



**Tesis para optar por el título de DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE  
(VSPS) DEL PARÁSITO *Giardia lamblia* COMO OPCIÓN PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE  
PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

**por**

**Román Alejandro Martino**

**Lic. en Ciencias Biológicas**

**Director: Dr. Hugo Daniel Luján**

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.

Facultad de Medicina. Universidad Católica de Córdoba

Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades infecciosas (CIDIE-  
CONICET)

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2018**



# Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Summary .....	3
Capítulo I .....	4
1. Introducción.....	5
1.1-Generalidades.....	5
1.2- <i>Giardia lamblia</i> . Un fósil vivo.....	10
1.3- <i>Giardia lamblia</i> . Relevancia. ....	11
1.3.1-Trofozoítos y el mecanismo de Variación antigénica.....	11
1.3.2-Proteínas variables de superficie. ....	13
1.3.3-Resistencia de las VSPs a la digestión proteolítica y a cambios en el pH.....	16
1.4-Objetivos.....	17
1.4.1-Objetivos generales.....	17
1.4.2-Objetivos particulares.....	17
Capítulo II .....	19
2. Materiales y Métodos .....	20
2.1-Cultivo de <i>Giardia lamblia</i> . ....	20
2.2-Lisado de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> .....	20
2.3-Purificación de ácidos nucleicos. ....	20
2.4-Generación de la plataforma de producción de proteínas recombinantes en el sistema de expresión de baculovirus.....	20
2.4.1-Células y medios de cultivo. ....	20
2.4.2-Diseño de genes clonados.....	20
2.4.3-Diseño de los primers.....	21
2.4.4-Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). ....	21
2.4.5-Construcción de baculovirus .....	21
2.4.6-Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH10Bac. ....	23
2.4.7-Aislamiento del b́acmido.....	24
2.4.8-PCR del b́acmido recombinante.....	25
2.4.9-Transfección de células de insecto y preparación de stock de baculovirus. ....	25

2.4.10-Amplificación de stock virales .....	25
2.4.11-Cuantificación de título viral. ....	25
2.5-Optimización de la expresión de proteínas recombinantes. ....	26
2.6-Producción a gran escala y purificación de las proteínas recombinantes .....	26
2.7-Diálisis y almacenamiento de la producción de proteínas .....	27
2.8-Métodos analíticos de cuantificación de proteínas. ....	27
2.9-Electroforesis de ADN en geles de agarosa. ....	27
2.10-Análisis bioinformático de las secuencias de ADN.....	27
2.11-Electroforesis de proteínas en geles de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) y <i>Western blotting</i> . ...	28
2.12-Ensayos proteolítico de las VSPs recombinantes.....	29
2.13-Ensayos para la evaluación <i>in vitro</i> de la protección de los fármacos.....	29
2.14-Administración y medición de la absorción de fármacos <i>in vivo</i> . ....	29
2.14.1-Administración oral. ....	30
2.14.2-Interleuquinas Humanas (hIL-2, hIL-10). ....	30
2.14.3-Interferones de tipo I humano (IFN $\alpha$ e IFN $\beta$ ). ....	30
2.14.4-Insulina y glucagón. ....	30
2.15-Análisis estadístico.....	31
2.16-Evaluación de la presencia de inmunoglobulinas totales en sangre y materia fecal.....	31
<b>Capítulo III.....</b>	<b>32</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>33</b>
3.1-Análisis de la secuencia de ADN .....	33
3.2-Transfección celular y validación de la expresión proteica .....	35
3.3-Producción y purificación de $\Delta$ VSPs en agitación. ....	37
3.4-Estudio de la resistencia <i>in vitro</i> y estabilidad de $\Delta$ VSPs. ....	42
3.5-Estudios <i>in vitro</i> de la capacidad de $\Delta$ VSPs para proteger péptidos bioactivos de la degradación.44	
3.6-Estudios <i>in vivo</i> de la absorción oral.....	46
3.7-Estudios <i>in vivo</i> : actividad biológica. ....	47
3.8-Estudios <i>in vivo</i> : administración crónica.....	49
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>52</b>
<b>4. Discusión .....</b>	<b>53</b>
4.1 El uso de drogas de origen biológico.....	53
4.2 Desarrollo de la plataforma para el transporte por vía oral de proteínas recombinantes.....	55
<b>Capítulo V.....</b>	<b>68</b>

5. Conclusión .....69  
Capítulo VI ..... 70  
6. Bibliografía ..... 71

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** Ácido etilen diamino tetracético

**h:** Horas

**kDa:** kiloDalton

**mAb:** Anticuerpo monoclonal

**Mb:** Megabases

**min:** Minutos

**ORF:** Marco de lectura abierto (**O**pen **R**eadin**G** **F**rame)

**PBS:** "Buffer" fosfato salino

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**Vol.:** Volumen

**VSP:** Proteína Variable de Superficie (**V**ariant-specific **S**urface **P**rotein)

**ΔVSP:** Proteínas Variables de Superficie recombinantes (porción extracelular)

**hIFN:** Interferón Humano Recombinante

**hGln/Gln:** Glucagón Humano Recombinante

**Insu:** Insulina Humana Recombinante

**hIL:** Interleuquinas Humanas Recombinantes

**TGI:** Tracto Gastro Intestinal

**hGH:** Hormona de Crecimiento Humana Recombinante

**hPTH:** Paratohormona Humana Recombinante

**CI:** Contenido Intestinal

**PSI:** Post Infección

**s.c.:** Subcutánea

## Resumen

La administración oral es la vía de suministro ideal para agentes profilácticos y terapéuticos debido a la facilidad de administración, el cumplimiento por parte del paciente, y el costo. Sin embargo, la vía oral es también la más que mayores desafíos nos plantea debido a las muchas barreras impuestas por el tracto gastrointestinal (TGI). Proteínas de membrana como las proteínas variables de superficie (VSPs, por sus siglas en Ingles “Variant specific surface proteins”) del organismo *Giardia lamblia*, protegen a este parásito intestinal de las duras condiciones del intestino delgado y presentan características únicas que las hacen candidatas ideales para el transporte de fármacos a través del TGI. Dichas proteínas tienen la capacidad de resistir tanto pHs extremos como a la degradación proteolítica y se adhieren a la mucosa intestinal. En este trabajo, se seleccionaron dos VSPs a partir de diferentes aislamientos de *Giardia* y se produjo la región extracelular de las mismas de manera recombinante en una plataforma de células de insecto ( $\Delta$ VSPs), para luego evaluar su capacidad para proteger a los diferentes compuestos de la acción del contenido intestinal. Además, se evaluó *in vivo* la absorción oral de péptidos bioactivos solos o co-administrados con una  $\Delta$ VSP particular. Se pudo observar que los fármacos combinados con alguna  $\Delta$ VSP fueron protegidos de su degradación por acción de los jugos gástricos y proteasas del TGI, aumentando sus niveles en sangre y en ciertos casos evidenciando su acción biológica sistémica. Por otra parte, se observó también que los niveles de absorción por vía oral de los fármacos administrados y su acción biológica sistémica no se modificaron luego de la administración crónica en combinación con las  $\Delta$ VSPs. El presente trabajo demuestra por primera vez el uso de VSPs recombinantes, diseñadas a partir de las secuencias genómicas de *Giardia lamblia*, como vehículo para la administración de agentes terapéuticos de naturaleza peptídica.

## Summary

Oral administration is the ideal supply means for prophylactic and therapeutic agents because of the ease of administration, patient compliance, and cost. However, the oral route is also the most difficult due to of the many barriers imposed by the gastrointestinal tract (GIT). The variant-specific surface proteins (VSPs) of the intestinal parasite *Giardia lamblia* cover and protect this parasite from the harsh conditions of the small intestine and present unique characteristics that make them an ideal candidate to transport drugs through the GIT. VSPs are resistant to extreme pHs and to proteolytic degradation and adhere to the intestinal mucosa of the host. In this work, two VSPs from different assemblage were selected and produced in an insect cell platform ( $\Delta$ VSPs) to test *in vitro* its capacity to protect different compounds from the action of intestinal content, specific proteolytic enzymes such as trypsin and from extreme pHs. Furthermore, the oral absorption of the drugs, alone or plus  $\Delta$ VSP, was evaluated. The combination of the drugs with a given  $\Delta$ VSP protected them from degradation, increasing their blood levels and/or to promoting their systemic biological action. Besides, we demonstrated the oral absorption levels after chronic administration of the  $\Delta$ VSP-drug mixture was not modified. The present work shows for the first time the use of recombinant VSPs, designed from the genomic sequences of *Giardia lamblia*, as a vehicle for the administration of therapeutic agents of the peptide nature.



# **Capítulo I**

## **Introducción**

## 1. Introducción

### 1.1-Generalidades

La popularidad en el uso de proteínas para fines terapéuticos creció con la aprobación de la insulina recombinante por parte de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por su siglas en Ingles) en 1982, lo que la convirtió en la primera proteína recombinante disponible en el mercado y una importante fuente de terapia para los pacientes que sufren de diabetes mellitus (Leader, Baca et al. 2008). El estudio y comprensión de la biología molecular y bioquímica detrás de las proteínas endógenas y péptidos, y su papel en varias funciones normales del cuerpo y condiciones patológicas, nos ha llevado a poner el foco en el enorme potencial terapéutico de estas moléculas en las últimas décadas (Muheem, Shakeel et al. 2016).

Como consecuencia de su estudio se han desarrollado una variedad de nuevas proteínas terapéuticas biológicamente activas, con beneficios en el tratamiento de enfermedades tales como la diabetes y cáncer. Podemos observar que actualmente además de insulina humana se dispone de otros productos como interferones, interleuquinas, factor de crecimiento epidérmico, agentes anti-trombóticos, eritropoyetina, factor anti-hemofílico, etc., para su comercialización (Pawar, Meher et al. 2014). Las proteínas y péptidos para uso terapéutico nos ofrecen numerosas ventajas sobre otras drogas convencionales. En primer lugar, las proteínas realizan a menudo un conjunto muy específico y complejo de funciones en el cuerpo que no puede ser imitado por los compuestos químicos simples. En segundo lugar, ya que las proteínas realizan funciones muy específicas, a menudo es menos probable que estas causen efectos adversos. En tercer lugar, debido a que el cuerpo produce naturalmente muchas de las proteínas que se utilizan con fines terapéuticos, estos agentes son a menudo bien tolerados y son menos propensos a provocar respuestas inmunitarias. En cuarto lugar, para enfermedades en las que está mutado o delecionado un gen, proteínas terapéuticas pueden proporcionar un sustituto eficaz para el tratamiento sin la necesidad de la terapia génica, que no está actualmente disponible para la mayoría de los trastornos genéticos. Por último, el desarrollo clínico y el tiempo de aprobación de la FDA puede ser más rápido en el caso de proteínas que el de otros fármacos (Muheem, Shakeel et al. 2016).

Es por esto que, como resultado de intensos esfuerzos de investigación, tanto en laboratorios académicos como industriales, nuevas técnicas de ADN recombinante, ingeniería de proteínas y péptidos, y técnicas de cultivo de tejidos se encuentran actualmente disponibles para obtener proteínas y péptidos para uso medicinal a una escala comercial, los cuales se asemejan a moléculas endógenas y por lo tanto provocan mínimas respuestas inmunológicas. A pesar de que inicialmente existieron problemas relacionados con la obtención de proteínas recombinantes no inmunogénicas en forma pura a escala comercial, estos inconvenientes han ido superándose con el tiempo, aunque su formulación y entrega óptima siguen siendo el mayor reto para los científicos (Muheem, Shakeel et al. 2016).

La elección de la vía de administración es un factor crítico en cualquier intervención terapéutica ya que regula tanto la farmacocinética como la eficacia del fármaco. En el caso del empleo de proteínas y péptidos para usos terapéuticos podemos mencionar la interacción entre diferentes factores como la escasa permeabilidad luminal, variabilidad de absorción en el borde en cepillo, procesos metabólicos a nivel citosol, y mecanismos hepáticos de eliminación, entre otros, los cuales dan lugar a una pobre biodisponibilidad de estas moléculas cuando son administradas por vías mucosas orales y no orales (Renukuntla, Vadlapudi et al. 2013). Por otra parte, es de tener en cuenta a la hora de elegir una vía para la administración que la degradación física implica la modificación de la estructura nativa de una proteína conduciendo por ejemplo a procesos de agregación o precipitación. Mientras que la degradación química por lo general implica la escisión del compuesto y conduce a la formación de un nuevo producto (Smart, Gaisford et al. 2014).

Podemos observar además que inyecciones frecuentes generan un trastorno constante, oscilaciones en las concentraciones del fármaco en la sangre y poca predisposición del paciente, lo que hacen que incluso la administración parenteral sencilla de estos fármacos sea problemática. Esto ha llevado a los investigadores a desarrollar nuevos sistemas de suministro capaces de transportar una clase de fármacos de una manera más eficaz. La administración de productos terapéuticos por vía oral, por ende, sigue siendo un punto importante para futuros estudios (Renukuntla, Vadlapudi et al. 2013).

Este interés por la ruta oral, a pesar de las enormes barreras para la administración de fármacos que existen en el tracto gastrointestinal (TGI), se puede apreciar muy bien por las evidentes ventajas que propone tales como la facilidad de administración, gran aceptabilidad del paciente, etc. El potencial de ahorro en costos para el cuidado de la salud lleva a aumentar aún más las ventajas de los sistemas de administración órales en términos de cumplimiento y aceptabilidad del paciente ya que las formulaciones de este tipo no requieren sofisticadas instalaciones o la participación directa de los profesionales de la salud. Por lo tanto, a pesar de que un enfoque para la administración oral que no solo proteja a las proteínas/péptidos de la degradación enzimática, sino además que ayude en la mejora de su absorción sin alterar su actividad biológica, sigue siendo una opción atractiva, pero para alcanzar su verdadero potencial se deben superar amplios retos. (Muheem, Shakeel et al. 2016).

*Giardia lamblia* es un patógeno intestinal humano y al igual que muchos microorganismos protozoarios, la superficie de *Giardia* se encuentra recubierta por proteínas que pertenecen a una familia de proteínas variables de superficie (VSPs) específicas de membrana, que cubren toda la superficie de trofozoítos y se caracterizan por poseer una región amino-terminal (N-terminal) extracelular rica en cisteína, un dominio carboxilo-terminal (C-terminal) conservado, el cual incluye una región transmembrana y un segmento corto de 5 aminoácidos citoplasmático (Nash 2002). Teniendo en cuenta que la porción extracelular de estas proteínas de superficie permite al parásito sobrevivir en el ambiente hostil que se presenta en la porción superior del intestino, pensamos que las VSPs podrían ser potencialmente utilizadas como portadores de compuestos de interés a ser administrados por vía oral. Las VSPs poseen la particular característica de ser muy resistentes a pH variable (de 1 a 10) y a la digestión por tripsina y otras proteasas presentes en el intestino (Rivero, Saura et al. 2010).

Con el fin de evitar la manipulación de proteínas obtenidas a partir de organismos patógenos, la producción de VSPs recombinantes se llevó a cabo a través de una plataforma de células de insectos. A través de la ingeniería molecular, los baculovirus han evolucionado a partir de simples virus de insectos, útiles para el control biológico de plagas agrícolas, a herramientas biotecnológicas versátiles, capaces de infectar células de insectos y transducir células de mamíferos para la expresión de proteínas extrañas (Hopkins, Esposito et al. 2010).

Los baculovirus son los virus más prominentes que se sabe que afectan a la población de insectos. Son básicamente moléculas de ADN de doble hebra, circular, superenrolladas y envueltas por una cápside en forma de varilla. Se han aislado e identificado más de 500 baculovirus basados en los huéspedes que habitan, la mayoría de los cuales se originaron en artrópodos, particularmente insectos del orden Lepidoptera. Dos de los aislados más comunes utilizados en la expresión génica son el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y el virus de la poliedrosis nuclear *Bombyx mori* (BmNPV). Ambos en estado salvaje exhiben ciclos de vida líticos y ocluidos que se desarrollan independientemente a lo largo de las tres fases de replicación del virus (Jarvis 2009, Shang, Garretson et al. 2017).

En la fase temprana, el virus prepara la célula infectada para la replicación del ADN viral. En la fase tardía, se expresan los genes tardíos que se encargan de la replicación del ADN viral y el ensamblaje de virus extracelulares, también llamados virus no ocluidos, responsables de la transmisión horizontal de la infección entre células adyacentes. En la fase muy tardía (conocida como la fase de la proteína de oclusión viral), se expresan los genes de poliedrina y p10, se forman el virus ocluido (VO) o cuerpos de inclusión poliédricos y comienza la lisis celular. Los VO son los responsables de la transmisión vertical de la infección de una larva de insecto a la siguiente (Jarvis 2009).

De entre los mencionados, actualmente AcMNPV es la más ampliamente usado en biotecnología. El Sistema de expresión hace uso del ciclo bifásico de replicación del virus, en el cual los genes pertenecientes a las fases temprana y tardía del ciclo de replicación viral son esenciales para el ensamble de las partículas virales, mientras que los genes tardíos de la última fase, responsables de la expresión de las proteínas de poliedrina y p10 de los VO, no son vitales para la replicación del virus en la célula. Por lo tanto, éstos pueden ser reemplazados por genes foráneos haciendo uso de ingeniería genética para generar baculovirus recombinantes capaces de expresar proteínas foráneas bajo el control de los promotores de poliedrina o p10 (Gomez-Sebastian, Lopez-Vidal et al. 2014).

Los virus recombinantes pueden ser replicados en un amplio número de líneas celulares comercialmente disponibles, entre las que se encuentran dos de las más empleadas hoy en día, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) y High Five (*Trichoplusia ni*). Ambas líneas celulares han sido

registradas en la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para la fabricación de productos biológicos. Cervarix <sup>™</sup> (GSK, Rixensart, Bélgica), un vacuna recombinante no infecciosa desarrollada para la prevención de la infección por los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH) aprobada en 2009 para su comercialización en los EE.UU., se produce actualmente utilizando células High Five infectadas con baculovirus; mientras que FluBlok, una vacuna recombinante contra la gripe estacional desarrollada por Protein Sciences Corp. (Connecticut, EE.UU.) que se encuentra en la etapa final de la Fase 3 de ensayos clínicos, se produce en células de la clase Sf9. Otras vacunas humanas candidatas que actualmente se encuentran en fase de desarrollo clínico tardío incluyen Provenge, una vacuna inmuno terapéutica para cáncer de próstata producida por Dendreon Inc. (Seattle, WA) y vacunas contra hepatitis B y C crónicas, desarrolladas por Virexx Medical Corp. (Calgary, Canadá) (Harper 2009, Aucoin, Mena et al. 2010, Cox and Hashimoto 2011).

Este sistema presenta una serie de cualidades que lo hacen de particular valor para el laboratorio o la industria. La expresión de proteína mediada por baculovirus es muy alta sumado al hecho de que las células de insecto infectadas son capaces de realizar varias modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación, acetilación, foforilación, formación de numerosos puentes disulfuro y procesamiento proteolíticos. Los cultivos de células de insecto no contienen pirógenos o endotoxinas provenientes de microorganismos o contaminantes de células de mamífero y los virus recombinantes son fáciles de construir, seguros de manipular para los operadores, siendo la infección específica de células de insecto, no infectando ninguna clase de célula de mamífero (Hu, Yao et al. 2008, Felberbaum 2015).

Es así que haciendo uso del sistema de expresión de proteínas mediado por baculovirus hemos producido  $\Delta$ VSPs a partir de dos aislamientos de *Giardia*;  $\Delta$ VSP1267, la cual se clonó a partir de la cepa WB/A y  $\Delta$ VSPH7 clonada a partir de la cepa GS/B. Estos aislamientos han sido exitosamente cultivados y estudiados en detalle a nivel molecular *in vitro* (Adam 2001). El repertorio genético de VSP en ambos aislados es completamente diferentes, excepto por la presencia de numerosos motivos CXXC (cisteína-aminoácido-aminoácido-cisteína, donde X es cualquier aminoácido) en la porción N-terminal extracelular y el segmento citoplasmático corto

de la región carboxilo-terminal altamente conservado (Nash and Mowatt 1992, Bienz, Siles-Lucas et al. 2001).

En resumen, en el desarrollo de esta tesis se empleó proteínas variables de superficie recombinantes ( $\Delta$ VSPs) para mejorar la administración de fármacos de naturaleza proteica a través de la vía oral. Dado que la administración oral de fármacos sería la vía de administración ideal para muchas moléculas de uso medicinal, en particular para las enfermedades crónicas, se probaron proteínas tales como la insulina (Insu) y glucagón (Gln). Otros péptidos con importancia farmacológica que se incluyeron en este estudio fueron la hormona de crecimiento humana (hGH), parathormona humana (hPTH), interferones tipo I humano (hIFN $\alpha$  y hIFN $\beta$ ), interleuquinas humanas 2 y 10 (hIL-2, hIL-10).

### **1.2-*Giardia lamblia*. Un fósil vivo**

*Giardia* fue descubierta en 1681 por el científico holandés Antonie van Leeuwenhoek, quien observó a este parásito en su propia materia fecal mediante la utilización de su invención, el “microscopio compuesto”. Posteriormente, este organismo fue descrito en más detalle por Lambl en 1859, pero no fue sino hasta 1882 que el género *Giardia* fue reconocido como tal por Kunstlerm (Feely and Erlandsen 1981). Desde un punto de vista taxonómico, *Giardia lamblia* pertenece al reino Protista y se encuentra clasificado dentro de la clase Zoomastigofora, orden Diplomonadida, aunque recientemente se ha sugerido la formación de un nuevo reino denominado Archezoa (“fósiles biológicos”), abarcando a organismos originados antes de la aparición de la mitocondria, como *Giardia spp.* y *Trichomonas spp.* (Adam 2000). Sin embargo, el hallazgo de genes de origen mitocondrial en *Giardia* ha puesto en discusión esta denominación (Tovar, Leon-Avila et al. 2003).

Recientemente, mediante la utilización de marcadores moleculares se ha clasificado a *G. lamblia* en grupos nombrados con letras: los grupos A y B infectan humanos y se los suele denominar como descendientes de las cepas WB y GS, respectivamente. Por último, se pueden distinguir los grupos: C y D, procedentes de perros; E, encontrados en animales ungulados; y F y G provenientes de gatos y ratas, respectivamente (Monis, Andrews et al. 2003).

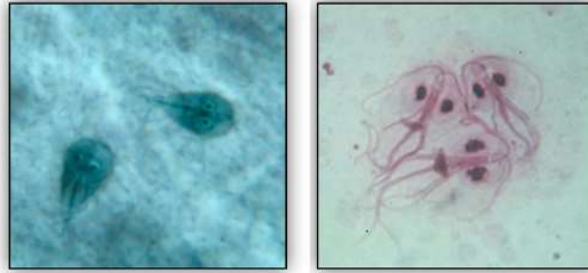
Una de las características más importantes de *G. lamblia* es que constituye una de las células eucariotas más primitivas que se conocen (Hashimoto, Nakamura et al. 1994). Si bien es claramente un organismo eucariota debido a que posee una membrana nuclear rodeando el material genético, un sistema de endomembranas, vesículas lisosomales y citoesqueleto, carece de mitocondrias típicas y peroxisomas, asemejándose más, en muchos aspectos, a un organismo procariota que a cualquier otro eucariota conocido (Adam 1991, Adam 2001). En resumen, *Giardia* se puede catalogar en: Imperio o Superreino: Eukaryota; Reino: Protozoa; Filo: Sarcomastigota; Subfilo: Mastigospora; Clase: Zoomastigosporea; Orden: Diplomonadida; Especie: *Giardia lamblia*.

### **1.3-Giardia lamblia. Relevancia.**

#### **1.3.1-Trofozoítos y el mecanismo de Variación antigénica**

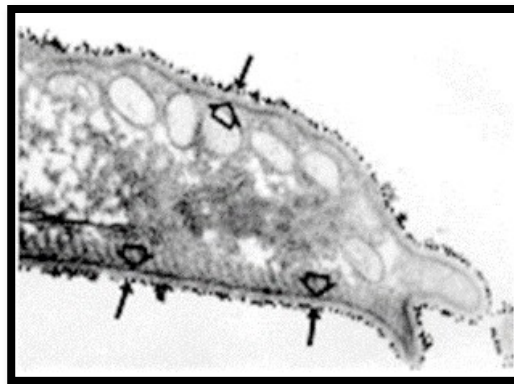
*Giardia lamblia* habita el duodeno y el yeyuno superior, donde el pH alcalino es favorable para el crecimiento. Los trofozoítos, piriformes y de un tamaño aproximado de 9 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y de 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho, se adhieren firmemente a la superficie de la microvellosidad intestinal con sus discos ventrales, o se mueven libremente en el lumen, mientras que la invasión actual de la mucosa y la submucosa se ha documentado con poca frecuencia. Su forma de vida libre posee una cara posterior convexa y una cara anterior cóncava, siendo el único protozoario que presenta simetría bilateral. Posee dos núcleos ovoides, sin nucléolos distinguibles morfológicamente. Tiene cuatro pares de flagelos que le confieren gran motilidad y carece de algunas organelas típicas de las células eucariotas como mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi (Adam 2001, Campanati, Holloschi et al. 2002). Los trofozoítos se encuentran más frecuentemente en heces líquidas o blandas y los quistes infecciosos más resistentes se observan en heces más formadas (Wolfe 1992) (Fig. 1).





**Figura 1. Trofozoítos de *Giardia lamblia*.** A la izquierda con tinción de Kohn y a la derecha coloreados con Giemsa. Tomado de CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/>).

Es en el estadio de trofozoíto que *Giardia* lleva a cabo la colonización del hospedador, causando la patología que puede ser evidenciada o no por una gran variedad de síntomas y signos (Adam 2001). Los microorganismos parásitos como lo es *Giardia* están preparados para soportar condiciones ambientales adversas tanto fuera como dentro del hospedador (Petry, Jakobi et al. , Bongfen, Laroque et al. 2009). Una de las características estructurales más importantes que se observan en los trofozoítos es su recubrimiento con un tipo especial de proteínas denominadas “proteínas variables específicas de superficie” o VSPs (Fig. 2) (Nash and Mowatt 1993, Lujan, Mowatt et al. 1995). Las VSPs constituyen una familia de proteínas que provienen de un repertorio de más de 200 genes homólogos presentes en el genoma de *Giardia* (Adam 2001).



**Figura 2. Imagen de microscopía electrónica mostrando las VSPs de *Giardia* mediante inmunomarcación.** Microscopia electrónica de un corte transversal de un trofozoíto de *G. lamblia* incubado con anticuerpos anti-VSPs marcados con oro coloidal. En la periferia de la célula puede observarse el acúmulo de VSPs demarcado por las agrupaciones de oro coloidal (flechas) recubriendo la superficie de la célula (Pimenta, da Silva et al. 1991).

Normalmente cada trofozoíto sólo expresa una VSP de un repertorio de más de 200 genes presentes en su genoma. Cada cierto tiempo la VSP que recubre en su totalidad al trofozoíto es cambiada por otra con características antigénicas diferentes (Nash, Aggarwal et al. 1988, Pimenta, da Silva et al. 1991, Prucca, Slavin et al. 2008). Se ha observado que el intercambio de proteínas de superficie ocurre espontáneamente en células cultivadas *in vitro* con una frecuencia que varía entre 6 y 18 generaciones. De esta manera, los trofozoítos que son liberados a partir de los quistes en el intestino del hospedador inicialmente expresan un tipo de VSP, cuando se ven afectados por el sistema inmunológico simplemente cambian por otra VSP diferente y logran sobrevivir (Nash, Banks et al. 1990).

El sistema de regulación de la expresión de las VSPs en este organismo es regulado por un mecanismo post-transcripcional similar al ARN de interferencia. La totalidad de los genes que codifican para VSPs son transcritos simultáneamente de manera constitutiva. Posteriormente una ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRP: del inglés RNA-dependent RNA-polymerase) genera segmentos antisentido para todos los transcritos menos uno. Los ARN mensajeros doble hebra son degradados por un complejo multienzimático formado por las enzimas Dicer y Argonauta, pero el único transcripto de simple hebra que logra superar este proceso sigue su camino hacia la expresión de la VSP que finalmente recubrirá la superficie del trofozoíto (Prucca, Slavin et al. 2008).

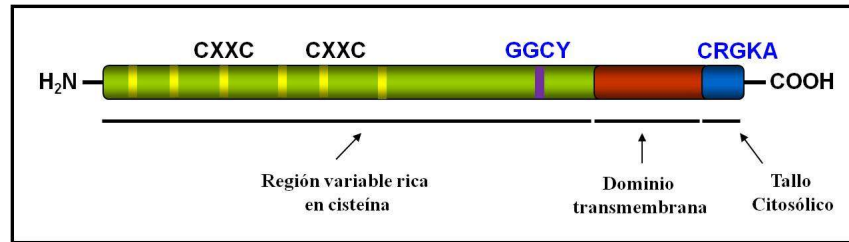
### **1.3.2-Proteínas variables de superficie.**

Como se mencionó anteriormente, las VSP pertenecen a una familia de proteínas ricas en residuos de cisteína (Nash 1992) (Fig. 3). Sus masas moleculares varían entre 20 y 200 kDa (Nash 1992) y poseen un péptido señal de 14 a 17 aminoácidos (Lujan, Mowatt et al. 1995). Aunque inicialmente fue determinada la secuencia parcial del mARN de la VSP A6 (Adam, Aggarwal et al. 1988), recién dos años más tarde se informó la primera secuencia completa de una VSP (TSA417) (Gillin, Hagblom et al. 1990). Desde entonces, innumerables trabajos han reportado la presencia de VSPs en una variedad de cepas, pero con la finalización del proyecto genoma de *Giardia* (McArthur, Morrison et al. 2000) para los aislamientos WB (Morrison, McArthur et al. 2007) y GS (Morrison, McArthur et al. 2007, Franzen, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2009) pudo conocerse el set

completo de estas proteínas.

El grado de homología que existe entre los diferentes genes que codifican para proteínas variables de superficie varía desde la completa duplicación hasta la presencia de regiones muy conservadas seguidas por regiones de gran divergencia (Adam 2001). Estas observaciones sugieren que el amplio repertorio de VSPs se originó por una combinación de eventos de duplicación seguidos por mecanismos de divergencia y recombinación. A pesar que todos los genes VSP parecen estar formando clústeres, no existe en la actualidad, evidencia que indique que estos genes estén ligados transcripcionalmente (Adam 2000). Puntualmente no poseen intrones, tienen una similitud de tamaño que varía entre un 60 y 100%, contienen regiones intergénicas cortas (RIG: < 200 nt), los transcriptos poseen regiones no codificantes (5' y 3' UTR) pequeñas (0-40 nt) y no poseen regiones reguladoras evidentes (Adam, Yang et al. 1992, Yang, Ortega et al. 1994, Lujan, Mowatt et al. 1995).

El análisis bioinformático, muestra que todas las VSPs poseen en sus secuencias un péptido señal hidrofóbico. Además, cada una contiene un dominio N-terminal altamente variable, en el cual se observan frecuentes motivos CXXC (Adam 2001). La porción C-terminal de las VSPs presenta un alto grado de homología, con 38 aminoácidos que tienen casi el 90% de identidad. Esta parte incluye un dominio transmembrana hidrófobo de entre 23 - 25 aminoácidos y un tallo citoplasmático altamente conservado con el motivo CRGKA (Mowatt, Aggarwal et al. 1991). El dominio extracelular de las VSPs constituye la interfaz entre el hospedador y parásito: por esta razón varios mAb que reconocen la superficie de los parásitos vivos reconocen un epítipo en la porción N-terminal de las VSP (Nash and Aggarwal 1986, Mowatt, Aggarwal et al. 1991). De la misma manera, cuando se agregó como marcador el epítipo de la hemaglutinina (HA) al extremo N-terminal de las VSPs pudo observarse señal de localización en la superficie del parásito utilizando un mAb anti-HA (Kulakova, Singer et al. 2006), esto confirma claramente que las VSP son una familia de proteínas integrales de membrana de tipo 1 (Smith, Aley et al. 1998).



**Figura 3. Esquema de la estructura de las proteínas variables de superficie de *Giardia*.** Esquema representativo de una VSP de *G. lamblia*. En el extremo C-terminal puede apreciarse el dominio transmembrana (rojo) y el tallo citosólico altamente conservado (azul). En el extremo N-terminal pueden identificarse los dominios GGCY (violeta) y CXXC (amarillo) típicos de la región variable de estas proteínas.

También se pueden encontrar numerosos motivos CXXC en las proteínas de superficie de otros organismos, ya sea que estén o no involucradas en la variación antigénica (Cheng and Chen 2001). Estos motivos contienen la mayoría de las cisteínas presentes en las VSPs y se cree que son los responsables de proporcionar las propiedades estructurales de las proteínas, así como también de conferir estabilidad redox en la superficie del parásito (Gillin, Hagblom et al. 1990). La porción extracelular de las VSPs presenta una disminución progresiva en la conservación de los motivos CXXC, generando un alto grado de divergencia entre las diferentes VSPs (Adam 2001). En el extremo C-terminal extracelular puede reconocerse un motivo GGCY (Bienz, Wittwer et al. 2001), aunque también puede estar presente en la porción N-terminal en algunas VSPs (Nash, Conrad et al. 1995). Diferentes dedos de zinc se han reportado en las VSPs (Nash and Mowatt 1992, Nash and Mowatt 1993). Estos motivos están presentes en diferentes proteínas con funciones diversas, sobre todo en factores de transcripción. Aunque fue sugerida la inferencia de las VSPs en el control de la expresión génica, no ha podido ser demostrado hasta el momento (Nash, Lujan et al. 2001). Las VSPs poseen motivos de unión a metales análogos a los dominios LIM y RING hallados en eucariotas superiores (Gill 1995, Borden 2000). Los dominios LIM se caracterizan por su capacidad de unir metales pesados, primordialmente átomos de zinc. Además, estas proteínas poseen a lo largo de su secuencia motivos adicionales (CXXCXnCXXC) que, conjuntamente con los dominios "CXXC", intervienen en la unión de átomos de zinc (Nash and Mowatt 1993, Lujan, Mowatt et al. 1995, Nash, Conrad et al. 1995). En células eucariotas superiores, estos motivos se encuentran formando parte de proteínas intracelulares de unión a ADN o que actúan en el control de la transcripción o en la reparación del ADN (Gill 1995). *Giardia*

es el único organismo conocido que posee un motivo de unión a zinc en proteínas de superficie (Nash and Mowatt 1993). Cuando los trofozoítos se encuentran adheridos a la pared intestinal del huésped, el secuestro de átomos de zinc por las VSPs podría ayudar a la inhibición de enzimas dependientes de zinc como las carboxipeptidasas (Nash and Mowatt 1993) o competir con el huésped por este metal causando la deficiencia de Zinc previamente observada en pacientes con giardiasis (Udomkesmalee, Dhanamitta et al. 1992).

En *Giardia*, la variación antigénica en la que una VSP es reemplazada por otra antigénicamente diferente ocurre tanto en respuesta al ataque inmunológico que estos antígenos inducen en animales (Aggarwal, Merritt et al. 1989) y humanos (Nash, Banks et al. 1990), como así también espontáneamente *in vitro* (Singer, Elmendorf et al. 2001). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que la variación antigénica en *Giardia* está regulada por un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Prucca, Slavin et al. 2008). El mecanismo de PTGS es un proceso altamente conservado en el cual el reconocimiento de las moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) induce degradación específica de ARNm homólogos, reduciendo o anulando la expresión del gen en cuestión. Este proceso ocurre en el citoplasma sin afectar la transcripción del ARNm. En *Giardia*, en ambos núcleos se lleva a cabo la transcripción simultánea de la gran mayoría de los genes que codifican para las VSPs, los cuales son posteriormente transportados hacia el citoplasma. Una señal no determinada hasta el momento causaría el incremento de la transcripción del gen que codifica para una VSP en particular, aumentando por lo tanto la concentración citoplasmática de sus transcriptos. Esta VSP que posee mayor concentración citoplasmática es capaz de evadir el mecanismo de silenciamiento para ser traducida y expresada en la superficie del parásito (Prucca, Slavin et al. 2008).

### **1.3.3-Resistencia de las VSPs a la digestión proteolítica y a cambios en el pH.**

Aunque las VSPs comparten características comunes, estas pueden variar en particularidades tales como la presencia y naturaleza de las repeticiones en tándem, localización y número de motivos comunes o únicos, así como variaciones en los motivos CXXC, que derivan en diferencias en la secuencia, estructura y antigenicidad. Estas características variables, a su vez, dan lugar a propiedades físico químicas únicas tales como diferentes niveles de resistencia a

tripsina y quimotripsina (Nash 1991), lo cual le permite a los trofozoítos sobrevivir en el intestino delgado.

Resistencia a presencia de tripsina en concentraciones similares a las halladas en el duodeno han sido evidenciada a través de ensayos de inmunofluorescencia empleando mAb específicos contra diferentes VSPs (Rivero, Saura et al. 2010). En ensayos similares se confirmó que las VSPs de los trofozoítos no eran alteradas por cambios en el pH. En ambos casos, la resistencia a la acción de la tripsina como a los cambios en el pH se evidenció por la sobrevida y aglutinación de los trofozoítos recubiertos por las VSPs; y el marcaje con mAb, uno de ellos capaz de reconocer un epítipo conformacional, evidenció la presencia de las proteínas luego del tratamiento (Rivero, Saura et al. 2010). La relevancia biológica de la resistencia a proteasas de las VSPs de *G. lamblia* es desconocida. Su variabilidad es muy alta y existe un gran número de genes codificantes para estas proteínas en el genoma del parásito (Huang and White 2006), lo que amplía las posibilidades de nuevas opciones a la hora de elegir proteínas objetivos para los ensayos planteados en esta tesis.

Con una alta gama de opciones para elegir, el uso de las VSPs y sus propiedades nos brinda grandes posibilidades a futuro en el desarrollo de una plataforma para mejorar la administración de fármacos de naturaleza proteica a través de la vía oral.

## **1.4-Objetivos**

### **1.4.1-Objetivos generales**

Es por todo lo expuesto que en el presente trabajo se decidió estudiar las características estructurales y bioquímicas de las VSPs para poder implementar una plataforma para la administración de drogas por vía oral, combinando su accionar con la de péptidos de interés que permitan evaluar la eficacia de la plataforma tanto sea en lo que concierne a la administración como además a los efectos biológicos sistémicos.

### **1.4.2-Objetivos particulares.**

- Optimizar la producción de VSPs y péptidos similares a VSPs presentes en otros organismos para su producción a escala de laboratorio y escala industrial.

- Optimizar la purificación de VSPs para un sistema continuo de producción.
- Realizar estudios estructurales sobre las VSPs para indagar sobre sus propiedades físico-químicas.
- Realizar ensayos de la plataforma de administración oral con proteínas y péptidos de interés biológico.

# **Capítulo II**

## **Materiales y Métodos**



## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1-Cultivo de *Giardia lamblia*.**

Los trofozoítos de *G. lamblia* utilizados pertenecen a los aislamientos WB y GS/M, clones 1267, 9B10, y H7, respectivamente (Nash y col., 1988). Los trofozoítos fueron cultivados a 37°C en anaerobiosis en medio de crecimiento TYI-S-33 (pH 6,8) suplementado con suero adulto bovino al 10% y bilis bovina 0,5 mg/ml (medio completo) (Diamond y col., 1978).

### **2-2-Lisado de trofozoítos de *Giardia lamblia***

Los trofozoítos se cosecharon mediante enfriamiento en hielo de los tubos de cultivo durante 30 min seguido por centrifugación a 1000-1500 g durante 10 min. El pellet con los trofozoítos se lavó tres veces en buffer fosfato frío (PBS, pH 7,4, 4°C), se sonicó con ocho ciclos a 40 volts por 30-s y se centrifugó a 10.000 g durante 20 min (Chaudhuri et al., 1997). Se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas solubles de los trofozoítos y la concentración de proteínas se determinó por el ensayo de Bradford.

### **2.3-Purificación de ácidos nucleicos.**

El ADN geonómico fue extraído a partir de trofozoítos con el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sambrook, 1989).

### **2.4-Generación de la plataforma de producción de proteínas recombinantes en el sistema de expresión de baculovirus.**

#### **2.4.1-Células y medios de cultivo.**

Células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*, Invitrogen) fueron cultivadas por un lado a 27°C en adherencia en frascos T-75 (Corning) y por otra parte en frascos de cultivo en agitación a 110-120 rpm en SF900-II libre de suero (Gibco, Life Technologies).

#### **2.4.2-Diseño de genes clonados**

Las construcciones se hicieron en el caso de la VSPH7 de GS/M a partir de las secuencias de ADN extraídas del genoma de *G. lamblia* y en el caso de la VSP1267 por pedido a la empresa

Genscript de una secuencia sintética. El diseño de ambas proteínas recombinantes se hizo manteniendo el péptido señal y la región N-terminal extracelular por completo sin afectar ningún dominio estructural, reemplazando en ambos casos la porción transmembrana y la región C-terminal citoplasmática por un tag de histidinas para permitir su purificación y su reconocimiento mediante técnicas inmunológicas.

### 2.4.3-Diseño de los primers

Para el diseño de los primers se empleó la plataforma PrimerStat ([http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)) que permite analizar las características de los mismos, teniendo en cuenta factores como temperatura de hibridación, horquillas, autohibridación, etc.

Nombre	Enzimas	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido reverso
VSP1267	XbaI, HindIII	GCTCTAGAGCATGCTGCTGAT CGCGTTC	CCCAAGCTTGGGTTAGTGATGGTGATGGTG
VSPH7	XbaI, HindIII	GCTCTAGAGCATGTTTCTATTA ATTAATTGCC	CCAAGCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGG CCAGAGGAGAGGTTGGGGCCAC

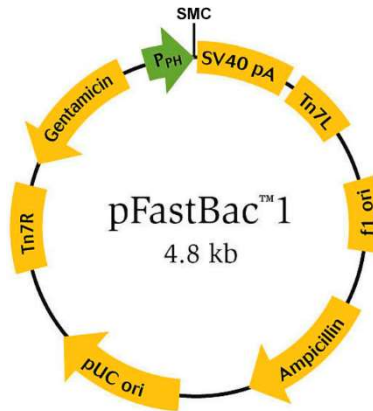
### 2.4.4-Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Todas las construcciones se hicieron empleando la enzima ADN polimerasa AccuPrime™ Pfx (ThermoFisher), la cual es una ADN polimerasa de la especie *Thermococcus* de la sepa KOD. Esta polimerasa posee actividad exonucleasa 3' a 5' que provee una alta fidelidad.

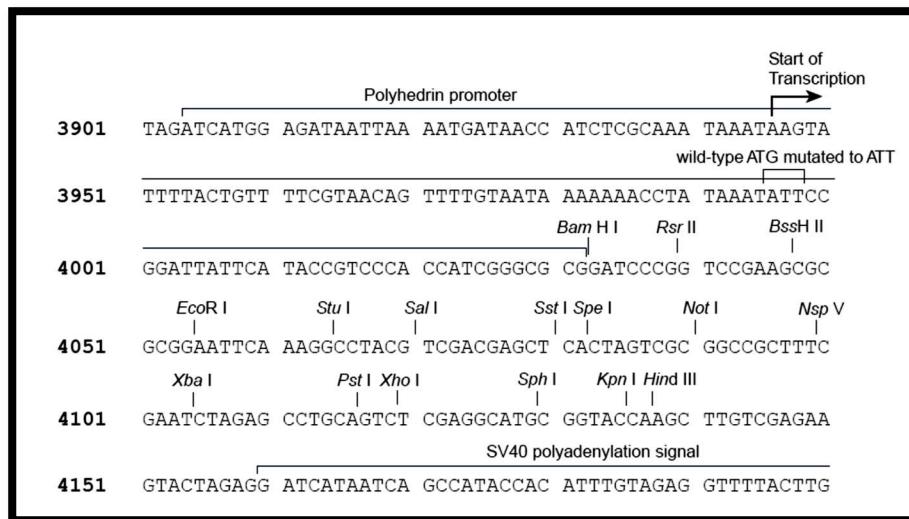
### 2.4.5-Construcción de baculovirus

Para la obtención de las proteínas recombinantes expresadas en Baculovirus los fragmentos génicos correspondientes a las proteínas de *Giardia* deseadas fueron introducidos en el vector pFastBac 1 (Fig. 5, 6 y 7. Invitrogen). La expresión de los genes clonados en este vector se produce usando el promotor de polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear múltiple de la polilla *Autographa californica*, que tiene una expresión muy elevada en células de insecto y es un gen prescindible para la infección. Este casete está flanqueado en ambos lados por secuencias del transposón Tn7. El vector incluye también un gen de resistencia a gentamicina. Los plásmidos

construidos se purificaron y se secuenciaron para asegurar la inserción correcta de los genes.



**Figura 5. Esquema del plásmido pFastbac 1 de Invitrogen.** El vector es parte del sistema Bac-to-Bac. Posee regiones de reconocimiento (Tn7R y L) para la trasposasa encargada de generar el ADN vírico recombinante.



**Figura 6. Sitio de múltiple clonado del pFastbac 1.**

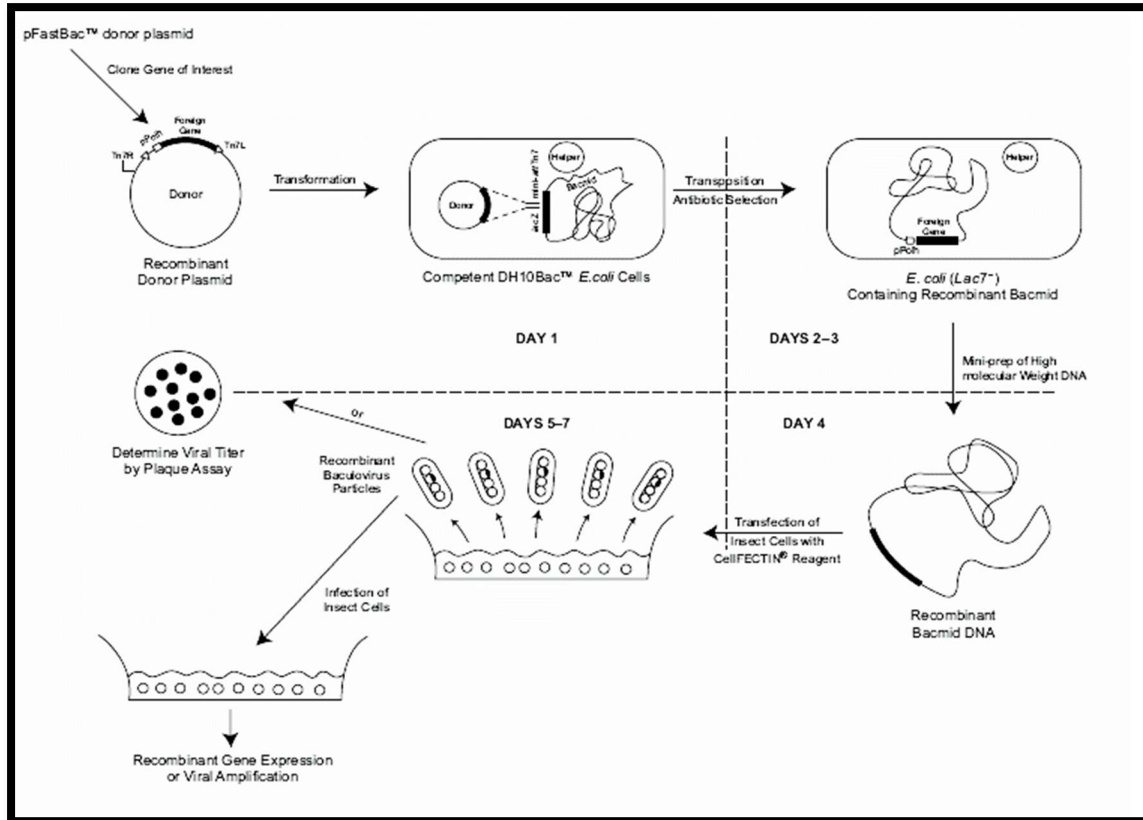


Figura 7. Diagrama de flujo según Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen.

#### 2.4.6-Transformación de *Escherichia coli* DH10Bac.

Una vez se obtiene el pFastBac1 recombinante se procedió a transformar mediante shock térmico con el mismo a una cepa de bacteria perteneciente al sistema Bac-to-Bac denominadas DH10Bac. Esta cepa posee las siguientes características:

- Transportan al ADN vírico denominado baculovirus o bÁCmido (bMON14272, Invitrogen).
- Contiene el plásmido auxiliar, pMON 7124 (13,2 kb), que codifica la transposasa y confiere resistencia a la tetraciclina. El plásmido auxiliar proporciona la función de transposición Tn7 en trans (Barry, 1988).

El bÁCmido se propaga en *E. coli* DH10Bac™ como un gran plásmido que confiere resistencia a la kanamicina y se puede complementar una supresión del lacZ presente en el mismo para formar colonias que son de color azul (Lac +) en presencia de un sustrato cromogénico como

Bluo-gal o X-gal y el inductor, IPTG. Los b́acmidos recombinantes se generan mediante la transposici3n de un elemento mini-Tn7 de un pĺasmido donante, el pFastBac, al sitio de uni3n attTn7 en el receptor o b́acmido, proceso llevado a cabo por la trasposasa codificada en el pĺasmido auxiliar pMON. Las colonias resultantes de la inserci3n correcta del gen en el b́acmido son blancas luego de la trasposici3n (Lac<sup>-</sup>) y resistentes a tres clases de antibi3ticos (tetraciclina, kanamicina y gentamicina), lo cual asegura una correcta elecci3n de las colonias donde haya ocurrido la transposici3n.

#### **2.4.7-Aislamiento del b́acmido.**

Se seleccionaron al menos 5 colonias blancas para extracci3n del ADN recombinante. Antes de aislar el ADN, las colonias fueron estriadas en placas de cultivo frescas para garantizar que sean realmente blancas.

A partir de cada colonia confirmada se establecieron 2 ml de un cultivo de LB que contiene antibi3ticos (50 mg/ml de kanamicina, 7 mg/ml de gentamicina, y 10 mg/ml de tetraciclina) para el aislamiento del b́acmido recombinante. Para su purificaci3n se procedi3 segun se detalla: crecer a 37°C hasta la fase estacionaria (hasta 24 h) con agitaci3n a 250-300 rpm. Transferir 1,5 ml de cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y centrifugar a 14.000 g durante 1 min. Eliminar el sobrenadante por aspiraci3n al vaci3 y resuspender cada pellet en 0,3 ml de Soluci3n I [15 mM Tris-HCl (pH 8,0), EDTA 10 mM, 100 mg / ml de RNasa UN]. Añadir 0,3 ml de Soluci3n II (NaOH 0,2 N, 1% SDS) y mezclar suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Añadir lentamente 0,3 ml de acetato de potasio 3 M (pH 5,5), mezclando suavemente durante la adici3n. Se formará un precipitado blanco espeso de proteínas y ADN gen3mico de *E. coli*. Colocar la muestra en hielo durante 5 a 10 min. Centrifugar durante 10 min a 14.000 g. Transferir el sobrenadante a un tubo conteniendo 0,8 ml de isopropanol. Mezclar invirtiendo suavemente el tubo un par de veces y colocar en hielo durante 5 a 10 min. Centrifugar la muestra durante 15 min a 14.000 g a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y añadir 0,5 ml 70% de etanol a cada tubo. Centrifugar durante 5 min a 14.000 x g a temperatura ambiente. Eliminar la mayor cantidad del sobrenadante como sea posible. Se deja secar al aire brevemente, de 5 a 10 min, a temperatura ambiente y se disuelve el DNA en 40 µl de buffer TE. Se almacena el DNA a -20° C.

#### **2.4.8-PCR del bácmido recombinante.**

El bácmido recombinante aislado se confirmó mediante PCR utilizando primer específicos y primer universales M13 suministrados comercialmente por la empresa Invitrogen.

#### **2.4.9-Transfección de células de insecto y preparación de stock de baculovirus.**

Para la preparación de los stock de Baculovirus, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células Sf9 fueron sembradas en placas de seis pocillos. La mezcla de transfección compuesta del bácmido construido y del reactivo de transfección Fugene (Promega) fue diluido en medios SF900-II acorde al protocolo de la empresa. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente antes de ser agregada a las células y se incubó con las mismas durante 5 h a 27°C. El medio de transfección se reemplazó con medio fresco. Estos cultivos se incubaron a 27°C, y se recogieron los sobrenadantes a las 96 h después de la transfección, los cuales fueron centrifugados (4°C, 1.000 g, 10 min) y almacenados a 4°C con adición de 2% de suero fetal bovino (SFB) (stock P1).

#### **2.4.10-Amplificación de stock virales**

Mayores volúmenes de reserva de virus se realizaron mediante infección con stock P1, P2 y P3 consecutivamente con multiplicidades de infección (MOI) entre 0,1 y 1 unidad formadora de placa (pfu) por célula, escalando los cultivos de Sf9 en frascos T-25, 75 y 125, respectivamente. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo a las 96 h después de la infección, los cuales fueron centrifugados (4°C, 1.000 g, 10 min) y almacenados a 4°C con adición de 2% de SFB.

Los stocks de virus P3 se utilizaron para la producción de proteínas recombinantes a gran escala.

#### **2.4.11-Cuantificación de título viral.**

La cuantificación del título viral de los stock se realizó mediante el ensayo en placa de lisis según el protocolo del fabricante (sistema de expresión Bac-to-Bac, Invitrogen). Se sembraron  $1 \times 10^6$  células Sf9 por triplicado en placas de cultivo de 6 pocillos. Se realizaron 8 diluciones seriadas del stock de virus ( $10^{-8}$ ) en medio SF900 II SFM, se infectó con 1 ml por pocillo a partir de

la dilución  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Luego de la hora de incubación se removió el medio con virus, se enjuagó con medio fresco y se agregaron 2 ml de una mezcla con agarosa (SF900II + 1% agarosa). Se dejó reposar durante 20-30 min para que gelifique. Se incubaron luego a  $27^{\circ}\text{C}$  en ambiente húmedo por 4 a 7 días hasta que el número de placas de lisis no cambiaron por dos días consecutivos. El título fue calculado por la siguiente fórmula:  $\text{pfu/mL} = [(1/\text{factor de dilución} \times \text{N}^{\circ} \text{ de placas}) \times 1/(\text{mililitros de inóculo por pocillo})]$ .

### **2.5-Optimización de la expresión de proteínas recombinantes.**

Para los ensayos de optimización, se infectaron cultivos de células Sf9 en placas de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) con stock de virus P3 a diferentes MOI entre 1 y 10. El sobrenadante y los pellets celulares se cosecharon por centrifugación a intervalos regulares (24, 48, 72 y 96 h después de la infección) y se analizaron por *Western blotting*. Para el lisado de los pellet celular se utilizó buffer 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 mM NaCl, 1% NP40 (Sigma-Aldrich), adicionado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete<sup>TM</sup>, EDTA free, Roche).

### **2.6-Producción a gran escala y purificación de las proteínas recombinantes**

Se inició un cultivo a  $27^{\circ}\text{C}$  en incubadora en agitación a 140 rpm con densidad inicial de  $5 \times 10^5$  células/ml. El cultivo de células de insecto (SF9 o HighFive) se mantuvo con conteo diario de células y viabilidad celular (no inferior a 95% en ningún momento) hasta una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, luego de lo cual el volumen de medio se duplicó. Una vez alcanzado un volumen de 1,6 L de cultivo celular, se inoculó empleando el stock de virus con la MOI determinada previamente. Se realizaron conteos diarios de número total de células y de viabilidad celular. Luego de 96 h post-infección, el cultivo fue centrifugado a 10.000 g por 15 min y conservado el sobrenadante y pellet celular a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El pellet celular fue lisado en hielo mediante la adición de buffer de lisis (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1% NP40, Complete EDTA free, pH 8), centrifugado a 10.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, los restos celulares fueron descartados y el sobrenadante del lisado recuperado. Los sobrenadantes de cultivo y los sobrenadantes de lisado celular fueron incubados con resina NTI-NA (Qiagen) durante 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$  y se pasaron por columnas de cromatografía (Bio-Rad) para separar fase líquida de fase sólida. La resina fue lavada con 5

volúmenes de buffer de lavado (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8) y luego se eluyó con buffer de elución (300 mM NaCl, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 250 mM Imidazol, pH 8). La muestra eluida fue colectada por fracciones de 1 ml en tubos Eppendorf.

### **2.7-Diálisis y almacenamiento de la producción de proteínas**

Las proteínas fueron dializadas en casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce) contra buffer fosfato (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) durante 2 h a temperatura ambiente. Se almacenó el stock de cada proteína a -70° C previa adición de glicerol a concentración final del 5%.

### **2.8-Métodos analíticos de cuantificación de proteínas.**

Los ensayos de proteínas totales se realizaron mediante el ensayo de Bradford con Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La pureza se determinó midiendo la densidad óptica (DO) en la electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie, para su posterior análisis empleando el programa ImageJ (National Institute of Health, USA).

### **2.9-Electroforesis de ADN en geles de agarosa.**

Las muestras de ADN a ser analizadas fueron sembradas en geles de agarosa 0,8–2 %/TAE 1 X conteniendo Bromuro de Etidio 0,5 µg/ml y separadas electroforéticamente a 100 V en buffer TAE 1 X (Sambrook y col., 1989). Luego las bandas fueron visualizadas mediante exposición a luz UV en UV Transilluminator (UVP). Las fotos digitales fueron obtenidas utilizando el analizador de imágenes Eagle Eye II. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 1 Kb DNA ladder y 100 bp ladder (Invitrogen).

### **2.10-Análisis bioinformático de las secuencias de ADN.**

El análisis de las secuencias fue llevado a cabo con el programa computacional DNASTar (Lasergene). Para la predicción de dominios transmembranas y péptidos señales se utilizó Phobius 5.1 (Kall y col., 2005). El programa SMART Simple Modular Architecture Research Tools (Schultz



col., 2000) fue utilizado para la búsqueda de dominios y motivos en las proteínas. La búsqueda de homologías se realizó con BLAST (Altschul y col., 1997) y otras predicciones estructurales se obtuvieron con el software presente en ExPASy (<http://www.expasy.ch>). El análisis de secuencias de *Giardia* fue también llevado a cabo con el servidor BLAST del Genoma de *Giardia* (McArthur y col., 2000, [www.giardiadb.org](http://www.giardiadb.org)).

### **2.11-Electroforesis de proteínas en geles de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) y *Western blotting*.**

Las proteínas se colocaron 10 min a 100°C en buffer de siembra (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 10 % glicerol, 0,5 % azul de bromofenol) en presencia o ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM y corridas en geles de poliácridamida al 10-20 %/SDS 0,1 % (Laemmli, 1970). La electroforesis fue realizada utilizando el sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad), a un voltaje constante de 100 V.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell o Hybond-C, Amersham) en buffer conteniendo Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol 20 % a 100 V por 1,30 h a 4°C (PS 1200 PC Power Supply, Hoefer Scientific Instruments) (Towbin y col., 1979). Las membranas fueron bloqueadas 1 h con PBS/Tween 20 0,5 %/leche descremada 3 %, luego de lo cual se incubaron por 1 h con los anticuerpos específicos (mAb primarios) correspondientes diluidos 1/1000 en solución bloqueante.

Luego de ser lavadas con PBS/ 0,5 % Tween 20, las membranas fueron incubadas con suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology) y reveladas con sustrato para fosfatasa alcalina (BCIP/NBT, Color Development Solution, BIO-RAD).

Los anticuerpos de ratón utilizados para la marcación específica fueron los siguientes:

Proteína o epitope	Nombre o abreviatura	Empresa
rVSP1267 y lisado WB1267	5C1	NIH
rVSPH7 y lisado GS/M H7	G10/4	NIH
rVSP9B10 y lisado WB9B10	9B10	NIH
Tag His6 C-terminal	Anti-His6	Roche
INF $\alpha$ 2A	Anti- INF $\alpha$ 2A	Prospect
INF $\beta$ 1A	Anti- INF $\beta$ 1A	Prospect

Hormona de crecimiento humana recombinante	Anti- hGH	Biosidus
Glucagón humano recombinante	Anti- Gln	Prospect

### 2.12-Ensayos proteolítico de las VSPs recombinantes.

1  $\mu$ g de  $\Delta$ VSP se trató durante 90 min a 37° C con concentraciones variables de tripsina (100/50/25/10:1, peso:peso,  $\Delta$ VSP:tripsina (tripsina pancreática bovina, Sigma-Aldrich) en PBS pH 8; diferente contenido intestinal (IC) (diluciones 1/1000, 1/500, 1/250, 1/100 respecto al volumen de reacción final); o a pHs extremos (PBS pH 2 o pH 10). La reacción se detuvo mediante la adición de cóctel inhibidor de proteasas (Complete, EDTA-libre, Roche), mezclada con buffer de siembra para electroforesis (Laemmli, 1970) y calentadas a 100° C por 10 min. El IC se obtuvo de intestino delgado de ratones normales por lavado intestinal con PBS.

### 2.13-Ensayos para la evaluación *in vitro* de la protección de los fármacos

1  $\mu$ g de proteína o péptido solo o mezclado previamente con  $\Delta$ VSP a temperatura ambiente durante 30 minutos (relación de 1:3, peso:peso) en PBS, fue incubado en las mismas condiciones empleadas para evaluar el perfil proteolítico de  $\Delta$ VSPs (ver arriba). La presencia de cada compuesto se determinó utilizando su anticuerpo monoclonal específico correspondiente. Los fármacos y anticuerpos empleados para los ensayos fueron:

Proteína	Empresa	Anticuerpo monoclonal
IFN $\beta$ 1a humana recombinante	Prospect	Ac de ratón anti hIFN- $\beta$
IFN $\alpha$ 2a humana recombinante	Prospect	Ac de ratón anti hIFN- $\alpha$
Glucagón humano recombinante	Prospect	anti-glucagón mAb (Clone K79bB10, Sigma)
Hormona paratiroidea recombinante humana	Prospect	
Hormona de crecimiento humana	Bio Sidus S.A.	Anti- hGH (Bio Sidus S.A.)

### 2.14-Administración y medición de la absorción de fármacos *in vivo*.

### **2.14.1-Administración oral.**

En todos los casos, para la administración oral, tanto la droga sola como la mezcla con  $\Delta$ VSPs se llevó a un volumen final de 250  $\mu$ l en PBS pH 8. Ambas soluciones fueron incubadas 30 min a temperatura ambiente previo a su uso. Las administraciones fueron llevadas a cabo, empleando sondas nasogástricas, en ratones Balb/c de 8-12 semanas de edad, machos y hembras, que fueron dejados sin alimento por un período de 2 h previas al ensayo. Para todos los ensayos se respetó la relación droga: $\Delta$ VSP (1:3, peso:peso) en la mezcla.

### **2.14.2-Interleuquinas Humanas (hIL-2, hIL-10).**

Se estableció que luego de 30 min de la inyección s.c de 400 ng de hIL-10 y hIL-2 se pudo detectar a las mismas en suero usando un ELISA Kit II (Bioscience U.S.). Para la administración oral, se trabajó con una concentración de 4  $\mu$ g, diez veces más alta que las muestras s.c. Las muestras de suero se obtuvieron de la sangre extraída a través del seno retro-orbital en tubos de microcentrífuga, se dejó coagular 1 h a 37° C, se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 min y se almacenaron a -70° C hasta su análisis.

### **2.14.3-Interferones de tipo I humano (IFN $\alpha$ e IFN $\beta$ ).**

Se observó que 10<sup>4</sup> U pudieron ser detectados en muestras de suero después de 15 minutos de administración s.c. (grupo positivo) usando un sistema indicador (HEK-Blue™ de InvivoGen) específicos de Interferones humano tipo I. Posteriormente fue empleada una dosis diez veces mayor, 10<sup>5</sup> U (equivalente a 3,7  $\mu$ g), para los ensayos de administración oral. Las muestras de suero se obtuvieron como se describe en el punto anterior.

### **2.14.4-Insulina y glucagón.**

Se estableció que 0.1 UI (0,35  $\mu$ g) de la insulina y 2  $\mu$ g de glucagón en inyección s.c. permitieron evaluar el efecto de estas moléculas modificadoras de la glucemia. Para la administración oral se trabajó con cantidades diez veces mayores. Los niveles de glucosa en sangre fueron tomados posteriormente a los tiempos indicados mediante el método de mella en la cola y recogiendo una gota de sangre en un glucómetro (Accu-Chek, Roche).

### **2.15-Análisis estadístico**

Se aplicó ANOVA de una vía a los datos y test de Turkey's para comparación de medias no paramétricas. Se empleó el software Prism 5.0 (GraphPad Software).

### **2.16-Evaluación de la presencia de inmunoglobulinas totales en sangre y materia fecal.**

Aproximadamente 100 mg de materia fecal (mf) se recolecto en eppendorf. Las muestras fueron suspendidas en solución tampón de extracción (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M [PBS] [pH 7,4], Tween al 0,5% [Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, Reino Unido], y azida sódica al 0,05%) a cada tubo en una proporción de 150  $\mu$ l cada 100 mg, y homogeneizadas mecánicamente en vortex. Las suspensiones fecales se centrifugaron a 1.500 g durante 20 minutos a 5°C y se almacenaron a -70° hasta su uso. Las muestras de suero se recolectaron por punción orbital como se describió previamente. Se empleó ELISA para detectar la concentración inmunoglobulinas totales en suero y materia fecal.

# **Capítulo III**

## **Resultados**

### 3. Resultados

#### 3.1-Análisis de la secuencia de ADN

Utilizando el programa BLAST y la base de datos del genoma de *Giardia* (giardiadb.org), se buscaron las secuencias correspondientes a dos VSPs, una pertenecientes a la cepa WB, en este caso la VSP1267, y una perteneciente a la cepa GS/M, la VSPH7. Ambas poseen similares características. El análisis con la plataforma Phobius (phobius.sbc.su.se.; Tabla 1) muestra un péptido señal de exportación a membrana, una región extracelular de gran tamaño, una región transmembrana y una cola citoplasmática, que sabemos se encuentra conservada (CRGKA).

Predicción VSP1267. Posición de aminoácidos			
Péptido señal	1	14	
Región	1	1	N-Región
Región	2	10	H-Región
Región	11	14	C-Región
Topología del Dominio	15	566	Extracelular
Transmembrana	567	591	
Topología del Dominio	592	596	Citoplasmática

Predicción VSPH7. Posición de aminoácidos			
Péptido Señal	1	22	
Región	1	2	N-Región
Región	3	14	H-Región
Región	15	22	C-Región
Topología del Dominio	23	527	Extracelular
Transmembrana	528	552	
Topología del Dominio	553	557	Citoplasmática

**Tabla 1.** Predicción bioinformática de la topología de las VSPs utilizadas en el estudio mediante la utilización de la plataforma Phobius. (<http://phobius.sbc.su.se/>)

La estrategia que se utilizó fue la de clonar la región para porción extracelular de las VSPs. Esta región es rica en motivos CXXC. Se empleó el programa SMART (smart.embl-heidelberg.de) para tomar en cuenta donde situar el primer o sonda reversa (oligonucleótido reverso) sin irrumpir ningún posible dominio estructural de la proteína. El resultado de análisis permitió

asegurar que las regiones seleccionadas eran determinadas como regiones de baja complejidad. Luego de ello se situó el sitio de corte para la clonación de la región extracelular de las VSPs lo más próximo posible a la región transmembrana. Los genes por lo tanto se clonaron de tal forma que el dominio transmembrana y el tallo citoplasmático fuesen reemplazados por una cola de 6 histidinas en posición C-terminal (Fig. 8).

#### > $\Delta$ VSP1267

MLLIAFYLILSTFAVDCKNSGNSCEAGQCDTIGDTEI **CMQC**NQGKVPINGICTAHSEEAVTNAGCKKNGG  
 TNIEESDKV **CGQC**GNGYFLHKGGCYKIGEAPGNLCADEASNPGARTAGV **CGACK**DGYKNSDAVATA  
 DS **CIAC**EDAN **CATC**GGAGENK **CTKC**IDGYFVGATGNEGG **CIKC**DATTGPNSYKGVAG **CAKCE**KPKNAG  
 PAK **CIECA**AADYLKTEADEQTSVCSEAVCREGKTHFPTTDSAGGNKKV **CVSC**GTTNNGGIEN **CGECT**SKES  
 AARAGTEIT **CTKCSS**NNLSPLGDA **CLTDC**PAGTYAVSGDSGSV **CKPCH**NT **CAGC**QTDDRETS **CTAC**YPG  
 YLLYESNGATGR **CVKEC**TGAFITNCADGQCTANVGGAKY **CTQCK**DGYAPIDGICTAVAAAGRDVSVCT  
 ATGGK **CTACT**GNYALLSGGCYNTQTLPGKSVCKAVANSNDGK **CKTC**ANGQAPDPATNF **CPLC**DST **CAE**  
**C**STKNDADA **CTKC**FPGYKTGNK **CIKC**TESSNNGKKIDGIPD **CLSC**EAPINTGPVICYVKTDGTSDDNSGN  
 GGDSTNKSLSTG **HHHHHH**.

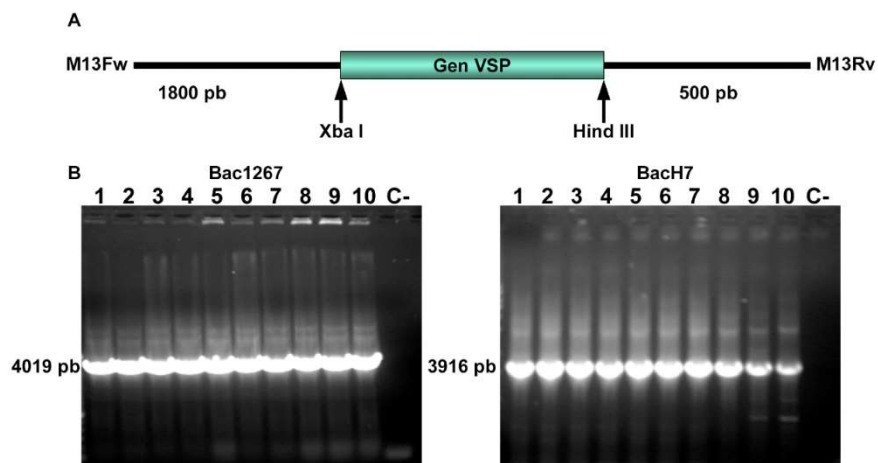
#### > $\Delta$ VSPH7

MFLINLIASSTLAGACSTTQACVAEKCEMVGETEI **CTQC**KQNYVPINGVCEAAASSNTKCQKASADEAS  
 DQT **CGKCL**STTFMYKGGCYDKTGNLGRICKTEGSDAGK **CGAC**NDEKGFDPDAANNVDS **CISCG**DA  
 TGVTIPGSSTKYKGVAG **CTKC**TKPSQISENTGTKEAT **CTEC**NANLYLKAVSSPTSATSCVSAEDCKTGYP  
 TDTTDSKKK **CLTC**STADKGGIDG **CSAC**ELLPSTTRASTVLIS **CSAC**STNNLSPLKNE **CMQDC**PAGTYADS  
 NV **CKPCH**TS **CASC**KGDNTESS **CTAC**YPGSVLSYGTDNTKGT **CIAECT**GKYLEN **CADGQC**TATIAGSKY **CS**  
**KC**KSGFVNVNGLCVSAETARAAPPSTPDKTNGV **CTAC**TEKYFLESGGCYQAEKFPGNLCTTADAGK **C**  
**TTC**ANGQDKDSNGS **CPACPT**NCASC AKDNTKT **CNKC**FSGYLDTAKA **CKKC**SETSGNIQGVENC **CISCL**A  
 PTSPQSSTPVTCYVKTSGGGSGDNSTGGDSGPLSSG **HHHHHHHH**.

**Figura 8. Secuencia de aminoácidos de las VSPs recombinantes para producción en el sistema Bac-to-Bac.** En rojo están resaltados los motivos CXXC y en amarillo el tag de 6 histidinas fusionado en el extremo C-terminal de cada secuencia.

Con esta estrategia, en cada una de las  $\Delta$ VSPs clonadas se caracterizan por poseer repetidos motivos CXXC (denotados en color rojo y subrayado) y un porcentaje de cisteína que varía entre 10,6 a un 11,2%.

Las secuencias génicas obtenidas de ambas VSPs fueron clonadas en el pFastbac1. El gen para VSPH7 se obtuvo por PCR del genoma de *G. lamblia*, mientras que VSP1267 se obtuvo de la empresa Genscript. Una vez que se obtuvieron los plásmidos recombinantes (pFastbac1 H7 y 1267), los mismos se usaron para transformar las bacterias DH10Bac y seleccionar las colonias positivas en las que la recombinación entre el plásmido y el genoma vírico se hubiese llevado a cabo correctamente (Fig. 9).



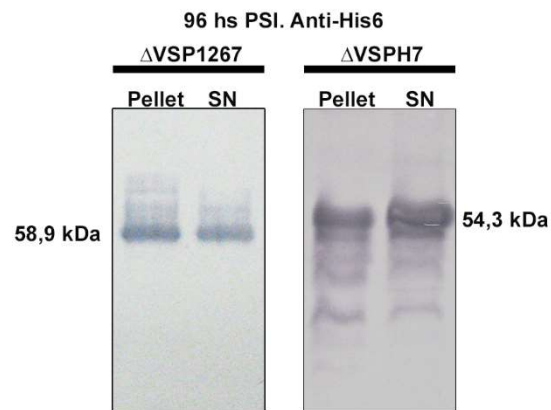
**Figura 9. Transformación de bacterias DH10Bac y selección del b́acmido recombinante. (A)** Esquema del fragmento a amplificar por PCR con los primer M13 si la transposici3n fue correcta. Control que permite identificar colonias cuya inserci3n del gen de inter3s en el ADN v3rico es correcta. **(B)** Colony PCR con los oligonucle3tidos M13 sobre 10 colonias blancas de cada transformaci3n para seleccionar los b́acmidos recombinantes Bac1267 y BacH7. El control negativo corresponde a una colonia de color azul.

### 3.2-Transfecci3n celular y validaci3n de la expresi3n proteica

Luego de evaluar la inserci3n de los genes en el genoma del virus o b́acmido recombinante, se realiza una extracci3n de ADN de las colonias positivas para la purificaci3n de los mismos y se transfectan c3lulas SF9 para la obtenci3n de stock de virus P1. Mediante una infecci3n realizada en placas de 12 pocillos se evalúa la expresi3n de la prote3na mediante la t3cnica de *Western blot*. La presencia de la prote3na buscada se puso en evidencia mediante el uso de diferentes anticuerpos, uno de ellos comercial contra el tag de histidina (Fig. 10); los dem3s anticuerpos

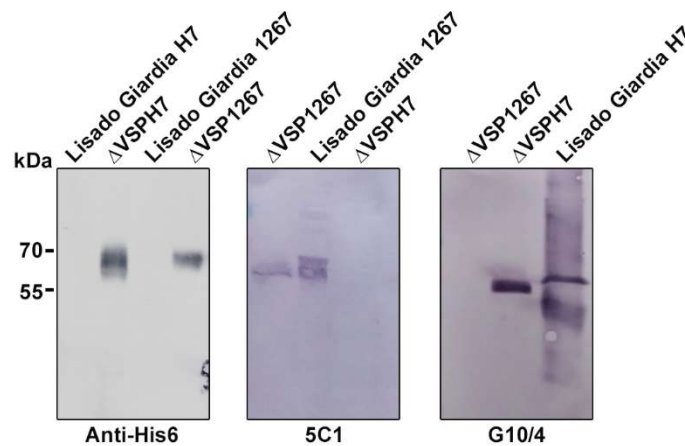


utilizados son específicos para cada una de las VSP empleadas, 5C1 es específico para VSP1267 y G10/4 (anticuerpo contra un epítipo conformacional) es específico para VSPH7.



**Figura 10. Análisis de la expresión de los stock de virus.** *Western blot* para comprobar la expresión de proteína recombinante por ambos stock de virus, baculovirus 1267 P1 y baculovirus H7. La expresión se evaluó por defecto a las 96 h PSI. Anticuerpo primario Anti-His6 que corrobora la presencia del tag de histidina.

El *Western blot* permitió corroborar la expresión de la proteína de los stocks de virus, al mismo tiempo que marcó el tag de histidina, una importante pieza para la purificación de las proteínas recombinantes. Se puede apreciar que las proteínas se encuentran en el sobrenadante del cultivo, pero a las 96 h PSI aún hay una buena proporción en el sobrenadante de pellet celular que se puede purificar. Además de ello, se comprobó la identidad de las proteínas por medio de anticuerpos específicos contra las VSPs originales de *Giardia* (Fig. 11). Considerando que el mAb G10/4 es un anticuerpo cuyo epítipo de reconocimiento es conformacional, el hecho de que reconozca a la proteína recombinante nos sugiere una alta similitud estructural entre la proteína recombinante y la nativa perteneciente a *Giardia*.



**Figura 11. Caracterización de  $\Delta$ VSPs.** Western blot de  $\Delta$ VSPs purificadas y lisado de *Giardia* después de SDS-PAGE y transferencia. Las proteínas se detectaron con sus anticuerpos específicos, 5C1 o G-10/4, para VSP1267 o VSPH7, respectivamente; o con el anti-His6. Se muestra la especificidad de cada anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales específicos que reconocen VSPs del lisado de *Giardia* reconocen al mismo tiempo la correspondiente  $\Delta$ VSP a partir de células de insectos.

De esta manera pudimos corroborar la identidad de la  $\Delta$ VSPs como similares a las VSP originarias de *Giardia*, lo cual nos posibilita continuar en el escalado de la producción y purificación de las mismas.

### 3.3-Producción y purificación de $\Delta$ VSPs en agitación.

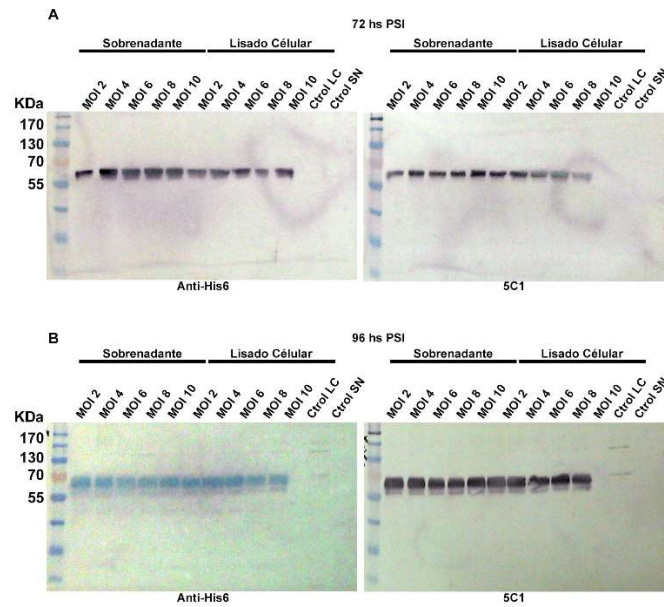
Previo a escalar a un cultivo en agitación, fue necesario conocer la relación entre la eficiencia de producción de proteína y la multiplicidad de infección (MOI) entendiéndose ésta como el número de partículas virales o unidades formadoras de placa por célula (pfu/cel). El cálculo del volumen de inóculo viral a emplear lo llevamos a cabo por lo tanto en función de la MOI a emplear:

- Inóculo requerido= [MOI (pfu/cel) x N° de células] / título del stock viral (pfu/ml).

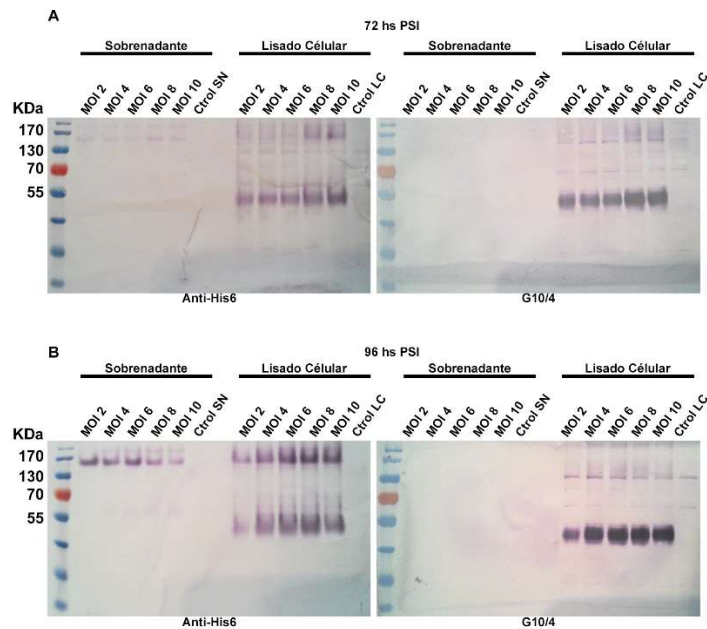
Para ello, previamente se tituló el stock de virus P1 mediante el método de lisis en placa recomendado por la empresa Invitrogen. Previo al ensayo de infección, el stock de virus P1 se amplificó en volúmenes cada vez mayores hasta un stock de trabajo P3 de gran volumen para emplear en cultivos en agitación a gran escala. Para la amplificación de los stocks, se utiliza una

MOI de entre 0,1 y 1, cosechándose los stocks luego de 72 h PSI. Cada uno de los stocks fueron titulados de manera consecutiva y almacenados a 4° C protegidos de la luz. Los stocks finales de trabajo P3 se evaluaron mediante expresión en placa de 12 pocillos, infectando mediante diferentes MOI y evaluando los resultados a los tiempos 72 y 96 h PSI, tiempo recomendado para un buen compromiso entre expresión proteica y viabilidad celular, la cual puede bajar precipitadamente luego de las 96 h debido al ciclo lítico del baculovirus. En primera instancia se evaluó la expresión de  $\Delta$ VSP1267 (Fig. 12) por el baculovirus 1267 comprobando el resultado por dos anticuerpos y examinando la presencia de la misma en medio de cultivo (sobrenadante) y en la porción soluble luego de lisar las células (lisado celular). Se evaluaron MOI en intervalos de 2, es decir, MOI 2, 4, 6, 8 y 10, mediante el uso de dos anticuerpos para su reconocimiento, anti-His6 y 5C1. Se puede observar que a las 96 h PSI la cantidad de proteína presente en la muestra aumentó considerablemente, no observándose una gran diferencia entre las distintas MOI. Por otra parte se pudo observar que existe una considerable cantidad de proteína en ambas fracciones, celular y sobrenadante, por lo cual se pueden utilizar ambas fuentes para su obtención. En base a esto se decidió escalar la producción utilizando una MOI de 2 y purificar la proteína a las 96 h PSI.

Se emplearon las mismas condiciones para evaluar la expresión de  $\Delta$ VSPH7 (Fig. 13) por el baculovirus H7. Para el caso de esta proteína recombinante se decidió emplear una MOI 10 donde se aprecia una mayor expresión de proteína y 96 h PSI para su purificación. Ambas fracciones, sobrenadante de cultivo y pellet celular, poseen proteína, pero pudo observarse mayor proporción en la fracción celular.

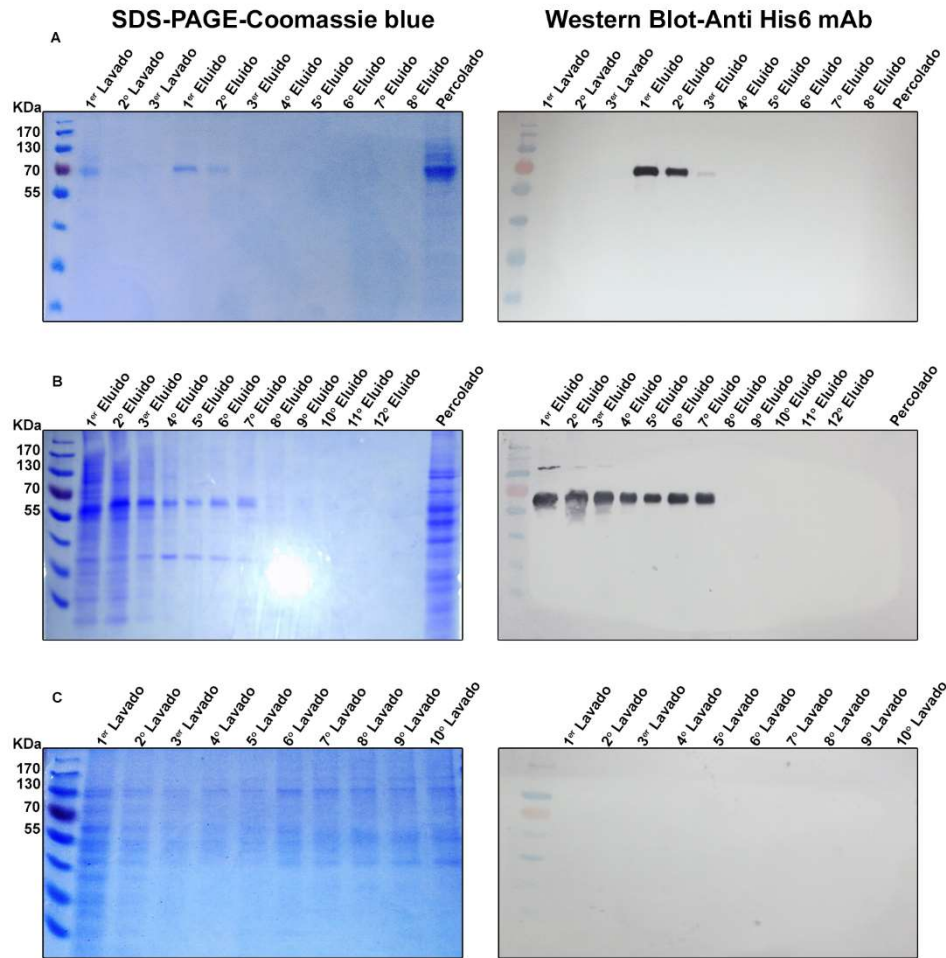


**Figura 12. Optimización de la expresión de  $\Delta$ VSP 1267.** (A) Western blot de la evaluación de la expresión del sobrenadante y el pellet celular a las 72 h PSI. Se evaluaron MOI 2, 4, 6, 8 y 10. (B) Evaluación de la expresión de proteína en sobrenadante (SN) y lisado celular (LC) a las 96 h PSI. La expresión se evaluó por medio de dos anticuerpos, anti-His6 y 5C1, para detectar la expresión de  $\Delta$ VSP1267 y la presencia del tag de histidina que permite su purificación.



**Figura 13. Optimización de la expresión de  $\Delta$ VSPH7.** (A) Western blot de la evaluación de la expresión del sobrenadante y el pellet celular a las 72 h PSI. Se evaluaron MOI 2, 4, 6, 8 y 10. (B) Evaluación de la expresión de la proteína en sobrenadante (SN) y lisado celular (LC) a las 96 h PSI. La expresión se evaluó por medio de dos anticuerpos, anti-His6 y G10/4, para detectar la expresión de  $\Delta$ VSPH7 y la presencia del tag de histidina que permite su purificación.

Luego se evaluaron a menor escala las condiciones de purificación de la proteína. Se partió de condiciones estándar recomendadas por la empresa Qiagen para el uso de la resina Ni-NTA (níquel-agarosa). Las mismas fueron un buffer general compuesto por 300 mM NaCl y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Esta condición se empleó para buffer de lisis (en caso del pellet celular), lavado y eluido. La proteína se eluyó de la resina mediante el empleo de Imidazol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 250 mM (Fig. 14). Se pudo apreciar que para ambas ΔVSPs la proteína se encontraba en los primeros eluidos, no observándose proteína en lavados o percolados. Esto indica que las condiciones empleadas son adecuadas para la purificación de ambas, permitiendo estandarizar las mismas para toda producción a gran escala. Aquellos eluidos donde se encontraba la mayor parte de la proteína se mezclaron y dializaron contra el buffer general de pH 7,4 y se añade glicerol al 5% para crio-preservarlos a -70°C. En caso de ser necesario una re-purificación para obtener mayor pureza, los eluidos obtenidos fueron diluidos a un volumen final de 25 a 50 ml de buffer e incubados nuevamente con la resina Ni-NTA, repitiendo el proceso de lavado y elución.



**Figura 14. Purificación de  $\Delta$ VSPs a través de Ni-NTA. (A)** SDS-PAGE y *western blotting* de las fracciones lavado, eluido y percolado de la purificación de  $\Delta$ VSP1267. **(B)** SDS-PAGE y *western blotting* de la purificación de  $\Delta$ VSPH7. **(C)** SDS-PAGE y *western blotting* de los lavados de la columna de la purificación de  $\Delta$ VSPH7. Las membranas de SDS-PAGE fueron teñidas con coomassie blue y el western fue revelado con el anticuerpo comercial anti-His6.

El proceso de producción de ambas  $\Delta$ VSPs se escaló en agitación por volúmenes de 1,4 a 1,6 L por vez. Cada producción se purificaba a las 96 h PSI en las condiciones descritas.

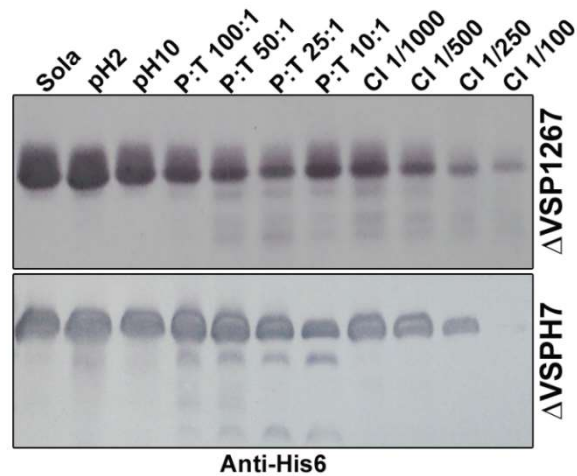
Cabe aclarar que la producción de ambas  $\Delta$ VSPs se realizó semanalmente de manera continua no solo para abastecer los ensayos de este proyecto, sino también para proyectos de colaboración que hacían uso de las mismas tanto dentro de la institución como en instituciones de investigación extranjeras públicas y privadas, así como para ensayos requeridos relacionados con las patentes “**Plataforma novedosa para la Producción de Vacunas Orales**” (TCPsal0046-07) y “**Proteínas VSP de Protozoo como Transportadores de Fármacos**” (TCPsal0099-05) del Dr. Hugo

Daniel Lujan. Cabe señalar que los datos de esta tesis fueron aportes principales de las patentes cuyo objetivo versa en el de la tesis y que fueron realizados en colaboración con la Dra. Marianela C. Serradell, Investigadora Asistente del CONICET.

### **3.4-Estudio de la resistencia *in vitro* y estabilidad de $\Delta$ VSPs.**

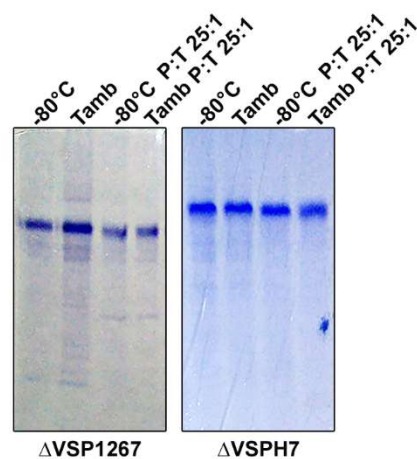
Con la finalidad de comprobar la capacidad *in vitro* de las  $\Delta$ VSPs para proteger proteínas y/o péptidos bioactivos de su degradación, primero evaluamos el comportamiento de  $\Delta$ VSPs sometiéndolas a condiciones similares a las que presenta en el tracto gastrointestinal (TGI). Es importante tomar en cuenta que, para esta clase de formulaciones basadas en proteínas, la opción de administración oral representa un gran desafío, puesto que las proteínas se verán expuestas a condiciones que naturalmente llevarían a su degradación física y química. A través del TGI las mismas están expuestas a cambios de pH tales como el pH estomacal, el cual es sumamente ácido, para luego ser expuestas al pH intestinal que es por el contrario alcalino. Por otra parte, sufren el accionar de proteasas tales como la tripsina, quimio tripsina, elastasas y carboxipeptidasas, de las cuales podemos decir que las proteínas son sus sustratos naturales.

Para asemejar las condiciones que debería atravesar las proteínas al ser administradas de manera oral, se expuso a las  $\Delta$ VSPs a diferentes pH, desde un pH sumamente ácido como 2 a uno alcalino como 10. Por otra parte, se las sometió a diferentes concentraciones de tripsina. Finalmente, se las incubó en contenido intestinal donde se encuentran presentes todas las proteasas secretadas por el páncreas. El perfil proteolítico de ambas  $\Delta$ VSPs, que se observa en la figura 15, mostró resistencia a pH 2 y pH 10, a la tripsina hasta una proporción de 10: 1 (peso:peso) y a contenido intestinal hasta una dilución de 1: 250 y 1: 100 (dilución final CI).



**Figura 15.  $\Delta$ VSPs son resistentes a condiciones extremas de pH y proteólisis.** Caracterización de la resistencia de  $\Delta$ VSP1267 y  $\Delta$ VSPH7 a pH extremo, actividad enzimática de la tripsina y el contenido intestinal. En ambos casos,  $\Delta$ VSPs mostraron resistencia incluso a condiciones extremas. Ambos western blot se revelaron con el anticuerpo comercial anti-His6.

Por otra parte, caracterizamos la estabilidad de estas proteínas recombinantes a temperatura ambiente, puesto que si las mismas resultaban estables tendrían además el valor agregado de poder ser trasportadas sin la necesidad de mantenerlas en refrigeración o ser liofilizadas. Para ello colocamos las  $\Delta$ VSPs a temperatura ambiente (TA) en una cámara húmeda sellada para evitar la pérdida de volumen por una semana. La muestra original se mantuvo congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Después de eso, ambas muestras se incubaron con la misma relación de tripsina. Sorprendentemente, las  $\Delta$ VSPs almacenadas en ambas condiciones presentaron el mismo comportamiento frente a esta proteasa (Fig. 16).

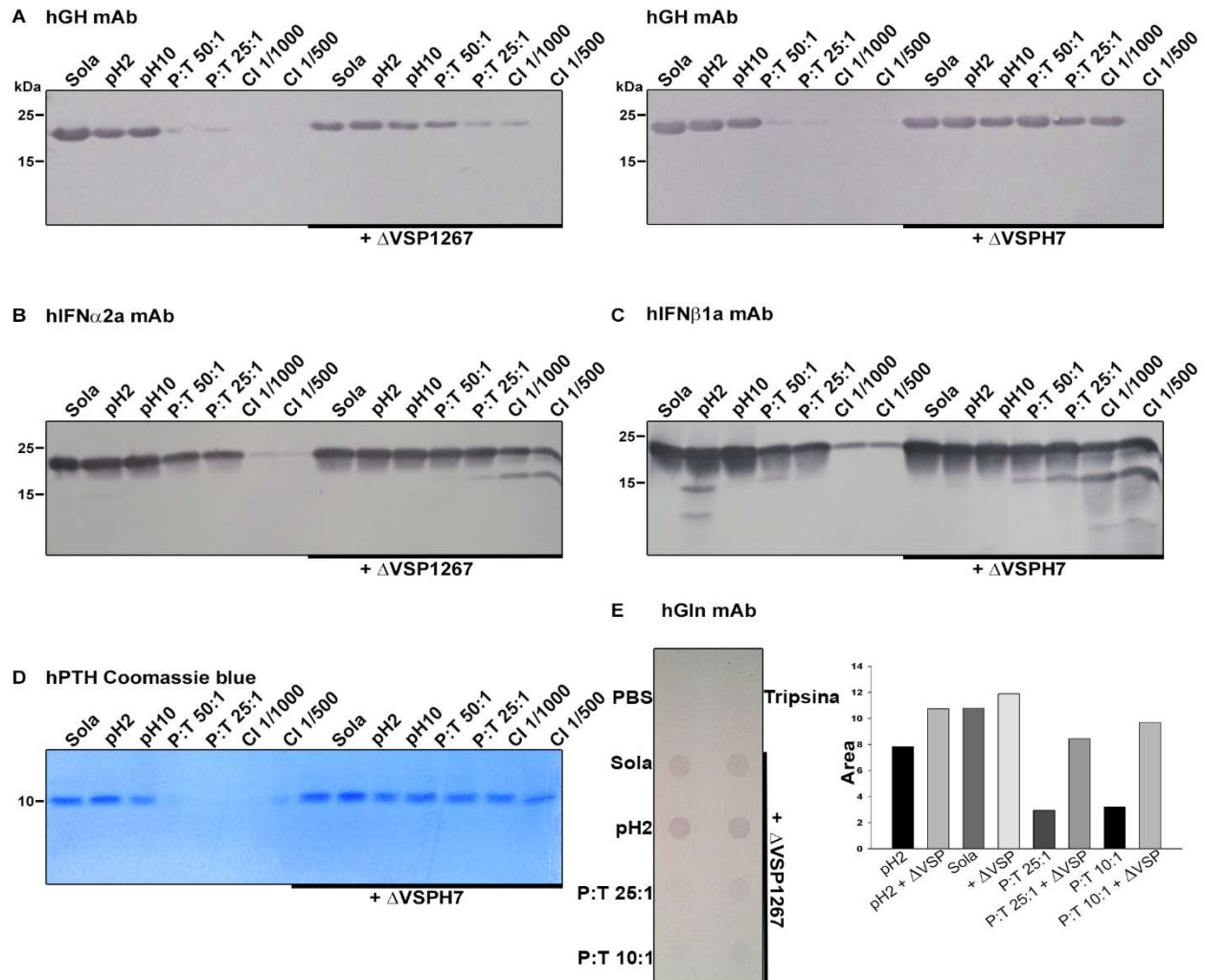




**Figura 16. Estabilidad de  $\Delta$ VSPs.** Se analizaron comparando la misma muestra conservada a temperatura ambiente (TA) y conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , versus la misma concentración de tripsina. Después de SDS-PAGE y tinción por Coomassie blue, la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente era igual que la muestra conservada a temperatura muy baja para ambas proteínas.

### **3.5-Estudios *in vitro* de la capacidad de $\Delta$ VSPs para proteger péptidos bioactivos de la degradación.**

Para evaluar la capacidad de las  $\Delta$ VSPs como potenciales transportadores de fármacos por vía oral, probamos su capacidad para proteger diferentes proteínas biológicamente activas de la degradación causada por pHs extremos y de la proteólisis enzimática, similar al análisis previo realizado con las  $\Delta$ VSPs solas. Para esto, se sometieron tanto a las proteínas o péptidos por si solos y combinados con una  $\Delta$ VSP, a soluciones con diferentes condiciones de pH y diversas concentraciones de proteasas intestinales y posteriormente se les realizaron ensayos de Western blot, tinción con Coomassie blue o *Dot Blot*. Se incluyeron en esta parte de los estudios péptidos con potencial para el desarrollo de tratamientos contra enfermedades o posibles usos terapéuticos, como son interferones tipo I, de relevancia en el control de infecciones víricas crónicas y están a su vez emergiendo como una posible herramienta de tratamiento contra cáncer (Snell, McGaha et al. 2017); hormona de crecimiento, cuya deficiencia se caracteriza por anomalías metabólicas asociadas con obesidad visceral, deterioro en la calidad de vida y un aumento de la mortalidad (Takahashi 2017); glucagón, con un importante rol en el control de la homeostasis de glucosa en sangre (Insuela and Carvalho 2017); y hormona paratiroidea y su relevancia en desordenes tales como hipoparatiroidismo (Marcucci, Della Pepa et al. 2017). En todos los casos, el tiempo y temperatura de incubación fue el mismo, 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  (Fig. 17).



**Figura 17. Protección proteolítica *in vitro* de diferentes fármacos peptídicos por  $\Delta VSP1267$  y  $\Delta VSPH7$ .** Western blot de (A) hormona de crecimiento humana (hGH), (B) interferón alfa 2a humano (hIFN $\alpha$ 2a), (C), interferón beta humano (hIFN $\beta$ 1a). Los resultados muestran que la resistencia a la degradación proteolítica por tripsina o CI aumenta cuando el péptido se mezcla con cualquiera de las  $\Delta VSP$ s. (D), Coomassie blue de paratohormona humana (hPTH). hPTH sola es muy sensible a la degradación por tripsina o CI, pero la mezcla con  $\Delta VSP$  asegura la protección de la misma. (E), Dot Blot de glucagón humano (hGln). El gráfico muestra como la DO aumenta cuando se mezcla hGln con  $\Delta VSP$ . Los ensayos detallados se realizaron con el anticuerpo monoclonal específico en cada caso y se revelaron con anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina.

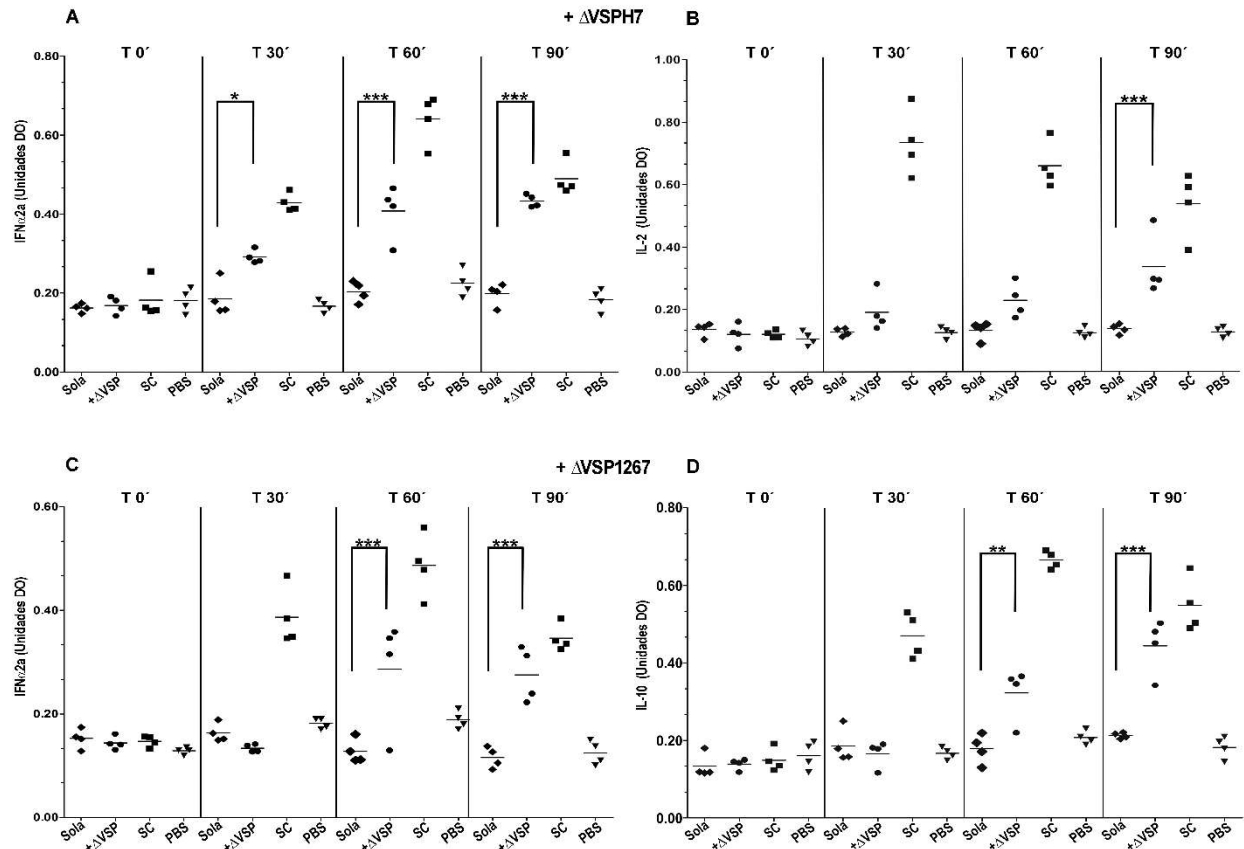
La mayoría de los compuestos evaluados han demostrado ser sensibles a la proteólisis mediada por tripsina 1:50 (peso:peso) y diluciones CI tan bajas como 1:1000. PTH humana, en

particular, ha demostrado una sensibilidad más alta, donde la degradación completa se puede ver a tripsina 1:500 (Fig. 17D).

Pese a la sensibilidad a la degradación que demuestran tener los compuestos evaluados, se puede apreciar en los resultados obtenidos que las  $\Delta$ VSPs protegen a las demás proteínas de su completa degradación.

### **3.6-Estudios *in vivo* de la absorción oral**

Para cada fármaco en cuestión se procedió a evaluar su efecto *in vivo* cuando eran co-administración con  $\Delta$ VSPs. En cada ensayo se incluyó como control la administración subcutánea (s.c.) de los péptidos como patrón de referencia para validar los métodos de detección en suero empleados para los péptidos, además de la administración sola del péptido y de la solución tampón empleada como controles negativos. Se pudo observar que la absorción oral de los fármacos (hIFN $\alpha$ , hIL-2 e IL-10) se logró solamente cuando se administraron conjuntamente con  $\Delta$ VSP y no cuando se suministraron solos (Fig. 18).

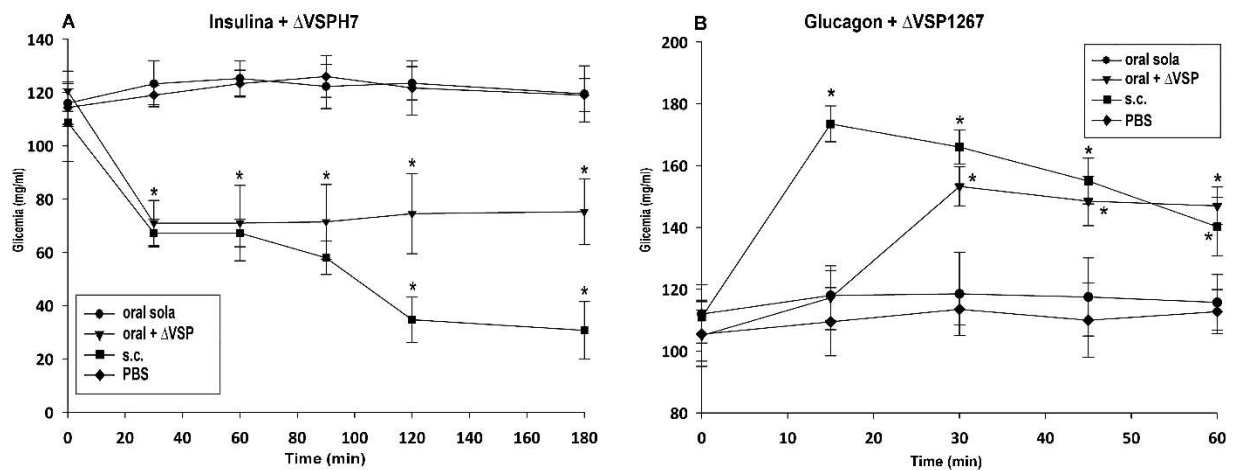


**Figura 18. ΔVSPs promueven la absorción intestinal de fármacos peptídicos después de la administración por vía oral.** Un grupo de ratones recibió el fármaco solo como control negativo. Los controles positivos se administraron de manera subcutánea (s.c.). El grupo tratado recibió el fármaco mezclado con ΔVSP (+ ΔVSP). **A-C** se detectó los niveles de hIFNα2a en suero usando un sistema de células reporteras (HEK-Blue™ de InvivoGen) específicas de los interferones tipo I humano. Niveles detectables de hIFNα2a en suero se observan relevantes alrededor de 30-60 minutos (T 30' y T 60') posterior a la ingesta en el grupo tratado. **B-D**, ELISA de los niveles séricos (DO) de IL-10 (B) y hIL-2 (C). Los niveles en suero son evidentes alrededor de 60-90 minutos (T 60' T y T 90') posterior a la ingesta en el grupo tratado. \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 (ANOVA, Test de Tukey). Los animales fueron privados de alimento dos horas previas a la ingesta de la formulación. La determinación de niveles séricos de las diferentes moléculas fueron realizadas a diferentes tiempos post administración (T0, T30, T60 o T90 minutos, respectivamente).

### 3.7-Estudios *in vivo*: actividad biológica.

Para estudiar la funcionalidad biológica de péptidos luego de la administración vía oral de los mismos, decidimos emplear las hormonas Insulina (Insu) y Glucagón (Gln) co-administradas con ΔVSP. Estas hormonas presentan una ventaja a la hora de medir su actividad biológica, ya que por un método no invasivo como es un glucómetro comercial podemos determinar los niveles de

glucosa en sangre con mucha sencillez. Este método directo y simple nos permitió determinar si los animales tratados con la mezcla sufrían modificaciones en los niveles de glucemia luego de la administración oral de las mismas. Se administró al mismo tiempo de manera subcutánea (s.c) ya sea insulina o glucagón solos como control positivo, lo cual nos permitió validar el procedimiento empleado de medición de glucosa en sangre para nuestro modelo de estudio. Además, permitió constatar que la insulina y glucagón usadas presentasen la misma funcionalidad en ratones. La dosis oral sub-óptima de ambos fármacos se ensayó previamente. Por ende, después del período de inanición, los ratones recibieron los tratamientos apropiados, ya sea con los péptidos solos o en combinación con  $\Delta$ VSP. Los niveles de glucosa en sangre fueron analizados posteriormente en los tiempos indicados en el gráfico a través de una mella en la cola y recogiendo una gota de sangre en glucómetro calibrado previamente (Accu-Chek<sup>®</sup> Performa, Roche). A través de estos ensayos pudimos observar acciones biológicas sistémicas por parte de la insulina y el glucagón cuando se administraban oralmente en combinación con  $\Delta$ VSPs (Fig. 19).



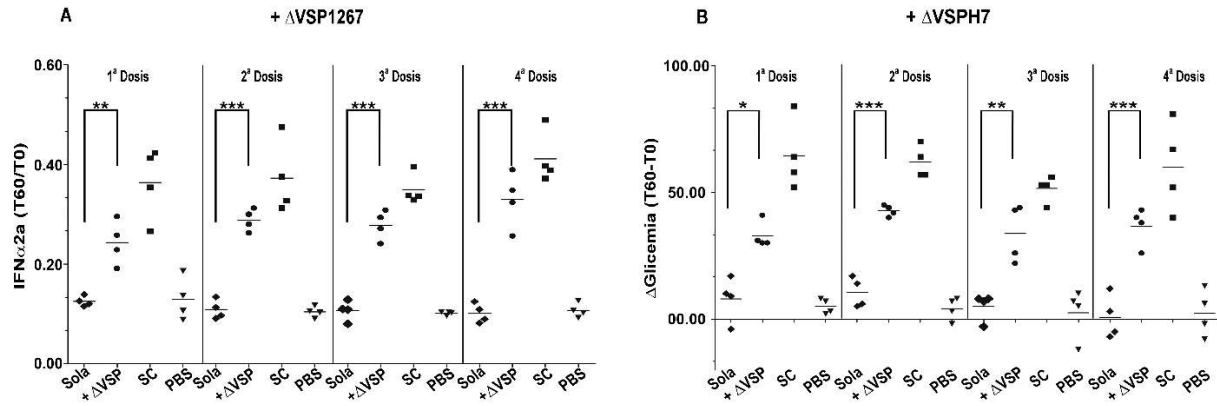
**Figura 19.  $\Delta$ VSPs protegen y promueven la actividad biológica de hormonas peptídicas modificadores de glucemia a través de la administración oral.** Resultados de la medición de la glucemia de ratones que han sido privados de alimentos dos horas antes de recibir la administración oral de **(A)** insulina sola o mezclada con  $\Delta$ VSPH7 o **(B)** glucagón solo o mezclado  $\Delta$ VSP1267. El nivel de glucosa en la sangre comenzó a modificarse alrededor de 25-30 minutos después de la administración en los grupos tratados. Los controles positivos se administraron por vía subcutánea (s.c.). La medición de glucemia fue realizada utilizando un glucómetro comercial. \*  $P < 0,05$  respecto al fármaco solo al mismo tiempo de medición (ANOVA, Test de Tukey).

Analizados en conjunto, estos datos indican que las  $\Delta$ VSPs no solo protegen a los péptidos sino que además facilitan su acción biológica, sin necesidad de ser inyectados, cuando son co-administradas oralmente.

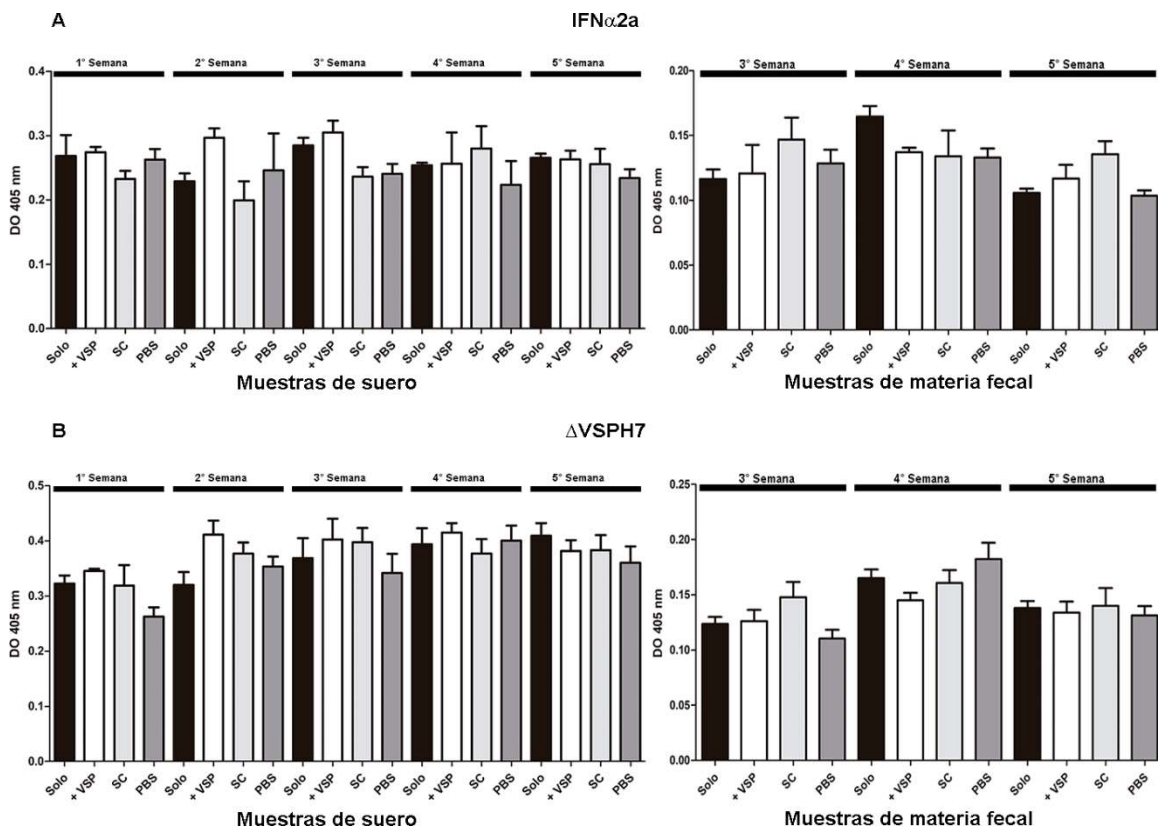
### **3.8-Estudios *in vivo*: administración crónica**

Para evaluar la absorción en un modelo de administración crónica, se utilizó hIFN $\alpha$  y hGln co-administradas con  $\Delta$ VSP1267 y  $\Delta$ VSPH7. Las administraciones orales se llevaron a cabo cada 7 días en ratones Balb/c de 8-12 semanas de edad, machos y hembras. Dos grupos de animales utilizados como control recibieron los fármacos de forma oral solos o combinados con  $\Delta$ VSP en una sola dosis en cada administración. Tomando en cuenta el tiempo en el cual se observa el efecto máximo después de la administración oral de cada fármaco (ver figuras 18 y 19), para el esquema de la administración crónica, sólo se evaluaron mediciones en tiempo T0 y T60 (hIFN $\alpha$ ) o T30 (Gln). Las muestras de sangre fueron tomadas antes y después de la dosis administrada a los tiempos establecidos. La absorción se evaluó mediante la determinación de los niveles séricos de hIFN $\alpha$  por ELISA, o por medición de la glucemia con el glucómetro en el caso de Gln. Como se muestra, la absorción oral de hIFN $\alpha$  no fue modificada por la co-administración crónica con  $\Delta$ VSPH1267, siendo tan eficiente como la primera dosis. Del mismo modo, la administración repetitiva de Gln plus  $\Delta$ VSPH7 no modificó su actividad hiperglucemiante (Fig. 20).

Se evaluó durante el transcurso del ensayo y hasta la quinta semana la presencia o ausencia de anticuerpos contra las drogas empleadas en el ensayo. No se detectó la presencia de anticuerpos séricos o en materia fecal contra las drogas empleadas,  $\Delta$ VSPH7 y hIFN $\alpha$ , no existiendo diferencia significativa entre los valores observados de absorbancia (Fig. 21).



**Figura 20: La co-administración crónica de  $\Delta$ VSP-droga no interfiere con niveles de absorción oral. (A) Niveles séricos de hIFN $\alpha$ 2a después de la administración oral sola o mezclada con  $\Delta$ VSP1267. (B) Niveles de glucosa en sangre después de la administración oral de hGln solo o mezclado con  $\Delta$ VSPH7. La administración crónica de ambos fármacos no afectó la adsorción o la actividad biológica y los niveles medidos fueron similares en cada momento. Los valores resultantes reflejan la lectura normalizada de cada animal (T60 / T0 para hIFN $\alpha$ 2a; T30-T0 para Gln). \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 (ANOVA, Test de Tukey).**



**Figura 21: ELISA de inmunoglobulinas en suero y materia fecal de la co-administración crónica de  $\Delta$ VSPH7-hIFN $\alpha$ 2a. (A) Niveles séricos y en materia fecal de inmunoglobulinas específicas contra hIFN $\alpha$ 2a. (B) Niveles séricos y en materia fecal de inmunoglobulinas específicas contra**

$\Delta$ VSPH7. La medición de anticuerpos en suero y materia fecal se realizó hasta una semana posterior a finalizado el ensayo, no observándose diferencias significativas entre el tratamiento,  $\Delta$ VSPH7- hIFN $\alpha$ 2a, y los controles (hIFN $\alpha$ 2a solo, SC y PBS). \*  $P < 0,05$  (ANOVA, Test de Tukey).



# **Capítulo IV**

## **Discusión**

## 4. Discusión

### 4.1 El uso de drogas de origen biológico

En las últimas tres décadas, desde el lanzamiento de la insulina humana recombinante a la fecha, muchas drogas de origen biológico, incluyendo péptidos, proteínas terapéuticas recombinantes, enzimas, anticuerpos monoclonales y anticuerpos conjugados a fármacos, han ido transformado la industria farmacéutica. De 1989 al 2012, el número de productos biotecnológicos que se comercializan creció de 13 a 210, mientras que las ventas de productos en todo el mundo aumentaron a 163 billones de dólares (Mitragotri, Burke et al. 2014). Más de 900 productos de origen biológico se encuentran actualmente en desarrollo, dirigidos a enfermedades en una amplia gama de áreas terapéuticas y que representan casi el 20% del número total de medicamentos en tramitación. Alrededor del 40% de estos productos están siendo desarrollados por grandes compañías farmacéuticas (The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America 2013).

Las drogas de origen biológico basadas en péptidos y proteínas obtenidos mediante el uso de tecnología recombinante en diferentes sistemas resultan muy atractivas en la medicina moderna debido a su alta potencia combinada con una alta especificidad. Estas características surgen de su naturaleza macromolecular, que proporciona la complejidad estructural que a menudo se requiere para una mayor especificidad. Sin embargo, esta complejidad estructural también hace que sean algunas de las moléculas más difíciles de formular, transportar y entregar a las células o tejidos blancos de su acción biológica. De hecho, los problemas en formulación y entrega de productos biológico fueron reconocidos desde los primeros días de la biotecnología como caracteres que en parte hicieron de estos fármacos candidatos menos atractivos para su desarrollo. Por ejemplo, la pérdida de actividad en respuesta a desencadenantes ambientales tales como la temperatura, que pueden ocurrir debido a un mal almacenamiento, o a alta masa molecular de muchos de estos productos que condiciona su distribución, es decir, una reducción sustancial de la permeabilidad a través de barreras biológicas tales como la piel, membranas mucosas y membranas celulares, ponen una carga considerable en el desarrollo de tecnologías para su formulación (Zelikin, Ehrhardt et al. 2016).

Actualmente los métodos más utilizados para la administración de esta clase de medicamentos son la vía intravenosa, intramuscular e inyecciones subcutáneas. Estas últimas son las más convenientes, ya que requieren mínimas habilidades por parte de profesionales y constituyen el método menos invasivo, mientras que las inyecciones intramusculares se utilizan comúnmente para la administración de vacunas. Las inyecciones intravenosas se utilizan generalmente para productos biológicos tales como anticuerpos monoclonales. Además de las complicaciones en la administración e independientemente del tipo de vía utilizada, muchos de los fármacos de este tipo (con algunas excepciones, tales como anticuerpos monoclonales) se eliminan rápidamente del cuerpo, por lo que se requiere una administración frecuente (Zelikin, Ehrhardt et al. 2016).

En la actualidad, las herramientas de biotecnología, que han hecho posible la producción de grandes cantidades de proteínas puras a un costo razonable, permiten que la industria se desarrolle a la vez que se hace mayor la necesidad de mejorar los métodos de entrega para esta clase de fármacos (Goldberg and Gomez-Orellana 2003). Cuando se trata de proteínas, se presentan diferentes retos a superar como por ejemplo la inestabilidad biológica de las mismas, la cual puede ser causada por agregación, des-amidación, isomerización, hidrólisis, oxidación y desnaturalización con la consecuente pérdida de su actividad biológica (Mitragotri, Burke et al. 2014). La tendencia de un producto de origen biológico a exhibir estas modificaciones estructurales depende de diversos factores como pueden ser las propiedades de la proteína en cuestión o factores ambientales, incluyendo la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio ambiente circundante. En base a esto, varios agentes se han desarrollado con el objetivo de aumentar la estabilidad de los productos biológicos. Entre los que podemos mencionar se incluyen el uso de pequeños azúcares como trehalosa, y polisacáridos tales como dextranos. También se ha ensayado el empleo de surfactantes no iónicos como *pluronics* para reducir la tendencia a agregarse por parte de los péptidos o proteínas. Finalmente, los agentes tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos también son utilizados en bajas concentraciones para disminuir los fenómenos de agregación (Luo, Xiong et al. 2016). Aunque muchos de estos agentes resultan ser estabilizadores eficaces, su uso dentro de la industria farmacéutica requiere una consideración cuidadosa en términos de toxicidad local y potencial inmunogénico. En suma, la

comprensión del mecanismo de inactivación de los fármacos biológicos es crucial y permite un enfoque racional en la determinación de los excipientes a ser utilizados en las formulaciones con el fin de proporcionar estabilización (Mitragotri, Burke et al. 2014). Se requiere la colaboración entre una amplia gama de expertos, entre los que se cuentan físico-químicos, bioquímicos e ingenieros, para hacer frente a los problemas que plantean los retos de formulación de este tipo de medicamentos de origen biológico.

#### **4.2 Desarrollo de la plataforma para el transporte por vía oral de proteínas recombinantes**

A pesar de la relevancia y de la potencialidad del uso de proteínas y de péptidos como agentes terapéuticos por su alta especificidad, se nos presentan diferentes impedimentos a través del TGI si pensamos en su administración oral, entre los podemos mencionar la degradación catalizada por ácido y pepsina en el estómago, la degradación luminal en el intestino por diferentes proteasas y la absorción variable en los epitelios. Estos obstáculos son mayores si consideramos que fármacos de la clase de proteínas y péptidos son sustratos naturales para la degradación por parte de las enzimas presentes en el TGI (Smart, Gaisford et al. 2014). Este problema representa uno de los mayores desafíos para los investigadores, por lo que varios enfoques, incluyendo modificaciones químicas, nanopartículas, uso de inhibidores de enzimas, etc., han sido abordados para mejorar la biodisponibilidad de fármacos de naturaleza protéica (Renukuntla, Vadlapudi et al. 2013, Mitragotri, Burke et al. 2014).

Durante mucho tiempo, en nuestro grupo de trabajo hemos estudiado el parásito intestinal *Giardia lamblia* que, entre sus características particulares, tiene la capacidad de sobrevivir en el TGI y permanecer unido a la mucosa intestinal. Toda la superficie del parásito se encuentra recubierta por proteínas VSPs, proteínas que han demostrado en estudios previos realizados por Theodore Nash en 1991, ser muy resistentes a las duras condiciones del TGI, como pHs extremos y alta concentración de tripsina, ejerciendo una acción protectora sobre el parásito (Nash, Merritt et al. 1991). Estos ensayos de resistencia fueron llevados a cabo por nuestro grupo en investigaciones posteriores observando los mismos resultados (Rivero, Saura et al. 2010).

El mismo autor (Theodore Nash) planteo la posibilidad de que las estas proteínas superficiales (VSPs) serían las responsables de que el parásito sea capaz de sobrevivir a altas

concentraciones de tripsina, característica que se atribuyó a la presencia de puentes disulfuro formados por los mismos motivos CXXC repetitivos encontrados como denominador común en todos los genes que codifican para VSPs. En un trabajo posterior se demostró que estas proteínas poseen motivos de unión a metales y que eran capaces de acomplejar Zinc y Hierro (Lujan, Mowatt et al. 1995), lo cual planteó la posibilidad de que mediante el secuestro de diferentes metales posean características inhibitoras de proteasas.

Aunque se cree que los numerosos genes que codifican para VSPs en el genoma de *Giardia* han surgido por procesos de duplicación y divergencia génica (Adam 2000), la presencia de repetitivos motivos CXXC y de motivos de unión a Zinc permanecen como variables compartidas entre todos ellos. Así mismo, el repertorio de VSPs presentes en las diferentes subclases de *Giardia* no es el mismo, como sucede entre las subclases A de WB y subclase B de GS/H. Respecto al repertorio de VSPs, Nash propuso que ante la presión que imponen las altas concentraciones de proteasas intestinales, existe una variabilidad en la susceptibilidad de las VSPs a las mismas, lo que lleva al trofozoíto a expresar en su superficie una VSPs que pueda resistir dicha presión (Nash, Merritt et al. 1991).

Es así que, durante el desarrollo de este trabajo de tesis, analizando las características principales de las VSPs y teniendo en cuenta sus funciones críticas en la supervivencia del parásito, diseñamos y producimos a partir del dominio extracelular de VSPs, proteínas recombinantes que comparten en común la presencia de repetidos motivos CXXC. Nos planteamos poner a punto un sistema de producción de proteínas recombinantes que nos permitiera producir más de una VSP y nos diera versatilidad a la hora de realizar nuevos diseños y expresar nuevas proteínas. Además de esto, el objetivo planteado fue el de llegar a un sistema de producción continua que permitiera escalar la producción de manera semanal y poder cambiar a elección que proteína producir. Por otro lado, se buscó optimizar el método de purificación a través de la elección del sistema adecuado, punto esencial que nos permiten ahorrar costos y tiempo. El segundo gran objetivo de este trabajo fue poder caracterizar estructural y funcionalmente las VSPs, para intentar implementar un método de transporte para diferentes fármacos proteicos vía administración oral empleando las VSPs como transportadoras o *carriers*, evaluando su potencial acción protectora sobre el fármaco.

Para cumplir con el primer objetivo que nos planteamos decidimos utilizar el sistema de producción de proteínas recombinantes basada en células de insectos. La tecnología basada en cultivo de células de insecto es una tecnología que dispone de muchas herramientas en biología molecular ofrecidas por diferentes empresas y se usa de manera rutinaria en laboratorios de investigación para la obtención de proteínas recombinantes. Uno de los principales avances en este sistema ha sido el desarrollo de líneas de células de insecto capaces de crecer en suspensión en medios de cultivos químicamente definidos, libres de suero y de proteínas (Jarvis 2009). El sistema dispone de varias líneas celulares que se adaptan a los requerimientos de las proteínas a expresar, con la ventaja de poder emplearse todas con el mismo baculovirus diseñado y clonado en un principio. La línea celular más ampliamente utilizada hoy es la línea de células ováricas derivadas de la larva *Spodoptera frugiperda*, Sf-9, la cual se utiliza de forma rutinaria para producir proteínas intracelulares o de membrana, mientras que la línea celular derivada de la larva *Trichoplusia ni*, conocida como High Five, se caracteriza por mayor rendimiento en proteínas secretadas al medio extracelular (Palomares, Joosten et al. 2003). Por otra parte, para el aislamiento y la propagación de baculovirus, la línea celular Sf-21 (línea celular parental de Sf-9) sigue siendo la línea celular preferida. Todas las líneas celulares crecen rápidamente, con un ciclo celular de 1 día aproximadamente, lo que permite una rápida expansión y agiliza los procesos de producción (Palomares, Mena et al. 2012).

El sistema de expresión en células de insecto es hoy en día tan conocido como los sistemas basados en *E. coli* o levaduras. Aunque se ha utilizado principalmente para producir proteínas de buena calidad (en el orden de miligramos a gramos) para la posterior determinación de la estructura o evaluación de parámetros bioquímicos como la cinética enzimática (Fussenegger 2009), la aprobación europea de la vacuna Cervarix (para cáncer de cuello uterino) de Glaxo SmithKline en otoño de 2007 y el desarrollo de otros posibles candidatos (por ejemplo, la vacuna contra la gripe FluBlok de Protein Sciences Inc.) indican un creciente interés industrial en el uso comercial del sistema para la fabricación de productos biofarmacéuticos de alta calidad (Cox and Hashimoto 2011, Cox 2012).

Pese a que empleando esta tecnología pudimos cumplir con la primera parte de nuestros objetivos, y disponer de un método eficiente y continuo para obtener  $\Delta$ VSPs, y a pesar de ser un

sistema versátil, las primeras etapas de este proceso implican más tiempo debido a la obtención de los baculovirus recombinantes necesarios para la infección de los cultivos celulares. Los mismos debieron ser titulados y se necesitó comprobar en todos los casos si expresan eficientemente la proteína de interés antes de su uso. Sin embargo, una vez que se obtuvieron los primeros stocks de baculovirus, se pudo producir proteína semanalmente con procesos que duran desde 72 a 96 hs con una mínima supervisión. En contraposición, podemos mencionar dos desventajas principales que pueden disuadirnos a la hora de elegirlo. En primer lugar, se presentan los altos costos comerciales de los medios de cultivo por ser libres de suero, costo que pueden ser equilibrados si pensamos que posteriormente los lotes de proteínas obtenidos carecen de pirogénos y son muy puros, lo que ahorra pasos posteriores de purificación. En segundo lugar, es necesario reemplazar los stocks de baculovirus anualmente debido a la disminución en la capacidad de infección durante el almacenamiento prolongado, una labor que consumió un tiempo considerable durante todo el desarrollo de la tesis.

De las líneas celulares disponibles, se trabajó principalmente con Sf-9. Aunque se evaluó la expresión de proteínas en la línea celular *High Five*, no observamos diferencias en los niveles de proteínas obtenidos. Debido a que ambas líneas no utilizan el mismo medio de cultivo, continuamos empleando Sf-9 por los altos costos que implica la compra de medios de cultivos separados para cada una de ellas. Por otra parte, Sf-9 presenta la ventaja de ser una buena línea para la producción de stock virales, mientras que la línea High Five no lo es (Palomares, Mena et al. 2012).

En relación al proceso de purificación, las proteínas recombinantes poseen un péptido señal de membrana, sin un motivo transmembrana, por lo que se pudo observar la presencia de las mismas en el medio de cultivo o sobrenadante luego de su secreción. Sin embargo, luego de lisar las células se observó que gran cantidad de proteína recombinante aún se encontraba en su interior. Esto puede deberse a que los virus no infectan en el mismo momento a todo el cultivo y muchas células aún no han exportado la proteína al momento de finalizar el ciclo de producción (Unger and Peleg 2012). Como la purificación se realizaba de manera manual mediante columnas de cromatografía por gravedad con resinas de afinidad a níquel-(residuos de histidina presentes en las proteínas), purificar la proteína del medio de cultivo consumía mucho tiempo y requería

repetir la purificación repetidas veces. En cambio, fue posible obtener gran cantidad de proteína que aún se encontraba dentro de las células. Esto nos permitió ahorrar tiempo debido a que la manipulación de las células durante su lisado y la posterior purificación resultó más rápida y agil.

A continuación, para cumplir con nuestro siguiente objetivo, nos propusimos caracterizar a las  $\Delta$ VSPs para evaluar si se comportan igual que las VSPs nativas. A tal fin, tratamos ambas con diferentes condiciones de pH, así como diferentes concentraciones de tripsina y de contenido intestinal tal como se detalló en capítulos anteriores. De esta manera pudimos comprobar que las  $\Delta$ VSPs muestran la misma resistencia *in vitro* a pH que las VSPs nativas, en dos condiciones extremas tales como pH 2 y pH 10. En particular, la acidez es una situación normal a la que las proteínas tienen que hacer frente cuando llegan al estómago, por lo que es muy importante que las mismas sean capaces de atravesar estas condiciones sin perder su funcionalidad. Otro dato importante es que mostraron tener una gran resistencia a concentraciones de tripsina muy altas, incluso concentraciones mayores a las que se encuentran habitualmente en el organismo (Bade, Gorris et al. 2010). Ya que la tripsina no es la única enzima proteolítica que se puede encontrar en el TGI, las  $\Delta$ VSPs se enfrentaron a contenido intestinal, donde otras proteasas tales como elastasa, quimotripsina o carboxipeptidasas están presentes. De manera notable, evidenciamos que nuestras proteínas se mantuvieron resistentes en estas duras condiciones. Como mencionamos antes, estos resultados van en concordancia con lo demostrado anteriormente por otros trabajos (Nash, Merritt et al. 1991, Rivero, Saura et al. 2010) donde se observó la resistencia de los trofozoítos recubiertos por VSPs.

También evaluamos la estabilidad a temperatura ambiente debido a los beneficios que nos brindaría la posibilidad de producir y sobre todo transportar un medicamento de naturaleza proteica a zonas desfavorables sin requerir refrigeración o equipos especiales. Las  $\Delta$ VSPs demostraron ser estables a temperatura ambiente y mantuvieron sus propiedades funcionales intactas después de una semana, demostrando resistencia a la alta concentración de tripsina. La termo estabilidad de las proteínas a menudo se ha asociado con un aumento en su resistencia proteolítica. Los elementos estructurales de las proteínas responsables de esta asociación no están firmemente establecidos, sin embargo, se ha postulado que los bucles (loops) están implicados indirectamente debido a su papel estructural en la estabilidad de las proteínas



(Ahmad, Kumar et al. 2012, Minde, Maurice et al. 2012). Diferentes investigaciones sobre la relación estructura-estabilidad de las proteínas ha demostrado el papel emergente de los bucles y los residuos superficiales en la estabilidad (Max, Wunderlich et al. 2007, Ahmad, Kamal et al. 2008, Kamerzell and Middaugh 2008). En comparación, estudios realizados mediante mutagénesis dirigida en la proteína lipasas de *Bacillus subtilis* han evidenciado la relación directa de estos bucles con la resistencia a la proteólisis de las mutantes (Ahmad, Kumar et al. 2012). Se podría postular que la formación de numerosos puentes disulfuro entre los motivos CXXC esté relacionado con la presencia de bucles en el plegamiento de la proteína, dando a la estructura su estabilidad frente a la proteólisis y cambios de temperatura. Esto sugiere que las proteasas no pueden acceder libremente a sus residuos diana y no serían capaces de ejercer su acción sobre las  $\Delta$ VSPs. Un estudio más detallado de la estructura de la proteína permitiría, a su vez, postular modificaciones puntuales que eleven su estabilidad.

Cabe señalar aquí que la estabilidad a la temperatura, resistencia a pH y a proteasas hace a su vez la producción y purificación más eficiente y reproducible, lo cual resulta en una gran ventaja a la hora de montar una plataforma de producción de estas proteínas a gran escala, permitiendo reducir costos de manipulación como refrigeración o empleo de inhibidores de enzimas proteolíticas comerciales.

Para evaluar si estas proteínas serían capaces de proteger a otras proteínas o péptidos de la degradación química o física y al mismo tiempo implementarse como plataforma para la administración de fármacos por vía oral, ensayamos la mezcla de un péptido o proteína con  $\Delta$ VSPs como agentes protectores en diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para validar nuestro método, empleamos drogas modelo de origen peptídico con posibles usos terapéuticos en la administración oral, si bien no serían las únicas que se puedan emplear a futuro. Incluimos en los ensayos hIL-2, hIL-10, hIFN $\alpha$ , hIFN $\beta$ , hGH y hPTH (McHutchison, Gordon et al. 1998, Freedman 2014, Abdel-Gayoum 2015). Los IFN tipo I se emplean para el control de las infecciones por virus. IFN $\alpha$ -poliethilenglicol (PEG) es administrado a través de inyecciones subcutáneas junto a Ribavirin, un medicamento antiviral administrado oralmente, en el tratamiento de infecciones crónicas por virus de hepatitis C (van Vlerken, Lieveld et al. 2016). A pesar de que la implementación del polímero PEG en 2001 ha permitido inyecciones semanales, en lugar de

diarias, debido a que aumenta el tiempo de circulación en sangre del interferón, el tratamiento continúa siendo agotador para el paciente (Cortez and Kottlilil 2015). IL-10 posee acción inmunoreguladora en enfermedades autoinmunes (Kwilasz, Grace et al. 2015). Estudios realizados en modelos murinos de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) han demostrado que la administración de IL-10 minimiza los síntomas (Polyak, Mach et al. 2012). En los ensayos pre-clínicos, el tratamiento con IL-10 recombinante consiste en tres dosis de administración intravenosa o subcutánea 3 o 4 veces a la semana durante 4 a 6 semanas, y aunque no se ha podido replicar con éxito el resultado observado en modelos murinos en los ensayos pre-clínicos, existe un potencial uso para la misma (Lindsay, Van Montfrans et al. 2002, Yuan, Chen et al. 2013). IL-2 por un lado ha sido ampliamente investigada por su potencial para inducir inmunidad antitumoral en diferentes modelos tumorales (Gaffen and Liu 2004). Además, ensayos clínicos de prueba han demostrado que bajas dosis de IL-2 activan específicamente las poblaciones de células Treg y así puede controlar enfermedades autoinmunes e inflamación (Klatzmann and Abbas 2015). Se podría postular que una posible aplicación de las mezclas terapéuticas  $\Delta$ VSPs-peptidos podrían ser el tratamiento de aquellas enfermedades cuyo origen se encuentra en primera instancia en el TGI, entre las cuales podemos mencionar enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Schleder, Pawlik et al. 2013), en cuyo caso la administración combinada de la interleucina con la  $\Delta$ VSP podría surgir como terapia complementaria. En concordancia, no sería extraño pensar en el tratamiento de algún tipo de cáncer gastrointestinal, en donde podría formularse la combinación de IFNs o IL-2 con  $\Delta$ VSP como adyuvantes en el tratamiento (Bustamante, Frakes et al. 2015).

Los análisis bioinformáticos de la secuencia proteica de estos fármacos indicaron que los mismos presentan diferentes sitios sensibles a la acción de la tripsina, así como otras proteasas intestinales; en consecuencia, se observó, mediante los ensayos *in vitro* de proteólisis, que las mismas resultaron altamente sensibles a la degradación. En contraposición, cuando estos fármacos peptídicos se mezclaron con  $\Delta$ VSP en una relación 1:3, evidenciamos que fueron protegidos exitosamente de su destrucción frente a pHs extremos o proteólisis enzimática. Estos resultados nos sugirieron la posibilidad de emplear estas proteínas recombinantes del parásito

*Giardia lamblia* como transportadores (*carriers*) en el desarrollo de una plataforma para la administración de fármacos por vía oral.

Los resultados *in vitro* resultaron prometedores para aquellas proteínas que eran sensibles a la degradación proteolítica. Sin embargo, en el siguiente paso, la administración oral mediante ensayos *in vivo*, representa un desafío. Las formulaciones no sólo deben resistir todas las barreras que nos impone el paso a través del TGI sino además permitir y mejorar la absorción intestinal de los péptidos de interés. En este sentido, observamos en el caso de algunas citoquinas como IL-2 e IL-10, que a pesar de ser muy resistentes a la degradación proteolítica en los ensayos *in vitro*, su absorción oral mejoró notablemente cuando se co-administraron con  $\Delta$ VSPs. En resumen, mediante ensayos *in vivo* observamos que cuando algunas moléculas relevantes tales como hIFN $\alpha$ , hIFN $\beta$ , hIL-2, hIL-10 son administradas oralmente en combinación  $\Delta$ VSP, estas son protegidas de las condiciones adversas del TGI, resultando en un aumento de la absorción intestinal con respecto a los fármacos administrados de la misma forma, pero solos, no vehiculizados. Aunque en general la absorción oral presenta una cinética algo más lenta que la observada en la administración por vía subcutánea, los niveles de los fármacos detectados en sangre finalmente fueron comparables en ambas vías.

Enfocándonos en estos resultados, decidimos probar la actividad biológica después de la administración oral de dos fármacos modificadores de la glucosa, como son insulina y glucagón. La diabetes mellitus, enfermedad en la que el cuerpo no puede usar o producir suficiente insulina y caracterizada por altos niveles constantes de glucosa en sangre (hiperglucemia), es una de las enfermedades metabólicas y crónicas más prevalentes que afecta a más de 415 millones de adultos en el mundo y está previsto que aumente a 642 millones de personas para 2040 (Diabetes 2015). En la diabetes mellitus, con el tiempo, la ineficiencia o falta de insulina en una persona puede causar daño a los tejidos que lleva al desarrollo de complicaciones como insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular, cetoacidosis, accidente cerebrovascular, daño a los nervios, amputación de extremidades inferiores y retinopatía (Katsarou, Gudbjörnsdottir et al. 2017).

La principal ventaja que presentan los ensayos utilizando estos fármacos modificadores de los niveles de glucosa es la manera fácil y rápida que se dispone de medir su acción biológica a través del empleo de un glucómetro. Observamos en la co-administración por vía oral de  $\Delta$ VSP-

insulina un efecto comprobable, la disminución de los niveles de glucosa en sangre, similar al de la inyección subcutánea de la insulina sola, que se usó como control positivo. Esta observación sugiere un aumento de absorción a nivel intestinal cuando esta hormona es co-administrada oralmente con la  $\Delta$ VSP en contraposición a cuando se la administra sola. El pico de acción y duración del efecto biológico de la hormona en los tiempos medidos también resultó comparable con el observado para el control positivo. En el caso de glucagón, aunque el pico de la hiperglucemia se manifestó más tarde en relación a la administración s.c., su acción persistió en el tiempo al igual que el control positivo. Cabe aclarar aquí que, en la administración oral, empleamos diez veces más proteína que en la aplicación s.c., lo cual responde al hecho de que en la vía s.c. la proteína empleada es inmediatamente incorporada a la circulación, con lo cual es efectiva a una dosis muy baja. Sin embargo y a pesar de emplear mayor cantidad por vía oral, evitamos el uso de agujas y lesiones dérmicas. Por lo tanto, el uso de la  $\Delta$ VSP en la co-administración con estos fármacos brindaría la posibilidad de administrarlos oralmente, permitiéndoles llegar a sus órganos diana y ejercer su acción biológica, la regulación de los niveles de glucosa en la sangre, fortaleciendo la idea de que han sido protegidos de su destrucción en el paso por el TGI.

En pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) con deficiencia absoluta de insulina, la autoadministración de insulina exógena a través de inyección subcutánea es actualmente el tratamiento primario para el control de la glucosa en sangre (Kanzarkar, Pathak et al. 2015). La frecuente inyección de insulina y el automonitoreo de la glucosa en sangre pueden ocasionar dolor, inconveniencia, incumplimiento, hipoglucemia, malestar, necrosis de la piel, infección local y daño a los nervios (Richardson and Kerr 2003, Buzasi, Sapi et al. 2011). Por su relevancia a nivel mundial, es una de las enfermedades en donde han surgido diferentes enfoques para la administración y algunos de ellos incluyen sistemas de administración en los que se busca aumentar la absorción oral de insulina (Sonia and Sharma 2012, Bakhru, Furtado et al. 2013).

Se han evaluado previamente otras rutas de administración, incluida la infusión subcutánea, la administración pulmonar y nasal de insulina. La insulina se comercializó y se administró a través de vías nasales y pulmonares con la aprobación de Exubera y Afrezza (Wong, Martinez et al. 2016). En 2006, Pfizer comercializó insulina en polvo para su administración

mediante inhalación (Exubera). Este producto fue aprobado en los Estados Unidos para adultos y niños mayores de 6 años. Sin embargo, Exubera fue retirado del mercado 1 año después. Se documentaron sus limitaciones, tales como variaciones significativas en la absorción de insulina inhalada en los alvéolos, especialmente en pacientes obesos, pacientes fumadores con asma y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Skyler, Hollander et al. 2008). Aunque Afrezza, de Sanofi y MannKind, ha conseguido mejorar en algunos aspectos, por ejemplo, la absorción de insulina no se altera en pacientes fumadores o con EPOC, al igual que con Exubera, la seguridad a largo plazo de este producto para el uso tanto en diabetes mellitus tipo 1 como tipo 2 solo se puede establecer después de que se haya comercializado durante varios años (Visentin, Giegerich et al. 2016).

Administrar insulina por vía oral presenta varias ventajas sobre las otras rutas de administración sistémica. Por ejemplo, el dolor local, la irritación, las lesiones por pinchazo de aguja y el riesgo de infección de la piel como *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium chelonae* asociados con inyecciones están ausentes (Finucane, Ambrey et al. 2003). Las estrategias importantes para formular proteínas en general y aumentar la biodisponibilidad de la insulina oral han incluido el empleo de inhibidores enzimáticos, potenciadores de la absorción, polímeros mucoadhesivos y modificación química para la absorción mediada por receptores endógenos (Wong, Martinez et al. 2016). Los inhibidores enzimáticos como el 2-hidroxiacetato de sodio, camostat y bacitracin, estudiados en un principio en la década de los noventa, han sido capaces de proteger a la insulina en su paso por el tracto digestivo, sin embargo, no fueron efectivos por la limitada absorción a nivel intestinal y al mismo tiempo la administración diaria de inhibidores enzimáticos en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 resultaba muy cuestionable (Khafagy et al. and Morishita 2012). A finales de la década de los noventa y primeros años del siglo XXI surgieron estudios que buscaban emplear mejoradores de la absorción como surfactantes no iónicos, dodecil sulfato de sodio, polisacárido quitosano, la enzima lisolecitina y polímeros tiolados, que lograban un aumento en la absorción de la insulina pero no eran específicos por lo que la flora intestinal y diferentes toxinas también podían ingresar a la circulación sistémica causando graves perjuicios, por lo que no serían recomendables para tratamientos crónicos en enfermedades como la diabetes (Kanzarkar, Pathak et al. 2015). Las modificaciones químicas fueron algunas de

las más prometedoras. Un estudio en el que se unió químicamente la insulina con transferrina con el objetivo de que la insulina fuese transportada a través del receptor de transferrina, logro muy buenos resultados en protección y acción sistémica. Sin embargo, fue cuestionada al haber sido observado un efecto hipoglucémico luego de 11 horas de administrado, por lo cual se requieren más estudios para determinar su correcto uso o poder pasar a ensayos clínicos (Shao, Zaro et al. 2016).

Los polímeros mucoadhesivos pueden cambiar su comportamiento en respuesta a diferentes temperaturas, pH, luz y fuerza iónica. Los polímeros mucoadhesivos se pueden usar para encapsular insulina adhiriéndose a la mucosidad gastrointestinal propiciando la presencia del fármaco deseable en la circulación sistémica. Algunas de las formulaciones que se ubican dentro de esta clase, denominadas nanopartículas, utilizaron quitosano y ácido poliláctico glicólico (PLGA) para encapsular la insulina, a fin de protegerla del ataque enzimático de tripsina, quimotripsina y elastasa (Almeida 2012). El quitosano es uno de los polímeros ideales que se puede utilizar en la formulación oral debido a sus propiedades no tóxicas, biocompatibles, biodegradables, mucoadhesivas y de mejora de la absorción. Se ha reportado que las nanopartículas de quitosano mucoadhesivas (cargadas con insulina oral) podían potenciar la absorción de insulina oral por vía transcelular o paracelular en modelos de estudio *in vitro* en intestino de ratas diabéticas (Rekha and Sharma 2009). Sin embargo, el inconveniente de este enfoque es que el quitosano presenta una baja solubilidad a pH fisiológico, lo que resulta en una retención prolongada de insulina en el tracto gastrointestinal no permitiendo su paso a la circulación sistémica (Chopra, Mahdi et al. 2006, Fonseca-Santos and Chorilli 2017). Para las formulaciones orales, es importante proteger a los péptidos o proteínas tanto de la proteólisis como permitir o potenciar su absorción intestinal.

La ventaja del empleo de proteínas recombinantes como las  $\Delta$ VSPs es la fácil preparación de la mezcla. Se pueden preparar en el momento y administrar sin mucha preparación técnica. Se puede optar por administrar de manera sencilla, por ejemplo, tomando una píldora de la mezcla, con lo que no se requerirá en ningún momento de inyecciones diarias. Hay, sin embargo, factores que quedan por determinar. No se puede controlar con exactitud el nivel de absorción intestinal, por lo que sería complejo ajustar la dosis de insulina en caso de que el paciente lo

requiriese. Tanto para la insulina, como para los demás biofármacos usados para evaluar el método, se requieren más estudios a fin de esclarecer cuáles son los mecanismos y las vías de absorción intestinal, así como determinar qué factores pueden afectar su paso causando variabilidad en la absorción. Futuros ensayos podrán dar luz a esta importante cuestión indicando que vías se encuentran implicadas en el paso desde el lumen a la circulación sanguínea. Resulta necesario además determinar si los fármacos están siendo transportados vía celular, mediante difusión pasiva, por medio de algún transportador o vesículas, o por vía intercelular, a través de uniones estrechas (Hamman, Enslin et al. 2005). En general, el gran tamaño y las características hidrofílicas de péptidos y proteínas evitan su paso a través de la membrana celular, y si no son reconocidos por un sistema de vehículo de transporte activo, su transporte se limita a la difusión a través de los espacios intercelulares. Sin embargo, que vía o vías de transporte pueden estar actuando es una particularidad de cada proteína y responde a diversos factores, por lo cual, es difícil suponer que una de ellas sea más probable sin mayor información.

Para completar más los estudios y poder implementar la utilización de las  $\Delta$ VSPs, evaluamos la absorción oral de biofármacos luego de regímenes de administración crónica. Con este objetivo, utilizamos las combinaciones  $\Delta$ VSPH7-Gln y  $\Delta$ VSP167-IFNa en los ensayos. Observamos que la co-administración de manera crónica de  $\Delta$ VSPs-péptido no interfirió con los niveles de absorción oral. En algunos experimentos se usaron los mismos animales para la administración de los dos fármacos ensayados en los esquemas crónicos y tampoco se observó variación en la absorción. Es importante destacar que, después de la terapia, no se detectó la presencia de anticuerpos séricos o en materia fecal contra las drogas empleadas o  $\Delta$ VSPs, sugiriendo que la co-administración de estos dos componentes resultó, en estos esquemas, inocuos para los animales empleados. Esto podría ser explicado por las bajas concentraciones a las cuales las  $\Delta$ VSPs fueron efectivas para lograr un efecto de protección y transporte de los demás fármacos, una propiedad que es ventajosa tomando en cuenta que las VSPs de *G. lamblia* han sido consideradas por mucho tiempo solo como inmunógenos (Nash 1992, Nash 1997, Nash 2002). Estos resultados son prometedores si se tiene en cuenta que los fármacos probados en este trabajo por lo general se emplean en los sistemas de administración crónica donde las respuestas inflamatorias o inmunológicas son completamente indeseables.

Es la primera vez que en nuestro grupo se realiza una tesis biotecnológica orientada al desarrollo de una plataforma para la administración de drogas por vía oral. De esta manera, el trabajo contribuye con el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la administración de fármacos y moléculas proteicas biológicamente activas por una vía no convencional diferente a las descritas hasta el momento para este tipo de agentes. En este trabajo, se describe un novedoso método de protección de agentes terapéuticos de la degradación enzimática y condiciones extremas del TGI que comprende la combinación de un portador ( $\Delta$ VSP) y el fármaco peptídico, que permitirá que el agente terapéutico se absorba en el tracto gastrointestinal y llegue al torrente sanguíneo conservando sus capacidades funcionales y no genere reacciones adversas. Aunque la mayoría de estos ensayos fueron realizados en animales de laboratorio utilizando péptidos y proteínas humanas, los resultados mostraron que los efectos se producen igualmente. Las características estructurales de las  $\Delta$ VSPs que confieren estas propiedades de resistencia, así como la capacidad de proteger otros péptidos, aún se encuentran bajo estudio, planteando nuevos interrogantes y abriendo nuevas y potenciales áreas de estudio. Respecto al gran número de motivos CXXC y la formación de puentes disulfuro que presentan estas proteínas, actualmente se encuentran en curso estudios para evaluar su relevancia en las propiedades estructurales y funcionales y si es posible que cumplan un papel importante en la resistencia de las  $\Delta$ VSPs.

A través de un mayor entendimiento de los mecanismos de transporte y protección involucrados, se pueden plantear líneas de investigación centradas en la evaluación de los posibles usos terapéuticos de la administración oral de algunos de los fármacos probados, ampliando el área de estudio para la utilización a futuro de esta plataforma o metodología de administración vía oral. Por ejemplo, los IFN tipo I para el control de las infecciones por virus (Cortez and Kottlilil 2015); la acción inmunoreguladora de IL-10 en las enfermedades autoinmunes (Kwilasz, Grace et al. 2015); el uso de IL-2 para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como el melanoma o en los modelos de diabetes mellitus (Gaffen and Liu 2004); entre otros.



# **Capítulo V**

## **Conclusión**

## 5. Conclusión

Las  $\Delta$ VSPs mediante el empleo del sistema de producción de proteínas basado en células de insecto pueden ser producidas eficientemente y de buena calidad. El método requiere adiestramiento por parte del operario, pero es un método que cuenta con mucha bibliografía y el desarrollo comercial de diferentes empresas.

Las  $\Delta$ VSPs obtenidas por tecnología recombinante son resistentes a la degradación proteolítica, de igual manera que las VSPs nativas de *G. lamblia*.

$\Delta$ VSPs protegen péptidos bioactivos de la acción proteolítica *in vitro* e *in vivo*, a su vez, observándose absorción y actividad biológica de los mismos tras su administración vía oral. Se requieren más estudios para determinar mecanismos, vías y factores que afecten la variabilidad en la absorción intestinal.

Los niveles de absorción observados luego de una administración crónica fueron similares a los observados en ensayos únicos.

Existe un repertorio muy grande de genes que codifican para  $\Delta$ VSPs en el genoma de *G. lamblia*, lo que abre la posibilidad de emplear diferentes  $\Delta$ VSPs para los ensayos a fin de caracterizar mejor el sistema. En este estudio solo empleamos dos de las muchas posibilidades, observándose resultados similares para ambas proteínas de superficie.

Para el caso de la insulina, uno de los fármacos más ampliamente comercializados para el tratamiento de diabetes mellitus, es un método que resulta muy prometedor por la sencillez y rapidez con que se formula la mezcla  $\Delta$ VSPs-insulina. Por tratarse de una enfermedad que requiere dosis diarias de la droga, se requieren estudios posteriores a fin de determinar su correcto método de empleo y descartar efectos secundarios como reacciones inmunogénicas, variabilidad en la absorción, mala absorción en pacientes con obesidad o fumadores, etc.

# **Capítulo VI**

## **Bibliografía**

## 6. Bibliografía

- Abdel-Gayoum, A. A. (2015). "Serum vitamin D and parathyroid hormone profiles in patients with various stages of renal disease." *Australas Med J* **8**(2): 33-40.
- Adam, R. D. (1991). "The biology of Giardia spp." *Microbiol Rev* **55**(4): 706-732.
- Adam, R. D. (2000). "The Giardia lamblia genome." *Int J Parasitol* **30**(4): 475-484.
- Adam, R. D. (2001). "Biology of Giardia lamblia." *Clin Microbiol Rev* **14**(3): 447-475.
- Adam, R. D., A. Aggarwal, A. A. Lal, V. F. de La Cruz, T. McCutchan and T. E. Nash (1988). "Antigenic variation of a cysteine-rich protein in Giardia lamblia." *J Exp Med* **167**(1): 109-118.
- Adam, R. D., Y. M. Yang and T. E. Nash (1992). "The cysteine-rich protein gene family of Giardia lamblia: loss of the CRP170 gene in an antigenic variant." *Mol Cell Biol* **12**(3): 1194-1201.
- Aggarwal, A., J. W. Merritt, Jr. and T. E. Nash (1989). "Cysteine-rich variant surface proteins of Giardia lamblia." *Mol Biochem Parasitol* **32**(1): 39-47.
- Ahmad, S., M. Z. Kamal, R. Sankaranarayanan and N. M. Rao (2008). "Thermostable Bacillus subtilis lipases: in vitro evolution and structural insight." *J Mol Biol* **381**(2): 324-340.
- Ahmad, S., V. Kumar, K. B. Ramanand and N. M. Rao (2012). "Probing protein stability and proteolytic resistance by loop scanning: a comprehensive mutational analysis." *Protein Sci* **21**(3): 433-446.
- Almeida, H., Amaral, M.H., Lobão, P. (2012). "Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **02**(06): 01-10.
- Aucoin, M. G., J. A. Mena and A. A. Kamen (2010). "Bioprocessing of baculovirus vectors: a review." *Curr Gene Ther* **10**(3): 174-186.
- Bade, S., H. H. Gorris, S. Koelling, V. Olivier, F. Reuter, P. Zabel and A. Frey (2010). "Quantitation of major protein constituents of murine intestinal fluid." *Anal Biochem* **406**(2): 157-165.
- Bakhru, S. H., S. Furtado, A. P. Morello and E. Mathiowitz (2013). "Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles." *Adv Drug Deliv Rev* **65**(6): 811-821.
- Bienz, M., M. Siles-Lucas, P. Wittwer and N. Muller (2001). "vsp gene expression by Giardia lamblia clone GS/M-83-H7 during antigenic variation in vivo and in vitro." *Infect Immun* **69**(9): 5278-5285.
- Bienz, M., P. Wittwer, V. Zimmermann and N. Muller (2001). "Molecular characterisation of a predominant antigenic region of Giardia lamblia variant surface protein H7." *Int J Parasitol* **31**(8): 827-832.
- Bongfen, S. E., A. Laroque, J. Berghout and P. Gros (2009). "Genetic and genomic analyses of host-pathogen interactions in malaria." *Trends Parasitol* **25**(9): 417-422.
- Borden, K. L. (2000). "RING domains: master builders of molecular scaffolds?" *J Mol Biol* **295**(5): 1103-1112.
- Bustamante, L., J. Frakes, S. Hoffe and R. Kim (2015). "Investigational drugs for treating anal cancer and future perspectives." *Expert Opin Investig Drugs*.
- Buzasi, K., Z. Sapi and G. Jermendy (2011). "Acanthosis nigricans as a local cutaneous side effect of repeated human insulin injections." *Diabetes Res Clin Pract* **94**(2): e34-36.
- Campanati, L., A. Holloschi, H. Troster, H. Spring, W. de Souza and L. H. Monteiro-Leal (2002). "Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoan Giardia lamblia." *Cell Motil Cytoskeleton* **51**(4): 213-224.
- Cortez, K. J. and S. Kottlilil (2015). "Beyond interferon: rationale and prospects for newer treatment paradigms for chronic hepatitis C." *Ther Adv Chronic Dis* **6**(1): 4-14.
- Cox, M. M. (2012). "Recombinant protein vaccines produced in insect cells." *Vaccine* **30**(10): 1759-1766.
- Cox, M. M. and Y. Hashimoto (2011). "A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells." *J Invertebr Pathol* **107** Suppl: S31-41.
- Cheng, L. and Y. Chen (2001). "Anti-Fas antibody induces apoptosis in cultured human renal interstitial fibroblasts." *Chin Med J (Engl)* **114**(2): 162-166.

- Chopra, S., S. Mahdi, J. Kaur, Z. Iqbal, S. Talegaonkar and F. J. Ahmad (2006). "Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery." J Pharm Pharmacol **58**(8): 1021-1032.
- Diabetes, F. I. d. (2015). Diabetes, Atlas septima ed. F. I. d. Diabetes. Brussels, Belgium.
- Feely, D. E. and S. L. Erlandsen (1981). "Isolation and purification of Giardia trophozoites from rat intestine." J Parasitol **67**(1): 59-64.
- Felberbaum, R. S. (2015). "The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors." Biotechnol J **10**(5): 702-714.
- Finucane, K., P. Ambrey, S. Narayan, C. B. Archer and C. Dayan (2003). "Insulin injection abscesses caused by Mycobacterium chelonae." Diabetes Care **26**(8): 2483-2484.
- Fonseca-Santos, B. and M. Chorilli (2017). "An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **77**: 1349-1362.
- Franzen, O., J. Jerlstrom-Hultqvist, E. Castro, E. Sherwood, J. Ankarklev, D. S. Reiner, D. Palm, J. O. Andersson, B. Andersson and S. G. Svard (2009). "Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species?" PLoS Pathog **5**(8): e1000560.
- Freedman, M. S. (2014). "Evidence for the efficacy of interferon beta-1b in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis in individuals with clinically isolated syndrome." Ther Adv Neurol Disord **7**(6): 279-288.
- Fussenegger, W. W. a. M. (2009). "Insect Cell-Based Recombinant Protein Production." Cell and Tissue Reaction Engineering. Principles and Practice. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gaffen, S. L. and K. D. Liu (2004). "Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications." Cytokine **28**(3): 109-123.
- Gill, G. N. (1995). "The enigma of LIM domains." Structure **3**(12): 1285-1289.
- Gillin, F. D., P. Hagblom, J. Harwood, S. B. Aley, D. S. Reiner, M. McCaffery, M. So and D. G. Guiney (1990). "Isolation and expression of the gene for a major surface protein of Giardia lamblia." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4463-4467.
- Goldberg, M. and I. Gomez-Orellana (2003). "Challenges for the oral delivery of macromolecules." Nat Rev Drug Discov **2**(4): 289-295.
- Gomez-Sebastian, S., J. Lopez-Vidal and J. M. Escribano (2014). "Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette." PLoS One **9**(5): e96562.
- Hamman, J. H., G. M. Enslin and A. F. Kotze (2005). "Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments." BioDrugs **19**(3): 165-177.
- Harper, D. M. (2009). "Currently approved prophylactic HPV vaccines." Expert Rev Vaccines **8**(12): 1663-1679.
- Hashimoto, T., Y. Nakamura, F. Nakamura, T. Shirakura, J. Adachi, N. Goto, K. Okamoto and M. Hasegawa (1994). "Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, Giardia lamblia." Mol Biol Evol **11**(1): 65-71.
- Hopkins, R., D. Esposito and W. Gillette (2010). "Widening the bottleneck: increasing success in protein expression and purification." J Struct Biol **172**(1): 14-20.
- Hu, Y. C., K. Yao and T. Y. Wu (2008). "Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens." Expert Rev Vaccines **7**(3): 363-371.
- Huang, D. B. and A. C. White (2006). "An updated review on Cryptosporidium and Giardia." Gastroenterol Clin North Am **35**(2): 291-314, viii.
- Insuela, D. B. R. and V. F. Carvalho (2017). "Glucagon and glucagon-like peptide-1 as novel anti-inflammatory and immunomodulatory compounds." Eur J Pharmacol.
- Jarvis, D. L. (2009). "Baculovirus-insect cell expression systems." Methods Enzymol **463**: 191-222.

- Kamerzell, T. J. and C. R. Middaugh (2008). "The complex inter-relationships between protein flexibility and stability." *J Pharm Sci* **97**(9): 3494-3517.
- Kanzarkar, M., P. P. Pathak, M. Vaidya, C. Brumlik and A. Choudhury (2015). "Oral insulin-delivery system for diabetes mellitus." *Pharm Pat Anal* **4**(1): 29-36.
- Katsarou, A., S. Gudbjörnsdóttir, A. Rawshani, D. Dabelea, E. Bonifacio, B. J. Anderson, L. M. Jacobsen, D. A. Schatz and Å. Lernmark (2017). "Type 1 diabetes mellitus." *Nature Reviews Disease Primers* **3**: 17016.
- Khafagy el, S. and M. Morishita (2012). "Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide." *Adv Drug Deliv Rev* **64**(6): 531-539.
- Klatzmann, D. and A. K. Abbas (2015). "The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases." *Nat Rev Immunol* **15**(5): 283-294.
- Kulakova, L., S. M. Singer, J. Conrad and T. E. Nash (2006). "Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation." *Mol Microbiol* **61**(6): 1533-1542.
- Kwilasz, A. J., P. M. Grace, P. Serbedzija, S. F. Maier and L. R. Watkins (2015). "The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases." *Neuropharmacology* **96**(Pt A): 55-69.
- Leader, B., Q. J. Baca and D. E. Golan (2008). "Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification." *Nat Rev Drug Discov* **7**(1): 21-39.
- Lindsay, J., C. Van Montfrans, F. Brennan, S. Van Deventer, P. Drillenbug, H. Hodgson, A. Te Velde and M. Sol Rodriguez Pena (2002). "IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis." *Gene Ther* **9**(24): 1715-1721.
- Lujan, H. D., M. R. Mowatt, J. J. Wu, Y. Lu, A. Lees, M. R. Chance and T. E. Nash (1995). "Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties." *J Biol Chem* **270**(23): 13807-13813.
- Luo, Y. Y., X. Y. Xiong, Y. Tian, Z. L. Li, Y. C. Gong and Y. P. Li (2016). "A review of biodegradable polymeric systems for oral insulin delivery." *Drug Deliv* **23**(6): 1882-1891.
- Marcucci, G., G. Della Pepa and M. L. Brandi (2017). "Drug safety evaluation of parathyroid hormone for hypocalcemia in patients with hypoparathyroidism." *Expert Opin Drug Saf* **16**(5): 617-625.
- Max, K. E., M. Wunderlich, Y. Roske, F. X. Schmid and U. Heinemann (2007). "Optimized variants of the cold shock protein from in vitro selection: structural basis of their high thermostability." *J Mol Biol* **369**(4): 1087-1097.
- McArthur, A. G., H. G. Morrison, J. E. Nixon, N. Q. Passamaneck, U. Kim, G. Hinkle, M. K. Crocker, M. E. Holder, R. Farr, C. I. Reich, G. E. Olsen, S. B. Aley, R. D. Adam, F. D. Gillin and M. L. Sogin (2000). "The *Giardia* genome project database." *FEMS Microbiol Lett* **189**(2): 271-273.
- McHutchison, J. G., S. C. Gordon, E. R. Schiff, M. L. Shiffman, W. M. Lee, V. K. Rustgi, Z. D. Goodman, M. H. Ling, S. Cort and J. K. Albrecht (1998). "Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group." *N Engl J Med* **339**(21): 1485-1492.
- Minde, D. P., M. M. Maurice and S. G. Rudiger (2012). "Determining biophysical protein stability in lysates by a fast proteolysis assay, FASTpp." *PLoS One* **7**(10): e46147.
- Mitragotri, S., P. A. Burke and R. Langer (2014). "Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies." *Nat Rev Drug Discov* **13**(9): 655-672.
- Monis, P. T., R. H. Andrews, G. Mayrhofer and P. L. Ey (2003). "Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin." *Infect Genet Evol* **3**(1): 29-38.
- Morrison, H. G., A. G. McArthur, F. D. Gillin, S. B. Aley, R. D. Adam, G. J. Olsen, A. A. Best, W. Z. Cande, F. Chen, M. J. Cipriano, B. J. Davids, S. C. Dawson, H. G. Elmendorf, A. B. Hehl, M. E. Holder, S. M. Huse, U. U. Kim, E. Lasek-Nesselquist, G. Manning, A. Nigam, J. E. Nixon, D. Palm, N. E. Passamaneck, A. Prabhu, C. I. Reich, D. S. Reiner, J. Samuelson, S. G. Svard and M. L. Sogin (2007). "Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*." *Science* **317**(5846): 1921-1926.

- Mowatt, M. R., A. Aggarwal and T. E. Nash (1991). "Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*." Mol Biochem Parasitol **49**(2): 215-227.
- Muheem, A., F. Shakeel, M. A. Jahangir, M. Anwar, N. Mallick, G. K. Jain, M. H. Warsi and F. J. Ahmad (2016). "A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives." Saudi Pharm J **24**(4): 413-428.
- Nash, T. (1992). "Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*." Parasitol Today **8**(7): 229-234.
- Nash, T. E. (1997). "Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1359): 1369-1375.
- Nash, T. E. (2002). "Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*." Mol Microbiol **45**(3): 585-590.
- Nash, T. E. and A. Aggarwal (1986). "Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates." J Immunol **136**(7): 2628-2632.
- Nash, T. E., A. Aggarwal, R. D. Adam, J. T. Conrad and J. W. Merritt, Jr. (1988). "Antigenic variation in *Giardia lamblia*." J Immunol **141**(2): 636-641.
- Nash, T. E., S. M. Banks, D. W. Alling, J. W. Merritt, Jr. and J. T. Conrad (1990). "Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*." Exp Parasitol **71**(4): 415-421.
- Nash, T. E., J. T. Conrad and M. R. Mowatt (1995). "*Giardia lamblia*: identification and characterization of a variant-specific surface protein gene family." J Eukaryot Microbiol **42**(5): 604-609.
- Nash, T. E., H. T. Lujan, M. R. Mowatt and J. T. Conrad (2001). "Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*." Infect Immun **69**(3): 1922-1923.
- Nash, T. E., J. W. Merritt, Jr. and J. T. Conrad (1991). "Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases." Infect Immun **59**(4): 1334-1340.
- Nash, T. E., Merritt, J.W. Jr. & Conrad, J.T. (1991). "Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases." Infect. Immun.: 59,1334-1340
- Nash, T. E. and M. R. Mowatt (1992). "Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size." Mol Biochem Parasitol **51**(2): 219-227.
- Nash, T. E. and M. R. Mowatt (1992). "Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene." Exp Parasitol **75**(4): 369-378.
- Nash, T. E. and M. R. Mowatt (1993). "Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5489-5493.
- Palomares, L. A., C. E. Joosten, P. R. Hughes, R. R. Granados and M. L. Shuler (2003). "Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins." Biotechnol Prog **19**(1): 185-192.
- Palomares, L. A., J. A. Mena and O. T. Ramirez (2012). "Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: production of virus-like particles." Methods **56**(3): 389-395.
- Pawar, V. K., J. G. Meher, Y. Singh, M. Chaurasia, B. Surendar Reddy and M. K. Chourasia (2014). "Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: strategies and industrial perspectives." J Control Release **196**: 168-183.
- Petry, F., V. Jakobi and T. S. Tessema "Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection." Exp Parasitol **126**(3): 304-309.
- Pimenta, P. F., P. P. da Silva and T. Nash (1991). "Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey." Infect Immun **59**(11): 3989-3996.
- Polyak, S., A. Mach, S. Porvasnik, L. Dixon, T. Conlon, K. E. Erger, A. Acosta, A. J. Wright, M. Campbell-Thompson, I. Zolotukhin, C. Wasserfall and C. Mah (2012). "Identification of adeno-associated viral vectors suitable for intestinal gene delivery and modulation of experimental colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(3): G296-308.

- Prucca, C. G., I. Slavin, R. Quiroga, E. V. Elias, F. D. Rivero, A. Saura, P. G. Carranza and H. D. Lujan (2008). "Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference." *Nature* **456**(7223): 750-754.
- Rekha, M. R. and C. P. Sharma (2009). "Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption." *J Control Release* **135**(2): 144-151.
- Renukuntla, J., A. D. Vadlapudi, A. Patel, S. H. Boddu and A. K. Mitra (2013). "Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins." *Int J Pharm* **447**(1-2): 75-93.
- Richardson, T. and D. Kerr (2003). "Skin-related complications of insulin therapy: epidemiology and emerging management strategies." *Am J Clin Dermatol* **4**(10): 661-667.
- Rivero, F., A. Saura, C. G. Prucca, P. G. Carranza, A. Torri and H. D. Lujan (2010). "Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine." *Nat Med* **16**(5): 551-557, 551p following 557.
- Rivero, F. D., A. Saura, C. G. Prucca, P. G. Carranza, A. Torri and H. D. Lujan (2010). "Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine." *Nat Med* **16**(5): 551-557, 551p following 557.
- Schleder, S., M. Pawlik, P. Wiggermann, C. Ott, S. Fichtner-Feigl, R. Muller-Wille, C. Stroszczynski and A. G. Schreyer (2013). "Interobserver Agreement in MR Enterography for Diagnostic Assessment in Patients with Crohn's Disease." *Rofo* **184**(10): 992-997.
- Shang, H., T. A. Garretson, C. M. S. Kumar, R. F. Dieter and X. W. Cheng (2017). "Improved pFastBac donor plasmid vectors for higher protein production using the Bac-to-Bac(R) baculovirus expression vector system." *J Biotechnol* **255**: 37-46.
- Shao, J., J. L. Zaro and W. C. Shen (2016). "Proinsulin-Transferrin Fusion Protein Exhibits a Prolonged and Selective Effect on the Control of Hepatic Glucose Production in an Experimental Model of Type 1 Diabetes." *Mol Pharm* **13**(8): 2641-2646.
- Singer, S. M., H. G. Elmendorf, J. T. Conrad and T. E. Nash (2001). "Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*." *J Infect Dis* **183**(1): 119-124.
- Skyler, J. S., P. A. Hollander, L. Jovanovic, S. Klioze, A. Krasner, R. J. Riese, J. Reis, P. Schwartz, W. Duggan and G. Inhaled Human Insulin Type 1 Diabetes Study (2008). "Safety and efficacy of inhaled human insulin (Exubera) during discontinuation and readministration of therapy in adults with type 1 diabetes: A 3-year randomized controlled trial." *Diabetes Res Clin Pract* **82**(2): 238-246.
- Smart, A. L., S. Gaisford and A. W. Basit (2014). "Oral peptide and protein delivery: intestinal obstacles and commercial prospects." *Expert Opin Drug Deliv* **11**(8): 1323-1335.
- Smith, M. W., S. B. Aley, M. Sogin, F. D. Gillin and G. A. Evans (1998). "Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome." *Mol Biochem Parasitol* **95**(2): 267-280.
- Snell, L. M., T. L. McGaha and D. G. Brooks (2017). "Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer." *Trends Immunol*.
- Sonia, T. A. and C. P. Sharma (2012). "An overview of natural polymers for oral insulin delivery." *Drug Discov Today* **17**(13-14): 784-792.
- Takahashi, Y. (2017). "The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in the Liver." *Int J Mol Sci* **18**(7).
- The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, P. (2013). "Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. Medicines in Development — Biologics".
- Tovar, J., G. Leon-Avila, L. B. Sanchez, R. Sutak, J. Tachezy, M. van der Giezen, M. Hernandez, M. Muller and J. M. Lucocq (2003). "Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation." *Nature* **426**(6963): 172-176.
- Udomkesmalee, E., S. Dhanamitta, S. Sirisinha, S. Charoenkiatkul, S. Tuntipopipat, O. Banjong, N. Rojroongwasinkul, T. R. Kramer and J. C. Smith, Jr. (1992). "Effect of vitamin A and zinc supplementation on the nutriture of children in Northeast Thailand." *Am J Clin Nutr* **56**(1): 50-57.
- Unger, T. and Y. Peleg (2012). "Recombinant protein expression in the baculovirus-infected insect cell system." *Methods Mol Biol* **800**: 187-199.



- van Vlerken, L. G., F. I. Lieveld, S. van Meer, G. H. Koek, K. M. van Nieuwkerk, P. Friederich, J. E. Arends, P. D. Siersema, D. M. Burger and K. J. van Erpecum (2016). "Adherence to ribavirin in chronic hepatitis C patients on antiviral treatment: Results from a randomized controlled trial using real-time medication monitoring." Clin Res Hepatol Gastroenterol **40**(5): 622-630.
- Visentin, R., C. Giegerich, R. Jager, R. Dahmen, A. Boss, M. Grant, C. Dalla Man, C. Cobelli and T. Klabunde (2016). "Improving Efficacy of Inhaled Technosphere Insulin (Afrezza) by Postmeal Dosing: In-silico Clinical Trial with the University of Virginia/Padova Type 1 Diabetes Simulator." Diabetes Technol Ther **18**(9): 574-585.
- Wolfe, M. S. (1992). "Giardiasis." Clin Microbiol Rev **5**(1): 93-100.
- Wong, C. Y., J. Martinez and C. R. Dass (2016). "Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities." J Pharm Pharmacol **68**(9): 1093-1108.
- Yang, Y. M., Y. Ortega, C. Sterling and R. D. Adam (1994). "Giardia lamblia trophozoites contain multiple alleles of a variant-specific surface protein gene with 105-base pair tandem repeats." Mol Biochem Parasitol **68**(2): 267-276.
- Yuan, C., W. X. Chen, J. S. Zhu, N. W. Chen, Y. M. Lu, Y. X. Ou and H. Q. Chen (2013). "IL-10 treatment is associated with prohibitin expression in the Crohn's disease intestinal fibrosis mouse model." Mediators Inflamm **2013**: 617145.
- Zelikin, A. N., C. Ehrhardt and A. M. Healy (2016). "Materials and methods for delivery of biological drugs." Nat Chem **8**(11): 997-1007.