#### 2.6.1. Animals

Female 10- to 14-week-old and body weights 21–24 g Balb/c mice were obtained from the Animal Care Facilities of Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Instituto de Biotecnología, UNAM, and Instituto Nacional de Pediatría. Mice were housed under controlled temperature, humidity, light/dark cycles, and pathogen-free conditions. The animals were given ad libitum access to food and water. All procedures were performed according to the Internal Committee for Care and Use of Laboratory Animals of the IIB, UNAM (Protocol 193) and the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist are filled out and attached in the Supplementary material.

#### 2.6.2. Confocal laser scanning microscopy analysis

**2.6.2.1. In vivo retention of raw starch in the nasal cavity.** FITC-SMPs (1 mg suspended in 20 µL of PBS, pH 7.4) were administered nasally to mice by nasal drops with a micropipette (n = 15). Three mice were euthanized for each sampled time (5, 60, 240, 480 min, or 24 h). Control animals were administered PBS, pH 7.4 (n = 3), and euthanized at 60 min following a standardized protocol. Briefly, the mice were deeply anesthetized by subcutaneous injection of a ketamine-xylazine solution (100 and 10 mg/kg, respectively) (KX) and then transcardially perfused with cold PBS pH 7.4 followed by 4 % PFA. The skin surrounding the skull and face was removed, and the head was immersed in 4 % PFA for subsequent fixation for 24 h. Next, the heads were immersed in a decalcification solution (10 % EDTA, pH 7.4) and kept at room temperature, protected from light for 15–18 days according to the protocol described by Guibas [34] with slight modifications in time. The decalcified tissue was rinsed for 2 h with deionized sterile water and cut transversely under the stereoscopic microscope into the following parts: anterior region (immediately after the incisive teeth), middle (at the level of the incisive papilla), and posterior (in half of the second molar tooth). Each specimen was embedded in a freezing medium and stored at –70 °C until use.

The anterior, middle, and posterior regions of the nasal cavity (Appendix A) were cut into 6 µm thick transverse sections at a constant interval of 150 µm using a Leica CM1850 cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) at 5, 60, 240, 480 min, or 24 h after nasal administration of SMPs. Reconstruction of the nasal cavity was performed by plotting the total area of each region, which in turn was subdivided into upper and lower section contours using Stereo Investigator software. After drawing the contours, the SMPs were counted using the reconstructed images (Appendix B). In each region of the nasal cavity, a total of 5 cuts were chosen to perform the SMPs count. The analysis and image capture were carried out in an Olympus BX51-WI DSU (Disk Spinning Units) confocal microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) equipped with Stereo Investigator software (v9; MBF Bioscience, Vermont, US). The Stereo Investigator data were analyzed with the NeuroExplorer program

(MBF Bioscience, Vermont, US). Image analysis was performed using ImageJ.

**2.6.2.2. Localization of raw starch microparticles in nasal-associated lymphoid tissue.** The animals were anesthetized for the experiments according to the above protocol. The NALT, identified as two small longitudinal strips of tissue attached to the palate [35], was dissected following the methodology described by Cisney and coworkers [36]. Briefly, the heads of the mice were severed, sagittal separation of the two hemimandibles was performed with a cut in the anteroposterior region leaving the palate visible, and the tongue was removed with a cut under a stereoscopic microscope. The soft palate was separated from the hard palate with the edge of an 18-gauge needle. The NALT is located bilaterally in the anterior region of the hard palate.

Whole tissue was fixed in 4 % PFA for 24 h at 4 °C and then immersed in increasing concentrations of sucrose in PBS pH 7.4 (10 %, 20 %, and 30 %) for 24 h in each solution. The hard palate was embedded in Tissue Freezing Medium and cut into longitudinal sections (10 µm thick) on a cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Tissue isolation was performed 5, 120, or 240 min after the nasal administration of FITC-SMPs (1 mg suspended in 20 µL of PBS pH 7.4), control mice were administered with PBS pH 7.4. Images were captured utilizing an Olympus BX51-WI DSU confocal microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA). Image analysis was performed using ImageJ. Each experiment was repeated at least three times (n = 12).

**2.6.2.3. Localization of raw starch microparticles in the small intestine.** Twelve hours before the experiment, the animals were fasted with ad libitum access to water. Mice were deeply anesthetized as described in Section 2.6.2.1. After sedation, a small incision was made in the midline of the abdomen, the proximal end of the small intestine was carefully exposed, and a single dose of FITC-SMPs was injected into the lumen (1 mg suspended in 100 µL of PBS pH 7.4). The intestine was returned to the abdominal cavity, and the incision was closed. Five, 120, or 240 min after intraduodenal injection of SMPs, the mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (200 mg/kg) and transcardially perfused as described above. The intestine was carefully separated from the mesentery, and PPs (4–5 per animal) were isolated under a stereoscopic microscope.

Transverse segments of the small intestine containing PPs were transferred to a Petri dish with PBS pH 7.4, to remove fecal debris and then immersed in 4 % PFA overnight, followed by a gradient of sucrose (10 %, 20 %, and 30 %). Next, PPs were embedded in Tissue Freezing Medium and stored at –70 °C until use.

Cross-sections of randomly selected PPs were cut at a 10 µm thickness at –20 °C using a cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Images of the small intestine were captured by an Olympus BX51-WI DSU confocal microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA). Image analysis was performed using ImageJ. Each experiment was repeated in three animals (n = 9).

### 2.6.3. Scanning electron microscopy analysis

The nasal cavities and the PPs collected for confocal microscopy analysis (2.6.2.1 and 2.6.2.3, respectively) were thawed to prepare the specimens for SEM. Cross-sections with a thickness of 1 mm were made from the anterior, middle, and posterior regions of the nasal cavity using a sharp knife. The PPs were cut longitudinally with scissors, exposing the villi and the lumen. The tissues were dehydrated through graded ethanol (50, 60, 70, 80, 90, and 100 %). During dehydration, the tissue remained extended and adhered at its four ends to a Petri dish. Then, the tissue was dried, and on sample holders covered with double-sided carbon tape, the samples were covered with a thin layer of gold (Denton Vacuum Desk IV, Moorestown, NJ, US). Preparations were examined in the SEM JEOL-JSM-6390LV (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, US) at a voltage of 20 kV.

## 2.7. In vivo biodistribution and organs excision

Biodistribution of FITC-SMPs was studied in mice intragastrically or nasally administered with the microparticles (1 and 5 mg suspended in 100 µL of PBS pH 7.4 or 1 and 3 mg suspended in 20 µL of PBS pH 7.4, respectively). Mice were separated randomly into groups of three mice, and one animal was administered with PBS pH 7.4 as a control to differentiate the endogenous fluorescence signal. The day before the experiment, mice were shaved entirely with depilatory cream (Veet® Sensitive Skin, Slough, UK) under deep anesthesia (Section 2.6.2.1). Animals were anesthetized subcutaneously with KX and 2 % isoflurane using an XGI-8 gas anesthesia system (Caliper Life Sciences Inc., Hopkinton, MA, USA). The fluorescence emission spectrum was recorded at 20, 45, 90, 240, and 420 min, and animals were kept awake between each image capture.

Due to the limited ability of FITC fluorescence to penetrate tissue (3–4 mm) [37], we repeated the experiment in a different group of mice, and after 60 min of FITC-SMPs administration, the animals were euthanized as described previously (Section 2.6.2.1). Cervical lymph nodes, brain, lungs, heart, stomach, spleen, liver, kidneys, ladder, and small intestine were collected by simple dissection.

Whole-organ fluorescence imaging and *in vivo* images were recorded an *In vivo* Imaging System IVIS Lumina XR III (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) in the CICATA, IPN, at a wavelength of 520 nm after excitation at 480 nm, 0.75–1 s of exposure time, medium binning, f-stop 1, and field of view of 12.5 cm<sup>2</sup> (D). Fluorescence intensity was determined by measuring the fluorescence within the region of interest (ROI) selected for each animal using Living Image® Software 4.5.2 (IVIS Spectrum, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA).

## 2.8. Toxicity of raw starch microparticles to red blood cells

The hemolytic activity of SMPs was tested in human blood cell samples following the protocol described by Evans and coworkers [38]. Briefly, mixtures of red blood cells (RBCs) in 100 mM PBS pH 5.6, 6.2, 6.8, and 7.4 and various concentrations of SMPs in suspension (2.5, 4, 12.5, 25, 100, 200, 400, 1000, 2000 µg/mL) were added to 96-well flat-bottom plates. The samples were then incubated in an orbital shaker at 37 °C for 1 h. The plates were centrifuged for 5 min at 500 × g.

Supernatants were aspirated and transferred to a 96-well plate for reading on a Biotek Epoch™ 2 (Agilent, CA, US) spectrophotometer at wavelengths of 400–541 nm. As a positive control, a hemolysis curve was performed with the detergent Triton X-100 (0–180 µg/mL). The percentage of hemolysis was calculated by the following equation:

$$\% \text{Hemolysis} = \frac{(\text{abs sample}) - (\text{abs neg control})}{(\text{abs pos control}) - (\text{abs neg control})} \times 100$$

## 2.9. Statistical analysis

The data are expressed as the mean of the experiments ± standard deviation (SD). For statistical analyses, GraphPad Prism 4.0 software for Windows was used. Comparison analysis was performed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni or Tukey's multiple comparison test. Differences were considered significant at p ≤ 0.05.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of the raw starch microparticles

#### 3.1.1. Particle size and ζ-potential

The required minimum concentration of FITC to stain 100 % of SMPs in suspension was established at 0.05 mg FITC/mg of SMPs by direct observation of FITC-SMPs suspensions in confocal laser scanning microscopy (Appendix C). The average particle size and ζ-potential of

microparticles are shown in Fig. 1. The SEM histogram shows that the SMPs are in a size range of 1.4–8.8  $\mu\text{m}$  with an average particle size of 4.8  $\mu\text{m}$ . SMPs of irregular and polygonal shapes with smooth horizontal surfaces are observed. In turn, laser diffraction size analysis revealed that SMPs and FITC-SMPs had an average size of 4.84  $\mu\text{m}$  and 5.86  $\mu\text{m}$ , respectively. The average  $\zeta$ -potential of SMPs was negative ( $-13.5 \pm 0.4$  mV) and did not change after FITC staining ( $-14.3 \pm 0.7$  mV); in any case, the differences were statistically significant; a relevant result because the staining should not modify  $\zeta$ -potential or size of the microparticles since both are determining factors for the interaction with the mucosa *in vivo* [39].

### 3.1.2. Stability of FITC-staining on SMPs

FITC fluorescence is highly dependent on environmental temperature and pH. Excessing hydrogen (H<sup>+</sup>) ions at acidic pH promote the protonation of the conjugated aromatic rings, which results in the loss of emission capacity [40]. As expected, the pH adjustment to 7.4 allows recovery of fluorescence intensity due to the deprotonation of the conjugated aromatic rings, a reaction named acid-tolerant reversible switchable recovery of FITC. Fig. 1 shows that the incubation at 37 °C reduced fluorescence intensity, but the decrement was dramatic after the treatment with SGF. However, the fluorescence recovered after pH neutralization indicated that FITC remained stably bound to SMPs, for at least the 8 h of the experiment. Likewise, the stability fluorescence of FITC-SMPs submitted to simulated digestion was confirmed. Thus, the results in this section indicated the suitability of staining of SMPs with FITC for *in vivo* distribution studies.

### 3.2. *In vitro* mucoadhesion studies of raw starch microparticles

We studied the mucoadhesion behavior of SMPs by adapting an *in vitro* adsorption assay between SMPs and submaxillary mucin (BSM) or porcine gastric mucin (PGM), followed by fluorescence spectroscopy. Following the addition of increasing quantities of SMPs in both gastric and intestinal conditions, a gradual decrease in the intensity of the fluorescence emission spectra of the unbound mucins is observed (Appendix D), indicating the decreasing concentration of soluble mucin due to the interactions with SMPs. SMPs bound PGM better (up to 74.5 % at pH 5.8, 56.0 % at pH 2; and 46.9 % at pH 6.8) than BSM (up to 44.4 % at pH 5.8 and 34.7 % at pH 6.8) (Fig. 2). This could be related to the percentages of sialic acid in the mucins. While BSM contains 9–24 %

sialic acid, PGM only contains 0.5–1.5 % sialic acid [41]. Thereby, the electronegative  $\zeta$ -potential of SMPs did not allow ionic interactions with the BSM's negatively charged sialic acid and sulfonic acid moieties. As reported in other systems where starch adheres to proteins such as lectins and carbohydrate-binding modules, the interaction could occur through hydrogen bonding and hydrophobic interactions with aromatic amino acids that stack with the pyranose rings of starch [29].

For many authors, swelling is a crucial step for the initiation of adhesion of many polymeric materials [42,43,44]. Starches can undergo different stages of swelling, from water absorption of amorphous regions of starch granules to the disintegration of the granules. However, swelling is usually associated with heat [45,46,47]. Consequently, to investigate if raw starch microparticles could suffer swelling in physiological conditions, the swelling power of raw starch was determined in distilled water, PBS pH 7.4, simulated gastric fluid (SGF; pH 1.2), or simulated intestinal fluid (SIF; pH 6.8). As shown in Fig. 2, any of the tested conditions produced SMPs swelling at 37 °C, at least until 240 min had passed; while in the microparticles heated at 70 °C for 60 min (positive control), the swelling was observable under all conditions. The fact that SMPs are mucoadhesive but do not swell might be considered an advantage *in vivo* since the course through the mucus mesh network would be facilitated without the steric hindrance that causes the passage of swollen starch. Unlike other polymers [48,49] the swelling of raw starch is not a determining factor for mucoadhesion *in vitro*.

### 3.3. Residence time and *in vivo* distribution of raw starch microparticles in the nasal cavity

Next, we evaluated the residence time and distribution of SMPs in the nasal cavity by confocal laser scanning microscope (CLSM) and SEM. Following intranasal administration, FITC-SMPs localize in the air passages, between the turbinates, and on the epithelial surfaces in the nasal's anterior, middle, and posterior regions. Counting SMPs after reconstruction of the nasal cavity using Stereo Investigator software allowed us to observe the gradual decrease in the number of SMPs/mm<sup>2</sup> over time (Appendix B). FITC-SMPs could be detected for up to 480 min in the nostrils of mice and were distributed heterogeneously throughout the nasal cavity (Fig. 3). There was no evidence that the FITC-SMPs were preferentially localized in the upper or lower section of the nasal cavity. The heterogeneous pattern of distribution enables us to hypothesize that the retention of SMPs is multifactorial and independent of size, as other

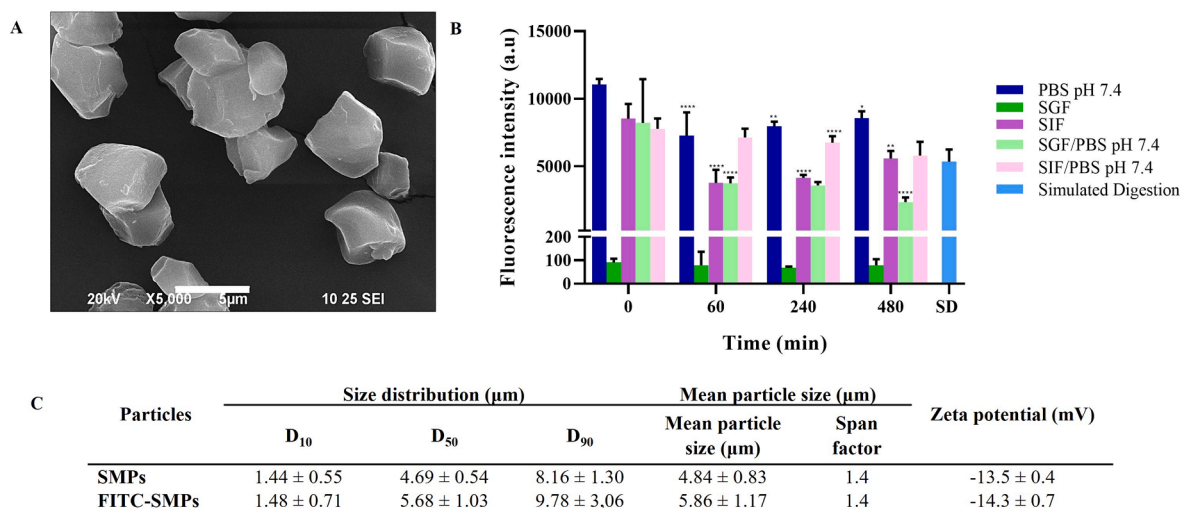
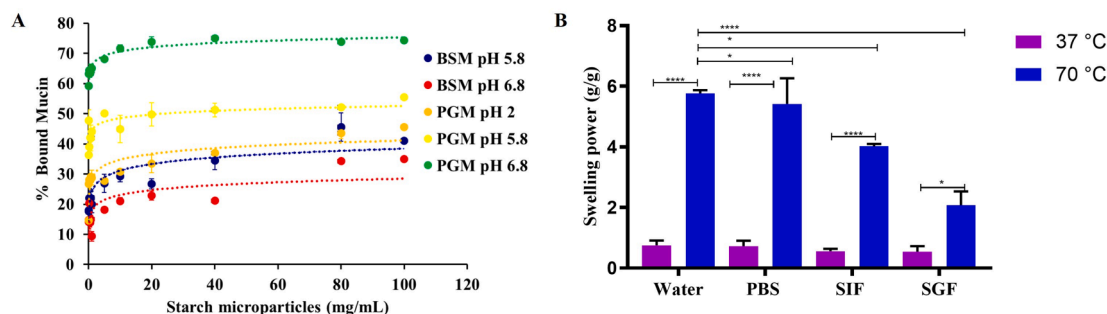
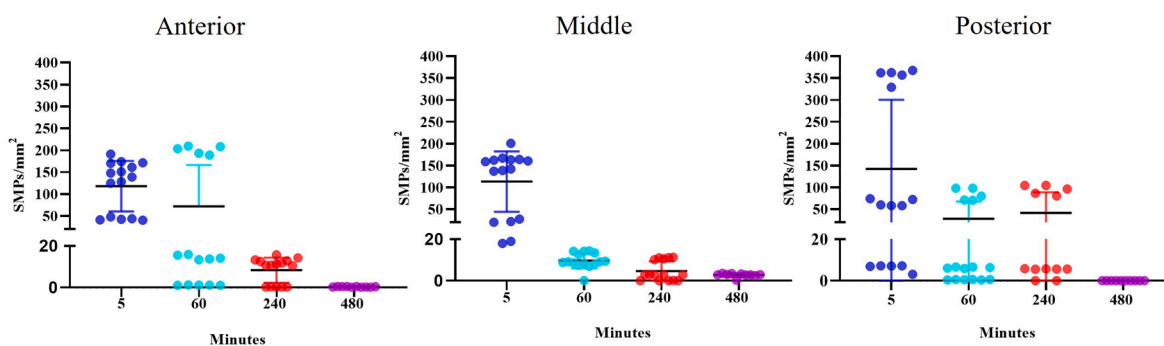


Fig. 1. Characterization of the raw starch microparticles and FITC-stained raw starch microparticles. (A) SEM images of SMPs (Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ ). (B) FITC-SMPs (0.5 mg/mL) suspended in PBS (pH 7.4), gastric and intestinal simulated fluids, and mixed for simulated digestion were incubated at 37 °C. Fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{em}} = 525$  nm) was estimated over time. The particle suspension was washed with PBS (pH 7.4) to assess recovery to fluorescence intensity at the different buffers. (C) Particle size and zeta potential of microparticle preparations. D10, D50, and D90 represent 10 %, 50 %, and 90 % of the cumulative particle size distribution. Span, distribution width. Mean  $\pm$  SD, n = 5. (For interpretation of the colour in this figure, the reader is referred to the web version of this article).





**Fig. 2.** *In vitro* mucoadhesive properties and swelling patterns of raw starch microparticles (SMPs). (A) The percentage of bound mucin was calculated by spectroscopy data of unbound mucin in the supernatants after adsorption tests with the bovine submaxillary mucin (BSM) and porcine gastric mucin (PGM) in the presence of increasing concentrations of SMPs in water at pH 2 or PBS buffer at pH 5.8 and 6.8. Data are representative of two independent experiments performed in triplicate. (B) Swelling power of SMPs as a function of temperature in distilled water (dW), PBS buffer pH 7.4, simulated intestinal fluid (SIF), and simulated gastric fluid (SGF) after 60 min. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. Statistical significance was determined by two-ANOVAs with Bonferroni multiple comparisons test and indicated as follows: \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , \*\*,  $P < 0.05$ , \*,  $P < 0.002$ . (For interpretation of the colour in this figure, the reader is referred to the web version of this article).



**Fig. 3.** Analysis of retention time of FITC stained raw starch microparticles after nasal administration to Balb/c mice. The number of FITC-SMPs per unit area ( $\text{mm}^2$ ) was calculated in anterior, middle and posterior region of nasal cavity. Systematic random sampling was performed every  $150 \mu\text{m}$  and five slices ( $6 \mu\text{m}$ ) from each mouse, region, and time were selected to count SMPs. Each dot ( $\bullet$ ) 1 represents a slice (30 total slices/time). Total  $750 \mu\text{m}$  were evaluated in each portion of the nasal cavity. Data of counted of SMPs were obtained by NeuroExplorer software. The bars represent the mean  $\pm$  SD (standard deviation) of three experiment.

authors have shown [50]; therefore, the SMPs diffusion throughout the nasal cavity must be considered different mechanisms of transport, including inertial, Brownian, and gravitational forces [51].

A similar maxillo-turbinates epithelial surface deposition was observed when the inactivated influenza virus (WIV) was administered encapsulated on N,N,N-trimethyl chitosan. A distribution that was not observed for WIV alone. For the authors, the results correlated with improvements in immunogenicity and protective efficacy [52]. Likewise, the local distribution could be relevant for understanding the improvement in the antigen-specific immune responses found in our *in vivo* previous studies [14].

Unexpectedly, after nasal administration, the SMPs rapidly moved from the airway lumen into the nasal epithelium, glands, and mucosal tissues (Fig. 4 and Movie 1, representative Z-stack image captured by CLSM). The microparticles cross the nasal epithelium without evidence of SMPs uptake by the epithelial cells at any time; however, the SMPs internalization by antigen-presenting cells is currently under investigation. This result is significant in several aspects. First, SMPs exceed the mucociliary clearance rate from the nasal cavity in rodents (15–20 min) without being eliminated [53]. Second, our findings suggest that raw starch could be used as a mucopenetrating polymer besides being mucoadhesive. The transport pathway of SMPs might be paracellular as described for some carbohydrates such as dextran [54,55]; for starch-based polymers reported the passage from the nasal cavity to blood circulation [56]. Resuming, the transport mechanism will depend on the mesh-pore size, mucosa thickness, and consequently, the location of the mucosal tissue; the  $\zeta$ -potential of SMPs that reduces ionic interactions with negatively charged sialic acid and sulfonic acid moieties, and the

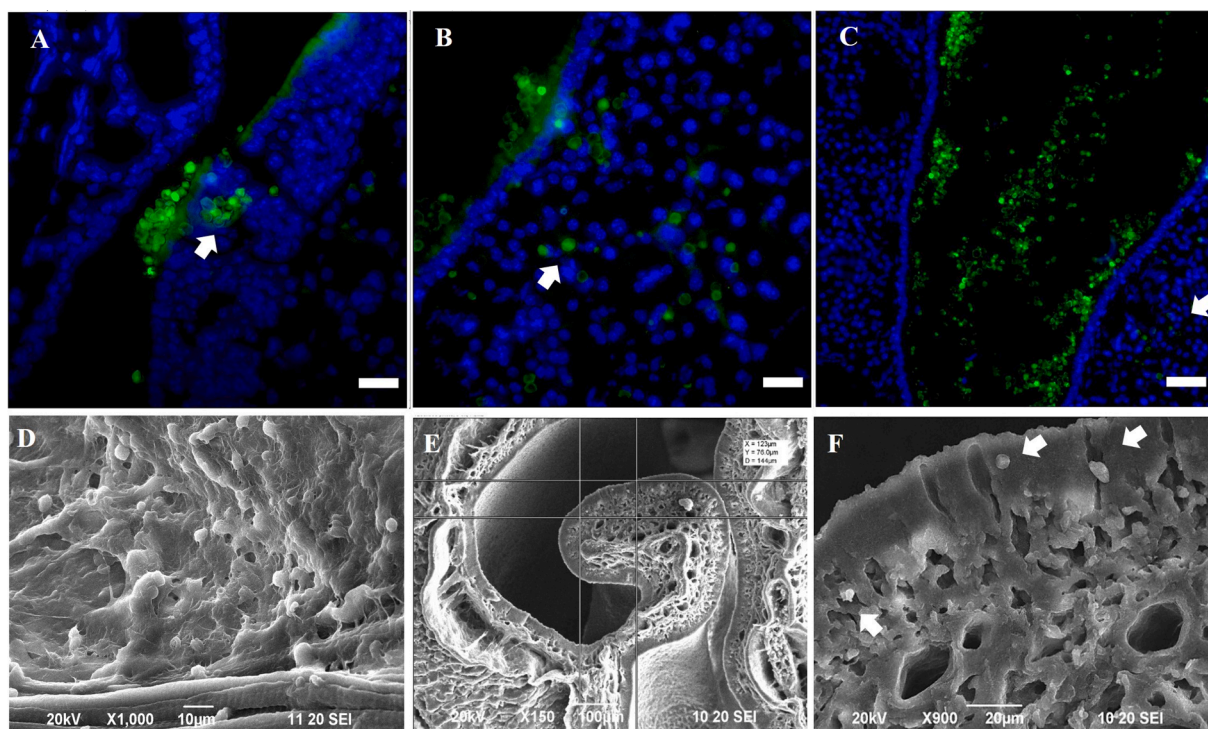
neutral charge of the raw starch that limit electrostatic interactions with the mucin.

Since our work is the first to report on the location and deposition of SMPs administered by nasal drip to mice, there is a limited capacity to compare the results with previous studies. For starch-based polymers, there is previous research on the clearance half-life in the human nasal cavity. Clearance half-lives of starch-based polymers range from 68 and 240 min, influenced by posture during administration and variation in dose distribution in dose in the anterior and posterior regions between individuals according to the type of administration [57,58].

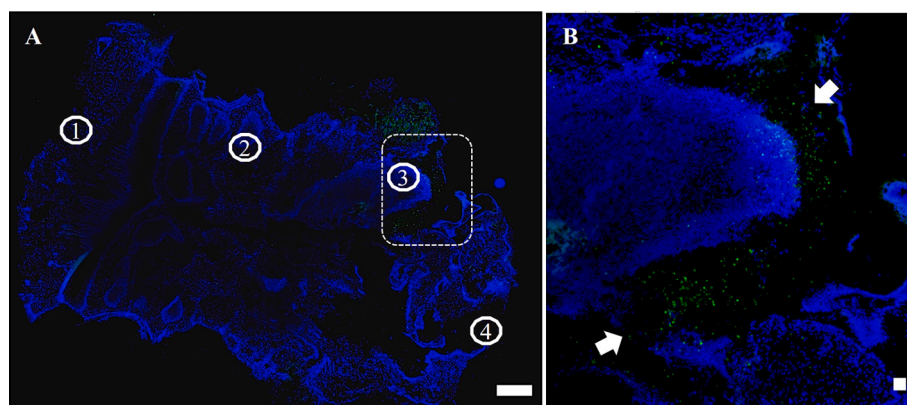
On the other hand, SEM images confirmed the SMPs retention in the anterior, middle, and posterior regions of the nasal cavity and the mucus entrapment of microparticles, mainly in the nasal septum for at least 24 h (Fig. 4, Appendix E). The difference in SMPs retention time between SEM and CLSM may be attributed to limitations associated with using fluorochromes for confocal microscopy. After this time, SMPs are expected to be cleared by mucociliary activity, as evidence suggests for most polymeric particles [59]. By this technique, we also confirm the ability of SMPs to cross the nasal epithelium.

#### 3.4. Location of raw starch microparticles in mucosal-associated lymphoid tissue

To establish whether the adjuvant and immunomodulatory responses previously observed with SMPs [14,16,17] are facilitated by the ability to reach the inductive sites for mucosa immune responses, we first evaluated the presence of SMPs in the NALT following nasal administration. As shown in Fig. 5, at 2 h after SMPs nasal



**Fig. 4.** Passage of raw starch microparticles through the epithelium of the nasal cavity of Balb/c mice. Representative confocal laser microscopy images (A–C). White arrows point to FITC-SMPs crossing the epithelial cells lining the turbinates of the (A) anterior, (B) middle, and (C) posterior regions of the nasal cavity after 5 min of nasal administration. FITC-SMPs (green) and DAPI stained nuclei (blue). Scale bars = 50  $\mu$ m. (D–F) Scanning electron microscopy images showing nasal cavity cross-sections; (D) Microparticles trapped in the mucus network, (E) SMPs crossing the nasal turbinate epithelium (X150), and (F) enlarges the central rectangle of figure E (X900). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 5.** Location of FITC-raw starch microparticles in mice nasal-associated lymphoid tissue. Confocal laser scanning microscopy on the entire longitudinal section of the hard palate that includes the NALT. FITC-SMPs (green) and DAPI-stained nuclei (blue) are shown. (A) Representative image of SMPs in NALT and between the palatal shelves after 120 min of administration. The hard palate is oriented in the figure from the posterior palate ① (left) to the upper incisors ② (right), crossing the anterior palate ③ and the NALT ④. (B) Magnification of inset in figure A, white arrows point to the SMPs. Scale bars = 500  $\mu$ m in A and 50  $\mu$ m in B. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

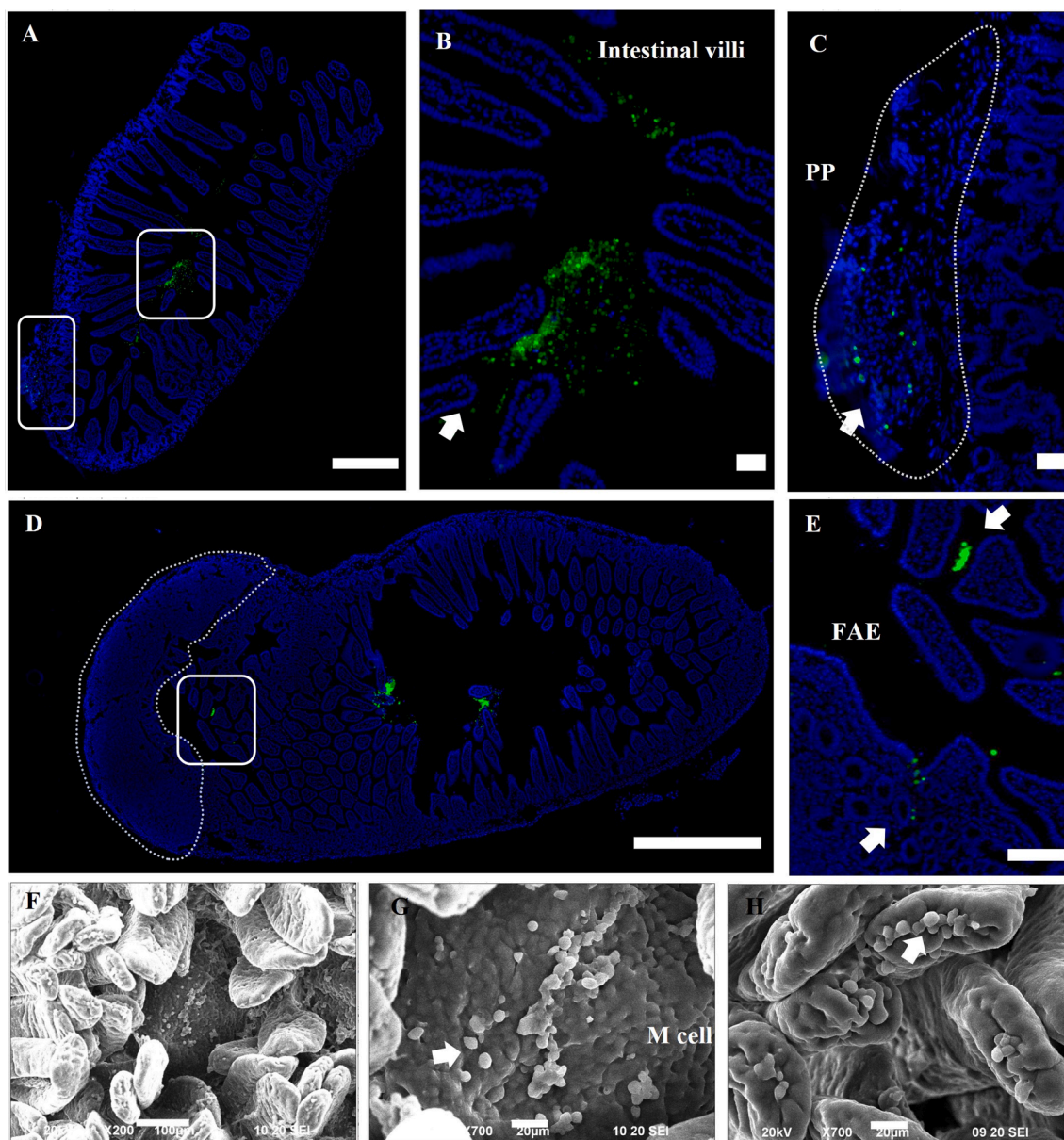
administration, an appreciable amount of FITC-SMPs was found in the NALT and between the elevated palatal shelves [60]. The SMPs remained retained in the NALT for at least 4 h, the maximum time evaluated in our experiment. Overall, mucoadhesion, mucopenetration, and translocation across the nasal epithelium explain their reach to NALT.

Then, we investigate the passage of microparticles across the lumen of the small intestine and their localization within the Peyer patches. After injecting FITC-SMPs in the proximal duodenum, CLSM and SEM images allowed identified us at SMPs at 2 and 4 h, located predominantly in the intestinal lumen, attached to mucus, covering the intestinal microvilli (Appendix F). Some SMPs moved toward the follicle-associated epithelium (FAE) and reached the PPs (Fig. 6). The SEM images revealed SMPs on M cells located in the intestinal villous epithelium (Fig. 6), where it is reported that M cells sample antigens in the intestinal lumen to induce a PP-dependent immune response [61].

According to these data, SMPs penetrate the epithelial cell barrier and reach mucosal immune inductive sites. Therefore, we suggest that the induction of antigen-specific immune responses observed in our previous work, following the oral vaccination with SMPs-immobilized antigens, is mediated by both M cells located in the FAE that cover the PPs and M cells of the intestinal villi.

Fig. 7 shows the biodistribution of SMPs *in vivo* and in different organs of mice that received FITC-SMPs via nasal or oral. SMPs retention time at the administration site was dose-related. Thus, the fluorescence signal was evident up to 420 min only with the highest doses of SMPs (3 mg and 5 mg, respectively). Despite the superior quantum yield of FITC, the limited ability to penetrate tissue (3–4 mm) [37] was a limitation in allowing fluorescence signals observation in organs in the *in vivo* assays. For this reason, principal organs had to be obtained, where we observed a similar distribution of microparticles both in nasal and oral administration (Fig. 7), detecting most of the dose in the small intestine and





**Fig. 6.** Location of FITC-raw starch microparticles in the small intestine of Balb/c mice. Confocal laser scanning microscopy shows FITC-SMPs in the small intestine after 2-h (A-C) and up to 4-h (D-E) following intraduodenal administration. FITC-SMPs (green) and DAPI-stained nuclei (blue) are shown. Rectangles in figures A and D are magnified in figures B, C, and E. The SMPs (White arrows) are located on the small intestine lumen, Peyer's patch (white dotted lines), and near the FAE (epithelium associated with the follicle), respectively. [Scale bars = 1000  $\mu$ m A, 100  $\mu$ m B-C, 500  $\mu$ m D, and 50  $\mu$ m E. (F-H) Scanning electron microscopy images show SMPs in the intestinal epithelium of Balb/c mice. (F) Localization of the SMPs in the intestinal villi associated with the intestinal villous M cells [scale bars = 100  $\mu$ m]. (G) SEM micrograph enlargement of F shows SMPs on an intestinal villous M cell [scale bars = 20  $\mu$ m]. (H) SEM micrograph enlargement of F showing SMPs on the villi surface [scale bars = 20  $\mu$ m]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

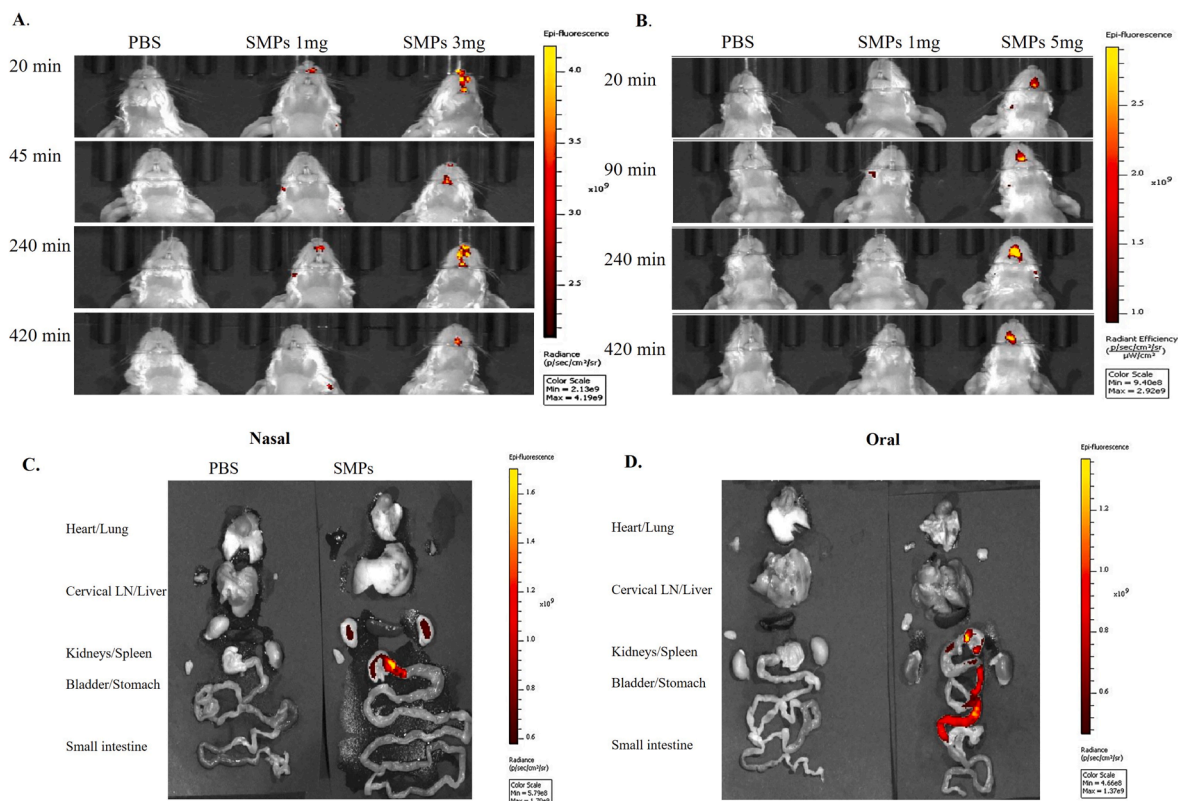
stomach 60 min post-administration. There was no evidence of FITC-SMPs in the lungs, heart, cervical lymph nodes, liver, spleen, or bladder; however, animals that received FITC-SMPs nasally exhibited a fluorescence signal in the kidneys. When crossing the epithelium, the particles can drain into the systemic circulation due to the great vascularization of the epithelium [62] and go to the kidneys, where it has been observed with different types of particles that they can remain up to several hours after administration [63,64]. A fraction of the SMPs dose was swallowed due to quick passage through the floor of the nasal cavity without interaction with the nasal mucosa. This occurrence is related to the nasal administration system and is more frequent when performed by nasal drip [65,66].

### 3.5. Biodistribution and toxicity of raw starch microparticles

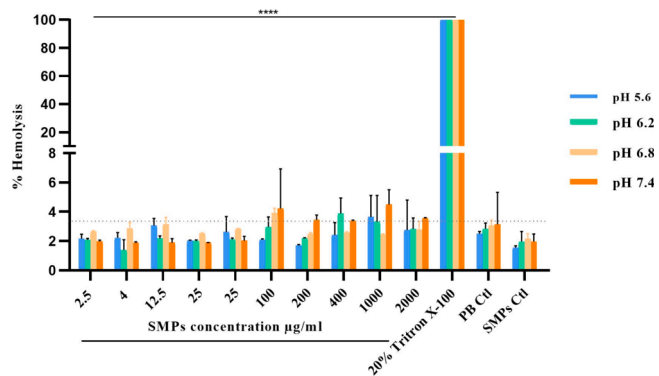
Due to the potential passage of polymeric nanoparticles and microparticles into the systemic bloodstream through the nasal route, we decided to study hemolysis as an expression of SMPs-induced cytotoxicity. As seen in Fig. 8, no concentration of SMPs, regardless of pH value, induced hemolysis of red blood cells after incubation compared to that of a PBS control. These results, together with the existing literature on the use of starch in pharmaceuticals and cosmetics, clearly demonstrate starch is safe and non-toxic.

## 4. Conclusions

The present work demonstrates the retention of SMPs in the nasal



**Fig. 7.** Biodistribution of FITC-SMPs. *In vivo* images of mice showing the administration site and retention of FITC-SMPs administered via the (A) nasal or (B) oral route. Mice were imaged at different time points up to 420 min. Major organs were harvested and imaged at 60 min after a single dose of FITC-SMPs by (C) nasal or (D) oral route. IVIS-Lumina®III; set to Exc: 480 nm, Ems: 520 nm, 0.75–1 s exposure; medium binning, F/stop: 1, and field of view of 12.5 cm<sup>2</sup>. (For interpretation of colour in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 8.** Hemolytic activity of raw starch microparticles on human red blood cells. Increasing concentrations of SMPs were incubated with red blood cells in 100 mM PBS (pH 5.6, 6.2, 6.8 or 7.4) in 37 °C shaker for 1 h. After centrifugation, the amount of hemoglobin released into supernatants were measured by spectrophotometry scanning (400–541 nm). Percentage hemolysis was calculated with Triton X-100 standards curve at  $\lambda_{max}$  410 nm. Data are representative of three independent experiments. Statistical significance was determined by two-ANOVAs with Tukey’s multiple comparison test and indicated as follows: \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , \*\*,  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.002$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cavity and small intestine mucosa *in vivo*, associated with the mucoadhesion property of raw starch *in vitro*. The interaction depends on the mucin’s nature. We can deduce that the adhesion between mucin and SMPs helps microparticles to be retained in the mucus layer so that they can later cross the epithelial cell barrier and reach the mucosal lymphoid

tissues. All these results allow us to explain our previous results showing the immunostimulatory activity of these microparticles. Indeed, our results agree with previous reports with several polymeric particle-based adjuvants that report that greater mucoadhesion improves the immunogenicity and the quality of the immune response.

For this reason, raw starch microparticles are proposed as a suitable, nontoxic, and efficient system for mucosal vaccination and other biomedical applications involving mucosal administration without the need to introduce physicochemical modifications.

**Author contribution**

**Nathaly Vasquez-Martínez:** conceptualization, methodology, formal analyses, investigation and data curation, writing original draft. **Daniel Guillén:** conceptualization, writing - review & editing. **Silvia Andrea Moreno-Mendieta:** conceptualization, methodology, investigation. **Pedro Medina-Granados:** conceptualization, methodology, investigation. **Rocío Guadalupe Casañas-Pimentel:** methodology, conceptualization, investigation, writing - review & editing. **Eduardo San Martín-Martínez:** resources, writing - review & editing. **Miguel Ángel Morales:** resources, writing - review & editing. **Sergio Sanchez:** conceptualization, writing-review & editing. **Romina Rodríguez-Sanoja:** conceptualization, validation, resources, writing-original draft, supervision, funding acquisition project administration.

**Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



## Data availability

No data was used for the research described in the article.

## Acknowledgments

We appreciate the excellent technical assistance in microscopy of Dr. Miguel Tapia Rodríguez from the Unidad de Microscopía of IIB, UNAM and Eng. Mario Alberto García, of the Laboratorio de Microscopía from CICATA, IPN. We also thank Dr. Isabel Velázquez, Dr. Laura I. Álvarez and M.Sc. Ricardo Muñiz from Laboratorio de Química e Ingeniería de Proteínas, FM, UNAM for providing physical facilities and technical assistance. The authors thank Dr. Freddy R. Cifuentes from the Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIB, UNAM for also providing physical facilities and to M.Sc. Heriberto Caballero from the Instituto Nacional de Pediatría for the supply and care of animal subjects.

## Funding sources

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México [grant number A1-S-9849] and PAPIIT/DGAPA/UNAM [grant numbers IN 216419 and IN 216722]. Nathaly Vasquez Martínez is a doctoral student from Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. She received a fellowship from CONACYT.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.04.013>.

## References

- H. Kiyono, S. Fukuyama, Nalt-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 699–710, <https://doi.org/10.1038/nri1439>.
- E.C. Lavelle, R.W. Ward, Mucosal vaccines — fortifying the frontiers, *Nat. Rev. Immunol.* 22 (2022) 236–250, <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>.
- V. Mouro, A. Fischer, Dealing with a mucosal viral pandemic: lessons from COVID-19 vaccines, *Mucosal Immunol.* 15 (2022) 584–594, <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00517-8>.
- S. Wang, H. Liu, X. Zhang, F. Qian, Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: Advantages, challenges and formulation strategies, *Protein Cell* 6 (2015) 480–503, <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0164-2>.
- M. Skwarczynski, I. Toth, Non-invasive mucosal vaccine delivery: advantages, challenges and the future, *Expert Opin. Drug Deliv.* 17 (2020) 435–437, <https://doi.org/10.1080/10.1080/17425247.2020.1731468>.
- Z. Jin, S. Gao, X. Cui, D. Sun, K. Zhao, Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines, *Int. J. Pharm.* 572 (2019), 118731, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118731>.
- A.M. Weiss, S. Hossainy, S.J. Rowan, J.A. Hubbell, A.P. Esser-Kahn, Immunostimulatory polymers as adjuvants, immunotherapies, and delivery systems, *Macromolecules* 55 (2022) 6913–6937, <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.2c00854>.
- V.S. Gondil, T. Dube, J.J. Panda, R.M. Yennamalli, K. Harjai, S. Chhibber, Comprehensive evaluation of chitosan nanoparticle based phage lysin delivery system; a novel approach to counter *S. pneumoniae* infections, *Int. J. Pharm.* 573 (2020), 118850, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118850>.
- C.-S. Cho, S.-K. Hwang, M.-J. Gu, C.-G. Kim, S.-K. Kim, D.-B. Ju, C.-H. Yun, H.-J. Kim, Mucosal vaccine delivery using mucoadhesive polymer particulate systems, *Tissue Eng Regen. Med.* 18 (5) (2021) 693–712, <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00373-w>.
- M. Lemieux, P. Gosselin, M.A. Mateescu, Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres as gastroretentive dosage form, *Int. J. Pharm.* 496 (2015) 497–508, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.027>.
- M. Jelkmann, C. Lechner, C. Menzel, V. Krieb, A. Bernkop-Schnürch, Cationic starch derivatives as mucoadhesive and soluble excipients in drug delivery, *Int. J. Pharm.* 570 (2019), 118664, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118664>.
- A. Nouri, M. Jelkmann, S. Khoee, A. Bernkop-Schnürch, Diaminated starch: a competitor of chitosan with highly mucoadhesive properties due to increased local cationic charge density, *Biomacromolecules* 21 (2020) 999–1008, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01665>.
- D. Guillén, S. Moreno-Mendieta, R. Pérez, C. Espitia, S. Sánchez, R. Rodríguez-Sanoja, Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens, *Carbohydr. Polym.* 112 (2014) 210–215, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.089>.
- S.A. Moreno-Mendieta, D. Guillén, C. Espitia, R. Hernández-Pando, S. Sanchez, R. Rodríguez-Sanoja, A novel antigen-carrier system: The *Mycobacterium tuberculosis* Acr protein carried by raw starch microparticles, *Int. J. Pharm.* 474 (2014) 241–248, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.041>.
- J.Y. Hwang, T.D. Randall, A. Silva-Sanchez, Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung, *Front. Immunol.* 7 (2016) 1–17, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00258>.
- S. Moreno-Mendieta, J. Barrios-Payán, D. Mata-Espinosa, S. Sánchez, R. Hernández-Pando, R. Rodríguez-Sanoja, Raw starch microparticles have immunostimulant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with *Mycobacterium tuberculosis*, *Vaccine* 35 (2017) 5123–5130, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.012>.
- S. Moreno-Mendieta, A. Barrera-Rosales, D. Mata-Espinosa, J. Barrios-Payán, S. Sánchez, R. Hernández-Pando, R. Rodríguez-Sanoja, Raw starch microparticles as BCG adjuvant: their efficacy depends on the virulence of the infection strains, *Vaccine* 37 (2019) 5731–5737, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.027>.
- R.E. Guktur, E.I. Nep, O. Asala, P.O. Olorunfemi, N.C. Ngwuluka, N.A. Ocheke, A. S. Sagay, Carboxymethylated and acetylated xerogel derivatives of *Plectranthus esculentus* starch protect Newcastle disease vaccines against cold chain failure, *Vaccine* 39 (2021) 4871–4884, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.062>.
- E. Ojogbo, E.O. Ogunsona, T.H. Mekonnen, Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials, *Mater. Today Sustain.* 7–8 (2020), 100028, <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028>.
- M.V. Lawal, Modified starches as direct compression excipients – effect of physical and chemical modifications on tablet properties: a review, *Starch/Staerke* 71 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1002/star.201800040>.
- F.G. Torres, O.P. Troncoso, A. Pisani, F. Gatto, G. Bardi, Natural polysaccharide nanomaterials: an overview of their immunological properties, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019), <https://doi.org/10.3390/ijms20205092>.
- S. Thakore, M. Valodkar, J.Y. Soni, K. Vyas, R.N. Jadeja, R.V. Devkar, P.S. Rathore, Synthesis and cytotoxicity evaluation of novel acylated starch nanoparticles, *Bioorg. Chem.* 46 (2013) 26–30, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2012.10.001>.
- A. Drabczyk, S. Kudlacik-Kramarczyk, B. Tyliczszak, K. Rudnicka, M. Urbaniak, S. Michlewska, J.B. Królczyk, P. Gajda, K. Pielichowski, Measurement methodology toward determination of structure-property relationships in acrylic hydrogels with starch and nanogold designed for biomedical applications, *Meas. J. Int. Meas. Confed.* 156 (2020), 107608, <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.107608>.
- M.T. Soe, P. Chitropas, T. Pongjanyakul, E. Limpongsa, N. Jaipakdee, Thai glutinous rice starch modified by ball milling and its application as a mucoadhesive polymer, *Carbohydr. Polym.* 232 (2020), 115812, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115812>.
- M.R. McDermott, P.L. Heritage, V. Bartzoka, M.A. Brook, Polymer-grafted starch microparticles for oral and nasal immunization, *Immunol. Cell Biol.* 76 (1998) 256–262, <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00743.x>.
- N. Rydell, L. Stertman, I. Sjöholm, Starch microparticles as vaccine adjuvant, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 807–828, <https://doi.org/10.1517/17425247.2.5.807>.
- R. Rodríguez Sanoja, J. Morlon-Guyot, J. Jore, J. Pintado, N. Juge, J.P. Guyot, Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the c-terminal direct repeats in raw-starch binding, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3350–3356, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3350-3356.2000>.
- R. Rodríguez-Sanoja, N. Oviedo, L. Escalante, B. Ruiz, S. Sánchez, A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 341–346, <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0502-y>.
- S. Armenta, Z. Sánchez-Cuapio, M.E. Munguia, N.O. Pulido, A. Farrés, K. Manoutcharian, A. Hernandez-Santoyo, S. Moreno-Mendieta, S. Sánchez, R. Rodríguez-Sanoja, The role of conserved non-aromatic residues in the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase CBM26-starch interaction, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 829–838, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.061>.
- D. Guillén, S. Moreno-Mendieta, P. Aguilera, S. Sánchez, A. Farres, A., R. Rodríguez-Sanoja, The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 4141–4148, doi:10.1007/s00253-013-4778-0.
- United States Pharmacopeia Convention Council of Experts. Simulated gastric and intestinal fluids, TS, in: Board of Trustees (Eds), The United States Pharmacopeia 27, The National Formulary vol. 22, Rockville, MD, 2004, pp 2728.
- M. Ouellette, F. Masse, M. Lefebvre-Demers, Q. Maestracchi, P. Grenier, R. Millar, N. Bertrand, M. Prieto, É. Boisselier, Insights into gold nanoparticles as a mucoadhesive system, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32699-2>.
- J.Y. Li, A.I. Yeh, Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches, *J. Food Eng.* 50 (2001) 141–148, [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00236-3).
- G.V. Guibas, S. Lakis, C. Gkimpas, M. Manda, D. Kapoukranidou, E. Spandou, Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: An attempt at standardization, *Exp. Toxicol. Pathol.* 66 (2014) 469–475, <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.09.001>.
- D. Velin, G. Fotopoulos, F. Luthi, J.P. Kraehenbühl, The nasal-associated lymphoid tissue of adult mice acts as an entry site for the mouse mammary tumor retrovirus, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1871–1876, <https://doi.org/10.1084/jem.185.10.1871>.



- [36] E.D. Cisney, S. Fernandez, S.I. Hall, G.A. Krietz, R.G. Ulrich, Examining the role of nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) in mouse responses to vaccines, *J. Vis. Exp.* (2012) 1–7, <https://doi.org/10.3791/3960>.
- [37] P.T. Chin, C.A. Beekman, T. Buckle, L. Josephson, F.W. van Leeuwen, Multispectral visualization of surgical safety-margins using fluorescent marker seeds, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2 (2012) 151–162.
- [38] B.C. Evans, C.E. Nelson, S.S. Yu, K.R. Beavers, A.J. Kim, H. Li, H.M. Nelson, T. D. Giorgio, C.L. Duvall, Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs, *J. Vis. Exp.* 73 (2013) 7–11, <https://doi.org/10.3791/50166>.
- [39] C. Feng, J. Li, M. Kong, Y. Liu, X.J. Cheng, Y. Li, H.J. Park, X.G. Chen, Surface charge effect on mucoadhesion of chitosan based nanogels for local anti-colorectal cancer drug delivery, *Colloids Surf. B* 128 (2015) 439–447, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.042>.
- [40] M. Salari, D. Bitounis, K. Bhattacharya, G. Pyrgiotakis, Z. Zhang, E. Purington, W. Gramlich, Y. Grondin, R. Rogers, D. Bousfield, P. Demokritou, Development & characterization of fluorescently tagged nanocellulose for nanotoxicological studies, *Environ. Sci. Nano* 6 (2019) 1516–1526, <https://doi.org/10.1039/c8en01381k>.
- [41] A. Sarkar, F. Xu, S. Lee, Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases – similarities and differences, *Adv. Colloid Interface Sci.* 273 (2019), 102034, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102034>.
- [42] F. Khonsari, P. Zakeri-Milani, M. Jelvehgari, Formulation and evaluation of *in-vitro* characterization of gastric- mucoadhesive microparticles/discs containing metformin hydrochloride, *Iran. J. Pharm. Res.* 13 (2014) 67–80.
- [43] M. Rojewska, M. Olejniczak-Rabinek, A. Bartkowiak, A. Snela, K. Prochaska, J. Lulek, The wettability and swelling of selected mucoadhesive polymers in simulated saliva and vaginal fluids, *Colloids Surf. B* 156 (2017) 366–374, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.042>.
- [44] A.H. Asif, S. Harsha, N.H. Puttaswamy, B.E. Al-Dhubiab, An effective delivery system of sitagliptin using optimized mucoadhesive nanoparticles, *Appl. Sci.* 8 (2018) 861, <https://doi.org/10.3390/app8060861>.
- [45] G.E. Vandeputte, V. Derycke, J. Geeroms, J.A. Delcour, Rice starches. II. Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties, *J. Cereal Sci.* 38 (2003) 53–59, doi:10.1016/S0733-5210(02)00141-8.
- [46] C. Zhang, L. Zhu, K. Shao, M. Gu, Q. Liu, Toward underlying reasons for rice starches having low viscosity and high amylose: Physicochemical and structural characteristics, *J. Sci. Food Agric.* 93 (2013) 1543–1551, <https://doi.org/10.1002/jsfa.5987>.
- [47] F. Zhu, Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch, *Carbohydr. Polym.* 122 (2015) 456–480, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.063>.
- [48] T. Suksamran, T. Ngawhirunpat, T. Rojanarata, W. Sajomsang, T. Pitaksutepong, P. Opanasopit, Methylated N-(4-N, N-dimethylaminocinnamyl) chitosan-coated electrospray OVA-loaded microparticles for oral vaccination, *Int. J. Pharm.* 448 (2013) 19–27, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.015>.
- [49] M.B. Stie, J.R. Gätke, I.S. Chronakis, J. Jacobsen, H.M. Nielsen, Mucoadhesive electrospun nanofiber-based hybrid system with controlled and unidirectional release of desmopressin, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 1458, <https://doi.org/10.3390/ijms23031458>.
- [50] J. Dong, Y. Shang, L. Tian, K. Inthavong, J. Tu, Detailed deposition analysis of inertial and diffusive particles in a rat nasal passage, *Inhal. Toxicol.* 30 (2018) 29–39, <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1439549>.
- [51] A. Tsuda, F.S. Henry, J.P. Butler, Particle transport and deposition: basic physics of particle kinetics, *Compr. Physiol.* 3 (2013) 1437–1471, <https://doi.org/10.1002/cphy.c100085>.
- [52] N. Hagenaars, M. Mania, P. de Jong, I. Que, R. Nieuwland, B. Slütter, H. Glansbeek, J. Heldens, H. van den Bosch, C. Löwik, E. Kaijzel, E. Mastrobattista, W. Jiskoot, Role of trimethylated chitosan (TMC) in nasal residence time, local distribution and toxicity of an intranasal influenza vaccine, *J. Control. Release* 144 (2010) 17–24, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.027>.
- [53] X. Hua, K.L. Zeman, B. Zhou, Q. Hua, B.A. Senior, S.L. Tilley, W.D. Bennett, Noninvasive real-time measurement of nasal mucociliary clearance in mice by pinhole gamma scintigraphy, *J. Appl. Physiol.* 108 (2010) 189–196, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00669.2009>.
- [54] J.R. Pappenheimer, Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: Relation to body size, *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 259 (1990), <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.2.g290>.
- [55] S.C. Pearce, A. Al-Jawadi, K. Kishida, S. Yu, M. Hu, L.F. Fritzy, K.L. Edelblum, N. Gao, R.P. Ferraris, Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types, *BMC Biol.* 16 (2018) 1–16, <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0481-z>.
- [56] E. Björk, P. Edman, Characterization of degradable starch microspheres as a nasal delivery system for drugs, *Int. J. Pharm.* 62 (1990) 187–192, [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90232-S](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90232-S).
- [57] L. Illum, H. Jørgensen, H. Bisgaard, O. Krosgaard, N. Rossing, Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system, *Int. J. Pharm.* 39 (1987) 189–199, [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(87\)90216-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(87)90216-X).
- [58] D. Ridley, A.C. Perkins, N. Washington, C.G. Wilson, M.L. Wastie, P. O'Flynn, A. Blattman, G. Ponchel, D. Duchene, The effect of posture on nasal clearance of bioadhesive starch microspheres, *S.T.P. Pharma Prat.* 5 (1995) 442–446.
- [59] S. Güzuraron, The effect of cilia and the mucociliary clearance on successful drug delivery, *Biol. Pharm. Bull.* 38 (2015) 497–506, <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00398>.
- [60] P.D. Bittner-Eddy, L.A. Fischer, A.A. Tu, D.A. Allman, M. Costalonga, Discriminating between interstitial and circulating leukocytes in tissues of the murine oral mucosa avoiding nasal-associated lymphoid tissue contamination, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01398>.
- [61] M.H. Jang, M.N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P.D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium, *PNAS* 101 (2004) 6110–6115, <https://doi.org/10.1073/pnas.0400969101>.
- [62] J.J. Lochhead, R.G. Thorne, Intranasal delivery of biologics to the central nervous system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 614–628, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>.
- [63] S. Alam, Z.I. Khan, G. Mustafa, M. Kumar, F. Islam, A. Bhatnagar, F.J. Ahmad, Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 5705–5718, <https://doi.org/10.2147/IJN.S35329>.
- [64] O. Gusliakova, E.N. Atochina-Vasserman, O. Sindeeva, S. Sindeev, S. Pinyaev, N. Pyataev, V. Revyn, G.B. Sukhorukov, D. Gorin, A.J. Gow, Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00559>.
- [65] T. Furubayashi, A. Kamaguchi, K. Kawaharada, Y. Masaoka, M. Kataoka, S. Yamashita, Y. Higashi, T. Sakane, Evaluation of the contribution of the nasal cavity and gastrointestinal tract to drug absorption following nasal application to rats, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 608–611, <https://doi.org/10.1248/bpb.30.608>.
- [66] P.G. Djupesland, Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective — a review, *Drug Deliv. and Transl. Res.* 3 (2013) 42–62, <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0108-9>.

Review

# The Role of Mucoadhesion and Mucopenetration in the Immune Response Induced by Polymer-Based Mucosal Adjuvants

Nathaly Vasquez-Martínez <sup>1,2</sup> , Daniel Guillen <sup>1</sup>, Silvia Andrea Moreno-Mendieta <sup>1,2,3</sup> , Sergio Sanchez <sup>1</sup> and Romina Rodríguez-Sanoja <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito, Mario de La Cueva s/n, C.U., Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico; vasquezmarnathaly@gmail.com (N.V.-M.)

<sup>2</sup> Programa de Doctorado en Ciencia Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito de Posgrado, C.U., Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Benito Juárez, Mexico City 03940, Mexico

\* Correspondence: romina@iibiomedicas.unam.mx

**Abstract:** Mucus is a viscoelastic gel that acts as a protective barrier for epithelial surfaces. The mucosal vehicles and adjuvants need to pass through the mucus layer to make drugs and vaccine delivery by mucosal routes possible. The mucoadhesion of polymer particle adjuvants significantly increases the contact time between vaccine formulations and the mucosa; then, the particles can penetrate the mucus layer and epithelium to reach mucosa-associated lymphoid tissues. This review presents the key findings that have aided in understanding mucoadhesion and mucopenetration while exploring the influence of physicochemical characteristics on mucus–polymer interactions. We describe polymer-based particles designed with mucoadhesive or mucopenetrating properties and discuss the impact of mucoadhesive polymers on local and systemic immune responses after mucosal immunization. In future research, more attention paid to the design and development of mucosal adjuvants could lead to more effective vaccines.

**Keywords:** mucoadhesion; polymeric particles; immune response; mucosal vaccines; mucosal adjuvants



**Citation:** Vasquez-Martínez, N.; Guillen, D.; Moreno-Mendieta, S.A.; Sanchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. The Role of Mucoadhesion and Mucopenetration in the Immune Response Induced by Polymer-Based Mucosal Adjuvants. *Polymers* **2023**, *15*, 1615. <https://doi.org/10.3390/polym15071615>

Academic Editors: Antonio M. Borrero-López, Concepción Valencia-Barragán, Esperanza Cortés Triviño, Adrián Tenorio-Alfonso and Clara Delgado-Sánchez

Received: 17 February 2023

Revised: 9 March 2023

Accepted: 10 March 2023

Published: 24 March 2023



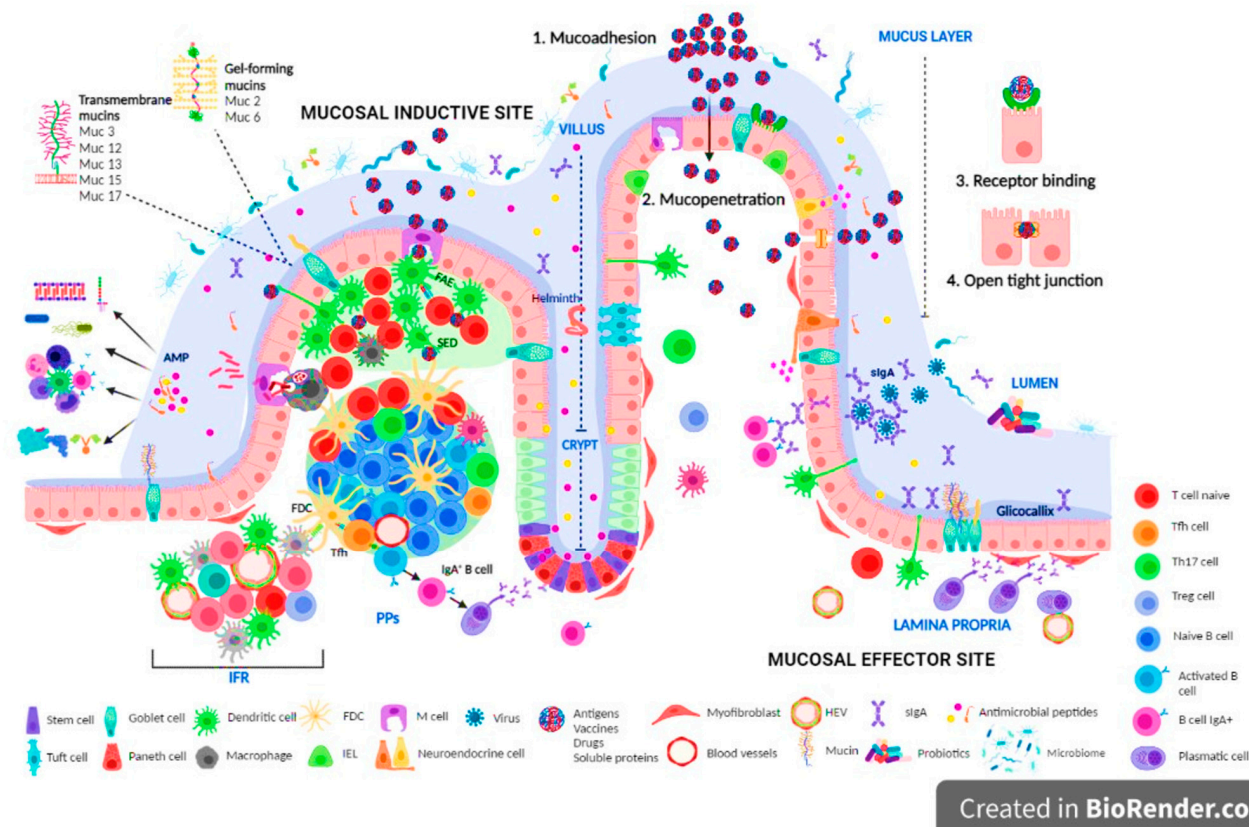
**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The development of mucosal vaccines continues to be a priority in the fight against microorganisms whose entry is the mucosa. However, the mucus layer limits the passage of antigens across the epithelium to reach mucosa-inductive sites. This protective barrier facilitates the clearance of foreign pathogens and particles. The mucosal compartments have the epithelium and the mucosal immune system as barriers to defense. The epithelial barrier interconnected by tight junctions, the mucus layer, antimicrobial peptides, and immunoglobulin A (IgA) production prevent, as a whole, access to pathogenic microorganisms, foreign particles, and toxins [1–3].

Furthermore, the mucosal immune system, comprising a network of mucosa-associated lymphoid tissues (MALT), is responsible for initiating and establishing the antigen-specific innate and adaptive immune response following infection or vaccination [4]. Both inducing and effector sites are found in MALT. For example, in the small intestine, immune-inductive gut-associated lymphoid tissue (GALT) comprises the Peyer patches, mesenteric lymph nodes, and isolated lymphoid follicles (Figure 1). The GALT is covered by a follicle-associated epithelium, predominantly composed of enterocytes and membranous cells (M cells) [5]. M cells, surrounded by a thin layer of mucus, are responsible for transferring, via phagocytosis or transcytosis, bacteria and particulate antigens from the luminal side to the basal side of the epithelium and to the subepithelial dome (SED) [6,7], along with the other intestinal epithelial cells [8,9]. Regardless of the sampling mechanism, antigen-specific primed cells in the mucosa leave the encounter site to enter the lymph, then the bloodstream, and re-enter the mucosal tissues of origin, where they differentiate into effector

or memory B and T cells, a process mediated by integrins [10]. In the small intestine, this effector site is the lamina propria. For a deeper understanding of the inductive and effector sites in the mucosal immune responses other than GALT and NALT, the following reviews are suggested [11–13].



**Figure 1.** Components of gut-associated lymphoid tissues. The intestinal epithelium comprises multiple cell types derived from intestinal stem cells (IECs), including absorptive enterocytes, Paneth cells, goblet cells, tuft cells, and enteroendocrine cells. The IECs maintain gut homeostasis by synthesizing and secreting mucins, antimicrobial peptides, hormones, and soluble proteins. Furthermore, the IECs participate in the recognition of microorganisms via PPRs. The inner mucus layer or glycocalyx that lines the intestinal epithelium contains many antimicrobial peptides (AMPs) and IgA, both with effector functions. The outer mucus layer is also colonized by commensal microbiota. AMPs bind to glycosylated proteins, neutralize bacterial toxins, participate in the recruitment of effector cells, and directly kill bacteria. Antigen uptake can occur by M-cell-mediated transcytosis, via macrophage/dendritic cells extending transepithelial dendrites into the gut lumen, paracellular pathway, or through goblet-cells-associated antigen passages. The passage of the particles is further facilitated by mucoadhesion and mucopenetration phenomena. In gut-associated lymphoid tissues, antigens are presented to naive T and B cells with subsequent antigen-specific immune responses. PPs are mucosa-inductive sites for immune responses in the gastrointestinal tract, while the lamina propria and epithelial compartment constitute effector sites. FAE, follicle associated epithelial; SED, subepithelial dome; PPs, Peyer’s patches; IFR, interfollicular regions; FDC, follicular dendritic cells; Tfh, T follicular helper cells.

Considering the barrier properties of mucosal surfaces, extensive studies have been performed to develop strategies for prolonging the residence time of vaccines in epithelial tissues; one of the most relevant is the use of mucoadhesive formulations. This review provides an overview of mucus, mucin, and how the interactions between mucus and

particles occur. We discuss the physicochemical characteristics of particles that lead to improved mucoadhesion and/or mucopenetration.

The paper aims to show solid scientific evidence to re-evaluate the correlation between improving the mucoadhesive or mucopenetrating characteristics of polymer-based particles used as mucosal vaccine adjuvants and the increase in specific systemic and mucosal immune responses. Likewise, we address potential strategies for mucus penetration, highlighting the importance of incorporating them to design more effective mucosal vaccines. For these purposes, most of the included research papers are those in which the mucoadhesion test of polymer particles was published together with the assessment of adjuvanted capacity following mucosal vaccination.

## 2. Mucosal Vaccination

The mucosal surfaces cover a vast extension of the body surface area. Due to continuous environmental exposure, many pathogens, or antigens, as well as particles found in the air and toxins, have the mucosal surfaces as portals of entry to the body. Therefore, the mucosal tissues play a fundamental role in protecting from invasion by harmful microorganisms through physical and biological barriers. The characteristic induction of antigen-specific sIgA antibodies, both local and distant, as well as protective immunity in systemic and mucosal compartments, makes mucosal vaccination the best tool for reducing mortality and morbidity caused by infectious pathogens that enter the body through the mucosal surfaces [14,15].

However, most vaccines licensed for use in humans are currently administered parenterally. Although parenteral immunization successfully induces a protective systemic immune response, it hardly induces an effective mucosal immune response, and the cellular mechanisms underlying this response remain largely unknown [16–18].

The SARS-CoV-2 pandemic highlighted mucosal vaccination's importance in triggering an immune response at the predominant sites of pathogen infections and protecting against mucosal invasion. Several nasal and oral vaccines are currently in the clinical phase (Table 1), thanks to numerous researchers who have focused on developing mucosal vaccination platforms for other diseases in recent decades. It is essential to clarify that there are already authorized vaccines for application through these routes for other diseases. For example, oral vaccines are currently on the market for *Vibrio cholerae* (Dukoral<sup>®</sup>, ShanChol<sup>™</sup> OCV, Euvichol-Plus<sup>®</sup>/Euvichol<sup>®</sup>, and Vaxchora<sup>®</sup>) [19], poliovirus (BIOPOLIO<sup>™</sup> B1/3), rotavirus (RotaRix<sup>®</sup>, RotaTeq<sup>®</sup>, Rotavac<sup>®</sup>, and RotaSiil<sup>®</sup>) [20], *Salmonella typhi* (Vivotif<sup>®</sup> Ty21A) [21], and the adenovirus vaccine (Adenovirus types 4 and 7) approved for military use only [22]. On the other hand, presented in the form of a spray for nasal administration, there are the influenza vaccines against type A and B viruses (FluMist<sup>®</sup> Quadrivalent and Nasovac-S<sup>™</sup>) [23,24]. Mucosal vaccines induce diverse immune responses in strength, efficiency, and long-term protection [25–27]. Most of these formulations contain live attenuated or inactivated whole-cell organisms or viruses [28,29]; consequently, the limitations and challenges are many, especially those related to safety. In this regard, developing subunit vaccines becomes a promissory strategy because they are safer but, unfortunately, less immunogenic. Consequently, most of the time, subunit vaccines demand the use of adjuvants that require specific characteristics for mucosal routes; regrettably, there are no approved vaccines for these routes.



**Table 1.** Current mucosal COVID-19 vaccine candidates in clinical trials. Adapted from WHO vaccine tracker and landscape, February 2023 (Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-COVID-19-candidate-vaccines>, accessed on: 10 February 2023). RBD, receptor-binding domain; Ad, adenovirus; MVA, modified vaccinia Ankara; LAIV, live attenuated influenza virus; NDV, Newcastle disease virus. **R**, route of administration: in, intranasal; or, oral; ae, aerosol; ih, inhale.

Protein Subunit				
Antigen	Name	Developer	Clinical Trial	R
Spike $\beta$ -variante	ACM-001	ACM Biolabs	Phase 1 NTC05385991	in
RBD of S protein+ AgnHB	CIBG-669	CIGB, Cuba	Phase 1/2 RPCE0000345	in
RBD of S protein	Cov2-OGEN1	USSF/VaxForm	Phase 1 NCT04893512	or
Spike	OMV-linked Hexapro	Intravacc B. V	Phase 1 NCT05604690	In
Live attenuated virus				
S protein	Mv-014-212	Meissa Vaccines, Inc.	Phase 1 NCT04798001	in
S protein	COVI -VAC	CODAGENIX Inc./Serum Institute of India	Phase 3 ISRCTN15779782	in
RBD of S protein	Razi Cov Pars	Razi Vaccine and Serum Research Institute	Phase2IRCT20201214049709N2	In
Viral vector				
NON-REPLICANT				
■ <i>Adenoviral vector</i>				
S protein	ChAdOx1 nCoV-19	University of Oxford	Phase 1 NCT04816019	in
S + nucleocapsid	VXA-CoV-2-1-Ad5	Vaxart	Phase 2 NCT04563702	or
S protein	BBV154	Bharat Biotech International Limited	Phase 3 CTRI/2022/02/040065	in
RBD	Ad5-nCoV	CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology	Phase 4 NTC05303584	ih
Spike + nucleocapsid	Ad5-triCoVMac	McMaster University <i>PIV5 vector</i>	Phase 1 NTC05094609	ae
Spike	CVXGA1	CyanVac LLC	Phase 1 NCT04954287	in
■ <i>Ankara vector</i>				
Spike	MVA-SARS-2-ST	Hannover Medical School	Phase 1 NCT05226390	ih
■ <i>Influenza vector</i>				
N protein fragment	Corfluevec	Research Institute of Influenza	Phase 1/2 NCT05696067	In
REPLICANT				
■ <i>Intranasal flu-based RBD</i>				
RBD of S protein	DelNS1-2019-nCoV-RBD-OPT1	University of Hong Kong, Xiamen University, and Beijing Wantai Biological Pharmacy	Phase 3 ChiCTR2000037782	in
■ <i>Live recombinant Newcastle-disease-virus-vectored</i>				
Spike	NDV-HXP-S	Sean Liu, Icahn School of Medicine at Mount Sinai	Phase 2/3 NTC05354024	In
Others				
■ <i>DNA based vaccine</i>				
S protein	BacTRL-Spike DNA vaccine	Symvivo Corporation	Phase 1/2 NTC04845191	or
<i>Bacterial antigen-spore expression vector</i>				
Spike	<i>B. subtilis spores</i>	DreamTec Research Limited	Phase 1 NA	or

### 2.1. Mucosal Vaccine Adjuvants

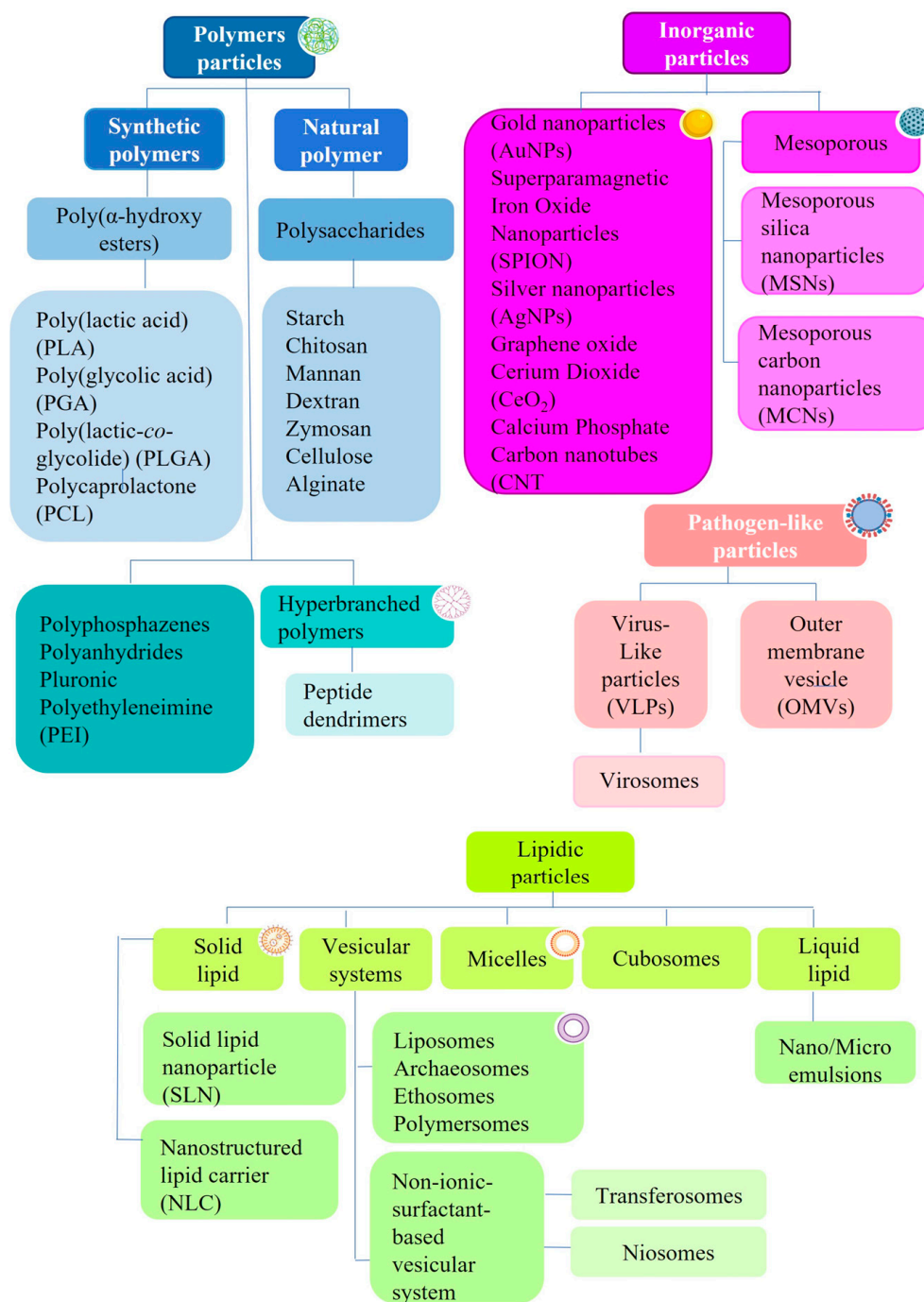
The induction of robust immune responses after immunization by mucosal routes requires the antigen on the mucosal surface for its transport across the epithelial barrier. For this reason, the rational design of mucosal vaccines and adjuvants must consider the specific problems related to the route of administration, such as changes in pH, enzymatic degradation, or entrapment in the mucus layer that limit the absorption of antigens. Consequently, it is a challenge to find effective mucosal adjuvants that allow overcoming the limitations associated with the mucosal barrier, enhancing local and systemic immune responses.

Several parenteral adjuvants have been approved for use in humans, including adjuvants based on aluminum hydroxide salts and gels, virosomes, oil-in-water emulsions (MF59<sup>®</sup>, AS03, Montanide<sup>™</sup> ISA 51 VG, and ISA 720 VG) [30–32], monophosphoryl Lipid A (MPL) [33], Adjuvant Systems<sup>®</sup> (an immunostimulant combination of AS01 (MPL and QS-21) [34] and AS04 (MPL and aluminum hydroxide)) [35], CpG1018 [36] (a synthetic TLR-9 agonist adjuvant (Dynavax<sup>®</sup>)), and recently, Matrix-MTM (saponins from *Quillaja saponaria*), which were authorized in a recombinant vaccine for SARS-CoV-2 [37]. However, none of these adjuvants have been licensed for human mucosal use, although several mucosal vaccine adjuvants are currently under pre-clinical evaluation [38–40]. The rapid progress in SARS-CoV-2 mucosal vaccine development has allowed more adjuvants to be taken to the clinical phase, such as adenoviral vector as self-adjuvant [41], artificial-cell-membrane polymersome-encapsulated CpG (NCT05385991) or membrane vesicles from *Neisseria meningitidis* [42] (Table 1). In the pre-clinical phase, N-N-N-trimethyl-chitosan particles designed for mucosal administration are under investigation [43].

#### Use of Particulate Systems as Mucosal Vaccine Adjuvants

Encapsulation, entrapment, or conjugation of antigens within particulate systems is one of the most promising approaches for the mucosal administration of vaccines. Particles protect the antigens from in vivo enzymatic degradation, prolong the residence time in mucosa favoring delivery and absorption [44], promote the transport of antigens and cells to lymph nodes [45], improve antigen presentation, and enhance immunogenicity [46]. All these benefits are reflected in greater vaccine efficacy [47–51]. Scheme 1 summarizes the general classification of particle-based systems used commonly as vaccine adjuvants.

The performance of these particles as adjuvants is usually determined by their intrinsic characteristics, such as size [52–54], shape [55,56], surface charge [57], and hydrophobicity [58,59], and also are influenced by the methods used for antigen loading [60], the density of antigen on the surface [61], the ability of controlled-release kinetics [62], functionalization [63–65], and importantly mucoadhesion [66,67]. In many cases, particulate vaccine adjuvants mimic the size, shape, and surface molecule organization of pathogenic microorganisms and can contain molecules such as pathogen-associated molecular patterns, which directly impact the recognition, interaction, phagocytosis, and processing of antigens by antigen-presenting cells (APCs), affecting vaccine efficacy [68–70].



**Scheme 1.** Material types of particulate systems used as mucosal adjuvants. PCL, polycaprolactone; PLGA, poly (lactic-co-glycolide); PGA, poly ( $\alpha$ -L-glycolic acid); PLA, poly (lactic acid);  $\gamma$ -PGA, poly (glutamic acid); PEI, polyethyleneimine; VLPs, virus-like particles; MSNs, mesoporous silica nanoparticles; MCNs, mesoporous carbon nanoparticles.

### 3. Mucoadhesion

The mucus layer covering the mucosal epithelium is mainly synthesized and secreted by goblet cells [71,72]. Mucus is composed of water (>95%), electrolytes, enzymes, salts, DNA, lipids, growth factors, antimicrobial peptides, immunoglobulins, and mucins, the most abundant high-molecular-weight glycoproteins of the extracellular mucus [73,74]. The mucus layer's composition, thickness, viscosity, and rheological properties vary widely among mucosal tissues. For instance, the nasal mucus is thinner (10  $\mu$ m thick), making

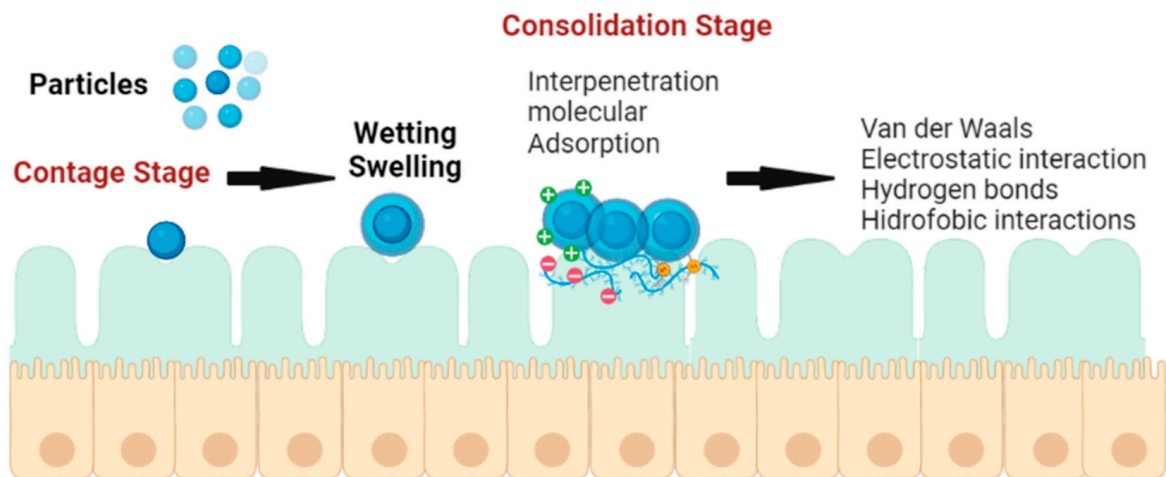
it highly permeable compared to the mucus layer along the gastrointestinal tract, whose thicknesses range from 180  $\mu\text{m}$  to 800  $\mu\text{m}$  from the antrum to the colon, respectively [75,76]. The mucus's rheological properties also vary according to the anatomical site and the type, composition, and properties of the mucins [77]; therefore, the transport of microorganisms, molecules, particulate matter, drugs, exogenous, and endogenous agents through the mucus is also different. For a better understanding of essential functions, general features, and distribution according to the anatomical location of mucins, see Table 2.

**Table 2.** Overview of mucins. The structural and functional details of mucins are described. Mucins (MUC) are differentially expressed in mucosal tissues. PTS domains: proline/threonine/serine-rich domains; VNTRs: variable number of tandem repeats; GalNAc: N-acetylgalactosamine; OH-: hydroxyl groups; S: serine; T: threonine.

MUCINS	
<b>General characteristics</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ High-molecular-weight glycoproteins (10–40 MDa)</li> <li>■ Molecular organization: a central region with PTS domains with a variable number of VNTRs</li> <li>■ Domains: Highly glycosylated via O-glycosidic linkages between GalNAc and the OH- of S and T residues from the protein core</li> <li>■ In the gastric mucus, some of these sugars bear sulfate ester groups</li> <li>■ A high proportion of cysteine domains participate in dimer formation and form multimers</li> </ul>
<b>Classification</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Membrane-bound/transmembrane</li> <li>■ Secreted/gel-forming</li> <li>■ Soluble</li> </ul>
<b>Biological functions</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Prevents the adhesion of pathogens, foreign debris, or cells to the mucosal epithelium by steric hindrance</li> <li>■ Establishes a selective filter for the diffusion of particles and small molecules</li> <li>■ Bound by and enriched with nutrients, allowing them to harbor beneficial microbial communities</li> <li>■ Attenuates the virulence of opportunistic microorganisms</li> <li>■ Regulates signal transduction</li> </ul>
Anatomical location	Type
<b>Oral cavity</b>	MUC1, MUC4, MUC5B, MUC7, MUC19
<b>Eye</b>	MUC1, MUC4, MUC16, MUC20, MUC21, MUC22. MUC2, MUC5B, MUC5A, MUC5B, MUC5AC, MUC7, MUC19
<b>Respiratory tract</b>	MUC1, MUC4, MUC16, MUC20, MUC5AC, MUC 5B, MUC19
<b>Stomach</b>	MUC1, MUC5C, MUC6
<b>Small intestine</b>	MUC13, MUC17, MUC2
<b>Colon</b>	MUC2
<b>Female reproductive tract</b>	MUC1, MUC4, MUC5
<b>Male urogenital tract</b>	MUC1, MUC19, MUC20, MUC5B, MUC6

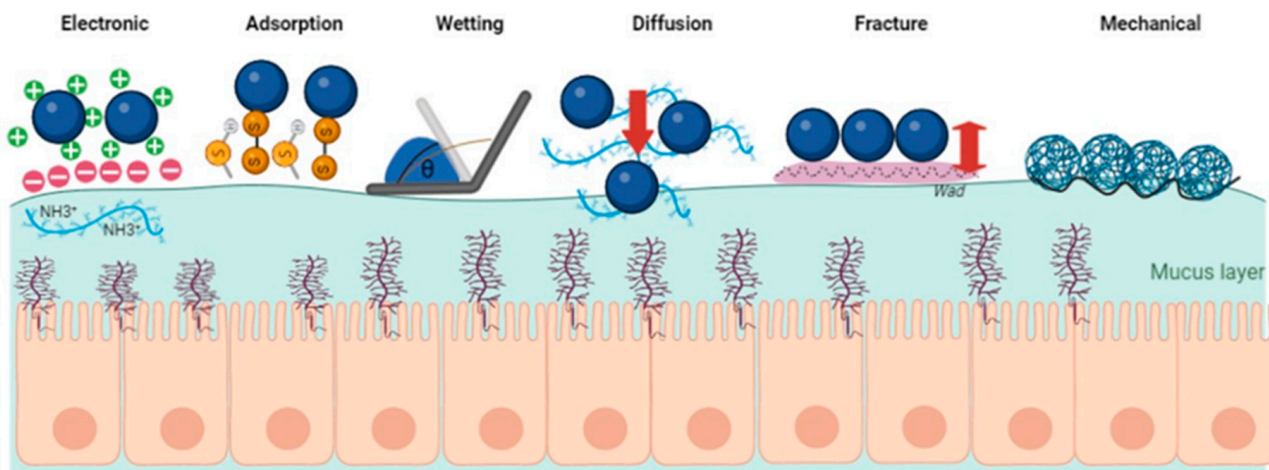
Some synthetic and natural materials/macromolecules and hydrocolloids adhere to biological surfaces [78] and remain attached for an extended period of time by interfacial forces. When the adhesive attachment occurs with mucus or epithelial tissues, the phenomenon is considered mucoadhesion (Figure 2) [79] and involves an interaction with mucin.





**Figure 2.** Mucoadhesion of polymeric particles to mucous membranes. First, an intimate interaction between polymeric particles and the mucous membrane occurs in the contact stage, with subsequent wetting and swelling. Later, in the state of consolidation, physicochemical interactions enable the adsorption and molecular interpenetration of polymer chains into the mucus layer that covers the epithelial surface, eventually leading to prolonged adhesion.

Different theories try to explain the interactions between bioadhesive polymers and mucosal surfaces from both physical and chemical perspectives: the electronic theory [80], the adsorption theory [78], wetting theory [81,82], diffusion theory [83], and fracture and mechanic theory [84] (details in Figure 3). In all of them, the molecules must bind through the interface, an interfacial layer formed between the adhesive and the mucosal tissue. However, the links between the polymers and the mucus differ in each theory.



**Figure 3.** Theories of mucoadhesion. The electronic theory describes mucoadhesion mediated by electrostatic forces. Adsorption assumes intermolecular contact at the interface and adhesion of materials by intermolecular forces. Wetting is described in terms of the spreading coefficient; therefore, the requirement for mucoadhesive materials to adhere is that these can spread spontaneously onto a surface. The diffusion theory: interdiffusion and interpenetration through the polymer-mucin interface according to their concentration gradient. Fracture describes the forces required to separate two surfaces after bonding and assumes that adhesion bond failure occurs at the interface (*Wad*: work adhesion). Mechanical assumes that the irregular rough or abrasive substrate surface provides mechanical keying.

In addition to pharmacokinetic studies, *in vivo* and *ex vivo* methods for assessing mucoadhesion allow for the direct investigation of the particulate systems' adhesion to mucosal tissues [85,86] or mucosa-mimetic materials [87]. Likewise, it is possible to perform *in vitro* determinations that depend mainly on the physical properties of the polymers [88]. Several detailed reviews can be consulted to learn more about the methods used in mucoadhesion [89–91].

#### *Determining Factors in the Mucoadhesion and Mucopenetration of Polymeric Particulate Systems*

The mucoadhesive properties of particulate adjuvants can be affected by the physico-chemical characteristics of polymers, such as size,  $\zeta$ -potential, elasticity, molecular weight, or spatial conformation, as well as by environmental factors, such as pH and presence of metal ions, and physiological factors, including mucin turnover. The particles are trapped in mucus networks through polyvalent adhesive interactions [92]. Sulfate groups on N-acetylglucosamine and galactose and carboxylic groups on sialic acid sugars confer negative charges to the mucin under most pH conditions [93]. Hydrophilic particles adhere to the negatively charged moieties, while hydrophobic particles are captured by low-affinity bonds between hydrophobic protein residues and particle surfaces. Although cationic polymers have shown better mucoadhesive properties [94], anionic polymers also attach to mucin just as much as cationic or nonionic polymers. This occurs thanks to surface carboxyl groups in mucin that permit interaction via hydrogen bonds with the oligosaccharide chains [95]. Mucus limits the diffusion of particles of any size, so it seems that size has a more significant contribution to mucopenetration than to mucoadhesion. Thus, the transport rate of particles in mucus decreases with increasing particle size [96,97].

The surface functionalization of particles affects adhesion and permeation across the mucus of particles of equal size, *i.e.*, as expected, polystyrene NPs of a small size (100 nm) penetrate the mucus better than large particles (500 nm); however, among 500 nm particles, sulfate-functionalized particles were 1.7 times more permeable than amino-functionalized particles [98].

On the other hand, cylindrical-shaped NPs and rod-shaped nanocrystals have been shown to penetrate the mucus more efficiently compared to their spherical counterparts with similar particle sizes and surface charges [99]. Similarly, compared to their soft and hard counterparts, particles with moderate stiffness have a higher diffusivity through the mucus [100].

#### **4. Mucoadhesive and Mucopenetrating Polymer-Based Adjuvants**

For at least the past four decades, multiple research groups have searched for materials for the development of mucoadhesive and/or mucopenetrating pharmaceutical formulations to improve the bioavailability of active constituents [101–104]. Both the adhesive and mucopenetrating properties of particulate adjuvants allow them to reach the epithelial barrier. Once there, the particulate can be transported to the basolateral side to initiate mucosal immune responses.

Several materials commonly used in the pharmaceutical industry are also used as mucosal vaccine adjuvants; however, few studies have been devoted to evaluating the direct influence of mucoadhesion and mucopenetration on the strength and quality of the antigen-specific immune responses stimulated after mucosal vaccination. Consequently, we provide an overview of polymer-based particles in the following sections. Based on the available experimental findings, we analyzed the association between increased mucoadhesive strength, mucosal penetrability, and enhanced immune response quality after mucosal vaccination.

##### *4.1. Chitosan and Chitosan Derivatives*

Chitosan (CS) is a natural cationic polysaccharide obtained by the deacetylation of chitin. CS has been widely used in various biomedical applications due to its biodegradability, biocompatibility, low toxicity, immunogenicity, and mucoadhesive properties [105–107].

The mucoadhesive properties of CS are attributed to the protonation of the amino groups in weakly acidic media, which interact with the negatively charged sialic acid moieties of mucin. However, different chemical processes have been applied to CS to improve its application limitations, such as high hydrophilicity, low solubility from pH 7.4, high degree of swelling, and thermal stability [108,109]. These modifications, in turn, are favorable to promoting adhesion to mucosal surfaces and, as a result, enhance mucosal contact time.

For example, the chemical conjugation of CS with hydrophilic ethylene glycol branches improves solubility in water at neutral and acid pH values and its steric stability [110,111]. Pawar and Jaganathan (2016) compared the immunogenicity of CS NPs and glycol chitosan (GC) NPs loaded with a hepatitis B surface antigen (HBsAg) after nasal administration in Balb/c mice. While the anti-HBsAg antibody titer induced by HBsAg alone was minimal, HBsAg conjugated with GC NPs significantly increased serum IgG and IgA antibody titers in nasal, saliva, and vaginal secretions, compared to the CS-conjugated group. Splenocytes isolated from mice immunized with GC NPs and CS NPs secreted significantly higher amounts of IL-2 and IFN- $\gamma$  than the control mice immunized with Alum-adsorbed HBsAg. Nasal clearance studies of radiolabeled particles in rabbits showed a nasal cavity retention time of up to 240 min for GC NPs (20% radioactivity) compared to 180 min for CS NPs (20% radioactivity) and 90 min for HBsAg alone (<20% radioactivity). In confirming nasal deposition after nasal administration in mice, only formulations with GC and CS NPs were retained in the NALT at 30 min, with higher fluorescence intensity for GC NPs than FITC-BSA [112].

Similarly, adding cross-linking agents, such as tripolyphosphate (TPP), improves the encapsulation efficiency during the elaboration of CS NPs [113]. Co-crosslinked vanillin/TPP was used for developing a trivalent oral vaccine (DwPT). Studies of the adhesion behavior of the microspheres were related to the  $\zeta$ -potential of the groups, the electrostatic interaction between the positively charged CS and the negatively charged sialic acid of mucin, and the degree of cross-linking. Thus, the highest swelling index was for the group with the lowest degree of cross-linking. Batches with electropositive charge (placebo CS microspheres, diphtheria toxoid (DT) CS microspheres, and tetanus toxoid (TT) CS microspheres:  $\sim +30$  mV) showed a higher adhesion to mucin than those with  $\zeta$ -potential around +10 mV (whole-cell pertussis (wP) CS microsphere and trivalent (DwPT)). Antibody response in serum corresponded to the mucoadhesion of the microspheres, developing a higher IgG antibody titer in TT and DT batches on days 28 and 35 after immunization, followed by batches with a lower adherence (PT: pertussis toxin). This response was consistent with that observed in saliva and intestinal secretions [114].

Other derivatives of CS have been developed to improve, specifically, absorption and bioadhesion properties. Currently, the most used are obtained by quaternization, acylation, thiolation, and carboxymethylation [109]. Trimethyl chitosan (TMC), a quaternized derivative of CS with polyampholytic properties, improves CS solubility without affecting its mucoadhesive cationic nature, reduces cytotoxicity, and enhances absorption on mucosal surfaces in a wide range of pH values, increasing the carrying capacity [115–117].

In 2010, Vyas laboratory used PLGA microparticles (MPs) coated with CS and TMC for the intranasal administration of HBsAg to mice. While unmodified PLGA MPs had a negative  $\zeta$ -potential ( $-14.4 \pm 1.2$ ), the coating with CS and TMC increased the  $\zeta$ -potential to values between +5 mV and +10 mV for PLGA/CS MP and +10 mV and +20 mV for PLGA/TMC MP. The authors also indicated that the  $\zeta$ -potential directly influenced the adsorption capacity of MPs to mucin, i.e., PLGA MPs showed insignificant mucin retention, while CS-PLGA and TMC-coated MPs had significantly higher mucoadhesive properties. Remarkably, this increase in mucoadhesion improved the immunogenicity of the formulation. However, PLGA/TMC MPs induced substantially higher antibody IgG titers throughout the study than PLGA/CS MPs, both in serum and distal mucosal sites [118]. A second study found the same results with PLGA/TMC NPs and demonstrated the adjuvanticity effect of TMC through the stimulation of dendritic cell maturation. Furthermore, TMC-coated MPs were selectively taken up by M cells in the NALT following nasal ad-

ministration compared to the FITC-BSA solution, which would substantially explain the enhancement of vaccine formulations' immunogenicity [119].

Another quaternized CS derivative is N-[(2-hydroxy-3-trimethyl ammonium) propyl] CS or HTCC. HTCC polymers have different degrees of quaternization or extent of positive charge [116]. Zhang et al. prepared OVA-loaded curdlan sulfate-O-HTCC NPs as an intranasal vaccine system. Although the inclusion of curdlan, a  $\beta$ -glucan capable of activating innate immune cells via Dectin-1 receptors and TLR-4 [120], could promote the antigen-specific immune response, its negative surface charge was considered a limitation for mucosal application. For this reason, O-HTCC was added, which, in addition to conferring a positive  $\zeta$ -potential on the particle, improved its adhesion and subsequent internalization by epithelial cells due to its high viscosity. The OVA–curdlan–O-HTCC complex led to higher OVA-specific CD4+ T-cell, CD8+ T-cell, and B-cell proliferation when nasally administered to mice, compared with the proliferation induced by OVA, OVA–curdlan, OVA–CS, or CS–curdlan [121].

Carboxymethyl chitosan (CMCS) is another water-soluble CS derivative with an improved degradation rate, a desired characteristic for its use in vivo [122]. Recently, CMCS was also used to coat the surface of calcium phosphate (CaP) NPs. The electrostatic interactions and hydrogen bonds between mucin and CaP–CMCS–BSA allowed in vitro adhesion close to 90% compared to CaP–BSA adhesion (60%). Additionally, the diffusion efficiency was higher for CaP–CMCS–BSA than for CaP–CS–BSA, CaP–BSA, and BSA alone. The coating with CMCS and CS improved the apparent permeability coefficient in the mucus layer at 2 h, an index of apical to basolateral transport. Ex vivo biodistribution in a rat study showed that CaP–CMCS–BSA/FITC absorption was improved in the small intestine at 2 h compared to CaP–CS–BSA/FITC, attributed to the change in surface charge caused by coating with CS and its derivative (CaP–CMCS–BSA,  $\zeta$ -potential:  $-4.7$  mV vs. CaP–CS–BSA,  $\zeta$ -potential:  $8.5$  mV). These findings are correlated with the efficacy of oral vaccination since the levels of IgG and sIgA antibodies in sera and feces, respectively, increased after each boost in the animals that received CaP–CMCS–OVA compared to OVA alone [123].

For their part, methyl CS has been studied for diverse biological activities, including as tissue regeneration activator, absorption enhancer, and mucoadhesive [124]. Suksamran et al. evaluated methylated CS MPs for entrapping OVA. Calcium alginate MPs–OVA, calcium alginate–yam starch microparticles (YMP)–OVA, and (YMP)–OVA coated with methylated N-(4-N, N-dimethylaminocinnamyl) CS (TM<sub>65</sub>CM<sub>50</sub>CS) were used in this work. The evaluation of swelling showed that the degree and rate of swelling of the TM<sub>65</sub>CM<sub>50</sub>CS-coated MPs were higher than those uncoated, both in HCL pH 1.2 and in PBS pH 7.4. Similarly, the in vitro mucoadhesion study using the everted gut sac with porcine jejunum showed that, while the adherence percentages of calcium alginate MPs and YMP MPs were low (29.62% and 11.29%, respectively), the coating with TM<sub>65</sub>CM<sub>50</sub>CS of both particles increased mucosal adhesion during the first hour (45.64% and 43.38%, respectively). Oral immunization resulted in significantly higher IgG and IgA levels in mice receiving OVA-loaded TM<sub>65</sub>CM<sub>50</sub>CS-coated MPs, which again confirms the role of mucoadhesive polymers in immunogenicity [125].

The  $\zeta$ -potential of the CS-based vaccines significantly influences the induction of an immune response affecting more than one mechanism. Jesus et al. demonstrated that, after the intranasal administration of polycaprolactone/CS (PCL/CS) NPs in C57BL/6 mice, the lowest dose of adsorbed antigen (1.5  $\mu$ g HBsAg) induced antibody titers comparable to the dose containing six times more adsorbed antigen (10  $\mu$ g HBsAg). Furthermore, this group had the highest number of responding animals. However, serum IgG titers were significantly low compared to previous studies with the same dose of antigen (1.5  $\mu$ g HBsAg), so the authors suggested that the decrease in  $\zeta$ -potential (CS: +30 mV) to values close to neutrality generated by antigen interaction (PCL/CS: +26 mV; PCL/CS: 1.5  $\mu$ g HBsAg: +22 mV; PCL/CS: 10  $\mu$ g HBsAg: +5.7 mV) leads to a reduced uptake in the epithelial barrier. These observations were independent of the mucoadhesive behavior of the particles without anti-



gen evaluated in vitro. Therefore, the authors suggested that the antigen on the particle's surface reduces the  $\zeta$ -potential and hinders the interaction with mucin in vivo, avoiding particle–cell interactions and ultimately impacting the immune response [126]. Although this finding contradicts what was observed for other CS-based particles reviewed, it highlights the importance of assessing the mucoadhesion of the polymeric system alone, as well as the particle-entrapped antigens of interest.

#### 4.2. Cellulose Derivatives

Carboxymethylcellulose (CMC), an anionic and water-soluble cellulose derivative [127], has been successfully used as a mucoadhesive polymer to enhance immune responses. Hanson et al. developed CMC and alginate (ALG) wafers loaded with the HIV gp140 protein and with  $\alpha$ -GalSer as an adjuvant. In ex vivo tests with porcine sublingual mucosa, wafers with a higher CMC content withstood intense mucosal washings and had a higher tissue penetration of the coupled protein (fluorescently labeled bovine serum albumin (BSA)) compared to wafers with a higher ALG content and the free protein. However, the presence of ALG in the formulation was necessary to maintain protein stability on the wafer. Following sublingual administration in mice, most mucoadhesive wafers generated a greater T-cell response in the lungs and cervical lymph nodes [128]. In other studies, it has been suggested that CMC's viscosity and anionic structure allows the formation of ionic bonding and hydrogen bonds with mucin layers [129–131].

#### 4.3. Mannan-Decorated Polymeric Particles

Similar results have also been achieved using the dual immunostimulant and mucoadhesive capacity of mannan isolated from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* [132]. Mannans present immunostimulatory activity via pathogen recognition receptors (PRRs) in APCs. An in vivo optical imaging system, following the intranasal administration of thiolated hydroxypropylmethylcellulose phthalate microspheres (Man-THM), showed that mannan decoration increased the residence time of Cy5.5-conjugated OVA-loaded Man-THM in the respiratory mucosa compared to OVA alone or OVA-loaded THM. Subsequently, the mucosal immune response was evaluated following the nasal immunization of the ApxIIA toxin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* loaded in the MPs groups. The findings also demonstrated that the microspheres reached the lungs and secondary lymphoid tissues and induced systemic IgG and secretory IgA responses to the ApxIIA in bronchoalveolar lavage (BAL) and nasal and vaginal washes. Although the immunostimulatory role of mannosylation in enhancing immunogenicity has been reported [133,134], in this work, the authors highlighted the mucoadhesion of the mannosylated microspheres to explain the improved immunogenicity in vivo.

#### 4.4. Alginate Coating

Vyas and his team (2014) assessed the coating of CS MPs with alginate (A-CSMp). In contrast to most of the works reviewed up to this point, where the positive surface charge plays a fundamental role in adhesion to mucin, alginate as an anionic polyelectrolyte changes the  $\zeta$ -potential of the particle to an electronegative value (−29.7 mV). FITC-BSA was rapidly washed from rat jejunal tissues; however, the in vitro retention time in the mucosa was prolonged when FITC-BSA was associated with A-CSMp. In the same way, in the in vivo assays, only A-CSM loaded with FITC-BSA successfully generated uptake by M cells in Peyer's patches. When evaluating the efficacy of the particulate system in an oral anthrax vaccination model, high-titer anti-PA serum IgA and IgG antibodies were observed in animals receiving particles loaded with antigens compared to the free *Bacillus anthracis* protective antigen [135].

Similarly, Saraf et al. loaded alginate-coated CS NPs (ACNPs) with HBsAg anchored to E. coli EH-100 lipopolysaccharide (LPS) (LPS-HBs-ACNPs) as an adjuvant for oral administration. As expected, the alginate coating changed the  $\zeta$ -potential of the NPs from +45.2 mV (0.5% CS-0.1% TPP) to −26.2 mV (0.5% CS-0.1% TPP-2% alginate-2%

LPS) due to the negatively charged  $-\text{COO}^-$  electrostatic interaction of the alginate on the positively charged  $-\text{NH}_3^+$  of the CS. Despite the  $\zeta$ -potential's more negative values, in vitro mucoadhesion studies showed that alginate-coated NPs were more mucoadhesive than CS NPs alone. Although anti-HBsAg serum IgG titers were higher for HB-ACNPs after oral administration, sIgA antibody titers in mucosal secretions were higher for LPS-HBs-ACNPs. The anchoring of LPS targeted the NPs to M cells, conferring immunogenicity to the system [136] independently of the mucoadhesive properties of ACNPs. As in the case of LPS, any ligand can be anchored to the particulate system to target it and to allow specific binding to M cells or mucosal epithelial cells. Excellent reviews have been conducted on this topic [137–139].

On the other hand, sodium alginate protects the NPs from the hostile environment of the gastrointestinal tract, the same as the introduction of hydrophilic groups, such as hydroxyalkyls, carboxyalkyls, succinyls, and thiols, or polymer grafts, such as PEG. In this way, Amin and Boateng (2022) proposed a system based on OVA-loaded CS NPs coated with sodium alginate or PEG for oral vaccine administration. Both sodium alginate and PEG coatings increased the stability of NPs upon exposure to gastric fluids with the protection of the encapsulated protein (4 h and 1 h, respectively), compared to uncoated NPs (<30 min). After transfer into simulated intestinal fluid, both coatings showed stability for 120 h, although with different release profiles of OVA. Increased alginate concentrations were related to a higher level of mucin binding. According to the authors, the alginate coating ensures stability, allows a higher antigen load to reach the site for mucosal immune response, improves mucoadhesive properties, and enhances the sustained release of antigen-loaded NPs [140].

#### 4.5. Xyloglucan

Xyloglucan (XG), a non-anionic polysaccharide and the main hemicellulose component, has been applied with *Quillaja* saponins to vaccine formulations against brucellosis. While *Brucella* LPS was weakly immunogenic, when *B. abortus* LPS-loaded XG NPs were administered nasally to Balb/c mice, higher systemic and mucosal IgG antibody levels and mucosal IgA were induced. Increased immunogenicity was associated with a greater mucoadhesion force of the XG and the LPS-XG NPs compared to the LPS alone, as well as the ex vivo retention of LPS-XG NPs over 24 h in goat mucosa [141].

As in the case of CS, XG has been previously used in pharmaceutical applications in different formulations and by different routes, including mucosal, transdermal, and intraperitoneal, due to its biodegradability, cost-effectiveness, and non-toxicity. Some authors have suggested that the XG molecular structure, "mucin-like," is responsible for mucoadhesive properties, including swelling capacity and increasing concentration-dependent viscosity [142,143]. All these characteristics, taken together, expand the possibility of the future use of XG in mucosal vaccinations [144].

#### 4.6. Poly (Acrylic Acid) and its Derivatives

Poly (acrylic acid) and its derivatives have excellent mucoadhesive capacity compared to cellulose, polycarbophil, chitosan, and pectin [145–147]. An example is Carbopol<sup>®</sup>, a highly cross-linked hydrophilic polymer, which provides it with mucoadhesive and viscoelastic properties. Coucke et al. used spray-dried powders of amylopectin (Amioca<sup>®</sup>) with polyacrylic acid (Carbopol<sup>®</sup> 974P) in different proportions (SD 0/100, 25/75, 50/50, 85/15, and 100/0) for the intranasal administration of H3N2-inactivated influenza virus and in combination with the LTR192G adjuvant in rabbits. The formulation SD25/75 induced the highest serum response of IgG anti-haemagglutinin compared to the formulation SD100/0, thus highlighting the importance of polyacrylic acid. Despite this, neither SD25/75 nor SD0/100 induce a local mucosal response. The immune response was directly related to the negative  $\zeta$ -potential of Carbopol<sup>®</sup> 974P and the mucoadhesive properties of the formulations. The reticulated, predominantly elastic, or highly structured characteristics of SD25/75 ( $G' \gg G''$ ) increased the residence time in the nasal cavity. In contrast,

the lowest viscosity and cross-linking of SD100/0 were associated with a low mucosal retention [148].

#### 4.7. $\gamma$ -PGA

The poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA)-based vaccine adjuvant, an anionic biopolymer, was used for the intranasal delivery of the influenza fusion protein sM2HA2 and OVA, co-administered with 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (MPL) and QS21 in a system denominated  $\gamma$ -PGA/MPL/QS21(CA-PMQ). Using in vivo single-positron-emission computed tomography imaging, it was possible to determine that  $\gamma$ -PGA increased the OVA residence time by up to 12 h in the nasal cavity. This signal decreased at 6 h when OVA was administered alone. This result is correlated with the higher serum IgG, IgG1, and IgG2a antibody responses in the groups vaccinated with OVA/CA-PMQ and sM2HA2/CA-PMQ compared to the groups that received OVA and sM2HA2 alone, as well as being superior to that induced by the cholera toxin used as a mucosal adjuvant. Likewise, animals vaccinated with the antigen/CA-PMQ induced more IL-4 and IFN- $\gamma$ -secreting cell populations in the spleens stimulated with OVA, sM2, and HA2 protein than mice immunized with proteins alone or the control group. Additionally, the CA-PMQ induced high titers of sM2HA2-specific IgA antibodies at the administration and distal sites, along with an increased survival time (80–100%) following the challenge with influenza A subtypes and cleared pulmonary viral titers [149]. The presence of carboxyl groups within  $\gamma$ -PGA can provide a strong interaction with the mucus layer.

The anionic model (−35.5 mV) of Kurosaki et al. with benzalkonium chloride (BK) and  $\gamma$ -PGA NPs in a complex with OVA (OVA/BK/ $\gamma$ -PGA) was used for pulmonary administration. They observed an increased fluorescence intensity in the lung (Alexa647-OVA/BK/ $\gamma$ -PGA) indicative of lung deposition compared to Alexa647-OVA. OVA/BK/ $\gamma$ -PGA increased the levels of specific IgG antibodies, while in the animals that received OVA or the vehicle (BK/ $\gamma$ -PGA), anti-OVA IgG was not detected. The induction of immune responses at the mucosal site was also significantly higher in the OVA/BK/ $\gamma$ -PGA group [150]. Their study did not discuss the role of  $\gamma$ -PGA mucoadhesion in the results obtained. However, the authors suggest the uptake efficiency of BK/ $\gamma$ -PGA NPs by the antigen-presenting cells in the alveolar region. Due to the high capture efficiency of particles <2  $\mu$ m in the lung [151], the adhesion phenomenon could favor the increased particle residence time in the lung mucosa. Evaluating bioadhesive properties in these systems could help to improve rational vaccine design using polymeric particles.

#### 4.8. Thiolated Polymers

The previously reviewed polymer-based adjuvants could be thiolated to improve mucoadhesion. In the past two decades, important research has been conducted using thiolated polymers or so-called “thiomers”, mainly in excipients for drug delivery. Thiomers can interact with mucin through disulfide bonds with the cysteine-rich subdomains of mucus glycoproteins [152]. These covalent bonds are supposed to have stronger binding than the non-covalent interactions that are formed between the polymers and the sialic acid of the mucus layer [153], improving the mucoadhesive properties of the polymers.

Using a tensile test and rotating cylinder method to obtain compressed tablets, Roldo et al. demonstrated that increasing the number of thiol groups covalently attached to chitosan-4-thio-butyl-amidine conjugated significantly improves mucoadhesion compared to unmodified CS. Thiolation increased the total adhesion work (TWA,  $\mu$ J) up to 100 times [154]. Similarly, thiol reactivity impacts mucopenetration. When the thiol reactivity is medium to low, extensive interpenetration occurs in the mucus layer, with a larger interface for disulfide bond formation. Conversely, highly reactive thiols have difficulty penetrating through the mucus because they form disulfide bonds with the mucins on the surface of the mucus layer, facilitating their rapid removal through mucus turnover [155].

In a recent study, Sinani et al. immunized Balb/c mice with BSA-loaded NPs prepared using aminated CS (aCS) and aminated and thiolated CS (atCS) polymers; mice were nasally immunized at 14-day intervals. At the end of the experiment (day 253), the nanoparticles (aCS and atCS) induced a more robust systemic response, resulting in an almost two orders of magnitude higher systemic IgG titer than the BSA/CpG ODN control, with atCS being the best. These results are correlated with the increased mucoadhesion observed in the aCS and the atCS. Both aCS and atCS modulated the Th2 immune response and enabled immune response at distal mucosal sites [156].

Cellulose acetate phthalate (CAP) is widely used as an enteric coating for pharmaceutical dosage forms due to its solubility at pH values above 6 (such as in the intestines) but poor water solubility at a low pH (such as in the stomach). After exposure to intestinal fluids, the polymer swells, with the subsequent softening or complete dissolution of the phthalate, allowing the release of the biologically active compounds [157]. Lee et al. orally immunized mice with M5BT, a chimerical multi-epitope recombinant protein of foot-and-mouth disease virus (FMDV), alone, loaded in thiolated CAP MPs (T-CAP), or loaded in non-thiolated MPs (CAP). In ex vivo studies in the porcine intestinal mucosa, T-CAP mucoadhesion was 1.48-fold higher than CAP. The improvement in the mucoadhesion properties was reflected in the highest production of antigen-specific IgG antibodies in animals that received M5BT/T CAP. Similarly, this group of animals had significantly higher levels of anti-M5BT IgA in fecal samples at 2 and 4 weeks due to the longer transit time of antigens in the mucosa and increased MHC class II- expression on APC in PPs, related to IgA production [158].

For cationic thiomers such as atCS, the interactions are predominantly driven by electrostatic forces. In contrast, for anionic thiomers, such as T-CAP, interaction with the mucus occurs through hydrogen bonds, van der Waals interactions, and chain entanglement. In both cases, the bioavailability is improved by the extension of the residence time [159]. Notably, regardless of the surface charge of the polymer particles and resulting surface forces, the thiolation of both polymers improved in vivo immune response.

Further evidence has shown that thiomers are susceptible to thiol oxidation at  $\text{pH} \geq 5$ , with their effectiveness being reduced following oral administration. Typically, thiol groups (R-SH) can form disulfide bonds with mercaptopyridine substructures, whereby thiol groups are stabilized against oxidation and increase their reactivity. S-protected thiomers, so-called “pre-activated”, have shown greater mucoadhesion than unprotected thiomers, according to Iqbal et al. (2012) [153]. In this work, Iqbal et al. synthesized a polymer with improved mucoadhesive, cohesive, and in situ gelling properties. For this purpose, poly (acrylic acid) (PAA), PAA-cysteine (PAA-cys), and 2-mercaptopyridine (2MNA) coupled with PAA-cys (PAA-cys-2MNA) were compressed into tablets, and the mucoadhesion strength was determined by the rotating cylinder method. Adding thiol groups improved the mucoadhesive properties 456-fold, while the S-protected thiomers increased the contact time to 960-fold compared to unmodified PAA. These thiolated nanosized carriers and others, such as thiolated cyclodextrins [155,160], are research fields that may be explored further for mucosal vaccine development.

## 5. Enhancement of Epithelial Permeability by Polymer-Based Adjuvants

Although mucoadhesive molecules improve the bioavailability of drugs and antigens administered via the mucosa, the mucus layer still limits passage into the epithelium. The transit time of particles in the mucosa is determined by the physiological renewal time of the secreted mucus layer [161]. Mucus turnover reduces the mucosal residence time of particulate delivery systems because they can be trapped by the mucus and rapidly eliminated [162], which could compromise their effectiveness as mucosal adjuvants.



Therefore, polymer-based adjuvants are expected to adhere to the mucous layer, penetrate the epithelium, and reach the inductive sites for mucosal immune responses before being removed. Hence, this section briefly describes the strategies to facilitate mucus barrier penetration and improve the permeability of polymer-based adjuvants once they are in the mucosa.

### 5.1. Mucus-Penetrating Particles

Particles with a low adhesion and small size, thus with few steric hindrances to the mucin network, are often referred to as mucus-penetrating particles. Unlike mucoadhesive particles, mucus-penetrating particles seek to minimize the strength of electrostatic and hydrophobic interactions with the mucin. Polymers with neutral or low positive charges are generally included in the design of mucus-penetrating formulations. Several studies have reported the surface coating of particles with PEG. PEG is used as an adhesion promoter acting at the interface to improve adhesion. Hence, PEG chains tethered or grafted are covalently attached at one end on the polymer surface while the other is free, allowing PEG to diffuse from the polymer network to the mucus and enhancing interpenetration [163]. Wang et al. further demonstrated the formation of hydrogen bonds between the ether oxygen atoms of the PEG chain and glycosylated proteins of mucins. Additionally, they reported PEG with a low molecular weight (2 and 10 kDa), near-neutral surface charge ( $\zeta$ -potential of  $2 \pm 4$  and  $1 \pm 3$  mV, respectively), minimized mucoadhesion by reducing hydrophobic hydrogen bonding, and electrostatic interactions to have better mucus-penetrating properties. The authors even proposed that PEG-covered particles between  $-10$  and  $-7$  mV are within the interval that defines mucoadhesive vs. mucoadhesive characteristics [164].

Despite its widespread use in over-the-counter drugs and vaccines, recent approaches suggest that PEG is not immunologically inert [165–167]. Several authors demonstrated that introducing PEG to mucosal vaccine formulations increases their protective efficacy [168,169]. Similarly, an extensive recent review explained the impact of PEGylation in terms of biodistribution for anticipating safety and efficacy [170]. Therefore, it is essential to study the tolerability and safety profile of PEG, despite being an alternative to increased mucopenetration.

Some works have also raised doubts about coating particles with PEG due to surface modifications that can alter the linked polymers' physical and biological properties. Bamberger et al. evaluated the effects on APC response after functionalizing spermine NPs with acetylated dextran (Sp-Ac-DEX) through a process called DEXylation and PEGylation. The average particle size was considerably increased by DEXylation, with subsequent aggregation. PEGylation and DEXylation decreased the primary amines and, therefore, the  $\zeta$ -potential. This was reflected in the 20% reduction in the cell viability of bone-marrow-derived dendritic cells and macrophages treated with DEXylated NPs, whereas PEGylation treatment increased viability by 10–20% compared to unmodified NPs. However, the binding and cellular uptake of surface-modified NPs was lower in PEGylated particles [171].

Other polymers with mucopenetration ability are poloxamers, also known as Pluronic<sup>®</sup>. These block copolymers consist of hydrophilic poly (ethylene oxide) (PEO), and hydrophobic block-poly (propylene oxide) (PPO) ordered in an A-B-A triblock structure: PEO-PPO-PEO [172–174]. Díaz et al. demonstrated that the addition of mucoadhesive and thermosensitive poloxamer 407(F127)-based hydrogels to CS microspheres in a formulation for nasal and conjunctival ram immunization improved both local and systemic humoral immune responses against the BLSOmp31 antigen, an outer membrane protein of *Brucella* spp., along with the reduced excretion of *Brucella ovis* [175]. Pastor et al. proposed a Pluronic<sup>®</sup> (PF127) and Gantrez<sup>®</sup> AN119 thermally sensitive hydrogel for intranasal vaccine delivery since the hydrogel increases the residence time of the antigens in the nasal epithelium, allowing their penetration into the deep skin layers of the nose thus reaching the submucosa, where they can trigger an immune response [176].

Another type of mucopenetrant includes nanoemulsions (NEs). Di Cola et al. evaluated PEG-coated O/W NEs with emulsified, added CS as a proposal for the nasal administration of drugs or vaccines. They observed that CS-added NE led to a local shrinking of the mucin gel network, forming larger pores between the mucin bundles. This phenomenon does not occur in the absence of CS. The SAXS (small-angle X-ray) monitoring of the penetration of solute CS-added NE into the PGM showed a higher diffusion over time (20 min) through the mucus mesh. SANS (neutron scattering) confirmed that, unlike the steric hindrance caused by the pore-like size of mucus caused by mucoinert NPs, the CS-added NE based on Solutol<sup>®</sup> mucopenetrates by the collapse of the mucus mesh [177].

Coating dextran particles with mucopenetration properties have also been explored to improve drug administration performance [178–181] and enhance immunoadjuvant activity in vivo [182]. Other strategies, such as coating polymeric particles with polydopamine (PDA) [183] or cell-penetrating peptides [184] used in drug delivery, might be explored and characterized in mucosal vaccines, as well as continuing the search for new adjuvants with mucopenetrating properties.

### 5.2. Permeation of Polymeric Particles via the Mucus Layer

An additional consideration for the design of polymer-based particles is passing through the second barrier, the epithelial cell membrane. The permeability of peptides, proteins, and drugs is often deficient. In this sense, absorption enhancers have been developed, which, in addition to preventing enzymatic degradation, facilitate the opening of the epithelial barrier and improve absorption through intracellular or paracellular mechanisms [185]. Absorption and permeation enhancers include surfactants, such as bile salts, fatty acids, phospholipids, tight junction modulators, cyclodextrins, and detergents [186–189]. This group also includes mucolytic agents, such as acetylcysteine or enzymes, which can decrease the elastic properties and dynamic viscosity of the mucus, influencing the integrity of the mucus layer [190]. For example, Zhang et al. reported the oral administration, in mice, of self-assembled nanoparticles with recombinant urease subunit B from *Helicobacter pylori*, coated with a cell-penetrating peptide, and coated with PEG derivative. NPs were transported transepithelially, improving the systemic and mucosal antibody response and the protection against *H. pylori* after the challenge [191]. It will be essential to continue studying absorption enhancers in mucosal vaccine formulations to improve the immune response.

## 6. Challenges and Opportunities

For several decades, many polymer-based particles have shown promise as potential human mucosal vaccine adjuvants due to their biodegradability, biocompatibility, and nontoxicity characteristics. Added to this is the extensive study of the adjuvant mechanisms of particulate systems. However, in the mucosa, the mucin networks that cover the compartments are often considered a barrier for the particles, so the mucoadhesive and mucopenetrating capacity of the polymer-based particles often defines their adjuvant mechanism of action.

The search for polymers with better mucoadhesive properties, regardless of the polymer's source, but focusing on the physicochemical characterization of polymeric particles and the contribution of these properties to mucoadhesion, will allow the rational design of mucosal vaccines. However, it is not an easy task because, on the one hand, the smallest nanoparticles are the most mucopenetrating. Still, on the other, there is a lack of studies that suggest an ideal surface charge or a hydrophobicity that favors adhesion. At the same time, it cannot be ignored that there are multiple other cellular mechanisms to elicit the immune response triggered by the polymeric particles, i.e., enhanced antigen uptake, immune cell presentation and recruitment, and traffic to lymph nodes.

Studies demonstrating the correlation between the observed immune response, the physicochemical characteristics, the mucoadhesion, and the mucopenetration ability are scarce. More studies that examine all these factors simultaneously are required to position mucoadhesion as another immune response mechanism necessary for designing more efficient polymer-based particulate adjuvants.

## 7. Conclusions

The COVID-19 pandemic highlighted the need for mucosal vaccination as an effective strategy to eradicate infectious diseases that have the mucosa as a natural route of infection. Mucoadhesion is probably the most important feature to improve local and systemic immune responses since, by prolonging the residence time of particulate polymers in mucosal tissues, the absorption and sometimes penetration through the mucosal epithelia are allowed and improved. In this sense, studying the physicochemical characteristics of the polymeric particles used as mucosal vaccine adjuvants and how they affect mucoadhesion is crucial to developing new mucosal vaccines.

**Author Contributions:** N.V.-M. conceptualization, writing—original draft. D.G., S.A.M.-M. and S.S. reviewed the document, and R.R.-S. reviewed, discussed, and edited the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (grant number A1-S-9849) and PAPIIT/DGAPA/UNAM (grant numbers IN 216419 and IN 216722). Nathaly Vasquez Martínez is a doctoral student from Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. She received a fellowship from CONACYT.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors are grateful for the financial support of the CONACYT and PAPIIT/DGAPA/UNAM.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lycke, N.Y.; Bemark, M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: Recent developments. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 1361–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tezuka, H.; Ohteki, T. Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ornelas, A.; Dowdell, A.S.; Lee, J.S.; Colgan, S.P. Microbial metabolite regulation of epithelial cell-cell interactions and barrier function. *Cells* **2022**, *11*, 944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kiyono, H.; Fukuyama, S. Nalt-versus Peyer’s-patch-mediated mucosal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 699–710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Nakamura, Y.; Kimura, S.; Hase, K. M Cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. *Inflamm. Regen.* **2018**, *38*, 15. [[CrossRef](#)]
6. Ohno, H.J.B. Special review—Crosstalk between the intestinal immune system and gut commensal microbiota intestinal M. *Cells* **2016**, *159*, 151–160. [[CrossRef](#)]
7. Kimura, S. Molecular Insights into the Mechanisms of M-Cell Differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat. Sci. Int.* **2018**, *93*, 23–34. [[CrossRef](#)]
8. Howe, S.E.; Lickteig, D.J.; Plunkett, K.N.; Ryerse, J.S.; Konjufca, V. The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86656. [[CrossRef](#)]
9. Kulkarni, P.; Rawtani, D.; Barot, T. Design, development and in-vitro/in-vivo evaluation of intranasally delivered rivastigmine and N-acetyl cysteine loaded bifunctional niosomes for applications in combinative treatment of alzheimer’s disease. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *163*, 1–15. [[CrossRef](#)]
10. Agace, W.W. T-Cell Recruitment to the Intestinal Mucosa. *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 514–522. [[CrossRef](#)]

11. Oya, Y.; Kimura, S.; Nakamura, Y.; Ishihara, N.; Takano, S.; Morita, R.; Endo, M.; Hase, K. Characterization of M cells in tear duct-associated lymphoid tissue of mice: A potential role in immunosurveillance on the ocular surface. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 779709. [[CrossRef](#)]
12. Rivellese, F.; Pontarini, E.; Pitzalis, C. *Inducible Lymphoid Organs*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; Volume 426, ISBN 9783030517465.
13. Zhou, J.Z.; Way, S.S.; Chen, K. Immunology of the uterine and vaginal mucosae. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 302–314. [[CrossRef](#)]
14. Brandtzaeg, P. Secretory IgA: Designed for anti-microbial defense. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 222. [[CrossRef](#)]
15. Lavelle, E.C.; Ward, R.W. Mucosal vaccines—Fortifying the frontiers. *Nat. Rev. Immunol.* **2022**, *22*, 236–250. [[CrossRef](#)]
16. Su, F.; Patel, G.B.; Hu, S.; Chen, W. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Hum. Vaccines Immunother.* **2016**, *12*, 1070–1079. [[CrossRef](#)]
17. Clements, J.D.; Freytag, L.C. Parenteral vaccination can be an effective means of inducing protective mucosal responses. *Clin. Vaccine Immunol.* **2016**, *23*, 438–441. [[CrossRef](#)]
18. Garziano, M.; Utyro, O.; Strizzi, S.; Vanetti, C.; Saulle, I.; Conforti, C.; Cicilano, F.; Ardizzone, F.; Cappelletti, G.; Clerici, M.; et al. Saliva and plasma neutralizing activity induced by the administration of a third Bnt162b2 vaccine dose. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14341. [[CrossRef](#)]
19. Shaikh, H.; Lynch, J.; Kim, J.; Excler, J.L. Current and future cholera vaccines. *Vaccine* **2020**, *38*, A118–A126. [[CrossRef](#)]
20. Varghese, T.; Kang, G.; Steele, A.D. Understanding rotavirus vaccine efficacy and effectiveness in countries with high child mortality. *Vaccines* **2022**, *10*, 346. [[CrossRef](#)]
21. Booth, J.S.; Goldberg, E.; Barnes, R.S.; Greenwald, B.D.; Sztein, M.B. Oral typhoid vaccine Ty21a elicits antigen-specific resident memory CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cells in the human terminal ileum lamina propria and epithelial compartments. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 102. [[CrossRef](#)]
22. Collins, N.D.; Adhikari, A.; Yang, Y.; Kuschner, R.A.; Karasavvas, N.; Binn, L.N.; Walls, S.D.; Graf, P.C.F.; Myers, C.A.; Jarman, R.G.; et al. Live oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine induces durable antibody response. *Vaccines* **2020**, *8*, 411. [[CrossRef](#)]
23. Carter, N.J.; Curran, M.P. Live attenuated influenza vaccine (FluMist<sup>®</sup>; Fluenz<sup>TM</sup>). *Drugs* **2011**, *71*, 1591–1622. [[CrossRef](#)]
24. Kulkarni, P.S.; Raut, S.K.; Dhere, R.M. A post-marketing surveillance study of a human live-virus pandemic influenza A (H1N1) vaccine (Nasovac<sup>®</sup>) in India. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 122–124. [[CrossRef](#)]
25. Czerkinsky, C.; Holmgren, J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: Targeting immunity to the right tissues. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; Volume 354, pp. 1–18. ISBN 9783540767756. [[CrossRef](#)]
26. Delph, K.M.; Davis, E.G.; Bello, N.M.; Hankins, K.; Wilkerson, M.J.; Ewen, C.L. Journal of equine veterinary science comparison of immunologic responses following intranasal and oral administration of a USDA-approved, live-attenuated *Streptococcus Equi* Vaccine. *J. Equine Vet. Sci.* **2018**, *60*, 29–34.e1. [[CrossRef](#)]
27. Shillova, N.; Howe, S.E.; Hyseni, B.; Ridgell, D. Crossm chlamydia-specific IgA secretion in the female reproductive tract induced via per-oral immunization confers protection against primary *Chlamydia* challenge. *Infect. Immun.* **2021**, *89*, 1–16. [[CrossRef](#)]
28. Jahnmatz, M.; Richert, L.; Storsaeter, J.; Colin, C.; Bauduin, C.; Thalén, M.; Solovay, K.; Rubin, K. Safety and immunogenicity of the live attenuated intranasal pertussis vaccine BPZE1: A phase 1b, double-blind, randomised, placebo-controlled dose-escalation study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1290–1301. [[CrossRef](#)]
29. Li, L.; Shi, N.; Xu, N.; Wang, H.; Zhao, H.; Xu, H.; Liu, D.; Zhang, Z. Safety and viral shedding of live attenuated influenza vaccine (LAIV) in Chinese healthy juveniles and adults: A phase I. *Vaccines* **2022**, *10*, 1796. [[CrossRef](#)]
30. Ascarateil, S.; Puget, A.; Koziol, M. Safety data of montanide ISA 51 VG and montanide ISA 720 VG, two adjuvants dedicated to human therapeutic vaccines. *J. Immunother. Cancer* **2015**, *3*, P428. [[CrossRef](#)]
31. Cohet, C.; Van Der Most, R.; Bauchau, V.; Bekkat-berkani, R.; Doherty, T.M.; Schuind, A.; Tavares, F.; Silva, D.; Rappuoli, R.; Garçon, N.; et al. Safety of AS03-adjuvanted influenza vaccines: A review of the evidence. *Vaccine* **2019**, *37*, 3006–3021. [[CrossRef](#)]
32. Li, A.P.Y.; Cohen, C.A.; Leung, N.H.L.; Fang, V.J.; Gangappa, S.; Sambhara, S.; Levine, M.Z.; Iuliano, A.D.; Perera, R.A.P.M.; Ip, D.K.M.; et al. Immunogenicity of standard, high-dose, MF59-adjuvanted, and Recombinant-HA Seasonal Influenza Vaccination in Older Adults. *Npj Vaccines* **2021**, *6*, 25. [[CrossRef](#)]
33. Wang, Y.Q.; Bazin-Lee, H.; Evans, J.T.; Casella, C.R.; Mitchell, T.C. MPL adjuvant contains competitive antagonists of human TLR4. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 577823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Didierlaurent, A.M.; Laupèze, B.; Di Pasquale, A.; Hergli, N.; Collignon, C.; Garçon, N. Adjuvant system AS01: Helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **2017**, *16*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Schwarz, T.F.; Huang, L.M.; Lin, T.Y.; Wittermann, C.; Panzer, F.; Valencia, A.; Suryakiran, P.V.; Lin, L.; Descamps, D. Long-term immunogenicity and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in 10- to 14-year-old girls open 6-year follow-up of an initial observer-blinded, randomized trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2014**, *33*, 1255–1261. [[CrossRef](#)]
36. Hsieh, S.; Liu, M.; Chen, Y.; Lee, W.; Hwang, S.; Cheng, S.; Ko, W.; Hwang, K. Safety and immunogenicity of CpG 1018 and aluminium hydroxide-adjuvanted SARS-CoV-2 S-2P protein vaccine MVC-COV1901: Interim results of a large-scale, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial in Taiwan. *Lancet Respir.* **2021**, *9*, 1396–1406. [[CrossRef](#)]



37. Parums, D.V. Editorial: First approval of the protein-based adjuvanted nuvaxovid (NVX-CoV2373) novavax vaccine for SARS-CoV-2 could increase vaccine uptake and provide immune protection from viral variants. *Med. Sci. Monit.* **2022**, *28*, e936523-1–e936523-3. [[CrossRef](#)]
38. Pan, S.; Hsieh, S.; Lin, C.; Hsu, Y.; Chang, M.; Chang, S. A randomized, double-blind, controlled clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of an intranasally administered trivalent inactivated influenza vaccine with adjuvant LTh(aK): A phase I study. *Vaccine* **2019**, *37*, 1994–2003. [[CrossRef](#)]
39. Schussek, S.; Bernasconi, V.; Mattsson, J.; Wenzel, U.A.; Strömberg, A.; Gribonika, I.; Schön, K.; Lycke, N.Y. The CTA1-DD adjuvant strongly potentiates follicular dendritic cell function and germinal center formation, which results in improved neonatal immunization. *Mucosal Immunol.* **2020**, *13*, 545–557. [[CrossRef](#)]
40. Van Herck, S.; Feng, B.; Tang, L. Delivery of STING agonists for adjuvanting subunit vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *179*, 114020. [[CrossRef](#)]
41. Kantarcioglu, B.; Iqbal, O.; Lewis, J.; Carter, A.; Singh, M.; Lievano, F.; Ligocki, M.; Jeske, W.; Adiguzel, C.; Gerotziafas, T.; et al. An update on the status of vaccine development for SARS-CoV-2 including variants: practical considerations for COVID-19 special populations. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2022**, *28*, 10760296211056648. [[CrossRef](#)]
42. Van der Ley, P.A.; Zariri, A.; Van Riet, E.; Oosterhoff, D.; Kruiswijk, C.P. An intranasal OMV-based vaccine induces high mucosal and systemic protecting immunity against a SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 781280. [[CrossRef](#)]
43. Jearanaiwitayakul, T.; Seesen, M.; Chawengkirttikul, R.; Limthongkul, J.; Apichirapokey, S.; Sapsutthipas, S.; Phumiamorn, S.; Sunintaboon, P.; Ubol, S. Intranasal administration of RBD nanoparticles confers induction of mucosal and systemic immunity against SARS-CoV-2. *Vaccines* **2021**, *9*, 768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Li, J.; Qiang, H.; Yang, W.; Xu, Y.; Feng, T.; Cai, H.; Wang, S.; Liu, Z.; Zhang, Z.; Zhang, J. Oral insulin delivery by epithelium microenvironment-adaptive nanoparticles. *J. Control. Release* **2022**, *341*, 31–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. McCright, J.; Skeen, C.; Yarmovsky, J.; Maisel, K. Acta biomaterialia nanoparticles with dense poly (ethylene glycol) coatings with near neutral charge are maximally transported across lymphatics and to the lymph nodes. *Acta Biomater.* **2022**, *145*, 146–158. [[CrossRef](#)]
46. Nguyen, B.; Tolia, N.H. Protein-based antigen presentation platforms for nanoparticle vaccines. *Npj Vaccines* **2021**, *6*, 70. [[CrossRef](#)]
47. Guillén, D.; Moreno-Mendieta, S.; Pérez, R.; Espitia, C.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *112*, 210–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Moreno-Mendieta, S.A.; Guillén, D.; Espitia, C.; Hernández-Pando, R.; Sanchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. A novel antigen-carrier system: The *Mycobacterium tuberculosis* acr protein carried by raw starch microparticles. *Int. J. Pharm.* **2014**, *474*, 241–248. [[CrossRef](#)]
49. Barnowski, C.; Kadzioch, N.; Damm, D.; Yan, H.; Temchura, V. Advantages and limitations of integrated flagellin adjuvants for HIV-based nanoparticle B-Cell vaccines. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 204. [[CrossRef](#)]
50. Vijayan, V.; Mohapatra, A.; Uthaman, S.; Park, I.K. Recent advances in nanovaccines using biomimetic immunomodulatory materials. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 534. [[CrossRef](#)]
51. Vu, M.N.; Kelly, H.G.; Kent, S.J.; Wheatley, A.K. Current and future nanoparticle vaccines for COVID-19. *EBioMedicine* **2021**, *74*, 103699. [[CrossRef](#)]
52. Oyewumi, M.O.; Kumar, A.; Cui, Z.A. Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev. Vaccines* **2011**, *9*, 1095–1107. [[CrossRef](#)]
53. Shah, R.R.; Amiji, M.M.; Brito, L.A. The impact of size on particulate vaccine adjuvants. *Nanomedicine* **2014**, *9*, 2671–2681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Nakamura, T.; Kawai, M.; Sato, Y.; Maeki, M.; Tokeshi, M.; Harashima, H. The Effect of size and charge of lipid nanoparticles prepared by microfluidic mixing on their lymph node transitivity and distribution. *Mol. Pharm.* **2020**, *17*, 944–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Tazaki, T.; Tabata, K.; Ainai, A.; Ohara, Y.; Kobayashi, S. Conjugated RNA Adjuvants for Intranasal Inactivated Influenza Vaccines. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 16527–16536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Gogoi, H.; Mani, R.; Aggarwal, S.; Malik, A.; Munde, M.; Bhatnagar, R. Crystalline and amorphous preparation of aluminum hydroxide nanoparticles enhances protective antigen domain 4 specific immunogenicity and provides protection against anthrax. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 239–252. [[CrossRef](#)]
57. O'Hagan, D.T. New generation vaccine adjuvants. In *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2007; pp. 1–7. ISBN 9780470015902. [[CrossRef](#)]
58. Liu, Y.; Wang, L.; Weifeng, Z.; Chen, X. Surface hydrophobicity of microparticles modulates adjuvanticity. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3888–3896. [[CrossRef](#)]
59. Shima, F.; Akagi, T.; Akashi, M. Effect of Hydrophobic side chains in the induction of immune responses by nanoparticle adjuvants consisting of amphiphilic poly ( $\gamma$ -glutamic acid). *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 890–898. [[CrossRef](#)]
60. Katare, Y.K.; Muthukumar, T.; Panda, A.K. Influence of particle size, antigen load, dose and additional adjuvant on the immune response from antigen loaded PLA microparticles. *Int. J. Pharm.* **2005**, *301*, 149–160. [[CrossRef](#)]

61. Kapadia, C.H.; Tian, S.; Perry, J.L.; Luft, J.C.; Desimone, J.M. Role of linker length and antigen density in nanoparticle peptide vaccine. *ACS Omega* **2019**, *4*, 5547–5555. [[CrossRef](#)]
62. Zhang, W.; Zhu, C.; Xiao, F.; Liu, X.; Xie, A.; Chen, F.; Dong, P.; Lin, P.; Zheng, C.; Zhang, H.; et al. PH-controlled release of antigens using mesoporous silica nanoparticles delivery system for developing a fish oral vaccine. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 644396. [[CrossRef](#)]
63. Jahan, S.T.; Sadat, S.M.; Haddadi, A. Design and immunological evaluation of anti-CD205-tailored PLGA-based nanoparticulate cancer vaccine. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *ume 13*, 367–386. [[CrossRef](#)]
64. Schmidt, S.T.; Olsen, C.L.; Franzzyk, H.; Wörzner, K.; Korsholm, K.S.; Rades, T.; Andersen, P.; Foged, C.; Christensen, D. Comparison of two different pegylation strategies for the liposomal adjuvant CAF09: Towards induction of CTL responses upon subcutaneous vaccine administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *140*, 29–39. [[CrossRef](#)]
65. Genito, C.J.; Batty, C.J.; Bachelder, E.M.; Ainslie, K.M. Considerations for size, surface charge, polymer degradation, co-delivery, and manufacturability in the development of polymeric particle vaccines for infectious diseases. *Adv. NanoBiomed. Res.* **2021**, *1*, 2000041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yan, S.; Gu, W.; Xu, Z.P. Re-Considering How Particle Size and Other Properties of Antigen-Adjuvant Complexes Impact on the Immune Responses. *J. Colloid. Interface Sci.* **2013**, *395*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Bastola, R.; Lee, S. Physicochemical properties of particulate vaccine adjuvants: Their pivotal role in modulating immune responses. *J. Pharm. Investig.* **2018**, *49*, 279–285. [[CrossRef](#)]
68. Ulery, B.D.; Petersen, L.K.; Phanse, Y.; Kong, C.S.; Broderick, S.R.; Kumar, D.; Ramer-Tait, A.E.; Carrillo-Conde, B.; Rajan, K.; Wannemuehler, M.J.; et al. Rational design of pathogen-mimicking amphiphilic materials as nanoadjuvants. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Wu, J.; Ma, G. Biomimic strategies for modulating the interaction between particle adjuvants and antigen-presenting. *Cells Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 2366–2375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Moreno-Mendieta, S.; Guillén, D.; Vasquez-Martínez, N.; Hernández-Pando, R.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. Understanding the phagocytosis of particles: The key for rational design of vaccines and therapeutics. *Pharm. Res.* **2022**, *39*, 1823–1849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Jackson, A.D.; Jackson, A.D. Airway Goblet-Cell Mucus Secretion. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 39–45. [[CrossRef](#)]
72. Birchenough, G.; Johansson, M.; Gustafsson, J.; Bergström, J.H.; Hansson, G.C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 712–719. [[CrossRef](#)]
73. Creeth, J.M. Constituents of mucus and their separation. *Br. Med. Bull.* **1978**, *34*, 17–24. [[CrossRef](#)]
74. Dupont, A.; Heinbockel, L.; Brandenburg, K.; Hornef, M.W. To protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 761–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Atuma, C.; Strugala, V.; Allen, A.; Holm, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2014**, *280*, G922–G929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Gustafsson, J.K.; Ermund, A.; Johansson, M.E.; Schütte, A.; Hansson, G.C.; Sjövall, H. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2012**, *302*, G430–G438. [[CrossRef](#)]
77. McGuckin, M.A.; Thornton, D.J.; Whittsett, J.A. *Mucins and Mucus*, 4th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 231–250. ISBN 9780124158474.
78. Peppas, N.A.; Buri, P.A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Control. Release* **1985**, *2*, 257–275. [[CrossRef](#)]
79. Leung, S.S.; Robinson, J.R. Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II. *J. Control. Release* **1990**, *12*, 187–194. [[CrossRef](#)]
80. Nyström, B.; Kjøniksen, A.; Beheshti, N.; Maleki, A.; Zhu, K.; Knudsen, K.D.; Pamies, R.; Hernández, J.G.; García, J.; Torre, D. Characterization of polyelectrolyte features in polysaccharide systems and mucin. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *158*, 108–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Jabbari, E.; Peppas, N. Polymer-polymer interdiffusion and adhesion. *Polym. Rev. Part C* **1994**, *34*, 205–241. [[CrossRef](#)]
82. Sriamornsak, P.; Wattanakorn, N.; Nunthanid, J.; Puttipipatkachorn, S. Mucoadhesion of Pectin as evidence by wettability and chain interpenetration. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 458–467. [[CrossRef](#)]
83. Shaikh, R.; Raghu, T.; Singh, R.; Garland, M.J.; David, A.; Donnelly, R.F. Mucoadhesive drug delivery systems. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2011**, *3*, 89–100. [[CrossRef](#)]
84. Saini, H.K.; Nautiyal, U. Pioneering and encouraging approach—mucoadhesive drug delivery system. *Int. J. Pharm. Med. Res* **2017**, *5*, 455–463.
85. Pereira, M.N.; Reis, T.A.; Matos, B.N.; Cunha-filho, M.; Gratieri, T.; Gelfuso, G.M. Colloids and surfaces B: Biointerfaces novel ex vivo protocol using porcine vagina to assess drug permeation from mucoadhesive and colloidal pharmaceutical systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *158*, 222–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Gidvall, S.; Björklund, S.; Feiler, A.; Dahlström, B.; Rönn, R.; Engblom, J.; Valetti, S. A novel versatile flow-donor chamber as biorelevant ex-vivo test assessing oral mucoadhesive formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *166*, 105983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Falavigna, M.; Pattacini, M.; Wibel, R.; Sonvico, F.; Škalko-Basnet, N.; Flaten, G.E. The vaginal-PVPA: A vaginal mucosa-mimicking in vitro permeation tool for evaluation of mucoadhesive formulations. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 568. [[CrossRef](#)]
88. Rossi, S.; Vigani, B.; Bonferoni, M.C.; Sandri, G.; Caramella, C.; Ferrari, F. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis rheological analysis and mucoadhesion: A 30 year-old and still active combination. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *156*, 232–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Bassi, J.; Barbosa, S.; Ferreira, D.S.; De Freitas, O.; Bruschi, M.L. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 1053–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Drumond, N.; Stegemann, S. Colloids and surfaces B: Biointerfaces polymer adhesion predictions for oral dosage forms to enhance drug administration safety. Part 3: Review of in vitro and in vivo methods used to predict esophageal adhesion and transit time. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *165*, 303–314. [[CrossRef](#)]
91. Bayer, I.S. Recent advances in mucoadhesive interface materials, mucoadhesion characterization, and technologies. *Adv. Mater. Interfaces* **2022**, *9*, 2200211. [[CrossRef](#)]
92. Lai, S.K.; Wang, Y.; Hanes, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 158–171. [[CrossRef](#)]
93. Petrou, G.; Crouzier, T. Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 2282–2297. [[CrossRef](#)]
94. Jelkmann, M.; Lechner, C.; Menzel, C.; Krebs, V.; Bernkop-Schnürch, A. Cationic starch derivatives as mucoadhesive and soluble excipients in drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2019**, *570*, 118664. [[CrossRef](#)]
95. Martău, G.A.; Mihai, M.; Vodnar, D.C. The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector-biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. *Polymers* **2019**, *11*, 1837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Yildiz, H.M.; Mckelvey, C.A.; Marsac, P.J.; Carrier, R.L.; Point, W. Size selectivity of intestinal mucus to diffusing particulates is dependent on surface chemistry and exposure to lipids. *J. Drug Target.* **2016**, *23*, 768–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Lamson, N.G.; Berger, A.; Fein, K.C.; Whitehead, K.A. Proteins by enhancing intestinal permeability. *Nat. Biomed. Eng.* **2020**, *4*, 84–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Bandi, S.P.; Kumbhar, Y.S. Effect of particle size and surface charge of nanoparticles in penetration through intestinal mucus barrier. *J. Nanopart. Res.* **2020**, *22*, 62. [[CrossRef](#)]
99. Guo, S.; Sun, J.; Gan, Y.; Shi, X.; Gao, H. Rotation-facilitated rapid transport of nanorods in mucosal tissues. *J. Control. Release* **2016**, *307*, 64–75. [[CrossRef](#)]
100. Yu, M.; Xu, L.; Tian, F.; Su, Q.; Zheng, N.; Yang, Y.; Wang, J.; Wang, A.; Zhu, C.; Guo, S.; et al. Rapid transport of deformation-tuned nanoparticles across biological hydrogels and cellular barriers. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2607. [[CrossRef](#)]
101. Gómez-Guillén, M.C.; Montero, M.P. Food hydrocolloids enhancement of oral bioavailability of natural compounds and probiotics by mucoadhesive tailored biopolymer-based nanoparticles: A review. *Food Hydrocoll.* **2021**, *118*, 106772. [[CrossRef](#)]
102. Das, S.; Kaur, S.; Rai, V.K. Gastro-retentive drug delivery systems: A recent update on clinical pertinence and drug delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**, *11*, 1849–1877. [[CrossRef](#)]
103. Tan, S.J.L.; Billa, N. Improved bioavailability of poorly soluble drugs through gastrointestinal muco-adhesion of lipid nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1817. [[CrossRef](#)]
104. De Lima, C.S.A.; Varca, J.P.R.O.; Alves, M.; Nogueira, K.M.; Cruz, C.P.C.; Rial-Hermida, M.I.; Kadłubowski, S.S.; Varca, G.H.C.; Lug, A.B. Mucoadhesive polymers and their applications in drug delivery systems for the treatment of bladder cancer. *Gels* **2022**, *8*, 587. [[CrossRef](#)]
105. Liu, Q.; Zheng, X.; Zhang, C.; Shao, X.; Zhang, X.; Zhang, Q.; Jiang, X. Antigen-conjugated N-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles induce strong immune responses after nasal administration. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 22–36. [[CrossRef](#)]
106. Collado-González, M.; Espinosa, Y.G.; Goycoolea, F.M. Interaction between chitosan and mucin: Fundamentals and applications. *Biomimetics* **2019**, *4*, 32. [[CrossRef](#)]
107. Gong, X.; Gao, Y.; Shu, J.; Zhang, C.; Zhao, K. Chitosan-based nanomaterial as immune adjuvant and delivery carrier for vaccines. *Vaccines* **2022**, *10*, 1906. [[CrossRef](#)]
108. Szymańska, E.; Winnicka, K. Stability of chitosan—A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1819–1846. [[CrossRef](#)]
109. Safdar, R.; Aziz, A.; Arunagiri, A.; Regupathi, I.; Thanabalan, M.; Engineering, C.; Petronas, T.; Iskandar, B.S.; Ridzuan, P.D. Potential of chitosan and its derivatives for controlled drug release applications—A review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 642–659. [[CrossRef](#)]
110. Trapani, A.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Kissel, T. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **2009**, *375*, 97–106. [[CrossRef](#)]
111. Lin, F.; Jia, H.; Wu, F. Glycol chitosan: A water-soluble polymer for cell imaging and drug delivery. *Molecules* **2019**, *24*, 4371. [[CrossRef](#)]
112. Pawar, D.; Jaganathan, K.S. Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: Enhancement of mucosal and systemic immune response. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 185–194. [[CrossRef](#)]
113. Kim, E.S.; Baek, Y.; Yoo, H.; Lee, J.; Lee, H.G. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles prepared by ionic gelation improve the antioxidant activities of astaxanthin in the in vitro and in vivo model. *Antioxidants* **2022**, *11*, 479. [[CrossRef](#)]

114. Walke, S.; Srivastava, G.; Routaray, C.B.; Dhavale, D.; Pai, K.; Doshi, J.; Kumar, R.; Doshi, P. Preparation and characterization of microencapsulated DwPT trivalent vaccine using water soluble chitosan and its in-vitro and in-vivo immunological properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 2044–2056. [[CrossRef](#)]
115. Snyman, D.; Hamman, J.H.; Kotze, A.F. Evaluation of the mucoadhesive properties of N-trimethyl chitosan chloride. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*, 61–69. [[CrossRef](#)]
116. Pathak, K.; Misra, S.K.; Sehgal, A.; Singh, S.; Bungau, S.; Najda, A.; Gruszecki, R.; Behl, T. Biomedical applications of quaternized chitosan. *Polymers* **2021**, *13*, 2514. [[CrossRef](#)]
117. Kim, Y.H.; Yoon, K.S.; Lee, S.; Park, E.; Rhim, J. Synthesis of fully deacetylated quaternized chitosan with enhanced antimicrobial activity and low cytotoxicity. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1644. [[CrossRef](#)]
118. Pawar, D.; Goyal, A.K.; Mangal, S.; Mishra, N.; Vaidya, B.; Tiwari, S.; Jain, A.K.; Vyas, S.P. Evaluation of mucoadhesive PLGA microparticles for nasal immunization. *AAPS J.* **2010**, *12*, 130–137. [[CrossRef](#)]
119. Krishnakumar, D.; Kalaiyarasi, D.; Bose, J.C.; Jaganathan, K.S. Evaluation of Mucoadhesive nanoparticle based nasal vaccine. *J. Pharm. Investig.* **2012**, *42*, 315–326. [[CrossRef](#)]
120. Kim, H.S.; Park, K.H.; Lee, H.K.; Kim, J.S.; Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Kim, K.H.; Yun, J.; Hwang, B.Y.; Hong, J.T.; et al. Curdlan activates dendritic cells through dectin-1 and toll-like receptor 4 signaling. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *39*, 71–78. [[CrossRef](#)]
121. Zhang, S.; Huang, S.; Lu, L.; Song, X.; Li, P.; Wang, F. Curdlan sulfate-O-linked quaternized chitosan nanoparticles: Potential adjuvants to improve the immunogenicity of exogenous antigens via intranasal vaccination. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2377–2394. [[CrossRef](#)]
122. Lu, G.; Sheng, B.; Wang, G.; Wei, Y.; Gong, Y.; Zhang, X.; Zhang, L. Controlling the degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan utilizing bimodal molecular weight distribution. *J. Biomater. Appl.* **2009**, *23*, 435–451. [[CrossRef](#)]
123. Cao, P.; Wang, J.; Sun, B.; Rewatkar, P.; Popat, A.; Fu, C.; Peng, H.; Xu, Z.P.; Li, L. Enhanced mucosal transport of polysaccharide-calcium phosphate nanocomposites for oral vaccination. *ACS Appl. Bio. Mater.* **2021**, *4*, 7865–7878. [[CrossRef](#)]
124. Rúnarsson, Ö.V.; Holappa, J.; Nevalainen, T.; Hjálmarsson, M.; Järvinen, T.; Loftsson, T.; Einarsson, J.M.; Jónsdóttir, S.; Valdimarsdóttir, M.; Másson, M. Antibacterial activity of methylated chitosan and chito-oligomer derivatives: Synthesis and structure activity relationships. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 2660–2671. [[CrossRef](#)]
125. Suksamran, T.; Ngawhirunpat, T.; Rojanarata, T.; Sajomsang, W.; Pitaksuteepong, T.; Opanasopit, P. Methylated N-(4-N,N-Dimethylaminocinnamyl) chitosan-coated electrospray OVA-loaded microparticles for oral vaccination. *Int. J. Pharm.* **2013**, *448*, 19–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Jesus, S.; Soares, E.; Costa, J.; Borchard, G.; Borges, O. Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly- $\epsilon$ -caprolactone based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2016**, *504*, 59–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Rahman, M.S.; Hasan, M.S.; Nitai, A.S.; Nam, S.; Karmakar, A.K.; Ahsan, M.S.; Shiddiky, M.J.A.; Ahmed, M.B. Recent developments of carboxymethyl cellulose. *Polymers* **2021**, *13*, 1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Hanson, S.M.; Singh, S.; Tabet, A.; Sastry, K.J.; Barry, M.; Wang, C. Mucoadhesive wafers composed of binary polymer blends for sublingual delivery and preservation of protein vaccines. *J. Control. Release* **2021**, *330*, 427–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Mishra, M.; Mishra, B. Mucoadhesive microparticles as potential carriers in inhalation delivery of doxycycline hyclate: A comparative study. *Acta Pharm. Sin. B.* **2012**, *2*, 518–526. [[CrossRef](#)]
130. Cook, S.L.; Woods, S.; Methven, L.; Parker, J.K.; Khutoryanskiy, V.V. Mucoadhesive polysaccharides modulate sodium retention, release and taste perception. *Food Chem.* **2018**, *240*, 482–489. [[CrossRef](#)]
131. Baus, R.A.; Zahir-Jouzani, F.; Dünnhaupt, S.; Atyabi, F.; Bernkop-Schnürch, A. Mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery: In vitro-in vivo correlation study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *142*, 498–505. [[CrossRef](#)]
132. Li, H.S.; Shin, M.K.; Singh, B.; Maharjan, S.; Park, T.E.; Kang, S.K.; Yoo, H.S.; Hong, Z.S.; Cho, C.S.; Choi, Y.J. Nasal immunization with mannan-decorated mucoadhesive HPMCP microspheres containing ApxIIA toxin induces protective immunity against challenge infection with *Actinobacillus Pleuropneumoniae* in mice. *J. Control. Release* **2016**, *233*, 114–125. [[CrossRef](#)]
133. Luong, M.; Lam, J.S.; Chen, J.; Levitz, S.M. Effects of fungal N- and O-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines. *Vaccine* **2007**, *25*, 4340–4344. [[CrossRef](#)]
134. Kreer, C.; Kuepper, J.M.; Zehner, M.; Quast, T.; Kolanus, W.; Schumak, B.; Burgdorf, S. N-glycosylation converts non-glycoproteins into mannose receptor ligands and reveals antigen-specific T cell responses in vivo. *Oncotarget* **2017**, *8*, 6857–6872. [[CrossRef](#)]
135. Mangal, S.; Pawar, D.; Agrawal, U.; Jain, A.K.; Vyas, S.P. Evaluation of Mucoadhesive carrier adjuvant: Toward an oral anthrax vaccine. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2014**, *42*, 47–57. [[CrossRef](#)]
136. Saraf, S.; Jain, S.; Sahoo, R.N.; Mallick, S. Lipopolysaccharide derived alginate coated hepatitis B antigen loaded chitosan nanoparticles for oral mucosal immunization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *154*, 466–476. [[CrossRef](#)]
137. Des Rieux, A.; Pourcelle, V.; Cani, P.D.; Marchand-Brynaert, J.; Pr eat, V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 833–844. [[CrossRef](#)]
138. Longet, S.; Lundahl, M.L.E.; Lavelle, E.C. Targeted strategies for mucosal vaccination. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 613–623. [[CrossRef](#)]
139. Lee, N.K.; Kim, S.N.; Park, C.G. Immune cell targeting nanoparticles: A review. *Biomater. Res.* **2021**, *25*, 44. [[CrossRef](#)]
140. Amin, M.K.; Boateng, J.S. Enhancing stability and mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles by surface modification with sodium alginate and polyethylene glycol for potential oral mucosa vaccine delivery. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 156. [[CrossRef](#)]



141. Vyas, S.; Dhoble, S.; Ghodake, V.; Patravale, V. Xyloglucan based mucosal nanovaccine for immunological protection against brucellosis developed by supercritical fluid technology. *Int. J. Pharm. X* **2020**, *2*, 100053. [[CrossRef](#)]
142. Piqué, N.; Gómez-Guillén, M.d.C.; Montero, M.P. Xyloglucan, a plant polymer with barrier protective properties over the mucous membranes: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 673. [[CrossRef](#)]
143. Campolo, M.; Lanza, M.; Filippone, A.; Paterniti, I.; Casili, G.; Scuderi, S.A.; Ardizzone, A.; Cuzzocrea, S.; Esposito, E. Evaluation of a product containing xyloglucan and pea protein on skin barrier permeability. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2020**, *33*, 231–236. [[CrossRef](#)]
144. Dutta, P.; Giri, S.; Giri, T.K. Xyloglucan as green renewable biopolymer used in drug delivery and tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *160*, 55–68. [[CrossRef](#)]
145. Grabovac, V.; Guggi, D.; Bernkop-Schnürch, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1713–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Pérez-González, G.L.; Villarreal-Gómez, L.J.; Serrano-Medina, A.; Torres-Martínez, E.J.; Cornejo-Bravo, J.M. Mucoadhesive electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications of polymers and the parameters' roles. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 5271–5285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Lam, H.T.; Zupančič, O.; Laffleur, F.; Bernkop-Schnürch, A. Mucoadhesive properties of polyacrylates: Structure–function. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2021**, *107*, 102857. [[CrossRef](#)]
148. Coucke, D.; Schotsaert, M.; Libert, C.; Pringels, E.; Vervaet, C.; Foreman, P.; Saelens, X.; Remon, J.P. Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine* **2009**, *27*, 1279–1286. [[CrossRef](#)]
149. Noh, H.J.; Chowdhury, M.Y.E.; Cho, S.; Kim, J.-H.; Park, H.S.; Kim, C.-J.; Poo, H.; Sung, M.-H.; Lee, J.-S.; Lim, Y.T. Programming of influenza vaccine broadness and persistence by mucoadhesive polymer-based adjuvant systems. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 2472–2482. [[CrossRef](#)]
150. Kurosaki, T.; Katafuchi, Y.; Hashizume, J.; Harasawa, H.; Nakagawa, H. Induction of mucosal immunity by pulmonary administration of a cell-targeting nanoparticle. *Drug Deliv.* **2021**, *28*, 1585–1593. [[CrossRef](#)]
151. Fedorovitch, G. *Aerosol Particles in Lungs: Theoretical Modeling of Deposition and Mucociliary Clearance*; IntechOpen: London, UK, 2019; Open Access Books Built by Scientists; pp. 1–16. [[CrossRef](#)]
152. Leitner, V.M.; Walker, G.F.; Bernkop-Schnürch, A. Thiolated polymers: Evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *56*, 207–2114. [[CrossRef](#)]
153. Iqbal, J.; Shahnaz, G.; Dünhaupt, S.; Müller, C.; Hintzen, F.; Bernkop-schnürch, A. Biomaterials preactivated thiomers as mucoadhesive polymers for drug delivery. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1528–1535. [[CrossRef](#)]
154. Roldo, M.; Hornof, M.; Caliceti, P.; Bernkop-schnu, A. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: Synthesis and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 115–121. [[CrossRef](#)]
155. Lechner, C.; Jelkmann, M.; Bernkop-schnürch, A. Thiolated polymers: Bioinspired polymers utilizing one of the most important bridging structures in nature. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *151–152*, 191–221. [[CrossRef](#)]
156. Sinani, G.; Sessevmez, M.; Gök, M.K.; Özgümüş, S.; Alpar, H.O.; Cevher, E. Modified chitosan-based nanoadjuvants enhance immunogenicity of protein antigens after mucosal vaccination. *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118592. [[CrossRef](#)]
157. Malm, C.J.; Emerson, J.; Hiatt, G.D. Cellulose acetate phthalate as an enteric coating material. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1951**, *40*, 520–525. [[CrossRef](#)]
158. Lee, H.B.; Yoon, S.Y.; Singh, B.; Oh, S.H.; Cui, L.; Yan, C.; Kang, S.K.; Choi, Y.J.; Cho, C.S. Oral immunization of FMDV vaccine using PH-sensitive and mucoadhesive thiolated cellulose acetate phthalate microparticles. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Singh, I.; Rana, V. Enhancement of mucoadhesive property of polymers for drug delivery applications: A critical review. *Rev. Adhe. Adhes.* **2013**, *1*, 271. [[CrossRef](#)]
160. Schneider, H.; Pelaseyed, T.; Svensson, F.; Johansson, M.E.V. Study of mucin turnover in the small intestine by in vivo labeling. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Asim, M.H.; Nazir, I.; Jalil, A.; Matuszczak, B.; Bernkop-schnürch, A. Tetradeca-thiolated cyclodextrins: Highly mucoadhesive and in-situ gelling oligomers with prolonged mucosal adhesion. *Int. J. Pharm.* **2020**, *577*, 119040. [[CrossRef](#)]
162. Bansil, R.; Turner, B.S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *124*, 3–15. [[CrossRef](#)]
163. Serra, L.; Doménech, J.; Peppas, N.A. Design of poly (ethylene glycol)-tethered copolymers as novel mucoadhesive drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63*, 11–18. [[CrossRef](#)]
164. Wang, Y.; Lai, S.K.; Pace, A.; Cone, R.; Hanes, J. Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that “slip” through the human mucus barrier. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *47*, 9726–9729. [[CrossRef](#)]
165. Karabasz, A.; Szczepanowicz, K.; Cierniak, A.; Mezyk-Kopec, R.; Dyduch, G.; Szczęch, M.; Bereta, J.; Bzowska, M. In vivo studies on pharmacokinetics, toxicity and immunogenicity of polyelectrolyte nanocapsules functionalized with two different polymers: Poly-L-glutamic acid or PEG. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 9587–9602. [[CrossRef](#)]
166. Chen, B.M.; Cheng, T.L.; Roffler, S.R. Polyethylene glycol immunogenicity: Theoretical, clinical, and practical aspects of anti-polyethylene glycol antibodies. *ACS Nano* **2021**, *15*, 14022–14048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

167. Estapé Senti, M.; de Jongh, C.A.; Dijkxhoorn, K.; Verhoef, J.J.F.; Szebeni, J.; Storm, G.; Hack, C.E.; Schiffelers, R.M.; Fens, M.H.; Boross, P. Anti-PEG antibodies compromise the integrity of pegylated lipid-based nanoparticles via complement. *J. Control. Release* **2022**, *341*, 475–486. [[CrossRef](#)]
168. Chang, X.; Yu, W.; Ji, S.; Shen, L.; Tan, A.; Hu, T. Conjugation of PEG-hexadecane markedly increases the immunogenicity of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine. *Vaccine* **2017**, *24*, 1698–1704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Abhyankar, M.M.; Orr, M.T.; Lin, S.; Suraju, M.O.; Simpson, A.; Blust, M.; Pham, T.; Guderian, J.A.; Tomai, M.A.; Elvecrog, J.; et al. Adjuvant composition and delivery route shape immune response quality and protective efficacy of a recombinant vaccine for *Entamoeba histolytica*. *npj Vaccines*. **2018**, *3*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Shi, D.; Beasock, D.; Fessler, A.; Szebeni, J.; Ljubimova, J.Y.; Afonin, K.A.; Dobrovolskaia, M.A. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine’s most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2023**, *180*, 114079. [[CrossRef](#)]
171. Bamberger, D.; Hobernik, D.; Konhäuser, M.; Bros, M.; Wich, P.R. Surface modification of polysaccharide-based nanoparticles with PEG and dextran and the effects on immune cell binding and stimulatory characteristics. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 4403–4416. [[CrossRef](#)]
172. Batrakova, E.V.; Kabanov, A.V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release* **2008**, *130*, 98–106. [[CrossRef](#)]
173. Liu, D.; Yang, M.; Wang, D.; Jing, X.; Lin, Y.; Feng, L.; Duan, X. Dpd Study on the interfacial properties of PEO/PEO-PPO-PEO/PPO ternary blends: Effects of pluronic structure and concentration. *Polymers* **2021**, *13*, 2866. [[CrossRef](#)]
174. Petit, B.; Bouchemal, K.; Vauthier, C.; Djabourov, M.; Ponchel, G. The counterbalanced effect of size and surface properties of chitosan-coated poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles on mucoadhesion due to pluronic F68 addition. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 943–952. [[CrossRef](#)]
175. Díaz, A.G.; Quinteros, D.A.; Paolicchi, F.A.; Rivero, M.A.; Palma, S.D.; Pardo, R.P.; Clause, M.; Zylberman, V.; Goldbaum, F.A.; Estein, S.M. Mucosal immunization with polymeric antigen BLSOmp31 using alternative delivery systems against *Brucella Ovis* in rams. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2019**, *209*, 70–77. [[CrossRef](#)]
176. Pastor, Y.; Ting, I.; Luisa, A.; Manuel, J.; Gamazo, C. Intranasal delivery system of bacterial antigen using thermosensitive hydrogels based on a pluronic-gantrez conjugate. *Int. J. Pharm.* **2020**, *579*, 119154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Di Cola, E.; Cantu, L.; Brocca, P.; Rondelli, V.; Fadda, G.C.; Canelli, E.; Martelli, P.; Clementino, A.; Sonvico, F.; Bettini, R.; et al. Novel O/W nanoemulsions for nasal administration: Structural hints in the selection of performing vehicles with enhanced mucopenetration. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *183*, 110439. [[CrossRef](#)]
178. Lopes, M.; Shrestha, N.; Correia, A.; Shahbazi, M.; Sarmiento, B.; Hirvonen, J.; Veiga, F.; Seic, R. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *J. Control. Release* **2016**, *232*, 29–41. [[CrossRef](#)]
179. Manchanda, S.; Sahoo, P.K.; Majumdar, D.K. Mucoadhesive chitosan-dextran sulfate nanoparticles of acetazolamide for ocular hypertension. *Nanotechnol. Rev.* **2016**, *5*, 445–453. [[CrossRef](#)]
180. Ferreira, L.M.B.; Alonso, J.D.; Kiill, C.P.; Ferreira, N.N.; Buzzá, H.H.; Martins de Godoi, D.R.; de Britto, D.; Assis, O.B.G.; Seraphim, T.V.; Borges, J.C.; et al. Exploiting supramolecular interactions to produce bevacizumab-loaded nanoparticles for potential mucosal delivery. *Eur. Polym. J.* **2018**, *103*, 238–250. [[CrossRef](#)]
181. Elmowafy, E.; Soliman, M.E. International journal of biological macromolecules losartan-chitosan/dextran sulfate microplex as a carrier to lung therapeutics: Dry powder inhalation, aerodynamic profile and pulmonary tolerability. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 220–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Pirouzmand, H.; Khameneh, B.; Tafaghodi, M. Immunoadjuvant potential of cross-linked dextran microspheres mixed with chitosan nanospheres encapsulated with tetanus toxoid. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 212–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Poinard, B.; Lam, S.A.E.; Neoh, K.G.; Kah, J.C.Y. Mucopenetration and biocompatibility of polydopamine surfaces for delivery in an ex vivo porcine bladder. *J. Control. Release* **2019**, *300*, 161–173. [[CrossRef](#)]
184. Uhl, P.; Grundmann, C.; Sauter, M.; Storck, P.; Tursch, A.; Özbek, S.; Leotta, K.; Roth, R.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J.A.; et al. Coating of PLA-nanoparticles with cyclic, arginine-rich cell penetrating peptides enables oral delivery of liraglutide. *Nanomedicine* **2020**, *24*, 102132. [[CrossRef](#)]
185. Ghadiri, M.; Young, P.M.; Traini, D. Strategies to enhance drug absorption via nasal and pulmonary routes. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 113. [[CrossRef](#)]
186. Suzuki, H.; Kondoh, M.; Li, X.; Takahashi, A.; Matsuhisa, K.; Matsushita, K.; Kakamu, Y.; Yamane, S.; Kodaka, M.; Isoda, K.; et al. A toxicological evaluation of a claudin modulator, the c-terminal fragment of *Clostridium Perfringens* enterotoxin, in mice. *Pharmazie* **2011**, *66*, 543–546. [[CrossRef](#)]
187. Moghimipour, E.; Ameri, A.; Handali, S. Absorption-enhancing effects of bile salts. *Molecules* **2015**, *20*, 14451–14473. [[CrossRef](#)]
188. Zhang, H.; Huang, X.; Sun, Y.; Lu, G.; Wang, K.; Wang, Z.; Xing, J.; Gao, Y. Improvement of pulmonary absorption of poorly absorbable macromolecules by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin grafted polyethylenimine (HP- $\beta$ -CD-PEI) in rats. *Int. J. Pharm.* **2015**, *489*, 294–303. [[CrossRef](#)]
189. Zhang, T.; Li, M.; Han, X.; Nie, G.; Zheng, A. Effect of different absorption enhancers on the nasal absorption of nalmefene hydrochloride. *AAPS PharmSciTech.* **2022**, *23*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

190. Oh, D.W.; Kang, J.H.; Kim, Y.J.; Na, S.B.; Kwan Kwon, T.; Kim, S.; Hwan Shin, D.; Jie, G.; Shin, M.S.; Sung Kang, K.; et al. Preparation of inhalable N-acetylcysteine-loaded magnetite chitosan microparticles for nitrate adsorption in particulate matter. *Int. J. Pharm.* **2023**, *630*, 122454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Zhang, Y.; Li, H.; Wang, Q.; Hao, X.; Li, H.; Sun, H.; Han, L.; Zhang, Z.; Zou, Q.; Sun, X. Rationally designed self-assembling nanoparticles to overcome mucus and epithelium transport barriers for oral vaccines against *Helicobacter Pylori*. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1802675. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.