

Universidad de La Habana
Facultad de Biología
Departamento de Bioquímica

**Encapsulación del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante
(EGFhr) en liposomas y estudio de la respuesta inmune
anti-EGFhr en ratones**

Defensa de tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Biológicas

Autora: Lic. María del Carmen Luzardo Lorenzo

Tutoras: Dra. María Eliana Lanio Ruíz
Dra. María Eugenia Alonso Biosca

Asesor: Dr. Edgardo Aníbal Disalvo

Ciudad de La Habana

2003

SÍNTESIS

La capacidad inmunopotenciadora de las vesículas liposomales ha sido demostrada para numerosos antígenos de diferentes fuentes. No obstante, no existe un consenso en cuanto a la formulación liposomal óptima puesto que su capacidad adyuvante está influida por las características estructurales de las vesículas tales como la composición lipídica y el tamaño, así como su combinación con otros adyuvantes o moléculas co-estimuladoras. Además, se conoce muy poco acerca de los mecanismos por los cuales transita la adyuvancia liposomal por lo que, el empleo de liposomas como adyuvantes de antígenos poco inmunogénicos pudiera resultar de interés en el esclarecimiento del efecto potenciador de estos sistemas. En esta dirección, se seleccionó el EGFhr como antígeno modelo por cuanto debe resultar un débil inmunógeno para el ratón dada su elevada homología estructural con el EGF murino. La respuesta inmune obtenida contra el EGFhr ha sido ampliamente caracterizada en modelos animales y en humanos, con el empleo de adyuvantes convencionales. En este trabajo se estudió la encapsulación y retención del EGFhr por las vesículas liposomales constituidas por fosfatidilcolina de diferente naturaleza y colesterol, obtenidas mediante los procedimientos de congelación- descongelaón y deshidratación-rehidratación. Estas vesículas se emplearon como adyuvantes del EGFhr, conjugado o no a la proteína transportadora P64k de *Neisseria meningitidis*, en ratones Balb/c y NMRI. Los principales resultados derivados de la caracterización de los liposomas que contenían EGFhr permitieron demostrar el mejor rendimiento de encapsulación y capacidad de retención de las vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol obtenidas mediante deshidratación-rehidratación. El estudio de la respuesta inmune anti-EGFhr con el empleo de estas vesículas evidenció un efecto potenciador superior en comparación al obtenido con el hidróxido de aluminio. Con el empleo del EGFhr encapsulado en liposomas de la composición antes mencionada se lograron altos títulos de anticuerpos anti-EGFhr, la promoción de las subclases IgG2a e IgG2b, la inducción de respuestas de hipersensibilidad retardada y linfoproliferación, así como un incremento en la supervivencia frente al tumor ascítico de Ehrlich de los ratones inmunizados, aun en ausencia de la proteína transportadora P64k. Los liposomas constituidos por los fosfolípidos saturados dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina indujeron respuestas de anticuerpos anti-EGFhr cualitativamente superiores a las obtenidas con los liposomas de fosfatidilcolina de soya (insaturada) y con el hidróxido de aluminio en cuanto a los niveles totales de IgG y de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b, así como la capacidad de estos anticuerpos anti-EGFhr para inhibir la interacción del EGF con su receptor.

GLOSARIO

AA: acrilamida
ACF: adyuvante completo de Freund
AIF: adyuvante incompleto de Freund
APC: células presentadoras de antígeno
BSA: albúmina de suero bovino
CF: carboxifluoresceína
Cho: colesterol
cpm : conteos por minuto
CTL: linfocitos T citolíticos
AH: variación de entalpia
DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina
dpm: desintegraciones radiactivas por minuto
DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
DRVs: vesículas multilaminares obtenidas por deshidratación-rehidratación
DSPC: diestearoilfosfatidilcolina
EGFhr: factor de crecimiento epidérmico humano recombinante
EGFm: factor de crecimiento epidérmico murino
ELISA: ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida
ePC: fosfatidilcolina de yema de huevo
FATMLVs: vesículas multilaminares obtenidas por congelación-descongelación
HR: hipersensibilidad retardada
HSDSC: calorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad
IFN- γ : interferón γ
Ig: inmunoglobulina
IL: interleuquina
ILS: incremento de la extensión de vida
i.m.: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
kDa: kilodaltons
Ksv: constante de Stern-Volmer
LUVETs: vesícula unilaminares grandes obtenidas por extrusión
LUVs: vesículas unilaminares grandes
MET: microscopía electrónica de transmisión

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

MLVs: vesículas multilaminares

PBS: tampón fosfato salino

PG: fosfatidilglicerol

PM: masa molecular

R-EGF: receptor del factor de crecimiento epidérmico

RMN: resonancia magnética nuclear

SA: estearilamina

SD: desviación estándar

SFT: suero fetal de ternera

sPC: fosfatidilcolina de soya

SUVs: vesículas unilaminares pequeñas

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

Te: temperatura de transición de fase de los lípidos

Tg: temperatura de transición de fase del estado vítreo del azúcar

Th: linfocitos T colaboradores

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TT: toxoide tetánico

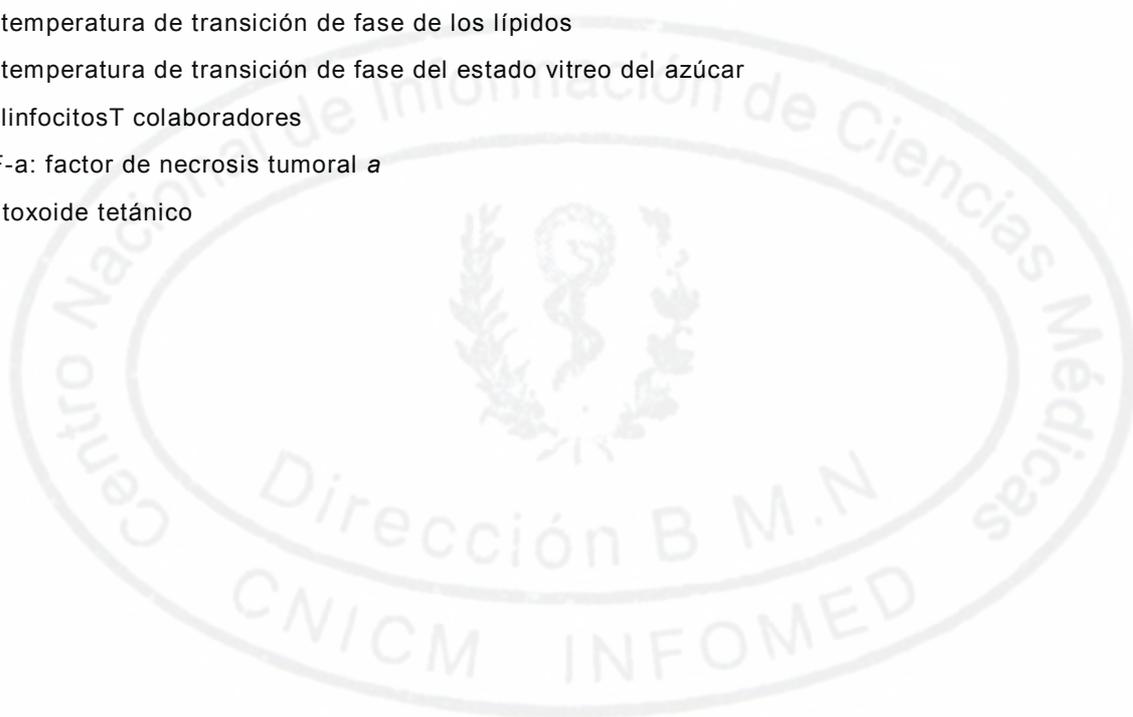


TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
I. Vesículas liposomales	7
1.1 Tecnologías para la obtención de liposomas.....	7
1.1.1 Caracterización de las vesículas liposomales	11
1.2 Estabilidad de las vesículas liposomales	14
1.2.1 Empleo de azúcares para la estabilización de los liposomas	17
1.3 Importancia de las vesículas liposomales para la industria biofarmacéutica.....	70
1.3.1 Propiedad adyuvante de los liposomas	23
1.4 Procesamiento de los antígenos para su presentación a los linfocitos T	76
1.4.1 Vía no clásica de presentación de antígenos	27
1.5 Sistema EGF/R-EGF: antecedentes de una vacuna terapéutica.....	31
II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
II.1 Obtención de los liposomas.....	35
II. 1.1 Procedimiento de deshidratación-rehidratación	35
II. 1.2 Procedimiento de congelación-descongelación.....	36
II.2 Purificación de los liposomas.....	36
II.3 Mareaje de EGFr y P64k con ¹²⁵ I.....	37
II.4 Conjugación del EGFr a la proteína P64k.....	37
II.5 Determinación de la eficiencia de encapsulación de EGFr, P64k, el conjugado EGFr-P64k y de las variantes co-encapsuladas (EGFr+P64k) en liposomas....	38
II.6 Determinación de la capacidad de retención del contenido de las preparaciones liposomales	39
II.7 Procedimientos para el estudio de la interacción del EGFr con las membranas liposomales	39
II.7.1 Evaluación de la liberación del EGFr encapsulado en vesículas liposomales en presencia de plasma	39
II.7.2 Atenuación de la fluorescencia intrínseca del EGFr y de la proteína P64k en solución y en presencia de SUVs por el atenuador hidrosoluble acrilamida.....	40
II.7.3 Análisis de la transición de fase de los liposomas mediante calorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad (HSDSC)	40
II.8 Determinación del tamaño de las partículas liposomales	41

II.9 Evaluación de la respuesta inmune anti-EGFhr con el empleo de liposomas como adyuvante	41
II.9.1 Determinación de la dosis de EGFhr encapsulado en liposomas para obtener anticuerpos	4&
II.9.2 Inmunización con EGFhr solo, conjugado o co-encapsulado con P64k en liposomas de DPPC:Cho	4&
II.9.3 Determinación de la influencia del esquema de inmunización en la respuesta inmune anti-EGFhr.....	43
II.9.4 Análisis de la respuesta inmune anti-EGFhr inducida con liposomas DRVs de distinta composición fosfolipídica	43
II.10 Estudio de la respuesta inmune mediada por células inducida con liposomas y con Al(OH) ₃	44
II. 10.1 Ensayo de hipersensibilidad retardada (HR)	44
II. 10.1.1 Histología del cojinete plantar de los ratones	45
II. 10.2 Ensayo de proliferación celular <i>in vitro</i> de linfocitos aislados de ratón.....	45
II.11 Ensayo de actividad antitumoral en animales inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH) ₃	4*
II.12 Ensayo de inhibición de la unión del EGF a su receptor por el suero de ratones inmunizados	46
II.13 Técnicas auxiliares	
II. 13.1 Determinación de la concentración de proteínas	47
II. 13.2 Determinación del título de anticuerpos por ELISA	48
II.13.3 Purificación de EGF murino (EGFm)	49
II.14 Análisis estadístico	50
 III. RESULTADOS	
III. 1 Caracterización de las vesículas liposomales con EGFhr encapsulado.....	51
III.1.1 Influencia de la composición lipídica en la eficiencia de encapsulación y en la capacidad de las preparaciones liposomales para retener el EGFhr atrapado. Tamaño de las vesículas.....	51
III.1.2 Influencia del tamaño de las vesículas liposomales en la eficiencia de encapsulación y su capacidad de retención del EGFhr	53
III. 1.3 Efecto de la proteína P64k de <i>N. meningitidis</i> sobre la eficiencia de encapsulación y la capacidad de retención del EGFhr de los liposomas.....	55
III.1.4 Estudio de la interacción del EGFhr con membranas liposomales	58

III 1.5 Efecto de los azúcares sobre el tamaño de las vesículas liposomales y la capacidad para retener el EGFhr encapsulado	61
III.2 Estudio de la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones con el empleo de liposomas como adyuvante	64
III.2.1 Efecto de la dosis de EGFhr empleada en la respuesta de anticuerpos (IgG).	6)
III.2.2 Respuesta de anticuerpos anti-EGFhr en ratones inmunizados con EGFhr conjugado o co-encapsulado con P64k en liposomas de DPPC:Cho.....	66
III.2.2.1 Evaluación de la especificidad de la respuesta anti-EGFhr.....	68
III.2.3 Influencia del esquema de inmunización en la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr.....	69
III.2.4 Respuesta inmune mediada por células en animales inmunizados con EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas de DPPC:Cho	71
III.2.5 Efecto sobre la actividad antitumoral de la inmunización con EGFhr encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH) ₃	73
III.2.6 Efecto de la composición fosfolipídica de los liposomas en la respuesta inmune anti-EGFhr	74
IV. DISCUSION	77
V. CONCLUSIONES.....	89
VI. RECOMENDACIONES.....	90
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

INTRODUCCIÓN

El empleo de los liposomas como vehículo de compuestos con propósitos biomédicos data de los años 70. Desde entonces, cientos de fármacos y biomoléculas que incluyen antitumorales, antimicrobianos, hormonas, inmunomoduladores, material genético y antígenos han sido incorporados en liposomas.

La capacidad de los liposomas para potenciar la respuesta inmune contra un antígeno encapsulado fue descubierta por Allison y Gregoriadis en 1974, y posteriormente ha sido confirmada para una amplia variedad de antígenos de bacterias, virus, protozoos, tumores y otras fuentes. Los liposomas satisfacen muchos de los requerimientos de un adyuvante: son biocompatibles, biodegradables, no son tóxicos, con su empleo se requieren sólo pequeñas cantidades del antígeno, reducen considerablemente la toxicidad de proteínas tóxicas y potencian tanto la inmunidad humoral como la mediada por células (Lasic, 1993; Toda y col., 1997; Kunisawa y col., 2001).

A pesar de que la capacidad adyuvante de los liposomas ha sido demostrada para una amplia variedad de antígenos (Alving y col., 1995; Gregoriadis y col., 1996) no existe un consenso en cuanto a la formulación liposomal con "adyuvancia óptima", debido a que ella está influida por las características estructurales de la vesícula (composición lipídica, tamaño, presencia o no de carga superficial), el empleo de adyuvantes adicionales o moléculas co-estimuladoras e incluso por el esquema de inmunización empleado (Gregoriadis y col., 1996). Como resultado, se ha sugerido la necesidad del estudio del potencial de los liposomas como adyuvante inmunológico para cada antígeno en particular.

De las diversas metodologías desarrolladas para la encapsulación de solutos en liposomas, el procedimiento de deshidratación-rehidratación descrito por Kirby y Gregoriadis (1984) ha sido el más recomendado para la encapsulación de moléculas lábiles como las proteínas y el ADN. Las vesículas liposomales obtenidas mediante esta metodología, conocidas como DRVs, encapsulan entre 20 y 90% del soluto y muestran elevada capacidad de retención de su contenido acuoso en comparación con otras formulaciones liposomales (Gregoriadis y col., 1996; Zadi y Gregoriadis, 2000).

La eficiencia de los liposomas en la potenciación de la respuesta inmune varía con su composición lipídica. Gregoriadis y col. (1992) encontraron que los liposomas constituidos

por diestearoilfosfatidilcolina (fosfolípido saturado) resultaban más eficientes en la inducción de respuesta inmune contra antígenos provenientes de la membrana del virus de la influenza, mientras que para antígenos solubles de este mismo virus, las vesículas constituidas por fosfatidilcolina de yema de huevo (insaturada) resultaban más convenientes.

El factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr) es un polipéptido que presenta una elevada homología estructural (70%) con la molécula homóloga murina, por lo que debe resultar un débil inmunógeno para el ratón. González y col. (1996; 1997; 1998; 2003) detectaron anticuerpos anti-EGFhr en diferentes modelos animales y en humanos mediante la inmunización con el EGFhr conjugado con toxoide tetánico o con P64k de *Neisseria meningitidis*. Los resultados obtenidos por estos investigadores permitieron, por una parte, disponer de una amplia caracterización de la respuesta inmune contra este antígeno y por otra, el diseño de una vacuna terapéutica para el tratamiento de tumores que dependen del sistema EGF/R-EGF. Esta formulación contiene EGFhr conjugado a P64k y montanide ISA 51 o Al(OH)₃ como adyuvante (Lage y col., 1997).

Las vesículas liposomales pudieran constituir una variante muy favorable para la presentación al sistema inmune de antígenos poco inmunogénicos o "propios". Utilizar un antígeno con estas características y que además haya sido estudiada la respuesta inmune inducida por él bajo diversas condiciones experimentales posibilitaría profundizar en la capacidad adyuvante de las vesículas liposomales. En esta dirección, el EGFhr resulta un antígeno modelo atractivo para estudiar las propiedades inmunoestimuladoras de los liposomas, lo cual no había sido investigado antes.

Estos antecedentes nos permitieron formular la siguiente hipótesis de trabajo:

Es posible encapsular EGFhr en liposomas con buena eficiencia de encapsulación y retención, así como modular la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones, todo lo cual dependerá de la naturaleza de la fosfatidilcolina empleada en la preparación de las vesículas liposomales y de si el EGFhr se encuentra conjugado o no a la proteína transportadora P64k.

Para comprobar la validez de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar la eficiencia de encapsulación y la retención del EGFhr conjugado o no a la proteína transportadora P64k, en liposomas constituidos por fosfatidilcolina de diferente naturaleza y obtenidos por diferentes procedimientos.
2. Estudiar la respuesta inmune anti-EGFhr inducida en ratones inmunizados con liposomas que contienen EGFhr conjugado o no a la proteína transportadora P64k y formados por fosfatidilcolina de diferente naturaleza y comparar esta respuesta con la obtenida con $Al(OH)_3$.

Para cumplimentar estos objetivos se trazaron las siguientes tareas:

1. Comparación de las tecnologías de deshidratación-rehidratación, congelación- descongelación y extrusión, así como la naturaleza de la fosfatidilcolina empleada en la obtención de las vesículas en cuanto a la eficiencia de encapsulación y retención del EGFhr por los liposomas.
2. Análisis del efecto de la proteína transportadora P64k sobre la eficiencia de encapsulación y la capacidad de retención del EGFhr, de liposomas obtenidos mediante las tecnologías de deshidratación-rehidratación (DRVs) y congelación- descongelación (FATMLVs).
3. Estudio de la interacción del EGFhr con las membranas liposomales mediante espectroscopia de fluorescencia y microcalorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad.
4. Evaluación del efecto de los azúcares sacarosa, trealosa, maltosa y glucosa sobre la capacidad de las vesículas liposomales para encapsular y retener el EGFhr.
5. Estudio de la respuesta de anticuerpos inducida en ratones Balb/c y NMRI inmunizados con EGFhr conjugado o no a la proteína transportadora P64k y encapsulado en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol o adsorbido en $Al(OH)_3$.
6. Estudio de la respuesta inmune mediada por células, inducida en ratones inmunizados con EGFhr conjugado o no a la proteína transportadora P64k y encapsulado en liposomas DRVs de dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol o adsorbido en $Al(OH)_3$, a través de los ensayos de hipersensibilidad retardada y linfoproliferación.
7. Evaluación de la supervivencia de ratones Balb/c inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas DRVs de dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol o adsorbido en $Al(OH)_3$ y retados posteriormente con células de tumor ascítico de Ehrlich.

8. Estudio de la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones inmunizados con EGFhr conjugado a la proteína transportadora P64k en liposomas DRV de diferentes composiciones fosfolípicas o adsorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Diversos aspectos destacan la **novedad científica** de los resultados de esta tesis:

1. Se demuestra que las vesículas DRV constituidas por dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol muestran la mayor eficiencia de encapsulación y capacidad para retener el EGFhr durante su conservación.
2. Se demuestra, por primera vez, la interacción del EGFhr con los fosfolípidos que componen las vesículas liposomales, lo cual induce probablemente una perturbación de la bicapa lipídica y una mayor liberación del EGFhr contenido en las vesículas.
3. Se evidencia, por primera vez, que es posible inducir respuesta inmune en ratones inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas, aun en ausencia de la proteína transportadora P64k. Esta respuesta es comparable a la obtenida con el conjugado EGFhr-P64k en $\text{Al}(\text{OH})_3$.
4. Por primera vez se demuestra que los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas inducen una respuesta humoral contra un antígeno soluble como el EGFhr más eficiente que las vesículas de fosfatidilcolina insaturada o el $\text{Al}(\text{OH})_3$.

La **importancia teórica** de esta tesis está en sus aportes al conocimiento de la influencia de factores como: la composición fosfolípica, el tamaño de las vesículas, la adición de otros solutos y la tecnología desarrollada en la preparación de los liposomas, sobre el rendimiento o eficiencia de encapsulación del EGFhr en estos sistemas, así como en la capacidad de las vesículas liposomales para retener el EGFhr encapsulado. Además, se hacen consideraciones acerca de la influencia de la naturaleza saturada o no de los fosfolípidos liposomales en la modulación de la respuesta inmune al EGFhr, inducida en ratones inmunizados con vesículas que contienen este antígeno.

La **importancia práctica** de lo recogido en esta tesis se sustenta en la medida que valida las potencialidades de los liposomas como adyuvante para un antígeno poco inmunogénico como el EGFhr. Se demuestra el efecto adyuvante de liposomas de fosfatidilcolinas saturadas y colesterol preparados mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación al encapsular una proteína de baja inmunogenicidad, obtenida por vía recombinante, sin la necesidad de su conjugación a un transportador proteico.

La tesis cuenta con 90 páginas distribuidas en: introducción, revisión bibliográfica, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones. El trabajo contiene, además: una síntesis, un glosario de términos, una tabla de contenidos, las referencias bibliográficas consultadas, 6 tablas y 27 figuras.

Los resultados que reúne la presente investigación se han presentado en 14 eventos científicos nacionales e internacionales. Una parte de estos resultados se han publicado en revistas nacionales e internacionales (dos artículos en **Biología Aplicada**, uno en **Biología** y otro en **Biophysical Journal**). Además, se solicitó una patente (No 2000- 0102) ante la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial y se envió una publicación a la revista **Journal of Liposome Research**.

Estos resultados han sido reconocidos como logros científicos de la Facultad de Biología en los Balances Anuales de Investigación desde 1998-2001. Además, fueron premiados en el Forum Provincial de Ciencia y Técnica (comisión 9) (2001) y por las Brigadas Técnicas Juveniles a nivel nacional (2002). Esta tesis se pre-defendió ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología.



I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Vesículas liposomales.

En 1965, Bangham y col. descubrieron que los fosfolípidos en agua formaban vesículas cerradas. Estas vesículas denominadas "liposomas" se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos y otras moléculas anfifílicas se dispersan en un exceso de agua constituyendo bicapas, donde las cabezas polares se exponen hacia el exterior y las partes apolares hacia el interior, evitando así el contacto con el agua. Los liposomas, atendiendo a su morfología y tamaño, que puede variar entre décimas de nanómetros y décimas de micras en diámetro, se clasifican convencionalmente en tres grupos: i) vesículas unilaminares pequeñas (SUVs: <100 nm) y ii) vesículas unilaminares grandes (LUVs: 100-500 nm), las cuales poseen sólo una bicapa fosfolipídica mientras que iii) las vesículas multilaminares (MLVs: 0,1-10 μm) están compuestas por varias bicapas concéntricas alternando con compartimentos acuosos. Una amplia variedad de fosfolípidos (naturales o artificiales, saturados o insaturados, cargados o neutros) se pueden utilizar con el propósito de encapsular sustancias en los compartimentos acuosos y en la bicapa. Estas vesículas no sólo han resultado modelos útiles para el estudio de las propiedades físico-químicas y la biología de las membranas celulares, sino también han constituido vehículos promisorios para diferentes compuestos con propósitos biomédicos. Esto último ha permitido el desarrollo de un número importante de procedimientos para la obtención de los liposomas (Gregoriadis, 1992; Hoebeke, 1995; Lasic, 1998; Ulrich, 2002).

1.1 Tecnologías para la obtención de liposomas.

En este epígrafe, por su extensión, no se pretende agotar el tema relacionado con las tecnologías para la obtención de las vesículas liposomales, sino considerar, de forma organizada, algunos procedimientos y los tipos de vesículas que se originan a partir de ellos. Todos los métodos de obtención de liposomas involucran las etapas básicas siguientes: i) secado de los lípidos a partir de la fase orgánica, ii) dispersión de los mismos en un medio acuoso, iii) purificación de los liposomas resultantes y iv) análisis del producto final. El propósito de cualquiera de los métodos es la obtención de vesículas de forma simple y reproducible con tamaño y estructura adecuados, alta eficiencia de atrapamiento del material a encapsular y gran estabilidad física y química (New, 1994).

Procedimientos para la preparación de vesículas multilaminares:

El procedimiento clásico para la obtención de MLVs es la **dispersión simple** descrita por Bangham y col. (1965). A partir de este método sencillo se obtienen vesículas heterogéneas en tamaño, con un volumen interno acuoso reducido y bajo rendimiento de encapsulación, de manera que se han desarrollado alternativas tecnológicas con el propósito de optimizar estos parámetros. La técnica de **congelación-descongelación** descrita por Mayer y col. (1985), rinde vesículas conocidas como FATMLVs con un volumen interno y una eficiencia de encapsulación del soluto superior, y una heterogeneidad de tamaño de las vesículas menor a los obtenidos por dispersión simple (Sainz y Chantres, 1988a).

Kirby y Gregoriadis (1984) desarrollaron un procedimiento basado en la deshidratación de una suspensión acuosa de SUVs en presencia del soluto a encapsular en forma libre, seguido de una rehidratación controlada en cuanto a la fuerza iónica y temperatura del medio. Con esta metodología se obtienen liposomas conocidos como DRV (vesículas multilaminares obtenidas por deshidratación-rehidratación) que se caracterizan por una elevada relación material encapsulado:lípido y gran capacidad de retención de su contenido acuoso. La morfología de estas vesículas, caracterizada por un gran volumen en su compartimento más interno con espacios interlaminares más reducidos, explica, en cierta medida, las propiedades antes mencionadas. Otras ventajas de este procedimiento tecnológico son: su relativa simplicidad, reproducibilidad, facilidad de escalar, no se requieren equipos especializados y, como se realiza en pocas etapas, no es difícil mantener la esterilidad si se trabaja con técnicas asépticas (Kirby y Gregoriadis, 1984; Gregoriadis, 1994a; Ulrich, 2002).

Técnicas para la preparación de vesículas unilaminares:

Estas técnicas pueden clasificarse en tres grupos básicos (Sainz y Chantres, 1988a): a) Aquellas que originan vesículas unilaminares a partir de una suspensión de MLVs. Los procedimientos más empleados para lograr la transformación de los MLVs en vesículas unilaminares son: la **sonicación**, la **prensa de French** y la **extrusión secuencial**.

La **prensa de French** utilizada para la obtención de SUVs ofrece ventajas con respecto al ultrasonido debido a que rinde partículas más estables, sus membranas presentan menos defectos estructurales y liberan menos su contenido (Ulrich, 2002). Los SUVs obtenidos por ambos procedimientos exhiben un volumen interno pequeño lo que resulta en una reducida capacidad de encapsulación de solutos (Sainz y Chantres, 1988a).

La **extrusión secuencial** propuesta por Olson y col. (1979), consiste en la filtración de MLVs a baja presión a través de membranas de policarbonato con tamaño de poro definido (generalmente 0,1 ó 0,2 μ m de diámetro) y permite obtener vesículas unilaminares grandes identificadas por las siglas LUVETs. Entre las ventajas de esta técnica se citan la ausencia de contaminantes (ej. solventes, detergentes), elevado rendimiento del proceso, rapidez y distribución homogénea del tamaño de las partículas (Schneider y col., 1995; Jin y col., 1999).

b) Procedimientos que parten de un sistema bifásico agua-solvente orgánico. Dentro de este grupo se pueden citar dos métodos: **inyección e inversión de fase**, los cuales dan lugar a la formación de LUVs. El método de **inyección** se basa en la formación espontánea de LUVs como resultado de la inyección de una solución orgánica del lípido en un medio acuoso tamponado; su limitación fundamental está en la solubilidad de los compuestos lipídicos en las fases orgánicas empleadas en este procedimiento (generalmente éter etílico o etanol) (Ulrich, 2002). Esta tecnología fue escalada eficientemente para la producción de liposomas que encapsulan la droga antimicótica econazol para uso tópico (Naeff, 1996).

El procedimiento de **inversión de fase**, ampliamente aceptado para la preparación de LUVs, consta de dos etapas: primero, la formación de una emulsión fase orgánica-fase acuosa, seguido de la eliminación gradual del solvente orgánico. En la medida que se reduce la proporción de la fase orgánica se transita a la formación de un gel estable que colapsa produciéndose la inversión final de las fases. Las ventajas de este método son su alta eficiencia de encapsulación y partir de una emulsión para obtener la dispersión liposomal, propiedades muy atractivas para su escalado (New, 1994; Ulrich, 2002).

c) Método que parte de micelas mixtas lípido-detergente: Esta técnica se fundamenta en la solubilización del lípido por formación de micelas con un detergente (colato, desoxicolato y octilglucósido son los más empleados) y su eliminación controlada mediante filtración en gel o diálisis, en dependencia de si la concentración micelar crítica del detergente es baja o alta, respectivamente. El detergente también se puede eliminar mediante su absorción a bioperlas o resinas (New, 1994; Ollivon y col., 2000). Este procedimiento se ha empleado frecuentemente para la reconstitución de proteínas integrales en estos sistemas modelos de membranas con la formación de los llamados "proteoliposomas" (Ulrich, 2002).

Tecnologías para la obtención de liposomas gigantes:

Los liposomas gigantes son vesículas de varias micras de diámetro que han sido recomendados para la obtención de vacunas. En ellos se pueden incluir virus y bacterias, atenuadas o muertas; antígenos particulados y solubles; citoquinas u otros activadores (Gregoriadis, 1994a). Entre los procedimientos de obtención de vesículas gigantes se incluyen:

a) El método de doble emulsión agua-aceite-agua, propuesto por Kim y Martin (1981). La primera emulsión agua-aceite se forma al adicionar, gradualmente y con agitación mecánica, una solución acuosa que contiene el soluto a encapsular a una solución clorofórmica de los lípidos (relación volumétrica final de ambas fases 1 : 1). Una segunda emulsión aceite-agua se obtiene al mezclar una parte de una solución de los lípidos en éter etílico, de igual composición, con cinco partes de la fase acuosa sin soluto. La "doble emulsión" se logra mediante la mezcla de estas emulsiones en una proporción 3:1 (volumen: volumen) aceite-agua: agua-aceite. La eliminación de las fases orgánicas bajo corriente de nitrógeno y agitación origina finalmente los liposomas "gigantes" (New, 1994).

b) La congelación-descongelación de SUVs y de proteoliposomas obtenidos mediante sonicación. En este procedimiento, a diferencia del empleado en la obtención de FATMLVs, la solución tampón en que se dispersan los lípidos contiene sales (ej. KCl) y las vesículas que se someten a sucesivos ciclos de congelación-descongelación son, inicialmente, unilaminares. Estas condiciones permiten la agregación vesicular, evento esencial para que se produzcan procesos de fusión interbicapas, favoreciendo así la formación de vesículas gigantes. Para obtener FATMLVs los lípidos se dispersan en ausencia de fuerza iónica y las vesículas que se congelan y descongelan son multilaminares (New, 1994). Esta metodología se ha utilizado para preparar liposomas con grandes capacidades de atrapamiento (Higashi y col., 1987).

c) La congelación-deshidratación de vesículas gigantes vacías pre-formadas, en presencia del material que se desea encapsular (ej. esporas muertas o atenuadas de *Bacillus subtilis*, bacilo Calmette-Guérin muerto, toxoide tetánico) y su rehidratación de manera controlada a una fuerza iónica y temperatura adecuadas, similar al procedimiento descrito para obtener DRVVs. Con esta metodología, además de inmovilizar biomoléculas lábiles, se obtienen vacunas mixtas preservando la viabilidad de los microorganismos encapsulados

y se posibilita la entrada simultánea de todo el material a las células presentadoras de antígeno (APC) (Gregoriadis, 1994a).

Además de los métodos descritos con anterioridad existen otros que permiten la encapsulación de sustancias hidrosolubles en liposomas pre-formados. La técnica de encapsulación a través de un gradiente de pH es una de ellas, y se utiliza para solutos pequeños cuya hidrofobicidad varía con el pH. El pH exterior al liposoma favorece la entrada por difusión del soluto no cargado hacia el interior de la vesícula, donde el pH existente provoca su transformación a una forma cargada, incapaz de atravesar la membrana. Este procedimiento es muy usado para encapsular agentes antitumorales con altas eficiencias de atrapamiento (Winden y col., 1998; Barenholz, 2000).

1.1.1 Caracterización de las vesículas liposomales.

El comportamiento de los liposomas en los sistemas biológicos y no biológicos está determinado por factores como: su composición química, tamaño, número de bicapas, permeabilidad de la membrana, cantidad de soluto encapsulado así como la calidad y pureza de los reactivos empleados en su preparación (Perkins y col., 1993). En este epígrafe se abordarán algunas metodologías empleadas en el estudio físico-químico de las vesículas liposomales.

El tamaño de los liposomas se puede determinar por diferentes métodos: i) técnicas basadas en la dispersión de la luz, ii) microscopía electrónica, iii) cromatografía de exclusión molecular (De la Maza y col., 1997; Goñi y Alonso, 2000).

Las técnicas que monitorean la **dispersión de la luz** provocada por una suspensión de liposomas, como la espectroscopia de correlación fotónica, han sido las más ampliamente utilizadas por ser simples y rápidas. Mediante este procedimiento se puede determinar el tamaño promedio de las vesículas y un parámetro referido a la polidispersidad de la población (Goñi y Alonso, 2000). Por el contrario, la microscopía electrónica de transmisión (MET) permite observar cada liposoma de forma individual y por tanto, se puede obtener información exacta de la población de vesículas en todo el rango de tamaños; su desventaja radica en que se requiere de mucho tiempo para un análisis completo. Para visualizar los liposomas por MET, las muestras se someten a diferentes procesos (ej. congelación-fractura, tinción negativa) (Ulrich, 2002). Brandl y col. (1997) utilizaron la MET con congelación-fractura para evaluar los cambios morfológicos de dispersiones acuosas que contenían entre 35-60% de fosfatidilcolina de soya (sPC) y que

fueron homogeneizadas en una prensa de French. Este procedimiento le permitió a estos autores demostrar la presencia de estructuras vesiculares aun a concentraciones muy elevadas de sPC (350-600 mM). De igual forma, observaron la presencia de SUVs por debajo de 450 mM mientras que, entre 450-600 mM, la suspensión resultó heterogénea por la aparición de MLVs (Brandl y col., 1997).

La **cromatografía de exclusión molecular** sólo se puede recomendar en aquellos casos en que se requiere una idea aproximada del rango de tamaño (Lesieur y col., 1993; New, 1994). Cuando se desea comparar poblaciones de liposomas de composición y concentración idénticas, y sólo se requieren valores relativos, es posible medir también la absorbancia aparente producto de la turbidez de la dispersión. Este último método es de gran utilidad para comprobar si los liposomas han reducido su tamaño durante los procesos de sonicación y extrusión (Goñi y Alonso, 2000).

También es posible caracterizar los liposomas respecto al número de bicapas mediante resonancia magnética nuclear (RMN-³¹P) se puede cuantificar la cantidad de lípidos que forman la monocapa externa de las vesículas, y con este dato estimar el número de bicapas promedio con la siguiente expresión (Perkins y col., 1993):

$$\text{Número de bicapas promedio} = 1/(2 \times \text{lípidos monocapa externa})$$

La **MET con tinción negativa** es una técnica menos cuantitativa pero permite estimar el número de bicapas a medida que la tinción penetra en los espacios interbicapas (Ulrich, 2002). El número de bicapas afecta la eficiencia de atrapamiento y la liberación del compuesto encapsulado. Perkins y col. (1993) determinaron que el número de bicapas por vesícula de suspensiones de MLVs, obtenidas a partir de películas lipídicas delgadas, era menor que las derivadas de películas más gruesas y, consecuentemente, la eficiencia de atrapamiento por lípido se incrementaba.

La eficiencia de encapsulación de las vesículas liposomales, expresada como porcentaje de soluto encapsulado, se determina empleando preferentemente moléculas hidrosolubles, que no se asocien con la membrana de modo que no la desestabilicen o formen agregados con ella, y que puedan separarse fácilmente de los liposomas. Estos compuestos se pueden detectar por espectroscopia de absorción (ej. citocromo C, cromato de sodio), espectroscopia de emisión de fluorescencia (ej. carboxifluoresceína - CF-, calceína), métodos enzimáticos (ej. superóxido dismutasa, peroxidasa de rábano) y

radiactividad (ej. ácido desoxirribonucleico -ADN-³H-, glucosa-¹⁴C, proteínas-¹²⁵I). Una vez que el liposoma se forma, la distribución del soluto se determina por la comparación de la relación soluto/lípido antes y después de eliminar el marcador no encapsulado mediante centrifugación, filtración en gel o por diálisis (Perkins y col., 1993; New, 1994).

El volumen atrapado en una población de liposomas (expresado como $\mu\text{L mg}^{-1}$ de fosfolípido) se puede estimar por diferentes procedimientos. La metodología más común consiste en incorporar un marcador acuoso impermeable (ej. glicina-¹⁴C, glucosa-¹⁴C) en el tampón de hidratación de los lípidos y, una vez que los liposomas se han formado, se determina la distribución de ese soluto comparando la relación soluto/lípido antes y después de eliminar el marcador no encapsulado (Perkins y col., 1993). En este método se asume que la concentración del soluto atrapado en las vesículas es igual a la del medio externo y no varía una vez que se ha separado el material no encapsulado, esto no siempre resulta válido pues en ocasiones el agua puede entrar o salir de los liposomas debido a diferencias osmóticas entre los medios externo e interno (New, 1994). La forma más precisa de determinar el volumen interno es midiendo directamente la cantidad de agua atrapada en las vesículas y para ello, los liposomas se centrifugan a una elevada fuerza centrífuga y el precipitado obtenido se resuspende en óxido de deuterio el cual permea las membranas liposomales y se puede determinar la señal de agua por RMN (New, 1994). El volumen de agua que encierran los liposomas depende de las técnicas de dispersión y del tipo de lípido empleado para ello (de Gier, 1993). La razón de volumen interno del liposoma comparado con el volumen acuoso total de la preparación define también la eficiencia o rendimiento de encapsulación (Perkins y col., 1993).

La **calorimetría diferencial de barrido** es un método termodinámico muy potente y relativamente rápido que permite el estudio de las transiciones de fase termotrópicas de los lípidos de las membranas: de un estado relativamente ordenado semejante a un cristal existente a bajas temperaturas (gel), a uno relativamente desordenado semejante a un fluido (líquido-cristalino), a temperaturas mayores. En los termogramas obtenidos, el área bajo la curva constituye la entalpia del proceso (AH) y es representativa de la cooperatividad (Hirsch-Lerner y Barenholz, 1999). Ambos parámetros de la transición de fase (Te: temperatura de transición de fase de los lípidos y AH) son sensibles a la interacción de moléculas (ej. péptidos, drogas) con la bicapa lipídica (Fahr y Seelig, 2001).

La **espectroscopia de fluorescencia** es una técnica muy sensible que permite estudiar las membranas liposomales con el uso de moléculas fluorescentes sin perturbar de manera notable las propiedades de las bicapas lipídicas (García-Segura y col., 1996). Con esta metodología se puede obtener información complementaria acerca de la dinámica de las membranas como por ej: transiciones y separación lateral de fases, la fusión de membranas, potenciales electrostáticos superficiales, etc (Ulrich y col., 1998). Para ello se han utilizado una gran variedad de fluoróforos intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son aquellos que se presentan de manera natural y entre ellos se incluyen: los aminoácidos aromáticos, el NADH, las flavinas y los derivados del piridoxal. Los fluoróforos extrínsecos se adicionan a las muestras para estudiar sus propiedades y entre ellos se incluyen: las sondas pireno, dansilo, fluoresceínas, la rodamina, el laurdan, etc (Eftink, 1991; Lakowicz, 1999). Con la espectroscopia de fluorescencia se puede evaluar también la interacción de péptidos y proteínas con las bicapas lipídicas mediante: i) la variación que experimenta la fluorescencia intrínseca de los residuos aromáticos y ii) la modificación que sufre la fluorescencia de una proteína o péptido en presencia de un atenuador soluble (García-Segura y col., 1996; Lakowicz, 1999). Los residuos triptofanilos se utilizan, fundamentalmente, para estudiar la fluorescencia intrínseca de las proteínas porque sus grupos indol constituyen la principal fuente de absorción y emisión de luz ultravioleta. La emisión de los triptófanos es muy sensible al microentorno donde se ubican, por lo que se utiliza para evaluar cambios conformacionales en las proteínas. Además, el máximo de emisión de las proteínas refleja el nivel promedio de exposición de sus triptófanos al medio acuoso. Por otra parte, los ensayos de atenuación de la fluorescencia de las proteínas mediante atenuadores o apagadores son utilizados para revelar la localización o nivel de exposición de los fluoróforos en estas estructuras. La fluorescencia de los residuos triptofanilos puede ser atenuada por compuestos solubles como la acrilamida (AA), iones yoduro, grupos disulfuro y grupos deficientes de electrones como NH_3^+ , COOH y residuos de histidina protonados cercanos (Lakowicz, 1999).

1.2 Estabilidad de las vesículas liposomales.

Los liposomas han transitado de la investigación básica a la práctica clínica. Sin embargo, su uso como vehículo de drogas *in vivo* se ha visto limitado por su baja estabilidad en el medio biológico (Lasic y Papahadjopoulos, 1995). La estabilidad ha sido definida como el período durante el cual el transportador retiene el soluto encapsulado *in vitro* e *in vivo* (Kirby y col., 1980).

Los liposomas son sistemas heterogéneos con problemas de estabilidad física y química.

Estabilidad física:

La estabilidad física comprende dos parámetros: i) cambios en el tamaño promedio de las vesículas debido a los fenómenos de agregación y fusión y, ii) pérdida del soluto encapsulado (Frokjaer y col., 1993; Grit y Crommelin, 1993). La fusión y pérdida del contenido de las vesículas ocurre, entre otros factores, por defectos en el empaquetamiento de las membranas durante su preparación. Estas irregularidades pueden reducirse si se incuban los liposomas a temperaturas superiores a la T_e para que las caras opuestas de la bicapa se equilibren mediante los movimientos flip-flop de los lípidos (New, 1994). La pérdida del soluto encapsulado depende de la composición de los liposomas, su tamaño y el estado físico de las bicapas lipídicas (gel o líquido-cristalino). En general, la salida del soluto de los liposomas es menor en el estado gel que en el líquido-cristalino; sin embargo, el almacenamiento de las vesículas a temperaturas alrededor de la T_e potencia la permeabilidad de las bicapas en estado gel (Grit y Crommelin, 1993). La incorporación de una fracción de colesterol (Cho) a los liposomas disminuye la permeabilidad de sus membranas al reducir las interacciones de estas vesículas con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las opsoninas del suero e inhibir la captura de estas partículas por células fagocíticas *in vivo* (Hernández-Caselles y col., 1993; Ulrich, 2002).

La agregación de los liposomas se produce por interacciones de van der Waals y tiende a ser más pronunciada en las vesículas de mayor tamaño ya que áreas más extensas de las membranas pueden hacer contacto entre sí (New, 1994). Los liposomas que carecen de carga eléctrica neta tienden a experimentar más agregación que las vesículas cargadas; así, este fenómeno se puede evitar o disminuir incorporando pequeñas cantidades de lípidos cargados en la formulación liposomal, por ejemplo, usando 10 mol% de ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol (PG) o estearilamina (SA). Algunos factores como los residuos de solventes y los cationes polivalentes potencian la agregación, por lo que se debe tener esto en cuenta al seleccionar el medio de hidratación de los lípidos (Grit y Crommelin, 1993; New, 1994).

Estabilidad química:

La estabilidad química de los liposomas se ve afectada por procesos de oxidación y de hidrólisis de los lípidos. La oxidación se produce principalmente en las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos por el mecanismo de formación de radicales libres. La

exposición a la luz, el oxígeno y la presencia de metales de transición provocan la formación de hidroperóxidos. Los lípidos que contienen cadenas acilo poliinsaturadas son los más sensibles a la formación de radicales, pero las cadenas saturadas también se oxidan a elevadas temperaturas (New, 1994). La degradación oxidativa se puede evitar con el uso de materiales de alta calidad, preparando los liposomas en atmósfera libre de oxígeno, usando fosfolípidos saturados como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y almacenando las preparaciones a bajas temperaturas (Grit y Crommelin, 1993; Ulrich, 2002).

Una segunda vía de degradación de los fosfolípidos presentes en los liposomas es la hidrólisis. Estudios con rayos X han demostrado que el agua y, consecuentemente, los protones e iones hidroxilo tienen acceso a los 4 enlaces éster de las moléculas de fosfolípidos; los ésteres carboxílicos de las posiciones *sn-1* y *sn-2* son hidrolizados más rápidamente que el éster fosfato (Grit y Crommelin, 1993). En estudios de estabilidad química de las suspensiones liposomales el principal producto de esta hidrólisis es la 1- acil lisofosfatidilcolina, y es por eso que la formación de lisofosfolípidos es un indicador de la extensión de la hidrólisis. Los lisofosfolípidos, constituidos por ácidos grasos de cadena larga, se organizan en micelas cuando se dispersan en agua a una concentración superior a su concentración micelar crítica (Disalvo y col., 1996; Ulrich, 2002) por lo que al aumentar la proporción de estas moléculas en la bicapa contribuyen notablemente a la desestabilización de esta estructura. Este proceso se acompaña de cambios morfológicos que afectan la permeabilidad de la bicapa así como una mayor tendencia de las vesículas a la fusión (Senisterra y col., 1991). El segundo producto de la hidrólisis primaria de los fosfolípidos lo constituyen los ácidos grasos; la incorporación de ácidos grasos libres a las bicapas liposomales tiene un efecto similar al descrito para los lisofosfolípidos (Grit y Crommelin, 1993; Ulrich, 2002).

En las dispersiones acuosas la temperatura y el pH de almacenamiento son los principales parámetros que afectan la hidrólisis de los fosfolípidos. Es por eso que se recomienda, para lograr la estabilidad durante largos períodos, el almacenamiento entre 4-6°C y ajustar el pH a 6,5. Se ha observado que a este valor de pH experimentan una hidrólisis mínima la DSPC, la sPC natural y la saturada así como la fosfatidilcolina de yema de huevo (ePC) parcialmente hidrogenada (Grit y Crommelin, 1993).

En contraste a la degradación oxidativa, la hidrólisis de los fosfolípidos puede evitarse eliminando el agua mediante procesos de congelación-secado. Sin embargo, la

deshidratación y posterior rehidratación de los liposomas causa numerosos daños físicos y químicos que resultan en cambios morfológicos y en la liberación del contenido liposomal, haciéndolos no aptos para su uso (Grit y Crommelin, 1993).

Para evaluar la estabilidad de las preparaciones liposomales se analizan los siguientes parámetros: i) degradación de los fosfolípidos mediante cromatografía en placa delgada, ii) determinación del tamaño de las vesículas y iii) liberación del material encapsulado (Frokjaer y col., 1993). Numerosos trabajos en la literatura evalúan la pérdida del material encapsulado en las preparaciones liposomales por la incubación de éstos con suero o plasma sanguíneo, humano o de animales, y con el registro de la liberación de un fluoróforo soluble en agua previamente encapsulado (Kirby y col., 1980; Hernández-Caselles y col., 1993; Mercadal y col., 1995). Este ensayo representa una primera aproximación del comportamiento de los liposomas en los fluidos biológicos (Mercadal y col., 1995). Con esta metodología Hernández-Caselles y col. (1993) encontraron que la composición lipídica y las propiedades electrostáticas de los liposomas tenían influencia en su estabilidad. Las vesículas neutras y las cargadas positivamente resultaron las más estables ya que liberaron menor cantidad de CF y esto se correlacionó con la asociación de menores cantidades de proteínas específicas del plasma. Utilizando esta misma metodología, Mercadal y col. (1995) encontraron que al incorporar entre 10-22 mol% de N-palmitoilfosfatidiletanolamina en liposomas de ePC:Cho disminuía la salida de CF provocada por el suero humano. La inserción de N-palmitoilfosfatidiletanolamina incrementa la rigidez de la bicapa, disminuyendo así su permeabilidad y además, modifica la superficie de las vesículas lo que pudiera alterar su interacción con los componentes del suero (Mercadal y col., 1995). En resumen, la composición lipídica y la carga liposomal son parámetros de gran importancia en la estabilidad de los liposomas y por tanto deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar preparados liposomales con fines biomédicos.

1.2.1 Empleo de azúcares para la estabilización de los liposomas.

Una de las vías más efectivas para conservar las preparaciones liposomales durante largos períodos de tiempo es la liofilización o secado (Crowe y Crowe, 1991; Ozaki y Hayashi, 1997). Este procedimiento constituye un método alternativo para evitar la inestabilidad al llevar los liposomas a una forma anhidra, donde la degradación química de los lípidos o de los solutos encapsulados es menos probable. Los métodos de criopreservación que utilizan altas concentraciones de soluciones de azúcares, análogos a los empleados para almacenar líneas celulares, han resultado también exitosos para la conservación de las vesículas liposomales (New, 1994).

Crowe y col., en la década del 70, iniciaron los estudios de la interacción entre carbohidratos y membranas, tanto naturales como de fosfolípidos puros. Estos autores observaron en diferentes organismos, tales como: *Selaginella lepidophylla* (planta de América del Sur), el nemátodo *Aphelenchus avenae*, embriones de *Artemia salina* y en esporas de hongos y bacterias, la capacidad de sobrevivir en condiciones de completa deshidratación, manteniendo la integridad estructural y funcional de sus membranas. Esta capacidad se explicó a partir de la síntesis de los disacáridos trealosa y sacarosa (tomado de Crowe y col., 1985a; Crowe y Crowe, 1991). Inicialmente, se pensó que el papel de los azúcares en la estabilización de los liposomas, secos y posteriormente rehidratados, era el resultado de la retención de una pequeña cantidad de agua. Sin embargo, se demostró que la retención del soluto atrapado era máxima en un rango de cantidades de trealosa donde no había incremento del contenido de agua aparente (Crowe y Crowe, 1991; Engel y col., 1994).

El efecto protector de los azúcares se debe a su capacidad de prevenir la agregación y fusión liposomal, así como a la disminución de la T_e de los fosfolípidos deshidratados (Sun y col., 1996). La fusión de los liposomas ocurre, principalmente, durante el proceso de deshidratación. En presencia de azúcares, a medida que el agua es eliminada, la solución saturada del azúcar se convierte en sobresaturada y se forma finalmente una matriz vitrea o estado vitreo, sólido, amorfo y altamente viscoso, que garantiza la separación física de los liposomas, limita el movimiento de las vesículas, eleva la energía de activación del proceso de fusión y por tanto, disminuye la probabilidad de que ocurra este fenómeno (Sun y col., 1996; van Winden y Crommelin, 1999). El tiempo en el cual los liposomas retienen el 50% de su contenido aumenta cuando la temperatura de almacenamiento es inferior a la temperatura de transición de fase del estado vitreo del azúcar (T_g) (Sun y col., 1996).

Cuando los liposomas, inicialmente en estado líquido-cristalino, son deshidratados en ausencia de azúcares sufren una transición liotrópica al estado gel, que conlleva a un aumento de la T_e , luego con la rehidratación pasan nuevamente al estado líquido-cristalino y en este cambio de fase liberan su contenido (Crowe y Crowe, 1991). Análisis mediante espectroscopia infrarroja y RMN de ^2H y ^{31}P evidenciaron que los azúcares, tales como: trealosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, maltotriosa y glucosa interaccionan intensamente con la porción hidrofílica de los fosfolípidos (Crowe y col., 1985b; Crowe y Crowe, 1991; Ozaki y Hayashi, 1997; Tsvetkova y col., 1998). Estos estudios mostraron que las mezclas de liposomas, deshidratados en presencia de azúcares, tienen

propiedades espectrales similares a las bicapas lipídicas hidratadas y fue posible inferir la interacción de los grupos hidroxilo de los azúcares con los grupos fosfato de los fosfolípidos mediante enlaces de hidrógeno. Esta interacción fosfolípido-azúcar provoca el espaciamiento de los grupos polares de los fosfolípidos al disminuir las interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, lo que posibilita que las membranas aún deshidratadas, se encuentren en estado líquido-cristalino. De manera que, bajo estas condiciones, cuando las vesículas son rehidratadas sus bicapas no experimentan transición de fase y retienen su contenido (Crowe y col., 1985a; Crowe y Crowe, 1991).

La mayor o menor capacidad de los azúcares para interactuar con los fosfolípidos se correlaciona directamente con su efectividad como protector de las vesículas lipídicas durante los procesos de deshidratación-rehidratación. Esta capacidad está determinada, probablemente, por la estereoquímica de los azúcares (localización y ángulos de los grupos hidroxilo) y el volumen característico de cada azúcar (Crowe y Crowe, 1991). El efecto de la disminución de la T_e de los liposomas por la adición de azúcares es sumamente importante para las vesículas cuya T_e es inferior a la temperatura a la cual se realiza la rehidratación, usualmente a temperatura ambiente (Crowe y col., 1987). Las membranas liposomales que a temperatura ambiente están en estado gel, como las de DPPC, al no sufrir transición de fase liotrópica durante la deshidratación-rehidratación, con la adición de azúcares son estabilizadas sólo mediante la inhibición de la fusión entre las vesículas (Crowe y col., 1989).

Los disacáridos han sido los azúcares más eficaces como protectores y de ellos, la trealosa ha resultado el mejor. Crowe y col. (1997) observaron que la glucosa, a pesar de que disminuye la T_e de los liposomas de DPPC, no los preserva durante la liofilización. Sin embargo, van Winden y col. (1997), trabajando con iguales vesículas pero a bajas velocidades de congelación, encontraron propiedades lioprotectoras para este monosacárido superiores a las obtenidas con trealosa. Para explicar esas diferencias estos autores sugirieron que bajo estas condiciones la cantidad de agua que permanece en el estado vítreo durante la deshidratación es inferior a cuando la congelación se realiza de manera rápida. Esto condicionará la formación de menor cantidad de cristales de hielo que serán los responsables de la ruptura de las bicapas durante la desvitrificación, evento posterior a la rehidratación (van Winden y col., 1997).

Los carbohidratos de mayor masa molecular como las maltodextrinas con más de tres unidades de glucosa, la dextrana y el hidroxietil almidón, no pueden interactuar por enlaces de hidrógeno con los fosfolípidos debido a impedimentos estéricos; sin embargo, la inulina, polímero lineal de fructosa con un grado medio de polimerización de 15, es capaz de disminuir la T_e de liposomas de ePC provocando su estabilización (Ozaki y Hayashi, 1997; Hinch y col., 2000).

Después de la rehidratación de los liposomas, los azúcares se mantienen intercalados entre los fosfolípidos tanto a temperaturas inferiores como superiores a la T_e (Viera y col., 1993). La presencia de azúcares, intercalados en las bicapas de los liposomas en solución, inhibe en una gran extensión la salida del soluto atrapado durante un rápido cambio en la transición de fase termotrópica y durante la incubación o almacenamiento de la suspensión (Fabrie y col., 1990).

Hasta el momento existe un cúmulo importante de estudios acerca del papel de los azúcares en la estabilización de los liposomas; no obstante, en todos los casos no se cuenta con los argumentos para explicar la función protectora obtenida con algunos de ellos.

1.3 Importancia de las vesículas liposomales para la industria biofarmacéutica.

Desde los años 70, un gran número de científicos, clínicos y profesionales de la industria farmacéutica, centraron su esfuerzo en el empleo potencial de estos sistemas lipídicos en la biomedicina, tanto en la dirección terapéutica como en el diagnóstico. Como resultado de ello, cientos de drogas y biomoléculas que incluyen antitumorales, antimicrobianos, agentes quelantes, hormonas, antígenos y material genético han sido incorporados en la fase acuosa o lipídica de liposomas de varios tamaños y composiciones, obtenidos por diferentes procedimientos tecnológicos (Sainz y Chantres, 1988b; Gregoriadis y Florence, 1993; Ulrich, 2002).

Los liposomas presentan una serie de propiedades que los hacen particularmente atractivos como transportadores de fármacos. En primer lugar, son sistemas biodegradables, no tóxicos y de baja inmunogenicidad, características fundamentales para un transportador idóneo. En segundo lugar, son estructuras extremadamente versátiles, ya que es posible manipular factores como el tamaño, tipo -uni o multilaminar-, composición, así como dotarlos de carga neta superficial e incluso ligar covalentemente diversas moléculas a su superficie (Sainz y Chantres, 1988b; Lasic, 1998).

Diferentes propósitos han motivado el empleo de los liposomas como sistemas de liberación de fármacos: i) incrementar la solubilidad del principio activo, ii) proteger moléculas sensibles, iii) incrementar la captura por las células de agentes antineoplásicos, antibióticos y antivirales y iv) disminuir la toxicidad del producto con la alteración de su farmacocinética y biodistribución (Lasic, 1998). El objetivo principal de la utilización de los mismos como vehículos de medicamentos es la localización selectiva de la molécula activa en los sitios blanco, como son los tumores y tejidos inflamados (Barenholz, 2000).

El comportamiento *in vivo* de las vesículas liposomales ha sido extensamente estudiado tanto en animales como en humanos (Gregoriadis y Florence, 1993; Alving, 2002; Charrois y Alien, 2003). Después de la administración sistémica de los liposomas, son endocitados por células monocíticas, principalmente las células de Kupffer del hígado y los macrófagos del bazo (Lasic, 1998). Los liposomas han sido descritos como excelentes vehículos para la liberación pasiva de drogas en las células fagocíticas y para la formulación de vacunas (Lasic y Papahadjopoulos, 1995; Alving, 2002).

Actualmente, los liposomas se diseñan racionalmente con los siguientes propósitos: i) lograr su estabilización estérica y ii) formar complejos de liposomas catiónicos con ácidos nucleicos y proteínas cargadas negativamente para introducir estos biopolímeros en las células *in vitro* e *in vivo* (Barenholz, 2000).

Los liposomas estabilizados estéricamente pueden ser diseñados para lograr una direccionalidad específica. Lo característico de estas vesículas liposomales es la presencia de glucolípidos y lípidos conjugados con etilenglicol en la bicapa lipídica, lo cual proporciona una barrera estérica fuera de los límites de la membrana. Estas vesículas, también denominadas liposomas "*stealth*" permanecen en la sangre un tiempo 100 veces mayor que los liposomas convencionales y así se incrementa la eficacia farmacológica de los agentes que encapsulan (Lasic, 1993; Gabinzon, 1995). La estabilidad biológica de estos liposomas es el resultado de la inhibición de las interacciones con las opsoninas, las lipoproteínas de alta densidad y los receptores de la superficie celular. La presencia prolongada de los liposomas en la sangre permite que sean extravasados a sitios donde la vasculatura es débil, frecuentemente a los tumores (Lasic y Martin, 1995; Lasic, 1998).

Para optimizar la direccionalidad a un blanco predeterminado se han utilizado ligandos que se enlazan covalentemente a la superficie de los liposomas y que resultan identificados por receptores que se expresan o sobre-expresan en las células blanco. Esto

ha constituido una alternativa prometedora para mejorar la selectividad y la actividad antitumoral de formulaciones liposomales que contienen agentes antineoplásicos (Park, 2002).

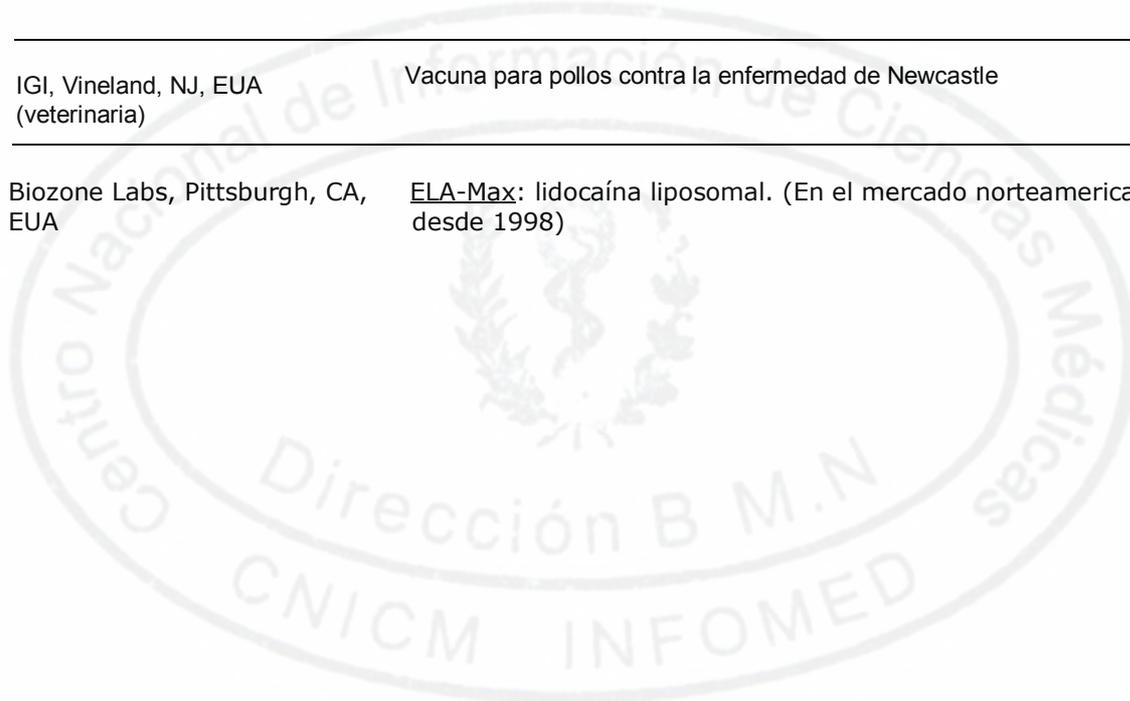
En la Tabla 1 se muestran algunos de los productos liposomales disponibles comercialmente. AmBisoma fue el primer producto liposomal inyectable (tomado de Gregoriadis y Florence, 1993). El mismo contiene anfotericina B en liposomas pequeños y cargados negativamente y se utiliza en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas (Adler-Moore y Proffitt, 1993). Doxil y DaunoXoma son dos formulaciones liposomales que se encuentran disponibles comercialmente en EUA, Europa y Japón para el tratamiento del Sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA. Doxil es una suspensión de liposomas de 80-100 nm constituidos por polietilenglicol 2000 enlazado covalentemente a diestearoilfosfatidiletanolamina, sPC hidrogenada y Cho en los cuales se encapsula doxorubicina-HCl mediante un gradiente de sulfato de amonio (Lasic, 1998; Barenholz, 2000). DaunoXoma es una formulación de SUVs compuestos por DSPC:Cho (2:1, mol/mol) en los cuales se encapsula la doxorubicina mediante un gradiente de pH (Lasic, 1998).

Los virosomas (proteoliposomas que contienen glucoproteínas de la superficie del virus de la influenza y mezclas de fosfolípidos naturales y sintéticos) han funcionado de manera eficaz como portadores de antígenos, debido a su estructura y composición (Glück y Wegmann, 1998). Este sistema ha sido registrado en la mayoría de los países de Europa, Asia y América como adyuvante de las vacunas comerciales de hepatitis A e influenza para uso humano (Epaxal), con mejores resultados que las vacunas convencionales adsorbidas en Al(OH)₃ (Holzer y col., 1996; Glück y col., 1999; Babai y col., 2001).

Los liposomas catiónicos acomplexados con ácidos nucleicos se han convertido en los portadores no virales más favorables para la terapia génica (Barenholz, 2000; Pedroso de Lima y col., 2001). Estas vesículas, como sistemas de liberación de ácidos nucleicos, presentan ventajas sobre los vectores virales los cuales tienen limitaciones de tamaño para portar genes foráneos y sus componentes virales pueden producir efectos indeseados. Estos complejos liposoma-ADN pueden ser adicionados a células *in vitro*, inyectados por vía parenteral o aplicados en aerosol. Entre los genes con potencial terapéutico se pueden incluir varias citoquinas y otras moléculas regulatorias para el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas (Lasic, 1998). La transfección de células con genes extraños *in vivo* se ha desarrollado rápidamente con amplias

Tabla 1. Algunos productos liposomales que se encuentran en el mercado (Lasic, 1998).

Compañía	Producto
Sequus, Menlo Park, CA, EUA	Doxil: doxorubicina-HCl en liposomas estabilizados estéricamente. (En el mercado norteamericano desde 1995 y en Europa desde 1996)
Gilead Sciences, CA, EUA	AmBisoma: anfotericina B en liposomas. (En el mercado europeo desde 1990 y en EUA desde 1997; se comercializa en más de 44 países) DaunoXoma: daunorubicina en liposomas. (Se comercializa en EUA y en Europa desde 1996)
Swiss Serum Institute, Bern, Suiza	Epaxal: virosoma. vacuna contra la hepatitis A. (En el mercado suizo desde 1994)
IGI, Vineland, NJ, EUA (veterinaria)	Vacuna para pollos contra la enfermedad de Newcastle
Biozone Labs, Pittsburgh, CA, EUA	ELA-Max: lidocaína liposomal. (En el mercado norteamericano desde 1998)



perspectivas en varias enfermedades como: la fibrosis quística, el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Lasic y Papahadjopoulos, 1995; Pedroso de Lima y col., 2001).

1.3.1 Propiedad adyuvante de los liposomas.

Durante los últimos años los investigadores del campo de las vacunas han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos antígenos, transportadores ("*carriers*") y adyuvantes para mejorar la inducción de respuesta inmune contra antígenos de baja inmunogenicidad. Un adyuvante inmunológico es cualquier sustancia que al ser incorporada en una formulación vacunal acelera, prolonga, potencia o modula la respuesta inmune específica contra los antígenos empleados (Vogel, 1995). Los liposomas son considerados adyuvantes particulados que direccionalizan el antígeno hacia las APC, propiciando que éstas lo presenten procesado a las células T (Vogel, 1995; Cox y Coulter, 1997; O'Hagan y col., 2001).

El papel de los liposomas como adyuvante inmunológico fue descubierto por Allison y Gregoriadis (1974), al encontrar que la respuesta de anticuerpos contra el toxoide diftérico encapsulado en liposomas era superior a la obtenida cuando se inyectaba esta proteína sola en ratones. A partir de ese momento, la adyuvanticidad de los liposomas ha sido confirmada para una amplia variedad de antígenos de bacterias, virus, protozoos, tumores y otras fuentes (Lasic, 1993; Gregoriadis, 1994a; Rao y Alving, 2000). A diferencia de otros adyuvantes, los liposomas no causan granulomas en el sitio de inyección, ni producen reacciones de hipersensibilidad en los animales inmunizados con ellos. Además, en los pacientes inyectados con liposomas compuestos por fosfolípidos apropiados, ej. fosfatidilcolinas de diferentes fuentes o sintéticas, no se producen efectos colaterales por inyecciones repetidas (Gregoriadis, 1994a).

La adyuvanticidad de los liposomas es un atributo de su estructura vesicular y, probablemente, de su naturaleza lipídica. La factibilidad de preparar liposomas con características variables, en términos del tamaño de las vesículas, número de bicapas, propiedades superficiales y composición, así como el modo de acomodar el antígeno (encapsulado en la fase acuosa, insertado hidrofóticamente en la fase lipídica, adsorbido electrostáticamente, enlazado covalentemente a la superficie liposomal o como subunidades virales solubles en la membrana) sustenta su versatilidad como inmunoadyuvante y sus potencialidades en el diseño de vacunas (Gregoriadis y Florence, 1993; Gregoriadis, 1994a; Gregoriadis y col., 1996).

Los macrófagos son las APC que de manera predominante procesan y presentan los antígenos liposomales *in vivo* (Rao y Alving, 2000). Los liposomas resultan también eficientes en la direccionalización de antígenos a las células dendríticas. Después de una administración subcutánea periférica, los liposomas se distribuyen preferentemente en la linfa y en los órganos linfoides locales (Gregoriadis y col., 1996; Ludewig y col., 2001). La inducción de una respuesta inmune mediada por células dendríticas requiere menor cantidad de antígeno que la mediada por macrófagos (Gregoriadis y col., 1996). Van Rooijen, (1995) sugirió que los macrófagos pueden transferir los antígenos procesados que escapan al citosol a las células dendríticas. En ausencia de macrófagos, las células dendríticas han resultado inefectivas como APC para la inducción de respuesta de linfocitos T citolíticos (CTL) a antígenos liposomales; este hallazgo sugiere la participación de los macrófagos en la presentación antigénica a células T por las células dendríticas, cuando se utilizan vesículas liposomales como adyuvante (Rao y Alving, 2000).

La **inducción de inmunidad humoral** contra un antígeno por los liposomas puede explicarse, por un lado, por la acción de depósito de estas vesículas. De este modo, la amplificación clonal inicial dirigida por el antígeno sería potenciada por las sucesivas amplificaciones que ocurren con la liberación lenta de este último. Por otra parte, la administración del antígeno en forma particulada en los liposomas hace más eficiente la toma del mismo por las APC y su localización posterior en los órganos de respuesta. Estas células migran a los órganos secundarios, al compartimento donde ocurre la cooperación T-B y en el microambiente adecuado inducen de forma óptima la producción de anticuerpos (Roitt y col., 2001). Desde la primera inmunización se observa el efecto adyuvante de las vesículas liposomales, al inducirse el cambio de clase de inmunoglobulina (Ig) M a diferentes subclases de IgG (Gregoriadis y col., 1996). El trabajo con diferentes antígenos sugiere que los liposomas incrementan los niveles de IgG2a / IgG2b con respecto a los de IgG1 (Phillips y Emili, 1992).

Estudios de la respuesta inmune empleando inmunización intranasal con vacunas liposomales demuestran que las respuestas inducidas son de anticuerpos IgA específicos en las secreciones nasales y pulmonares, y respuestas sistémicas de tipo IgG (de Haan y col., 1995; Childers y col., 2000). Los sistemas particulados como los liposomas, cuando son administrados por vía oral, pueden proteger al antígeno del pH ácido y de la destrucción proteolítica en el tracto gastrointestinal, lo que favorece su tránsito al tejido linfóide asociado a las mucosas del sistema digestivo (Fujii y col., 1993; Vogel, 1995). La administración de diferentes antígenos liposomales por esta vía demuestra la inducción de

respuestas inmunes mucosal y sistèmica (Fujii y col., 1993; Venkatesan y Vyas, 2000; Wierzbicki y col., 2002).

La **inducción de inmunidad mediada por células** es otra característica importante de la adyuvancia liposomal, lo cual ha sido demostrado a través de reacciones de hipersensibilidad retardada (HR), proliferación de linfocitos y la inducción de CTL. Entre las posibles explicaciones a estas evidencias está el hecho de que los antígenos son presentados por los liposomas en un microambiente hidrofóbico (de manera similar al que exhiben los antígenos conjugados a moléculas lipídicas), la localización eficiente de las vesículas en los nodulos linfáticos regionales y la liberación del contenido liposomal al citosol celular, propiciando su presentación por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (Gregoriadis y col., 1996). Alving y col., en la década del 90, desarrollaron una formulación liposomal que contenía DMPC, dimiristoilfosfatidilglicerol, Cho, lípido A o su derivado monofosforilado, con la cual obtuvieron respuestas CTL contra diferentes péptidos o proteínas virales: dos proteínas del *Plasmodium falciparum* (malaria) obtenidas por vía recombinante, la principal proteína de la estructura del virus Ébola y péptidos derivados de la proteína gpl20 del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (tomado de Rao y Alving, 2000).

Numerosas estrategias se han realizado para mejorar la acción adyuvante de los liposomas:

- i) La direccionalización a las APC mediada por receptores: Ligandos manosilados enlazados a la superficie del liposoma favorecen la captura de las vesículas por las células dendríticas y los macrófagos, a través de los receptores específicos (Gregoriadis, 1994a; Gregoriadis y col., 1996). Estas preparaciones liposomales han inducido respuestas humorales superiores, así como la activación preferencial de linfocitos T colaboradores (Th) tipo 1, demostrada por la mayor producción de interferón γ (IFN- γ) con relación a la de interleuquina (IL) 4 y la inducción de respuestas del tipo HR y CTL (Toda y col., 1997; Fukasawa y col., 1998). El recubrimiento de los liposomas con anticuerpos específicos para moléculas de superficie de las APC también direccionaliza las vesículas hacia esos blancos, fortaleciendo la respuesta inmune contra el antígeno encapsulado (Ludewig y col., 2001).
- ii) El empleo, junto al antígeno liposomal, de otros adyuvantes tales como $Al(OH)_3$ (alúmina), adyuvante completo de Freund (ACF), *Bordetella pertussis*, IL-2, IL-12, IL-15, IFN- γ , muramil dipéptido y tripéptido unido a la fosfatidiletanolamina, lípido A, entre

otros, mejora significativamente la respuesta inmune (Lasic, 1993; New, 1994; Cox y Coulter, 1997). También se ha informado que la co-encapsulación del antígeno con oligonucleótidos inmunoestimuladores (CpG-ODN) en vesículas liposomales induce activación de las células dendríticas *in vivo* (Ludewig y col., 2001; Lj y col., 2003).

1.4 Procesamiento de los antígenos para su presentación a los linfocitos T.

El reconocimiento de los antígenos peptídicos por las células T, presentados en el contexto del MHC, ha sido durante más de medio siglo uno de los paradigmas más importantes de la Inmunología. Las moléculas MHC clase I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, mientras que las del MHC clase II lo hacen sólo en la superficie de las APC profesionales (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas). Ambos tipos de moléculas son proteínas de membrana, altamente polimórficas, capaces de unir y transportar fragmentos peptídicos, provenientes de proteínas intracelulares y de fuentes exógenas, que serán reconocidos por linfocitos T en la superficie de las células (Rao y col., 1999; Roitt y col., 2001). De manera general, se ha aceptado que los péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas son presentados por el MHC clase I, mientras que aquellos que provienen de proteínas exógenas son presentados a los linfocitos T por moléculas MHC clase II. No obstante, los antígenos exógenos también pueden ser presentados vía MHC clase I si se administran de manera conjugada a lipopéptidos, adsorbidos en perlas de látex o encapsulados en vesículas liposomales (tomado de Rao y col., 1999).

La localización del antígeno en el liposoma puede determinar la forma en que es llevado a las células del sistema inmune (Lasic, 1993). Los antígenos que permanecen en la superficie liposomal pueden ser detectados por los receptores presentes en las células B y luego internalizados por endocitosis mediada por el receptor, produciéndose su degradación parcial en los endosomas. Los péptidos resultantes se localizan en un endosoma tardío con características de gránulo lisosomal denominado MIIC por ser un compartimento enriquecido en moléculas MHC clase II (Roitt y col., 2001). Estas moléculas MHC clase II se ensamblaron en el retículo endoplasmático, asociadas a una cadena invariante (Ii) que actúa como chaperona garantizando el plegamiento correcto de las moléculas MHC clase II e impidiendo el acomodo de péptidos en el surco antes de su llegada al compartimento MIIC (Figura 1). El complejo MHC clase II-Ii es transportado a través del aparato de Golgi. La vacuola que contiene este complejo utiliza los motivos dileucina (II o Ii) de las colas citoplasmáticas del MHC clase II y de Ii para fusionarse al endosoma tardío con características de gránulo lisosomal, el cual contiene los productos

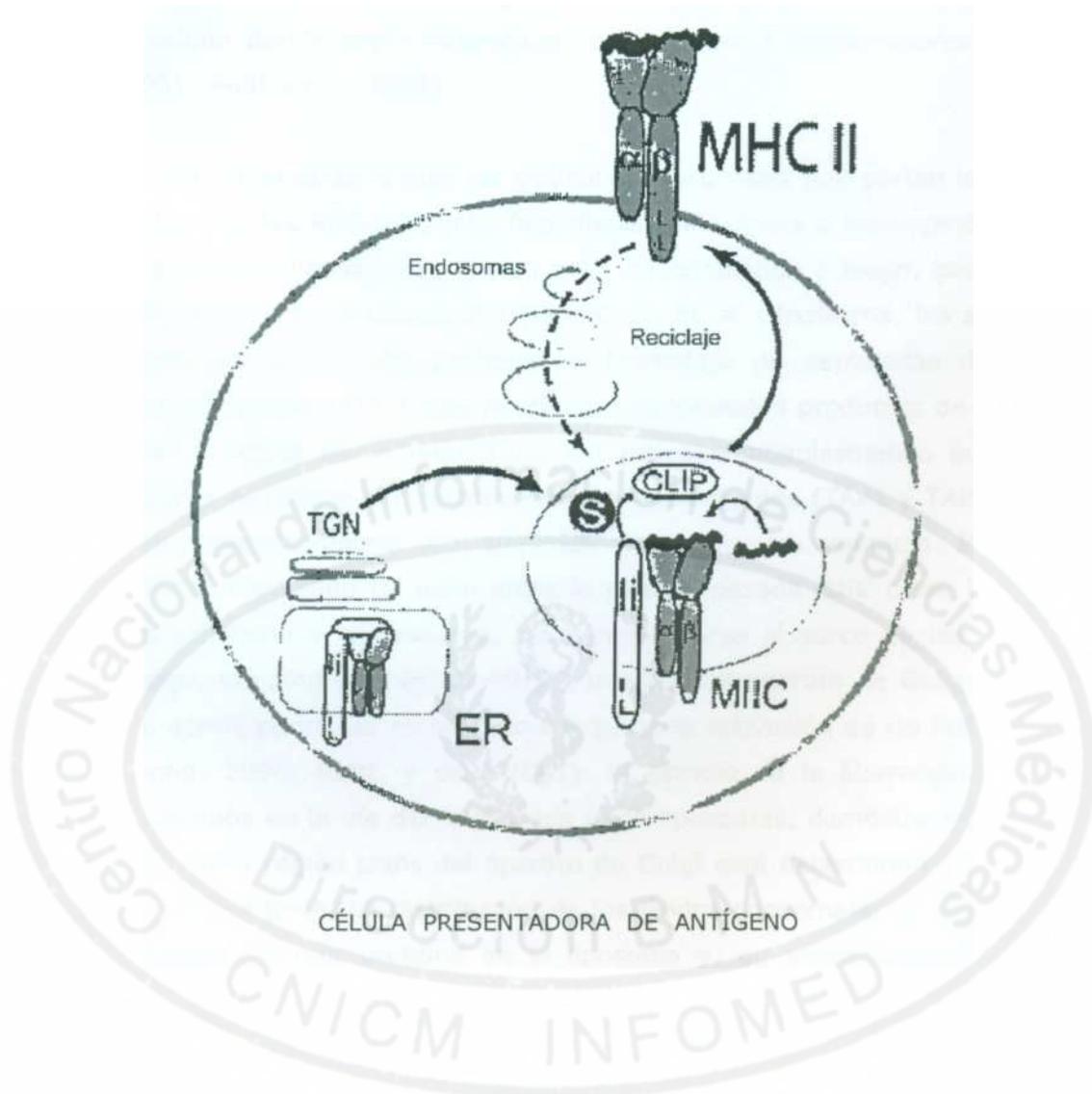


Figura 1. Presentación de antígenos vía MHC clase II.

ER: retículo endoplasmático; TGN: red **trans** del aparato de Golgi; MIIC: compartimento MHC clase II; S: catepsinas; Ii: cadena invariante; IL y LL: motivos dileucina; CLIP: péptido de la cadena invariante que se acomoda en el surco de la molécula MHC clase II (Moody y Porcelli, 2001).

de la degradación parcial de la proteína antigénica (compartimento MIIC) (Moody y Porcelli, 2001). Es en este sitio donde la cadena invariante se degrada por la acción de catepsinas, permaneciendo en el surco del MHC clase II un péptido de la cadena peptídica (CLIP) que por acción de una molécula dimérica es reemplazado por otros péptidos derivados del antígeno exógeno. Luego, el complejo péptido-MHC II es transportado a la superficie celular donde podrá interactuar con linfocitos T colaboradores CD4⁺ (Moody y Porcelli, 2001; Roitt y col., 2001).

Existe otra vía a través de la cual las vesículas liposomales que portan los antígenos son internalizadas por las APC mediante fagocitosis, pinocitosis o macropinocitosis. De esta forma los antígenos liposomales entran a la vía endocítica y luego, por un mecanismo desconocido, se liberan al citoplasma (Figura 2). En el citoplasma, los antígenos sufren ubiquitinación por acción del proteasoma (complejo de peptidasas dependientes de trifosfato de adenosina -ATP-). Los péptidos o lipopéptidos productos de la hidrólisis son translocados a través de la membrana del retículo endoplasmático por las proteínas transportadoras asociadas con la presentación de antígenos (TAP1 y TAP2). En el lumen del retículo endoplasmático los péptidos se unen al complejo MHC clase I-p₂ microglobulina, disociando la unión entre la cadena pesada MHC clase I naciente y sus chaperonas calnexina y calreticulina, para incorporarse al surco de las moléculas MHC clase I. Luego, el complejo péptido-MHC I transita del aparato de Golgi a la membrana plasmática, donde podrá ser reconocido e inducirá la activación de los linfocitos CTL CD8⁺ (Rao y Alving, 2000; Roitt, y col., 2001). El estudio de la liberación de proteínas y péptidos exógenos en la vía del MHC clase I por liposomas, demostró que la localización de proteínas en la región *trans* del aparato de Golgi está determinada por la naturaleza particulada del antígeno. La distribución de los lípidos liposomales en la célula se afecta por la presencia de una proteína en el liposoma y, en estas condiciones, los lípidos provenientes de las vesículas se localizan también en la región *trans* del aparato de Golgi (TGN), organelo por donde transitan las moléculas CD1 presentadoras de antígenos no clásicas. Estos resultados sugieren que tanto la proteína como el lípido liposomal pudieran ser presentados a las mismas células T por ambas vías: MHC clase I y CD1, respectivamente (Rao y Alving, 2000).

1.4.1 Vía no clásica de presentación de antígenos.

Estudios de la última década han revelado una tercera vía para la presentación de antígenos no-peptídicos a las células T. Esta vía es mediada por la familia de proteínas

CD1 (Jayawardena-Wolf y Bendelac, 2001; Sugita, 2001). Los principios y mecanismos de esta estrategia del sistema inmune, que difiere marcadamente de la clásica presentación de péptidos vía MHC, pudieran ser explotados para el diseño de nuevos adyuvantes y vacunas basadas en lípidos (Park y Bendelac, 2000; Sugita, 2001).

Todas las moléculas CD1 estudiadas son proteínas transmembrana que se expresan preferencialmente en la superficie de los timocitos y en células con funciones presentadoras de antígenos como las células dendríticas y los linfocitos B (Ulrichs y Porcelli, 2000; Matsuda y Kronenberg, 2001). Estas proteínas están relacionadas en su estructura y origen evolutivo con las moléculas del MHC: se asocian de manera no covalente a β_2 -microglobulina, lo que posibilita el plegamiento adecuado de la molécula para acomodar el antígeno en el surco hidrofóbico pero, a diferencia de las moléculas MHC, el surco de las moléculas CD1 acomoda lípidos (Porcelli y Modlin, 1999). En los humanos existen 5 genes que codifican las moléculas CD1, éstas se han agrupado en dos familias: el grupo I incluye a CD1a, b, c y e, mientras que el grupo II está representado sólo por CD1d (Jayawardena-Wolf y Bendelac, 2001). Todas las especies de mamíferos examinadas poseen moléculas de ambos grupos, excepto los roedores que sólo presentan dos genes que codifican para las proteínas mCD1d1 y mCD1d2, de elevada homología con la humana (Gumperz y Brenner, 2001). A las proteínas del grupo I se les atribuye una función en la defensa del hospedero contra las infecciones bacterianas, mientras que a las moléculas del grupo II se les asignan importantes funciones en la inmunorregulación, autoinmunidad y regresión tumoral (Porcelli y col., 1998).

Las moléculas CD1 presentan diferentes clases de antígenos lipídicos entre los que se incluyen hasta el momento: micolatos de micobacterias, fosfatidilinositoles, esfingolípidos y lípidos poliisoprenoides (Figura 3), a linfocitos T del tipo $\gamma\delta$ CD4CD8⁻ y a poblaciones minoritarias de células T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Sugita y col., 1998; Moody y Porcelli, 2003). Castaño y col. (1995) y Lee y col. (1998) informaron que las moléculas CD1 murinas (mCD1) además presentan antígenos de naturaleza peptídica. La porción alquílica hidrofóbica de los lípidos se une directamente a las proteínas CD1 quedando expuestos los azúcares, fosfatos y otros grupos polares para su interacción específica con las regiones de complementariedad de los receptores de antígenos de las células T (Grant y col., 2002). Los linfocitos T restringidos por CD1 destruyen las células infectadas y secretan IFN- γ , interleuquina moduladora de la respuesta inmune tipo Th1, lo que indica el papel de la

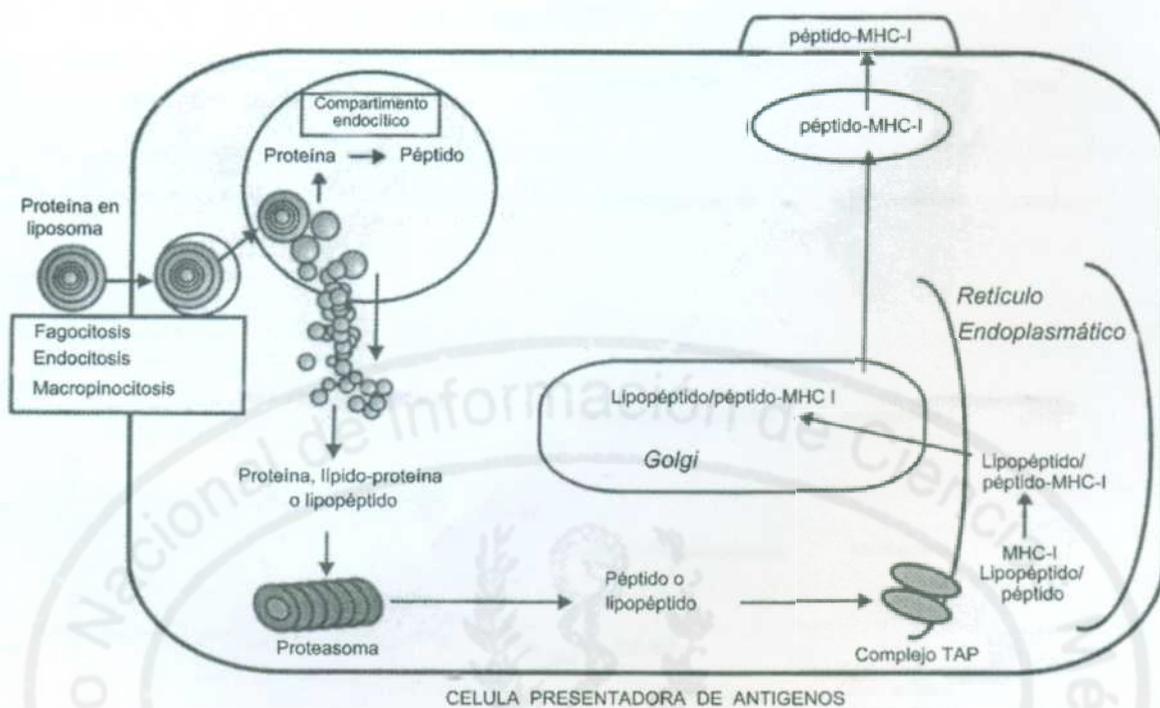


Figura 2. Presentación de antígenos encapsulados en liposomas vía MHC clase I (Rao y Alving, 2000).

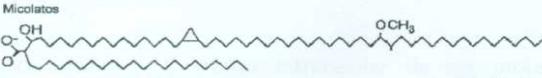
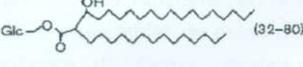
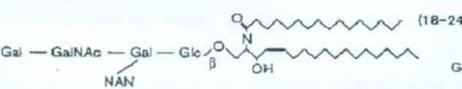
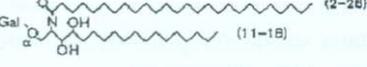
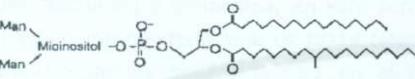
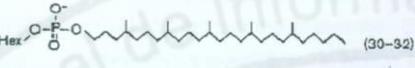
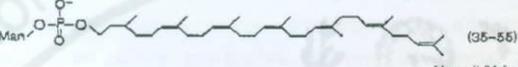
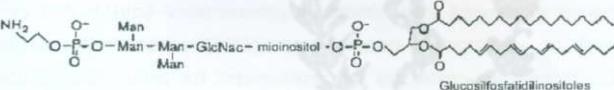
Antígenos lipídicos		Origen	Restricción
	Micolatos libres	Micobacteria	CD1b
	Glucosa monomicolatos (32-80)	Micobacteria o sintético	CD1b
Glucosfingolipidos			
	Gangliósido GM1 (18-24)	Humano	CD1b
	α -galactosil ceramida (2-28) (11-18)	Esponja marina	CD1d
Fosfolipidos			
	Fosfatidilinositolmanósidos	Micobacteria	CD1b
	Hexosil-1-fosfoisoprenoides (30-32)	Micobacteria	CD1c
	Manosil- β 1-fosfodiolcolos (35-55)	Semi-sintético (Micobacteria)	CD1c
	Glucosilfosfatidilinositulos	Humano/ Bacterias	CD1d

Figura 3. Estructura de los antígenos lipídicos que son presentados por las moléculas CD1.

Los números entre paréntesis ubicados junto a las cadenas lipídicas representan la cantidad de átomos de carbono para los cuales se ha observado antigenicidad. Gal: galactosa; GalNAc: *N*-acetilgalactosamina; Glc: glucosa; GlcNAc: *N*-acetilglucosamina; Hex: hexosa; Man: manosa; NAN: ácido *N*-acetilneuramínico (Matsuda y Kronenberg, 2001).

respuesta de células T mediada por CD1 en la eliminación de las infecciones (Sugita y col., 1998).

La localización y el tráfico intracelular de las proteínas CD1 son esenciales para comprender sus funciones en la presentación de antígenos y en la respuesta inmune. En el tráfico intracelular de estas moléculas se han identificado dos vías independientes que transcurren de forma paralela: una requiere de co-factores endosomales para la presentación de glucolípidos exógenos internalizados por las APC (vía endosomal) y otra, que no requiere de estos co-factores, para la presentación a células T autorreactivas, de lípidos propios expuestos en las membranas de las APC (Moody y Porcelli, 2003). En el retículo endoplasmático se asocian chaperonas a las cadenas pesadas de las moléculas CD1 recién sintetizadas para el plegamiento correcto del surco donde se acomodará el antígeno. Es probable que lípidos propios funcionen como chaperonas para proteger el surco hasta que las moléculas CD1 encuentren lípidos antigénicos durante su tránsito por las vías secretora o endocítica; en este sentido, se ha propuesto que el fosfatidilinositol haga la función de chaperona de CD1d (Moody y Porcelli, 2003). Un segundo evento del ensamblaje de las moléculas CD1 en el retículo endoplasmático es la asociación no covalente de las cadenas pesadas y μ_2 -microglobulina, lo cual pudiera regular la salida de las proteínas CD1 de este compartimento. Durante el tránsito por el aparato de Golgi las cadenas pesadas son glucosiladas y luego las moléculas CD1 son exportadas por la vía secretora a la superficie celular (Figura 4). El tránsito de las proteínas CD1 desde la membrana plasmática a los compartimentos endosomales, está condicionado por la presencia en estas moléculas de una secuencia YXXZ que se proyecta del lado citoplasmático de la membrana, donde Y es tirosina, X es cualquier aminoácido y Z es un residuo hidrofóbico voluminoso. Mediante esta secuencia aminoacídica los complejos de proteínas adaptadoras (AP2), que forman la cubierta de clatrina, interactúan con las moléculas CD1 para su internalización en vesículas recubiertas y su entrada a la vía endocítica (Moody y Porcelli, 2001). Esta secuencia está presente en la mayoría de las proteínas CD1, excepto en CD1a, la cual no transita a los endosomas tardíos ricos en lípidos (Porcelli y Modlin, 1999).

CD1a se localiza en la superficie celular, en vesículas recubiertas de clatrina y en los endosomas de clasificación (se) que son las vesículas que primero reciclan. Hasta el momento se desconoce si su entrada a estos compartimentos intracelulares es resultado del flujo de moléculas de la superficie celular, presentes en las zonas de pozos de

clatrina, o si existe algún mecanismo específico de señalización que no ha sido identificado todavía (Moody y Porcelli, 2003). CD1c penetra un poco más en la vía endosomal, localizándose en los endosomas tempranos (ee) y en los de reciclaje tardío (le) (Figura 4) (Briken y col., 2000).

Las moléculas CD1b y CD1d se localizan en los endosomas tardíos, lisosomas y en los compartimentos MHC clase II (MIIC) (Figura 4). CD1b humano presenta como característica distintiva la unión del motivo YXXZ con el complejo AP3 para promover el tránsito a los compartimentos lisosomales y al MIIC (Briken y col., 2002). Estudios recientes han mostrado que el complejo AP3 también influye en la localización intracelular de CD1d murino (Moody y Porcelli, 2003).

Para la localización de CD1d en los endosomas tardíos se han propuesto 3 mecanismos: i) una vía de señalización que utiliza el motivo tirosina de la cola citoplasmática, similar a la de las proteínas CD1b y CD1c; ii) la existencia de un motivo funcional de dileucinas modificadas en la cola citoplasmática de las moléculas CD1d humanas, no así en las CD1d murinas para interactuar con el complejo de proteínas adaptadoras AP2 y iii) un mecanismo que involucra la asociación no covalente de CD1d con el complejo MHC clase II-cadena invariante (Ii). Aunque no se ha establecido la vía por la cual los complejos CD1d-MHC clase II-Ii transitan del retículo endoplasmático a los endosomas tardíos, se ha pensado que este proceso esté mediado por la interacción de los complejos API con los motivos dileucinas modificadas (leucina-leucina o isoleucina-leucina) de CD1d, Ii y las moléculas MHC clase II (Kongovik y col., 2002). Para CD1d, la existencia de dos vías de procesamiento antigénico, una endosomal y otra no endosomal (Figura 4), pudiera facilitar que las APC controlen de manera separada la activación de poblaciones de células T asesinas naturales (NKT) con receptores de antígenos invariantes (Val4⁺) y diversas (Val4⁻) (Chiu y col., 2002). Sin embargo, no se han determinado las funciones normales de estas dos poblaciones celulares y se desconocen las estructuras de los antígenos endógenos que ellas presentan de manera natural (Moody y Porcelli, 2003).

Algunos antígenos requieren de procesamiento endosomal para su presentación a células T específicas por ej. los ácido micólicos. Sin embargo, esto no ocurre con los gangliósidos y sulfátidos. Shamshiev y col. (2002) demostraron que el sulfátido constituido por galactosa modificada en la posición 3 por un éster sulfato y unido mediante un enlace p- glucosídico a un grupo ceramida, era presentado de manera eficiente por CD1a, CD1b y

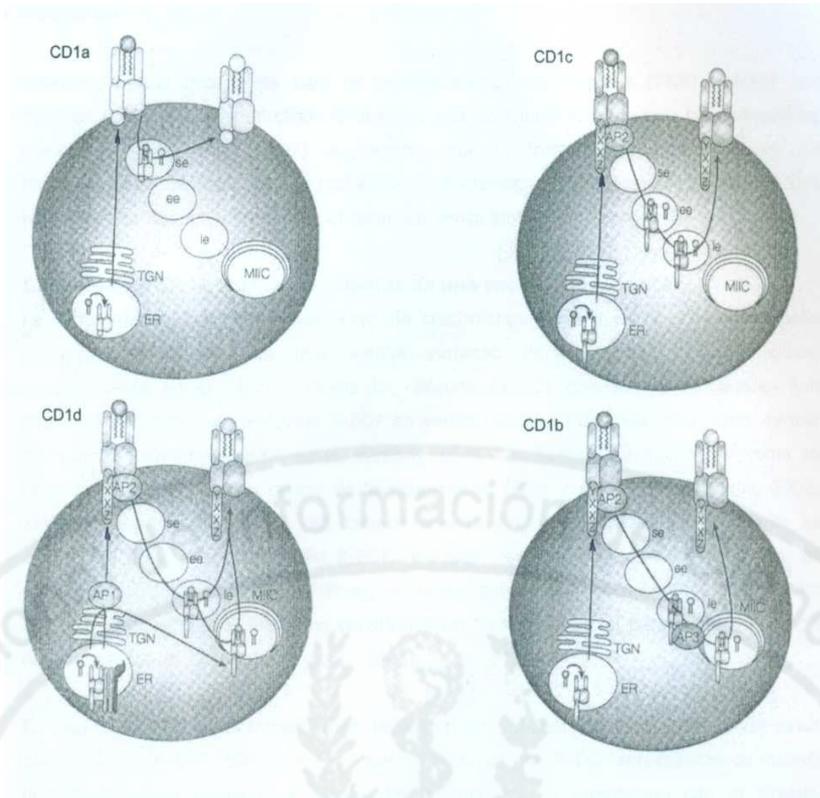


Figura 4. Tráfico intracelular y distribución de las moléculas CD1 humanas.

ER: retículo endoplasmático, TGN: red **trans** del aparato de Golgi, AP: proteínas adaptadoras, YXXZ: motivo citoplasmático de las moléculas CD1 donde Y= tirosina, X= cualquier aminoácido y Z= residuo hidrofóbico voluminoso, se: endosomas de clasificación, ee: endosomas tempranos, le: endosomas tardíos, MIIC: compartimento de moléculas MHC clase II (tomado de Moody y Porcelli, 2003).

CDIc. Estos autores demostraron que para la formación de los complejos CDI-sulfátido no era necesario la acidificación endosomal, la internalización ni el procesamiento intracelular.

Además, ciertos receptores para el reconocimiento de patrones (PRR) pueden unir ligandos lipídicos e internalizarlos de manera selectiva para su tránsito a los endosomas. Medzhitov y Janeway (1997) sugirieron que la fosfatidilcolina cumplía con los requerimientos de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), por lo que representa un blanco idóneo para el reconocimiento inmune innato.

1.5 Sistema EGF/ R-EGF: antecedentes de una vacuna terapéutica.

La subfamilia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) desempeña importantes funciones en una amplia variedad de desórdenes patofisiológicos, especialmente en el cáncer. Desde la década del 80 diversos investigadores han informado la sobre-expresión del R-EGF en varios tumores humanos tales como: cáncer de mama, pulmón, ovario, vejiga, cerebro, páncreas, cabeza y cuello, así como su relación con el pronóstico clínico de la enfermedad (Ríos y col., 1988; Arteaga, 2002; Xiong y Abbruzzese, 2002). Se conoce que la proliferación de estos tumores es estimulada por la activación del R-EGF inducida por sus ligandos EGF o el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), de forma autocrina (Mendelsohn, 2002). Es por ello que el sistema EGF/R-EGF ha constituido un blanco potencial para la inmunoterapia del cáncer (Ullrich, 2002; Lage y col., 2003).

En esta dirección, varios tratamientos de cáncer con anticuerpos monoclonales han usado como diana al R-EGF (Ullrich, 2002;). Los anticuerpos anti R-EGF son capaces de impedir la activación del receptor, a través del bloqueo de su interacción con el ligando, inhibiendo así el crecimiento tumoral (Mendelsohn, 2002; Lage y col., 2003). De los anticuerpos anti R-EGF existentes, el C225 ha sido uno de los más empleados en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello (Herbst y Hong, 2002), de pulmón (Herbst y Langer, 2002), carcinoma colorectal (O'dwyer y Benson, 2002) y de páncreas (Xiong y Abbruzzese, 2002). Sin embargo, esta "inmunoterapia pasiva" tiene la desventaja propia de la administración de una proteína extraña, la cual presenta un tiempo de vida media corto *in vivo* y puede causar reacciones alérgicas (tomado de González y col., 1996).

Una estrategia alternativa para inhibir la interacción EGF/R-EGF, diferente al empleo de anticuerpos monoclonales contra el receptor, fue desarrollada por Lage y col. (1997). Estos investigadores sugirieron que era factible inhibir la interacción ligando-receptor mediante la "castración" del EGF por auto-anticuerpos obtenidos al inmunizar con EGF autólogo unido a una proteína transportadora, o con el antígeno heterólogo.

González y col. (1996) observaron una respuesta de anticuerpos anti-EGF murino (EGFm) en ratones Balb/c inmunizados con EGFm sólo si se encontraba conjugado a una proteína transportadora como la cadena p de la toxina del cólera, utilizando además ACF y adyuvante incompleto de Freund (AIF) como adyuvantes. Por otra parte, la inmunización de ratones de las cepas Balb/c, C-57 y CBA, con EGFhr (70% de homología con el EGFm) en ACF, indujo respuesta contra el antígeno en el 100% de los animales. Sin embargo, en ratones NMRI la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr resultó heterogénea y sólo entre un 10-20% de los animales inmunizados desarrollaron una respuesta de anticuerpos específica. Esta heterogeneidad no se manifestó cuando los ratones se inmunizaron con EGFhr conjugado con toxoide tetánico (TT), o con la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*, obtenida de forma recombinante, encontrándose en este caso un 90% de animales con títulos anti-EGFhr (González y col., 1996; 1997).

La caracterización de la respuesta humoral anti-EGFhr en ratones Balb/c con el empleo de diferentes adyuvantes mostró que la subclase de anticuerpos predominante era IgG1. Además, se obtuvieron pequeños títulos de anticuerpos IgG2a sólo con el uso de los adyuvantes montanide ISA 51 y ACF, pero no con Al(OH)₃ (González y col., 1997).

Estudios realizados sobre el efecto de la inmunización con EGFhr en la supervivencia de ratones Balb/c y NMRI, los cuales se retaron con el tumor ascítico de Ehrlich (TAE) una vez concluido el esquema de inmunización, evidenciaron un sensible incremento en la supervivencia en comparación con animales no inmunizados. La supervivencia resultó directamente proporcional al nivel de títulos anti-EGFhr (González y col., 1996; 1997). Estos investigadores plantearon que los anticuerpos anti-EGF obtenidos inhibían la señal mitogénica mediante una "castración" inmunológica del EGF. Por otra parte, la presencia de un precursor de membrana del EGF hace que no se pueda descartar un efecto citolítico dependiente de anticuerpos (González y col., 1996).

Otros resultados obtenidos por estos autores, usando monos como modelos experimentales fueron los siguientes (González y col., 1996; 1997):

- Monos verdes con dos dosis de 500 μ g de EGFhr conjugado a TT o a P64k, usando $Al(OH)_3$ como adyuvante y por vía subcutánea, rindieron anticuerpos con título detectable hasta la dilución 1:20 000 de los sueros.
- Monos IRUS (primates no-humanos) inmunizados con 5 dosis de 500 ng de EGFhr unido a TT (EGFhr-TT) por vía subcutánea, en ACF para la primera inmunización y AIF para las restantes, produjeron anticuerpos con título hasta la dilución 1:200 000 del suero.
- Monos IRUS, inmunizados con 5 dosis de 50 μ g de EGFhr-TT por vía subcutánea, rindieron anticuerpos que fueron capaces de inhibir la unión EGF/R-EGF. Esta inhibición aumentó durante el tiempo posterior a la primera inmunización incluso después que los títulos de anticuerpos disminuyeron en gran medida, llegando a un 80% de inhibición al año de haber recibido la primera dosis.

En 1998, González y col. realizaron un ensayo clínico piloto con 10 pacientes que presentaban carcinomas malignos (colon, pulmón, estómago y próstata) en estado clínico avanzado para conocer la seguridad, inmunogenicidad y toxicidad del preparado vacunal. El protocolo de inmunización comprendió 2 dosis (0 y 15 días) de 50 μ g de EGFhr conjugado a P64k o a TT, utilizando $Al(OH)_3$ como adyuvante. El 60% de los pacientes desarrolló títulos de anticuerpos anti-EGFhr sin evidencias de toxicidad. La mayoría de los pacientes mostró una mejoría clínica después de la vacunación y durante el tiempo que los anticuerpos anti-EGFhr estuvieron presentes en el suero.

González y col. (2003) publicaron los resultados obtenidos en otros ensayos clínicos pilotos realizados con 40 pacientes que presentaban cáncer de pulmón en estado avanzado. El propósito de ambos ensayos fue evaluar la seguridad e inmunogenicidad de un protocolo de inmunización de 5 dosis (0, 7, 14, 21 y 51 días) con 50 ng de EGFhr conjugado a P64k, utilizando $Al(OH)_3$ o montanide ISA 51 como adyuvantes. El empleo de montanide ISA 51 incrementó el porcentaje de individuos que respondieron con buenos niveles de anticuerpos anti-EGFhr en comparación con el $Al(OH)_3$. Los pacientes que desarrollaron mayores niveles de anticuerpos anti-EGFhr mostraron los mejores índices de supervivencia.

Todos estos resultados posibilitaron el diseño de una vacuna de EGF anti-cáncer para ser usada en humanos. La formulación contiene EGFhr conjugado a P64k y montanide ISA 51 o $Al(OH)_3$ como adyuvante (Lage y col., 1997).

El extensivo estudio realizado en nuestro país, en función de una inmunoterapia activa contra células tumorales, tomando como diana el sistema EGF/R-EGF, ha posibilitado que se disponga de una amplia caracterización de la respuesta inmune contra el EGFhr. Esto hace que este sistema resulte atractivo para estudiar la modulación de la respuesta inmune inducida por adyuvantes no convencionales.



II. MATERIALES Y MÉTODOS

El EGFhr y la proteína recombinante P64k de *Neisseria meningitidis* utilizados en el presente estudio se obtuvieron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), según los procedimientos descritos por Cinza y col. (1991) y Guillén y col. (1994), respectivamente.

II. 1 Obtención de los liposomas.

II. 1.1 Procedimiento de deshidratación-rehidratación.

Para la obtención de los DRVs se utilizó el procedimiento descrito por Kirby y Gregoriadis (1984). Se prepararon liposomas constituidos por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina de soya (sPC) o fosfatidilcolina de yema de huevo (ePC) y colesterol (Cho) utilizando una relación molar fosfolípido:Cho de 1:1. En determinadas preparaciones de ePC:Cho se introdujo de manera alternativa carga superficial positiva o negativa con la adición de 3,2 (amóles de estearilamina (SA) o fosfatidilglicerol (PG) (10 mol% con relación al contenido de fosfolípidos). Las soluciones clorofórmicas de estos lípidos se rotoevaporaron y la película se mantuvo al vacío durante 30 min. Los lípidos se hidrataron con agua destilada a una temperatura superior a la T_e de los fosfolípidos (DMPC: $T > 24^\circ\text{C}$, DPPC: $T > 45^\circ\text{C}$, DSPC: $T > 55^\circ\text{C}$ mientras que para ePC y sPC se realizó a temperatura ambiente). Las suspensiones de MLVs resultantes se sometieron a ciclos de ultrasonido en un equipo Soniprep MSE dotado de una sonda de titanio, con intervalos de 30 segundos de sonicación e igual tiempo de reposo hasta obtener los SUVs de menor tamaño y aspecto opalescente. Esta sonicación se realizó en baño de hielo para evitar la oxidación de los lípidos (Grit y Crommelin, 1993). Posteriormente, se adicionó a las preparaciones EGFhr, P64k, o el conjugado de ambas proteínas (EGFhr-P64k), obtenido como se describe en el epígrafe II.4, en una relación molar fosfolípido:EGFhr de 32:0,05 para las preparaciones que contenían EGFhr o EGFhr-P64k y fosfolípido:P64k de 32:0,005. Estas preparaciones se liofilizaron durante 24 horas. La rehidratación se realizó de manera controlada con 100 nL de agua destilada y agitación en vortex. A este paso le siguió una incubación durante 30 minutos a una temperatura igual o superior a la T_e de los fosfolípidos utilizados. El volumen se completó con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 (NaCl 136 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, Na_2HPO_4 9,55 mM, KCl 2,68 mM). En algunos experimentos, a las mezclas de SUVs de DPPC:Cho o ePC:Cho y EGFhr se les adicionó sacarosa, previo a la etapa de liofilización, en una relación masa:masa fosfolípido:azúcar de 1:3.

Para obtener LUVs, los DRVs de DPPC:Cho no purificados es decir, que contenían además el EGFhr no encapsulado, se extruyeron cinco veces a través de membranas de policarbonato de 200 nm y 400 nm, a una temperatura superior a 45°C, en un equipo Liposofast (McDonald y col., 1991). Después de extruir los DRVs se recuperó alrededor del 80% de EGFhr-¹²⁵I.

Se prepararon también liposomas MLVs con 16 Rimóles de ePC y de Cho, relación molar 1:1 con hidratación de la película lipídica en tampón PBS que contenían 0,025 Rimóles de EGFhr, durante una hora. Las vesículas se sonicaron en baño ultrasónico durante 10 minutos, con intervalos de un minuto de descanso y dos minutos de sonicación. A estas preparaciones se les adicionó trealosa, sacarosa, maltosa o glucosa en una relación masa:masa azúcar:fosfolípido de 0,5:1 y posteriormente se deshidrataron a vacío en Speedbac Savant durante 24 horas. La hidratación de las vesículas se realizó con PBS.

II. 1.2 Procedimiento de congelación-descongelación.

Mediante este procedimiento (Mayer y col., 1985) se obtuvieron liposomas FATMLVs de DPPC:Cho con una relación molar de 1:1. Las soluciones clorofórmicas de estos lípidos se evaporaron bajo corriente de nitrógeno hasta la eliminación completa del solvente orgánico y se conservaron a 4°C durante toda la noche. Las películas lipídicas se hidrataron, durante una hora a una temperatura superior a 45°C, con soluciones de EGFhr, P64k, o el conjugado EGFhr-P64k en PBS. Las relaciones molares fosfolípido: EGFhr y fosfolípido: P64k utilizadas fueron 32:0,05 y 32:0,005, respectivamente. Las suspensiones resultantes, después de agitar en vortex, se sonicaron en baño ultrasónico durante 10 minutos, con intervalos de dos minutos de sonicación y un minuto de descanso y luego se realizaron cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a una temperatura superior a 45°C.

II. 2 Purificación de los liposomas.

El material no encapsulado en los liposomas se separó de las vesículas mediante centrifugación: los DRVs y FATMLVs se centrifugaron a 25 000 rpm durante 30 minutos; los DRVs obtenidos en presencia de sacarosa, a 38 000 rpm durante 60 minutos y los LUVs, a 45 000 rpm durante 90 minutos. Se realizaron dos lavados adicionales con PBS, en iguales condiciones de centrifugación y finalmente se resuspendieron en este mismo tampón.

II.3 Marcaje de EGFhr y P64k con ¹²⁵I.

El EGFhr y la proteína P64k se yodaron por el método de la cloramina T (Hunter y Greenwood, 1962). Se utilizaron 4 μ g de ambas proteínas diluidas en agua destilada, 0,5 mCi de ¹²⁵I para el marcaje de EGFhr y 0,1 mCi para P64k. La reacción tuvo lugar en tampón KH₂PO₄ 0,3 M pH 7,5 y se inició al añadir 10 μ L de cloramina T 9 μ M que actúa como catalizador. Después de transcurrir 30 segundos, en el caso del EGFhr, y dos minutos para P64k la yodación se detuvo por adición de 10 μ L de metabisulfito de sodio 26 μ M como agente reductor. La mezcla de reacción se diluyó con 200 μ L de albúmina de suero bovino (BSA) 2,5%.

La purificación del EGFhr-¹²⁵I se realizó mediante una cromatografía de exclusión molecular por filtración en gel de Sephadex G-50 medio en una columna de 50 x 1 cm, equilibrada con tampón PBS-BSA 0,5%. Se colectaron 60 fracciones de 1 mL a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto. Para los estudios se escogieron las fracciones de mayor radiactividad del segundo pico correspondiente, por su masa molecular, al EGFhr-¹²⁵I. La cantidad de ¹²⁵I que contenía cada fracción se determinó por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) 20% y su posterior centrifugación a 12 000 rpm durante 5 minutos para eliminar el radiotrazador no enlazado. Dichas fracciones tuvieron entre 80 y 90% de ¹²⁵I enlazado a la proteína.

La separación de P64k-¹²⁵I del ¹²⁵I no enlazado se realizó por diálisis de la proteína contra PBS-BSA 0,5% durante 24 horas. El porcentaje de enlace de ¹²⁵I a P64k, determinado de manera similar a la descrita para el EGFhr, fue aproximadamente de 70%.

II. 4 Conjugación del EGFhr a la proteína P64k.

El EGFhr conjugado a la proteína P64k se obtuvo por el método descrito por González y col. (1996). Para estudiar la eficiencia de conjugación del EGFhr a P64k se adicionó * 200 000 conteos por minuto (cpm) de EGFhr-¹²⁵I a una preparación que contenía 1,07 mg de EGFhr y 1,14 mg de P64k para una relación molar de 10:1 (EGFhr:P64k). La reacción de conjugación se realizó con glutaraldehído a una concentración final de 0,05% en una relación v/v (volumen final de 2 mL). La mezcla de reacción se incubó durante una hora con agitación y posteriormente, se purificó mediante una cromatografía de exclusión molecular por filtración en gel de Sephadex G-50 medio, en una columna de 60 x 1 cm equilibrada con PBS. Se colectaron 30 fracciones de 1 mL, a una velocidad de flujo de 12 mL/hora. El perfil cromatográfico se determinó mediante la absorbancia a 280 nm y el

conteo de la radiactividad de cada fracción. Para los estudios se escogieron las fracciones de mayor radiactividad del primer pico. Dichas fracciones tuvieron un 40% de EGFhr-¹²⁵I unido después de la purificación. Este resultado sugiere que las variantes conjugadas utilizadas en el presente trabajo tuvieron como promedio una relación molar EGFhr: P64k de 4:1.

Para los experimentos de inmunización, el conjugado se preparó de manera similar pero en ausencia del radiotrazador (EGFhr-¹²⁵I) y una vez concluida la reacción de conjugación se dializó contra PBS durante 24 horas.

II. 5 Determinación de la eficiencia de encapsulación de EGFhr, P64k, el conjugado EGFhr-P64k y las variantes co-encapsuladas (EGFhr+P64k) en liposomas.

Para determinar el porcentaje de encapsulación de estas especies moleculares en DRVs, FATMLVs y LUVs se utilizaron como radiotrazadores EGFhr-¹²⁵I, P64k-¹²⁵I y el conjugado EGFhr¹²⁵I-P64k según correspondía, en una dosis de 100 000 cpm.

El efecto de la co-encapsulación del EGFhr con P64k sobre la eficiencia de inmovilización de ambas proteínas se evaluó en preparaciones DRVs a las cuales se le adicionaron 0,05 (imoles de EGFhr, 0,005 Rimóles de P64k y aproximadamente 100 000 cpm de las respectivas proteínas yodadas de manera alternativa (EGFhr-¹²⁵I o P64k-¹²⁵I). Para la estimación de la eficiencia de encapsulación en estos dos tipos de vesículas cuando se trataba de EGFhr-P64k, se utilizó un volumen de conjugado equivalente a 0,05 pinoles de EGFhr y 100 000 cpm de su forma yodada (EGFhr¹²⁵I-P64k). De manera análoga, en el estudio de la capacidad de encapsulación de DRVs y FATMLVs para cada proteína por separado (EGFhr y P64k) se adicionaron 0,05 emoles de EGFhr y 0,005 fimoles de P64k y 100 000 cpm de la proteína marcada correspondiente a cada preparación. Para determinar la encapsulación de EGFhr en LUVs se emplearon 0,05 (imoles de EGFhr y 100 000 cpm de EGFhr-¹²⁵I).

El registro de radiactividad de las vesículas se realizó antes y después de su purificación por centrifugación. Se midió la radiactividad del sobrenadante total (SNT) y del precipitado final con lo cual se determinó por una parte, la recuperación y por otra, el porcentaje de encapsulación o inmovilización de las diferentes variantes utilizando la siguiente expresión:

$\% \text{ encapsulación} = [\text{cpm precipitado final} / (\text{cpm SNT} + \text{cpm precipitado final})] \times 100$

El rendimiento de las preparaciones, en cuanto a pérdidas por manipulación, fue en todos los casos superior a un 80%.

II. 6 Determinación de la capacidad de retención del contenido de las preparaciones liposomales.

Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de retención del soluto encapsulado de las preparaciones liposomales de diferentes composiciones lipídicas, obtenidas según las metodologías descritas anteriormente. Con este propósito, las vesículas se almacenaron a 4°C y se evaluó la cantidad de EGFhr, P64k y el conjugado EGFhr-P64k retenido en las mismas, a las 24 horas o semanalmente durante un mes. En uno de los experimentos se evaluó este mismo parámetro para vesículas MLVs de ePC:Cho, obtenidas en presencia de sacarosa, trealosa, maltosa y glucosa, y que contenían EGFhr, durante 24 horas en iguales condiciones de conservación. En cada ocasión se tomaron alícuotas de las suspensiones para registrar la radiactividad total y posteriormente se centrifugaron, tal y como se describe en el epígrafe II.2, para el registro de radiactividad de los sobrenadantes.

II. 7 Procedimientos para el estudio de la interacción del EGFhr con las membranas liposomales

II.7.1 Evaluación de la liberación del EGFhr encapsulado en vesículas liposomales en presencia de plasma.

Para estos ensayos se encapsuló 80 mM de carboxifluoresceína (CF) en DRV's de ePC:Cho (26 (moles de lípidos totales, relación molar 1:1), siguiendo el procedimiento que se describe en el epígrafe II. 1.1 y se estimó la liberación del fluoróforo de las partículas, co- encapsulado o no con 0,02 (moles de EGFhr. A estos liposomas se les adicionó plasma fresco de ratón en una razón volumétrica liposoma:plasma de 1:5, para simular la dilución aproximada que deben experimentar los liposomas (0,2 mL) cuando son inyectados al ratón, asumiendo que el volumen de sangre de estos animales es de 2 mL (el 50% corresponde al hematocrito) (Sénior y Gregoriadis, 1994). En el ensayo control, las vesículas se mezclaron con PBS en la proporción antes mencionada. Todas las muestras se incubaron a 37°C y se leyó la fluorescencia en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, tomando alícuotas por duplicado a diferentes intervalos de tiempo.

Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 490 y 520 nm, respectivamente. La liberación total de CF (100%) se determinó por la adición de tritón X-100, a una concentración final de 100 mM.

II.7.2 Atenuación de la fluorescencia intrínseca del EGFhr y de la proteína P64k en solución y en presencia de SUVs por el atenuador hidrosoluble acrilamida.

Se prepararon liposomas SUVs de DPPC:Cho en PBS (2,6 inmoles de lípidos totales, en una relación molar 1:1) con un régimen de sonicación igual al que se describe en el epígrafe II. 1.1. Se prepararon diluciones en PBS de EGFhr y P64k para lograr una concentración final de 5 μ M en la cubeta (volumen 2 mL) y se registraron los espectros correspondientes a cada proteína en el intervalo entre 300 y 450 nm, una vez excitadas las muestras a 295 nm. Las ventanas de excitación y emisión se fijaron en 3 y 5 nm, respectivamente. Las longitudes de onda de emisión para cada una de las preparaciones se refieren en el capítulo de Resultados.

Para estudiar la atenuación de la fluorescencia intrínseca del EGFhr y de la proteína P64k en solución se adicionaron a cada una de las proteínas bajo estudio (5 μ M) cantidades crecientes de acrilamida (AA) hasta lograr concentraciones desde 0 hasta 350 mM en el medio de ensayo. EGFhr y P64k se preincubaron con vesículas de DPPC:Cho, a una concentración de lípidos totales de 28 μ M, durante 1 hora a 45°C, previo al ensayo de atenuación de la fluorescencia con AA. Posterior a cada adición de AA se registró la F en las condiciones descritas anteriormente, y se realizaron las correcciones de las diluciones necesarias para los cálculos. El procesamiento de los datos se realizó según la ecuación de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999):

$$F_0/F = 1 + K_{sv}(1/[Q])$$

donde F_0 y F representan la fluorescencia intrínseca del EGFhr y de P64k antes y después de la adición de AA, respectivamente; K_{sv} es la constante de Stern-Volmer y Q representa la concentración de AA en la cubeta.

II. 7.3 Análisis de la transición de fase de los liposomas mediante calorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad (HSDSC).

Se prepararon liposomas DRVs de DPPC y DSPC con EGFhr encapsulado según el procedimiento descrito en el epígrafe II. 1.1. Como controles se utilizaron vesículas

iguales que no contenían EGFhr. Se pesaron 100 mg de cada preparación y se determinó (T_c y la variación de entalpía (ΔH) de la transición de fase utilizando un microcalorímetro diferencial de barrido de elevada sensibilidad Micro-DSC III SETARAM.

Para ello, se realizaron dos ciclos de calentamiento y enfriamiento en el intervalo de 25- 60°C para DPPC y 25-75°C para DSPC, a una velocidad de 1°C/minuto. Las curvas de integración se obtuvieron utilizando un paquete de programas SETARAM.

II. 8 Determinación del tamaño de las partículas liposomales.

Liposomas de diferentes composiciones fosfolípídicas que encapsulaban EGFhr, obtenidos según se describió en el epígrafe II.1.1 y que fueron liofilizados en presencia o no de sacarosa (relación masa:masa fosfolípido :azúcar, 1:3), se diluyeron en agua bidestilada (3 mL). Para determinar el diámetro medio, la distribución de tamaño y el índice de polidispersidad de las poblaciones de partículas, las preparaciones liposomales diluidas se analizaron mediante espectroscopia de correlación fotónica utilizando un equipo Malvern Autosizer 2C, equipado con un láser de Helio/Neón de 5 mW (New, 1994; Zadi y Gregoriadis, 2000).

II. 9 Evaluación de la respuesta inmune anti-EGFhr con el empleo de liposomas como adyuvante.

Para la encapsulación de EGFhr en DRV's y FATMLV's de DPPC:Cho se utilizaron los procedimientos y las relaciones lípidos:proteínas descritas en los epígrafes II.1.1 y II.1.2. En todos los esquemas de inmunización se emplearon preparaciones recién obtenidas. En determinados experimentos se utilizaron liposomas con DSPC:Cho y sPC:Cho para evaluar el efecto de la naturaleza de la fosfatidilcolina sobre la capacidad adyuvante de las vesículas liposomales.

El estudio del efecto adyuvante de los liposomas sobre la respuesta inmune anti-EGFhr se realizó en ratones Balb/c (5-6 animales/grupo) y NMRI (7-10 animales/grupo) hembras, producidos por CENPALAB, de 6-8 semanas de nacidos y con un peso promedio de 20 y 25 g, respectivamente. En el cuidado de los animales se cumplieron las normativas internacionales establecidas por la Unión Europea. Los animales permanecieron bajo temperatura y humedad controladas, ciclo alternativo luz/oscuridad de 12 horas, así como alimentación y agua *ad libitum*. La inmunización se realizó con 100 μ L del inmunógeno por las vías intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.), en un esquema de dos dosis a los 0 y 28 días. El curso temporal de la respuesta se siguió a los 14, 40, 56 y

90 días después de la primera dosis. La sangre (50 μ L) se extrajo del plexo de la cavidad retrorbital o de la cola, con capilares heparinizados y se depositó en viales eppendorf que contenían 100 de PBS. Para la obtención del plasma los viales se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 minutos. Los plasmas se guardaron a -20°C hasta su posterior utilización.

II. 9.1 Determinación de la dosis de EGFhr encapsulado en liposomas para obtener anticuerpos.

Se inmunizaron ratones Balb/c (5 animales/grupo) con 2,5; 5 y 10 (μ g de EGFhr en PBS o encapsulado en vesículas DRVs de DPPC:Cho. Se utilizó un esquema de doble inmunización a los 0 y 28 días por vía i.m. En la preparación de los DRVs se utilizó la relación fosfolípido:EGFhr y el procedimiento descrito en el epígrafe II. 1.1. Los plasmas de los animales se colectaron, como se describió anteriormente, a los 14, 40 y 56 días de la primera inmunización. A estos tiempos se determinaron los niveles de IgG total y de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b según se describe en el epígrafe II. 13.2.

II. 9.2 Inmunización con EGFhr solo, co-encapsulado o conjugado con P64k en liposomas de DPPC:Cho.

Ratones NMRI (10 animales/grupo) se inmunizaron por vía i.m. a los 0 y 28 días con 10 ng de EGFhr/dosis, encapsulado en FATMLVs en las tres variantes: solo, co-encapsulado con P64k (EGFhr+P64k y conjugado a esta proteína (EGFhr-P64k). En la preparación de los inmunógenos, se obtuvieron FATMLVs, según el procedimiento descrito anteriormente y se utilizaron 0,05 inmoles de EGFhr libre o en la variante conjugada, 32 inmoles de DPPC y 32 emoles de Cho; mientras que aquellas vesículas que contenían ambas proteínas co- encapsuladas se obtuvieron a partir de 0,1 (amóles de EGFhr, 0,01 pinoles de P64k (relación molar EGFhr:P64k 10:1), 64 μ moles de DPPC y la misma cantidad de Cho. Los plasmas se colectaron en condiciones similares a las descritas anteriormente para determinar los títulos de anticuerpos anti-EGFhr (IgG) a los 14 y 40 días de la primera inmunización, así como los niveles de IgG1, IgG2a e IgG2b a los 40 días. También se evaluó la especificidad de la respuesta humoral por el EGFhr con relación al EGFm con los plasmas obtenidos a los tiempos 14 y 40 días (ver epígrafe II. 13.2).

11.9.3 Determinación de la influencia del esquema de inmunización en la respuesta inmune anti-EGFhr.

Para el ensayo se emplearon 4 grupos de 6 ratones Balb/c. La dosis de EGFhr utilizada fue de 10 ng por vía i.m. Los plasmas se colectaron y conservaron para su análisis según lo descrito en el epígrafe II.9. Los esquemas de inmunización se muestran en la Tabla 2.

Liposomas DRV's de DPPC:Cho, que encapsulaban EGFhr o el conjugado EGFhr-P64k, se prepararon tal como se explica en el epígrafe II.1.1. Para la formulación Liposoma/EGFhr se emplearon 28 μ moles de cada uno de los lípidos y 0,045 μ moles de EGFhr y para Liposoma/EGFhr-P64k, 34 μ moles de ambos lípidos y un volumen de conjugado equivalente a 0,053 μ moles de EGFhr. En los animales inmunizados con Al(OH)₃ se utilizó 2 mg de este adyuvante por dosis. Para la preparación del inmunógeno se mezcló, mediante agitación continua durante 30 minutos, 533 μ l de una suspensión de Al(OH)₃ de concentración 30 mg/mL con 0,013 μ moles de EGFhr (Al(OH)₃/EGFhr) o un volumen de conjugado equivalente a 0,013 μ moles de EGFhr (Al(OH)₃/EGFhr-P64k).

En otro experimento, 2 grupos de 6 ratones Balb/c se inmunizaron por vía i.m a los 0 y 28 días, con 10 μ g de EGFhr encapsulado en liposomas DRV's de DPPC:Cho o adsorbido en Al(OH)₃. Ambos inmunógenos se prepararon como se describió en el párrafo anterior.

Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-EGFhr (IgG) en los plasmas de los animales a los 14, 40 y 90 días de iniciado el esquema de inmunización, y las subclases de IgG a los 40 días (ver epígrafe II.13.2).

11.9.4 Análisis de la respuesta inmune anti-EGF inducida con liposomas DRV's de distinta composición fosfolipídica.

El estudio comparativo de la respuesta inmune inducida con preparaciones liposomales de diferente composición fosfolipídica se realizó empleando 4 grupos de ratones NMRI, de 7 animales cada uno. La dosis utilizada fue 10 μ g de EGFhr conjugado a P64k, por vía i.m. a los cero y 28 días.

Se prepararon DRV's de tres composiciones fosfolipídicas (DPPC, DSPC y sPC), siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe II.1.1. Para los liposomas de DPPC:Cho se emplearon 47 μ moles de cada uno de los lípidos y un volumen de conjugado equivalente a 0,073 μ moles de EGFhr unido covalentemente a P64k y para los de DSPC:Cho y

sPC:Cho se utilizaron 59 nmoles de cada uno de los lípidos y 0,092 Rimóles de EGFhr unido a la proteína transportadora. El cuarto grupo, utilizado como referencia, correspondió a los animales inmunizados con EGFhr-P64k adsorbido en Al(OH)₃ y para la preparación de este inmunógeno se mezclaron con agitación continua 933 (iL de Al(OH)₃ de concentración 30 mg/mL con un volumen de conjugado equivalente a 0,023 ^moles de EGFhr.

Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-EGFhr (IgG) en los plasmas de los animales a los 40 y 90 días de la primera dosis y las subclases de IgG a los 40 días (ver epígrafe II.13.2). Además, se estudió la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión del EGFhr a su receptor en membranas de placenta humana, a los 90 días de iniciado el esquema de inmunización, mediante un ensayo de radio-receptor (ver epígrafe 11.12).

II.10 Estudio de la respuesta inmune mediada por células inducida con liposomas y con Al(OH)₃.

II. 10.1 Ensayo de hipersensibilidad retardada (HR).

Se utilizaron 3 grupos de ratones NMRI, de 10 animales cada uno, los cuales se inmunizaron por vía i.m. a los 0 y 28 días con 10 (ig de EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en DRV's de DPPC:Cho o adsorbido en Al(OH)₃. En la obtención de los liposomas (ver epígrafe II.1.1) que contenían EGFhr se emplearon 0,072 (imoles de este antígeno y 46 emoles de DPPC y Cho (relación molar 1 : 1) . Para las partículas que portaban la variante conjugada se utilizaron 55 jimoles de DPPC y Cho de igual relación molar y un volumen de conjugado equivalente a 0,087 (imoles de EGFhr. La formulación Al(OH)₃/EGFhr-P64k se preparó con 0,052 lamoles de EGFhr conjugado a P64k y 1,33 mL de Al(OH)₃ (30 mg/mL) y se completó a un volumen final de 2 mL con PBS.

Para estudiar la respuesta de HR (Figura 5) los animales se retaron en el cojinete de la pata izquierda con 5 y.g de EGFhr en PBS (vol = 50 (iL), a los 7 días de la segunda inmunización. Cuatro animales de cada grupo (controles) se retaron con 5 víg de BSA en PBS. En todos los grupos la inflamación se determinó a 0 y 48 horas posteriores al reto, con un pletismómetro 7150 UGO BASILE. Los valores de inflamación se calcularon como la diferencia entre los valores de las lecturas digitales antes y después del reto.

Tabla 2. Esquemas de inmunización.

Nº del esquema	Nº de dosis	Días de inmunización	Inmunógeno
I	4	0 7 14 21	Liposoma/EGFhr-P64k
II	2	0 28	Liposoma/EGFhr-P64k
III	2	0 28	Liposoma/EGFhr Al(OH) ₃ /EGFhr
IV	2	0 28	Al(OH) ₃ /EGFhr-P64k



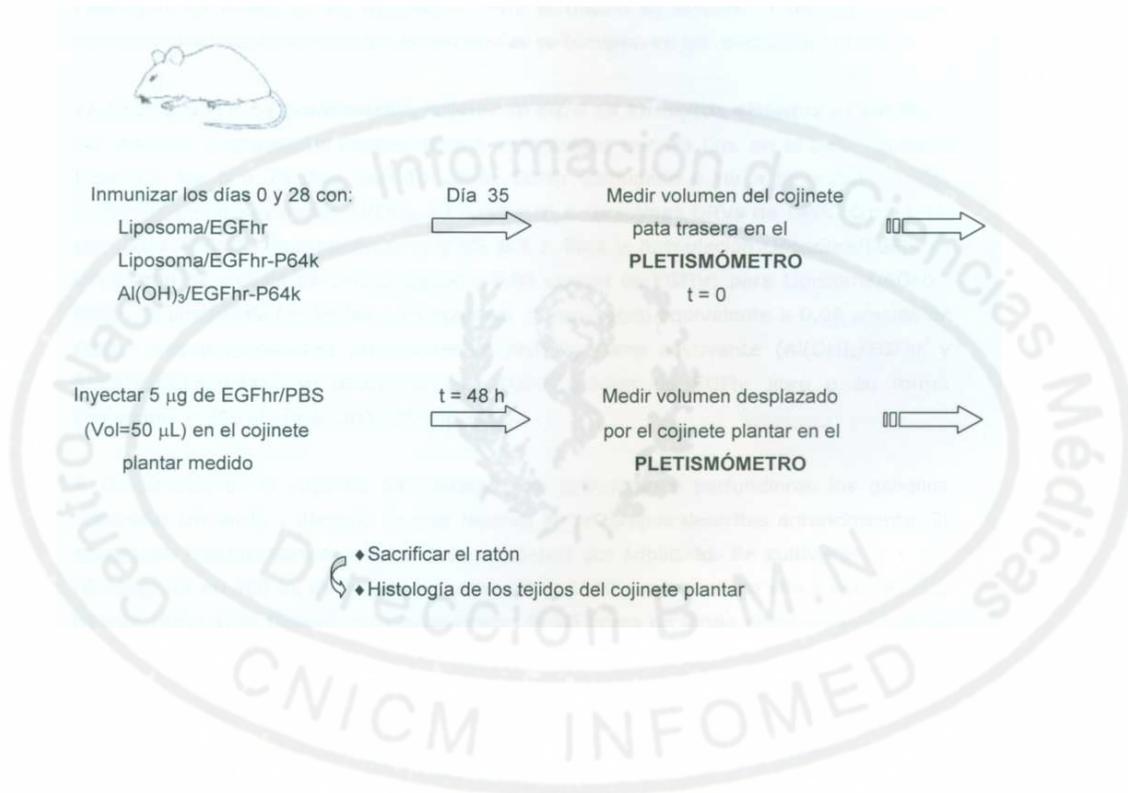


Figura 5. Esquema del ensayo de hipersensibilidad retardada (HR).

II. 10.1.1 Histología del cojinete plantar de los ratones.

Los animales se sacrificaron; las patas se cortaron a la altura de la articulación y se fijaron en formol al 10% durante 48 horas. La deshidratación se realizó al vacío en un procesador de tejidos, utilizando soluciones de etanol en concentraciones crecientes. Los tejidos se incluyeron en parafina durante una hora a 58°C y, posteriormente, se realizaron los cortes en un micrótomo. Para la tinción se empleó la técnica de doble coloración hematoxilina-eosina. Las fotografías se tomaron en un microscopio NOVEX.

II. 10.2 Ensayo de proliferación celular in vitro de linfocitos aislados de ratón.

Se utilizaron 4 grupos de ratones Balb/c inmunizados por vía i.m. en la pata izquierda trasera a los 0 y 28 días, con 10 μ g de EGFhr conjugado o no a la proteína P64k, utilizando como adyuvante Al(OH)₃ (2 mg/dosis) o liposomas DRVs de DPPC:Cho (1:1), obtenidos como se describe en el epígrafe II. 1.1. Para la formulación Liposoma/EGFhr se emplearon 32 μ moles de ambos lípidos y 0,05 nmoles de EGFhr; para Liposoma/EGFhr- P64k, 38 μ moles de los lípidos y un volumen de conjugado equivalente a 0,06 (μ moles de EGFhr. Las preparaciones que contenían Al(OH)₃ como adyuvante (Al(OH)₃/EGFhr y Al(OH)₃/EGFhr-P64k) se obtuvieron con 0,015 inmoles de EGFhr libre o en forma conjugada y 900 μ L de Al(OH)₃ (30 mg/mL).

A los 12 días de la segunda inmunización, se extrajeron y perfundieron los ganglios inguinales izquierdo y derecho de tres ratones de los grupos descritos anteriormente. El ensayo de proliferación de células T se desarrolló por triplicado. Se cultivaron 3 x 10⁵ células/pozo en 100 μ L de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera (SFT) 10% (Gibco), en placas Costar de 96 pozos de fondo plano. Las células se estimularon con EGFhr, diluido en medio RPMI 1640 suplementado con SFT 10%, para obtener concentraciones finales de 9, 18, 37 y 75 (μ g/mL en el cultivo (vol = 200 (μ L). El mitógeno concanavalina A se utilizó como control positivo de los ensayos a una concentración de 2 (μ g/mL y se añadió a los pozos correspondientes a las 24 horas de iniciado el cultivo. Como control del crecimiento celular basal, se determinó la proliferación inducida por el medio de cultivo en ausencia de antígeno y mitógeno. Las células se cultivaron 96 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Dieciocho horas antes de finalizado el cultivo, las células recibieron 1 (μ Ci de timidina-³H (Amersham). Las células de cada pozo se cosecharon en papel Filter Mat con un cosechador semiautomático Skatron y la radiactividad incorporada, en desintegraciones radiactivas por minuto (dpm),

se determinó en un contador Wallac 1450 MicroBeta Trilux. Los niveles de proliferación celular se expresaron como:

$$\Delta dpm = dpm \text{ antígeno} - dpm \text{ medio}$$

dpm antígeno: dpm media obtenida al estimular con el antígeno. *dpm medio*:

dpm media obtenida con el medio de cultivo.

II.11 Ensayo de actividad antitumoral en animales inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH)₃.

Para el estudio comparativo de la supervivencia frente al tumor ascítico de Ehrlich (TAE) se emplearon ratones Balb/c (12 animales por grupo) los cuales se inmunizaron con EGFhr por vía i.p. semanalmente, en un esquema de cuatro dosis, y utilizando como adyuvantes Al(OH)₃ (2 mg/dosis) y liposomas DRVs de DPPC:Cho en una relación molar 1:1, obtenidos como se describe en II.1.1. Los grupos controles recibieron el adyuvante correspondiente en ausencia del antígeno. Las dosis de EGFhr utilizadas fueron: 5 μ g en el grupo inmunizado con Liposoma y 50 μ g para el Al(OH)₃. Tres días después de la última inmunización los animales (controles e inmunizados) se retaron con 2×10^5 células de TAE. Como medida de la supervivencia se determinó el incremento de la extensión de vida (ILS) el cual se calculó como la relación del tiempo de supervivencia de los animales inmunizados (X_j) entre el tiempo de supervivencia de los animales controles (X_c) según la expresión:

$$ILS = \frac{X_j - X_c}{X_c} \times 100$$

II.12 Ensayo de inhibición de la unión del EGF a su receptor por los anticueros del suero de ratones inmunizados.

Este ensayo se realizó según el procedimiento descrito por Macías y col. (1985). Como fuente de receptores se utilizó una suspensión de membrana de placenta humana. Para su obtención, se homogeneizaron 100 g de tejido con un homogeneizador de cuchillas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante se le adicionó MgCl₂ para dar una concentración final igual a 10 mM y se incubó durante una hora. Luego se centrifugó 30 minutos a 3 000 rpm y la fracción de membrana (precipitado) se conservó a -20°C. Todas las operaciones se realizaron a 4°C. A una suspensión de membrana así obtenida y que contenía 400 μ g de proteína, determinados por el método de Lowry y col. (1951) (ver epígrafe II. 13.1) se le adicionó

100 000 cpm de EGFhr-¹²⁵I. Luego de incubar una hora a temperatura ambiente en presencia de diluciones 1:5 y 1:10 del suero de animales inmunizados según aparece en el epígrafe II.9.4, o dilución 1:5 del suero de ratones no inmunizados (suero control), la reacción se detuvo por adición de 1 mL de PBS y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos para determinar la radiactividad en el sedimento. Como control positivo se consideró la inhibición de la unión provocada por un exceso de EGFhr no radiactivo (1 fig/mL). Para determinar el porcentaje de inhibición de la interacción entre el EGFhr-¹²⁵I y el R-EGF por los anticuerpos del suero se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{ inhibición} = [(dpm \text{ suero control} - dpm \text{ suero inmunizado}) / dpm \text{ suero control}] \times 100$$

dpm suero control-, radiactividad obtenida al emplear el suero de animales no inmunizados

dpm suero inmunizado: radiactividad obtenida al emplear el suero de animales inmunizados

II.13 Técnicas auxiliares.

II. 13.1 Determinación de la concentración de proteínas.

Las concentraciones de EGFhr, P64k y proteínas totales presentes en las membranas de placenta humana, se determinaron por el método de Lowry y col. (1951), modificado en nuestro laboratorio. A 120 µL de la muestra diluida en NaOH 1N, se le adicionó 20 µL de desoxicolato de sodio 5% y 60 µL de NaOH 1N y se agitó. Luego se añadió 800 µL de la solución A (CuSO₄ 1%, tartrato de sodio y potasio 1% y Na₂CO₃ 2%) y posteriormente, 100 µL de la solución de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 en agua; se agitó y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras y de los patrones se midió a 720 nm en un espectrofotómetro contra un blanco de reactivos. Se utilizó BSA 1 mg/mL para la curva de calibración.

La concentración de EGFm, obtenido como se describe en II.13.3, se determinó mediante un ELISA tipo "sandwich" directo (Crowther, 1995), para lo cual se dejaron recubriendo placas Costar con 10 µg del anticuerpo monoclonal CB/EGF 1 (obtenido en el Centro de Inmunología Molecular), a 37°C durante tres horas. Luego de un lavado con Tween 20 al 0,05% se adicionaron las muestras diluidas en PBS-leche descremada 0,5% (100 µL/pozo) y se incubaron una hora a 37°C. En la curva de calibración se utilizó EGFhr 85,5 µg/mL, en un rango de concentración de 0,5-20 ng/mL. Una vez concluida la incubación

se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05% y luego se adicionaron 100 del conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (Sigma) diluido 1:4 000 y se repitió la incubación en condiciones similares a las descritas anteriormente. Posteriormente, se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 0,05% y luego se adicionaron 100 μ L de la mezcla sustrato- cromógeno H_2O_2 -OPD. La reacción se detuvo a los 20 minutos con H_2SO_4 2,5 M. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placas Multiskan EX.

II. 13.2 Determinación del título de anticuerpos por ELISA.

Para la determinación del título de IgG total anti-EGFhr en los plasmas de los animales inmunizados, se utilizó un ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (ELISA) indirecto, no competitivo, con el antígeno fijado a la fase sólida (Crowther, 1995). Se emplearon placas Costar "*high binding*" de 96 pozos que se dejaron recubriendo durante toda la noche a 4°C con 50 μ L de EGFhr, a una concentración de 10 μ g/mL, en tampón de recubrimiento ($Na_2CO_3/NaHCO_3$ 0,1 M pH 9,6). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 150 μ L de PBS-Tween 20 al 0,05% (PBST) y se llevó a cabo el bloqueo con 60 p.L de PBST-BSA al 1%, incubándolas durante una hora a 37°C. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los plasmas con PBST-BSA al 1%, comenzando por 1: 120 y se incubaron a 37°C durante una hora. Concluida la incubación se realizaron 3 lavados con PBST y se añadió el conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (Sigma), en una dilución 1:1 000 (50 μ L) incubando en iguales condiciones. Antes de la adición del sustrato, las placas se lavaron 6 veces con el PBST y finalmente, se adicionó 50 μ L de orto-fenilendiamina (OPD) como cromógeno y H_2O_2 , el sustrato, en tampón citrato de sodio pH 5,5. La reacción transcurrió durante 20 minutos a temperatura ambiente y se detuvo con 25 μ L de H_2SO_4 2,5 M. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placa Multiskan EX. El título de anticuerpos se determinó como la máxima dilución del plasma a la cual se obtuvo una absorbancia mayor o igual a 0,2. Como controles positivos se utilizaron plasmas con altos títulos de anticuerpos anti-EGFhr y como controles negativos, plasmas de animales sin inmunizar y pocillos vacíos a los que se les añadió sólo una parte del tratamiento: recubrimiento, bloqueo o conjugado.

Utilizando un ELISA de igual tipo se determinó también el título de IgG1, IgG2a e IgG2b en los plasmas de los animales inmunizados. Este ensayo se diferenció del explicado anteriormente en que una vez concluido el lavado posterior a la incubación de las muestras se adicionó 50 μ L de un conjugado anti-subclase de IgG-biotina (PharMingen) diluido 1:5 000 en PBST-BSA 1%, y luego de incubar 1 hora a 37°C y lavar

3 veces con PBS-T, se adicionaron 50 μ L de un segundo conjugado estreptavidina- peroxidasa (PharMingen) diluido 1:2 000 en PBST-BSA 1% procediéndose posteriormente de forma similar a la determinación de IgG total.

Se realizó un ELISA similar al descrito para IgG total con el empleo de EGFm o EGFhr como antígenos para el recubrimiento de las placas, para evaluar la especificidad de la respuesta humoral por el EGF humano, obtenida al inmunizar los animales con EGFhr solo, co-encapsulado o conjugado con P64k y encapsulado en FATMLVs, según se describió en el epígrafe II.9.2, El EGFm se obtuvo como se describe en el epígrafe II.13.3.

II. 13.3 Purificación de EGF mu riño (EGFm).

El EGFm se purificó a partir de glándulas submaxilares de ratón según el método descrito por Savage y Cohén (1972). El extracto total de glándulas se preparó homogeneizando las mismas en un homogeneizador de cuchilla; para ello se utilizaron 472 mL de HAc 0,05 N por cada 120 g de glándulas. El homogenado se ultracentrifugó a 35 000 rpm durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante por decantación. El precipitado se lavó dos veces con 296 mL de HAc 5×10^{-4} N cada vez. Luego se mezclaron los sobrenadantes y se rotoeva pora ron. El residuo seco se resuspendió en 28 mL de HCl 0,05 N, con una última ultracentrifugación en iguales condiciones.

El fraccionamiento del sobrenadante de la última centrifugación se realizó combinando los procedimientos cromatográficos de filtración en gel e intercambio iónico. En la primera etapa se utilizó la exclusión molecular en Biogel PIO, equilibrado con tampón HCl 0,05 N/NaCl 0,15 N, empaquetado en una columna de vidrio de 70 x 3 cm. El EGFm se separó de otros contaminantes al quedar retenido en la matriz por interacciones inespecíficas, y eluyó a 1,6 volúmenes de columna, aproximadamente. En cada corrida cromatográfica se aplicaron 3 mL del homogenado inicial y se colectaron fracciones de 10 mL en cada tubo, a una velocidad de flujo de 45 mL/hora. La absorbancia se registró a 280 nm. El material activo obtenido durante 3 corridas se mezcló y neutralizó a pH 5,7 con NaOH 1N, concentrándose por ultrafiltración hasta alcanzar un volumen de 10 mL, para luego resuspenderse en 250 mL de NH_4Ac 0,02 M pH 5,6, antes de reconcentrar nuevamente hasta 10 mL por ultrafiltración.

La segunda etapa del proceso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico en una columna de 20 x 1,5 cm, utilizando DEAE-Celulosa 52

equilibrada con tampón NH₄Ac 0,02 M pH 5,6. Se aplicaron 10 mL de muestra procedente de la cromatografía en Biogel PIO y se emplearon aproximadamente 60 mL de tampón de baja fuerza iónica para eliminar las proteínas básicas no adsorbidas a la matriz. La elución se realizó mediante la aplicación de un gradiente salino lineal obtenido a partir de la mezcla de 90 mL de tampón NH₄Ac 0,02 M y 90 mL de tampón NH₄Ac 0,2 M, ambos a pH 5,6. La velocidad de flujo utilizada fue de 12 mL/hora y se colectaron fracciones de 2 mL en cada tubo.

La actividad del EGFm se evaluó durante el proceso de purificación y en el producto final mediante el ensayo de competencia descrito en el epígrafe 11.12. El material activo final se liofilizó y se conservó a -20°C.

II.14 Análisis estadístico.

Con la finalidad de comprobar si los datos cumplían una distribución normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y a continuación, la prueba de Bartlett o la F máxima para determinar la homogeneidad de varianza. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA), de clasificación simple o bifactorial para probar la igualdad entre los promedios de los grupos. Para las comparaciones múltiples *a posteriori* se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Para probar la igualdad entre las medias de grupos no pareados se utilizó la prueba t de "Student". Cuando los datos no cumplían con la homogeneidad de varianza, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (Sigarroat, 1985).

Para analizar la retención del EGFhr por las vesículas de diferentes composiciones fosfolipídicas durante su almacenamiento, se aplicó un análisis de regresión lineal y luego, en cada tiempo de análisis, se realizaron ANOVA de clasificación simple y para las comparaciones múltiples de las medias se aplicó la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) paramétrica utilizando el paquete *Statistica for Windows* versión 5.0/1995 (StatSoft, Inc.).

En el ensayo de actividad antitumoral se utilizó el estimador de la función de supervivencia de Kaplan-Meier y las comparaciones de los tiempos de supervivencia entre los diferentes tratamientos se realizaron mediante la prueba *log-rank* empleando el paquete estadístico SPSS versión 10.05/1999 (Copyright SPSS Inc.).

Todas las pruebas se realizaron con $p < 0,05$.

III. RESULTADOS

III. 1 Caracterización de las vesículas liposomales con EGFhr encapsulado.

La encapsulación de un soluto en vesículas liposomales requiere la caracterización de la preparación obtenida. Para ello, los principales parámetros a determinar son: la eficiencia o rendimiento de la encapsulación (Kirby y Gregoriadis, 1984; Walde e Ichikawa, 2001) y su dependencia de la composición lipídica utilizada, el tamaño de las vesículas lipídicas obtenidas, la adición de otros solutos a encapsular y la tecnología desarrollada en la preparación de los liposomas, entre otros factores (New 1994; Walde e Ichikawa, 2001). Otro aspecto de interés es la estabilidad de las vesículas en términos de su capacidad de retención del soluto atrapado bajo diversas condiciones experimentales y las vías para controlar o modificar esta capacidad (Kirby y col., 1980; Woodle y Lasic, 1992; Lasic, 1998). Con este propósito, en la primera parte de este capítulo se exponen los resultados obtenidos al estudiar algunas características de las vesículas liposomales que encapsulan EGFhr.

III. 1.1 Influencia de la composición lipídica en la eficiencia de encapsulación y en la capacidad de las preparaciones liposomales para retener el EGFhr atrapado. Tamaño de las vesículas.

Para la inmovilización de EGFhr se seleccionó el procedimiento de deshidratación- rehidratación (DRVs) por las ventajas que éste presenta en la encapsulación de proteínas (Kirby y Gregoriadis, 1984; New, 1994). La Figura 6 muestra la influencia de la composición lipídica liposomal en la eficiencia de encapsulación de EGFhr. Se prepararon liposomas DRVs de ePC, sPC, DMPC, DPPC y DSPC que contenían cantidades equimolares de Cho. Con el propósito de determinar el efecto de la carga superficial de las vesículas en la encapsulación de EGFhr, en algunas preparaciones liposomales de ePC:Cho se incluyó 10 mol% de lípidos con carga positiva (SA) o negativa (PG). La mayor eficiencia de atrapamiento de EGFhr se observó en los liposomas de DPPC:Cho (35%) en comparación con el resto de las composiciones lipídicas ensayadas, las cuales mostraron una encapsulación inferior al 30%. El EGFhr tiene su punto isoeléctrico en la zona ácida (pH= 4,5) (Budavari y col., 1996), por lo que se pudiera presuponer que en las condiciones de pH en que se obtienen los liposomas (pH 7,4), la adición de carga positiva en su superficie debería favorecer la eficiencia de encapsulación de esta proteína en las vesículas. Esto sería cierto si durante la formación de los liposomas prevalecieran las interacciones electrostáticas entre las moléculas de EGFhr y las bicapas lipídicas sobre el fenómeno de reparto entre dos compartimentos acuosos (medio externo y volumen interno de las vesículas). Resultados opuestos serían esperados con la adición de carga

negativa a los liposomas (PG). Sin embargo, la presencia tanto de carga positiva como negativa en la superficie liposomal redujo la cantidad de EGFhr encapsulado en comparación con las vesículas compuestas sólo por fosfolípidos zwitteriónicos (Figura 6). Estos resultados apuntan a que en la encapsulación de EGFhr en las vesículas liposomales las interacciones electrostáticas entre esta proteína y las membranas liposomales no son lo suficientemente relevantes como para influir en la eficiencia de este proceso. Por otro lado, la disminución observada en este parámetro de manera inespecífica en relación a la carga superficial pudiera estar dada por la presencia de un tercer lípido inductor de estructuras no bicapas (PG o SA) en las membranas de ePC:Cho que contienen EGFhr. La presencia de PG o SA en las bicapas lipídicas modifica el empaquetamiento del resto de los componentes lipídicos, originando zonas de curvatura que desestabilizan la membrana. Así, PG muestra una tendencia espontánea a formar estructuras con curvatura negativa (micelas inversas o fase hexagonal invertida Hn), a diferencia de SA que, al estar constituida por una sola cadena de ácido graso, induce curvatura positiva (formación de micelas) (Seddon, 1990; Epan, 1998). Esto conduciría no sólo a una menor eficiencia de encapsulación de la proteína sino también a una menor capacidad de retención por las vesículas.

Alvarez y col. (2001) demostraron que la incorporación de 5 mol% de PG o de SA en vesículas liposomales compuestas por fosfatidilcolina y esfingomielina (relación molar 1:1) incrementaba la liberación de calceína por la acción de Sticholisinas I y II, dos citolisinas purificadas de la anémona *Stichodactyla helianthus*. Estos autores demostraron que el efecto no era, esencialmente, mediado por interacciones electrostáticas entre estas proteínas y las membranas liposomales, sugiriendo que la presencia de lípidos inductores de estructuras no bicapas podría facilitar la inserción de las toxinas en las membranas para formar el canal. La participación de otras fuerzas, además de las de naturaleza electrostática, en las interacciones proteína-membrana había sido sugerido con anterioridad por Bakas y col. (1998). Estos investigadores demostraron que una proteasa ácida de *Mucor miehei*, además de interactuar con liposomas de fosfatidilcolina:SA, se adsorbía a la interfaz de bicapas lipídicas neutras.

Las poblaciones de DRVs obtenidas (Figura 6) mostraron tamaños heterogéneos, los cuales oscilaron entre 700 y 1400 nm (valores representados junto a cada barra \pm SD), y una polidispersidad relativamente elevada, lo cual es característico de las vesículas preparadas mediante el procedimiento de deshidratación-rehidratación (Kirby y

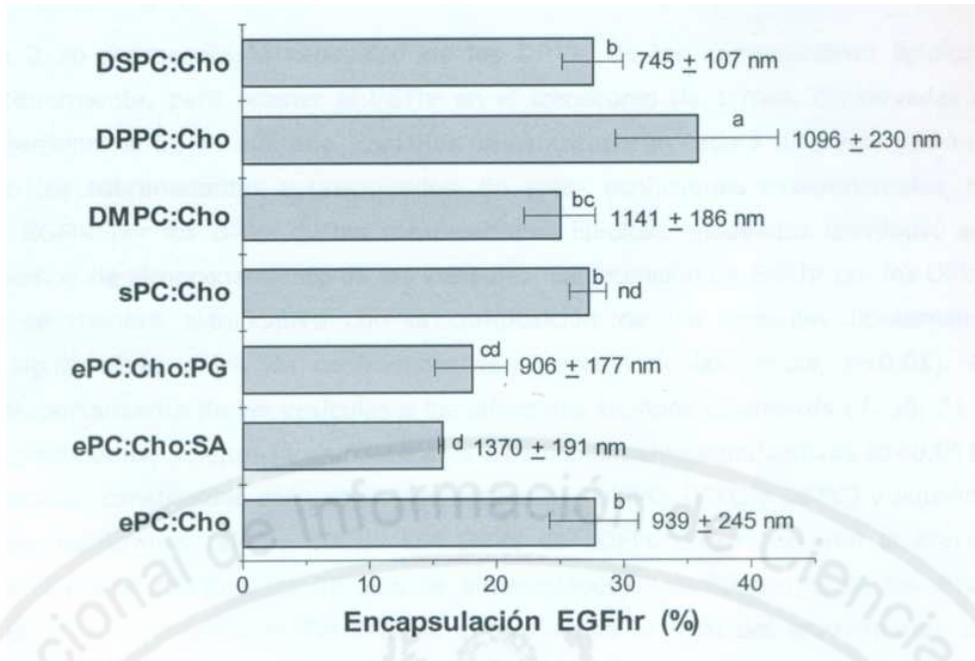


Figura 6. Eficiencia de encapsulación de EGFr en DRVs de diferentes composiciones lipídicas y tamaño de las vesículas.

Los liposomas se prepararon con 64 nmoles de lípidos totales, en una relación molar fosfolípido:Cho 1:1, y 0,05 nmoles de EGFr. PG o SA se incorporaron en una proporción de 10 mol%, manteniendo la relación molar 1:1 de ePC y Cho. Se representan los valores promedio y las desviaciones estándar (SD) de 5 preparaciones. Los números junto a las barras indican el tamaño promedio \pm SD de los DRVs determinado por espectroscopia de correlación fotónica. Letras desiguales indican significación estadística ($p < 0,05$) para la eficiencia de encapsulación (%) según la prueba de rangos múltiples de Duncan. nd: valor no determinado

Gregoriadis, 1984; New, 1994). Zadi y Gregoriadis (2000) utilizando este mismo método para encapsular diferentes solutos en liposomas de ePC:Cho, obtuvieron vesículas de 1000-6000 nm de diámetro que contenían entre 20 y 90% de estos solutos. Los valores de tamaño de las partículas, determinados para cada una de las preparaciones liposomales, no permitieron establecer una correlación entre este parámetro y la eficiencia de encapsulación.

En la Figura 7 se representa la capacidad de los DRVs, de las composiciones lipídicas descritas anteriormente, para retener el EGFhr en el transcurso de 1 mes, conservadas a 4°C. Para determinar el EGFhr liberado, los DRVs se centrifugaron cada 7 días y se midió el EGFhr-¹²⁵I en los sobrenadantes y precipitados. En estas condiciones experimentales, la retención de EGFhr por los DRVs de las composiciones lipídicas ensayadas disminuyó en función del tiempo de almacenamiento de las vesículas. La retención de EGFhr por los DRVs se modificó de manera significativa con la composición de las vesículas liposomales (diferencias significativas entre los coeficientes de regresión de las rectas, $p < 0,01$). Al analizar el comportamiento de las vesículas a los diferentes tiempos de análisis (7, 15, 21 y 28 días de almacenadas) se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre los liposomas constituidos por fosfolípidos saturados (DMPC, DPPC y DSPC) y aquellos de fosfolípidos insaturados (ePC y sPC). Los DRVs de DPPC:Cho mostraron la mayor capacidad de retención (85% a los 28 días de almacenados). Los liposomas de las otras composiciones retuvieron entre el 72-80% de su contenido al final del experimento. La retención de EGFhr en las preparaciones liposomales estudiadas se comportó en la siguiente forma: DPPC:Cho > DSPC:Cho > DMPC:Cho > sPC:Cho » ePC:Cho:SA * ePC:Cho. Estos liposomas, almacenados en las condiciones descritas, no mostraron cambios notables en el tamaño de las partículas durante todo el período de análisis (datos no mostrados).

III. 1.2 Influencia del tamaño de las vesículas liposomales en la eficiencia de encapsulación y su capacidad de retención del EGFhr.

Con el propósito de estudiar si una sensible reducción en el tamaño y en la polidispersidad de los liposomas afectaba la eficiencia de encapsulación de EGFhr, se prepararon LUVs mediante la extrusión de DRVs compuestos por DPPC:Cho en presencia de EGFhr no encapsulado, es decir, previo al paso de purificación por centrifugación. Ha sido bien establecido que la aplicación de métodos que provoquen un estrés mecánico (ej. sonicación y extrusión) reduce el tamaño de las vesículas liposomales (Brandl y col., 1997). La extrusión se realizó a través de membranas de policarbonato de 200 nm y 400 nm. Aunque el procedimiento de extrusión se efectuó en presencia del EGFhr no encapsulado, la

eficiencia de atrapamiento del EGFhr para los LUVs obtenidos con membranas de 400 nm y 200 nm fue de 4 a 6 veces inferior a la de los DRVs, respectivamente (Figura 8). La extrusión de DRVs a través de membranas de 200 nm y 400 nm, aunque permitió la obtención de vesículas homogéneas en cuanto a su tamaño (220 ± 4 nm y 330 ± 13 nm, respectivamente) no incrementó la cantidad de EGFhr encapsulado (Inserto Figura 8). Contrario a lo obtenido en el presente trabajo, Gregoriadis (1994a) informó que era posible reducir el tamaño de las partículas obtenidas por deshidratación-rehidratación mediante la microfluidización, sin pérdida notable del soluto encapsulado, si este paso se realizaba en presencia del compuesto no encapsulado. Sin embargo, más recientemente, Zadi y Gregoriadis (2000) encontraron que la extrusión de vesículas DRVs de ePC:Cho en similares condiciones y a través de membranas de policarbonato de 400 nm y 200 nm, produjo la reducción esperada en el tamaño de los liposomas (de 5200 nm a 330 nm y 240 nm, respectivamente), pero acompañado de una disminución importante en la encapsulación de riboflavina (de 43% a 26% y 19%, respectivamente). Esta diferencia en los resultados obtenidos pudiera explicarse por la diferencia en los métodos empleados para obtener partículas pequeñas (microfluidización y extrusión a través de membranas de policarbonato). A partir de los resultados presentados en este trabajo (Figura 8) y lo informado previamente por Zadi y Gregoriadis (2000) se pudiera sugerir que, como consecuencia de la formación de los LUVs, probablemente ocurre una ruptura del equilibrio de reparto del soluto favorecido por el método de deshidratación-rehidratación, el cual rinde vesículas con una morfología particular que se pierde durante el procedimiento de extrusión.

La comparación de la capacidad para retener el EGFhr encapsulado de los liposomas de DPPC:Cho obtenidos por extrusión (LUVs) y mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación (DRVs) confirmó la mayor estabilidad de estos últimos (Figura 9). Kirby y Gregoriadis (1984) demostraron que las vesículas DRVs muestran una mayor capacidad de retención del soluto atrapado que las obtenidas por extrusión. Aunque los LUVs contenían menor cantidad de EGFhr, mostraron una retención del péptido significativamente menor que los DRVs. En este caso tampoco el tamaño de los LUVs varió durante su almacenamiento.

La morfología de las vesículas obtenidas por estos dos procedimientos tecnológicos (LUVETs y DRVs) puede explicar las diferencias entre las capacidades de retención de EGFhr de los DRVs y LUVs. La presencia de múltiples bicapas en los DRVs con un volumen interno central relativamente grande respecto al existente entre los espacios interlaminares (Gregoriadis y

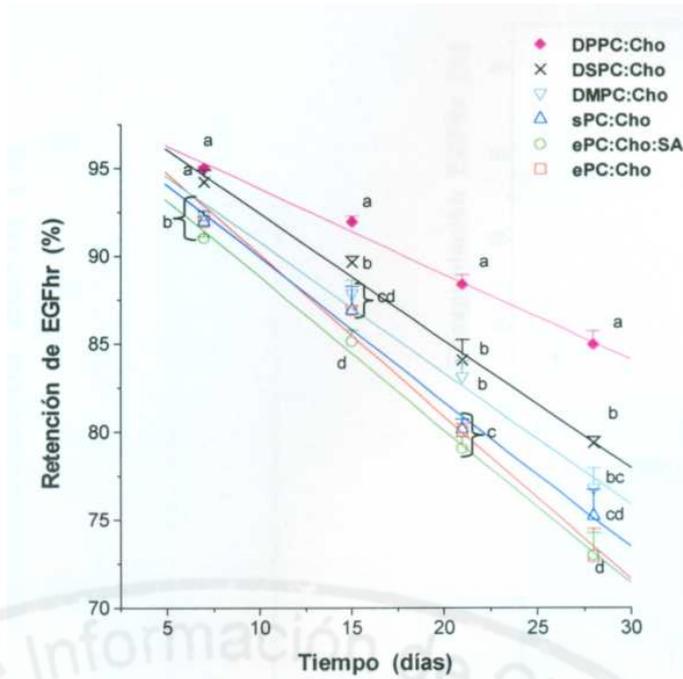


Figura 7. Retención de EGFr en liposomas DRVs de diferentes composiciones lipídicas.

Las vesículas se conservaron a 4°C y el % de EGFr retenido en ellas se determinó a los 7, 15, 21 y 28 días de almacenadas. Se representan el promedio de 2 preparaciones + SD en el sentido positivo. La comparación de las rectas de regresión lineal mostró diferencias significativas entre los coeficientes de regresión ($p < 0,01$).

$$DPPC:Cho: y = 98,70 - 0,49x \quad r^2 = 0,996 \quad DSPC:Cho: y = 99,65 - 0,72x \quad r^2 = 0,995$$

$$DMPC:Cho: y = 98,21 - 0,74x \quad r^2 = 0,993 \quad sPC:Cho: y = 98,18 - 0,82x \quad r^2 = 0,994$$

$$ePC:Cho:SA: y = 97,51 - 0,87x \quad r^2 = 0,998 \quad ePC:Cho: y = 99,32 - 0,92x \quad r^2 = 0,992$$

Letras desiguales en cada tiempo de análisis indican diferencias significativas en la retención entre las vesículas con el empleo de la prueba de Student-Newman-Keuls paramétrica ($p < 0,001$)

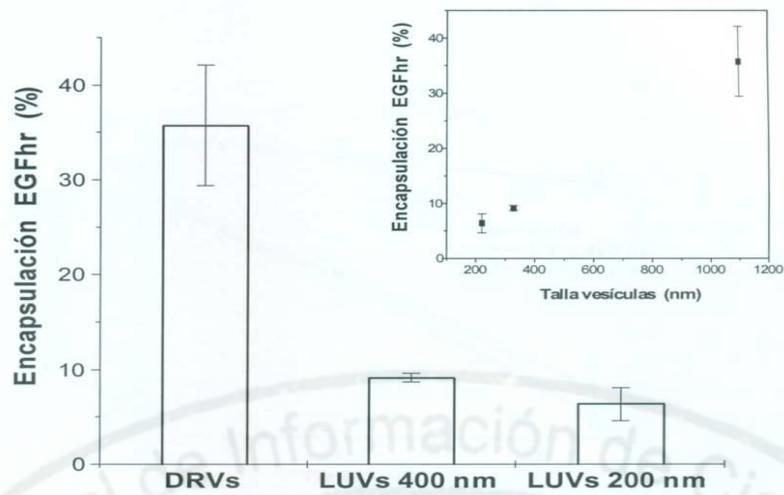


Figura 8. Eficiencia de encapsulación de EGFr en liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación y por extrusión.

Los DRVs y los LUVs se prepararon con 64 μ moles de DPPC y Cho, en proporción equimolar, y 0,05 nmoles de EGFr. Los valores de encapsulación representan el promedio \pm SD de 4 determinaciones. No se observaron diferencias significativas en el % de encapsulación del EGFr en los LUVs de 200 nm y 400 nm al aplicar la prueba t de "Student". En el inserto se muestra la variación de la encapsulación del EGFr con el tamaño de los liposomas determinado mediante espectroscopia de correlación fotónica; cada punto es el promedio \pm SD de 4 determinaciones.

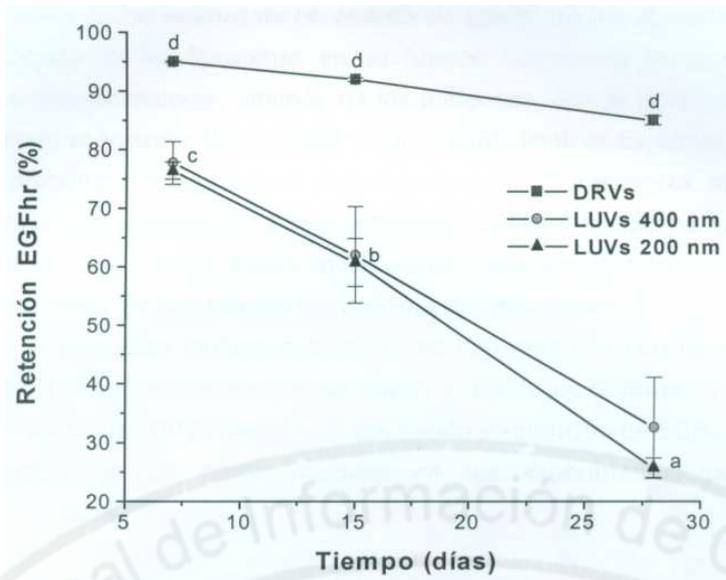


Figura 9. Retención de EGFr en vesículas DRVs y LUVs de DPPC:Cho.

Los liposomas preparados según lo descrito en la Fig. 8 se almacenaron a 4°C. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para la media de la interacción entre los tipos de vesículas y los tiempos de almacenamiento de las mismas según la prueba de rangos múltiples de Duncan. Cada punto es el promedio de 3 preparaciones \pm SD.

col., 1993) debe presuponer una localización mayoritaria del EGFhr en este compartimento acuoso central. Por lo tanto, la liberación de un número importante de moléculas de EGFhr de estas vesículas estará condicionado por su paso a través de un mayor número de barreras constituidas por las bicapas lipídicas. Los LUVs sólo presentan una membrana lipídica como barrera para la liberación de su contenido acuoso.

III. 1.3 Efecto de la proteína P64k de Neisseria meningitidis sobre la eficiencia de encapsulación y la capacidad de retención de EGFhr de los liposomas.

Una de las ventajas de los liposomas en su función adyuvante es la posibilidad de inmovilizar inmunopotenciadores, además de los antígenos, con el propósito de obtener una respuesta inmune superior (Gregoriadis y col., 1996). P64k se ha utilizado de manera exitosa como proteína transportadora para incrementar la respuesta inmune contra sustancias de baja inmunogenicidad (González y col., 2000) o antígenos "propios" como el EGFhr (González y col., 1998; 2003), involucrando generalmente un procedimiento de conjugación y el empleo de adyuvantes convencionales. Resultados muy promisorios en la potenciación de la respuesta inmune anti-EGFhr se han obtenido con P64k (González y col., 1996; 1997; 1998), de manera que se evaluó el efecto de la proteína P64k sobre la capacidad de las partículas DRVs para la encapsulación y retención de EGFhr. Este estudio permitiría la utilización de estas vesículas en los experimentos posteriores de inmunización.

En la Tabla 3 se muestra la eficiencia de encapsulación de EGFhr, conjugado o no a P64k, en liposomas DRVs compuestos por DPPC:Cho (EGFhr-P64k y EGFhr+P64k: variantes conjugada y co-encapsulada de las dos proteínas, respectivamente). La co-inclusión de P64k en los DRVs (EGFhr*+P64k) disminuyó significativamente la encapsulación de EGFhr de 35 a 20%. Una posible explicación a este resultado pudiera estar dada en el hecho de que ambas proteínas deben competir por el volumen interno finito de las vesículas liposomales y que P64k, al tener una masa molecular 10 veces superior al EGFhr (Cinza y col., 1991; Guillén y col., 1994), pudiera acomodarse de manera preferencial en estas vesículas liposomales. Por otra parte, al co-encapsular EGFhr y P64k en DRVs (EGFhr+P64k*) se obtiene una eficiencia de atrapamiento para P64k estadísticamente similar a la de las vesículas que contienen P64k solamente, lo que indica que el EGFhr no interfiere en la encapsulación de esta proteína. La variante conjugada (EGFhr*-P64k) mostró una eficiencia de encapsulación estadísticamente similar al EGFhr (Tabla 3).

La capacidad de las vesículas liposomales para encapsular un soluto depende, en primera instancia, del procedimiento tecnológico empleado (New, 1994; Walde e Ichikawa, 2001). La tecnología de congelación-descongelación (FATMLVs) es una alternativa sencilla que permite incrementar el rendimiento de encapsulación de solutos en vesículas MLVs (New, 1994) y su aplicación es factible cuando no se dispone de todas las condiciones para la preparación de los DRVs. Es por ello que evaluamos también la encapsulación de EGFhr, P64k y EGFhr-P64k en liposomas FATMLVs de DPPC:Cho (Tabla 4). Este tipo de vesículas (FATMLVs) se empleó en el estudio de la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr en ratones NMRI (ver epígrafe III.2.2). De las 3 variantes proteicas que se presentan en la Tabla 4, P64k resultó la de mayor porcentaje de encapsulación (11%), seguido por EGFhr y EGFhr-P64k con 6% y 4%, respectivamente. Al comparar los procedimientos de congelación-descongelación (FATMLVs) (Tabla 4) y deshidratación-rehidratación (DRVs) (Tabla 3) se evidenció una mayor eficiencia de atrapamiento en los liposomas obtenidos mediante esta última tecnología para todas las entidades proteicas ensayadas (4 veces superior para P64k y 6 veces para EGFhr y el conjugado EGFhr-P64k). Estos resultados concuerdan con lo aceptado generalmente con relación a que los liposomas DRVs son más eficientes para la encapsulación de sustancias de masas moleculares elevadas como son las proteínas (Kirby y Gregoriadis, 1984; New, 1994). Los FATMLVs y DRVs, si bien son vesículas multilaminares (MLVs), muestran diferencias notables en cuanto a la disposición y espaciamiento entre las bicapas y el volumen interno encapsulado (Mayer y col., 1985; Gregoriadis y col., 1993). Los DRVs encapsulan o "encierran" un volumen interno acuoso mayor propiciado por la disposición adyacente de las bicapas y la formación de una cavidad central interna superior a la de los FATMLVs. Esto, unido a un reparto ventajoso del soluto a encapsular durante los procesos de fusión que ocurren con la reorganización de las vesículas en la etapa de rehidratación, justifica la mayor capacidad de encapsulación de los DRVs para proteínas solubles y otras biomoléculas lábiles (Kirby y Gregoriadis, 1984).

La incubación prolongada con liposomas vacíos, de péptidos y proteínas marcadas con un radiotrazador, constituye un procedimiento simple propuesto por Utsumi y col. (1991) para la estimación o predicción de la capacidad de asociación que pudieran tener estas biomoléculas con las membranas liposomales durante la formación de estas vesículas. Siguiendo esta metodología, la incubación de EGFhr-¹²⁵I o P64k-¹²⁵I con vesículas MLVs de DPPC:Cho vacías, durante 24 horas a 45°C, permitió observar una mayor asociación de P64k (15%) que de EGFhr (3%) con estas membranas liposomales. Este resultado, unido al mayor rendimiento de encapsulación obtenido para P64k, especialmente en FATMLVs, nos permite sugerir una posible partición preferencial de esta proteína en las bicapas lipídicas,

Tabla 3. Eficiencia de encapsulación de EGFhr, P64k, el conjugado EGFhr-P64k o las variantes co-encapsuladas (EGFhr+P64k) en DRVs de DPPC:Cho.

Soluto encapsulado	Eficiencia encapsulación (%)
EGFhr	35 ±6 ab
P64k	41 ±2 a
EGFhr*- P64k	26 ±1 be
EGFhr* + P64k	20 ±2 c
EGFhr + P64k*	42 ±3 a

Para determinar la eficiencia de encapsulación (%) de cada variante proteica se utilizaron EGFhr-¹²⁵I o P64k-¹²⁵I como radiotrazadores. En las variantes que contienen ambas proteínas (EGFhr-P64k y EGFhr+P64k) el asterisco (*) indica la molécula yodada. El conjugado EGFhr*-P64k y las variantes co- encapsuladas (EGFhr*+P64k y EGFhr+P64k*) se prepararon como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Letras diferentes indican significación estadística (p<0,05) según la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los valores representan el promedio ± SD de 3 determinaciones.

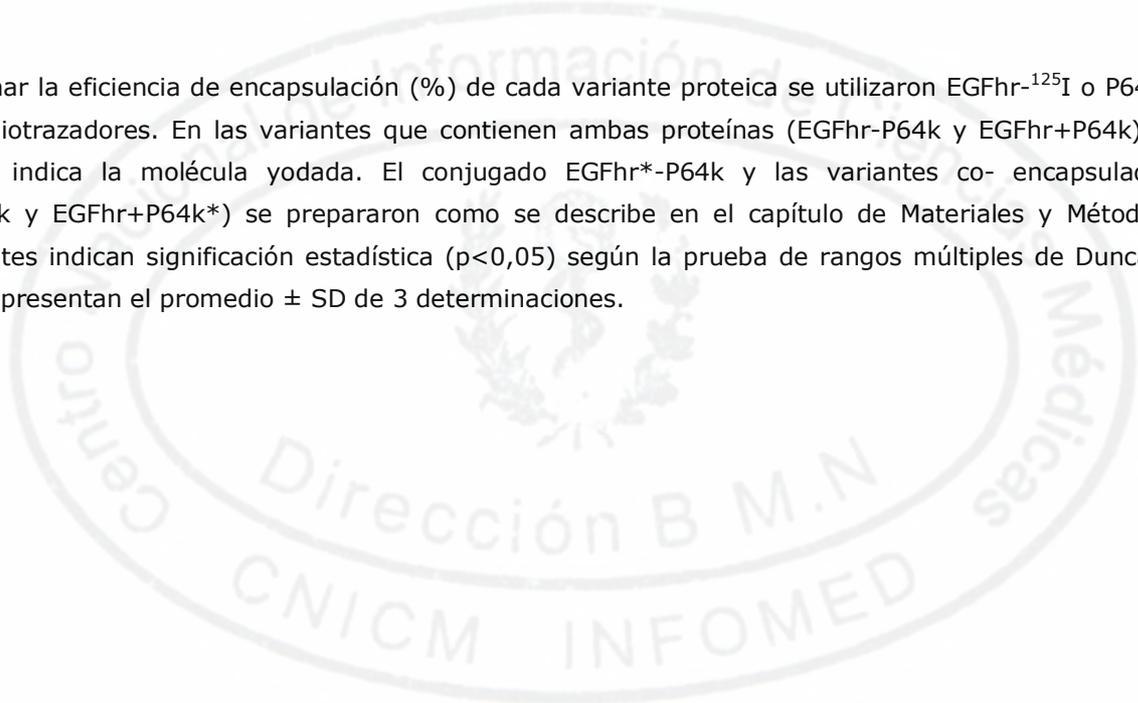


Tabla 4. Eficiencia de encapsulación de EGFr, P64k y el conjugado EGFr-P64k en FATMLVs de DPPC:Cho.

Soluto encapsulado	Eficiencia encapsulación (%)
E	
GFhr	6 ± 1 b
P64k	11 ± 1 a
EGFr*-P64k	4 ± 1 b

Para determinar la eficiencia de encapsulación (%) de cada variante proteica se utilizaron EGFr-¹²⁵I o P64k-¹²⁵I como radiotrazadores. El conjugado EGFr*-P64k se preparó como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos; el asterisco (*) indica la molécula yodada. Los valores representan el promedio ± SD de 3 determinaciones. Letras diferentes indican significación estadística (p<0,05) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.



Figura 10. Retención de EGFr, P64k y EGFr-P64k en liposomas FATMLVs de DPPC:Cho en las primeras 24 horas de almacenados a 4°C.

Para determinar la cantidad de proteína retenida se utilizaron EGFr-¹²⁵I o P64k-¹²⁵I como radiotrazadores. Los valores representan el promedio ± SD de 3 preparaciones. Letras desiguales indican diferencias significativas (p<0,05) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

en comparación con el EGFhr. Por su parte, el hecho de que el conjugado EGFhr-P64k muestre un reparto equivalente al EGFhr en ambos tipos de vesículas sugiere que el acomodo de P64k y EGFhr covalentemente unidos está determinado por esta última molécula.

La retención del contenido de las vesículas que encapsulan EGFhr, P64k o su variante conjugada se ilustra con los resultados obtenidos con las vesículas FATMLVs. La capacidad de estas partículas para retener el soluto encapsulado se determinó como la liberación de EGFhr-¹²⁵I o P64k-¹²⁵I durante su almacenamiento a 4°C (Figura 10). La retención de las proteínas se produjo en el siguiente orden: P64k > EGFhr = EGFhr-P64k.

La capacidad de los FATMLVs de DPPC:Cho para retener el EGFhr (Figura 10) fue notablemente inferior a la obtenida para los DRVs de similar composición lipídica (Figura 7) pues estas últimas vesículas retuvieron el 95% del EGFhr encapsulado a los 7 días de almacenadas a 4°C, mientras que los FATMLVs en las primeras 24 horas de almacenados en similares condiciones sólo conservaban el 70% del EGFhr encapsulado. La salida de estas especies moleculares de las vesículas pudiera estar condicionada porque ellas se asocian en diferente magnitud con las membranas liposomales contribuyendo a su desestabilización. Por otra parte, no se puede descartar que P64k, al tener una masa molecular superior al EGFhr, difunda más lentamente de las vesículas.

El comportamiento relativo de EGFhr, P64k y EGFhr-P64k durante el almacenamiento de los DRVs de DPPC:Cho bajo las condiciones experimentales descritas, fue muy similar al observado para los FATMLVs pero con una liberación del soluto encapsulado menor. Por su parte, las vesículas DRVs que contenían la variante co-encapsulada EGFhr+P64k* mostraron una retención de su contenido similar a aquellas que encapsulaban P64k solamente, mientras que la variante EGFhr*+P64k se comportó similar a aquellas vesículas que contenían EGFhr.

Como fue explicado anteriormente, las vesículas DRVs contienen un compartimento acuoso central relativamente grande, rodeado por bicapas concéntricas con pequeños espacios interbicapas (Gregoriadis y col., 1993), por lo que el soluto soluble encapsulado en estas partículas tiene que atravesar un mayor número de barreras que en los FATMLVs. Estas últimas vesículas, a diferencia de los DRVs, tienen un espacio acuoso central pequeño por lo cual es posible encontrar una mayor proporción de moléculas atrapadas en los compartimentos más externos de estas vesículas (Mayer y col., 1985). Las partículas

FATMLVs, aun cuando evidencien una relativa baja capacidad para retener el soluto encapsulado, muestran relaciones lípido:proteína adecuadas para ser aplicadas en esquemas de inmunización en animales de experimentación. Lo recomendable en este caso sería la utilización de preparaciones liposomales recién obtenidas.

III. 1.4 Estudio de la interacción del EGFhr con membranas liposomales.

Las vesículas DRVs y FATMLVs que contenían EGFhr mostraron una pérdida de su contenido relativamente elevada bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas (Figuras 7 y 10) si se compara con los resultados obtenidos, en este trabajo, con los liposomas que portaban P64k (Figura 10), así como lo informado por Kirby y Gregoriadis (1984). Por otra parte, el tamaño de las partículas, al menos para los DRVs de diferentes composiciones lipídicas y que contenían EGFhr (Figura 7), no varió durante todo el período en que se analizó el porcentaje de retención. Este hallazgo sugiere que la pérdida del contenido de estas vesículas (DRVs) no podía ser el resultado de procesos de agregación y fusión entre las partículas durante su almacenamiento. De manera que se investigó la posible interacción del EGFhr, proteína completamente soluble en agua, con las membranas liposomales como un posible mecanismo alternativo que justificara la desestabilización observada para estas vesículas. Con este propósito, se realizó un experimento de estabilidad en el cual liposomas de ePC:Cho con la sonda fluorescente carboxifluoresceína (CF) encapsulada, y que contenían o no EGFhr, se incubaron a 37°C con plasma o PBS, en una relación liposomas:PBS/plasma de 1:5 (vol:vol) (Figura 11). Esta relación volumétrica fue recomendada por Sénior y Gregoriadis (1994) para simular la dilución aproximada que deben experimentar las vesículas liposomales cuando son inyectadas a ratones, asumiendo un volumen de sangre de 2 mL. En ambas condiciones de incubación, la presencia de EGFhr en las vesículas provocó una mayor liberación de CF cuando se comparó con su respectivo ensayo control.

El mayor porcentaje de CF liberado se observó para los liposomas que contenían EGFhr y que fueron incubados con plasma. El plasma constituye el 55% del volumen de sangre y contiene iones y macromoléculas que pueden interactuar con los liposomas (Woodle y Lasic, 1992). En este sentido se ha sugerido que en la desestabilización de las vesículas liposomales la función más importante la desempeñan las lipoproteínas de alta densidad (HDL), al propiciar la salida de los fosfolípidos de las vesículas lipídicas (Mercadal y col., 1995) y las opsoninas que promueven la captura de los liposomas por los macrófagos (Liu y col., 1995). Hernández-Caselles y col. (1993) encontraron correlación entre la menor retención de CF de vesículas liposomales cargadas negativamente y la elevada asociación de

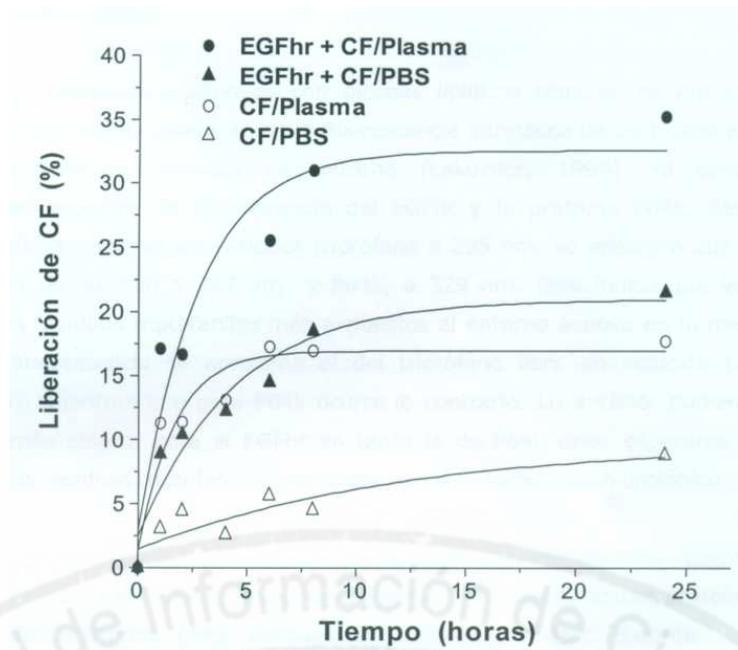


Figura 11. Liberación de carboxifluoresceína (CF) de liposomas DRVs que contienen o no EGFhr durante su incubación a 37°C con plasma o PBS.

La CF se encapsuló en DRVs de ePC:Cho (relación molar 1:1) que contenían o no EGFhr. Los liposomas se incubaron con plasma o PBS (relación DRVs:plasma/PBS 1:5, vol/vol). La liberación total de CF (100%) se determinó por la adición de tritón X-100 (concentración final de 100 mM). Las curvas representan el ajuste de los datos a una ecuación de Boltzmann. Se muestra un experimento representativo de 3 repeticiones independientes.

proteínas específicas del suero a estas partículas. La presencia de EGFhr rindió una preparación sensiblemente menos estable en cuanto a su capacidad de retención de CF, aun incubada sólo con PBS. Este resultado constituyó la primera evidencia de que el EGFhr, por algún mecanismo, era capaz de inducir una mayor susceptibilidad de la membrana liposomal a perder sus propiedades de barrera impermeable a solutos solubles, aun en ausencia de los agentes desestabilizantes de la bicapa lipídica presentes en el plasma sanguíneo (Liu y col., 1995; Mercadal y col., 1995).

La interacción de proteínas y péptidos con bicapas lipídicas también se puede evaluar mediante los cambios que se producen en la fluorescencia intrínseca de las proteínas cuando los residuos triptofanilos cambian de entorno (Lakowicz, 1999). Al estudiar las características del espectro de fluorescencia del EGFhr y la proteína P64k, después de excitados de manera selectiva los residuos triptófano a 295 nm, se encontró que el EGFhr tiene un máximo de emisión a 347 nm y P64k, a 329 nm. Esto indica que la primera proteína tiene los residuos triptofanilos más expuestos al entorno acuoso en la medida que el máximo de fluorescencia se aproxima al del triptófano libre en solución (350 nm) (Lakowicz, 1999), mientras que para P64k ocurre lo contrario. Lo anterior pudiera sugerir una estructura más abierta para el EGFhr en tanto la de P64k debe esperarse sea más compacta, con sus residuos triptofanilos protegidos en un entorno más hidrofóbico.

Un análisis de la posible interacción de EGFhr y de P64k con membranas liposomales se puede hacer al evaluar la atenuación de la fluorescencia intrínseca de ambas proteínas por el atenuador soluble acrilamida (AA), después de incubarlo a 45°C durante 1 hora en presencia o no de SUVs de DPPC:Cho (relación molar 1 : 1). En la Figura 12 se muestran los resultados expresados como la relación F_0/F , donde F_0 y F son las intensidades de la fluorescencia de las proteínas ensayadas en ausencia y presencia de AA, respectivamente, en función de la concentración de esta última y bajo las condiciones experimentales descritas: las proteínas pre-incubadas en solución o con SUVs. En ambas condiciones, la disminución en la fluorescencia intrínseca fue más notable para el EGFhr que para P64k, lo que se correlaciona con un mayor nivel de exposición de los residuos triptofanilos del EGFhr aun en presencia de los SUVs, si se compara con P64k. Mediante la ecuación de Stern- Volmer se determinó la constante K_{sv} para ambas proteínas. La mayor eficiencia de apagamiento de la fluorescencia se obtuvo para el EGFhr en solución ($K_{sv} = 18,8 \text{ M}^{-1}$). Por otra parte, la incubación de EGFhr con liposomas de DPPC:Cho en las condiciones anteriormente mencionadas redujo de manera notable la eficiencia de atenuación de la fluorescencia del EGFhr ($K_{sv} = 8,2 \text{ M}^{-1}$) lo que resulta una evidencia adicional de la

interacción EGFhr-membrana, la cual se manifiesta después de un período de contacto a una temperatura superior a T_e , condiciones que simulan las empleadas en el presente trabajo para la preparación de los liposomas. Para P64k se obtuvieron valores de K_{sv} muy similares antes y después de incubada con vesículas de DPPC:Cho ($K_{sv} = 1,5 \text{ M}^{-1}$ y $1,6 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). La no diferencia en la susceptibilidad de P64k al atenuador AA, cuando se encuentra en solución y frente a membranas liposomales, pudiera sugerir dos explicaciones: i) P64k puede no mostrar asociación con dichas membranas bajo estas condiciones experimentales o, ii) su transición a la membrana no conduce a cambios en la accesibilidad de los triptófanos al apagador, debido a que ya en solución éstos se encuentran notablemente protegidos (máximo de emisión de fluorescencia: 329 nm y $K_{sv} = 1,5 \text{ M}^{-1}$). Esta segunda posibilidad pudiera ser la más indicada, pues la asociación P64k-membrana no parece ser despreciable si la comparamos con la del EGFhr. En experimentos de asociación espontánea a vesículas vacías después de 24 horas de incubación, P64k mostró mayores porcentajes que EGFhr (pág. 56).

El análisis de la transición de los fosfolípidos del estado gel al líquido-cristalino mediante calorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad (HSDSC) y la determinación de los parámetros que caracterizan esa transición (T_e y AH) constituyen una herramienta muy eficaz para determinar la posible interacción del EGFhr con los componentes fosfolipídicos de las membranas liposomales (Pánico y col., 1992; Lohner y col., 1999). Para este estudio se seleccionaron dos de los fosfolípidos empleados en este trabajo que tienen valores de T_e bien definidos (DPPC: 42°C y DSPC: 55°C) (Marsh, 1990). Se eliminó el Cho de la composición liposomal para poder observar las características de estas transiciones. Se encuentra bien documentado en la literatura que en presencia de Cho las bicapas fosfolipídicas no experimentan transiciones de fases agudas, como resultado de las interacciones de esta molécula con los fosfolípidos y su capacidad "tampón" resultante (McMullen y McElhaney, 1996). Los valores de T_e y AH de los DRV's de DPPC y DSPC, que contenían o no EGFhr atrapado, se determinaron mediante ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento (DPPC: $25-60^\circ\text{C}$ y DSPC: $25-75^\circ\text{C}$) (Tabla 5). Como se puede observar, la T_e de ambas preparaciones liposomales no cambió en presencia de EGFhr; a diferencia de AH que disminuyó significativamente en ambos tipos de vesículas. Para la bicapa de DSPC, la disminución de AH fue de alrededor de un 50% cuando el EGFhr estaba encapsulado en estos liposomas, en comparación con estas mismas vesículas vacías. En los liposomas de DPPC que contenían EGFhr el AH obtenido fue alrededor de 20% inferior a su control, es decir, en ausencia de EGFhr. Los mayores cambios en el AH de los liposomas de DSPC se

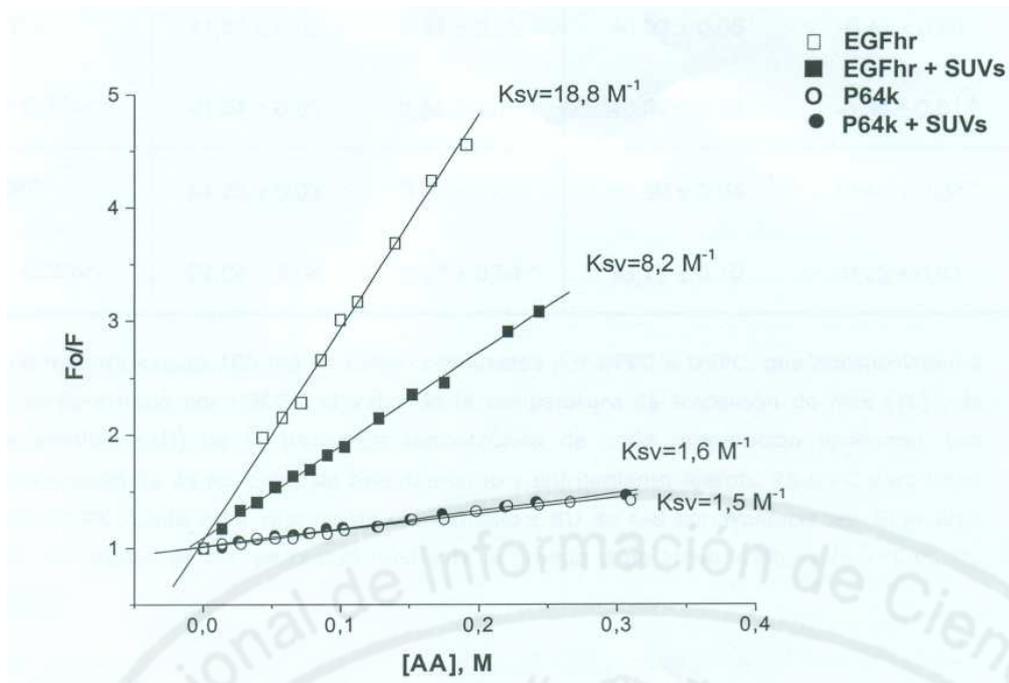


Figura 12. Atenuación de la fluorescencia del EGFr y la proteína P64k en solución y en presencia de SUVs de DPPC:Cho por acrilamida (AA).

Previo al ensayo, las proteínas se incubaron a 45°C durante 1 hora en presencia o no de SUVs. Fo y F representan la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de ambas proteínas antes y después de la adición de AA, respectivamente. La concentración de EGFr y de P64k utilizada en el ensayo fue 5 μM y la de lípidos totales, 28 μM . La excitación se realizó a 295 nm y la emisión fue a 347 nm (EGFr) y a 329 nm (P64k). Ksv se determinó mediante la ecuación de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{sv} (1/[AA])$ y representa la eficiencia de la atenuación de la fluorescencia. Se muestra un experimento representativo de 3 repeticiones independientes.

Tabla 5. Cambios en los parámetros de la transición de fase de vesículas de DPPC y DSPC inducidos por la encapsulación de EGFr.

Composición liposomal	Calentamiento		Enfriamiento	
	Tc (°C)	ΔH (J/g)	Tc (°C)	ΔH (J/g)
DPPC	41,55 ±0,02	0,41 ±0,05	40,93 ± 0,05	-0,41 ± 0,06
DPPC + EGFr	41,54 ±0,02	0,34 ±0,01*	40,89 ±0,03	-0,34 ±0,01*
DSPC	54,75 ±0,03	0,50 ±0,07	53,80 ± 0,04	-0,42 ± 0,06
DSPC + EGFr	54,64 ± 0,08	0,27 ± 0,04 *	53,79 ±0,10	-0,23 ±0,01*

Se pesaron de manera exacta 100 mg de DRVs compuestos por DPPC o DSPC, que encapsulaban o no EGFr, y se determinó por HSDSC el valor de la temperatura de transición de fase (Tc) y la variación de entalpia (ΔH) de la transición termotrópica de cada preparación liposomal. Los intervalos de temperatura de los ciclos de calentamiento y enfriamiento fueron: 25-60°C para DPPC y 25-75°C para DSPC. Cada valor representa el promedio ± SD de 4-8 determinaciones. El análisis estadístico de los valores de AH se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney (* p<0,05 vs. control sin EGFr)

correlacionan con una retención inferior de EGFhr por estas vesículas (80%) con relación a la obtenida para DPPC (85%), a los 28 días de almacenadas bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 7).

III. 1.5 Efecto de los azúcares sobre el tamaño de las vesículas liposomales y la capacidad para retener el EGFhr encapsulado.

Una de las vías más efectivas para incrementar la estabilidad de las vesículas liposomales es su liofilización o deshidratación en presencia de diversos azúcares de masas moleculares pequeñas (Crowe y Crowe, 1991; Ozaki y Hayashi, 1997).

La adición de 3 mg de sacarosa / mg de fosfolípido, conjuntamente con EGFhr, a las vesículas SUVs de DPPC:Cho y ePC:Cho previo a la etapa de liofilización para obtener DRVs, de manera similar a lo empleado por Zadi y Gregoriadis (2000), no modificó la eficiencia de encapsulación de EGFhr. Este parámetro se mantuvo entre 25 y 35%, de manera similar a lo observado en los DRVs de estas composiciones, obtenidos en ausencia de sacarosa (Figura 6). Sin embargo, en la Figura 13 se muestra como el tamaño de ambas vesículas liposomales se redujo de manera significativa desde 1000 hasta 100 nm aproximadamente. Una reducción de 10 veces en el diámetro promedio de los DRVs sin que se modifique la encapsulación de EGFhr pudiera atribuirse a la formación de un mayor número de vesículas para el acomodo de igual cantidad de soluto. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zadi y Gregoriadis (2000) para vesículas DRVs de ePC:Cho (relación molar 1:1) que contenían BSA. La adición de una relación similar sacarosa:fosfolípido 3:1, mg:mg («6 moléculas de sacarosa / molécula de ePC) redujo el diámetro de las vesículas de 5250 nm a 290 nm sin que se modificara de manera apreciable la cantidad de BSA encapsulada (84% y 87%, respectivamente).

Como se mostró en la Figura 7, los liposomas de ePC:Cho resultaron menos estables que aquellos preparados con fosfolípidos saturados. Fue por esa razón que se decidió evaluar la retención de EGFhr en DRVs compuestos por ePC:Cho obtenidos en presencia o no de sacarosa (Figura 14A). La adición de sacarosa como un paso previo a la liofilización de SUVs de ePC:Cho, como etapa tecnológica para la formación de DRVs, redujo significativamente la salida de EGFhr de estas vesículas después de 28 días de almacenadas a 4°C, a diferencia de lo observado para aquellas obtenidas en ausencia de sacarosa. Estas vesículas de ePC:Cho formadas en presencia de sacarosa mostraron una retención de EGFhr (86%) equivalente a aquellas de DPPC:Cho (Figura 7) que resultaron

las de mayor estabilidad en términos de la cantidad de EGFhr retenido (85%) durante su almacenamiento 28 días a 4°C.

Zadi y Gregoriadis (2000) sugirieron que la encapsulación de solutos en vesículas pequeñas mediante deshidratación-rehidratación y con la presencia de sacarosa dependía del tipo de soluto y de la relación azúcar:lípido empleada. Por otra parte, la retención de compuestos hidrofílicos en los liposomas durante los procesos de congelación- deshidratación depende también de los lioprotectantes empleados (van Winden y col., 1997). Tomando en consideración estos antecedentes, se evaluó la encapsulación de EGFhr y la capacidad de retención de vesículas de ePC:Cho con el empleo de otros azúcares de conocido efecto crioprotector: maltosa, trealosa y glucosa (Ozaki y Hayashi, 1997; Hinchay Crowe, 1998). Para este estudio, a liposomas MLVs que contenían EGFhr se les adicionaron los azúcares anteriormente mencionados, pero en una menor proporción azúcar:fosfolípido (0,5 mg / mg de ePC) y posteriormente se deshidrataron. Aun cuando la cantidad de azúcar utilizada («1 molécula de azúcar / molécula de ePC) resultó inferior a la del experimento anterior (3 mg /mg de ePC, que representan alrededor de 6 moléculas de sacarosa / molécula de ePC) la encapsulación de EGFhr se incrementó de 8% (MLVs donde no se adicionó azúcar) a 10-14% (MLVs deshidratados con azúcares). En general, la menor capacidad de encapsulación de estas vesículas con relación a los DRVs, obtenidos por el procedimiento clásico y descrito con anterioridad en este trabajo, pudiera explicarse por las diferencias existentes en determinadas etapas de los dos procedimientos tecnológicos. En un caso, se parte de MLVs formados en presencia del soluto a encapsular, y en el otro, de vesículas unilaminares pequeñas vacías (SUVs) que se mezclan con el EGFhr para formar los DRVs. New (1994) subrayó la dependencia de la eficiencia de encapsulación de los liposomas obtenidos por la clásica metodología de deshidratación-rehidratación (DRVs) con el diámetro de las pre-partículas vacías utilizadas en el paso previo a la deshidratación. Este autor recomendó la utilización de SUVs para la obtención de DRVs con elevados porcentajes de soluto encapsulado, pero no descartó la posibilidad del empleo de MLVs por la sencillez de su preparación. Al analizar las diferencias en la eficiencia de encapsulación por uno u otro procedimiento pudieran considerarse también las condiciones seguidas en la etapa de hidratación de los lípidos. La hidratación de estas moléculas para formar los MLVs se realizó con una solución de PBS que contenía EGFhr, a diferencia de los experimentos anteriores donde las pre-partículas (SUVs) se formaron en ausencia de fuerza iónica y luego se mezclaron con igual volumen de EGFhr previo al paso de liofilización. Ambas condiciones influyeron

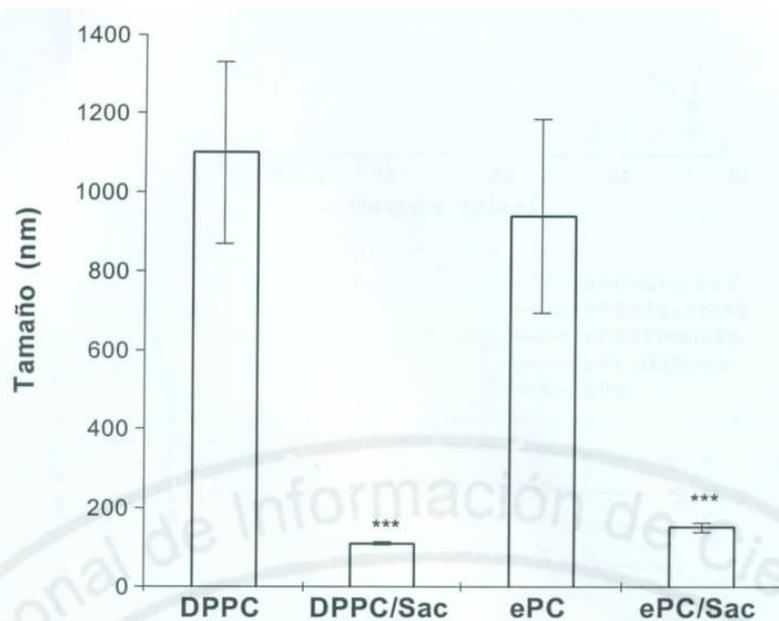


Figura 13. Tamaño de liposomas DRVs que contienen EGFr obtenidos en presencia o no de sacarosa.

Se prepararon DRVs compuestos por DPPC:Cho y ePC:Cho con 64 nmoles de lípidos totales y 0,05 μmoles de EGFr. Pevio a la etapa de liofilización, en algunas preparaciones se adició sacarosa (Sac) en una relación azúcar: fosfolípido 3 : 1 (mg : mg). Los tamaños de los DRVs se determinaron mediante espectroscopia de correlación fotónica; se representa el promedio ± SD de 3-6 preparaciones diferentes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de "Student" para valores no pareados: *** (p<0,001) vs. control obtenido en ausencia de sacarosa.

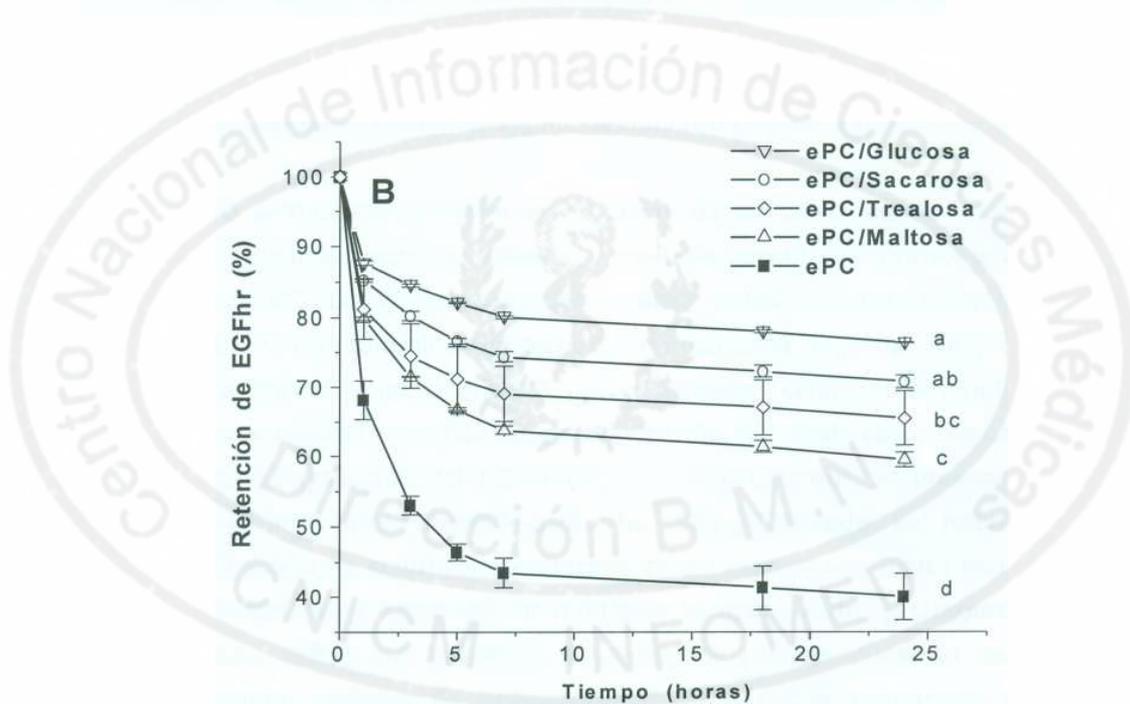
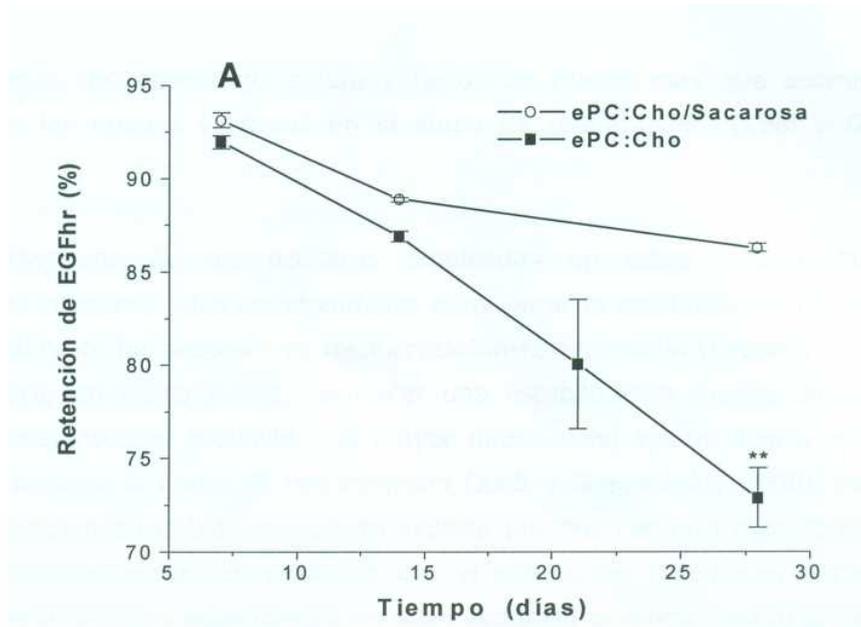


Figura 14. Efecto de diferentes azúcares en la retención de EGFr de liposomas de ePC:Cho durante su almacenamiento a 4°C.

A: Vesículas DRVs obtenidas en presencia o no de sacarosa (n=4). La sacarosa se adicionó conjuntamente con el EGFr, previo a la liofilización en una relación azúcar:ePC 3:1 (mg:mg). El análisis estadístico para el tiempo de 28 días se realizó mediante la prueba t de "Student" para valores no pareados (**p<0,01).

B: A liposomas MLVs que contenían EGFr se les adicionaron los azúcares indicados en la leyenda, en una relación azúcar:ePC 0,5:1 (mg:mg) y luego se deshidrataron. Para comparar la retención de EGFr al tiempo de 24 horas, letras desiguales indican significación estadística (p<0,05) según la prueba de rangos múltiples de Duncan (3 preparaciones liposomales/tratamiento).

en los procesos de reparto del soluto y fusión de membranas que acompañan a la formación de las nuevas vesículas en la etapa de rehidratación (Zadi y Gregoriadis, **2000**).

Las concentraciones de los azúcares empleadas en estos experimentos fueron relativamente inferiores a las recomendadas para lograr la estabilización de las vesículas liposomales durante los procesos de deshidratación-rehidratación (Crowe y Crowe, 1991) y esto pudiera, en cierta forma, favorecer una estabilización menos eficiente de las bicapas lipídicas, lo cual posibilitó una mayor difusión del soluto libre a través de las membranas durante la etapa de rehidratación (Zadi y Gregoriadis, 2000). Partiendo de estas consideraciones también se pudiera explicar por qué con la presencia de azúcares, durante la liofilización de las vesículas con el soluto, se obtuvieron porcentajes de encapsulación similares o superiores a los observados en ausencia de azúcar, aun cuando el tamaño de las partículas se redujo significativamente (Figura 13).

En la Figura 14B se muestra la retención de EGFhr de las vesículas MLVs deshidratadas en presencia de glucosa, sacarosa, trealosa y maltosa durante las primeras 24 horas de almacenamiento a 4°C. Las diferencias notables observadas en la retención de EGFhr por las vesículas de ePC:Cho obtenidas en ausencia de azúcares (Figuras 14A y B), pudieran ser explicadas a partir de los diferentes procedimientos tecnológicos empleados en la obtención de las partículas referidas en esta figura. En el primer caso, donde se aprecia mayor capacidad de retención del EGFhr (Figura 14A), estamos en presencia de DRVs que, por sus características morfológicas, ha sido justificada su relativa elevada capacidad de retención de soluto, preferentemente en el compartimiento acuoso central, en comparación con otras vesículas de múltiples bicapas (Kirby y Gregoriadis, 1984; Gregoriadis y col., 1993). Sin embargo, en la Figura 14B se muestran los resultados obtenidos empleando vesículas de múltiples bicapas que fueron preparadas mediante la hidratación de los lípidos en una solución de PBS que contenía EGFhr y una mejor dispersión de la suspensión mediante sonicación en baño ultrasónico. En este segundo experimento se pretende analizar el efecto de diferentes azúcares de conocido efecto protector sobre la capacidad de los liposomas de ePC:Cho para retener el EGFhr, de manera que se utilizaron vesículas liposomales de fácil y rápida preparación y que no son las preparaciones más favorables en términos de la capacidad de retención del soluto encapsulado (New, 1994). En este sentido, el estrés mecánico producido por la sonicación probablemente originó defectos en el empaquetamiento de los lípidos en las vesículas (Brandl y col., 1997), lo cual pudiera ser la causa de la menor capacidad de

retención de estos liposomas (70% del EGFhr retenido en la primera hora de almacenados) (Figura 14B).

La presencia de los azúcares incrementó de manera significativa la retención del EGFhr por las vesículas. Si bien en la literatura se sustenta con mayor frecuencia la trealosa o la sacarosa como disacáridos más recomendables para lograr un efecto estabilizador de las membranas (Crowe y col., 1997), no ha sido descartado el posible uso de otros azúcares de masas moleculares pequeñas como monosacáridos, trisacáridos y tetrasacáridos con estos mismos propósitos (Ozaki y Hayashi, 1997; Hinch y col., 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron esta idea, por cuanto se alcanzó una eficiente retención de EGFhr en vesículas deshidratadas en presencia de glucosa y además, sugirieron la adición de cualquiera de los azúcares empleados en este estudio, como una alternativa para incrementar la capacidad de retención de las vesículas liposomales que contenían EGFhr.

III.2 Estudio de la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones con el empleo de liposomas como adyuvante.

En la literatura ha sido bien documentado el empleo de las vesículas liposomales para mejorar la inducción de respuesta inmune contra sustancias poco inmunogénicas (Lasic, 1993; Gregoriadis, 1994b; Alving y col., 1995). Las potencialidades adyuvantes de estos sistemas están dadas por su capacidad de inducir inmunidad humoral y mediada por células, así como la posibilidad de acomodar inmunoestimuladores conjuntamente con el antígeno, entre otros aspectos (Lasic, 1993; Alving y col., 1995; Gregoriadis y col., 1996; Rao y col., 2002). En el presente trabajo se utilizó EGFhr como antígeno modelo con el propósito de profundizar en las propiedades adyuvantes de los liposomas. Esta molécula presenta una elevada homología estructural (70%) con la molécula homóloga murina (EGFm) (tomado de González y col., 1996), por lo que debe resultar un débil inmunógeno para el ratón. La respuesta inmune anti-EGFhr ha sido bien caracterizada por González y col. (1996, 1997, 1998 y 2003) en modelos animales y en humanos con el empleo de $Al(OH)_3$, adyuvantes de Freund y montanide ISA 51. En el presente estudio se emplearon, fundamentalmente vesículas DRV de DPPC:Cho con el objetivo de evaluar su capacidad para adyugar, por ser las que mejores resultados mostraron en cuanto a la eficiencia de encapsulación y capacidad de retención del EGFhr. La mayoría de los experimentos se realizaron utilizando un esquema de dos inmunizaciones con un intervalo de 28 días, similar al empleado por Gregoriadis y col. (1992) y Gursel y Gregoriadis (1995) con otros antígenos de naturaleza proteica.

III.2.1 Efecto de la dosis de EGFhr empleada en la respuesta de anticuerpos (IgG).

La cantidad de inmunógeno a utilizar para la inmunización de los animales es uno de los aspectos a tener en cuenta en cualquier estudio de respuesta inmune. En este trabajo se evaluó la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr en ratones Balb/c inmunizados con 2,5; 5 y 10 ug de EGFhr en PBS o encapsulado en liposomas DRV de DPPC:Cho (relación molar 1:1) (Figura 15). Los ratones inmunizados con EGFhr libre no produjeron anticuerpos (IgG) anti-EGFhr aun después de la segunda inmunización, lo cual puede explicarse por el hecho de ser una molécula pequeña ($PM \ll 6$ kDa) y tener 37 aminoácidos similares al EGFm, de un total de 53 residuos (Budavari y col., 1996; tomado de González y col., 1996). Sin embargo, la encapsulación de EGFhr en las vesículas liposomales de DPPC:Cho posibilitó la respuesta humoral anti-EGFhr. A los 40 días de iniciado el esquema, 12 días después de la segunda inmunización, la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr se incrementó de manera apreciable en los tres grupos inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas (2,5; 5 y 10 μ g) para alcanzar títulos de hasta 1:800 000 ($\text{Log}_{10} = 5,9$). Los títulos de anticuerpos anti-EGFhr se mantuvieron sin variación notable hasta los 56 días y no se observaron diferencias significativas entre éstos con el empleo de 2,5; 5 ó 10 ug de EGFhr encapsulado en liposomas en los tiempos analizados. González y col. (1996, 1997) utilizaron dosis de 10 ó 50 ug de EGFhr para caracterizar la respuesta anti-EGFhr en modelos murinos. Tomando esto en consideración, para nuestros ensayos iniciales se seleccionaron dosis de EGFhr inferiores a las utilizadas por estos autores, con el propósito de hacer más evidente la potenciación de la respuesta inmune por los liposomas. Los resultados muestran que las cantidades de EGFhr ensayadas eran adecuadas para inducir una respuesta humoral de altos títulos siempre y cuando el antígeno fuese portado por las vesículas. En el resto de los experimentos se utilizaron 5 ó 10 μ g del antígeno para garantizar una cantidad de EGFhr superior a la dosis inmunogénica mínima y porque con ambas dosis los animales mostraron una respuesta más homogénea en cuanto a los niveles de anticuerpos, lo que fue más evidente con la dosis de 10 μ g de EGFhr (inserto Figura 15).

Al evaluar las subclases de IgG presentes en el plasma de los animales inmunizados con Liposomas/EGFhr se encontraron niveles apreciables de IgG2a e IgG2b, además de IgG1, para las 3 dosis de EGFhr empleadas. En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos con la dosis de 10 ug de EGFhr encapsulado en DRV de DPPC:Cho, a los 12 días de la segunda inmunización. Para IgG1 se alcanzó un título promedio de 1:59 000,

mientras que para IgG2a e IgG2b se obtuvieron valores de 1:4 100 y 1:12 000, respectivamente. Los títulos de IgG1 obtenidos sugieren que bajo estas condiciones es estimulada preferencialmente la subpoblación de linfocitos Th2 (O'Garra y Murphy, 1994). Por otra parte, se obtuvieron buenos niveles de anticuerpos IgG2a e IgG2b, que en el ratón se han asociado con un patrón Th1 (O'Garra y Murphy, 1994; Phillips y Gagné, 1995). Estos resultados indican que el empleo de liposomas como adyuvante del EGFhr induce un patrón combinado de respuesta Th1/Th2. Este tipo de respuesta mixta ha sido sugerida para otros antígenos de naturaleza proteica encapsulados en liposomas (Phillips y Emili, 1992).

III.2.2 Respuesta de anticuerpos anti-EGFhr en ratones inmunizados con EGFhr conjugado o co-encapsulado con P64k en liposomas de DPPC:Cho.

La conjugación del EGFhr con proteínas transportadoras como TT y P64k de *N. meningitidis*, posibilitó que el 100% de ratones de la cepa no isogénica NMRI, que fueron inmunizados con el conjugado en ACF y AIF, produjeran anticuerpos anti-EGFhr (González y col., 1996). Tomando en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se estudió la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr inducida en ratones NMRI, cuando el antígeno se administraba solo en liposomas (EGFhr) o cuando era conjugado a P64k (EGFhr-P64k) y se incluía este conjugado en vesículas liposomales. Se incluyó un grupo para estudiar el efecto producido cuando las proteínas se co-administraban en liposomas no enlazadas covalentemente (EGFhr+P64k), ya que la encapsulación de EGFhr y P64k en una misma o en diferentes vesículas pudiera propiciar una modulación de la respuesta anti-EGFhr distinta a la que se obtiene con el conjugado.

En la Figura 17 se observa la respuesta de anticuerpos obtenida contra el EGFhr al emplear liposomas FATMLVs de DPPC:Cho (relación molar 1:1) como adyuvante y las variantes del antígeno anteriormente mencionadas. Los animales que recibieron el antígeno en las variantes solo o co-encapsulado con P64k (EGFhr y EGFhr+P64k) alcanzaron niveles de anticuerpos estadísticamente similares, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, a los 14 y 40 días, respectivamente. En el grupo que fue inmunizado con EGFhr-P64k, desde la primera dosis el 100% de los animales desarrollaron anticuerpos para un título superior a 1:240. Los títulos promedio en este grupo fueron 1:900, a los 14 días de iniciado el esquema de inmunización y 1:390 000, a los 40 días.

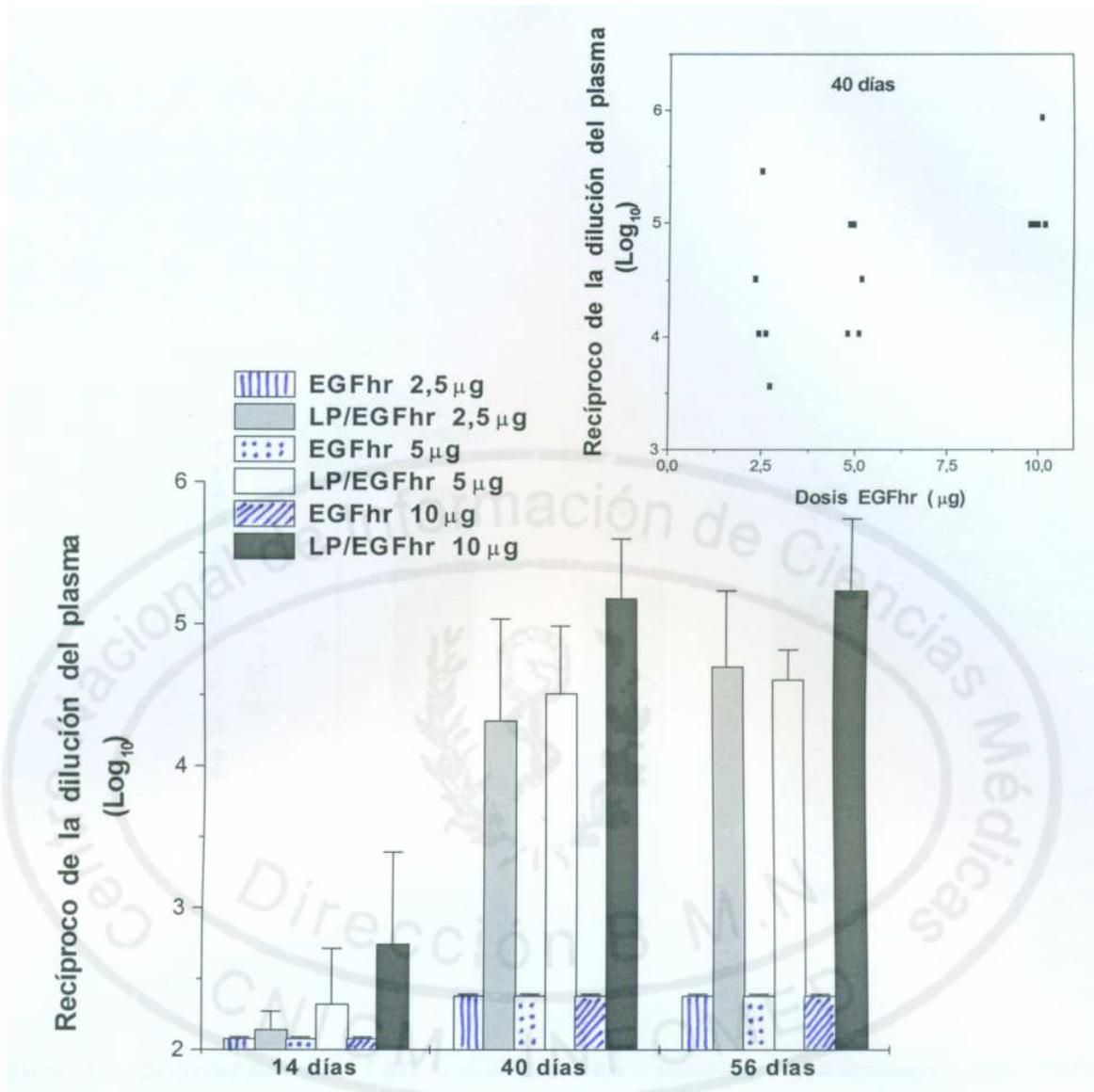


Figura 15. Anticuerpos anti-EGFr (IgG) en ratones inmunizados con diferentes dosis de EGFr.

Ratones Balb/c (n=5) se inmunizaron (i.m.) a los 0 y 28 días con 2,5; 5 y 10 µg de EGFr en PBS o encapsulado en liposomas DRVs de DPPC:Cho. Los resultados se muestran como el log₁₀ del recíproco de la dilución del plasma de los animales 14, 40 y 56 días después de la primera inmunización (valor de corte del ELISA: 0,2). El ANOVA de clasificación simple no mostró diferencias significativas entre los grupos que recibieron diferentes dosis de EGFr encapsulado en liposomas a los 14, 40 y 56 días, respectivamente. En el inserto se muestran los niveles de anticuerpos alcanzados a los 40 días con las 3 dosis de EGFr para cada animal.

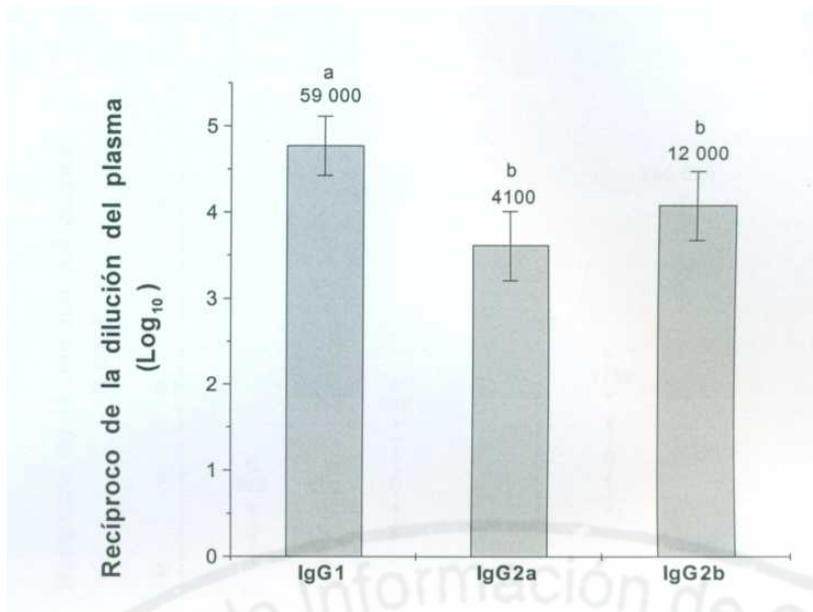


Figura 16. Subclases de IgG inducidas en ratones inmunizados con EGFr encapsulado en DRVs de DPPC:Cho.

Se representan los valores promedio ($n=5$) de IgG1, IgG2a e IgG2b obtenidos en el plasma de ratones Balb/c inmunizados con 10 μg de EGFr encapsulado en liposomas, 12 días después de la segunda dosis. La ordenada es el Log_{10} del recíproco de la dilución del plasma de los animales cuya $\text{Abs}_{492\text{nm}}$ es $> 0,2$. Sobre las barras se representa el recíproco del título promedio obtenido para cada subclase de IgG. Letras desiguales denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

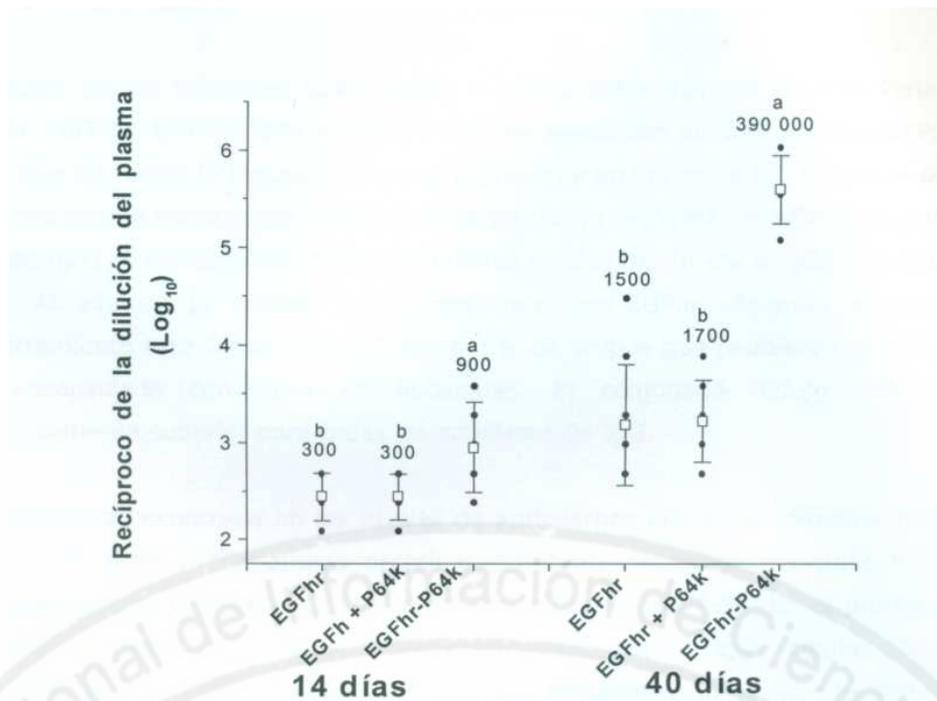


Figura 17. Anticuerpos anti-EGFr (IgG) en ratones inmunizados con EGFr solo, co-encapsulado o conjugado con P64k en liposomas de DPPC:Cho.

Ratones NMRI (10 animales/grupo) se inmunizaron a los 0 y 28 días (i.m.) con 10 μ g de EGFr, co-encapsulado (EGFr+P64k) o conjugado (EGFr-P64k) con P64k en FATMLVs de DPPC:Cho. Se representan los niveles de anticuerpos obtenidos como \log_{10} del recíproco de la dilución del plasma de cada animal y el valor medio por grupo \pm SD a los 14 y 40 días de la primera inmunización. Los números representan el recíproco del título promedio de cada grupo. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de anticuerpos obtenidos en cada grupo a los tiempos estudiados según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

González y col. (1996) informaron un 100% de individuos respondedores en una población NMRI que fue inmunizada con una dosis de 10 ug de EGFhr conjugado a TT o a P64k en ACF; sin embargo, al emplear este mismo esquema para el EGFhr en ACF, pero en ausencia de proteína transportadora, sólo el 10% de los animales resultaron respondedores. Debe señalarse que la utilización de los liposomas en este experimento propició un 80 % y 100% de animales respondedores en la primera y segunda inmunización, respectivamente, con las vesículas que contenían EGFhr, aun sin de la proteína transportadora.

Un estudio de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b obtenidas con las tres variantes del antígeno (EGFhr, EGFhr+P64k y EGFhr-P64k) encapsuladas en liposomas de DPPC:Cho, a los 12 días de recibir la segunda dosis, se representa en la Figura 18. El ANOVA bifactorial de los resultados mostró que para todos los grupos la respuesta mayor correspondió a la subclase IgG1, y también se obtuvieron buenos niveles de IgG2a e IgG2b dentro de cada grupo. Al evaluar la calidad de la respuesta anti-EGFhr obtenida se observa un comportamiento estadísticamente similar entre los grupos que recibieron el antígeno solo o co-encapsulado con P64k en liposomas. El conjugado indujo una respuesta estadísticamente superior para todas las subclases de IgG.

Esta diferencia encontrada en los niveles de anticuerpos entre los animales inmunizados con el conjugado y con ambas proteínas co-encapsuladas en vesículas liposomales, pudiera explicarse considerando las bases de la cooperación T-B. En el primer caso, las moléculas se encuentran unidas covalentemente, por lo que células B memoria específicas para el EGFhr pueden internalizar, procesar y presentar la proteína P64k del conjugado a células T específicas, y lograr con ello la llamada cooperación análoga (Roitt y col., 2001). En el segundo, donde las proteínas se encuentran incluidas de manera independiente, en un mismo liposoma, o aun en partículas diferentes, las células B específicas para el EGFhr no tienen forma de internalizar la proteína P64k si ella no está enlazada covalentemente al EGFhr, por lo que la cooperación de las células B estaría limitada a aquellos linfocitos T específicos para los epítomos T del EGFhr de manera que no se alcanza una cooperación T-B efectiva, que es lo que se pretende con la proteína P64k. Estos resultados corroboran que la función adyuvante de la proteína transportadora ("*carrier*") sólo ocurre cuando ambas moléculas se encuentran químicamente unidas (Roitt y col., 2001) y que no es posible alcanzar el efecto potenciador por su co- encapsulación con el antígeno principal en liposomas.

Por otro lado, ratones NMRI inmunizados con EGFhr o con la mezcla de las dos proteínas (EGFhr y P64k) en PBS, no desarrollaron respuesta humoral contra el antígeno y sin embargo, la administración de EGFhr solo o co-encapsulado con P64k en liposomas, indujo niveles de anticuerpos similares entre las dos preparaciones, como se apreció en las Figuras 17 y 18. Los resultados de la tesis demuestran que los epítomos T del EGFhr existen y que la adyuvantividad del liposoma permite prescindir de los de la proteína P64k. Esto pudiera ser indicativo de que la respuesta anti-EGFhr obtenida en ratones es fundamentalmente el resultado de la encapsulación del antígeno en liposomas y confirma el efecto potenciador de las vesículas liposomales en la respuesta inmune contra péptidos y proteínas poco inmunogénicas (Alving y col., 1995).

III. 2.2.1 Evaluación de la especificidad de la respuesta anti-EGFhr.

La respuesta inmune humoral "mejora" con el tiempo de exposición al antígeno (Roitt y col., 2001). Para estudiar la especificidad en la respuesta humoral al EGFhr, se evaluó el reconocimiento al EGFm con relación al EGFhr, por los anticuerpos inducidos por el antígeno humano. El EGFm, purificado a partir de glándulas submaxilares de ratones, se utilizó para determinar la especificidad relativa respecto al EGFhr en un ELISA indirecto no competitivo. Los resultados se expresaron como una relación de absorbancias a 492 nm con los plasmas de los animales inmunizados con EGFhr en las variantes descritas en el epígrafe III.2.2, en placas recubiertas con EGFhr o EGFm (Figura 19). Como se puede apreciar, los anticuerpos correspondientes a las respuestas primarias inducidas por las tres formulaciones ensayadas: EGFhr, EGFhr+P64k y EGFhr-P64k en liposomas de DPPC:Cho a los 14 días mostraron una baja reactividad. Los anticuerpos inducidos contra el EGFhr reconocieron tanto al EGFhr como al EGFm, lo que sugiere que el EGFhr indujo anticuerpos capaces de reconocer también epítomos comunes con el EGFm. Esto disminuyó luego de la segunda inmunización (40 días), donde se observó un reconocimiento mayor al EGFhr. Así, la disminución del reconocimiento al EGFm por los anticuerpos inducidos en los tres grupos a los 40 días es el resultado de la selección de los clones B que presentan mayor reactividad por epítomos específicos del EGFhr, al madurar la respuesta.

Los mayores niveles de anticuerpos anti-EGFhr obtenidos con el conjugado encapsulado en liposomas pudieran explicarse, por un lado, si se considera que durante el proceso de conjugación grupos que forman parte de epítomos conservados resulten comprometidos de forma tal que no sean reconocidos por las células B, produciéndose entonces

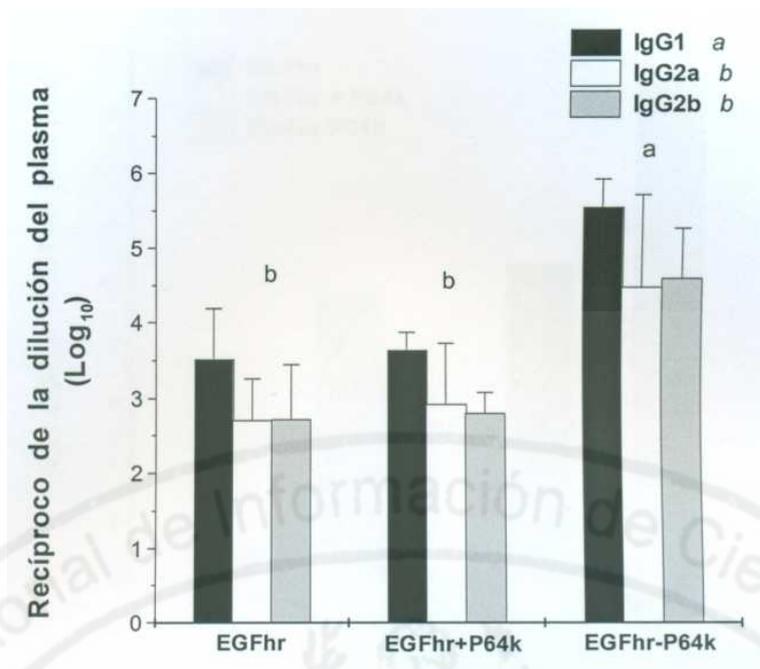


Figura 18. Subclases de IgG anti- EGFr en ratones NMRI inmunizados con EGFr solo > co-encapsulado o conjugado con P64k en liposomas de DPPC:Cho.

La ordenada es el logio del recíproco de la dilución del plasma de los animales (n=10), 12 días después de la segunda inmunización. Las letras sobre las barras indican la comparación entre los grupos experimentales y las letras itálicas de la leyenda, resultan de comparar los niveles de cada subclase de IgG mediante un ANOVA bifactorial. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$) al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan.

anticuerpos más específicos al EGFhr, incluso sin la necesidad de una segunda inmunización. Si se tienen en cuenta: i) el efecto direccionalizador del liposoma hacia las APC (Gregoriadis, 1994b) y ii) las excelentes propiedades de P64k como proteína portadora de epítomos T (González y col., 2000), ambos aspectos son suficientes para justificar los resultados alcanzados.

Por otra parte, los plasmas de los animales inmunizados con las variantes EGFhr y EGFhr+P64k encapsuladas en liposomas, mostraron una reactividad equivalente frente al EGFhr. Después de la segunda inmunización, los anticuerpos alcanzados con la variante Liposoma/EGFhr mostraron un comportamiento similar a los obtenidos con el conjugado en la respuesta primaria. Estos resultados evidenciaron la adyuvanticidad de las vesículas liposomales.

III.2.3 Influencia del esquema de inmunización en la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr.

En estudios previos sobre la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr realizados en ratones por González y col. (1996; 1997), se emplearon esquemas de inmunización de cuatro dosis, con intervalos de 7 días entre ellas y en estas condiciones estos autores informaron la obtención de buenos títulos de anticuerpos. Hasta el momento, en el presente trabajo se ha empleado un esquema de doble inmunización con un intervalo de 28 días, de manera que se quiso comparar los dos esquemas en términos de la respuesta de anticuerpos. Con este propósito, se inmunizaron ratones Balb/c con un mismo inmunógeno (EGFhr-P64k) encapsulado en liposomas de DPPC:Cho, empleando dos (0 y 28 días) y cuatro dosis (0,7,14 y 21 días) del antígeno (Figura 20A). Como referencia se utilizó un grupo que fue inmunizado con el conjugado adsorbido en $Al(OH)_3$ en dos dosis. La variante de cuatro inmunizaciones con Liposoma/EGFhr-P64k indujo títulos de anticuerpos superiores a los 14 días de iniciado el esquema de Inmunización, como corresponde a una respuesta secundaria por cuanto estos animales ya habían recibido en ese intervalo de tiempo dos dosis. Por otro lado, el esquema de inmunización de dos dosis con Liposoma/EGFhr-P64k o $Al(OH)_3$ /EGFhr-P64k indujo títulos estadísticamente similares a los obtenidos en el esquema de 4 dosis, evaluando los plasmas 12 y 68 días después de la segunda dosis (40 y 90 días). Estos resultados demuestran que es posible alcanzar respuestas equivalentes en cuanto a títulos de anticuerpos con el esquema de inmunización de dos dosis.

Con el propósito de estudiar el efecto del liposoma como sensibilizador ("*primer*") para el EGFhr, se evaluaron grupos experimentales que recibieron en la primera inmunización 10 ug del antígeno solo (EGFhr) o de la variante conjugada (EGFhr-P64k) encapsulados en ambos casos en DRV de DPPC:Cho, y que en la segunda dosis, a los 40 días de iniciado el esquema, fueron inmunizados con diferentes alternativas del inmunógeno: Liposoma/EGFhr-P64k o Al(OH)₃/EGFhr (Figura 20B). Como referencia se utilizó un grupo inmunizado, en las dos ocasiones, con Al(OH)₃/EGFhr-P64k. El grupo sensibilizado con el EGFhr solo encapsulado en liposomas y retado con Al(OH)₃/EGFhr, desarrolló una respuesta inmune que si bien fue inferior a los 14 días, a partir de la segunda inmunización alcanzó niveles de anticuerpos estadísticamente similares a los observados en los otros dos grupos a los 40 y 90 días (Figura 20B). De esto se pudiera inferir que la sensibilización del organismo con el antígeno encapsulado en liposomas favorece la preparación del sistema inmune de una manera tal que se logran resultados similares a los obtenidos con el empleo de la proteína P64k, aun cuando el EGFhr se administre en la segunda dosis en Al(OH)₃. Este resultado pudiera deberse a que el liposoma propicie una mejor presentación del EGFhr. El papel de los liposomas como potenciadores de la respuesta inmune, si bien ha sido informado desde 1974 (Allison y Gregoriadis, 1974), no han sido completamente esclarecidas todas las posibles causas que propician este efecto. Recientemente, Rao y Alving (2000) sugirieron que la presentación de los componentes lipídicos de las vesículas liposomales a las células T por moléculas CD1 existentes en las APC, podría contribuir a la acción inmunopotenciadora de estas vesículas contra diferentes antígenos.

Con el interés de estudiar no sólo el curso temporal de la respuesta inmune, sino también el efecto de diferentes condiciones empleadas en los esquemas de inmunización sobre la calidad de esta respuesta, se determinaron los niveles de las subclases de IgG: IgG1, IgG2a e IgG2b (Figura 21) en los animales inmunizados con los esquemas referidos en la Figura 20. Los resultados se expresaron como la relación de (IgG2a+IgG2b)/IgG1. Al analizar lo mostrado en la Figura 21A es posible destacar que no existen diferencias significativas entre los esquemas de dos y cuatro dosis con la variante Liposoma/EGFhr-P64k en cuanto a la calidad de la respuesta obtenida. Sin embargo, ambos grupos se diferenciaron de aquel que recibió dos dosis con el inmunógeno Al(OH)₃/EGFhr-P64k. Por otra parte, la mejor variante en términos de la calidad de la respuesta inmune, de acuerdo al parámetro que se muestra en la Figura 21B, fue la inmunización con dos dosis de Liposoma/EGFhr-P64k. Esta preparación indujo

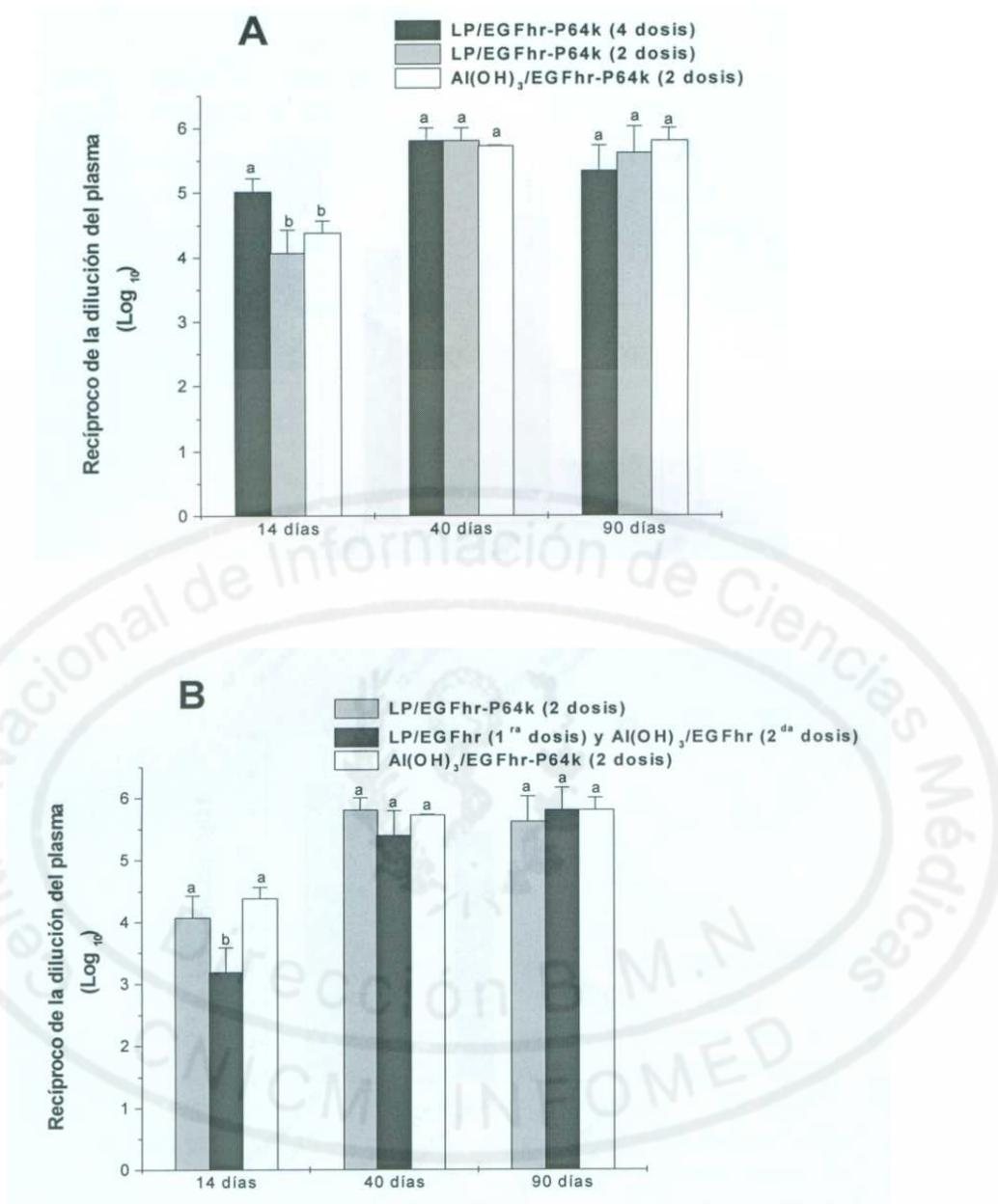


Figura 20. Respuesta de anticuerpos anti-EGFhr (IgG) en ratones inmunizados con EGFhr o EGFhr-P64k encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH)₃.

Se inmunizaron ratones Balb/c (6 animales/grupo) con 10 µg de EGFhr solo o en forma de conjugado (EGFhr-P64k) utilizando como adyuvantes liposomas (LP) DRV de DPPC:Cho o Al(OH)₃ (control). Letras desiguales sobre las barras denotan diferencias significativas (p<0,05) a los tiempos estudiados según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

A: Comparación entre esquemas de 4 (0, 7, 14 y 21 días) y 2 dosis (0 y 28 días).

B: Comparación entre esquemas de 2 dosis (0 y 28 días) con el empleo de diferentes alternativas de inmunógeno en la primera y segunda inmunización (se indica en la leyenda).

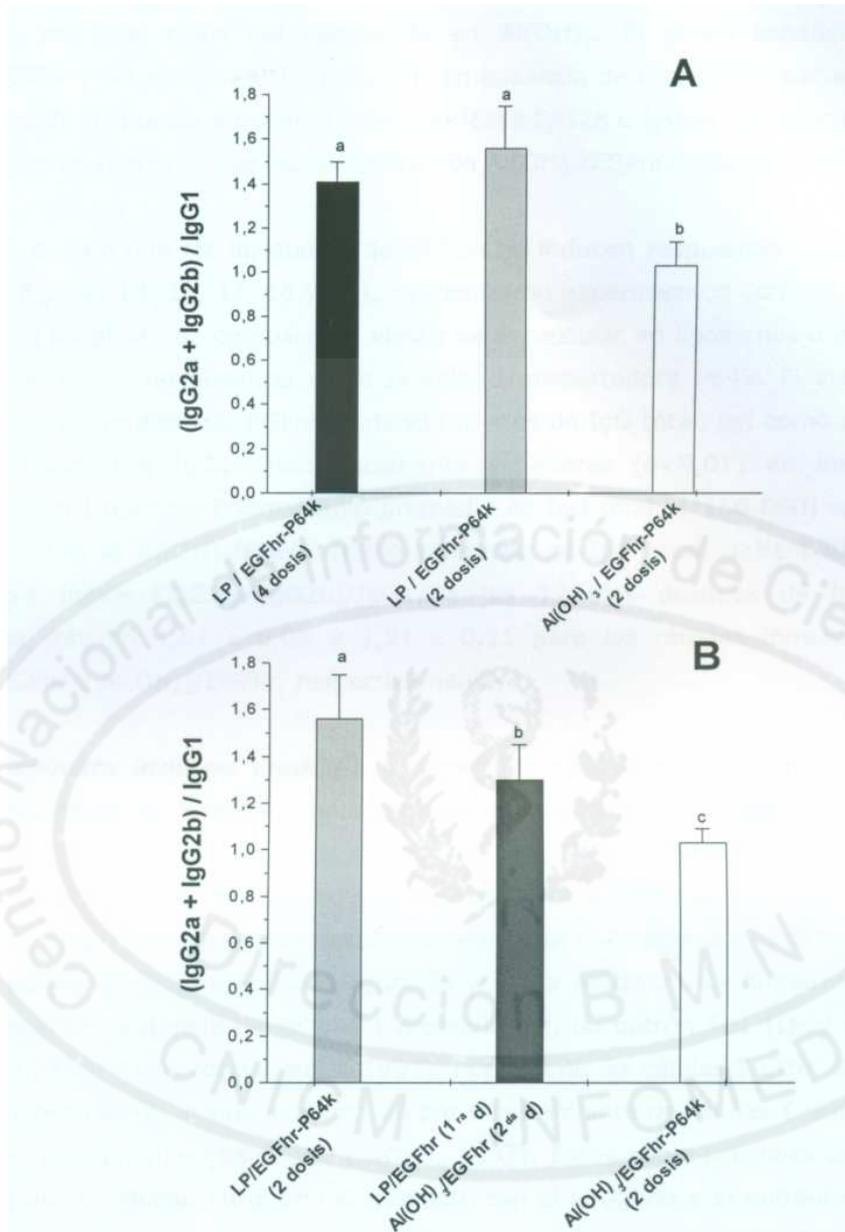


Figura 21. Relación entre las subclases de IgG en ratones inmunizados con EGFlhr o EGFlhr-P64k encapsulado en liposomas (LP) o adsorbido en Al(OH)₃.

Se inmunizaron (i.m.) ratones Balb/c (n=6) con 10 ug del antígeno. Se representa la razón entre la suma de los Log₁₀ del recíproco de la dilución del plasma para IgG2a e IgG2b y el Log₁₀ del recíproco de la dilución del plasma para IgG1 a los 40 días de la primera inmunización. Letras diferentes sobre las barras indican significación estadística (p<0,05) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

A: Comparación entre esquemas de 4 (0, 7, 14 y 21 días) y 2 dosis (0 y 28 días).

B: Comparación entre esquemas de 2 dosis (0 y 28 días) con el empleo de diferentes alternativas de inmunógeno en la primera y segunda inmunización.

una respuesta estadísticamente superior incluso a la observada en los animales inmunizados con dos dosis del conjugado en Al(OH)₃. El grupo sensibilizado con Liposoma/EGFhr y retado con Al(OH)₃/EGFhr, en ausencia de la proteína transportadora, indujo niveles de respuesta en cuanto a las subclases IgG2a e IgG2b con relación a IgG1, significativamente mayores que los obtenidos con Al(OH)₃/EGFhr-P64k (Figura 21B).

Teniendo en cuenta que los liposomas de DPPC:Cho inducen respuestas de altos títulos anti-EGFhr (Figuras 15, 16, 17, 18 y 20), se realizaron experimentos con ratones Balb/c (n= 6), con el propósito de comparar el efecto de encapsular en liposomas o de adsorber en Al(OH)₃, al EGFhr en ausencia de la proteína transportadora P64k. El estudio de la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr evidenció niveles de IgG total, así como de IgG2a e IgG2b con *relación a IgG1, estadísticamente superiores (p<0,01) en los animales* inmunizados con Liposoma/EGFhr (título promedio de IgG total: 1:150 000) con relación a los que recibieron Al(OH)₃/EGFhr (título promedio de IgG total: 1:51 000). El valor promedio del índice (IgG2a+IgG2b)/IgG1, a los 12 días después de la segunda inmunización, resultó $1,41 \pm 0,09$ y $1,21 \pm 0,11$ para los ratones inmunizados con Liposoma/EGFhr y Al(OH)₃/EGFhr, respectivamente.

III.2.4 Respuesta inmune mediada por células en animales inmunizados con EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas de DPPC:Cho.

La posibilidad de obtener una respuesta inmune mediada por células inducida por las preparaciones liposomales con EGFhr solo o conjugado a P64k se evaluó a través del estudio de la respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) contra el EGFhr. El ensayo de HR es relativamente sencillo (ver Figura 5) y se ha utilizado por numerosos autores para demostrar la existencia de células T memoria con un patrón Th1 (Li y col., 1994; Higashi y col., 1995; Baldrige y Ward, 1997). El papel de las células T CD4⁺ del tipo Th1 en las reacciones de HR ha sido demostrado por el aislamiento de células T específicas del antígeno con ese fenotipo (Baldrige y Ward, 1997). Estas subpoblaciones de linfocitos Th1 circulantes se inducen en el primer contacto con el antígeno y al enfrentarse con él, en un segundo contacto, se activan y liberan citoquinas promotoras de inflamación, que reclutan y activan a los macrófagos en el sitio de entrada del antígeno (Roitt y col., 2001).

En la Tabla 6 se representa la inflamación del cojinete plantar de ratones NMRI que fueron inmunizados con 10 (ig del EGFhr o del conjugado encapsulado en DRVs de

DPPC:Cho o adsorbido en $Al(OH)_3$, con el esquema de dos dosis anteriormente descrito. El reto en el cojinete plantar se realizó con EGFhr en PBS a los 7 días de la segunda inmunización. Los valores de inflamación obtenidos indican que en todos los grupos se produjo una reacción de HR estadísticamente similar.

Para el análisis histológico de los cojinetes plantares de los animales bajo estudio, se utilizó la tinción doble con hematoxilina-eosina. En la Figura 22 A se ilustra uno de los resultados obtenidos en el grupo inmunizado con Liposoma/EGFhr-P64k, donde se evidencia un infiltrado de células mononucleares, con predominancia de macrófagos. El patrón histológico observado se corresponde con una reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV (Sugimoto y col., 1995; Roitt y col., 2001). Resultados similares se obtuvieron con las otras dos variantes de inmunógenos ($Al(OH)_3$ /EGFhr-P64k y Liposoma/EGFhr). Como controles negativos se emplearon 4 animales de cada grupo experimental los cuales se retaron con un antígeno irrelevante (BSA) de manera similar a lo descrito para EGFhr. Los cojinetes plantares de esos animales no mostraron inflamación y en el análisis histológico de los tejidos no aparecieron los infiltrados de células mononucleares (Figura 22 B).

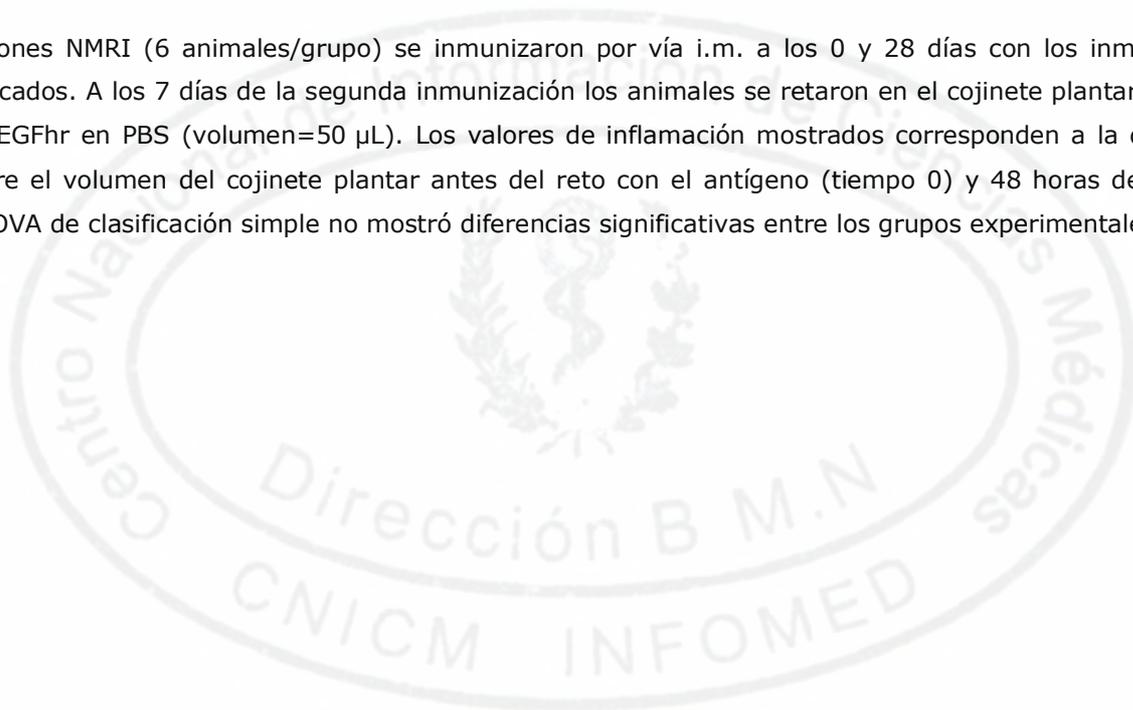
Resultados positivos en respuestas de HR en animales inmunizados con diferentes antígenos empleando liposomas como adyuvante han sido descritos por otros autores, pero en todos los casos la superficie de las partículas liposomales ha sido modificada, bien por la incorporación de lípidos catiónicos (Ishii y col., 1997), anticuerpos monoclonales (Ozpolat y col., 1998) o neoglicolípidos (Sugimoto y col., 1995). Sin embargo, son escasos los trabajos que refieren la Inducción de respuesta inmune mediada por células, utilizando como adyuvante preparaciones liposomales de composición lipídica simple y un antígeno con las características del EGFhr que, además de tener una masa molecular pequeña, posee una elevada homología con la proteína autóloga (tomado de González y col., 1996). Debe señalarse que el grupo Inmunizado con dos dosis de la preparación liposomal que contenía el antígeno solo (EGFhr), en ausencia de la proteína transportadora P64k, desarrolló una respuesta de HR específica contra el EGFhr similar o equivalente a los otros dos grupos que recibieron el conjugado encapsulado en liposomas o adsorbido en $Al(OH)_3$ (Tabla 6).

Considerando los resultados obtenidos hasta el momento sobre la capacidad de los liposomas de inducir niveles significativos de IgG2a e IgG2b, y de respuesta de HR, se decidió estudiar la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglios linfáticos, obtenidos

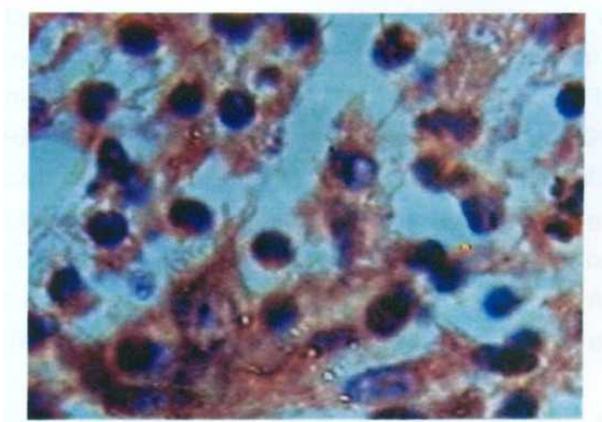
Tabla 6. Respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) en ratones NMRI inmunizados con EGFhr o EGFhr-P64k encapsulado en liposomas de DPPC:Cho o adsorbido en Al(OH)₃.

Inmunógenos	Inflamación (x 10 ² mL ₋₁)
Liposoma/EGFhr	10 ± 5
Liposoma/EGFhr-P64k	14 ± 9
Al(OH) ₃ /EGFhr-P64k	8 ± 6

Ratones NMRI (6 animales/grupo) se inmunizaron por vía i.m. a los 0 y 28 días con los inmunógenos indicados. A los 7 días de la segunda inmunización los animales se retaron en el cojinete plantar con 5 µg de EGFhr en PBS (volumen=50 µL). Los valores de inflamación mostrados corresponden a la diferencia entre el volumen del cojinete plantar antes del reto con el antígeno (tiempo 0) y 48 horas después. El ANOVA de clasificación simple no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales.



A:



B:

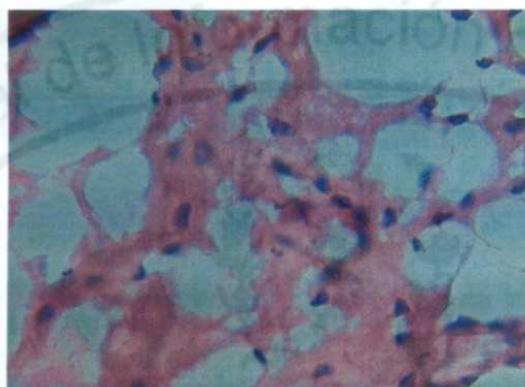


Figura 22. Histología del cojinete plantar de los ratones inmunizados con el conjugado EGFr-P64k encapsulado en liposomas de DPPC¹.Cho y que fueron retados en el cojinete plantar con:

A: EGFr/PBS. Con la doble tinción hematoxilina-eosina se aprecia el infiltrado de células mononucleares (x100). Resultados similares se observaron en los grupos inmunizados con Al(OH)₃/EGFr-P64k y Liposoma/EGFr.

B: BSA/PBS. No se observan células mononucleares características de la respuesta de hipersensibilidad retardada (x100) (Control).

Para el estudio histológico se utilizaron los tejidos de los animales referidos en la Tabla 6.

de ratones Balb/c, 12 días después de la segunda inmunización con EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en DRVs de DPPC:Cho o adsorbido en Al(OH)₃. Para ello, las células se estimularon *in vitro* con 9, 18, 37 y 75 ng/mL de EGFhr y se encontró que la proliferación inducida era dependiente de la concentración de EGFhr. En la Figura 23 se muestra la incorporación de timidina-³H cuando las células se estimularon con 75 ng/mL de EGFhr. Se obtuvieron respuestas de linfoproliferación en los grupos inmunizados con el EGFhr o con el conjugado encapsulados en liposomas y el conjugado adsorbido en Al(OH)₃, mientras que los animales inmunizados con EGFhr en Al(OH)₃ mostraron una respuesta proliferativa menor en comparación con el resto de los grupos.

Los resultados de los ensayos de HR y de linfoproliferación, así como el cambio de isotipo observado en cuanto a los niveles de IgG2a e IgG2b (Figura 21B) sugieren que la utilización de los liposomas como adyuvante potencia la preparación de células T específicas para el EGFhr, aun cuando los animales fueran inmunizados con este antígeno en ausencia de la proteína transportadora P64k. Este efecto ha sido descrito por otros autores para antígenos tumorales pero utilizando liposomas pH-sensibles (Lasic, 1998; Barenholz, 2000), activadores del sistema inmune co-encapsulados con el antígeno en liposomas (Lasic, 1993; Alving y col., 1995; Gregoriadis y col., 1996), o liposomas catiónicos conteniendo dioleilfosfatidiletanolamina en el desarrollo de vacunas-ADN (Ishii y col., 1997; Barenholz, 2000; Kunisawa y col., 2001).

III.2.5 Efecto sobre la actividad antitumoral de la inmunización con EGFhr encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH)₃.

Con el propósito de comparar el efecto adyuvante producido por los liposomas y el Al(OH)₃ sobre la actividad antitumoral, se realizó la inmunización de ratones Balb/c con EGFhr encapsulado en DRVs de DPPC:Cho o adsorbido en Al(OH)₃ y se evaluó la supervivencia de los animales después de realizado el trasplante de las células de TAE, un tumor de origen epitelial con alto contenido de R-EGF (10⁴ sitios/célula) (Lombardero y col., 1986). El esquema de inmunización seguido fue de 4 dosis con 5 ó 50 ng de EGFhr, cada una en intervalos de 7 días, en correspondencia con los resultados positivos obtenidos previamente por González y col. (1996; 1997). Para este estudio se utilizó como antígeno el EGFhr en ausencia de la proteína transportadora P64k, teniendo en cuenta que el efecto inmunopotenciador de las vesículas liposomales que contenían EGFhr resultó equivalente al obtenido con el conjugado encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH)₃ (Figuras 20, 21, 23 y Tabla 6).

En la Figura 24 se muestran las curvas obtenidas al calcular la supervivencia de los ratones Balb/c de los diferentes grupos. En ambos casos la supervivencia fue superior a la de los grupos controles. Se obtuvo un ILS de 87% cuando el EGFhr se administró en liposomas, y 35% con Al(OH)₃. Los resultados obtenidos en los ratones inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas de DPPC:Cho como adyuvante son alentadores, si se tiene en cuenta que la dosis de EGFhr utilizada fue 10 veces inferior a la empleada con Al(OH)₃.

Estos resultados corroboran la hipótesis del efecto de "castración" del EGF por anticuerpos específicos, y con ella la inhibición del crecimiento tumoral dependiente de EGF (González y col., 1996; 1997). Estos autores plantearon que los anticuerpos anti-EGF deben secuestrar el ligando lo que provoca una disminución del mismo en el entorno de la célula tumoral, y con ello, se inhibe la proliferación de estas células. Los resultados mostrados en la Figura 24 pudieran indicar que en los animales inmunizados con EGFhr encapsulado en vesículas liposomales se inducen anticuerpos anti-EGFhr en mayor cantidad o con una capacidad superior para neutralizar el EGFm en la vecindad del tumor.

III.2.6 Efecto de la composición fosfolipídica de los liposomas en la respuesta inmune anti-EGFhr.

En un estudio *in vivo* sobre la eficiencia de las vesículas liposomales para potenciar la respuesta inmune contra antígenos de origen viral, Gregoriadis y col. (1992) encontraron una dependencia de la respuesta inmune inducida contra estos antígenos con el nivel de saturación de los fosfolípidos que constituían las vesículas utilizadas como adyuvantes. Con el objetivo de conocer la influencia de la composición fosfolipídica de los liposomas sobre la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones NMRI, se emplearon fosfolípidos saturados sintéticos (DPPC y DSPC) e insaturado de origen natural (sPC) en la preparación de DRVs, en una relación molar de 1:1 respecto al Cho.

En la Figura 25 se muestran los títulos de IgG total anti-EGFhr, a los 40 y 90 días, de ratones NMRI inmunizados en un esquema de doble dosis (0 y 28 días) y utilizando EGFhr-P64k encapsulado en DRVs de las composiciones fosfolipídicas anteriormente mencionadas o adsorbido en Al(OH)₃. Después de la segunda dosis, en el 100% de los animales se observó una respuesta de anticuerpos con títulos iguales o mayores que 1:1 000 (Log₁₀ > 3). Los mejores resultados en cuanto a los niveles de IgG total se

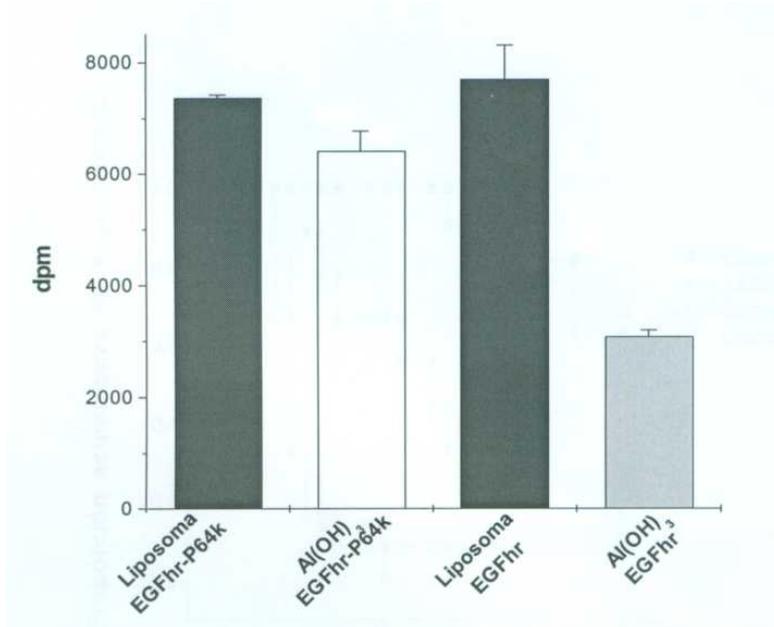


Figura 23. Respuesta de linfoproliferación de células de nodulos linfáticos provenientes de ratones inmunizados con EGFr o EGFr-P64k al ser estimuladas con EGFr.

Se utilizaron 3×10^5 células de ganglios inguinales de ratones Balb/c (3 animales por grupo de tratamiento) inmunizados con $10 \mu\text{g}$ de EGFr solo o conjugado a P64k (EGFr-P64k), encapsulado en DRVs de DPPC:Cho o adsorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$. El ensayo se realizó a los 12 días de la segunda inmunización. En el gráfico se representa la incorporación de timidina- ^3H en cada grupo, la cual se obtuvo por diferencia entre la timidina- ^3H incorporada por las células estimuladas con EGFr (75 ng/mL) y la obtenida con células a las que sólo se les adicionó medio RPMI 1640. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

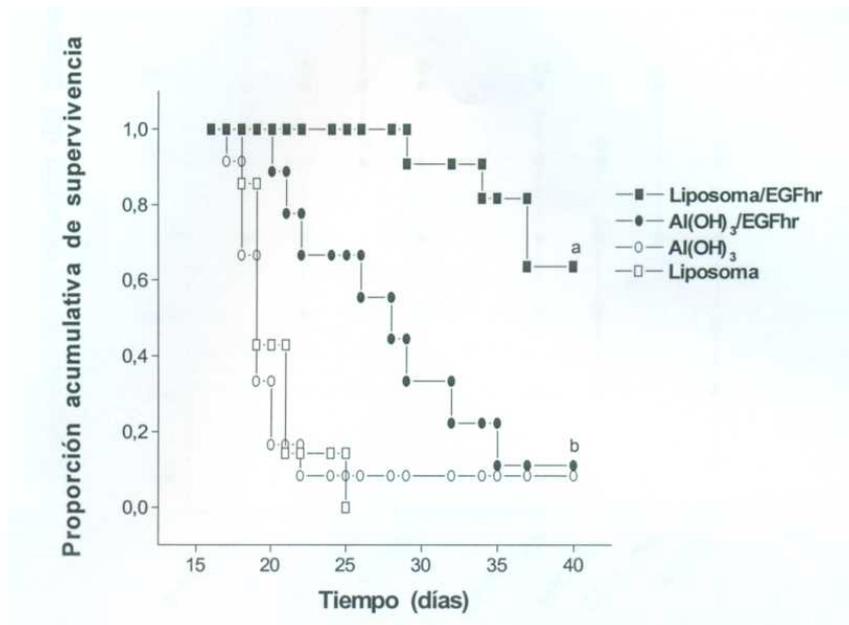


Figura 24. Curvas de supervivencia de ratones inmunizados con EGFr encapsulado en liposomas o adsorbido en Al(OH)₃ y que fueron retados con células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

Ratones Balb/c (12 animales/grupo) se inmunizaron semanalmente durante 1 mes por vía i.p. con 50 μ g de EGFr adsorbido en Al(OH)₃ o con 5 μ g de EGFr encapsulado en DRV de DPPC:Cho. Los grupos controles recibieron sólo el adyuvante correspondiente. El reto se realizó con 2×10^5 células de TAE 3 días después de la última inmunización. Se representa la supervivencia acumulada en los días sucesivos al trasplante del tumor. Letras diferentes sobre las curvas de tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba **log-rank** ($p < 0,05$).

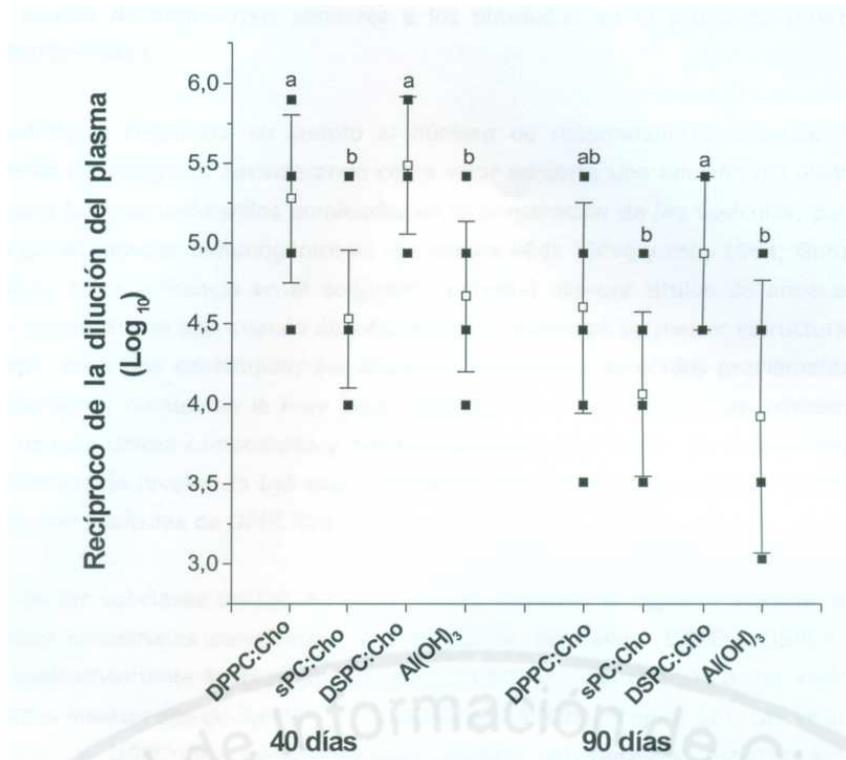


Figura 25. Respuesta inmune anti-EGFhr (IgG) en ratones inmunizados con EGFhr-P64k encapsulado en DRVs de diferentes composiciones fosfolipídicas o adsorbido en Al(OH)₃.

Se inmunizaron ratones NMRI por vía i.m. (7 animales/grupo) con 10 µg de EGFhr conjugado a P64k con un esquema de dos dosis cada 28 días. Se representan los niveles de anticuerpos como log₁₀ del recíproco de la dilución del plasma de cada animal y el valor medio por grupo ± SD a los 40 y 90 días de la primera dosis. En el ELISA, como valor de corte se utilizó 0,2. Letras desiguales indican diferencias significativas (p<0,05) entre los niveles de anticuerpos obtenidos en cada grupo para los tiempos analizados de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

obtuvieron en los grupos que recibieron el antígeno encapsulado en liposomas de DSPC:Cho y DPPC:Cho. Los títulos alcanzados con estas preparaciones resultaron estadísticamente similares entre sí. Por otra parte, con los liposomas de sPC:Cho se indujeron niveles de anticuerpos similares a los obtenidos en el grupo de referencia (Al(OH)₃/EGFhr-P64k).

La similitud de la respuesta en cuanto al número de respondedores después de la segunda dosis del antígeno, considerando como valor de corte una dilución del plasma > 1:1 000, para los tres fosfolípidos empleados en la preparación de las vesículas, pudiera explicarse por el carácter inmunogénico de la proteína P64k (Silva y col., 1994; González y col., 2002), cuya presencia en el conjugado permitió obtener títulos de anticuerpos anti-EGFhr significativos aun cuando se inmovilizó en liposomas de menor estructuración de su bicapa, como los constituidos por sPC:Cho. Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio mostraron la muy baja eficiencia como adyuvante que exhibían los liposomas de esta última composición y que encapsulaban sólo EGFhr, sin la presencia de P64k, en término de niveles de IgG total anti-EGFhr (título promedio: 1:890), cuando se compararon con vesículas de DPPC:Cho.

El análisis de las subclases de IgG de estos grupos confirmó la superior eficacia de las preparaciones liposomales constituidas por fosfolípidos saturados (DPPC y DSPC) para potenciar cualitativamente la respuesta inmune anti-EGFhr, con relación a las vesículas de fosfolípidos insaturados de fuente natural (sPC) o el Al(OH)₃ (Figura 26). Las vesículas de DPPC:Cho y DSPC:Cho lograron Inducir niveles superiores y estadísticamente equivalentes no sólo de IgG1, sino también de IgG2a e IgG2b respecto a los observados en los otros dos grupos. La respuesta obtenida en el grupo inmunizado con vesículas de sPC:Cho tuvo un comportamiento muy similar al del Al(OH)₃.

González y col. (1996) mediante un ensayo de competencia *in vitro* demostraron que los anticuerpos anti-EGFhr, inducidos en ratones, mediante la inmunización con este antígeno en adyuvantes de Freund, eran capaces de inhibir la unión del EGF a sus receptores en células de TAE. En la Figura 27 se muestra la caracterización de los anticuerpos producidos en los ratones NMRI, que fueron inmunizados con EGFhr-P64k en las diferentes variantes que se describieron en la Figura 25, en cuanto a su capacidad para bloquear la interacción del EGFhr-¹²⁵I con su receptor. Para esto se realizó un ensayo similar al empleado por González y col. (1996), pero utilizando membranas de

placenta humana como fuente de R-EGF. Los anticuerpos presentes en el suero de los diferentes grupos de animales provocaron la inhibición de la unión del EGFhr al R-EGF. Esta inhibición fue mayor cuando los sueros procedían de ratones inmunizados con EGFhr-P64k encapsulado en DRV's de DPPC:Cho y DSPC:Cho, mientras que para las formulaciones sPC:Cho y Al(OH)₃/EGFhr-P64k el comportamiento fue inferior y estadísticamente similar entre ellos. La mayor capacidad bloqueadora de los anticuerpos inducidos por la inmunización con EGFhr-P64k encapsulado en liposomas constituidos por fosfolípidos saturados, resulta prometedora para lograr una eficacia superior en la inhibición de la proliferación de la célula tumoral *in vivo*, si se parte de la teoría de la "castración" del EGF como un fenómeno molecular determinante para la reducción del crecimiento de tumores que sobre-expresan su receptor (González y col., 1996; 1997). Con los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas se mejoró cualitativamente la respuesta inmune al EGFhr en comparación a la obtenida con los liposomas de fosfolípidos insaturados y con Al(OH)₃.

Los principales resultados derivados de la caracterización de las vesículas liposomales que contenían EGFhr, así como el estudio de los liposomas como adyuvante de este antígeno, permitieron demostrar el mejor rendimiento de encapsulación y capacidad de retención de los DRV's de DPPC:Cho. El estudio de la respuesta inmune anti-EGFhr con el empleo de estas vesículas evidenció un efecto potenciador superior en comparación con el Al(OH)₃. Con esta preparación se obtuvieron altos títulos de anticuerpos anti-EGFhr, la promoción de las subclases IgG2a e IgG2b, la inducción de respuesta de HR, así como un incremento en la sobrevivencia frente al TAE de los ratones inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas, aun en ausencia de la proteína transportadora P64k. Los fosfolípidos saturados (DPPC y DSPC) indujeron respuestas de anticuerpos anti-EGFhr cualitativamente superiores a las obtenidas con liposomas de fosfolípidos insaturados (sPC) y con Al(OH)₃.

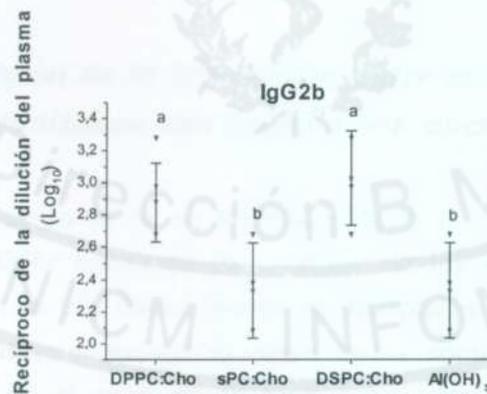
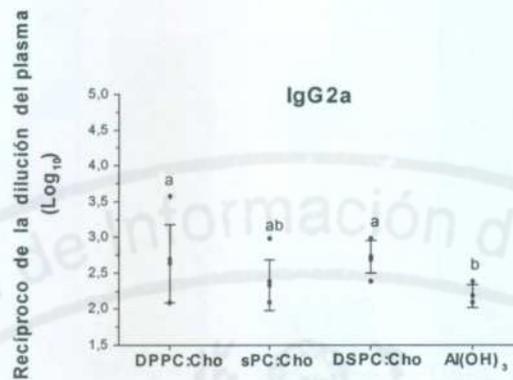
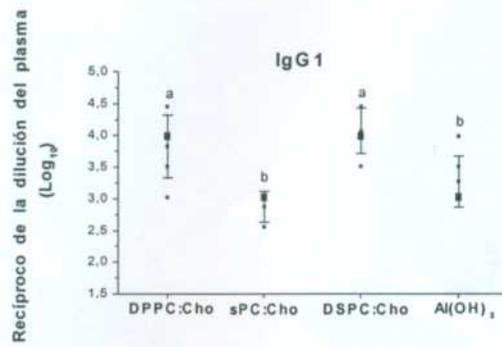


Figura 26. Subclases de IgG inducidas en ratones inmunizados con EGFhr-P64k encapsulado en DRVs de diferentes composiciones fosfolipídicas o adsorbido en Al(OH)₃.

Se siguió el esquema de inmunización descrito en la Figura 25. La ordenada es el recíproco de la dilución del plasma (\log_{10}) de grupos de 7 ratones NMRI, 12 días después de la segunda dosis. Valor de corte del ELISA: 0,2. Se representa el título individual de cada animal y el valor medio por grupo \pm SD. Letras diferentes indican significación estadística ($p < 0,05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

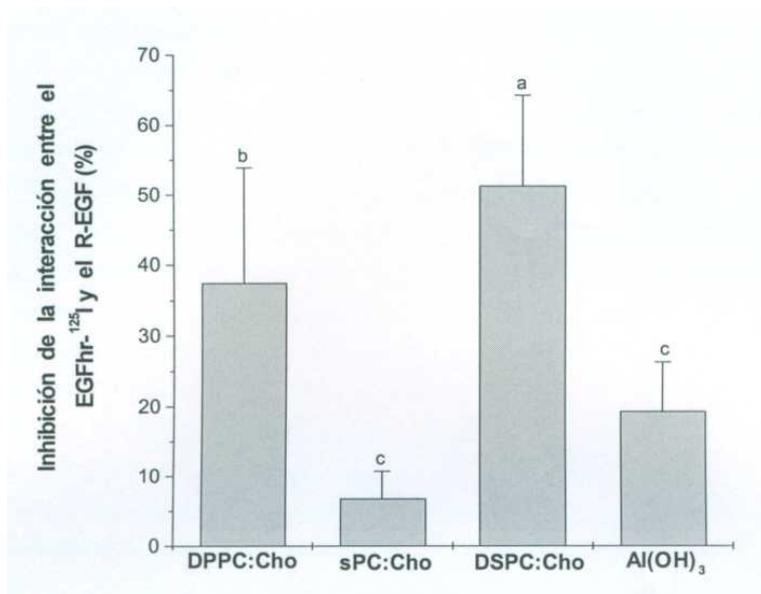


Figura 27. Inhibición de la interacción entre el EGF y su receptor por el suero de los animales inmunizados con EGFhr-P64k encapsulado en DRVs o adsorbido en Al(OH)₃.

La ordenada representa el % de inhibición de la interacción EGFhr/R-EGF derivado de los anticuerpos anti-EGFhr presentes en el suero de los animales inmunizados según el esquema descrito en la Figura 25. Como fuente de receptores se utilizaron membranas de placenta humana. Para el ensayo se extrajo el suero de los animales (7 ratones/grupo) a los 90 días. El ensayo se realizó con el suero diluido 1:10 y 1:5; los resultados mostrados corresponden a esta última dilución. Como controles y para el cálculo del % de inhibición se utilizaron sueros de animales no inmunizados y un exceso de EGFhr no radiactivo (control de máximo bloqueo o inhibición de la interacción EGFhr-¹²⁵I/R-EGF). Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

IV. DISCUSIÓN

En la actualidad existen más de 75 adyuvantes, muchos de ellos aún en fase de investigación. Entre estos se incluyen varias formulaciones liposomales ya aprobadas o en ensayos clínicos. Los liposomas exhiben baja toxicidad y una potencia comparable o superior a la obtenida con otros adyuvantes (Alving, 2002). El empleo de las vesículas liposomales como adyuvante inmunológico requiere el estudio previo de las características de estos sistemas para cada antígeno en particular. Para el EGFhr fue necesario definir la metodología, así como la composición lipídica a emplear en la obtención de los preparados liposomales por cuanto no se disponía de antecedentes. El objetivo de esta primera etapa fue lograr vesículas lipídicas con una adecuada eficiencia de encapsulación y capacidad de retención del antígeno seleccionado. Así, de los procedimientos tecnológicos empleados para la encapsulación de EGFhr (la congelación- descongelación -FATMLVs-, la deshidratación-rehidratación -DRVs- y la extrusión de partículas DRVs a través de membranas de policarbonato de 200 nm y 400 nm - LUVETs), los mejores resultados se obtuvieron con la tecnología DRVs, en cuanto a la cantidad de EGFhr atrapado y a la capacidad de las vesículas para retener este antígeno durante su almacenamiento (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 y Tablas 3 y 4). El empleo de la deshidratación-rehidratación ha sido documentado para la encapsulación de ADN, proteínas, subunidades de vacunas virales y moléculas lábiles en general (Gregoriadis y col., 1992, 1996). Esta capacidad superior de los DRVs fue explicada por Gregoriadis y col. (1993) atendiendo a sus características morfológicas. Por un lado, un volumen interno mayor de los liposomas obtenidos por este procedimiento y localizado preferentemente en el compartimento acuoso central, permite alcanzar un mejor reparto en el proceso de encapsulación de proteínas solubles, como es el caso del EGFhr. Por otra parte, la existencia de un número mayor de barreras lipídicas en los DRVs limita la liberación del soluto encapsulado en comparación con las vesículas, aun de múltiples bicapas, obtenidas mediante otros procedimientos empleados en este trabajo (Figuras 6, 7, 10 y Tablas 3 y 4).

La encapsulación de EGFhr en vesículas DRVs constituidas por fosfatidilcolinas saturadas o insaturadas y colesterol en proporciones equimolares, demostró que la naturaleza de este fosfolípido es un factor importante que determina el rendimiento de encapsulación, así como la capacidad de retención del EGFhr por las vesículas (Figuras 6 y 7). Porcentajes de encapsulación similares a los obtenidos para el EGFhr en las diferentes

composiciones fosfolipídicas estudiadas (15-35%) (Figura 6) han sido informados para otras moléculas al encapsularse en liposomas obtenidos por esta misma tecnología (DRVs): 17% de encapsulación para la proteína gpl20 del VIH-1 obtenida por vía recombinante (Lachman y col., 1995); 25%, para la IL-6 (Lachman y col., 1995); 31%, para antígenos de la membrana del virus de la influenza (Gregoriadis y col., 1996).

Los DRVs constituidos por DPPC:Cho mostraron los mejores resultados en cuanto a eficiencia de encapsulación (35%) y capacidad de retención de EGFhr a los 28 días de almacenados a 4°C (85%). De manera general, las vesículas constituidas por fosfolípidos insaturados (ePC y sPC) con valores de T_c negativos ($-25^{\circ}\text{C} < T_c < -5^{\circ}\text{C}$) (Marsh, 1990) mostraron una menor capacidad de retención del EGFhr que aquellas constituidas por los fosfolípidos saturados DMPC, DPPC y DSPC con valores de T_c superiores (24°C , 42°C y 55°C , respectivamente) (Marsh, 1990). Se ha demostrado que la fluidez de las membranas es uno de los factores que afecta la retención de solutos por las vesículas (Pánico y col., 1992; Mercadal y col., 1995). Ejemplo de ello son los resultados obtenidos por Pánico y col. (1992) al estudiar la retención del polipéptido timoestimulina, en MLVs de DMPC y DPPC. Estos autores encontraron que las vesículas constituidas por DPPC eran más eficientes, en términos de la retención del soluto encapsulado, que aquellas de DMPC.

A la temperatura de conservación de los DRVs (4°C), las membranas que contienen ePC y sPC se encuentran probablemente en el estado líquido-cristalino que se caracteriza por un menor grado de empaquetamiento de sus componentes lipídicos, de manera que la permeabilidad de las vesículas bajo estas condiciones debe resultar mayor en comparación con aquellas constituidas por fosfolípidos saturados (Grit y Crommelin, 1993). Por otra parte, se ha descrito ampliamente que la incorporación de elevadas proporciones de colesterol en las vesículas liposomales permite incrementar su capacidad de retención frente a la acción de los componentes del plasma, ya que reduce las interacciones de los fosfolípidos que componen las vesículas, con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las opsoninas (Hernández-Caselles y col., 1993; Liu y col., 1995; Mercadal y col., 1995). La presencia de 50 mol% de colesterol en las preparaciones liposomales empleadas en este trabajo moduló el comportamiento de las fosfatidilcolinas, de manera que las vesículas constituidas por ePC y sPC deben resultar más estructuradas al incluirse en ellas este segundo componente lipídico. En otras palabras, en ausencia de colesterol era de esperar una menor capacidad de retención del soluto encapsulado por estas vesículas, aun inferior a 70% (Figura 7).

Al comparar los DRVs constituidos por fosfatidilcolinas saturadas se observó que las preparaciones de DMPC(C14:0):Cho y DSPC(C18:0):Cho exhibieron una menor eficiencia de encapsulación y capacidad de retención del EGFhr que las de DPPC(C16:0):Cho (Figuras 6 y 7). Las diferencias entre las vesículas cuyas bicapas están formadas por DPPC y DSPC pudieran ser explicadas por la formación de defectos estructurales en las membranas fosfolípicas que se originan en la etapa de sonicación, especialmente cuando se emplean temperaturas inferiores y muy lejanas a la T_e de los fosfolípidos que constituyen la bicapa (Scherphof y col., 1993). Una de las etapas para la obtención de los DRVs en el presente trabajo, consistió en la formación de SUVs mediante sonicación de liposomas MLVs vacíos, en baño de hielo ($T \ll 4^\circ\text{C}$), previo a la deshidratación de las vesículas en presencia del soluto a encapsular. Posteriormente, para la rehidratación de las preparaciones, éstas se incubaron un tiempo fijo a temperaturas superiores a la T_e de sus fosfolípidos constituyentes, similar a lo descrito por Kirby y Gregoriadis (1984). La incubación de las bicapas lipídicas en presencia del soluto a encapsular en las condiciones antes mencionadas, si bien puede contribuir a la reparación de los defectos originados en el paso de sonicación, el tiempo puede no resultar igualmente suficiente para cada una de las preparaciones. Probablemente, los DRVs de DSPC que exhiben una $T_e \gg 55^\circ\text{C}$, más distante de la temperatura que se empleó para la sonicación, requieren un tiempo superior al ensayado para lograr una óptima reparación de los defectos en el empaquetamiento lipídico y esto puede reflejarse en su menor capacidad de retención del EGFhr encapsulado, en las condiciones de conservación descritas. Por otro lado, las vesículas de DPPC probablemente resultaron menos perturbadas en las condiciones de sonicación y con la incubación a 45°C ($T \gg T_e$ de DPPC) se logró la reparación de un mayor número de zonas defectuosas en sus membranas. Esta última razón pudiera justificar que los DRVs constituidos por DPPC:Cho no sólo muestren una mayor capacidad de retención del EGFhr, sino también una superior eficiencia de encapsulación de dicho soluto en las vesículas (35%) comparado con aquellas que contienen DSPC:Cho (28%) (Figura 6). El menor rendimiento de encapsulación (25%) y retención del EGFhr por las vesículas constituidas por DMPC:Cho en comparación con aquellas de DPPC:Cho (Figuras 6 y 7) pudiera explicarse, fundamentalmente, por la menor longitud de cadena de los ácidos grasos presentes en la DMPC (14:0), lo que induciría un grado de estructuración de la bicapa lipídica relativamente inferior (Ramstedt y Slotte, 1999). Para esta preparación, si bien deben existir zonas defectuosas generadas por la sonicación,

probablemente sean inferiores que las originadas en las preparaciones de T_e superiores (DSPC y DPPC).

La salida de EGFhr de las vesículas DRVs de diferentes composiciones lipídicas durante su almacenamiento (Figura 7) sin que se apreciaran cambios en el tamaño de las partículas, sugirió que la causa de esta liberación podía ser el resultado de la interacción de esta proteína con las bicapas lipídicas, más que la fusión o agregación de los liposomas. La mayor liberación de carboxifluoresceína de las vesículas que contenían el EGFhr co-encapsulado con este fluoróforo (Figura 11); así como la disminución en la atenuación de la fluorescencia por acrilamida, cuando el EGFhr se pre-incubó con membranas liposomales de DPPC:Cho (Figura 12) y finalmente, la disminución significativa del AH de la transición de fase en las membranas de DPPC y DSPC que contenían EGFhr (Tabla 5), constituyen evidencias de la interacción de este polipéptido con las bicapas liposomales.

La calorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad (HSDSC) es una técnica termodinámica muy potente que permite profundizar en la naturaleza de las interacciones que se establecen entre diferentes moléculas, como por ejemplo las proteínas o los péptidos y los lípidos que componen las bicapas liposomales (Lohner y col., 1999). Atendiendo al nivel de hidrofobicidad de la molécula proteica, el comportamiento termotrópico de los fosfolípidos se puede afectar de manera diferencial. La modificación en el valor de AH de la transición de fase también resulta una evidencia de la capacidad de estas moléculas para penetrar en las zonas de la bicapa lipídica (polar, interfacial y núcleo hidrofóbico hidrocarbonado) (Pánico y col., 1992; Lohner y col., 1999). Socaciu y col. (2000), estudiando el efecto de la incorporación de diferentes carotenos en vesículas liposomales de DPPC sobre la transición de fase de estas membranas con el empleo de la HSDSC, pudieron aproximarse al nivel de acomodo y profundidad de inserción en la bicapa lipídica de cada una de las especies moleculares estudiadas. Estos investigadores sugirieron que las especies de carotenos que se insertaban en la bicapa, afectando tanto la zona polar como el núcleo hidrofóbico, disminuían la T_e y provocaban el ensanchamiento de manera significativa del pico de la transición de fase de las vesículas de DPPC. En tanto, las otras especies que decrecieron el valor de AH, sin modificar T_e ni la amplitud del pico de la transición, debían asociarse fuertemente a la membrana provocando una reducción en la hidratación de la zona polar de la bicapa y como consecuencia, un debilitamiento en las interacciones entre los grupos polares de los fosfolípidos. Por otra parte, Lohner y col. (1999) encontraron que la 6-lisina, péptido citolítico de *Staphylococcus aureus*, producía un efecto sobre la transición de fase

termotrópica de vesículas de DPPC similar al obtenido con el EGFhr: una disminución en el AH de la transición de fase sin cambios en la Tc del estado gel al líquido-cristalino. Rydall y Macdonald (1992) mediante RMN^{-31P}, demostraron que esta citolisina perturbaba el grupo fosforilcolina sin modificar la carga neta superficial de la bicapa, de lo cual dedujeron que esta proteína no producía cambios en la inclinación de este grupo.

Tomando en consideración lo publicado por Lohner y col. (1999) y Socaciu y col. (2000), así como la disminución en los valores de AH sin cambios en Tc observados en las membranas que contienen EGFhr (Tabla 5), se pudiera presuponer una asociación del EGFhr con la zona polar de las bicapas lipídicas liposomales, lo que induciría una expansión lateral de esta región de la membrana y una disminución en las Interacciones electrostáticas entre los grupos fosforilcolina de las moléculas fosfolípicas adyacentes (Lohner y Prenner, 1999). Esto redundaría en un mayor espaciamiento entre los fosfolípidos, efecto que se extendería al interior de la membrana, disminuyendo así las interacciones de van de Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de sus grupos acilo. Además, si se toma en consideración el efecto bien conocido del colesterol sobre las bicapas de fosfolípidos saturados (McMullen y McElhaney, 1996) no hay que descartar una acción sinérgica de este esteroide con el EGFhr.

Los resultados obtenidos en este trabajo al analizar los cambios en la fluorescencia intrínseca del EGFhr provocada por la adición del apagador soluble acrilamida, en presencia o ausencia de membranas, sugieren un reacomodo de la estructura tridimensional del polipéptido que implica que los residuos triptofanilos, ubicados en el extremo carboxilo terminal (posiciones 49 y 50) (Capala y col., 1996), queden menos expuestos al solvente (Figura 12).

La interacción del EGFhr con las bicapas lipídicas de las vesículas dependió del tipo de fosfatidilcolina empleada (Tabla 5 y Figura 7). Numerosas proteínas y péptidos con actividades antimicrobianas, antitumorales o citolíticas, así como péptidos señales y muchas hormonas peptídicas han exhibido selectividad en la interacción con bicapas lipídicas (Cajal y col., 1996; Lohner y Prenner, 1999; Alvarez y col., 2001). Así por ejemplo, entre los péptidos con actividad antimicrobiana, las magaininas, permeabilizan de manera efectiva las membranas ricas en PG, mientras que la sapecina muestra mayor afinidad por la cardiolipina (Lohner y Prenner, 1999). De manera contrastante, la α -lactoalbúmina y los péptidos citolíticos anfipáticos como la melitina, proveniente del

veneno de abejas, y la β -lisina de *S. aureus* muestran mayor Interacción con la fosfatidilcolina (Marsh y Horváth, 1998; Lohner y col., 1999). En general, cuando estas moléculas interactúan con determinadas clases de fosfolípidos en la membrana son capaces de inducir un reordenamiento de los lípidos favoreciendo el tránsito a estructuras no bicapas (fases hexagonales o cúbicas) y en muchos casos, esto se acompaña con la formación de poros funcionales (Alvarez y col., 2001; Bonev y col., 2003).

En la literatura, la selectividad en la interacción de las proteínas con lípidos de igual grupo polar pero con diferentes composiciones de ácidos grasos, ha recibido mucho menos atención (Marsh y Horváth, 1998). En particular, se ha estudiado la interacción selectiva de la rodopsina, una proteína integral de membrana, con los lípidos que la componen mediante diversos procedimientos. En membranas constituidas por fosfolípidos de C18:0, la rodopsina se separa de los lípidos, existiendo interacciones muy pequeñas entre ambos, mientras que en membranas de C12:0, los lípidos quedan atrapados en los agregados de proteínas (Ryba y Marsh, 1992; Marsh y Horváth, 1998). En este trabajo, al estudiar la Interacción del EGFhr con vesículas liposomales de DPPC y DSPC se observó una mayor interacción del polipéptido con aquellas constituidas por DSPC, lo que se evidenció por cambios mayores en el AH de la transición de fase de estas bicapas (Tabla 5). Este efecto notable del EGFhr sobre los DRV de DSPC pudiera estar justificado también, por la presencia de una mayor proporción de defectos en la superficie de estas vesículas, los cuales pueden favorecer la asociación del polipéptido con la zona polar de las bicapas.

La incorporación de los azúcares sacarosa, trealosa, maltosa y glucosa en vesículas liposomales de ePC:Cho redujo significativamente la salida del EGFhr encapsulado (Figura 14). Este efecto protector ha sido atribuido a que los azúcares reemplazan el agua de hidratación de los grupos polares de los fosfolípidos, estableciéndose enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato de éstos y los hidroxilos de los azúcares (Tsvetkova y col., 1998). Como consecuencia, se forma un estado vítreo muy viscoso equivalente a un estado líquido-cristalino poco susceptible a experimentar transiciones (Sun y col., 1996). En este estado, las moléculas lipídicas exhiben un movimiento limitado lo que se acompaña con una disminución de los procesos de fusión y agregación liposomal y un incremento en la capacidad de las vesículas para retener su contenido (Sun y col., 1996; van Winden y Crommelin, 1999). Es posible presuponer que la presencia de los azúcares en la interfaz de las bicapas lipídicas limite el efecto perturbador del EGFhr sobre estas

estructuras. De manera que, la adición de estos azúcares a las preparaciones liposomales pudiera constituir una vía para incrementar la estabilidad de estas vesículas, en términos de la cantidad de EGFhr retenido.

La co-encapsulación del EGFhr con la proteína P64k de *N. meningitidis* redujo de manera sensible la eficiencia de encapsulación para este antígeno por los DRV's de DPPC:Cho (Tablas 3). La presencia de esta proteína de mayor masa molecular pudiera limitar el reparto efectivo del EGFhr en el volumen interno acuoso de los liposomas, aun con el empleo de una tecnología de alto rendimiento de encapsulación como la deshidratación- rehidratación. Resultados diferentes fueron obtenidos por Gursel y Gregoriadis (1995), al observar que la co-encapsulación de toxoide tetánico (PM «150 kDa) (Bizzini y col., 1969) con IL-2 (PM «15 kDa) (Abbas y col., 1998) en DRV's de fosfatidilcolina:Cho (relación molar 1:1) no modificaba el rendimiento de encapsulación de IL-2. Estas evidencias sugieren que la eficiencia de encapsulación para un soluto, cuando una segunda molécula está presente, no es un fenómeno simple de explicar y dependerá, entre otros factores, de la naturaleza de las moléculas a co-encapsular.

Por otro lado, el comportamiento análogo del conjugado EGFhr-P64k respecto al observado para el EGFhr con relación al rendimiento de encapsulación (Tablas 3 y 4) pudiera explicarse por el hecho de que ambas proteínas al conjugarse, forman una entidad molecular desapareciendo la posible competencia entre estas dos moléculas por un mismo volumen interno liposomal. A esto también pudiera contribuir que el conjugado contiene un número promedio de moléculas de EGFhr por molécula de P64k superior a 1 (un estimado de 4 moléculas de EGFhr), de manera que esto limitaría la influencia negativa de P64k sobre la encapsulación de EGFhr observada en la variante co-encapsulada EGFhr*+P64k (Tabla 3). Esta última explicación también pudiera justificar la similar capacidad de retención del soluto encapsulado, en las condiciones de almacenamiento descritas, para las vesículas que contenían EGFhr o el conjugado EGFhr- P64k (Figura 10).

En una segunda etapa del trabajo se estudió la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones con el EGFhr, conjugado o no a la proteína transportadora P64k, y encapsulado en vesículas DRV's, en comparación a la obtenida con el adyuvante convencional Al(OH)₃. Los resultados obtenidos al estudiar la inmunidad humoral muestran que la inmunización de ratones Balb/c y NMRI con EGFhr, conjugado o no a P64k y encapsulado en vesículas

DRVs o FATMLVs de DPPC:Cho y utilizando 10 ng de este antígeno en un esquema de dos dosis, indujo una respuesta inmune de altos títulos de anticuerpos anti-EGFhr (IgG), mayoritariamente de la subclase IgG1 pero con buenos niveles de IgG2a e IgG2b (Figuras 15, 16, 17, 18, 20 y 21). Un patrón de respuesta similar ha sido descrito por otros autores para diferentes antígenos encapsulados en liposomas, pero de manera general en las preparaciones liposomales se incluyeron inmunomoduladores tales como: lípido A o su derivado fosforilado (Childers y col., 2000; Rao y col., 2002), IL-2 (Kwak y col., 1998), secuencias CpG (Li y col., 2003), o se utilizaron lípidos fusogénicos (Kunisawa y col., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que una preparación liposomal constituida sólo por fosfatidilcolina y colesterol es capaz de potenciar la inducción de respuesta inmune contra un péptido poco inmunogénico.

Por otro lado, la inmunización de ratones con estos inmunógenos también indujo una respuesta inmune mediada por células, lo que se evidenció por la respuesta de hipersensibilidad retardada evaluada por la inflamación del cojinete plantar de todos los animales retados con el EGFhr (Tabla 6 y Figura 22), así como mediante la proliferación *in vitro* de linfocitos obtenidos de ratones Balb/c inmunizados con estas preparaciones (Figura 23). La respuesta de hipersensibilidad retardada ha sido utilizada por numerosos autores para demostrar la existencia de células T de memoria, para un antígeno dado, mediante su visualización por una inflamación local del sitio donde se administra el antígeno (Sugimoto y col., 1995; Toda y col., 1997; Sasaki y col., 1998). Esta inflamación es atribuida a la presencia de citoquinas inflamatorias como IFN- γ y TIMF- α , potentes activadores de los macrófagos, que se han encontrado siempre infiltrando estos sitios inflamados (Li y col., 1994; Higashi y col., 1995).

La respuesta inmune obtenida contra el EGFhr solo encapsulado en vesículas DRVs de DPPC:Cho resultó más eficiente que el empleo del EGFhr solo adsorbido en $Al(OH)_3$. En los animales que recibieron Liposoma/EGFhr se detectaron niveles superiores de anticuerpos (IgG total así como IgG1, IgG2a e IgG2b) y una mayor respuesta de proliferación de linfocitos (Figura 23), además se apreció una mayor supervivencia al ser retados con células del tumor ascítico de Ehrlich, en comparación con los animales que recibieron el EGFhr adsorbido en $Al(OH)_3$ (Figura 24). La respuesta superior obtenida con la preparación Liposoma/EGFhr pudiera deberse a que la encapsulación del EGFhr en vesículas liposomales favorezca el procesamiento y presentación de este antígeno. Los liposomas se han descrito como sistemas de liberación controlada de los solutos que

encapsulan (Gregoriadis y col., 1996). Las vesículas utilizadas con estos fines han sido modificadas en su superficie para permanecer un tiempo mayor en la circulación (Sihorkar y Vyas, 2001; Charrois y Alien, 2003). Se ha demostrado que los liposomas no modificados son rápidamente eliminados de la circulación por el sistema monocito- macrófago de los distintos tejidos (Gregoriadis, 1994b). Teniendo en cuenta que las vesículas utilizadas en este trabajo no fueron modificadas, es posible sugerir que la encapsulación del EGFhr en estas partículas propicia la concentración del antígeno y su derivación más eficiente hacia los macrófagos, lo que hace a estas vesículas superiores al $Al(OH)_3$ en cuanto a la direccionalización del antígeno hacia estas APC. Si bien en los últimos años se ha puesto énfasis en las células dendríticas como APC responsables de la sensibilización contra antígenos solubles, Rao y Alving (2000) destacaron el papel de los macrófagos como APC de antígenos particulados. Estos autores, estudiando la capacidad de las células dendríticas para inducir una respuesta CTL, demostraron la necesidad de los macrófagos en la obtención de dicha respuesta, cuando el antígeno era encapsulado en liposomas, ya que la eliminación de estas células *in vivo*, hizo ineficientes a las células dendríticas en su función presentadora.

Además, la encapsulación de EGFhr en liposomas DRVs de DPPC:Cho, en ausencia de la proteína transportadora P64k, produjo un efecto similar al obtenido con el conjugado EGFhr-P64k encapsulado en liposomas o adsorbido en $Al(OH)_3$; tanto en los niveles de IgG total (Figura 20B), como en la respuesta de hipersensibilidad retardada (Tabla 6) y de linfoproliferación (Figura 23). Estos resultados sugieren que la proteína transportadora P64k no es necesaria para inducir una respuesta inmune anti-EGFhr, cuando este antígeno se administra encapsulado en vesículas liposomales. Para explicar estas evidencias experimentales se pudiera sugerir: i) la presentación simultánea a células T del EGFhr por la vía MHC clase II, y de la fosfatidilcolina a través de las moléculas CD1 y ii) que la presencia de fosfatidilcolina en cantidades superiores a las encontradas en las membranas naturales y con algunas diferencias en sus cadenas acilo respecto a los lípidos propios, pueda representar una "señal de peligro" para el sistema inmune.

Con respecto a la primera sugerencia, Rao y Alving (2000) informaron que los antígenos proteicos encapsulados en liposomas y los lípidos que formaban estas vesículas, seguían la misma ruta intracelular durante su procesamiento en las APC, para ser presentados a las células T de manera simultánea; de modo que el efecto potenciador de los liposomas en la respuesta inmune contra el antígeno pudiera estar dado por la presentación de los componentes lipídicos de las vesículas liposomales por moléculas CD1. Los estudios

acerca de esta tercera vía para la presentación de antígenos de naturaleza lipídica datan de estos últimos años. Las células T restringidas por CD1 reconocen tanto lípidos exógenos como autólogos (Melián y col., 1999). Entre los antígenos lipídicos estudiados hasta el momento se incluyen lípidos de bacterias (micobacterias fundamentalmente) así como lípidos propios (gangliósidos y glucosilfosfatidilinositoles) (Matsuda y Kronenberg, 2001; Moody y Porcelli, 2001). Sin embargo, no existen estudios que demuestren la presentación de fosfatidilcolinas a las células T por las moléculas CD1. Moody y Porcelli (2003) informaron que las células T restringidas por CD1 pueden discriminar diferencias estructurales sutiles entre los lípidos presentados por estas moléculas. Si consideramos que tanto las fosfatidilcolinas, empleadas en la preparación de las vesículas en este trabajo, como los fosfatidilinositoles, antígenos presentados por las moléculas CD1d tanto humanas como murinas (Matsuda y Kronenberg, 2001), son glicerofosfolípidos (Voet y Voet, 2000) se pudiera especular sobre la presentación a células T de las fosfatidilcolinas sintéticas liposomales por las moléculas CD1d.

En general, es aceptado que los antígenos encapsulados en liposomas, al administrarse por vía exógena en forma particulada, son presentados a los linfocitos T CD4⁺ por la vía del MHC clase II y en consecuencia dan un patrón de respuesta Th2 o Th1 (Rao y col., 1999; Roitt y col., 2001). El patrón mixto de respuesta inmune obtenido en el presente trabajo pudiera relacionarse con que la fosfatidilcolina liposomal al ser presentada por moléculas CD1d, las cuales se localizan en el mismo compartimento de la vía endocítica que las moléculas MHC clase II (Moody y Porcelli, 2003), inmunomodulen la respuesta hacia un patrón Th1 (Sugita y col., 1998). Esto pudiera explicar los niveles de IgG2a e IgG2b anti-EGFhr observados, aun en ausencia de la proteína transportadora P64k cuando se utilizan las vesículas liposomales como adyuvante (Figuras 16, 18 y 21B).

Con relación a la segunda sugerencia, Melián y col. (1999) informaron que una modificación en la estructura de los lípidos endógenos así como en su concentración, podía ser detectada por las células T restringidas por CD1. Además, las fosfatidilcolinas constituyen uno de los componentes de las membranas celulares y generalmente sus cadenas acilo son de diferente longitud y al menos, una de ellas es insaturada (Voet y Voet, 2000). La DPPC empleada en la preparación de estas vesículas DRVs es de naturaleza sintética, completamente saturada, con ambas cadenas de 16 átomos de carbono. Esta diferencia estructural entre la DPPC y las fosfatidilcolinas naturales, así como la elevada proporción molar en que ella se adiciona para formar las vesículas

liposomales sugieren que estas moléculas también pudieran representar una señal que modifique el contexto en el que las células T respondan al antígeno.

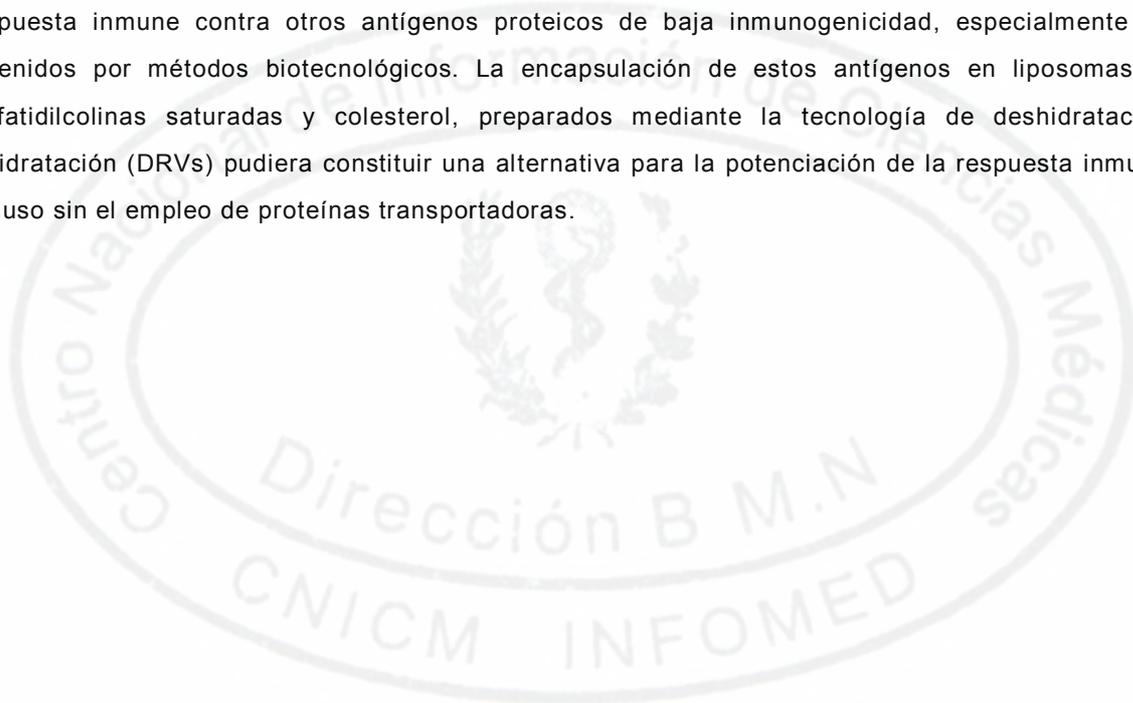
En este trabajo, el empleo de fosfatidilcolinas de diferente naturaleza en la preparación de los liposomas que encapsulaban el conjugado EGFhr-P64k Influjo en la potenciación de la respuesta inmune contra el EGFhr, fundamentalmente en la calidad de la respuesta humoral. En este sentido, los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas (DPPC y DSPC) indujeron niveles superiores de IgG2a e IgG2b y estos anticuerpos mostraron una mayor capacidad de inhibición de la unión del EGFhr a su receptor en comparación con los liposomas de sPC (insaturada) y con el Al(OH)₃, estos dos últimos grupos se comportaron estadísticamente similar (Figuras 26 y 27). Christodoulides y col. (1998) informaron la inducción de anticuerpos con una superior capacidad de reconocimiento de la proteína nativa con el empleo de liposomas de fosfatidilcolina:Cho como adyuvante, en comparación a los obtenidos con Al(OH)₃, para una proteína de la membrana externa de *N. meningitidis*.

Las diferencias encontradas en las respuestas obtenidas con las distintas fosfatidilcolinas (Figuras 25, 26 y 27) se pudieran explicar si se tiene en cuenta la segregación que, probablemente, experimenten los lípidos componentes de las membranas en las etapas iniciales de la ruta endocítica. Mukherjee y col. (1999) encontraron que los lípidos con el mismo grupo polar y que se diferenciaban en la longitud y en el grado de insaturación de sus cadenas acilo, se separaban en la vía endocítica, de manera que aquellos constituidos por largas cadenas saturadas (C16:0) se localizaban preferentemente en los endosomas tardíos, mientras que los de cadenas insaturadas se distribuían principalmente en los primeros endosomas que se forman y que reciclan a la membrana plasmática. Atendiendo a esto, es posible presuponer que las vesículas constituidas por fosfatidilcolinas saturadas, con su contenido, tengan un destino preferencial hacia los endosomas tardíos. En estos compartimentos existen todas las condiciones necesarias y suficientes para que pueda ocurrir de manera más eficiente, una presentación simultánea del antígeno procesado en el MHC clase II y de los lípidos por CD1, tal y como fue sugerido con anterioridad. Los mejores resultados obtenidos con los DRVs de DSPC:Cho en comparación con los de DPPC:Cho pudieran explicarse sobre la base de las diferencias en la longitud de las cadenas acilo de estas dos fosfatidilcolinas que condicionen una distinción en la segregación, más favorable para las vesículas de DSPC:Cho hacia los endosomas tardíos. También pudiera ocurrir que la presentación de DSPC esté favorecida

por las moléculas CDId. En este sentido, no existen estudios previos referidos a fosfolípidos liposomales que nos permitan sustentar estas ideas.

Tomando en consideración lo anteriormente discutido, es posible presuponer que la inducción de una menor respuesta inmune por las vesículas de sPC:Cho en comparación a la obtenida con DSPC y DPPC, pero estadísticamente equivalente a la inducida con Al(OH)₃ sea el resultado de una presentación menos efectiva de sPC por CDId. En este caso, la presentación del EGFhr conjugado a P64k debe proceder, preferentemente, por el mecanismo clásico de presentación vía MHC clase II. Por tanto, el efecto adyuvante para el EGFhr, obtenido con los liposomas de sPC:Cho comparable al inducido con Al(OH)₃, probablemente, se deba a la presencia de la proteína transportadora P64k, más que al efecto derivado de los lípidos liposomales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pudieran tener implicaciones en la inducción de respuesta inmune contra otros antígenos proteicos de baja inmunogenicidad, especialmente los obtenidos por métodos biotecnológicos. La encapsulación de estos antígenos en liposomas de fosfatidilcolinas saturadas y colesterol, preparados mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación (DRVs) pudiera constituir una alternativa para la potenciación de la respuesta inmune, incluso sin el empleo de proteínas transportadoras.



V. CONCLUSIONES

1. Los liposomas obtenidos mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación (DRVs) mostraron la mayor eficiencia de encapsulación y capacidad de retención del EGFhr durante su almacenamiento, en comparación con los obtenidos mediante congelación-descongelación (FATMLVs) y extrusión.
2. Las vesículas DRVs constituidas por dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol (DPPC:Cho) exhibieron un superior rendimiento en la encapsulación y capacidad de retención del EGFhr, en comparación con otras preparaciones constituidas por fosfatidilcolinas de diferente naturaleza.
3. La liberación de EGFhr de los liposomas durante su almacenamiento es debida a la interacción específica de este polipéptido con los fosfolípidos de las membranas liposomales provocando, probablemente, la separación de los grupos polares de la zona interfacial de la bicapa. Esta liberación se redujo con la adición de azúcares a las preparaciones liposomales.
4. La co-encapsulación de EGFhr con la proteína transportadora P64k en DRVs redujo la eficiencia de encapsulación del EGFhr; sin embargo, las vesículas que encapsulaban la variante conjugada de ambas proteínas mostraron un comportamiento similar a aquellas que contenían EGFhr solo, en cuanto al rendimiento de encapsulación y la cantidad de soluto retenido en las condiciones de almacenamiento ensayadas.
5. Los liposomas resultaron mejores adyuvantes para el EGFhr que el $\text{Al}(\text{OH})_3$ al inducir respuesta inmune aun en ausencia de la proteína transportadora P64k. La encapsulación de EGFhr en liposomas DRVs de DPPC:Cho indujo niveles superiores de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b en comparación a los obtenidos con el $\text{Al}(\text{OH})_3$. El EGFhr encapsulado en liposomas DRVs de DPPC:Cho favoreció la supervivencia de los ratones retados con tumor ascítico de Ehrlich de manera significativa respecto al EGFhr adsorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$.
6. El EGFhr encapsulado en liposomas DRVs de DPPC:Cho, indujo respuesta de hipersensibilidad retardada similar al conjugado EGFhr-P64k cuando se utilizaron como adyuvantes liposomas o $\text{Al}(\text{OH})_3$ y respuesta Infproliferativa equivalente al conjugado EGFhr-P64k encapsulado en liposomas DRVs o adsorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$ y superior a la obtenida con el EGFhr solo adsorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$.
7. Los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas (DPPC:Cho y DSPC:Cho) modularon más eficientemente la respuesta inmune anti-EGFhr que los insaturados de sPC:Cho y el $\text{Al}(\text{OH})_3$, en términos de los títulos de anticuerpos para cualquiera de los isotipos y la capacidad de bloqueo de la interacción EGF/R-EGF.

VI. RECOMENDACIONES

1. Profundizar en el estudio de la interacción del EGFhr con sistemas de membranas.
2. Evaluar el perfil de citoquinas inducidos con el EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas DRVs de fosfolípidos saturados y colesterol o adsorbido en $Al(OH)_3$.
3. Estudiar la avidéz de los anticuerpos anti-EGFhr obtenidos al inmunizar con el EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas DRVs de fosfolípidos saturados y colesterol o adsorbido en $Al(OH)_3$.
4. Estudiar la respuesta inmune contra otras proteínas de baja inmunogenicidad, conjugadas o no a una proteína transportadora y encapsuladas en liposomas en comparación con otros adyuvantes.
5. Profundizar en el papel de diferentes lípidos liposomales en la modulación de la respuesta inmune.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, K.A.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. (1998) *Immunologia Celular y Molecular*. 3ra. ed. McGraw-Hill Interamericana de España p. 294.
- Adler-Moore, J.P.; Proffitt, R.T. (1993) Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B, *J. Liposome Res.* 3: 429-50.
- Allison, A.C.; Gregoriadis, G. (1974) Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 252: 252.
- Alvarez, C.; Dalla, M.; Potrich, C.; Bernhart, I.; Tejuca, M.; Martínez, D.; Pazos, F.; Lanio, M.E.; Menestrina, G. (2001) Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 80: 2761-74.
- Alving, C.R. (2002) Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 20: S56-64.
- Alving, C.R.; Koulchin, V.; Glenn, G.M.; Rao, M. (1995) Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol. Rev.* 145: 5-31.
- Arteaga, C.L. (2002) Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin. Oncol.* 5 (14): 3-9.
- Babai, I.; Barenholz, Y.; Zakay-Rones, Z.; Greenbaum, E.; Samira, S.; Hayon, I.; Rochman, M.; Kedar, E. (2001) A novel liposomal influenza vaccine (INFLUSOME- VAC) containing hemagglutinin-neuraminidase and IL-2 or GM-CSF induces protective anti-neuraminidase antibodies cross-reacting with a wide spectrum of influenza A viral strains. *Vaccine* 20 (3-4): 505-15.
- Bakas, L.S.; Saint-Pierre Chazalet, M.; Bernik, D.L.; Disalvo, E.A. (1998) Interaction of an acid protease with positively charged phosphatidylcholine bilayers. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 12: 77-87.
- Baldrige, J.R.; Ward, J.R. (1997) Effective adjuvants for the induction of antigen specific delay type hypersensitivity. *Vaccine* 15: 395-401.
- Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-52.
- Barenholz, Y. (2000) Liposome application: problems and prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6: 66-77. S
- Bizzini, B.; Turpi, A.; Raynaud, M. (1969) Production et purification de la toxine tetanique. En: *Annales de l'Institut Pasteur*. Vol 116, No 5 p. 688-712.

Bonev, B.B.; Lam, Y.; Anderluh, G.; Watts, A.; Norton, R.S.; Separovic, F. (2003) Effects of the eukaryotic pore-forming cytolyisin equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. **Biophys. J.** 84: 2382-92.

Brandi, M.; Drechsler, M.; Bachmann, D.; Bauer, K.H. (1997) Morphology of semisolid aqueous phosphatidylcholine dispersions, a freeze fracture electron microscopy study. **Chem. Phys. Lipids** 87: 65-72.

Briken, V.; Jackman, R.M.; Dasgupta, S.; Hoening, S.; Porcelli, S.A. (2002) Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules. **EMBO J.** 21: 825-34.

Briken, V.; Jackman, R.M.; Watts, G.F.; Rogers, R.A.; Porcelli, S.A. (2000) Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens. **J. Exp. Med.** 192: 281-8.

Budavari, S.; O'Neil, M.J.; Smith, A.; Heckelman, P.E.; Kinneary, J.F. (eds) (1996) The Merck Index. 12th edition. Merck Co. Inc, Whitehouse Station, N.J., USA, p. 596.

Cajal, Y.; Rabanal, F.; Alsina, M.A.; Reig, F. (1996) A fluorescence and CD study on the interaction of synthetic lipophilic hepatitis B virus preS(120-145) peptide analogues with phospholipid vesicles. **Biopolymers** 38: 607-18.

Capala, J.; Barth, R.F.; Bendayan, M.; Lauzon, M.; Adams, D.M.; Soloway, A.H.; Fenstermaker, R.A.; Carlsson, J. (1996) Boronated epidermal growth factor as a potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors. **Bioconjugate Chem.** 7 (1): 7-15.

Castano, A.R.; Tangri, S.; Miller, J.E.; Holcombe, H.R.; Jackson, M.R.; Huse, W.D.; Kronenberg, M.; Peterson, P.A. (1995) Peptide binding and presentation by mouse CD1. **Science** 269: 223-6.

Charrois, G.J.; Allen, T.M. (2003) Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. **Biochim. Biophys. Acta** 1609 (1): 102-8.

Childers, N.K.; Miller, K.L.; Tong, G.; Llarena, J.C.; Greenway, T.; Ulrich, J.T.; Michalek, S.M. (2000) Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen. **Infect. Immun.** 68 (10): 5509-16.

Chiu, Y.H.; Park, S.H.; Benlagha, K.; Forestier, C.; Jayawardena-Wolf, J.; Savage, P.B.; Teyton, L.; Bendelac, A. (2002) Multiple defects in antigen presentation and T-cell development by mice expressing cytoplasmic-tail-truncated CD1d. **Nat. Immunol.** 3: 55-60.

Christodoulides, M.; Brooks, J.L.; Rattue, E.; Heckels, J.E. (1998) Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. **Microbiology** 144: 3027-37.

Cinza, A.M.; Quintana, M.; Lombardero, J.; Poutou, R.; Pérez, E.; Pérez, L.C.; Mella, C.M.; Besada, V.; Padrón, G.; Castellanos, L.; Estrada, R.; Morales Grillo, J. (1991) Establecimiento de un cultivo discontinuo para la producción del factor de crecimiento epidérmico humano en levaduras, caracterización del producto. **Biotechn. Api.** 8: 166-73.

Cox, J.C.; Coulter, A.R. (1997) Adjuvants -a classification and review of their modes of action. **Vaccine** 15 (3): 248-56.

Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F.; Aurell Wistrom, C. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.** 242: 1-10.

Crowe, J.H.; McKersie, B.D.; Crowe, L.M. (1989) Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** 979: 7-10.

Crowe, J.H.; Oliver, A.E.; Hoekstra, F.A.; Crowe, L.M. (1997) Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology** 35: 20-30.

Crowe, L.M.; Crowe, J.H. (1991) Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. **Develop. Biol. Standard** 74: 285-94.

Crowe, L.M.; Crowe, J.H.; Chapman, D. (1985b) Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. **Arch. Biochem. Biophys.** 236 (1): 289-96.

Crowe, L.M.; Crowe, J.H.; Rudolph, A.; Womersley, C.; Appel, L. (1985a) Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. **Arch. Biochem. Biophys.** 242 (1): 240-7.

Crowther, J.R. (1995) ELISA: theory and practice. En: *Methods in Molecular Biology* Vol. 42. Walker, J.M. (Ed). Humana Press, Totowa, New Jersey. Cap. 2 p. 35-50.

de Gier, J. (1993) Osmotic behaviour and permeability properties of liposomes. **Chem. Phys. Lipids** 64: 187-96.

de Haan, A.; Geerligts, H.J.; Huchshorn, J.P.; van Scharrenburg, G.J.M.; Palache, A.M.; Wilschut, J. (1995) Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization

- with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. **Vaccine** 13 (2): 155-62.
- De la Maza, A.; Manich, A.M.; Parra, J.L. (1997) Intermediate aggregates resulting in the interaction of bile salt with liposomes studied by transmission electron microscopy and light scattering techniques. **J. Microsc.** 186 (1): 75-83.
- Disalvo, E.A.; Viera, L.I.; Bakas, L.S.; Senisterra, G.A. (1996) Lysophospholipids as natural molecular harpoons sensing defects at lipid membranes. **J. Colloid Interface Sci.** 178: 417-25.
- Eftink, M.R. (1991) Fluorescence techniques for studying protein structure. En: *Methods of Biochemical Analysis*. Suelter, C.H. (Ed.) John Wiley & Sons, Inc. Vol. 35 p. 127-205.
- Engel, A.; Bendas, G.; Wilhelm, F.; Mannova, M.; Ausborn, M.; Nuhn, P. (1994) Freeze drying of liposomes with free and membrane-bound cryoprotectants -the background of protection and damaging processes. **Int. J. Pharm.** 107: 99-110.
- Epand, R.M. (1998) Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. **Biochim Biophys. Acta** 1376: 353-68.
- Fabrie, C.H.; de Fruijff, B.; de Gier, J. (1990) Protection by sugars against phase transition-induced leak in hydrated dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** 1024: 380-4.
- Fahr, A.; Seelig, J. (2001) Liposomal formulations of Cyclosporin A: a biophysical approach to pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.** 18: 141-72.
- Frokjaer, S.; Hjorth, E.L.; Worts, O. (1993) Stability testing of liposomes during storage. En: *Liposome technology*, Vol. I. G. Gregoriadis (Ed), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 235-45.
- Fujii, Y.; Aramaki, Y.; Hara, T.; Yachi, K.; Kikuchi, H.; Tsuchiya, S. (1993) Enhancement of systemic and mucosal immune responses following oral administration of liposomes. **Immunol. Lett.** 36: 65-70.
- Fukasawa, M.; Shimizu, Y.; Shikata, K.; Nakata, M.; Sakakibara, R.; Yamamoto, N.; Hatanaka, M.; Mizuochi, T. (1998) Liposome oligomannose-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. **FEBS Lett.** 441: 353-6.
- Gabinzon, A.A. (1995) Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 16: 285-94.

García-Segura, J.M.; Gavilanes, J.G.; Martínez del Pozo, A.; Montero, F.; Oñaderra, M.; Vivanco, F. (1996) Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. Editorial Síntesis, S.A., Madrid, España. Cap. 3 p. 142-7.

Glück, R.; Wegmann, A. (1998) Virosomes, a new liposome-like vaccine delivery system. En: Medical Applications of Liposomes. Lasic, D.D. and Papahadjopoulos, D. (Eds.) Elsevier Science B.V., p. 75-115.

Glück, U.; Gebbers, J.O.; Glück, R.; Althaus, B.; Egger, M. (1999) Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. **J. Virology** 73 (9): 7780-6.

González, G.; Crombet, T.; Catalá, M.; Mirabal, V.; Hernández, J.C.; González, Y.; Marinello, P.; Guillen, G.; Lage, A. (1998) A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: Report of a pilot clinical trial. **Annals Oncol.** 9: 431-5.

González, G.; Crombet, T.; Torres, F.; Catala, M.; Alfonso, L.; Osorio, M.; Neningen, E.; Garcia, B.; Mulet, A.; Perez, R.; Lage, A. (2003) Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. **Ann. Oncol.** 14: 461-6.

González, G.; Pardo, O.L.; Sánchez, B.; García, J.L.; Beausoleil, I.; Marinello, P.; González, Y.; Domarco, A.; Guillén, G.; Lage, A. (1997) Induction of immune recognition of self-epidermal growth factor II: characterization of the antibody response and the use of a fusion protein. **Vaccine Res.** 6 (2): 91-100.

González, G.; Sánchez, B.; Suárez, E.; Beausoleil, I.; Pérez, O.; Lastre, M.; Lage, A. (1996) Induction of immune recognition of self epidermal growth factor (EGF): effect on EGF-biodistribution and tumor growth. **Vaccine Res.** 5 (4): 233-44.

González, S.; Alvarez, A.; Caballero, E.; Viña, L.; Guillén, G.; Silva, R. (2000) P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. **Scand. J. Immunol.** 52 (2): 113-6.

Goñi, F.M.; Alonso, A. (2000) Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. **Biochim. Biophys. Acta** 1508 (1-2): 51-68.

Grant, E.P.; Beckman, E.M.; Behar, S.M.; Degano, M.; Frederique, D.; Besra, G.S.; Wilson, I.A.; Porcelli, S.A.; Furlong, S.T.; Brenner, M.B. (2002) Fine specificity of TCR complementary-determining region residues and lipid antigen hydrophilic moieties in the recognition of a CDI-lipid complex. **J. Immunol.** 168 (8): 3933-40.

Gregoriadis, G. (1992) Liposomes as immunological adjuvants: approaches to immunopotentialization including ligand-mediated targeting to macrophages. **Res. Immunol.** 143: 178-85.

Gregoriadis, G. (1994a) Liposomes as immunoadjuvants and vaccine carriers: antigen entrapment. **Immunomethods** 4: 210-6.

Gregoriadis, G. (1994b) The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes. **J. Drug Target.** 2: 351-6.

Gregoriadis, G.; Florence, A.T. (1993) Liposomes in drug delivery: clinical, diagnostic and ophthalmic potential. **Drugs** 45 (1): 15-28.

Gregoriadis, G.; Garcon, N.; da Silva, H.; Sternberg, B. (1993) Coupling of ligands to liposomes independently of solute entrapment: observations on the formed vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 1147:185-93.

Gregoriadis, G.; Gursel, I.; Gursel, M.; McCormack, B. (1996) Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. **J. Control. Release** 41: 49-56.

Gregoriadis, G.; Tan, L.; Ben-Ahmeida, E.T.S; Jennings, R. (1992) Liposomes enhance the immunogenicity of reconstituted influenza virus A/PR/8 envelopes and the formation of protective antibody by influenza virus A/Sichuan/87 (H3N2) surface antigen. **Vaccine** 10 (11): 747-53.

Grit, M.; Crommelin, D.J.A. (1993) Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. **Chem. Phys. Lipids** 64: 3-18.

Guillén, G.; Silva, R.; Alvarez, A.; Coizeau, E.; Novoa, L.; Selman, M.; Morales, J.; González, J.; Musacchio, A.; del Valle, J.; Delgado, M.; Tamayo, B.; Caballero, E.; Fernández, J.R.; Herrera, L. (1994) Cloning and expression of a high molecular weight protein (PM-6) from the *Neisseria meningitidis* strain B:4:P1.15. Evaluation of the immunogenicity and bactericidal activity of antibodies raised against the recombinant protein. En: Pathology and Immunobiology of *Neisseriaceae*. Conde C.J. *etal.* (Eds) p. 834-840 México:INSP.

Gumperz, J.E.; Brenner, M.B. (2001) CDI-specific T cells in microbial immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 13: 471-8.

Gursel, M.; Gregoriadis, G. (1995) Interleukin-2 as a coadjuvant for liposomal tetanus toxoid. En: Vaccines: new-generation immunological adjuvants. Gregoriadis et al. (Eds.) Plenum Press. NY. USA, p. 45-50.

Herbst, R.S.; Hong, W.K. (2002) IMC-C255, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. **Semin. Oncol.** 5(14): 18-30.

Herbst, R.S.; Langer, C.J. (2002) Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. **Semin. Oncol.** 1 (4): 27-36.

- Hernández-Caselles, T.; Villalain, J.; Gomez-Fernández, J.C. (1993) Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. **Mol. Cel. Biochem.** 120: 119-26.
- Higashi, K.; Suzuki, S.; Fujii, H.; Kirino, Y. (1987) Preparation and some properties of giant liposomes and proteoliposomes. **J. Biochem.** 101: 433-40.
- Higashi, N.; Yoshizuka, N.; Kobayashi, Y. (1995) Phenotypic properties and cytokine production of skin-infiltrating cells obtained from guinea pig delayed-type hypersensitivity reaction sites. **Cell Immunol.** 164: 28-35.
- Hincha, D.K.; Crowe, J.H. (1998) Trehalose increases freeze-thaw damage in liposomes containing chloroplast glycolipids. **Cryobiology** 36: 245-9.
- Hincha, D.K.; Hellwege, E.M.; Heyer, A.G.; Crowe, J.H. (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. **Eur. J. Biochem.** 267: 535-40.
- Hirsch-Lerner, D.; Barenholz, Y. (1999) Hydration of lipoplexes commonly used in gene delivery: follow-up by laurdan fluorescence changes and quantification by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta** 1461: 47-57.
- Hoebeke, M. (1995) The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 28: 189-96.
- Holzer, B.R.; Hatz, C.; Schmidt-Sissolak, D.; Glück, R.; Althaus, B.; Egger, M. (1996) Immunogenicity and adverse effects of inactivated virosome versus alum- adsorbed hepatitis A vaccine: a randomized controlled trial. **Vaccine** 14 (10): 982- 6.
- Hunter, W.M.; Greenwood, F. (1962) Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. **Nature** 191: 495-8.
- S Ishii, N.; Fukushima, J.; Kaneko, T.; Okada, E.; Tani, K.; Tanaka, S.I.; Hamajima, K.; Xin, K.Q.; Kawamoto, S.; Koff, W.; Nishioka, K.; Yasuda, T.; Okuda, K. (1997) Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type 1. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 13 (16): 1421-8.
- Jayawardena-Wolf, J.; Bendelac, A. (2001) CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation. **Curr. Opin. Immunol.** 13: 109-13.
- Jin, A.J.; Huster, D.; Gawrisch, K.; Nossal, R. (1999) Light scattering characterization of extruded lipid vesicles. **Eur. Biophys. J.** 28 (3): 187-99.
- Kim, S.; Martin, G.M. (1981) Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high capture volume and defined size distribution. **Biochim. Biophys. Acta** 646: 1- 9.

- Kirby, C.; Clarke, J.; Gregoriadis, G. (1980) Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*. **Biochem. J.** 186: 591-8.
- Kirby, C.; Gregoriadis, G. (1984) Dehydration-rehydration vesicles (DRV): A new method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology** 2: 979-84.
- Kongovik, T.L.; Honing, S.; Bakke, O.; Rodionov, D.G. (2002) Mechanism of interaction between leucine-based sorting signals from the invariant chain and clathrin-associated adaptor protein complexes AP1 and AP2. **J. Biol. Chem.** 277: 16484-8.
- Kunisawa, J.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. (2001) Pharmacotherapy by intracellular delivery of drugs using fusogenic liposomes: application to vaccine development. **Adv. Drug Deliv.** 52 (3): 177-86.
- Kwak, L.W.; Pennington, R.; Boni, L.; Ochoa, A.C.; Robb, R.J.; Popescu, M.C. (1998) Liposomal formulation of a self lymphoma antigen induces potent protective antitumor immunity. **J. Immunol.** 160 (8): 3637-41.
- Lachman, L.B.; Shih, L.C.; Rao, X.M.; Hu, X.; Bucana, C.D.; Ullrich, S.E.; Cleland, J.L. (1995) Cytokine-containing liposomes as adjuvants for HIV subunit vaccines. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 11 (8): 921-32.
- Lage, A.; Crombet, T.; González, G. (2003) Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. **Ann. Med.** 35: 327- 36.
- Lage, A.; González, G.; Sánchez, B.; Suárez, E.; Beausoleil, I.; Núñez, G. (1997) Composición vacunal del factor de crecimiento epidérmico autólogo con actividad antitumoral. **Patente Cuba No. 22 477.**
- Lakowicz, J.R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. Second Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 63, 64, 242 .
- Lasic, D.D. (Ed) (1993) Liposomes: from physics to applications. Elsevier, Amsterdam. Cap. 13 p. 347-63. s Lasic, D.D. (1998) Novel applications of liposomes. **Tibtech.** 16: 307-21.
- Lasic, D.D.; Martin, F.J. (Eds) (1995) Stealth liposomes. CRC, Boca Raton, F.L.
- Lasic, D.D.; Papahadjopoulos, D. (1995) Liposomes revisited. **Science** 267: 1275- 6.
- Lee, D.J.; Abeyratne, A.; Carson, D.A.; Corr, M. (1998) Induction of an antigen- specific, CDI-restricted cytotoxic T lymphocyte response *in vivo*. **3. Exp. Med.** 187: 433-8.

Lesieur, S.; Grabielle-Madumont, C.; Paternostre, M.; Ollivon, M. (1993) Study of size distribution and stability of liposomes by high performance gel exclusion chromatography. **Chem. Phys. Lipids** 64: 57-82.

Li, L.; Elliott, J.F.; Mosmann, T.R. (1994) IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. **J. Immunol.** 153: 3967-78.

Li, W.M.; Dragowska, W.H.; Bally, M.B.; Schutze-Redelmeier, M.P. (2003) Effective induction of CD8⁺ T-cell response using CpG oligodeoxynucleotides and HER-2/neu- derived peptide co-encapsulated in liposomes. **Vaccine** 21 (23): 3319-29.

Liu, D.; Liu, F.; Song, Y.K. (1995) Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. **Biochim. Biophys. Acta** 1235: 140-6.

Lohner, K.; Prenner, E.J. (1999) Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. **Biochim. Biophys. Acta** 1462: 141-56.

Lohner, K.; Staudegger, E.; Prenner, E.J.; Lewis, R.N.A.H.; Kriechbaum, M.; Degovics, G.; McElhaney, R.N. (1999) Effect of Staphylococcal 5-Lysin on the thermotropic phase behavior and vesicle morphology of dimyristoylphosphatidylcholine lipid bilayer model membranes. Differential Scanning Calorimetric, ³¹P Nuclear Magnetic Resonance and Fourier Transform Infrared Spectroscopic, and X-ray diffraction studies. **Biochemistry** 38: 16 514-28.

Lombardero, J.; Pérez, R.; Lage, A. (1986) Epidermal growth factor inhibits thymidine incorporation in Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. **Neoplasma** 33: 423- 9.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-75.

Ludewig, B.; Barchiesi, F.; Pericin, M.; Zinkernagel, R.M.; Hengartner, H.; Schwendener, R.A. (2001) In vivo antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumor immunity. **Vaccine** 19: 23-32.

Macias, A.; Pérez, R.; Lage, A. (1985) Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico II. Desarrollo de un radioreceptor análisis para la determinación de cantidades picomolares. **Inf y Biotecn.** 2: 115-27.

Marsh, D. (1990) Handbook of lipid bilayers. 1^{ra} Ed. CRC Press: Boca Ratón, FL, Sección II.13.

Marsh, D.; Horváth, L.I. (1998) Structure, dynamics and composition of the lipid- protein interface. Perspectives from spin-labelling. **Biochim. Biophys. Acta** 1376: 267-96.

Matsuda, J.L.; Kronenberg, M. (2001) Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules. **Curr. Opin. Immunol.** 13 (1): 19-25.

Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Ishibe, N.; Ueha, M.; Nakata, S.; Miyajima, K.; Epand, R.M. (1998) Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. **Biochemistry** 37: 11 856-63.

Mayer, L.D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R.; Janoff, A.S. (1985) Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 817 (1): 193-6.

McDonald, R.C.; MacDonald, R.I.; Meneo, B.; Taleshita, K.; Subbarao, N.K.; Hu, L. (1991) Small volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 1061: 297-303.

McMullen, T.P.W.; McElhaney, R.N. (1996) Physical studies on cholesterol/phospholipid interactions. **Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.** 1: 83-90.

Medzhitov, R.; Janeway, C.A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptative immune response. **Curr. Opin. Immunol.** 9: 4-9.

Melián, A.; Geng, Y.J.; Sukhova, G.K.; Libby, P.; Porcelli, S.A. (1999) CD1 expression in human atherosclerosis a potential mechanism for T cell activation by foam cells. **Am. J. Pathol.** 155 (3): 775-86.

Mendelsohn, J. (2002) Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. **J. Clin. Oncol.** 20 (18s): 1s-13.

Mercadal, M.; Domingo, J.C.; Bermudez, M.; Mora, M.; De Madariaga, M.A. (1995) /V- Palmitoylphosphatidylethanolamine stabilizes liposomes in the presence of human serum: effect of lipidie composition and system characterization. **Biochim. Biophys. Acta** 1235: 281-8.

Moody, D.B.; Porcelli, S.A. (2001) CD1 trafficking: invariant chain gives a new twist to the tale. **Immunity** 15: 861-5.

Moody, D.B.; Porcelli, S.A. (2003) Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. **Nature Immunol.** 3: 1-12.

Mukherjee, S.; Soe, T.T.; Maxfield, F.R. (1999) Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. **J. Cell. Biol.** 144 (6): 1271-84.

Naeff, R. (1996) Feasibility to topical liposome drugs produced on an industrial scale. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 18: 343-7.

New, R.R.C. (1994) Liposomes: a practical approach. B.D.H.D. Rickwood (Ed), Oxford University Press, New York, p. 33-160.

O'dwyer, P.J.; Benson, A.B. (2002) Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. **Semin. Oncol.** 5 (14): 10-7.

O'Garra, A; Murphy, K. (1994) Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. **Curr. Opinion Immunol.** 6 (3): 458-66.

O'Hagan, D.T.; MacKichan, M.L.; Singh, M. (2001) Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomol. Eng.** 18 (3): 69-85.

Ollivon, M.; Lesieur, S.; Grabielle-Madelmont, C.; Paternostre, M. (2000) Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. **Biochim. Biophys. Acta** 1508: 34-50.

Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J; Paphadjopoulos, D. (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 557: 9-23.

Ozaki, K.; Hayashi, M. (1997) The effects of glucose oligomers (maltodextrins) on freeze-drying liposomes. **Chem. Pharm. Bull.** 45 (1): 165-70.

Ozpolat, B.; Rao, X.M.; Powell, M.F.; Lachman, L.B. (1998) Immunoliposomes containing antibodies to costimulatory molecules as adjuvants for HIV subunit vaccines. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 14 (5): 409-17.

Panico, A.M.; Pignatello, R.; Puglisi, G.; Mazzone, G.; Petrone, G. (1992) Use of liposomes as carriers for immunomodulatory polypeptides: Studies on thymostimulin encapsulation and retention. **Int. J. Pharm.** 80: 93-100.

Park, S.H.; Bendelac, A. (2000) CDI-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature** 406 (6797): 788-92.

Park, Y.S. (2002) Tumor-directed targeting of liposomes. **Biosci. Repts.** 22: 267- 81.

Pedroso de Lima, M.C.; Simoes, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Duzgunes, N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 47 (2-3): 277-94.

Perkins, W.R.; Minchey, S.R.; Ahl, P.L.; Janoff, A.S. (1993) The determination of liposome captured volume. **Chem. Phys. Lipids** 64: 197-217.

Phillips, N.C.; Emili, A. (1992) Enhanced antibody response to liposome-associated protein antigens: preferential stimulation of IgG2a/b production. **Vaccine** 10: 151- 8.

Phillips, N.C.; Gagné, L. (1995) Modulation of murine macrophage nitric oxide synthesis by liposomal phospholipids: correlation with liposome immune adjuvant activity. **J. Drug Target.** 3: 137-47.

Porcelli, S.A.; Modlin, R.L. (1999) The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. **Annu. Rev. Immunol.** 17: 297-329.

Porcelli, S.A.; Segelke, B.W.; Sugita, M.; Wilson, I.A.; Brenner, M.B. (1998) The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. **Immunol. Today** 19 (8): 362-8.

Ramstedt, B.; Slotte, P. (1999) Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. **Biophys. J.** 76: 908-15.

Rao, M.; Alving, C.R. (2000) Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 41: 171- 88.

Rao, M.; Bray, M.; Alving, C.R.; Jahrling, P.; Matyas, G.R. (2002) Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4⁺ T cells. **J. Virol.** 76 (18): 9176-85.

Rao, M.; Rothwell, S.W.; Wassef, N.M.; Koolwal, A.B.; Alving, C.R. (1999) Trafficking of liposomal antigen to the trans-Golgi of murine macrophages requires both liposomal lipid and liposomal protein. **Exp. Cell Res.** 246: 203-11.

Ryba, N.J.P.; Marsh, D. (1992) Protein rotational diffusion and lipid/protein interactions in recombinants of bovine rhodopsin with saturated diacylphosphatidylcholines of different chain lengths studied by conventional and saturation transfer electron spin resonance. **Biochemistry** 31: 7511-8.

Rydall, J.R.; Macdonald, P.M. (1992) Influence of staphylococcal delta-toxin on the phosphatidylcholine headgroup as observed using ²H-NMR. **Biochim. Biophys. Acta** 1111 (2): 211-20.

Ríos, M.A.; Macias, A.; Pérez, R.; Lage, A.; Skoog, L. (1988) Receptors for epidermal growth factor and estrogen as predictors of relapse in patients with mammary carcinoma. **Anticancer Res.** 8 (1): 173-6.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. (2001) Immunology. 6ta Ed. Mosby, Harcourt Publishers Limited Cap. 11 p. 173-4.

Sainz, M.C.; Chantres, J.R. (1988a) Liposomas: estado de la cuestión (II). **Industria Farmacéutica** noviembre/diciembre: 105-12.

Sainz, M.C.; Chantres, J.R. (1988b) Liposomas: estado de la cuestión (I). **Industria Farmacéutica** julio/agosto: 115-9.

Sasaki, S.; Fukushima, J.; Hamajima, K.; Ishii, N.; Tsuji, T.; Xin, K.Q.; Mohri, H.; Okuda, K. (1998) Adjuvant effect of Ubenimex on a DNA vaccine for HIV-1. **Clin. Exp. Immunol.** III: 30-5.

Savage, R.; Cohen, S. (1972) Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. **J. Biol. Chem.** 247 (23): 7609-11.

Scherphof, G.L.; Damen, J.; Wilschut, J. (1993) Interactions of liposomes with plasma proteins. En: *Liposome Technology Vol III* G. Gregoriadis (Ed.) CRC Press, Inc Boca Raton, Florida, p. 212-8.

Schneider, T.; Sachse, A.; Röbling, G.; Brandi, M. (1995) Generation of contrast- carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method. **Int. J. Pharm.** 117: 1-12.

Seddon, J.M. (1990) Structure of the inverted hexagonal (H_n) phase, and non- lamellar phase transitions of lipids. **Biochim. Biophys. Acta** 1031: 1-69.

Senior, J.; Gregoriadis, G. (1994) Methodology in assessing liposomal stability in the presence of blood, clearance from the circulation of injected animals and uptake by tissues. En: *Liposome Technology*, G. Gregoriadis, (Ed.) CRC Press Inc. Vol. III, 2nd edition, p. 262-82.

Senisterra, G.A.; Gagliardino, J.J.; Disalvo, E.A. (1991) Effect of insulin on the lytic action of lysophosphatidylcholine in lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta** 1064: 148-54.

Shamshiev, A.; Gober, H.J.; Donda, A.; Mazorra, Z.; Mori, L.; De Libero, G. (2002) Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. **J. Exp. Med.** 195 (8): 1013-21.

Sigarroa, A. (1985) *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana: Pueblo y Educación.

Sihorkar, V.; Vyas, S.P. (2001) Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. **J. Pharm. Pharm. Sei.** 4 (2): 138-58.

Silva, R.; Selman-H, M.; Guillén, G.; Herrera, L.S.; Fernández, J.R.; Novoa, L. (1994) Nucleotide sequence coding for an outer membrane protein from *Neisseria meningitidis* and use of said protein in vaccine preparations. **USA Patent 5,286,484**.

Socaciu, C.; Jessel, R.; Haertel, S.; Diehl, H.A. (2000) Carotenoids in 1, 2- dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine liposomes: incorporation and effects on phase transition and vesicle size. **J. Med. Biochem.** 4 (2): 71-82.

Sugimoto, M.; Ohishi, K.; Fukasawa, M.; Shikata, K.; Kawai, H.; Itakura, H.; Hatanaka, M.; Sakakibara, R.; Ishiguro, M.; Nakata, M.; Mizuochi, T. (1995) Oligomannose-coated liposomes as an adjuvant for the induction of cell-mediated immunity. **FEBS Lett.** 363: 53-6.

Sugita, M. (2001) CD1: a new paradigm for antigen presentation. **J. Nippon Med. Sch.** 68 (6): 466-71.

Sugita, M.; Moody, D.B.; Jackman, R.M.; Grant, E.P.; Rosat, J.P.; Behar, S.M.; Peters, P.J.; Porcelli, S.A.; Brenner, M.B. (1998) CDI-a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 87 (1): 8-14.

Sun, W.Q.; Leopold, A.C.; Crowe, L.M.; Crowe, J.H. (1996) Stability of dry liposomes in sugar glasses. **Biophys. J.** 70: 1769-76.

Toda, S. ; Ishii, N. ; Okada, E. ; Kusakabe, K.I. ; Arai, H. ; Hamajima, K. ; Gorai, I. ; Nishioka, K. ; Okuda, K. (1997) HIV-I-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon- γ antibody. **Immunology** 92:111-7.

Tsvetkova, N.M.; Phillips, B.L.; Crowe, L.M.; Crowe, J.H.; Risbud, S.H. (1998) Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state ^{31}P NMR and FTIR studies. **Biophys. J.** 75: 2947-55.

Ullrich, A. (2002) Molecular targets in cancer therapy and their impact on cancer management. **Oncology** 63 (1): 1-15.

Ulrich, A. (2002) Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Biosci. Reps.** 22 (2): 129-50.

Ulrich, A.S.; Otter, M.; Glabe, C.G.; Hoekstra, D. (1998) Membrane fusion is induced by a distinct peptide sequence of the sea urchin fertilization protein binding. **J. Biol. Chem.** 273 (27): 16 748-55.

Ulrichs, T.; Porcelli, S.A. (2000) CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. **Rev. Immunogenet.** 2 (3): 416-32.

Utsumi, T.; Hung, M.; Klostergaard, J. (1991) Preparation and characterization of liposomal-lipophilic tumor necrosis factor. **Cancer Res.** 51: 3362-6.

Van Rooijen, N. (1995) Liposome mediated immunopotential and immunomodulation. En: Vaccines: new generation immunological adjuvants. G. Gregoriadis (Ed). Plenum Press. New York.

van Winden, E.C.A.; Crommelin, D.J.A. (1999) Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. **J. Control. Release** 58: 69-86.

- van Winden, E.C.A.; Zang, W.; Crommelin, D.J.A. (1997) Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. **Pharm. Res.** 14 (9): 1151-60.
- Venkatesan, N.; Vyas, S.P. (2000) Polysaccharide coated liposomes for oral immunization-- development and characterization. **Int. J. Pharm.** 203 (1-2): 169- 77.
- Viera, L.I.; Alonso-Romanowski, S.; Borovyagin, V.; Feliz, M.R.; Disalvo, E.A. (1993) Properties of gel phase lipid-trehalose bilayers upon rehydration. **Biochim. Biophys. Acta** 1145: 157-67.
- Voet, J.; Voet, D. (2000) Bioquímica. Cap. 11. CD-ROM
- Vogel, F.R. (1995) The role of adjuvants in retroviral vaccines. **Int. J. Immunopharmac.** 17 (2): 85-90.
- Walde, P.; Ichikawa, S. (2001) Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomol. Eng.** 18: 143-77.
- Wierzbicki, A.; Kiszka, I.; Kaneko, H.; Kmiecik, D.; Wasik, T.J.; Gzyl, J.; Kaneko, Y.; Kozbor, D. (2002) Immunization strategies to augment oral vaccination with DNA and viral vectors expressing HIV envelope glycoprotein. **Vaccine** 20 (9-10): 1295-307.
- Winden, E.C.A.; Zuidam, N.J.; Crommelin, D.J.A. (1998) Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use. En: Medical applications of liposomes D.D. Lasic and D. Papahadjopoulos (Eds.) Elsevier Science.
- Woodle, M.C.; Lasic, D.D. (1992) Sterically stabilized liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** 1113: 171-99.
- Xiong, H.Q.; Abbruzzese, J.L. (2002) Epidermal growth factor receptor-targeted therapy for pancreatic cancer. **Semin. Oncol.** 5 (14): 31-7.
- Zadi, B.; Gregoriadis, G. (2000) A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. **J. Liposome Res.** 10 (1): 73-80.