

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctora en Ciencias Biológicas

**VEHICULIZACIÓN DE AGENTES
BIOACTIVOS ANTITUMORALES BAJO LA
FORMA DE NANOCOMPLEJOS CON
ALBÚMINAS**

Joana Belén Ferrado

Directora de Tesis: MSc. Liliana G. Santiago

Co-director de Tesis: Dr. Adrián A. Perez

Lugar de realización: Área de Biocoloides – Instituto de Tecnología de
Alimentos – Facultad de Ingeniería Química – UNL

-2021-

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Liliana Santiago, por su orientación en el desarrollo de esta tesis, por la confianza depositada en mí y su apoyo en situaciones personales.

A mi co-director Adrián Perez, por todas sus enseñanzas y valiosos aportes a mi formación científica desde mi tesis de licenciatura, por su calidad humana y por creer siempre en mí.

Al financiamiento recibido de los siguientes proyectos:

- PICT-2017-1823 (2018-2021): “Impacto de la matriz alimentaria y la nanoencapsulación sobre la bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos”. Organismo Financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT). Investigador Responsable: MSc. Liliana G. Santiago.
- PICT-2014-2636 (2015-2018): “Estudio de las propiedades estructurales y biológicas de nanocomplejos formados por albúminas y compuestos bioactivos lipofílicos”. Organismo Financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT). Investigador Responsable: MSc. Liliana G. Santiago.
- PIO-CONICET-UNER (2015-2017): “Incorporación de nanopartículas biopoliméricas con actividad antimicrobiana en películas biodegradables”. Organismo Financiador: Consejo Nacional de investigaciones científicas y técnicas (CONICET). Investigador Responsable: Dr. Adrián A. Pérez.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por la Beca Doctoral Inicial otorgada en el marco del proyecto PICT 2014-2636, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de la Beca Doctoral para la finalización del doctorado.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos, y la Facultad de Ingeniería Química por brindarme el espacio y los recursos para la realización del desarrollo experimental de la presente tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por la formación de posgrado.

A los miembros del jurado de la presente tesis, por su tiempo y dedicación para evaluar el manuscrito y realizar aportes.

Al Sistema Nacional de Microscopía, especialmente a José L. Fernández (PRELINE) por la adquisición de las imágenes de AFM, por su ayuda desinteresada, buena predisposición y asistencia técnica.

A Hugo Ortega, María Eugenia Baravalle, Florencia Olmos y María Sol Renna del Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet Litoral) por los ensayos de actividad antitumoral *in vitro* realizados, y el trabajo y colaboración entre grupos. También quiero agradecer a Belén que siempre estuvo dispuesta a ayudar a llevar muestras desde Santa Fe a Esperanza.

A Ana Binetti, Elisa Ale y Virginia Batistela del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-CONICET) por la colaboración entre grupos y la asistencia brindada para realizar liofilizaciones.

A Santiago Vaillard, Victoria Vaillard y Malen Menegon del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, UNL-CONICET) por el trabajo en colaboración realizado para lograr la PEGilación de las nanopartículas, su buena predisposición y por animarme a seguir intentando cuando los resultados no son los esperados.

A Marcelo Schmidt, siempre dispuesto a ayudar en LaMoFIQ, por su asistencia técnica en el área de equipos de FIQ.

A mis compañeros de laboratorio, Flavia, Laura, Marianela y Osvaldo, por los momentos compartidos en congresos y jornadas de mediciones en el laboratorio y por el apoyo brindado en el transcurso de estos años.

A mi familia, mi pilar, por apoyarme en mis decisiones y sostenerme en los momentos difíciles. A mi mamá Cristina, que siempre me animó a perseverar y seguir adelante. A mi hermano Leandro, por ayudarme y estar en cada detalle aun estando lejos, y a mi papá Javier, por sus consejos, escucharme siempre y estar a mi lado.

A mi compañero de vida Agustín, quien vivió conmigo todos los altibajos de estos años de doctorado; por darme la mano todo este tiempo, compartir las alegrías y quedarse a mi lado para darme fuerzas en los momentos más difíciles.

PUBLICACIONES

- Joana B. Ferrado, Adrián A. Perez, Flavia F. Visentini, María E. Baravalle, Hugo H. Ortega, Liliana G. Santiago (2020). Genistein loaded in self-assembled bovine serum albumin nanovehicles and their effects on mouse mammary adenocarcinoma cells. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111777.
- Joana B. Ferrado, Adrián A. Perez, María C. Ruiz, Ignacio E. León, Liliana G. Santiago (2020) Chrysin-loaded bovine serum albumin particles as bioactive nanosupplements. *Food & Function*, 11, 6007-6019.
- Joana B. Ferrado, Adrián A. Perez, Flavia F. Visentini, Germán A. Islan, Guillermo R. Castro, Liliana G. Santiago (2019). Formation and characterization of self-assembled bovine serum albumin nanoparticles as chrysin delivery systems. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 43-51.
- Los resultados de la presente tesis doctoral se encuentran protegidos mediante la solicitud de patente P2018101403: Nanopartículas de albúmina cargadas con sustancias hidrofóbicas y un proceso para su obtención. Fecha de prioridad: 28/05/18. Titulares: UNL y CONICET.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | 1 |
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1.1. Nanotecnología y su aplicación contra el cáncer | 13 |
| 1.2. Cáncer de mama | 15 |
| 1.3. Nanopartículas de uso terapéutico: métodos de obtención y caracterización..... | 17 |
| 1.4. Albúmina sérica bovina..... | 20 |
| 1.5. Nanopartículas basadas en proteínas: albúminas séricas | 24 |
| 1.6. Compuestos lipofílicos naturales con propiedades antitumorales: flavonoides..... | 28 |
| 1.7. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de flavonoides | 31 |
| 1.8. Factores que afectan a la biodistribución y biodisponibilidad de nanopartículas en aplicaciones contra el cáncer..... | 33 |
| 1.9. Modificación superficial de nanopartículas..... | 37 |
| 2. OBJETIVOS | 39 |
| 2.1. Objetivo general | 40 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 40 |
| 3. CAPÍTULO 1 | 41 |
| 3.1. <i>INTRODUCCIÓN</i> | 42 |
| 3.1.1. Nanopartículas de albúminas séricas..... | 42 |
| 3.1.2. Albúmina sérica bovina..... | 45 |
| 3.1.3. Crisina..... | 46 |
| 3.2. <i>OBJETIVOS</i> | 48 |
| 3.3. <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> | 48 |
| 3.3.1. Materiales | 48 |
| 3.3.2. Tratamientos térmicos en distintas condiciones de pH y temperatura | 49 |
| 3.3.3. Espectroscopía de fluorescencia..... | 49 |
| 3.3.3.1. Fundamentos de espectroscopía de fluorescencia | 50 |
| 3.3.3.2. Fluorescencia intrínseca | 51 |
| 3.3.3.3. Fluorescencia extrínseca | 51 |
| 3.3.4. Caracterización de nanopartículas de albúmina sérica bovina | 52 |
| 3.3.4.1. Determinación de tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.4.2. Determinación de la carga neta superficial por medidas de potencial ζ | 53 |
| 3.3.4.3. Determinación de pesos moleculares por cromatografía rápida de proteínas por exclusión molecular y SDS-PAGE..... | 55 |
| 3.3.4.4. Morfología por microscopía de fuerza atómica | 55 |
| 3.3.5. Formación de nanocomplejos con crisina | 57 |
| 3.3.5.1. Determinación de parámetros de unión mediante la aplicación de modelo Scatchard modificado..... | 57 |
| 3.3.5.2. Morfología por microscopía de transmisión electrónica | 58 |
| 3.3.5.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de crisina en BSA _{np} | 59 |
| 3.3.6. Análisis estadístico..... | 61 |
| 3.4. RESULTADOS | 61 |
| 3.4.1. Formación de nanopartículas de BSA por autoensamblaje inducido por tratamiento térmico..... | 61 |
| 3.4.1.1. Fluorescencia intrínseca..... | 61 |
| 3.4.1.2. Fluorescencia extrínseca..... | 63 |
| 3.4.2. Características fisicoquímicas y morfológicas de nanopartículas de BSA..... | 67 |
| 3.4.2.1. Determinación de pesos moleculares por cromatografía rápida de proteínas (SEC-FPLC) y tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (DLS) | 67 |
| 3.4.2.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 70 |
| 3.4.3. Formación de nanocomplejos entre nanopartículas de BSA y crisina | 71 |
| 3.4.3.1. Fluorescencia intrínseca..... | 71 |
| 3.4.3.2. Fluorescencia extrínseca..... | 75 |
| 3.4.3.3. Distribución de tamaño de partícula y potencial ζ de nanocomplejos con crisina..... | 76 |
| 3.4.3.4. Microscopía electrónica de transición (TEM) | 78 |
| 3.4.3.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de crisina..... | 80 |
| 3.5. CONCLUSIÓN PARCIAL | 80 |
| 4. CAPÍTULO 2 | 82 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN | 83 |
| 4.1.1. Liofilización de proteínas y nanopartículas proteicas..... | 83 |
| 4.1.2. Estrategias contra el cáncer de mama | 84 |
| 4.1.3. Crisina en terapias contra el cáncer de mama | 85 |
| 4.1.4. Modelos de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 87 |
| 4.2. OBJETIVOS | 88 |
| 4.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 88 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1. Materiales | 88 |
| 4.3.2. Preparación de nanopartículas de albúmina sérica bovina..... | 89 |
| 4.3.3. Formación de nanocomplejos con crisina y ensayos de turbidez | 89 |
| 4.3.4. Producción de polvos liofilizados de nanopartículas..... | 90 |
| 4.3.4.1. Obtención de polvos liofilizados de nanopartículas de BSA cargadas con crisina..... | 90 |
| 4.3.4.2. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas tras la reconstitución de los polvos liofilizados..... | 90 |
| 4.3.4.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 90 |
| 4.3.4.2.1.1. Fundamentos de calorimetría diferencial de barrido..... | 90 |
| 4.3.4.2.1.2. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido..... | 92 |
| 4.3.4.2.2. Distribución de tamaño de partículas por DLS y potencial ζ | 93 |
| 4.3.4.2.3. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de crisina en povos | 94 |
| 4.3.5. Evaluación de la actividad antitumoral <i>in vitro</i> de los polvos resuspendidos..... | 94 |
| 4.3.5.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo | 94 |
| 4.3.5.2. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT..... | 95 |
| 4.3.5.3. Evaluación de mecanismos de muerte celular por marcación con sondas fluorescentes y análisis por citometría de flujo..... | 96 |
| 4.3.5.3.1. Mecanismos de muerte celular | 96 |
| 4.3.5.3.2. Detección de poblaciones celulares apoptóticas y necróticas por marcación con anexina V-FITC y yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo..... | 97 |
| 4.3.6. Evaluación de la liberación gastrointestinal <i>in vitro</i> de crisina en nanopartículas..... | 98 |
| 4.3.6.1. Actividades enzimáticas | 98 |
| 4.3.6.2. Simulación del proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 100 |
| 4.3.6.3. Determinación de la cantidad de crisina liberada tras la digestión gastrointestinal | 101 |
| 4.3.7. Análisis estadístico..... | 102 |
| 4.4. RESULTADOS | 102 |
| 4.4.1. Determinación de la concentración adecuada de crisina para cargar las nanopartículas..... | 102 |
| 4.4.2. Efecto de la liofilización sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas..... | 104 |
| 4.4.2.1. Propiedades térmicas | 106 |
| 4.4.2.2. Tamaño de partícula y potencial ζ | 107 |
| 4.4.2.3. Eficiencia de encapsulación..... | 111 |
| 4.4.3. Actividad antitumoral <i>in vitro</i> de polvos liofilizados reconstituidos | 112 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.3.1. Viabilidad celular por ensayo MTT..... | 112 |
| 4.4.3.2. Apoptosis..... | 114 |
| 4.4.4. Liberación de crisina bajo digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 115 |
| 4.5. CONCLUSIÓN PARCIAL..... | 117 |
| 5. CAPÍTULO 3 | 119 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN..... | 120 |
| 5.1.1. Genisteína y sus similitudes estructurales con crisina..... | 120 |
| 5.1.2. Propiedades antitumorales de genisteína..... | 121 |
| 5.1.3. Antecedentes de la vehiculización de genisteína en nanopartículas.. | 122 |
| 5.2. OBJETIVOS | 123 |
| 5.3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 123 |
| 5.3.1. Materiales | 123 |
| 5.3.2. Preparación de nanopartículas de albúmina sérica bovina..... | 124 |
| 5.3.3. Evaluación de la carga de nanopartículas de albúmina sérica bovina con genisteína..... | 124 |
| 5.3.3.1. Mediciones de fluorescencia..... | 124 |
| 5.3.3.2. Mediciones de turbidez | 126 |
| 5.3.4. Preparación de polvos liofilizados y evaluación de sus propiedades tras la reconstitución | 126 |
| 5.3.4.1. Determinación del tamaño de partícula y potencial ζ | 127 |
| 5.3.4.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de genisteína | 127 |
| 5.3.5. Evaluación de propiedades antitumorales <i>in vitro</i> de polvos reconstituidos sobre células murinas de adenocarcinoma de mama | 128 |
| 5.3.5.1. Línea celular F3II..... | 128 |
| 5.3.5.2. Preparación de las células F3II y condiciones de cultivo | 129 |
| 5.3.5.3. Determinación de la viabilidad celular..... | 130 |
| 5.3.5.4. Evaluación de apoptosis mediante marcación con sondas fluorescentes y análisis por citometría de flujo..... | 131 |
| 5.3.6. Análisis estadístico..... | 131 |
| 5.4. RESULTADOS | 132 |
| 5.4.1. Características moleculares de la unión entre nanopartículas de albúmina sérica bovina y genisteína..... | 132 |
| 5.4.2. Efecto de la carga de Gen sobre la turbidez de suspensiones y eficiencia de encapsulación..... | 139 |
| 5.4.3. Propiedades fisicoquímicas de los polvos liofilizados de nanopartículas de BSA cargadas con genisteína tras su reconstitución | 142 |
| 5.4.4. Efectos citotóxicos de polvos reconstituidos sobre células F3II..... | 144 |
| 5.4.5. Inducción de apoptosis sobre células F3II..... | 148 |

| | |
|---|------------|
| 5.5. CONCLUSIÓN PARCIAL..... | 151 |
| 6. CAPÍTULO 4 | 153 |
| 6.1. INTRODUCCIÓN..... | 154 |
| 6.1.1. PEGilación de proteínas y nanopartículas..... | 154 |
| 6.1.2. Conjugación al grupo amino como estrategia de PEGilación..... | 155 |
| 6.1.3. Antecedentes de PEGilación de albúmina sérica bovina y nanopartículas de albúminas..... | 156 |
| 6.2. OBJETIVOS | 158 |
| 6.3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 158 |
| 6.3.1. Materiales..... | 158 |
| 6.3.2. Síntesis y purificación de mPEG-carbonil imidazol de 30 kDa..... | 159 |
| 6.3.3. Preparación de nanopartículas de BSA cargadas con genisteína..... | 159 |
| 6.3.4. Reacciones de PEGilación de nanopartículas de BSA cargadas con Gen utilizando mPEG-carbonil imidazol de 30 kDa | 160 |
| 6.3.5. Análisis de los productos de PEGilación..... | 160 |
| 6.3.5.1. Determinación de grupos amino disponibles mediante el método de OPA..... | 160 |
| 6.3.5.1.1. Fundamentos del método espectrofotométrico de determinación de grupos amino libres por reacción con o-ftaldehído | 160 |
| 6.3.5.1.2. Ensayo de determinación de grupos amino disponibles | 161 |
| 6.3.5.2. Purificación por SEC-FPLC preparativo..... | 162 |
| 6.3.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes..... | 162 |
| 6.3.5.4. Determinación de la cantidad remanente de mPEG luego de la PEGilación..... | 162 |
| 6.3.5.5. Determinación del tamaño de partícula y potencial ζ | 163 |
| 6.3.5.6. Microscopía de fuerza atómica..... | 163 |
| 6.3.6. Estudio de propiedades antitumorales <i>in vitro</i> sobre células de adenocarcinoma de mama murino | 163 |
| 6.3.6.1. Cultivo de células F3II | 163 |
| 6.3.6.2. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT | 164 |
| 6.3.6.3. Determinación de muerte celular por apoptosis mediante marcación con sondas fluorescentes y citometría de flujo | 165 |
| 6.3.6.4. Evaluación de genotoxicidad mediante ensayo de micronúcleos | 165 |
| 6.3.6.4.1. Fundamentos del ensayo de micronúcleos..... | 165 |
| 6.3.6.4.2. Ensayo de micronúcleos sobre células F3II..... | 167 |
| 6.3.7. Análisis estadístico..... | 169 |

| | |
|--|------------|
| 6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 169 |
| 6.4.1. Grado de PEGilación por reducción de grupos amino disponibles determinados mediante ensayo de OPA | 169 |
| 6.4.2. Perfil de isoformas de productos de PEGilación..... | 171 |
| 6.4.3.. Análisis de productos de PEGilación por SDS-PAGE..... | 173 |
| 6.4.4. Tamaño de partícula y potencial ζ de productos de PEGilación | 176 |
| 6.4.5. Morfología por microscopía de fuerza atómica de nanopartículas de BSA PEGiladas | 179 |
| 6.4.6. Propiedades antitumorales <i>in vitro</i> de nanopartículas de BSA cargadas con Gen tras la PEGilación | 180 |
| 6.4.6.1. Citotoxicidad frente a células F3II | 180 |
| 6.4.6.2. Inducción de apoptosis sobre células F3II | 183 |
| 6.4.6.3. Genotoxicidad sobre células F3II mediante el ensayo de micronúcleos | 186 |
| 6.5. CONCLUSIÓN PARCIAL..... | 189 |
| 7. CONCLUSIÓN..... | 192 |
| 8. APÉNDICE | 197 |
| 8.1. Efecto del DMSO sobre la emisión de fluorescencia intrínseca de BSA _n | 198 |
| 8.2. Estudio del solapamiento de espectros de emisión de fluorescencia de BSA _n y absorción de Cris | 198 |
| 8.3. Solapamiento de espectros de emisión de fluorescencia de BSA _n y absorción de Gen | 199 |
| 8.4. Espectros de absorción de BSA _n p, Gen y del complejo BSA _n p-Gen .. | 199 |
| 8.5. Distribución de tamaño de partícula de BSA _n y BSA _n p cargados con Gen antes y después de liofilizar | 200 |
| 8.6. Ensayos previos de PEGilación de BSA _n p a diferentes condiciones de pH y relación molar BSA _n p:PEG | 200 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 203 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ΔH : Variación de entalpía

ε : Coeficiente de extinción molar

η : Viscosidad

λ_{em} : Longitud de onda de emisión

λ_{ex} : Longitud de onda de excitación

λ_{max} : Longitud de onda correspondiente al máximo de intensidad de fluorescencia

μ_e : Movilidad electroforética

ABS_{medio} : Absorbancia de células cultivadas en medio de cultivo

$ABS_{muestra}$: Absorbancia de células tratadas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AFM: Microscopía de fuerza atómica

aL: Antes de liofilizar

ANOVA: Análisis de la varianza

ANS: Ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico

BSA: Albúmina sérica bovina

BSAn: Albúmina sérica bovina nativa

BSAn-Cris: Albúmina sérica bovina cargada con crisina

BSAn-Gen: Albúmina sérica bovina cargada con genisteína

BSAn-Gen-PEG: Albúmina sérica bovina cargada con genisteína y PEGilada

BSAnp: Nanopartículas de albúmina sérica bovina

BSAnp-70-11: Nanopartículas de albúmina sérica bovina obtenidas por tratamiento térmico a 70°C y pH 11,0.

BSAnp-70-11-Gen-PEG: Nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con genisteína y PEGiladas

BSAnp-70-9: Nanopartículas de albúmina sérica bovina obtenidas por tratamiento térmico a 70°C y pH 9,0.

BSAnp-85-11: Nanopartículas de albúmina sérica bovina obtenidas por tratamiento térmico a 85°C y pH 11,0.

BSAnp-85-9: Nanopartículas de albúmina sérica bovina obtenidas por tratamiento térmico a 85°C y pH 9,0.

BSAnp-Cris: Nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con crisina

BSAnp-Gen: Nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con genisteína

$CDCl_3$: Cloroformo deuterado

CDI: Carbonildiimidazol

cit-B: Citocalasina B
CM: Cáncer de mama
Col: Colchicina
C_p: Capacidad calorífica
Cris: Crisina
Cris_L: Cantidad de crisina libre
Cris_T: Cantidad de crisina total
D: Coeficiente de difusión traslacional
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
d_H: Diámetro hidrodinámico
dL: Después de liofilizar
DLS: Dispersión de luz dinámica
DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
EC₅₀: Concentración media máxima eficaz
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EE: Eficiencia de encapsulación
EPR: Efecto de retención y permeabilidad aumentada
FACS: Clasificador de células activadas por fluorescencia
FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
FGS: Fluido gástrico simulado
f_i: Fracción de sitios ocupados por ligando
FIS: Fluido intestinal simulado
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteínas
FSC: Dispersión de luz hacia adelante
FSS: Fluido salival simulado
Gen: Genisteína
Gen_L: Cantidad de genisteína libre
Gen_T: Cantidad de genisteína total
HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HSA: Albúmina sérica humana

IA: Inhibidor de aromatasa
IC₅₀: Concentración inhibitoria media máxima
ICH: Conferencia Internacional de Armonización
IDC: Carcinoma ductal invasivo
IF₀: Intensidad de emisión de fluorescencia máxima del triptófano de la proteína nativa
IF_{ANS}: Intensidad máxima de emisión de fluorescencia extrínseca
IFR_{ANS}: Intensidad relativa de emisión de fluorescencia extrínseca
IFR_{Trp}: Intensidad relativa de emisión de fluorescencia del triptófano
IF_{Trp}: Intensidad máxima de emisión de fluorescencia del triptófano de proteína tratada térmicamente
ILC: Carcinoma lobular invasivo
IP: yoduro de propidio
IPBC: Índice de proliferación con bloqueo de citocinesis
IR: Índice de replicación
k: Constante de Boltzmann
K_A: Constante de asociación de ligando
LC: Capacidad de carga
L_{Cris}: Liberación de crisina tras digestión gastrointestinal *in vitro*
LSD: Diferencia mínima significativa
MN Bi %: Porcentaje de micronúcleos en células binucleadas
MN: Micronúcleo
mPEG: Metoxi-polietilenglicol
mPEG-Im: Metoxi-polietilenglicol carbonil imidazol
MSRE: Modulador selectivo de los receptores de estrógeno
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
n: Número de sitios de unión de ligando
n_m: Número de sitios de unión por monómero de proteína
n_v: Número de sitios de unión por vehículo
OPA: Orto-ftaldehído
PBS: Solución reguladora fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
Pdl: Índice de polidispersidad
PEG: Polietilenglicol
PLGA: Ácido poliláctico co-glicólico

PM: Peso molecular

PS: Relación de tamaño de partícula

PSDi: Distribución del tamaño de partícula basada en intensidad

PSDn: Distribución del tamaño de partícula basada en número

PSDv: Distribución del tamaño de partícula basada en volumen

RE: Receptor de estrógenos

R_h: Radio hidrodinámico

RP: Receptor de progesterona

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en modo fase reversa

S₀: Estado electrónico fundamental

S₁: Estado electrónico excitado

SDS: Dodecil-sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio

SEC: Cromatografía de exclusión molecular

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SFB: Suero fetal bovino

SFM: Sistema fagocítico mononuclear

SLS: Dispersión de luz estática

SSC: Dispersión de luz a 90°

TAME: Clorhidrato de éster metílico de N α -p-Tosyl-L-arginina

TCA: Ácido tricloroacético

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

THF: Tetrahidrofurano

T_m: Temperatura de desnaturalización térmica

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

uPA: Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa

UV: Ultravioleta

V_e: Volumen de elución

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

XTT: 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonatofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida de sodio

ZP: Relación de potencial zeta

RESUMEN

En las últimas décadas, el estudio de las propiedades quimiopreventivas y terapéuticas de los fitoquímicos contra el cáncer se han convertido en un tema importante de investigación. Entre ellos, se destacan los flavonoides, que forman parte de la dieta del ser humano, pero su baja solubilidad dificulta su incorporación en matrices acuosas. Además, su elevado metabolismo es la principal causa de su baja biodisponibilidad. Dentro de este grupo se encuentra la flavona crisina (Cris, 5,7-dihydroxiflavona) que se extrae de la flor pasionaria (*Passiflora caerulea*), la miel y el propóleo. Dado que Cris ha mostrado actividad sobre la viabilidad de líneas celulares tumorales sin efectos sobre las células normales, se ha propuesto como compuesto bioactivo para la prevención y el tratamiento del cáncer. Otro flavonoide, bien conocido por producir efectos antitumorales contra las células del cáncer de mama, es la isoflavona genisteína (Gen, 4',5,7-trihydroxiisoflavona). La incorporación de estos compuestos bioactivos en matrices farmacéuticas y nutracéuticas requiere la búsqueda de estrategias que permitan su solubilización, bioaccesibilidad, biodisponibilidad, preservación de su integridad molecular y aumento de su concentración en tejidos neoplásicos. En este campo, la nanotecnología constituye una poderosa herramienta para el desarrollo de nuevas estrategias de formulación para superar estos obstáculos. En este sentido, la albúmina sérica bovina (BSA) es atractiva debido a su biocompatibilidad y baja toxicidad. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue estudiar la formación de nanopartículas de BSA (BSAnp) mediante un proceso de autoensamblaje inducido térmicamente y la posterior carga de estos sistemas con flavonoides (Cris y Gen) a fin de obtener información relevante para el diseño y desarrollo de potenciales terapias contra el cáncer basadas en nanopartículas de albuminas.

Se estudió la formación de BSAnp mediante tratamiento térmico controlado a partir de soluciones acuosas de BSA nativa (BSAn) empleando condiciones experimentales: 70°C/5 min y 85°C/5 min, a distintas concentraciones de proteína (1,0-4,0% p/p), y a dos valores de pH (9,0 y 11,0) en los que se conoce que BSAn se encuentra en diferentes conformaciones desplegadas. Se obtuvieron diferentes poblaciones de BSAnp, las que fueron caracterizadas, mostrando forma esférica, diámetros hidrodinámicos (d_H), en el rango de 13-28 nm, pesos moleculares en el rango de 400-1.000 kDa y valores de potenciales ζ alrededor de -10,0 mV.

Las nanopartículas se cargaron con Cris (disuelta en DMSO) mediante una técnica antisolvente y su unión a BSAnp se corroboró y caracterizó mediante técnicas espectroscópicas en medio acuoso de pH fisiológico (PBS, pH 7,4). Un número en el

rango de 96-237 moléculas de Cris se unieron a BSAnp con una constante de asociación de aproximadamente $2,0-3,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Los porcentajes de eficiencia de encapsulación (EE) de Cris en BSAnp estuvieron comprendidos entre 44 y 65% con una capacidad de carga (LC) entre 2,1 y 6,9 μg Cris/mg proteína, mostrando correspondencia con el tamaño de los vehículos. Además, se obtuvieron formulaciones liofilizadas de BSAnp cargadas con Cris utilizando manitol como agente crioprotector. En general, las propiedades fisicoquímicas de BSAnp cargadas con Cris se conservaron luego de la liofilización y reconstitución del polvo. La actividad citotóxica de los polvos reconstituidos se examinó en dos líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7 (hormono-dependiente) y MDA-MB-231 (hormono-independiente) por medio del método colorimétrico MTT. Los mayores efectos citotóxicos se observaron cuando se cargó Cris en los sistemas BSAnp obtenidos a 70°C , 4,0% p/p BSAn y pH 11,0, los que produjeron una reducción de $\sim 85\%$ y $\sim 70\%$ en la viabilidad de las células MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente. Además, el mecanismo de muerte celular fue investigado por marcación con anexina V-FITC/IP seguido de análisis por citometría de flujo y se encontró que la disminución de la viabilidad fue causada por mecanismos de necrosis y apoptosis. La citotoxicidad mediada por apoptosis fue mayor para BSAnp cargadas con Cris en comparación con el sistema BSAnp sin carga, y el sistema BSAn-Cris. Finalmente, BSAnp-Cris se sometió a un protocolo estático de digestión gastrointestinal *in vitro*, liberándose $\sim 14\%$ de Cris de BSAnp, lo que sugiere que el complejo BSAnp-Cris podría digerirse en el tracto gastrointestinal, mientras que retiene una considerable cantidad de Cris.

Luego, se evaluó la carga de Gen en BSAnp aplicando técnicas espectroscópicas, y se compararon los resultados con los obtenidos para su estereoisómero, Cris. La unión de Gen a BSAnp involucró interacciones hidrofóbicas y de tipo enlaces de hidrógeno. Un número en el rango de 286-336 moléculas de Gen se unieron a BSAnp, con una constante de asociación alrededor de $0,3-5,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. En comparación con Cris, la unión de Gen a BSAnp involucró más sitios, mientras que la constante de asociación fue similar para ambos flavonoides. La carga de Gen en BSAnp también fue corroborada por mediciones de turbidez registrándose una mejor solubilización en comparación con la carga en BSAn. Además, se obtuvieron mayores porcentajes de EE (24-26%) y LC (2,1 μg Gen/mg proteína) para Gen cargada en nanopartículas de mayor tamaño. En general, la carga de flavonoides en los sistemas de proteínas estuvo fuertemente influenciada por efectos combinados del estado conformacional de BSA (nativo vs agregado), el tamaño del vehículo y la estructura química de los flavonoides. Para estudiar sus propiedades antitumorales, se

obtuvieron polvos liofilizados y las soluciones reconstituidas se ensayaron *in vitro* mediante la técnica XTT y marcación con anexina V-FITC/IP seguida por análisis de citometría de flujo contra células F3II de adenocarcinoma mamario murino. Los sistemas de BSAnp cargadas con Gen obtenidos a 70°C, 4,0% p/p BSA, pH 9,0 y 11,0 produjeron una disminución de ~ 60% en la viabilidad celular de la línea F3II. Esta disminución fue mayor en comparación con los sistemas BSAnp sin carga, siendo los efectos citotóxicos más altos los cargados con Gen en la BSAnp de menor tamaño. Por último, el principal mecanismo de muerte celular identificado para los sistemas BSAnp cargados con Gen fue la inducción de apoptosis.

Finalmente, se abordó la modificación superficial de los sistemas BSAnp cargados con Gen (BSAnp-Gen) mediante la asociación covalente de cadenas de polietilenglicol (PEG). Bajo las condiciones de reacción evaluadas (pH 8,5, 20-25°C, relación molar BSA: PEG 1:20, 24 h), la asociación covalente de cadenas de PEG de 30 kDa a BSAnp se logró mediante la reacción entre el grupo imidazol del reactivo mPEG-carbonilimidazol (mPEG -Im) y los grupos amino de residuos de Lys, causando una disminución en el contenido de grupos amino disponibles en un 17%. La PEGilación de BSAnp produjo un aumento del d_H de BSAnp, sin presentar cambios en el valor del potencial ζ . Las isoformas PEGiladas mostraron una distribución de tamaño de partícula bimodal, donde la población mayoritaria tendría una d_H en el rango de 20-28 nm, mientras que la otra presentaría un d_H más alto, comprendido en el rango 300-500 nm. Luego, se evaluaron las propiedades antitumorales de los sistemas sobre células F3II y se observó que la nanopartícula PEGilada produjo una reducción de ~70% en la viabilidad de las células F3II. La PEGilación produciría un mejoramiento de la citotoxicidad en BSAnp-Gen, ya que se requeriría una menor concentración de Gen para producir citotoxicidad celular, mostrando una IC_{50} de 25 μ M. Se evaluaron dos mecanismos de citotoxicidad de los sistemas: inducción de apoptosis y genotoxicidad mediante la formación de micronúcleos (MN). Se observó que la PEGilación no afectaría a la inducción de apoptosis en las células F3II, mientras que la genotoxicidad de los sistemas disminuyó, dando como resultado una menor inducción de la formación de MN. La PEGilación de BSAnp sería relevante en términos de administración, ya que haría factible la administración de sistemas BSAnp por vía parenteral.

En síntesis, los sistemas BSAnp con tamaños entre 13-15 nm constituyen vehículos versátiles para la administración de flavonoides, aumentando su solubilidad acuosa y conservando sus efectos citotóxicos sobre células tumorales de cáncer de mama. El procedimiento de preparación de BSAnp desarrollado es más sencillo en

comparación con otros como desolvatación o emulsificación y evita el uso de disolventes tóxicos e incompatibles con el medio ambiente. Además, las nanopartículas obtenidas permiten incrementar la carga de los flavonoides con respecto a la proteína en su estado nativo. Los resultados proporcionan información útil para estudios futuros, cuyo objetivo podría extenderse al desarrollo de formulaciones de BSA_{np} para la administración de compuestos bioactivos lipofílicos aplicados a la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

ABSTRACT

In the last decades, cancer chemopreventive and therapeutic properties of phytochemicals have become an important topic of research. Among them, flavonoids are part of the human daily diet, but their low solubility difficult their incorporation in aqueous matrices. Furthermore, its extensive metabolism is the main cause for its low bioavailability. Within this group it can be mentioned the natural flavone chrysin (Chrys, 5,7-dihydroxyflavone) which is extracted from blue passionflower (*Passiflora caerulea*), honey and propolis. Since Chrys has showed effects on viability of tumor cell lines with no effects on normal cells, it has been proposed as bioactive compound for the prevention and treatment of cancer. Another flavonoid, which is well known to produce antitumor effects against breast cancer cells, is the isoflavone genistein (Gen, 4',5,7-trihydroxyisoflavone). The incorporation of these bioactive compounds into pharmaceutical and nutraceutical matrices requires the search for strategies that allow its solubilization, preservation of its molecular integrity and the increase of its concentration in neoplastic tissues. In this field, nanotechnology constitutes a powerful tool for development of novel formulation strategies to overcome these problems. In this regard, bovine serum albumin (BSA) has a promising application due to their biocompatibility and low toxicity. Hence, the aim of this contribution was to study the formation of BSA nanoparticles (BSAnp) by a thermally induced self-assembling process and its subsequent loading with flavonoids (Chrys and Gen) in order to obtain relevant information for the design and development of potential cancer therapies.

Formation of BSAnp was performed by controlled heat treatment of native BSA (BSAn) aqueous solutions at different experimental conditions: 70°C/5 min and 85°C/5 min, at several protein concentrations (1.0-4.0% wt), and at two pH values (9.0 and 11.0) in which it is known that BSAn is found in different unfolded conformations. Different populations of BSAnp were obtained, which showed spherical shape, hydrodynamic diameters (d_H) in the range of 13-28 nm, molecular weights in the range of 400-1,000 kDa and ζ potentials values around -10.0 mV.

The nanoparticles were loaded with Chrys (in DMSO) by an antisolvent technique and its binding to BSAnp was corroborated and characterized by spectroscopic techniques in physiological aqueous medium (PBS, pH 7.4). A number in the range of 96-237 molecules of Chrys bonded to BSAnp with an affinity binding constant of approximately $2.0-3.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. The encapsulation efficiency (EE) percentages of Chrys in BSAnp were between 44-65% with a loading capacity (LC) of 2,1-6,9 μg Chrys/mg protein and they showed correspondence with the size of the vehicles. Furthermore, freeze-dried formulations of Chrys-loaded BSAnp were obtained

by using mannitol as cryoprotectant agent. In general, physicochemical properties of Chrys-loaded BSAnp were preserved after freeze-drying process and powder reconstitution. Cytotoxic activity of the reconstituted powders was assayed on two breast cancer cell lines: MCF-7 (hormone-responsive) and MDA-MB-231 (hormone-independent) by means of MTT colorimetric method. The greatest cytotoxic effects were observed when Chrys was loaded in BSAnp obtained at 70°C, 4.0 %wt. and at pH 11.0. Furthermore, the mechanism of cell death was researched by Annexin V-FITC flow cytometry, and it was found that the decrease of viability was caused by combined mechanisms of necrosis and apoptosis. Apoptosis-mediated cytotoxicity was higher for Chrys-loaded BSAnp in comparison with BSAnp system. Finally, this system was subjected to a static *in vitro* gastrointestinal digestion protocol, and ~14% Chrys was released from BSAnp after digestion, suggesting that BSAnp-Chrys could be degraded in gastrointestinal tract, while it retains a considerable amount of Chrys.

Then, Gen loading in BSAnp was studied by applying spectroscopic techniques, and the results were compared with the ones obtained for its stereoisomer, Chrys. Gen binding to BSAnp involved hydrophobic and hydrogen bonds interactions. A number in the range of 286-336 Gen molecules were bound to BSAnp, with an association constant around $0.3\text{-}5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. In comparison with the flavone Chrys, Gen binding to BSAnp involved more sites, whereas the association constant was similar for both flavonoids. Gen loading in BSAnp was also corroborated by turbidity measurements getting a better solubilization in comparison with loading in BSA. Moreover, greater EE percentages (24-26%) and LC (2.1 μg Gen/mg protein) for Gen were obtained for greater sized nanoparticles. In general, flavonoid loading in protein systems was strongly influenced by combined effects of BSA conformational state (native vs aggregated), vehicle size and flavonoid chemical structure. To study their antitumor properties, freeze dried powders were obtained, and the reconstituted solutions were assayed *in vitro* by XTT technique and Annexin V-FITC flow cytometry against mouse mammary adenocarcinoma F3II cells. Gen-loaded BSAnp produced a significant decrease in cell viability compared with unloaded BSAnp systems, being the highest cytotoxic effects those for Gen-loading in the lowest sized BSAnp. Finally, the main mechanism of cell death identified for Gen-loaded BSAnp systems was apoptosis induction.

Finally, the surface-modification of Gen-loaded BSAnp (BSAnp-Gen) systems was approached by the covalent addition of polyethylene glycol (PEG) chains. Under the evaluated reaction conditions (pH 8.5, 20-25°C, molar ratio BSA:PEG 1:20, 24 h), the covalent bond of 30 kDa PEG chains to BSAnp-Gen was achieved through the

reaction between the imidazole group of mPEG-carbonylimidazole (mPEG-Im) and the amino groups of Lys residues, decreasing the content of available amino groups by 17%. The PEGylation of BSAnp-Gen produced an increase in d_H , without changes in ζ potential value. The PEGylated isoforms showed a bimodal particle size distribution, where one population would have a d_H in the range 20-28 nm and the other a higher d_H , between 300 and 500 nm. Then, the antitumor properties of the systems on F3II cells were evaluated and it was observed that PEGylation would produce an improvement of cytotoxicity in BSAnp-Gen, since a lower concentration of Gen would be required to produce cellular cytotoxicity, showing a IC_{50} of 25 μ M. Two mechanisms of cytotoxicity of the systems were evaluated: induction of apoptosis and genotoxicity by micronucleus (MN) formation. It was observed that PEGylation would not affect the induction of apoptosis on F3II cells, while the genotoxicity of the systems decreased, resulting in a lower induction of MN formation. PEGylation of BSAnp is relevant because it would make the administration of BSAnp systems by parenteral route feasible.

In summary, BSAnp with sizes between 13-15 nm are versatile vehicles for flavonoid delivery with improved aqueous solubility and preserved cytotoxic effects on tumor cells. The procedure for BSAnp preparation is easier and simpler compared with others such as desolvation or emulsification and it avoids the use of toxic solvents. Furthermore, the obtained nanoparticles allow increasing the loading of flavonoids with respect to the protein in its native state. Results provide useful information for future studies, a drug delivery formulation consisting in BSAnp for flavonoid nanoencapsulation for cancer prevention and treatment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología y su aplicación contra el cáncer

En forma general, el término nanotecnología se refiere a la manipulación de los materiales en la nanoescala, es decir, en un rango de tamaño del orden de los nanómetros (10^{-9} m). Este campo surgió al observar que, reduciendo al menos una dimensión de cualquier tipo de material hasta el tamaño nanométrico, sus propiedades mecánicas, ópticas, magnéticas, térmicas, entre otras, cambian de forma abrupta [1] ampliando considerablemente el espectro de aplicaciones posibles para un mismo material. Hoy en día, la definición precisa de la escala nanométrica es controversial debido a la dificultad de establecer los límites a partir de los cuales estas propiedades cambian notablemente. Algunas definiciones consideran un rango de tamaño comprendido entre los 0,2 nm (tamaño de los átomos) y los 100 nm [2], [3] mientras que otras establecen la nanoescala en el rango 1-100 nm [4]. Por su parte, la Comisión Europea definió a un nanomaterial como un material natural, accidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado sin unir, o agregado, o aglomerado, donde al menos el 50% de las partículas de la distribución de tamaño en número tiene una o más dimensiones externas en el rango de 1 a 100 nm [5]. Esta última definición considera no sólo el tamaño de las partículas de material, sino también el porcentaje que representan dentro del mismo. De esa manera, se evitan ambigüedades en el caso en que, por ejemplo, un material contenga solo una proporción de partículas con tamaño en la nanoescala, o esté compuesto por nanoestructuras que existen en un rango de tamaño mayor debido a la aglomeración o agregación [6].

Desde su surgimiento, los términos nanotecnología y nanociencia han sido utilizados indistintamente. Sin embargo, la nanociencia se refiere al estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales en la escala atómica, molecular y macromolecular, mientras que la nanotecnología se refiere al diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño en la escala nanométrica. De esta manera, la nanotecnología abrió numerosas posibilidades de aplicación en diversos ámbitos, incluyendo la electrónica, la informática, la producción de energía, la industria textil, la medicina, los alimentos y la industria farmacéutica [1].

La nanotecnología presenta un enorme potencial dentro del ámbito de la salud, especialmente mediante el desarrollo de nanopartículas incorporadas en dispositivos de diagnóstico y como sistemas de vehiculización y liberación de compuestos con actividad farmacológica. El término nanopartícula se refiere a un material macromolecular en que un compuesto activo es disuelto, entrampado, encapsulado o

absorbido [7] y, por lo general, engloba a estructuras tales como nanoesferas y las nanocápsulas. Las nanoesferas están compuestas por una estructura tipo matriz en la cual el compuesto activo es absorbido o encapsulado, mientras que las nanocápsulas son sistemas compartimentados en los que el activo se encuentra confinado en su interior, rodeado por una membrana polimérica [8].

Asimismo, la incorporación de compuestos activos en nanopartículas posee múltiples ventajas, permitiendo la protección del compuesto activo contra la degradación, el aumento de su solubilidad, bioaccesibilidad, biodisponibilidad, de su vida media en circulación, mejoramiento del perfil farmacocinético, absorción y biodistribución, entre otras. Además, estos sistemas ofrecen la posibilidad de interactuar con el organismo humano a escalas subcelulares (es decir, moleculares) con un alto grado de especificidad [9]. Por esta razón, existe desde hace años un interés especial en la implementación de la nanotecnología en el diagnóstico, prevención y tratamiento del cáncer, con la esperanza de que promueva avances importantes.

El cáncer constituye un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la multiplicación de células anormales que invaden y, en algunos casos, producen metástasis diseminándose a otras partes de cuerpo [10]. En general, dentro de un tipo de tejido en particular, las células comparten ciertos mecanismos moleculares que controlan los procesos normales de proliferación, diferenciación y muerte celular. Cuando se producen alteraciones en estos mecanismos a nivel molecular, bioquímico y/o celular, las células normales se transforman en células con potencial capacidad de formar un tumor [10,11]. Se denominan células neoplásicas a aquellas que continúan dividiéndose independientemente de los estímulos de crecimiento externos normales. Las neoplasias se clasifican en benignas cuando están bien confinadas en el tejido, sin capacidad de invasión [10]. En cambio, las neoplasias malignas exhiben una invasión del tejido normal circundante, lo que puede progresar en la hiperproliferación celular, angiogénesis, potencial invasivo y lesiones metastásicas [11]. La metástasis, proceso mediante el cual las células tumorales provenientes del tumor primario forman tumores secundarios en partes distantes del cuerpo, es la principal causa de muerte por cáncer.

La neoplasia se desarrolla en pacientes durante largos períodos de tiempo y generalmente está precedida por el desarrollo de una o más lesiones preneoplásicas que incluyen hiperplasia, metaplasia y displasia [12]. La hiperplasia implica un aumento en el número de células en un órgano o tejido, frecuentemente en respuesta

a factores de crecimiento u hormonas. Esto deriva en un aumento en el volumen (o tamaño) del órgano o tejido afectado. Si el estímulo cesa, la proliferación celular se detendrá y el tejido hiperplásico retrocederá. Por otro lado, la metaplasia representa un cambio reversible en los tejidos caracterizado por la sustitución de un tipo de célula adulta por otro tipo de célula adulta. Este tipo de lesiones se manifiesta como una reacción a una condición adversa del tejido, en la que se reemplazan células sensibles por células resistentes a dichas condiciones adversas. Por su parte, la displasia es una lesión proliferativa caracterizada por un cambio en la forma, tamaño, maduración de las células e histoarquitectura del tejido. Si esta lesión permanece confinada dentro del tejido normal, se clasifica como carcinoma *in situ*. En muchos casos, la displasia y/o el carcinoma *in situ* se consideran precursores inmediatos de los cánceres invasivos. Sin embargo, no todas las lesiones displásicas se convertirán en una neoplasia maligna [10], [12].

1.2. Cáncer de mama

Entre los diferentes tipos de cáncer que existen, el más común en las mujeres es el cáncer de mama (CM). Según las últimas estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el número de nuevos casos de CM a nivel mundial durante el año 2020 fue de aproximadamente 2,26 millones, lo cual representa un 11,7% entre todos los tipos de cáncer. Por su parte, el número de muertes producidas por CM en 2020 fue de alrededor de 685.000, constituyendo un 6,9% sobre el total de muertes producidas por cáncer durante ese año [13]. En Argentina, se reportaron cerca de 22.000 casos nuevos de CM durante el 2020 [13].

Es comúnmente aceptado que no existe una única causa para el desarrollo del CM, sino que es consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a que células normales del tejido mamario se transformen en células neoplásicas, que luego atraviesan distintas etapas histopatológicas, desde la hiperplasia simple sin células atípicas, pasando luego por la neoplasia intraepitelial hasta llegar finalmente al cáncer invasivo o infiltrante.

Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de CM, se encuentran los genéticos, hormonales y ambientales. Los factores genéticos se refieren a mutaciones en genes relacionados con procesos claves para el desarrollo normal celular, principalmente en los genes BRCA-1 y BCRA-2, que codifican proteínas multifuncionales que participan en los procesos de reparación del ADN [14]. Con respecto a los factores hormonales, se ha reportado que una exposición prolongada a

hormonas, principalmente estrógenos, puede conducir al desarrollo de CM. Por último, se pueden enumerar diversos factores ambientales que contribuyen al desarrollo de esta patología, como lo son el consumo de alcohol, el tabaquismo, el aumento de peso luego de la menopausia, el sedentarismo, y la terapia de reemplazo hormonal [14].

El CM puede originarse en distintas áreas de la mama: en los conductos lácteos, los lobulillos o, menos frecuentemente, en el tejido intermedio. De acuerdo al área involucrada, se identifican tres tipos histopatológicos principales: (i) carcinoma ductal invasivo (IDC), siendo el tipo más común (75%), originado en los conductos lácteos y de carácter invasivo ya que se inicia en la pared del conducto y la atraviesa hacia el tejido mamario, (ii) carcinoma lobular invasivo (ILC), menos común (10%), originado en la pared del lóbulo productor de leche y que luego atraviesa la pared hacia otros tejidos, y (iii) mezcla ductal y tubular (IDC/ILC), el menos común entre todos (5%). Existen otros subtipos menos frecuentes, entre ellos el mucinoso, papilar, medular, tubular y metaplásico [14].

Asimismo, a nivel molecular, los carcinomas mamarios se clasifican en base a la expresión de ciertos biomarcadores, principalmente el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2). Actualmente, se reconocen y definen 5 subtipos intrínsecos de CM: Luminal A (expresan RE y/o RP, y no expresan HER2), Luminal B (expresan RE y/o RP, y expresan HER2), Basal (no expresan RE, RP ni HER2), HER2 enriquecido (no expresan receptores hormonales RE ni RP, expresan HER2) y normal (menos común y controversial ya que el perfil de expresión de marcadores es similar al del tejido mamario normal) [14], [15]. Estos subtipos moleculares a su vez se relacionan con el pronóstico de la enfermedad. La expresión de los receptores hormonales RE y RP se relaciona con un buen pronóstico del CM, siendo factible la indicación del tratamiento por terapia hormonal. Por otro lado, la sobreexpresión de HER2 se relaciona a una mayor agresividad biológica, debido a que está implicado a una mayor actividad proteolítica y angiogénica, por lo que estos carcinomas tienen un peor pronóstico. Finalmente, el subtipo triple negativo (TNBC por las siglas en inglés de *triple-negative breast cancer*) es una subclase dentro del subtipo basal, y es considerado agresivo en cuanto a la dificultad de encontrar moléculas blanco para dirigir y efectuar el tratamiento.

Actualmente existen diferentes terapias para combatir el CM, entre ellas la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, hormonoterapia y terapia dirigida. Sin embargo, muchas de ellas involucran tratamientos agresivos y/o la administración de fármacos altamente tóxicos e inespecíficos, lo que conduce a un deterioro general

de la condición del paciente. Es aceptado plenamente que la mejor forma de afrontar la batalla contra el cáncer es atacándolo desde distintos ángulos, usando terapias y tratamientos sinérgicos en los que se combina la acción simultánea de diferentes agentes antitumorales. En este sentido, la nanotecnología ofrece la posibilidad de no sólo mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico de drogas, sino también promover la acumulación selectiva del compuesto activo en el tumor, reduciendo los efectos adversos indeseados.

1.3. Nanopartículas de uso terapéutico: métodos de obtención y caracterización

En los últimos años, se han obtenido diferentes tipos de nanopartículas para la vehiculización de compuestos activos farmacéuticos. Desde el punto de vista de su composición química, las nanopartículas pueden ser orgánicas o inorgánicas. A su vez, estos grupos incluyen sistemas de nanopartículas que pueden clasificarse en (i) nanopartículas poliméricas, (ii) nanopartículas basadas en lípidos, (iii) conjugados, (iv) nanopartículas virales, (v) nanopartículas inorgánicas, entre otras (**Figura 1**).

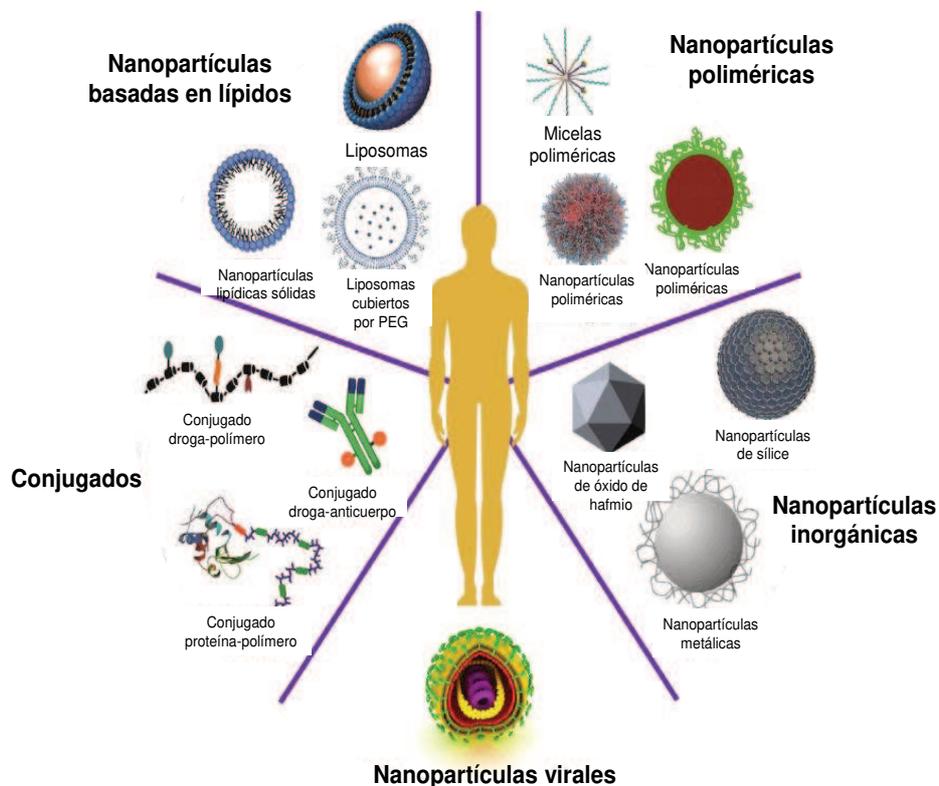


Figura 1. Tipos de nanopartículas de uso terapéutico, y ejemplos de cada tipo. Figura modificada de Aghebati-Maleki y col. (2020) [16].

La producción de nanopartículas puede llevarse a cabo mediante diversas metodologías dependiendo principalmente de la naturaleza de los materiales de partida y la aplicación deseada. En general, estas técnicas pueden ser clasificadas en dos grupos: de arriba hacia abajo (*top-down*) y de abajo hacia arriba (*bottom-up*) dependiendo del enfoque fisicoquímico en cuestión [17]. Los métodos *top-down* implican la ruptura o disgregación de sólidos o líquidos (desde partículas grandes a partículas más pequeñas) mediante la aplicación de esfuerzos mecánicos, incluyendo procesos como molienda, trituración, homogeneización y extrusión. Son ampliamente utilizados, pero presentan algunas limitaciones inherentes a la complejidad del equipamiento requerido, y a las dificultades en la obtención de partículas con propiedades estructurales definidas. Además, las fuerzas mecánicas aplicadas pueden causar degradación de los compuestos a incorporar en las nanopartículas. Por otro lado, los métodos *bottom-up* implican la construcción de nanopartículas por autoensamblaje o autoorganización de moléculas debido a cambios en las condiciones ambientales, tales como el pH, fuerza iónica, temperatura o concentración. Los ejemplos más comunes son la desolvatación, la coacervación y la formación de complejos. En general, los requerimientos de energía son menores que los requeridos en estrategias *top-down* y es posible tener mayor control sobre el tamaño, morfología y estado físico de las partículas [17].

Mediante métodos *bottom-up* es posible obtener nanopartículas biopoliméricas, formadas por la autoasociación o autoensamblaje de uno o más biopolímeros a partir de una solución acuosa de los mismos. Para esto, las condiciones de la solución son alteradas de forma tal que las interacciones biopolímero-biopolímero sean favorecidas por sobre las interacciones biopolímero-solvente [18].

Por otro lado, la caracterización fisicoquímica de nanopartículas es importante ya que permite inferir sobre su estabilidad y perfil de distribución en el organismo. Entre las características comúnmente evaluadas se encuentran el tamaño, carga eléctrica, morfología, propiedades térmicas, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de compuesto activo. Las técnicas utilizadas para caracterizar adecuadamente las nanopartículas se detallan a continuación.

Tamaño. El tamaño de las nanopartículas determina en gran parte su biodistribución al ser aplicadas en un organismo. Puede ser determinado mediante métodos de dispersión de luz estática (SLS) y dinámica (DLS) o por diferentes técnicas microscópicas. En general, se determina por SLS el tamaño de nanopartículas de mayor tamaño ($d > 200$ nm) [19], mientras que DLS se emplea para nanopartículas más pequeñas ($d < 3.000$ nm) [17]. Por DLS se mide el tamaño en

términos del diámetro hidrodinámico de las partículas, estando las mismas en solución. Por otro lado, pueden emplearse métodos microscópicos, como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Sin embargo, las técnicas microscópicas no constituyen un método adecuado para medir con precisión el tamaño de nanopartículas, sino que sólo se obtiene una estimación.

Morfología. La forma de las nanopartículas y características morfológicas pueden ser observadas mediante las técnicas microscópicas anteriormente mencionadas. Tanto TEM como SEM son técnicas de microscopía de gran resolución, que utilizan electrones que inciden en la muestra [20]. En el caso de TEM, los electrones atraviesan la muestra y la detección de estos se realiza mediante un detector colocado en forma posterior a la muestra, por lo que esta técnica brinda información acerca de la estructura interna de las nanopartículas. Por su parte, en SEM, los electrones son transmitidos y detectados a cierto ángulo, brindando información sobre la porosidad, entrecruzamiento y textura de las nanopartículas. Por otro lado, AFM brinda información superficial puesto que la imagen se genera mediante la medición de la interacción de un *tip* montado en un cantilever que recorre la superficie de la muestra, previamente colocada y secada al vacío sobre un disco de mica.

Carga eléctrica. Las nanopartículas poseen cierta carga neta superficial por lo que en solución se rodean de iones de carga opuesta, formándose una doble capa eléctrica. La medida del potencial de esta doble capa se denomina potencial ζ , y es determinado mediante la aplicación de un campo eléctrico y el análisis de la movilidad electroforética de las partículas. Por lo tanto, el potencial ζ constituye un parámetro que se informa como medida de la carga eléctrica, y depende de la fuerza iónica y del pH del medio. Debido a que la carga neta superficial influye en la agregación de las nanopartículas, el potencial ζ permite estimar la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Si la carga neta es lo suficientemente grande, habrá repulsión electrostática entre las nanopartículas impidiendo su agregación. En general, es aceptado que nanopartículas con un potencial ζ de ± 30 mV poseen muy elevada estabilidad coloidal.

Propiedades térmicas. El conocimiento de las propiedades térmicas de las nanopartículas permite no sólo inferir acerca de la composición de la nanopartícula, sino también determinar su estabilidad y condiciones de almacenamiento [20]. Para analizar las propiedades térmicas de nanopartículas biopoliméricas se emplea frecuentemente la técnica calorimetría diferencial de barrido (DSC). Particularmente,

para nanopartículas proteicas, mediante DSC es posible detectar transiciones y temperaturas de desnaturalización térmica de las proteínas que las componen.

Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga. La eficiencia de encapsulación (EE) indica el porcentaje de compuesto activo que ha sido incorporado en las nanopartículas, con respecto al total agregado. Por su parte, la capacidad de carga (LC) expresa la cantidad de compuesto activo incorporado por miligramo de nanopartículas, resultando útil en términos de formulación y establecimiento de dosis. En general, EE y LC dependen tanto de la naturaleza del compuesto activo como de la técnica utilizada para la producción de nanopartículas [20]. La determinación de EE y LC se realiza en forma indirecta, efectuando en primer lugar la separación del compuesto encapsulado en las nanopartículas y el compuesto libre, para luego cuantificar el compuesto libre.

1.4. Albúmina sérica bovina

La albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) es la proteína más abundante del suero bovino. Es una proteína globular de 65,5 kDa, muy soluble en agua, y con un punto isoeléctrico de alrededor de 4,7 en agua a 25°C [21].

La proteína consiste en un monómero de 585 aminoácidos, con una estructura terciaria que se asemeja a la forma de un corazón. Por cristalografía de rayos X puede observarse que la estructura secundaria de BSA es predominantemente α -helicoidal (67%), siendo los dominios restantes una mezcla de regiones flexibles entre subdominios, no presentando hojas plegadas β ni glucosilaciones (**Figura 2**). La estructura terciaria de BSA posee 3 dominios homólogos principales: I, II y III, compuestos por 10 α -hélices cada uno. Cada dominio se encuentra compactado en dos subdominios, A y B, con 4 o 5 α -hélices cada uno [22].

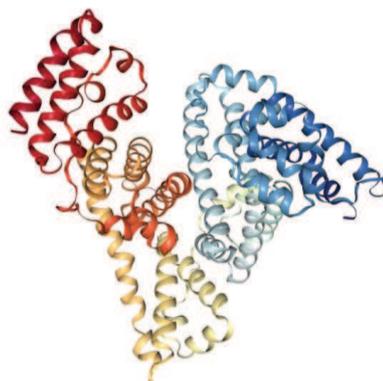


Figura 2. Estructura cristalográfica de BSA. Imagen creada con Protein Data Bank (PDB), ID 3V03 [22] utilizando NGL Viewer [23] y RCSB PDB [23].

En cuanto a su composición de aminoácidos, BSA presenta un bajo contenido de triptófano (Trp) y metionina (Met), con un alto contenido en cisteína (Cys) y aminoácidos cargados, como los ácidos glutámico (Glu) y aspártico (Asp), lisina (Lys) y arginina (Arg). La proteína posee en total 35 residuos Cys formando 17 puentes disulfuro intramoleculares que le confieren una relativa estabilidad, presentando un grupo –SH libre en la Cys₃₄.

BSA presenta una alta homología estructural con su contraparte humana, la albúmina sérica humana (HSA, por su nombre en inglés: *Human Serum Albumin*), presentando un 76% de identidad de secuencia (**Figura 3**) por lo que sus estructuras tridimensionales son consideradas similares [25]. Debido a su origen endógeno, HSA es considerada segura para la administración en humanos, y, en consecuencia, BSA es generalmente usada como modelo para investigación y desarrollo mientras que HSA es la proteína que finalmente está presente en el producto.

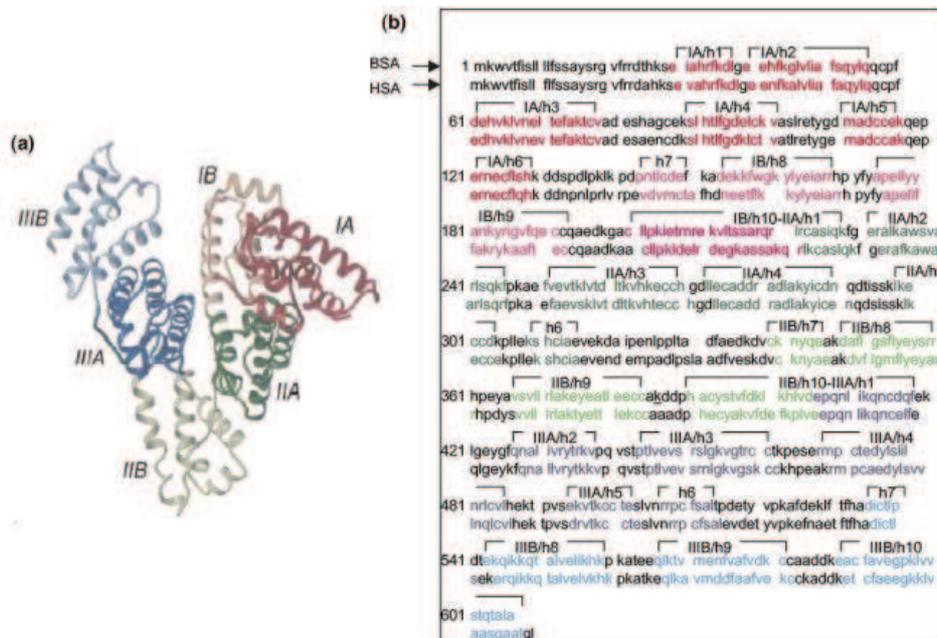


Figura 3. Estructura tridimensional y dominios de HSA (a) y comparación de secuencia aminoacídica entre HSA y BSA (b). Figura modificada de Huang y col., 2004 [25].

Tanto BSA como HSA han sido ampliamente estudiadas en términos de su estructura, estabilidad, unión a ligandos y cambios conformacionales en diferentes condiciones, tales como pH del medio acuoso, temperatura, fuerza iónica y presencia de agentes desnaturizantes. Las transiciones conformacionales y estructurales de BSA más conocidas y caracterizadas son aquellas que se producen por influencia de cambios en el pH y la temperatura.

En solución acuosa, BSA se ve sometida a isomerizaciones conformacionales reversibles producidas por cambios de pH (**Figura 4**) [26], [27]. Dentro del rango de

pH 4,5-7,0, BSA se encuentra en su conformación más estable, llamada normal o *forma N*, que es globular y tiene forma de corazón. A medida que disminuye el pH por debajo de 4,0, ocurre una transición a la forma de migración rápida (*forma F*, del inglés *fast*) [28], la cual se caracteriza por presentar mayor viscosidad y volumen, menor solubilidad y una pérdida significativa en el contenido de α -hélices [29]. A valores de pH menores a 3,5, ocurre otra transición hacia la forma expandida o *forma E*, con menor contenido de α -hélice y conformación más extendida. Por otro lado, cuando el pH incrementa hasta valores comprendidos en el rango 8,0-9,0, BSA se despliega adoptando la conformación básica o *forma B* que se caracteriza por una pérdida de rigidez conformacional y aumento de la afinidad de unión a ligandos. Finalmente, a valores de pH superiores a 9,0 y luego de 3-4 días ocurre otra transición hacia la llamada forma envejecida o forma A (por *aged-form*). Adicionalmente, se reportó un estado conocido como *molten globule* a valores de pH cercanos a 11,2 [30], en el cual la proteína se encontraría en una conformación extendida y flexible, con una gran exposición de superficies hidrofóbicas.

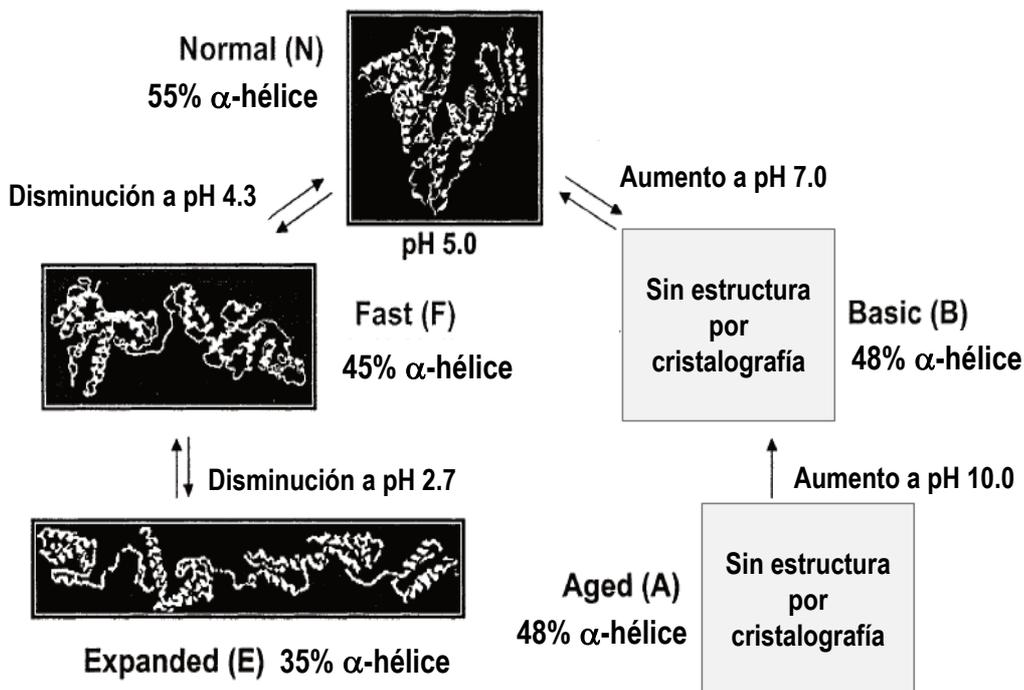


Figura 4. Relación entre las conformaciones pH-dependientes de BSA. Figura modificada de Pereira y col., 2003 [29].

Con respecto a la influencia de la temperatura, es bien conocido que BSA sufre cambios conformacionales y estructurales al ser sometida a tratamiento térmico [31]. A medida que se incrementa la temperatura por encima de 40°C, la estructura de BSA se despliega siendo estos cambios reversibles en el rango de 42-50°C [32]. Los cambios de naturaleza irreversible comienzan a temperaturas en el rango 52-60°C,

donde ocurre fundamentalmente una disrupción de la estructura α -hélice de la proteína junto con la aparición de elementos de cadena β extendida. A temperaturas por encima de 60°C, el desplegamiento de BSA y la consecuente aparición de cadenas β lleva a un proceso de agregación térmica, llamado frecuentemente β -agregación, ya que se postula que la formación de puentes de hidrógenos entre las cadenas β tendría una contribución fundamental en el proceso [33]. Mediante estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se ha determinado que la temperatura de desnaturalización de BSA a pH fisiológico (7,4) es de alrededor de 65°C [34].

La función fisiológica más importante de BSA es mantener la presión oncótica y el pH sanguíneo, siendo el principal regulador de la distribución de fluidos entre los compartimientos del cuerpo. Además, es capaz de unir y transportar una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos, incluyendo ácidos grasos, metales, aminoácidos, esteroides y drogas [35]. Esta capacidad de unión de compuestos de naturaleza lipofílica ha sido explotada en las últimas décadas para el desarrollo de estructuras biocompatibles para el transporte y liberación controlada de drogas. Dado que la afinidad de unión afecta la velocidad a la que se libera un fármaco en sitios de catabolismo o acción farmacológica, el estudio de unión de fármacos con albúminas séricas es de gran importancia en el campo de la farmacología y farmacodinámica. Por esta razón, en las últimas décadas se ha estudiado la unión de BSA y HSA a una amplia variedad de ligandos naturales y sintéticos. Al respecto, se conoce que las albúminas séricas tienen dos sitios de unión, el sitio I y el sitio II, que se encuentran en los subdominios IIA y IIIA, respectivamente. Aunque difieren en sus afinidades, parecen ser homólogos tanto en BSA como en HSA [36]. El sitio I es espacioso y la unión de ligandos está predominantemente mediada por interacciones hidrofóbicas; mientras que el sitio II es más pequeño, y la unión a este sitio a menudo se ve fuertemente afectada por la estereoselectividad, involucrando una combinación de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Se ha estudiado y caracterizado mediante técnicas espectroscópicas la interacción de BSA y HSA con pequeñas moléculas de fármacos tales como gemcitabina, 5-fluorouracilo, diazepam, ibuprofeno, cisplatino y otros [37], [38], [39]. Además, ha habido un interés especial en el estudio de la interacción con compuestos bioactivos naturales como los polifenoles, principalmente flavonoides [40], [41]. Entre las técnicas espectroscópicas utilizadas, a menudo se utilizan mediciones de fluorescencia intrínseca para obtener constantes de afinidad de unión y parámetros termodinámicos. Al respecto, se conoce que BSA tiene dos residuos Trp (Trp₁₃₅ y Trp₂₁₂) mientras que HSA tiene solo uno (Trp₂₁₄) ubicado en el subdominio IIA. Debido a su ubicación, generalmente se asume

que el microambiente fisicoquímico de Trp₂₁₂ en BSA es similar al de Trp₂₁₄ en HSA. La información concerniente a la unión de estas proteínas a diferentes ligandos es importante en términos de capacidad de carga de las estructuras basadas en albúmina sérica utilizadas para la administración de fármacos.

1.5. Nanopartículas basadas en proteínas: albúminas séricas

Las proteínas se encuentran entre los biopolímeros más utilizados en la producción de nanopartículas de uso terapéutico, debido a que presentan una elevada tasa de absorción, biocompatibilidad con el organismo humano y sus productos de degradación son inocuos. Ejemplos de ellas son la gelatina, el colágeno, la caseína, y las albúminas.

Las proteínas globulares que pertenecen a la familia de las albúminas resultan atractivas para la vehiculización de compuestos bioactivos lipofílicos ya que presentan la propiedad intrínseca de unir, transportar y/o vehiculizar este tipo de compuestos bajo la forma de complejos proteína-ligando, una propiedad que posiblemente esté vinculada con una función biológica [42], [43], [44], [45]. También son capaces de unir ligandos cargados positiva o negativamente mediante interacciones electrostáticas, debido que poseen un alto contenido de aminoácidos cargados (por ejemplo, Lys, Arg, Asp y Glu) [43], [46]. Otra ventaja que presentan es que se encuentran disponibles en diversas fuentes como en la clara de huevo (ovoalbúmina), la leche (lactoalbúminas), suero (albúminas séricas) y también en legumbres como la soja.

Dado su origen sérico, las nanopartículas de albúminas séricas se han empleado especialmente para la vehiculización de compuestos bioactivos y fármacos de administración parenteral. Adicionalmente, otras ventajas que presentan estos sistemas son sus métodos de preparación sencillos y reproducibles, y la presencia de grupos reactivos (tiol, amino y grupos carboxílicos) sobre sus superficies, los que pueden usarse para la conjugación de fármacos, ligandos o para realizar alguna otra modificación química [46].

Entre los métodos más comunes para la producción de nanopartículas de albúminas de uso terapéutico se encuentran la emulsificación y desolvatación. La emulsificación involucra la formación de emulsiones utilizando aceite como fase dispersa o a través de homogeneizadores de alta presión. Por su parte, en el método de desolvatación o coacervación se utiliza un solvente como etanol o acetona, para separar la proteína y suele emplearse glutaraldehído como agente entrecruzante a fin de estabilizar las nanopartículas. En 2005, la Administración de Drogas y Alimentos

(FDA) en EE.UU. aprobó la comercialización de nanopartículas de albúmina que vehiculizan paclitaxel bajo el nombre comercial Abraxane, para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Esta tecnología, conocida en inglés como *nanoparticle albumin-bound* o *nab-technology*, consiste agregar gota a gota una suspensión de la droga a encapsular a una dispersión acuosa de albúmina pre-saturada con cloroformo para luego formar una nanoemulsión utilizando un homogeneizador de alta presión. Además de los mencionados, existen otros métodos, como el método de autoensamblaje, gelificación térmica, y secado por nanoaspersión, que son menos comunes. En general, los métodos utilizados emplean solventes y reactivos potencialmente tóxicos (por ejemplo, el glutaraldehído), que luego deben ser eliminados.

En los últimos años, se han obtenido nanopartículas de albúmina sérica, tanto de origen humano (HSA) como bovino (BSA), las que han mostrado muchas ventajas como vehículo natural, biocompatible y biodegradable [47]. Se han utilizado diferentes métodos para la producción de nanopartículas tanto de BSA (**Tabla 1**) como HSA (**Tabla 2**) aplicadas a la vehiculización de una amplia variedad de drogas citotóxicas y compuestos bioactivos naturales con actividad antitumoral.

Tabla 1. Ejemplos de nanopartículas de BSA para la vehiculización de compuestos activos antitumorales, presentados en orden cronológico.

| Método | Material complementario | Efecto | Compuesto activo | Características reportadas | Ref. |
|----------------|--------------------------|--|---------------------------|--|------|
| Desolvatación | Ninguno | Liberación controlada | 5-fluoruracilo | Tamaño: 210 nm EE= 27,5-30,0% | [48] |
| Autoensamblaje | Octaldehído | Aumento de solubilidad acuosa. | Paclitaxel | Tamaño: 160-180 nm EE = 90,5% | [49] |
| Conjugación | Dextrano | Disminución de toxicidad | Doxorubicina | Tamaño: 90 nm EE=74,4-97,2% | [50] |
| Desolvatación | Folato | Aumento de la solubilidad acuosa. Direccionamiento hacia célula tumoral. | Paclitaxel | Tamaño: 210 nm EE = 95,3% | [51] |
| Desolvatación | Ninguno | Aumento de la solubilidad acuosa y biodisponibilidad. | Curcumina | Tamaño: 200 nm EE = 86,42% | [52] |
| Desolvatación | Folato Glutaraldehído | Liberación controlada y sostenida. Actividad citotóxica (apoptosis) sobre células MCF-7. | Bexaroteno | Tamaño:195,3 nm EE = 65,45% LC = 1,73% | [53] |
| Desolvatación | Ninguno | Aumento de citotoxicidad y estabilidad térmica. | Catequina Epicatequina | Tamaño: 45-48 nm EE = 54,5-60,5% | [54] |

| | | | | | |
|-----------------------------|------------------------------|---|-------------------------|---|------|
| Nab-technology | Paclitaxel | Aumento de la solubilidad acuosa. | Curcumina | Tamaño: 250 nm EE = 88,6-96,5%, | [55] |
| Desolvatación | Quitosano | Reducción del daño oxidativo celular y expresión de proteína pro-apoptótica en ratones | Polifenoles de té verde | Tamaño: 285-2942 nm EE = 25,7-26,1% | [56] |
| Desolvatación | Ninguno | Liberación estímulo-respuesta (redox) | Cisplatino | Tamaño: 83 nm EE~100% | [57] |
| Desolvatación modificada | Ácido fólico | Incremento de actividad citotóxica | Curcumina (análogo) | Tamaño:146-198 nm EE = 78% | [58] |
| Desolvatación y conjugación | Ácido fólico | Aumento de biocompatibilidad y citotoxicidad | Crisina | Tamaño: 127 nm | [59] |
| Desolvatación | Ninguno | Liberación sostenida. Aumento de citotoxicidad sobre células tumorales | Crisina | Tamaño: 97,5 nm | [60] |
| Coacervación | Ninguno | Aumento de la solubilidad acuosa. Aumento de citotoxicidad. | Curcumina | Tamaño: 92 nm EE = 78,12% | [61] |
| Desolvatación y conjugación | Ácido fólico | Incremento de la actividad antitumoral (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) | Ginsenoside Rg5 | Tamaño: 201,4 nm EE = 74% DL= 64 % | [62] |
| Nanogeles Core-shell | Ácido fólico Amilopectina | Resistencia a la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> . Incremento de la captación celular. Inducción de apoptosis. | Curcumina | Tamaño: 89,5-105,6 nm EE = 100% | [63] |
| Precipitación anti-solvente | Paclitaxel | Internalización en células. Combinación sinérgica de la actividad de ambos fármacos. | Resveratrol | Tamaño: 150 nm EE = 98,24% LC = 1,54% | [64] |

Tabla 2. Ejemplos de nanopartículas de HSA para la vehiculización de compuestos activos antitumorales, presentados en orden cronológico.

| Método | Material complementario | Efecto | Compuesto activo | Características reportadas | Ref. |
|----------------|-------------------------|--|------------------|-------------------------------------|------|
| Nab-technology | Ninguno | Aumento de la solubilidad acuosa y biodisponibilidad | Paclitaxel | Tamaño: 130 nm | [65] |
| Desolvatación | Ninguno | Aumento de la solubilidad acuosa y de la actividad antitumoral | Doxorubicina | Tamaño: 150-500 nm EE > 95% | [66] |
| Nab-technology | Ninguno | Aumento de la solubilidad acuosa. Acumulación en tumores (<i>in vivo</i>). | Curcumina | Tamaño: 130-150 nm LC= 3,1-14,1% | [67] |

| | | | | | |
|--|--|---|--------------|---|------|
| Autoensamblaje Conjugación | Péptido RGD Polietilenglicol (PEG) | Direccionamiento hacia tumor. Aumento de la captación y retención en células de melanoma humano. | Doxorubicina | Tamaño: 30 nm LC= 56,2-62,3% | [68] |
| Desolvatación | Ninguno | Direccionamiento activo | Plásmido | Tamaño: 200-220 nm | [69] |
| Desolvatación | Ninguno | Incremento de la solubilidad acuosa, selectividad y citotoxicidad. | Fisetina | Tamaño: 220 nm EE = 84% | [70] |
| Emulsificación Desolvatación Conjugación | Folato | Liberación controlada, incremento del tiempo de retención <i>in vivo</i> . | Curcumina | Tamaño: 165,6 nm EE = 88,7% LC = 7,9% | [71] |
| Desolvatación Entrecruzamiento | Peptido RGD Polietilenglicol (PEG) | Aumento de captación celular y tiempo de circulación. Efectos citotóxicos (apoptosis). | Resveratrol | Tamaño: 120 nm EE = 62,5% | [72] |
| Desolvatación | Aceite de oliva Glutaraldehído | Aumento de la captación celular y de la citotoxicidad | Curcumina | Tamaño: 169 nm | [73] |
| Nab-technology | Ácido oleico | Aumento de la captación celular y citotoxicidad. | Gefitinib | Tamaño: 138,6 nm EE = 85% LC = 6% | [74] |
| Desolvatación | Aptámero HER-2 | Aumento de solubilidad acuosa y estabilidad. Liberación sostenida. | Curcumina | Tamaño: 281,7 nm EE = 71% LC = 3,4% | [75] |
| Desolvatación Conjugación | Folato | Aumento de citotoxicidad, captación celular y tiempo de retención. | Artemether | Tamaño: 198 nm EE = 77% LC = 6% | [76] |

Como puede observarse en las tablas, las nanopartículas de BSA y HSA permitieron mejorar ciertas propiedades del compuesto activo, como su solubilidad en agua, captación e internalización celular, tiempo de circulación y retención, y el aumento de su actividad citotóxica sobre células tumorales, en algunos casos, sin ejercer efecto sobre células normales. Además, en los últimos años se ha evaluado la incorporación de otros materiales complementarios de la matriz de la nanopartícula, como polisacáridos (dextrano, quitosano, etc.) y ligandos superficiales. Los ligandos como el ácido fólico, péptidos y aptámeros permiten el direccionamiento activo de las nanopartículas hacia el tumor, mientras que la adición de moléculas de polietilenglicol (PEG) permite la evasión del reconocimiento por parte del sistema inmune. Esta última modificación es de relevancia principalmente en nanopartículas de BSA, dado su origen bovino.

A partir de las tablas puede deducirse que el método más utilizado para la obtención de nanopartículas de albúmina sérica es la desolvatación. Por lo tanto, el estudio de nuevos métodos de obtención de nanopartículas a partir de albúminas constituye un área de vacancia, de interés en el ámbito científico-tecnológico.

1.6. Compuestos lipofílicos naturales con propiedades antitumorales: flavonoides

Desde la antigüedad se han utilizado extractos de plantas medicinales para prevenir o tratar ciertas enfermedades. Los beneficios terapéuticos de estos extractos fueron atribuidos a la presencia de ciertos compuestos bioactivos [77]. En particular, se conoce que ciertos compuestos del metabolismo secundario de plantas (fitoquímicos) presentan actividad antitumoral. Esto se ve reflejado en la menor incidencia de cáncer de próstata, colon y mama en los países asiáticos, donde el consumo de frutas, vegetales, te y hierbas es elevado, en comparación con los países occidentales [78].

En base a esto, en las últimas décadas ha habido un interés especial en estudiar el potencial rol terapéutico de compuestos fitoquímicos en la prevención y tratamiento del cáncer. En este sentido, se define a la quimioprevención del cáncer como una intervención farmacológica utilizando compuestos sintéticos o naturales que pueden prevenir, inhibir o revertir la carcinogénesis [77]. Esta acción preventiva podría incluir un efecto de reversión de lesiones preneoplásicas, impidiendo el desarrollo de una neoplasia maligna y posterior cáncer invasivo. En general, a pesar de su elevado metabolismo, se asume que los compuestos naturales son más seguros que los compuestos sintéticos debido a su presencia en diversos alimentos, y a su amplia disponibilidad y tolerabilidad. Otra ventaja que presentan es la ausencia de efectos adversos indeseados, en comparación con los producidos por los fármacos citotóxicos utilizados en las terapias actuales contra el cáncer [79].

Dentro de los fitoquímicos conocidos, se encuentran los compuestos fenólicos, entre los que se destacan los flavonoides por poseer múltiples actividades biológicas promotoras de la salud. Los flavonoides están presentes naturalmente en plantas comestibles, incluyendo frutas, vegetales, legumbres, hierbas y especias, por lo que constituyen una parte integral de la dieta humana [77]. Poseen una estructura química de benzo- γ -pirano, con un esqueleto básico de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) constituido por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un puente de 3 átomos de carbono que puede formar o no un heterociclo C (pirano) [77], [79] (Figura 5).

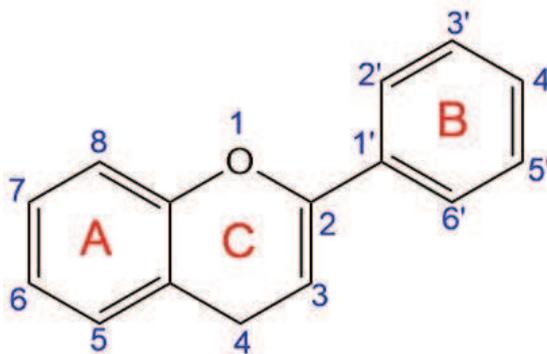


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides. Elaboración utilizando ChemDraw Professional (PerkinElmer, 2017).

En las plantas, la base estructural de estos compuestos deriva de dos vías biosintéticas diferentes: la vía del ácido shikímico y la vía del acetato-malonato [80], derivándose más de 4.000 estructuras de flavonoides [77]. Dependiendo del grado de oxidación del anillo C, la posición en la que se une el anillo B al anillo C y la presencia de sustituyentes en los anillos A y B, los flavonoides pueden ser clasificados en subclases que incluyen antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, flavanoles, isoflavonas y chalconas y derivados glucosilados (**Figura 6**) [79]. En la mayoría de estos compuestos, las posiciones 5 y 7 del anillo A, 3', 4' y 5' del anillo B, y las posiciones 3 y 2 del anillo C son reemplazadas por grupos hidroxilo.

En las plantas, los flavonoides están presentes principalmente en forma de glucósidos, unidos a azúcares de 5 o 6 átomos de carbono, cumpliendo en ellas funciones de protección frente a la luz UV y defensa contra organismos fitopatógenos. La forma glucosilada es relativamente hidrofílica lo que le confiere cierta solubilidad en agua, mientras que la forma libre (aglicona) es altamente hidrofóbica.

Los flavonoides presentan múltiples efectos biológicos beneficiosos sobre la salud, incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antidiabética, antiviral, antibacteriana, antitumoral, protección vascular y cardíaca, entre otras [80], [77], [81]. Muchos estudios también han reportado propiedades notables y significativas de los flavonoides como agentes anticancerígenos y/o quimiopreventivos, sugiriendo una correlación positiva entre un menor riesgo de cáncer y una dieta basada en flavonoides [81].

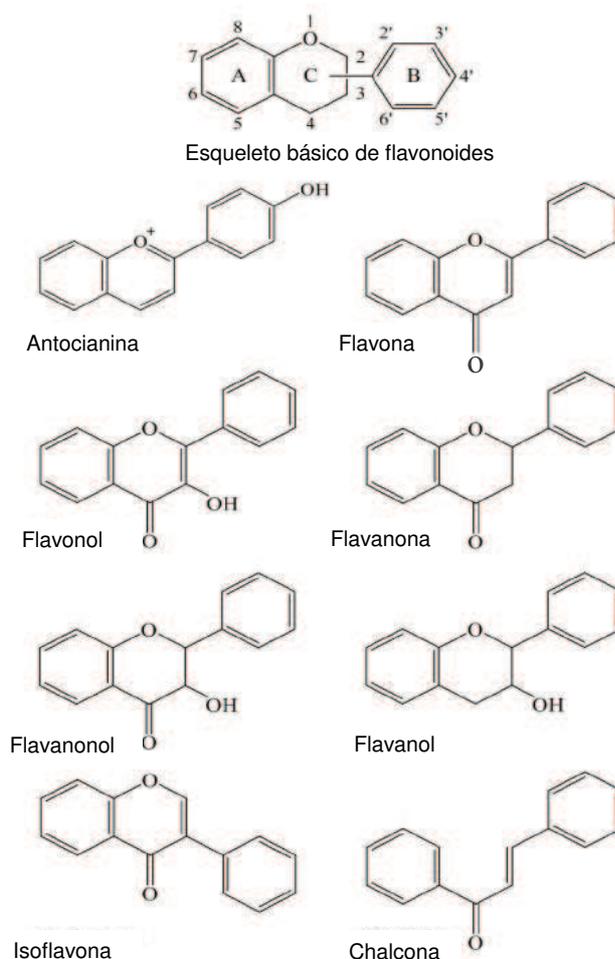


Figura 6. Estructura básica de subclases de flavonoides. Figura modificada de Kikuchi y col., (2019) [79].

Ciertos flavonoides como las flavonas e isoflavonas han recibido particular atención ya que se les atribuye un rol de protección frente al cáncer de mama [78]. Entre ellos, la flavona Cris y la isoflavona Gen han mostrado actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de mama (*in vitro*) y reducción de tumores (*in vivo*).

Entre los mecanismos antitumorales de los flavonoides, se destacan la inhibición de la actividad de enzimas quinasas involucradas en la regulación del ciclo celular (principalmente serina-treonina y tirosina quinasas), actividad antiproliferativa sobre células tumorales, inducción de apoptosis, inhibición de la angiogénesis y acción sobre otros factores que contribuyen a la migración de células tumorales e invasión de tejidos produciendo metástasis [78]. Además, los flavonoides han mostrado actividad citotóxica hacia diversas células cancerosas humanas con poco o nulo efecto sobre células normales. Por lo tanto, existe un interés en el desarrollo de potenciales agentes quimiopreventivos y quimioterápicos basados en flavonoides para la prevención y/o tratamiento del cáncer [82], [83].

1.7. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de flavonoides

El efecto beneficioso de los flavonoides presentes en la dieta dependerá en gran parte de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad en el cuerpo una vez ingeridos. La bioaccesibilidad se refiere a la fracción de compuesto activo que es capaz de liberarse de la matriz alimentaria y atravesar la barrera intestinal. Por su parte, la biodisponibilidad implica la absorción del compuesto, llegando a la circulación sistémica, para luego acceder al sitio diana y ejercer su función [84]. Por lo tanto, estos factores deben tenerse en cuenta en cualquier interpretación del potencial efecto sobre la salud de los flavonoides, así como también en el diseño de estrategias para mejorar su administración.

Al encontrarlos en una gran variedad de alimentos, los flavonoides son parte de la dieta humana, estimándose que su consumo es de aproximadamente 1 g por día [81]. Sin embargo, en plasma y tejidos corporales están presentes en cantidades muy por debajo de los niveles requeridos para que resulten en niveles farmacológicamente significativos. Esto es debido en gran parte a ciertas características de su metabolismo.

Luego de ser ingeridos, los glucósidos de flavonoides presentes en los alimentos son hidrolizados a sus respectivas agliconas por la microflora intestinal o colónica antes de su absorción en el tracto gastrointestinal [80], [79]. Una vez absorbidos, los flavonoides son metabolizados mediante reacciones de conjugación, principalmente por glucuronidación y por sulfatación. Esta conjugación ocurre primero en el intestino delgado y los conjugados son transportados al hígado, donde se metabolizan aún más. Los metabolitos producidos junto con los flavonoides que no son absorbidos (tanto glucósidos como agliconas) pueden ser excretados por vía biliar o urinaria. Los conjugados de mayor tamaño son preferentemente eliminados en la bilis, mientras que los conjugados pequeños como los monosulfatos son excretados en la orina [80]. Cuando se excretados por vía biliar, los flavonoides pasan al duodeno y son metabolizados por bacterias intestinales, lo que resulta en su fragmentación y/o hidrólisis. Los metabolitos resultantes pueden ser reabsorbidos y entrar en un ciclo enterohepático o ser excretados por heces (**Figura 7**). Por lo tanto, su elevado metabolismo y baja absorción limitan la biodisponibilidad de los flavonoides.

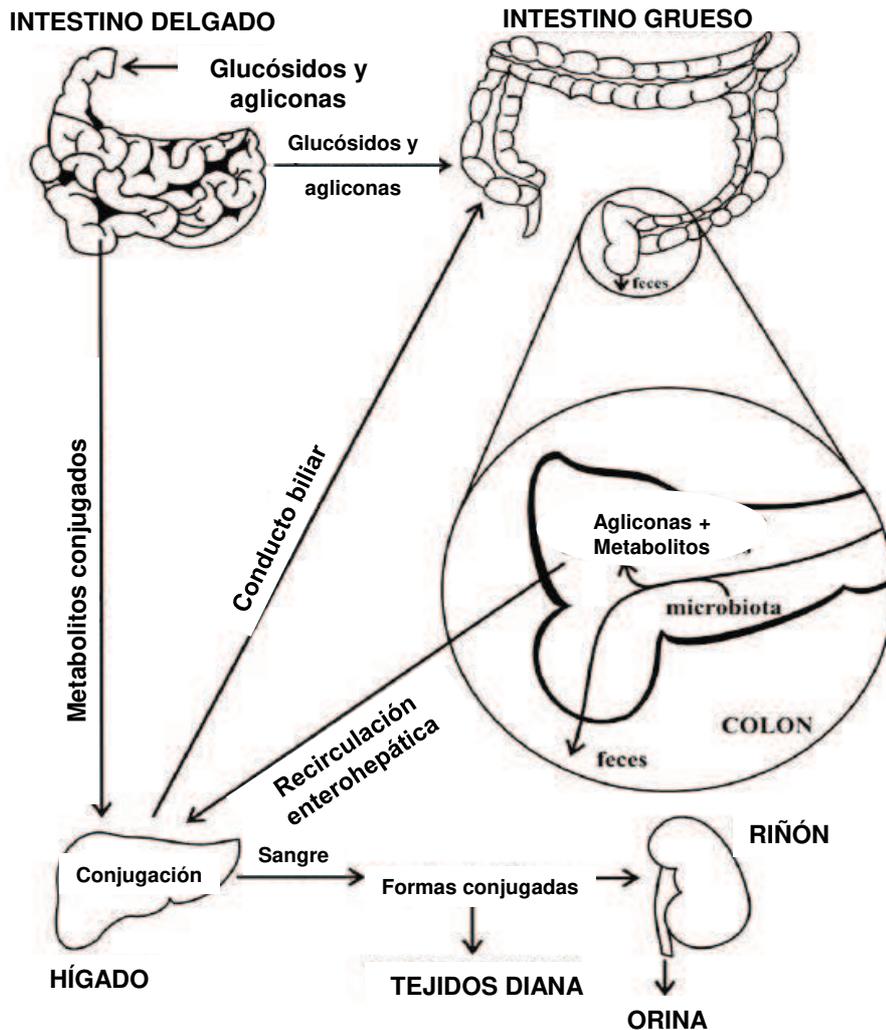


Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de los flavonoides. Figura modificada de Cazarolli y col. (2017) [80].

Por otro lado, la administración de flavonoides por otras vías tiene como principal obstáculo la baja solubilidad en medio acuoso que presentan estos compuestos en su forma aglicona. Además, se conoce que son susceptibles a ser modificados por factores ambientales, como la temperatura, el pH y la luz [85]. Por lo tanto, se requieren estrategias que permitan solucionar problemas de insolubilidad (mejorando la biodisponibilidad del bioactivo), aumentar su estabilidad química y su protección contra la biodegradación y rápida excreción. En este sentido, la nanotecnología ofrece la posibilidad de vehicular flavonoides e incorporarlos en matrices acuosas, controlando parámetros que inciden en su aplicación como promotores de la salud.

1.8. Factores que afectan a la biodistribución y biodisponibilidad de nanopartículas en aplicaciones contra el cáncer

Para el desarrollo de sistemas de vehiculización de drogas y compuestos de interés terapéutico es de gran importancia el estudio de las interacciones entre las nanopartículas y los sistemas biológicos (interacciones *nano-bio*) [86]. Asimismo, considerar los parámetros fisicoquímicos de las nanopartículas que influyen sobre su biodistribución y biodisponibilidad dentro de un organismo. Resulta de particular interés, para el diseño de nanopartículas utilizadas en terapias contra el cáncer, conocer las relaciones entre estas propiedades y las características biológicas propias de la patología a fin de lograr la acumulación preferencial de las nanopartículas en tumores.

Las formas de administración más frecuentes de las nanopartículas de uso terapéutico son la vía oral y parenteral. Las nanopartículas administradas por vía oral deben presentar estabilidad bajo condiciones de digestión gastrointestinal a la vez que deben ser capaces de atravesar el epitelio intestinal para alcanzar la circulación sistémica [87]. Por su parte, la administración parenteral constituye la vía más directa para la administración de nanopartículas.

Una vez en la circulación sistémica, las nanopartículas deben atravesar ciertas barreras biológicas para acceder al sitio donde ejercerán su acción. En general, el objetivo que se persigue es lograr que las nanopartículas tengan un tiempo de vida media en circulación prolongado, de manera tal de permitir un mayor tiempo de residencia, favoreciendo la interacción con el sitio diana. En el caso de las nanopartículas aplicadas en terapias contra el cáncer, el sitio diana es el tumor, pudiéndose distinguir 3 etapas en la vehiculización hacia tumores: (i) circulación sistémica e interacción con el sistema fagocítico mononuclear (SFM), (ii) extravasación hacia el tumor, (iii) interacción con la célula diana [88] (**Figura 8**).

En la primera etapa, para que las nanopartículas puedan permanecer un mayor tiempo presentes en el torrente sanguíneo deben evadir la eliminación renal, el reconocimiento por parte de componentes del sistema inmunológico y la captación hepática. El límite de tamaño para la filtración en el riñón es de entre 5 nm y 20-30 nm [88], [89], [87]. Además, las nanopartículas en circulación son susceptibles a ser opsonizadas, es decir, cubiertas por proteínas séricas (albúmina, fibrinógeno, inmunoglobulinas, apolipoproteínas, etc.) que se absorben a la superficie, formando lo que se denomina *corona proteica* [16].

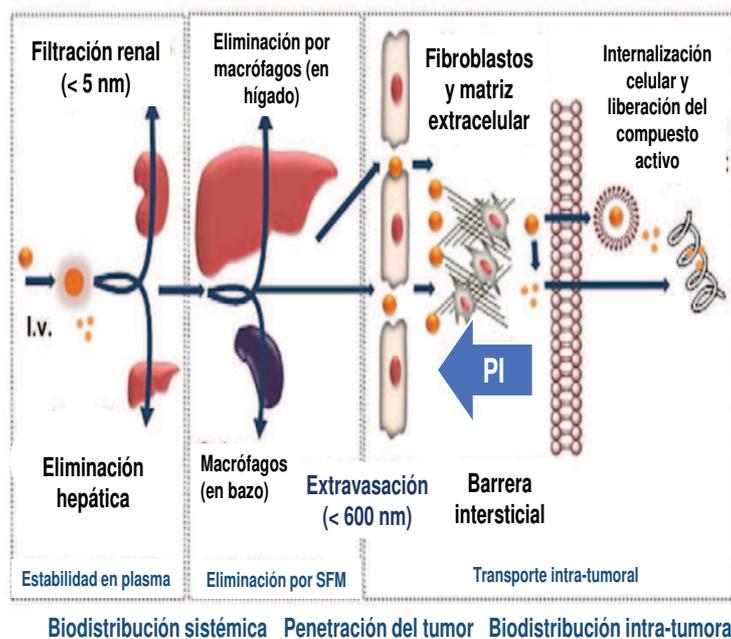


Figura 8. Etapas de la vehiculización de nanopartículas hacia tumores, luego de administración por vía parenteral intravenosa (i.v.). SFM: sistema fagocítico mononuclear. PI: presión hidrostática intersticial. Figura modificada de Ernsting y col. (2013) [88].

Luego, son eliminadas por células del sistema inmune, particularmente por macrófagos pertenecientes al SFM, presentes principalmente en el hígado y bazo [89], [90], [88]. Se conoce que el grado de opsonización decrece con el tamaño de la nanopartícula, por lo que es generalmente aceptado que nanopartículas de un tamaño en el rango 100-200 nm presentarán baja opsonización y eliminación por el SFM [88]. Finalmente, las nanopartículas en circulación deben evadir la captación por parte del hígado. Al respecto, se ha reportado que nanopartículas con un tamaño menor a 100 nm son capaces de atravesar el endotelio sinusoidal hepático, produciéndose su acumulación en el hígado. De esta manera, controlando el tamaño de las nanopartículas, es posible que las mismas atraviesen barreras biológicas a través de procesos de difusión, extravasación y evasión de la filtración renal y hepática.

En la segunda etapa, para ejercer su acción en el sitio diana, las nanopartículas deben extravasarse hacia el tumor atravesando el endotelio vascular, el cual constituye la monocapa de la superficie interna de los vasos sanguíneos. El endotelio vascular presenta una morfología diferente en los distintos órganos, pudiendo ser continuo, fenestrado o discontinuo. El endotelio continuo se caracteriza por poseer células endoteliales fuertemente conectadas unas con otras, y se encuentra principalmente en vasos, arterias y pulmones [90]. Por otro lado, los órganos implicados en procesos de filtración o excreción, como las glándulas, la mucosa gástrica e intestinal, los glomérulos y riñones poseen endotelio fenestrado.

Las fenestraciones son poros transcelulares, que se extienden a través del grosor total de la célula endotelial formando una abertura de aproximadamente 60 nm. [91]. En tejidos sanos, las nanopartículas de tamaño mayor a 60 nm no podrán atravesar el endotelio vascular, siendo las más grandes (400-600 nm), preferentemente filtradas por el bazo. Sin embargo, es conocido que ciertos estímulos producidos durante el desarrollo tumoral y procesos inflamatorios resultan en procesos de angiogénesis (formación y crecimiento de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preformados) que conducen a la formación de una neovascularización defectuosa, con fenestraciones de entre 300 y 700 nm [90]. Este proceso da origen a lo que se denomina “efecto de retención y permeabilidad aumentada” (EPR, por las siglas en inglés de *enhanced permeability and retention effect*). Debido al efecto EPR, nanopartículas con tamaños en un rango de 70-200 nm serían capaces de atravesar las fenestraciones, difundir hacia los tumores y acumularse en ellos [89] (Figura 9).

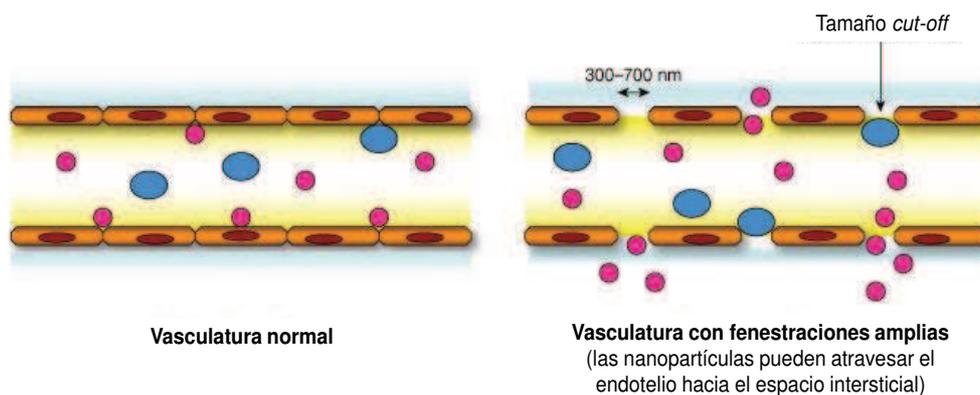


Figura 9. Esquema del efecto EPR. Figura modificada de Alexis y col. (2008) [90].

Otro factor que influye en la biodistribución sistémica de las nanopartículas es la forma, debido a que afecta a su comportamiento hidrodinámico [88]. Mientras que una forma esférica o elipsoide favorece los procesos de internalización celular, una forma filamentosa o más alargada puede favorecer en algunos casos la evasión del reconocimiento por parte de los macrófagos y la filtración esplénica. Con respecto a la carga eléctrica, es conocido que la carga neta superficial de las nanopartículas, medida como potencial ζ , puede afectar a su interacción con la célula diana y a su reconocimiento y eliminación por parte del sistema fagocítico nuclear. Es conocido que cargas eléctricas positivas (potencial $\zeta \geq 10$ mV) promueven una tasa mayor de internalización celular [90]. Esto es en gran parte debido a que la carga positiva permite la interacción de la nanopartícula con proteínas de la matriz extracelular, de carga negativa. Por otro lado, se asume que nanopartículas negativas (potencial $\zeta \leq$

10 mV) presentan mayor atracción por proteínas séricas favoreciendo su opsonización. Por lo tanto, en el rango de potencial $\zeta \pm 10$ mV, las nanopartículas serían capaces de evadir el SFM, presentando tiempos de circulación más largos [88]. Adicionalmente, las nanopartículas pueden atravesar el endotelio vascular mediante su unión a ciertos receptores de superficie. Especialmente para la internalización de albúminas, se ha identificado el receptor gp60, constituido por una glicoproteína de membrana de 60 kDa que es capaz de unir albúminas y mediar su traspaso a través del endotelio vascular, lo cual cumpliría funciones en la regulación de la permeabilidad capilar [91].

Por último, luego de la extravasación y penetración en el tumor, la nanopartícula debe interactuar con la célula diana. Sólo moléculas pequeñas y partículas menores a 1 nm pueden atravesar la membrana celular por difusión pasiva [92], por lo que las nanopartículas de mayor tamaño ingresarán a la célula fundamentalmente por endocitosis, que es el proceso por el cual la membrana celular envuelve a una partícula externa, y la internaliza. Las partículas más grandes pueden ingresar a la célula por fagocitosis o macropinocitosis [88], [92]. La fagocitosis es realizada principalmente por células especializadas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), para internalizar patógenos y restos celulares. Por su parte, la macropinocitosis está regulada por filamentos de actina. Partículas más pequeñas son internalizadas por endocitosis que, a su vez, puede ser (i) mediada por clatrina, (ii) mediada por caveolinas, (iii) mediada por receptor, o (iv) no específica (Figura 10).

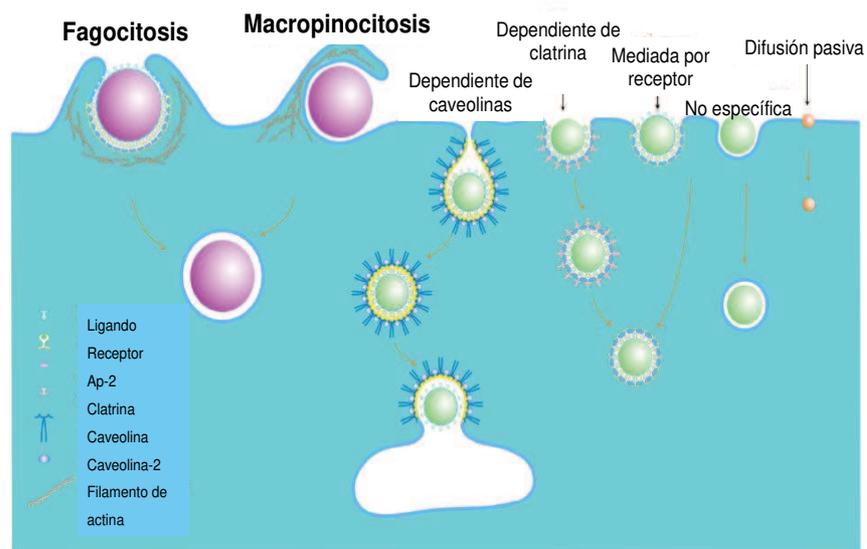


Figura 10. Mecanismos posibles de internalización celular de nanopartículas. Figura modificada de Zhang y col. (2015) [92].

La distinción del mecanismo de endocitosis por el cual una nanopartícula es internalizada es importante ya que en cierta medida determina el compartimiento de destino subcelular. En dependencia del mecanismo utilizado, la nanopartícula puede ser posteriormente captada por un lisosoma, lo cual produciría su degradación parcial o total en este compartimiento. En este sentido, es importante destacar que las nanopartículas interiorizadas por endocitosis mediada por clatrina son destinadas al compartimiento lisosomal [88]. Además, la endocitosis dependiente de caveolinas y de clatrina involucran importantes cascadas de señalización posteriores [92].

Además del tamaño, otras variables que influyen en la interacción de una nanopartícula con la superficie celular incluyen la forma, rigidez, carga superficial y la presencia de ligandos o grupos superficiales [86], [92]. Al respecto, se conoce que ligandos como el ácido fólico, albúmina y colesterol presentes en la superficie de nanopartículas pueden facilitar la captación a través de endocitosis mediada por caveolina, mientras que los ligandos para glicorreceptores promueven la endocitosis mediada por clatrina [88].

1.9. Modificación superficial de nanopartículas

En los últimos años, el diseño y desarrollo de sistemas de nanopartículas de uso terapéutico ha avanzado hacia la modificación de su superficie, a fin de mejorar sus propiedades, y lograr su direccionamiento o vectorización. En este sentido, el direccionamiento (*targetting*) de nanopartículas se refiere a la modificación superficial dirigida a la localización específica de las mismas en un sitio deseado, evitando su distribución inespecífica por todo el organismo [93].

Se distinguen dos tipos de direccionamiento: pasivo y activo [94]. En el direccionamiento pasivo, ciertas características fisiológicas o anatómicas favorecen el acceso preferencial de las nanopartículas al sitio de acción. En nanopartículas utilizadas en el tratamiento del cáncer, ciertas características fisiopatológicas promueven la acumulación preferencial de las mismas en el tumor o efecto EPR. Además, el microambiente de los tejidos tumorales presenta condiciones fisicoquímicas diferentes a la de los tejidos sanos, como lo son una temperatura más alta (>40°C) y un pH más ácido (alrededor de 5,4), lo cual puede ser utilizado para liberar un compuesto activo a partir de nanopartículas con capacidad estímulo-respuesta [16], [20]. Estas nanopartículas son diseñadas de manera tal que se mantengan inactivas en circulación, y liberen la droga en respuesta a un estímulo (pH, temperatura) al acceder al sitio de acción.

Por otro lado, el direccionamiento activo consiste en acoplar una molécula o ligando en la superficie de la nanopartícula, que interacciona con un receptor o grupo específico sobre la superficie de la célula diana, promoviendo la internalización celular por endocitosis mediada por receptor [94]. En general, se utilizan ligandos que tengan especificidad de interacción con moléculas que se encuentren preferentemente en células tumorales, no encontrándose en células normales. Algunos ejemplos de ligandos frecuentemente utilizados son: el ácido fólico, cuyo receptor se encuentra sobreexpresado en tumores de cáncer de mama, ovarios, pulmón, cuello uterino, entre otros [93], biotina (ya que su receptor se encuentra expresado en muchos tipos de tumores), anticuerpos con especificidad para ciertos marcadores tumorales, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), péptidos, aptámeros, entre otros.

Asimismo, tal como se mencionó anteriormente, el SFM presente en el hígado y el bazo representa un obstáculo importante en la biodisponibilidad y biodistribución de las nanopartículas debido a su capacidad para reconocer estos sistemas, eliminarlos rápidamente de la circulación sistémica y, en consecuencia, limitar su acceso al sitio diana [90]. Una estrategia para evitar esto es la modificación superficial de las nanopartículas, ya sea mediante la adición o el recubrimiento de polímeros hidrofílicos a la superficie o el recubrimiento de la nanopartícula con polímeros [8]. Se conoce que la unión de moléculas de polietilenglicol (PEG) a nanopartículas de uso terapéutico permite aumentar la hidrofiliidad superficial y mejorar la vida media en circulación al disminuir las interacciones con proteínas plasmáticas y con el SFM, evitando así el reconocimiento y remoción de las nanopartículas por parte del sistema inmune [95], [96], [97].

En este contexto, el presente trabajo de tesis aborda el estudio de la obtención de nanopartículas de BSA mediante un proceso de autoensamblaje de monómeros inducido por tratamiento térmico, para la vehiculización de compuestos flavonoides, contemplando aspectos de diseño que permitan su potencial administración por vía parenteral en terapias de prevención y/o tratamiento del cáncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Reunir conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, que conlleven a la obtención y caracterización estructural de nanocomplejos formados por albúminas y compuestos lipofílicos tales como flavonoides. Estas nanopartículas podrán ser propuestas como agentes antitumorales, considerando aspectos de diseño que permitan su potencial administración por vía parenteral.

2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudiar la obtención y caracterización de nanopartículas de albúmina sérica bovina (BSA) cargadas con crisina (Cris).

Objetivo 2: Estudiar la liofilización de nanopartículas de BSA cargadas con Cris. Evaluar la actividad antitumoral de las mismas sobre células de cáncer de mama, y la liberación gastrointestinal de Cris.

Objetivo 3: Estudiar la obtención y caracterización de nanopartículas de BSA cargadas con genisteína (Gen), y evaluar sus propiedades antitumorales.

Objetivo 4: Estudiar la PEGilación de nanopartículas de BSA que demostraron mayor efectividad según los resultados obtenidos en los Objetivos 2 y 3, y evaluar su efecto sobre células de cáncer de mama.

3. CAPÍTULO 1

Obtención y caracterización de nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con crisina

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Nanopartículas de albúminas séricas

Tal como se mencionó anteriormente (Introducción, sección 1.5), las albúminas resultan atractivas para la vehiculización de sustancias lipofílicas ya que presentan la propiedad intrínseca de unir, transportar y/o vehiculizar este tipo de compuestos bajo la forma de complejos proteína-ligando [44]. En particular, las albúminas séricas presentan propiedades idóneas para estas aplicaciones, ya que son consideradas no tóxicas, biodegradables, muy solubles en agua, no inmunogénicas y sus productos de degradación no son tóxicos.

Hoy en día, el diseño y desarrollo de estructuras a partir de albúminas séricas constituye un área en continuo crecimiento [98], [46]. La mayor parte de los sistemas desarrollados están enfocados en mejorar la eficiencia terapéutica de drogas conocidas en aplicaciones biomédicas, reduciendo los efectos adversos y la dosis requerida. Algunas aplicaciones tienen como objetivo el reemplazo de excipientes en formulaciones de compuestos que presentan problemas de administración en humanos, como toxicidad o efectos adversos. En el caso de las albúminas séricas, al ser proteínas plasmáticas, son frecuentemente empleadas en formulaciones de administración parenteral.

Los primeros métodos desarrollados para preparar sistemas de liberación a partir de albúminas séricas surgieron en los años 70', y estuvieron enfocados en la obtención de microesferas como soporte de agentes farmacológicos por medio de estrategias de desnaturalización térmica, modificación química o emulsificación. En el método de emulsificación (**Figura 11**) se dispersa una solución acuosa de proteína en un medio no acuoso, usualmente aceite (por ejemplo, aceite de semilla de algodón) [98], [99]. Luego, se obtiene la emulsión por simple agitación, homogenización a alta presión o ultrasonificación. Finalmente, la emulsión puede ser térmicamente estabilizada mediante su agregado gota a gota sobre aceite precalentado a 120-180°C; o químicamente mediante entrecruzamiento utilizando 2,3-butadieno o formaldehído [100], [101].

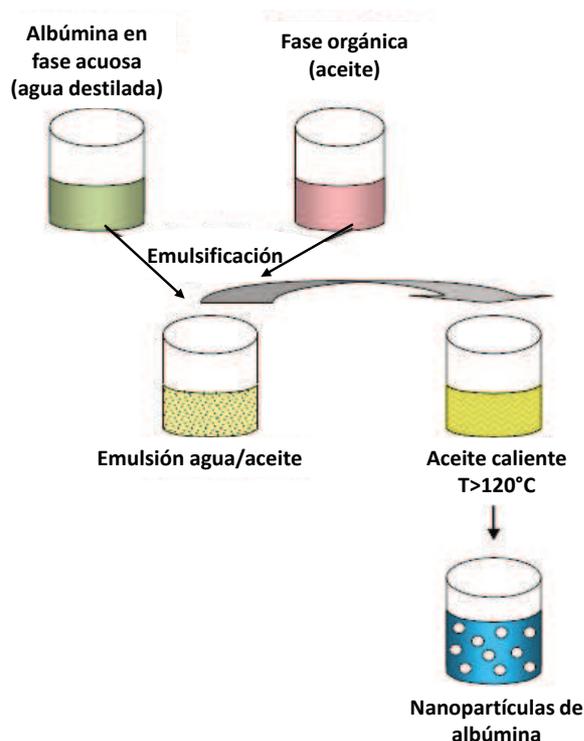


Figura 11. Esquema del método de emulsificación. Figura modificada de Jahanshahi y col., 2008 [98].

En los años posteriores, la tecnología avanzó hacia el desarrollo de partículas coloidales de tamaño menor a $1\ \mu\text{m}$ (nanopartículas), en las cuales la sustancia activa es atrapada, encapsulada o absorbida a la superficie de la estructura. La desventaja principal que presenta este método radica en la dificultad para remover los solventes utilizados, por lo cual la emulsificación fue gradualmente reemplazada por otros métodos que permitieron obtener nanopartículas de mayor estabilidad y tamaños bien definidos.

El método más utilizado hoy en día para la preparación de nanopartículas de albúmina es la desolvatación (**Figura 12**). Este método, también llamado coacervación, consiste en el agregado gota a gota de un agente desolvatante, que puede ser etanol o acetona (o una mezcla de ambos), a una dispersión acuosa de albúmina [43], [102]. El solvente produce una disminución de la solubilidad de la proteína, por lo que ocurre una separación de fases, en la cual la albúmina forma partículas agregadas. Sin embargo, las nanopartículas obtenidas por este método no son lo suficientemente estables, por lo que se requiere de un paso de estabilización, que frecuentemente consiste en una reacción de entrecruzamiento utilizando glutaraldehído. El entrecruzamiento se produce cuando los grupos aldehído del glutaraldehído reaccionan con los grupos amino de los residuos de aminoácidos proteicos Arg y Lys obteniéndose partículas estables. Debido a la potencial toxicidad

del glutaraldehído, el cual es un conocido carcinógeno, su uso es controvertido y, por lo tanto, resulta fundamental su remoción luego de la reacción. Además, se ha reportado que el glutaraldehído puede potencialmente reaccionar con los grupos amino presentes en la droga encapsulada [103], [104]. Las variables que pueden ser controladas para la optimización del método son el pH de la dispersión proteica, la cantidad de agente desolvatante y la velocidad de su agregado, la velocidad de agitación, la concentración de proteína y la fuerza iónica del medio [105]. Otra desventaja de este método es la frecuente agregación de las nanopartículas obtenidas, formando microesferas. Para evitar esto, una estrategia muy utilizada es el control del pH de la dispersión de proteína.

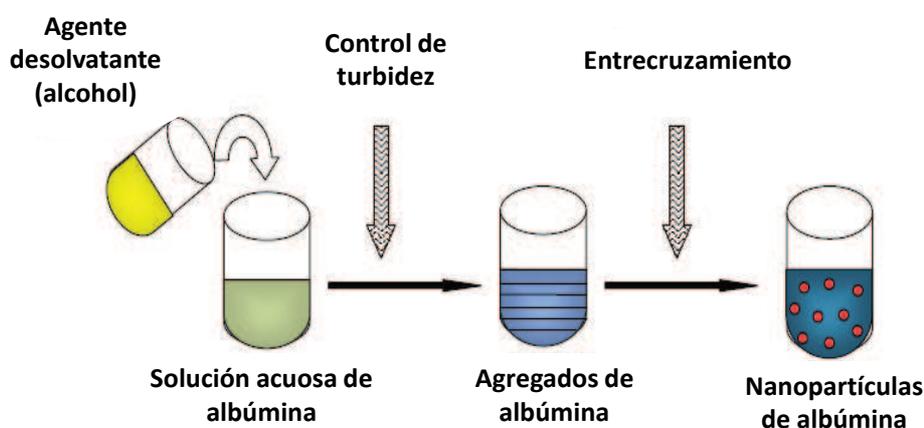


Figura 12. Esquema del método de desolvatación. Figura modificada de Jahanshahi y col., 2008 [97].

Se han preparado nanopartículas de BSA utilizando el método de coacervación para encapsular una amplia variedad de moléculas, incluyendo compuestos antivirales [104], antibióticos [106], antiparasitarios, antineoplásicos y antioxidantes [47], [73]. La tecnología permitió encapsular drogas antineoplásicas conocidas como 5-fluorouracilo [48], doxorubicina [66], cisplatino [57], metotrexato, paclitaxel, docetaxel, entre otras; las cuales presentan problemas de solubilidad, a la vez que se obtuvo una reducción de los efectos adversos asociados.

El producto Abraxane, aprobado por FDA en 2005, permitió la administración de paclitaxel sin emplear el excipiente Cremophor EL, asociado a efectos adversos severos tales como reacciones alérgicas e hipersensibilidad [65]. Abraxane fue entonces el primer medicamento basado en nanopartículas biopoliméricas aprobado para uso médico, hecho que promovió el incremento de publicaciones científicas en este campo e impulsó la nanotecnología aplicada a formulaciones parenterales como estrategia para la administración de drogas citotóxicas. Como se mencionó

anteriormente (Introducción, sección 1.3) el método *nab-technology* consiste en agregar gota a gota una suspensión de la droga a encapsular a una dispersión acuosa de albúmina pre-saturada con cloroformo. Luego, se forma una nanoemulsión mediante la acción de un homogeneizador de alta presión. Finalmente, se evapora el solvente. Mediante este método, se han obtenido nanopartículas de HSA y BSA para encapsular una gran variedad de drogas hidrofóbicas [55], [67], [107].

Otros métodos alternativos son el método de autoensamblaje, gelificación térmica, y secado por nanoaspersión. También se pueden formar nanopartículas a partir de proteínas globulares térmicamente desnaturalizadas utilizando una técnica de formación de partículas en frío. En esta técnica, una solución de proteína globular se calienta por encima de su temperatura de desnaturalización térmica (T_m) en condiciones donde existe una fuerte repulsión entre las moléculas de proteína de modo que las moléculas se despliegan, pero no se agregan extensamente [18]. El empleo de agregados proteicos obtenidos térmicamente para el desarrollo de nanopartículas para vehiculizar compuestos activos resulta interesante debido a que la capacidad de ligar compuestos lipofílicos aumenta considerablemente, respecto a la proteína nativa, producto de la exposición de sitios hidrofóbicos promovida por el desplegamiento que toma lugar en la desnaturalización. Esto, juntamente con la agregación, permite la creación de nuevos sitios de unión al ligando, lo cual finalmente se traduce en una mayor cantidad de carga de bioactivo por unidad de masa de proteína [108].

3.1.2. Albúmina sérica bovina

Anteriormente se describieron las propiedades y características de la albúmina sérica bovina (BSA) que la hacen adecuada para su uso como vehículo de compuestos hidrofóbicos. Como ya se mencionó (Introducción, sección 1.4), BSA es una proteína globular de 65,5 kDa, compuesta por 585 aminoácidos, con un pI de 4,7 en agua a 25°C [21]. Su estructura secundaria es predominantemente α -helicoidal y posee tres dominios principales (I, II y III) compuestos cada uno por dos subdominios (A y B). La proteína posee la función intrínseca de unir ligandos, presentando 2 sitios de unión (I y II), que se encuentran en los subdominios IIA y IIIA, respectivamente. Además, tiene 17 enlaces disulfuro intramoleculares que le confieren una estabilidad relativa, presentando con un grupo $-SH$ libre en la Cys₃₄. Con respecto a los aminoácidos capaces de emitir fluorescencia, BSA posee dos residuos Trp (Trp₁₃₅ y Trp₂₁₂), siendo la fluorescencia intrínseca debida principalmente al Trp₂₁₂ ya que el

Trp₃₁₄ se encuentra en un entorno más hidrofílico por lo que su emisión de fluorescencia se encontraría atenuada.

Se conoce que BSA presenta diferentes conformaciones dependientes del pH: a valores de pH por debajo de 3,5, tiene una forma expandida (forma E), con una transición a una forma llamada rápida (forma F) cuando el pH desciende abruptamente por debajo de 4,0. A valores de pH entre 4,5 y 7,0 se encuentra en una forma normal (forma N), y cuando el pH aumenta a 8,0-9,0, BSA se despliega adoptando una forma básica (forma B), presentando finalmente una forma envejecida (forma A) a un pH superior a 9,0 [29], [28]. Estos cambios conformacionales tendrían influencia en el proceso de agregación de BSA y en sus propiedades de unión a ligandos. También se reportó que el tratamiento térmico de BSA a temperaturas superiores a 65°C resulta en despegamiento de la estructura de la proteína, con una pérdida de conformación de α -hélice y un aumento de la formación de láminas β [33], [34]. Por lo tanto, como se mencionó, estas características conformacionales podrían usarse racionalmente en el desarrollo de nanopartículas de BSA.

3.1.3. Crisina

La crisina (5,7- dihidroxiflavona; Cris) es un compuesto perteneciente a la familia de los flavonoides, más específicamente al grupo de las flavonas. La estructura química de Cris (**Figura 13**) se compone básicamente del esqueleto flavonoide de 15 carbonos, con dos anillos A y C fusionados, un grupo carbonilo (-C=O) en C4, un doble enlace en C2-C3 y un anillo bencénico B como sustituyente en el C2. Cris presenta dos grupos hidroxilos (-OH) en el anillo A, en las posiciones 5 y 7 [109] y, a diferencia de otras flavonas, no presenta grupos -OH en el anillo B [110].

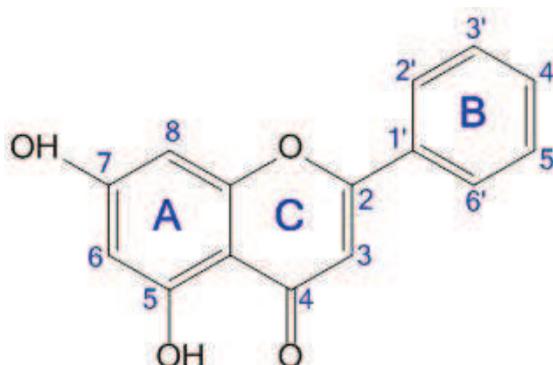


Figura 13. Estructura química de Cris (5,7-dihidroxiflavona). Elaboración utilizando ChemDraw Professional (PerkinElmer, 2017).

Este compuesto se obtiene comúnmente de la planta *Passiflora incarnate* (comúnmente conocida como Pasionaria) y, además, se encuentra en abundancia en

una gran variedad de extractos vegetales como propóleo y miel, algunas frutas y vegetales, e incluso se encuentra en algunos hongos, como por ejemplo el hongo ostra de árbol (*Pleurotus ostreatus*) [109], [110].

En cuanto a sus propiedades químicas, Cris presenta baja solubilidad en agua, la cual fue reportada en $1,86 \times 10^{-5}$ en fracción molar a 25°C [111], siendo soluble en solventes orgánicos como etanol, metanol y dimetilsulfóxido (DMSO) [112]. Su baja solubilidad acuosa se debe principalmente a su elevada hidrofobicidad, la cual se fundamenta químicamente en su estructura de anillos π - π conjugados [113].

Se ha comprobado que posee una amplia variedad de acciones biológicas, incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral, antialérgica, antibacteriana, antiviral, entre otras [114], [110], [109]. En particular, su actividad antitumoral es de fundamental interés para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer que incluyan compuestos naturales. Cris es capaz de ejercer citotoxicidad sobre líneas celulares de varios histotipos, incluyendo los correspondientes a cáncer de colon, pulmón, mama, nasofaríngeo, cervical, hígado, próstata, glioblastoma, tiroides y páncreas [115], [116], [117], [118], [119]. La actividad antitumoral de Cris involucra inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis. Más aún, se ha reportado que ejerce citotoxicidad preferencial en células tumorales por sobre las células normales [116].

Se ha postulado que la actividad citotóxica de Cris estaría relacionada con la presencia de los dos grupos 5-OH y 7-OH, junto con la falta de oxigenación en los anillos B y C [114], [110]. Por otro lado, la actividad antioxidante de Cris estaría vinculada con la cantidad y posición de grupos -OH en la molécula, ya que éstos serían responsables de la inhibición de la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (Cox-2) [110].

A pesar de su amplia variedad de efectos beneficiosos para la salud, la baja solubilidad acuosa de Cris resulta en una baja biodisponibilidad. Al respecto, se ha reportado que la biodisponibilidad de Cris luego de su administración por vía oral es de alrededor de 0,003-0,020% [120], y que sus concentraciones plasmáticas se encuentran en el rango 12-64 nM [121]. Por otro lado, se demostró que, en concentraciones bajas, el consumo de Cris a través de la dieta es seguro, siendo recomendada una dosis diaria de entre 0,5 y 3 g. Sin embargo, se ha reportado que en concentraciones más altas Cris podría producir efectos tóxicos en el cuerpo humano, principalmente a nivel hepático [114], [122].

En este contexto, la incorporación de Cris en nuevas matrices alimenticias y/o farmacológicas exige la búsqueda de estrategias que permitan una mayor solubilización en medios acuosos, preservación de su integridad molecular e incremento de su concentración en tejidos neoplásicos, minimizando a la vez los efectos tóxicos. Se ha estudiado la encapsulación de Cris en nanopartículas obtenidas por diferentes métodos, entre ellas liposomas, nanopartículas de ácido poliláctico coglicólico (PLGA), conjugados con polietilenglicol (PEG) y otros co-polímeros, entre otros sistemas [113], [117], [123], [124]. Con respecto a la vehiculización de Cris en nanopartículas obtenidas a partir de BSA, sólo se ha estudiado su encapsulación en nanopartículas de BSA obtenidas por desolvatación [59].

En virtud del conocimiento adquirido por el grupo sobre obtención de nanocomplejos de albúminas y ligandos liposolubles [125], [126], [127], [128], [129], en el presente capítulo de tesis se aplicaron diferentes tratamientos a la proteína BSA utilizando varias condiciones pH-temperatura, y se obtuvieron partículas de tamaño nanométrico capaces de vehiculizar Cris.

3.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos planteados en este capítulo son:

Objetivo 1: Estudiar la formación de nanopartículas obtenidas por autoensamblaje de BSA aplicando tratamiento térmico en diferentes condiciones de pH y temperatura.

Objetivo 2: Evaluar la carga de Cris en las nanopartículas obtenidas.

Objetivo 3: Caracterizar los nanocomplejos obtenidos mediante algunos parámetros fisicoquímicos.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Materiales

Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) en forma de polvo liofilizado adquirido en Sigma Aldrich (EE. UU.), con una pureza $\geq 96\%$ determinada por electroforesis en gel de agarosa. El compuesto bioactivo crisina (Cris) fue adquirido en Sigma Aldrich (EE. UU.), y contó con una pureza $\geq 96.5\%$ determinada por HPLC. Se preparó una solución reguladora fosfato salino (PBS) pH 7,4, utilizando las sales Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl y KCl , las que fueron obtenidas de Cicarelli (Argentina). El dimetilsulfóxido (DMSO) fue adquirido en Biopack (Argentina). El ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) fue obtenido de Fluka Chemie AG (Suiza). Los solventes

utilizados para los análisis cromatográficos fueron obtenidos de Pharmco Aaper y Sintorgan siendo los mismos de calidad HPLC.

3.3.2. Tratamientos térmicos en distintas condiciones de pH y temperatura

Se prepararon soluciones de BSA a diferentes concentraciones (1,0-4,0 % p/p) disolviendo el polvo liofilizado en NaCl 50 mM. Para promover la hidratación de la proteína, las dispersiones se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente (25°C) y luego se almacenaron toda la noche a 4°C. Luego, se filtraron utilizando un filtro de membrana de éster de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro (Merck Millipore, EE. UU.) con el objeto de eliminar trazas de agregados proteicos que pudieran estar presentes en la muestra de BSA liofilizada. La concentración de BSA fue determinada por medición espectrofotométrica de la absorbancia a 280 nm (espectrofotómetro Jenway 7305, Reino Unido) empleando un coeficiente de extinción (ϵ) de 43.747 M^{-1} . Dicho coeficiente fue determinado experimentalmente siendo consistente con el valor 43.824 M^{-1} , reportado por Peters (1985) [21].

Una vez obtenidas las soluciones de BSA, se ajustó el valor de pH de estas a 9,0 y 11,0 por agregado de NaOH 1 M. Los valores de pH de tratamiento fueron seleccionados en base a conocimiento previo de que, a valores altos de pH, es posible obtener nanopartículas proteicas de tamaño pequeño [127]. Para evitar la transición de BSA hacia la forma A, el tratamiento térmico fue realizado el mismo día del ajuste de pH de la solución de BSA.

Para realizar el tratamiento térmico, se dispensaron 2 mL de solución de BSA en tubos de vidrio con tapa a rosca (2 cm de diámetro y 15 cm de altura), y se sumergieron en un baño termostático (Dalvo instrumentos, modelo BTMP, Argentina) durante 5 min. Se evaluaron dos temperaturas: 70°C y 85°C, las cuales se encuentran por encima de la temperatura de desnaturalización térmica de BSA determinada por DSC (65°C) en base a estudios previos [33], [34]. Una vez finalizado el tratamiento térmico, los tubos fueron inmediatamente enfriados en baño de hielo. Luego de la obtención de las nanopartículas, se realizó una dilución de estas en PBS (pH 7,4) en un tiempo no mayor a 48 h. Una dispersión de BSA sin tratamiento térmico (BSA nativa) se utilizó como control. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis.

3.3.3. Espectroscopía de fluorescencia

La formación de nanopartículas de BSA (BSAnp) por tratamiento térmico fue monitoreada a través de mediciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca,

utilizando BSA nativa (BSAn) como control. Para ello, las dispersiones de BSAn y BSAnp se diluyeron en PBS pH 7,4 al 0,01% p/p.

3.3.3.1. Fundamentos de espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el que los átomos y moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética y retornan al nivel fundamental mediante la emisión del exceso de energía en forma de fotones [130]. Cuando una población de moléculas absorbe luz, ocurre una transición desde el estado electrónico fundamental S_0 hasta un estado excitado S_1 , y puede retornar al estado fundamental S_0 mediante diferentes procesos [131]. El retorno a través de la emisión de un fotón es denominado fluorescencia y debe competir con otros procesos de relajación como por ejemplo la conversión interna que es mucho más rápida que la fluorescencia (generalmente ocurre dentro de los 10^{12} s y la fluorescencia alrededor de los 10^{-8} s) [132].

Las moléculas capaces de emitir fluorescencia son denominadas fluoróforos y, generalmente, se trata de moléculas cuya estructura posee anillos aromáticos, siendo mayor la eficiencia cuántica al aumentar el número de anillos y el grado de condensación. Los fluoróforos de aplicación bioquímica se dividen en dos clases generales: intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son los que ocurren naturalmente mientras que los fluoróforos extrínsecos son aquellos que se agregan a una muestra para otorgarle características de emisión específicas [132]. En las proteínas, la fluorescencia intrínseca es debida a los aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptófano (Trp) y fenilalanina (Phe), siendo principalmente atribuida al grupo indol del Trp, que absorbe luz a aproximadamente 280 nm y es muy sensible a la polaridad del entorno; por lo que es ampliamente utilizado para monitorear cambios conformacionales durante el plegamiento y desplegamiento de estas macromoléculas [133]. Por otra parte, entre los fluoróforos extrínsecos más ampliamente utilizados en proteínas se encuentra el ácido 8-anilino-1-naftalen sulfónico (ANS). Este compuesto es débilmente fluorescente en medio acuoso pero su emisión de fluorescencia aumenta significativamente al ser disuelto en solventes orgánicos o al unirse a proteínas. Por lo tanto, es utilizado en estudios de caracterización de sitios de unión de proteínas y en interacciones proteína-ligando.

La fluorescencia molecular se evalúa excitando una muestra a la longitud de onda de absorción, también llamada longitud de onda de excitación (λ_{ex}), y midiendo su emisión a una longitud de onda mayor, denominada longitud de onda de emisión o fluorescencia (λ_{em}). De esta manera se obtienen los espectros de emisión de

fluorescencia, que consisten en gráficos de intensidad de emisión de fluorescencia en función de la longitud de onda. Para ello se emplean espectrofotómetros de fluorescencia, los cuales se componen básicamente de una fuente de luz, un monocromador de excitación o filtro, un monocromador de emisión o filtro, una celda en la cual se coloca la muestra, un detector y un procesador de datos [130].

3.3.3.2. Fluorescencia intrínseca

Con el objeto de monitorear cambios conformacionales inducidos por el tratamiento térmico aplicado a BSA_n, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca (debida al Trp) a una λ_{ex} de 295 nm, registrando la emisión de fluorescencia en el rango 310-400 nm. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2000 (Japón) equipado con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Las mediciones fueron realizadas por triplicado, a temperatura ambiente (25°C) y la resolución espectral fue de 10 nm. A partir de los espectros de emisión, se obtuvieron los datos de intensidad de fluorescencia máxima del Trp (IF_{Trp}) y fueron expresados en términos de intensidad de fluorescencia relativa del Trp (IFR_{Trp}), siendo $IFR_{Trp} = IF_{Trp}/IF_0$, donde IF_{Trp} es la intensidad de fluorescencia máxima del Trp de BSA_n (BSA tratada térmicamente), e IF_0 corresponde a la intensidad de fluorescencia máxima del Trp de la proteína nativa BSA_n (sin tratamiento térmico).

3.3.3.3. Fluorescencia extrínseca

Para las mediciones de fluorescencia extrínseca se agregaron 15 μ L de la sonda fluorescente ANS (8 mM) a 2 mL de dispersión. Previamente, se determinó experimentalmente que la saturación de los sitios de unión de ANS a BSA se alcanzó al agregar ANS en concentraciones finales comprendidas en el rango 20-80 μ M, por lo que la concentración final de ANS empleada estuvo fuera de este rango. Los espectros de fluorescencia extrínseca fueron registrados a una λ_{ex} de 390 nm, midiendo la emisión de fluorescencia en el rango 400-600 nm. Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron por triplicado, a temperatura ambiente (25°C), empleando un espectrofotómetro Hitachi F-2000 (Japón) y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Los datos de intensidad de fluorescencia máxima de ANS (IF_{ANS}) fueron expresados en términos de intensidad de fluorescencia relativa de ANS (IFR_{ANS}), siendo $IFR_{ANS} = IF_{ANS}/IF_0$, donde IF_{ANS} es la intensidad de fluorescencia máxima de ANS medida para BSA_n (BSA tratada térmicamente), e IF_0 corresponde a la intensidad de fluorescencia máxima medida para proteína nativa BSA_n (sin tratamiento térmico).

3.3.4. Caracterización de nanopartículas de albúmina sérica bovina

Los sistemas BSA_np obtenidos a diferentes condiciones de pH y temperatura del tratamiento térmico fueron caracterizados en términos de su distribución del tamaño de partículas, carga neta superficial, peso molecular y morfología empleando las técnicas que se describen a continuación.

3.3.4.1. Determinación de tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) es una técnica que permite la medición del tamaño hidrodinámico de partículas en suspensión a partir de la medición de la luz dispersada. Para ello, se hace incidir un haz de luz monocromática en una cubeta con la suspensión de partículas y se mide la dispersión de luz. Las partículas en suspensión se mueven aleatoriamente, según el movimiento Browniano por lo que al incidir la luz se producen interferencias constructivas y destructivas y la intensidad de la luz dispersada varía en el tiempo [134]. Las fluctuaciones de la intensidad de luz son medidas y correlacionadas a intervalos cortos de tiempo (en el orden de los ns- μ s) para medir la velocidad de fluctuación de la señal. Es decir, la fluctuación de la intensidad de luz se compara a sí misma, de a intervalos cortos de tiempo, obteniéndose una función de autocorrelación. A su vez, dado que las partículas más pequeñas se mueven a mayor velocidad que las partículas más grandes, las fluctuaciones son de mayor frecuencia para partículas más pequeñas en comparación con las más grandes. La función de correlación decae exponencialmente y es característica de la velocidad de difusión, siendo mayor a menor tamaño de partícula. Si las partículas son grandes, la señal cambiará lentamente y la correlación persistirá por más tiempo que en el caso de partículas pequeñas, donde sucede lo contrario. Cuando la curva de correlación es ajustada a un algoritmo cumulante de exponencial simple, es posible calcular el coeficiente de difusión D para una población de partículas. A partir de éste, es posible calcular un único valor de diámetro hidrodinámico (d_H), asumiendo que las partículas tienen forma esférica, y obtener un valor de radio hidrodinámico (R_h) utilizando la ecuación de Einstein-Stokes (Ecuación 1) [135]:

$$R_h = \frac{k T}{6 \pi \eta D} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde D es el coeficiente de difusión traslacional ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$); k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N} \cdot \text{m} \cdot \text{K}^{-1}$); T es la temperatura (K) y η es la viscosidad del solvente ($\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$). Por lo tanto, el valor de d_H obtenido corresponde al diámetro de una esfera hipotética que posee el mismo coeficiente de difusión de las partículas bajo

estudio, y depende de la viscosidad del solvente (η), la cual a su vez está influenciada por la temperatura (T).

A partir de la deconvolución de la función de correlación se obtiene la distribución de tamaño de partículas (PSD). La PSD obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varios tamaños y es conocida como distribución del tamaño de partícula en intensidad (PSDi). Para obtener información adicional, es posible realizar las transformaciones a partir de PSDi a fin de obtener las PSD en volumen (PSDv) y en número (PSDn) aplicando la teoría de Mie [136], donde son empleadas las propiedades ópticas del analito (índice de refracción y absorción a la longitud de onda del láser). Además, el análisis de cumulantes de la función de correlación permite obtener un índice de polidispersidad global (Pdl), el cual es indicativo del ancho de una distribución de tamaño global asumiendo un único valor medio. El término polidispersidad se utiliza para describir el grado de “no uniformidad” de una distribución de tamaño. En general, se considera que distribuciones con $Pdl < 0,1$ son monodispersas, mientras que valores de $Pdl > 0,1$ caracterizan muestras polidispersas pudiendo ser de polidispersidad moderada (0,1-0,4) o amplia ($> 0,4$) [134].

En este trabajo, la distribución del tamaño de partículas de BSA_n y BSA_{np} fue determinada por DLS empleando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) equipado con un láser He-Ne de una longitud de onda de salida de 638,8 nm, el cual permite realizar mediciones de tamaño en el rango 0,6-6.000 nm. El ángulo del haz de láser incidente fue de 90°. Las muestras de BSA_n y BSA_{np} fueron diluidas en PBS pH 7,4, en una concentración de 0,05%_{p/p} a la cual el número de cuentas por segundo fue adecuado para el análisis. El d_H de partícula fue obtenido a partir de PSDi. La curva PSDv también fue tomada en cuenta para el análisis, especialmente para identificar poblaciones mayoritarias. Para ello, se utilizó un valor de índice de refracción del analito de 1,45, un índice de refracción del solvente de 1,33 y un valor de absorción de 0,001. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado a temperatura ambiente (25°C).

3.3.4.2. Determinación de la carga neta superficial por medidas de potencial ζ

Cuando una partícula con carga eléctrica se encuentra en suspensión se rodea de iones desarrollándose una doble capa eléctrica en la interfase partícula-líquido. Dentro de la doble capa, la capa interna consiste en iones o moléculas con carga opuesta a la de la partícula (*capa de Stern*). Por encima de esta capa interna existen iones de carga opuesta a los iones de la capa de Stern, pero de carga similar a la de la

superficie de la partícula, que forman una capa externa difusa. La composición de la capa externa es dinámica y depende de varios factores, como el pH, fuerza iónica, concentración, etc. [134]. Cuando se aplica un campo eléctrico, las partículas cargadas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta, junto con los iones de la capa de Stern y la difusa. Dentro de la doble capa eléctrica existe un límite hipotético, llamado plano de deslizamiento, por encima del cual los iones no se mueven con la partícula. El potencial ζ representa la diferencia de potencial eléctrico que existe en el plano de deslizamiento, entre la doble capa eléctrica de las partículas y la capa dispersante de alrededor.

La medición del potencial ζ no se realiza en forma directa, sino que se calcula a partir de la movilidad electroforética de las partículas bajo un campo eléctrico. La movilidad electroforética (μ_e) de las partículas se relaciona con el potencial ζ a través de la ecuación de Henry (Ecuación 2):

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde ε es la constante dieléctrica, ζ es el potencial, $f(Ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad a la temperatura del experimento. Para partículas pequeñas en medio acuoso y con baja concentración de electrolitos (10^{-2} M), se hace la aproximación $f(Ka)=1,5$ y la ecuación de Henry se transforma en la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski (Ecuación 3):

$$\mu_e = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (\text{Ec. 3})$$

Experimentalmente, el potencial ζ es medido utilizando el mismo equipo empleado para las determinaciones de distribución de tamaño de partícula. La serie Zetasizer Nano calcula el potencial ζ mediante un experimento de microelectroforesis en el cual se mide la velocidad de las partículas utilizando velocimetría por láser Doppler. La velocidad se expresa como μ_e y el potencial ζ es calculado aplicando la ecuación de Henry.

El valor de potencial ζ es importante en la caracterización de suspensiones coloidales y de nanopartículas [137], siendo frecuentemente utilizado como medida de carga neta superficial. Para esto, se asume que la naturaleza positiva/negativa de los iones de la capa externa difusa en la doble capa eléctrica son similares a la carga eléctrica en la superficie de la nanopartícula [134]. Los factores que afectan el valor del potencial ζ son (i) pH, el cual es más negativo a valores altos de pH y más positivo a valores bajos de pH; (ii) fuerza iónica, ya que, a mayor concentración de iones, la

doble capa eléctrica se comprime y el potencial ζ disminuye; y (iii) concentración de partículas, siendo la relación más compleja, pero se asume que en general, el potencial ζ disminuye con la concentración. Finalmente, el valor del potencial ζ es frecuentemente utilizado como un parámetro para evaluar la estabilidad coloidal de una suspensión coloidal. En ese sentido, las suspensiones de nanopartículas se clasifican en base a rangos de potencial ζ de la siguiente manera: altamente inestables ($\pm 0-10$ mV), relativamente estables ($\pm 10-20$ mV), moderadamente estables ($\pm 20-30$ mV) y altamente estables (± 30 mV) [134].

El equipo utilizado para las mediciones de potencial ζ en este trabajo fue un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne con una longitud de onda de salida de 632,8 nm. En la presente tesis, siempre que se realizaron mediciones de potencial ζ , la concentración de proteína de la muestra fue de 0,05 %p/p para que la misma cumpliera con los parámetros de calidad del equipo.

3.3.4.3. Determinación de pesos moleculares por cromatografía rápida de proteínas por exclusión molecular y SDS-PAGE

La denominada *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) es un tipo de cromatografía líquida comúnmente utilizada para purificar y caracterizar proteínas. A diferencia de un sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), utiliza menor presión y, por lo tanto, mayor flujo (1-5 mL/min). Con el objeto de determinar los pesos moleculares (PM) de BSA_n y BSA_np, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare). La columna se conectó a un dispositivo FPLC (Akta Basic, GE Healthcare) y se equilibró con solución reguladora de fosfato pH 7,0 50 mM conteniendo NaCl 150 mM. El equipo se calibró con marcadores de PM (kit de calibración de filtración de gel-GE Healthcare) que incluyó tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa (13,7 kDa) and aprotinina (6,5 kDa) y se obtuvo una curva de calibrado para el cálculo de PM de la muestra. El volumen de inyección fue de 100 μ L y el flujo fue de 0,5 mL/min. Los PM fueron obtenidos y expresados como porcentaje del área de cada pico cromatográfico con respecto al área total normalizada.

3.3.4.4. Morfología por microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM por *Atomic Force Microscopy*) es una técnica de microscopía de alta resolución que se basa en la medición de cambios de la

fuerza de interacción entre una punta y la superficie de la muestra. Un microscopio de AFM está compuesto básicamente por un láser diodo, un fotodetector que funciona como un escáner, un brazo flexible (cantiléver) y una plataforma de muestra capaz de moverse en las direcciones x-y-z [138]. La muestra a analizar se monta sobre un cristal piezoeléctrico y es rastreada por una punta afilada (tip) montada sobre el cantiléver, a una distancia donde el tip es atraído o repelido por las fuerzas de interacción con la superficie de la muestra. Cuando la punta se acerca a la superficie, la fuerza atractiva de van der Waals entre la punta del cantilever y la muestra desvía el cantilever hacia la superficie de la muestra. Cuando la punta se pone en contacto con la superficie de la muestra, se desarrolla una fuerza repulsiva, que desvía el cantilever en la dirección opuesta. Estas desviaciones, en la misma dirección o en la dirección contraria a la superficie de la muestra, son detectadas por un rayo láser. El rayo láser incide en la parte superior del cantilever y se refleja en un fotodetector sensible a la posición por lo que la desviación en el cantilever es registrada por el fotodetector. Durante el escaneo, la punta de AFM se mueve continuamente hacia adelante y hacia atrás a lo largo de la superficie y el detector registra las desviaciones resultantes. La adquisición de la topografía de la superficie de la muestra se realiza mediante el registro de las pequeñas desviaciones del cantiléver. El cambio de fase de la oscilación en el cantilever también se registra como imagen de contraste de fase. De allí radica que una de las ventajas principales de AFM es la capacidad de proveer imágenes topográficas tridimensionales de la superficie en estudio [139].

El microscopio de AFM tiene tres modos de operación, dependiendo de la forma de contacto del tip con la superficie de la muestra: modo *contacto*, donde la distancia entre el tip y la muestra es menor a 0,5 nm; modo de *no contacto* donde esta distancia es de entre 0,1 y 100 nm, y modo *tapping*, donde el tip oscila cerca de su frecuencia de resonancia, en rangos de amplitud de 20 a 100 nm [139].

En el presente trabajo de tesis, se estudiaron las características morfológicas de BSA_np por AFM. Para ello, alícuotas de la muestra se adsorbieron a una superficie de mica (1cm², pegada a discos de acero) por medio de secado en cámara de vacío a temperatura ambiente. Las imágenes de AFM se realizaron en modo *tapping* con un microscopio Agilent 5400 (EE. UU.). Se utilizaron cantilevers de AFM recubiertos de aluminio (modelo OPUS: 160AC-NA) con las siguientes especificaciones: longitud: 160 μm; radio del tip: <7 nm; ancho medio: 40 ± 2 μm; espesor: 4 ± 0,5 μm; altura del tip: 14 μm; fuerza de resorte: 26 N.m⁻¹. Se empleó una frecuencia de oscilación de 280 kHz. Las muestras fueron escaneadas a 1 línea/s. Para el procesamiento de

imágenes, se utilizó el software Gwyddion 2.44. Las imágenes topográficas y de fase se procesaron de manera tal de presentar una mejor definición de las partículas.

3.3.5. Formación de nanocomplejos con crisina

Una vez caracterizados los sistemas BSA_n, se evaluó su carga con Cris. Para ello, se preparó una solución stock de Cris 2 mM en DMSO. Se utilizó DMSO como solvente de Cris por ser un solvente orgánico de baja toxicidad, miscible en agua y ampliamente utilizado en ensayos biológicos, ya que permite obtener el compuesto lipofílico en su forma más soluble, evitando la precipitación del compuesto que puede conducir a inexactitudes en su concentración cuando es evaluado en bioensayos [140].

3.3.5.1. Determinación de parámetros de unión mediante la aplicación de modelo Scatchard modificado

La formación de nanocomplejos entre BSA_n, BSA_np y Cris fue monitoreada a través de mediciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca. Para ello, se diluyeron las dispersiones de BSA_n y BSA_np en PBS pH 7,4 hasta una concentración final de 1,5 μM. Se tituló un volumen de 2 mL de dispersión de BSA_n y BSA_np agregando volúmenes crecientes de solución stock de Cris (2 mM) obteniendo concentraciones finales de Cris en el rango 0-140 μM. Inmediatamente tras la adición de Cris, los tubos fueron agitados en vórtex durante 5 s y se dejaron equilibrar las muestras a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h antes de efectuar las mediciones. Debido a que se ha reportado que a concentraciones superiores al 10% v/v el DMSO puede producir cambios estructurales en BSA [141], se contempló no exceder la concentración final 2,5% v/v en los sistemas mixtos. A fin de evaluar posibles alteraciones conformacionales en BSA_n en presencia de DMSO, se preparó una muestra control con 2 mL de dispersión de BSA_n (1,5 μM, en PBS pH 7,4) y se añadieron 50 μL de DMSO, lo cual representa la máxima concentración de DMSO utilizada durante los ensayos de fluorescencia.

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca por triplicado a temperatura ambiente (25°C) de acuerdo con lo previamente descrito. Los datos de intensidad de fluorescencia máxima del Trp (IF_{Trp}) fueron expresados en términos de intensidad de fluorescencia relativa (IFR_{Trp}), siendo $IFR_{Trp} = IF_{Trp}/IF_0$, donde IF_0 corresponde a la intensidad de fluorescencia intrínseca de los sistemas proteicos puros (sin agregado de Cris). Los datos de IF_{Trp} fueron utilizados para calcular los parámetros de unión: número de moléculas de Cris unidas (n) y contante de

asociación (K_A), ajustando los datos experimentales al modelo de Scatchard [108] (Ecuación 4):

$$[P]_{Total}(1 - f_i) = \frac{[Cris]}{n} \left(\frac{1}{f_i} - 1 \right) - \left(\frac{1}{n K_A} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

donde $[P]_{Total}$ es la concentración molar total de proteína, $[Cris]$ es la concentración total molar de Cris y n es el número de moléculas de Cris unidas en la saturación. El término f_i es la fracción de sitios ocupados por ligando (Cris), y se define como (Ecuación 5):

$$f_i = \frac{IF_i - IF_0}{IF_{max} - IF_0} \quad (\text{Ec. 5})$$

donde IF_0 , IF_{max} y IF_i son las intensidades de fluorescencia inicial, máxima y en la saturación, y a la relación proteína/ligando i , respectivamente.

Finalmente, para evaluar el modo en el cual se une Cris a BSA_n y BSA_np, se efectuaron mediciones de fluorescencia extrínseca agregando la sonda fluorescente ANS, mediante el procedimiento detallado anteriormente. Los valores de fluorescencia extrínseca se expresaron en términos de intensidad de fluorescencia relativa de ANS (IFR_{ANS}), siendo $IFR_{ANS} = IF_{ANS} / IF_0$, donde IF_{ANS} es la intensidad de fluorescencia de emisión de ANS de los nanocomplejos BSA_n-Cris y BSA_np-Cris y IF_0 corresponde a la emisión de fluorescencia de ANS de los sistemas proteicos puros. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 25°C.

3.3.5.2. Morfología por microscopía de transmisión electrónica

La microscopía de transmisión electrónica (TEM por *Transmission Electron Microscopy*) utiliza un haz de electrones acelerados que incide y pasa a través de una capa muy delgada de muestra y brinda detalles sobre su estructura y morfología, con un poder de magnificación de hasta un millón de veces. Un microscopio TEM comprende básicamente un cañón de electrones, lentes electromagnéticas para enfocar los electrones en la parte anterior y posterior a la muestra, un sistema que genera vacío y un sistema de detección [142]. El cañón de electrones acelera electrones con un voltaje de 80-300 kV y las lentes electromagnéticas dirigen el haz de electrones hacia la muestra controlando su ángulo de incidencia y apertura. El haz de electrones atraviesa la muestra y la imagen correspondiente se obtiene a través de la recolección de los electrones transmitidos por un detector colocado en forma posterior a la muestra o, en algunas configuraciones, en distintas posiciones alrededor del paso óptico. De los electrones del haz incidente, algunos habrán traspasado la muestra sin ningún tipo de interacción, otros habrán traspasado, pero habrán sido dispersados de

forma elástica (sin pérdidas de energía) o inelástica (con pérdidas de energía), y otros pudieron ser absorbidos [143]. Además, también pueden producirse fotones como consecuencia de transiciones de energía de los electrones de los átomos que forman la muestra. Según qué tipo de señal que se detecte después del impacto, se obtendrá diferente información. El sistema debe generar vacío (del orden de 10^{-5} Pa) para evitar la colisión y consecuente desvío de la trayectoria de los electrones con las moléculas de gas del aire dentro del microscopio.

La preparación de la muestra para ser analizada por TEM requiere de la formación de una capa muy delgada (<150 nm). Para muestras líquidas biológicas esta preparación incluye el depósito y secado de las muestras sobre una rejilla y un procedimiento de tinción. La puesta a punto y el desarrollo de las metodologías detalladas a continuación fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Nanobiomateriales (CINDEFI, UNLP-CONICET). Se prepararon las muestras de BSA_n y BSA_np para su observación por TEM realizando una dilución 1/100 de suspensiones en PBS (10 mM, pH 7,4). Luego, se depositó una gota de dilución sobre una rejilla de cobre cubierta con colodión (malla 400). El exceso de líquido fue drenado con un papel de filtro y se agregó una gota de ácido fosfotúngstico para aumentar el contraste. El análisis TEM fue realizado utilizando un microscopio Jeol-1200 EX II (Jeol Ma, EE. UU.). Las imágenes TEM 150.000 X fueron procesadas empleando el software ImageJ (NIH, EE. UU.).

3.3.5.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de crisina en BSA_np

Dentro del ámbito de la nanotecnología, la eficiencia de encapsulación (EE) se refiere a la cantidad de droga encapsulada o absorbida en las nanopartículas en relación con la cantidad total de droga agregada al sistema. La EE puede determinarse en forma indirecta mediante la separación de la droga no unida (libre) de la droga encapsulada/absorbida en las nanopartículas, y posterior cuantificación de la droga libre. Por su parte, la capacidad de carga (LC, por las siglas en inglés de *Loading Capacity*) se define como la cantidad de compuesto (en microgramos) cargado en el vehículo por miligramo de proteína [104]. Por lo tanto, es de esperarse que las nanopartículas con un alto porcentaje de LC y EE sean utilizadas con mayor frecuencia como encapsulantes de compuestos activos.

En el presente trabajo, la EE de Cris en BSA_n y BSA_np se determinó aplicando un método de extracción de Cris libre y posterior cuantificación por cromatografía líquida de alta performance en modo fase reversa (RP-HPLC, *Reverse Phase- High*

Performance Liquid Chromatography), mediante el procedimiento descrito a continuación. Se prepararon dispersiones de BSA_n-Cris y BSA_np-Cris (0,5% p/p BSA con 200 μM Cris) en PBS pH 7,4 y se ajustó el pH hasta el punto isoeléctrico de BSA (4,7-4,8). Luego, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 30 min para lograr la precipitación de los complejos BSA_n-Cris y BSA_np-Cris, quedando Cris libre en suspensión. Se transfirieron 3 mL de sobrenadante a tubos Falcon limpios, se agregaron 2 mL de acetato de etilo (mezcla 3:2 agua-acetato de etilo), y se centrifugó a 8.000 g durante 10 min, para lograr la separación de las fases. Se tomaron 500 μL de fase orgánica (acetato de etilo), se colocaron en frascos color caramelo con tapa y se evaporó el solvente bajo corriente de gas N₂ hasta sequedad. Las muestras fueron redisueltas agregando 500 μL de metanol para cuantificación de Cris por RP-HPLC. Para ello, se empleó un sistema HPLC modelo Prominence Serie 20^a (Shimadzu, Japón) equipado con un inyector manual modelo 7725i (Rheodyne, EE.UU.) y un detector de arreglos de fotodiodos modelo SPD-M20A (Shimadzu, Japón). Se utilizó una columna Simmetry300™ C18 (Waters Corp., EE.UU.) de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro, 5 μm de tamaño de partícula y 30 nm de diámetro de poro. El método de equilibrado y elución fue diseñado en base a un método de cuantificación de Cris reportado en la bibliografía [144]. Se utilizaron dos fases móviles: fase A (agua- ácido acético 0,12%) y fase B (acetonitrilo-ácido acético 0,12%), en las cuales la acidificación con ácido acético se realizó con el objetivo de mantener el pH por debajo del pK_{a1} de Cris (6,65) [112] y así evitar la formación de pares iónicos, los cuales producirían interacciones indeseadas con la columna. El equilibrado de la columna se realizó con 20% B durante 20 min. Se utilizó un volumen de inyección de 20 μL y el flujo fue de 1 mL/min. La elución fue realizada mediante un gradiente lineal efectuado de la siguiente manera: 20% B durante 5 min, 20–100% B en 5 min y por último 100% B durante 10 min. La detección de Cris se realizó a una longitud de onda de 267 nm y para su cuantificación se realizó una curva de calibrado de Cris en el rango 12,7-152,5 μg/mL. La linealidad fue verificada en todo el rango de concentraciones evaluado, con un valor de R >0,99.

Una vez cuantificada la cantidad de Cris libre, se calculó la EE de la siguiente manera (Ecuación 6):

$$EE(\%) = \frac{Cris_T - Cris_L}{Cris_T} \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

donde $Cris_T$ corresponde a la cantidad total de Cris agregada a la suspensión y $Cris_L$ es la cantidad de Cris libre presente luego de la precipitación de los complejos BSA_n-

Cris y BSA_n-Cris, cuantificada por RP-HPLC. De la misma manera, se calculó el valor de LC (Ecuación 7):

$$LC \left(\frac{\mu g \text{ Cris}}{mg \text{ proteina}} \right) = \frac{\mu g \text{ Cris}_T - \mu g \text{ Cris}_L}{mg \text{ proteina}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde $\mu g \text{ Cris}_T$ corresponde a la masa total de Cris en microgramos agregada a la suspensión y $\mu g \text{ Cris}_L$ es la cantidad de Cris libre en microgramos cuantificada por RP-HPLC. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

3.3.6. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software StatGraphics Plus 3.0. Para esto, se aplicó el método de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Formación de nanopartículas de BSA por autoensamblaje inducido por tratamiento térmico

3.4.1.1. Fluorescencia intrínseca

Tal como fue detallado previamente, se realizaron tratamientos térmicos a dispersiones de BSA_n en el rango de concentración 1,0-4,0% p/p, a dos valores de pH del medio acuoso (9,0 y 11,0) y dos temperaturas (70°C y 85°C). La concentración máxima de BSA_n fue seleccionada en base al límite de solubilidad de la proteína en agua, el cual es de alrededor de 4,0% p/p. Las temperaturas de tratamiento corresponden a valores por encima de la temperatura de desnaturalización térmica de BSA_n (65°C) [34], con lo cual se esperó observar cambios irreversibles debido al proceso de agregación térmica de monómeros de BSA_n. Con respecto a las condiciones de pH, se conoce que BSA_n es capaz de adoptar diferentes conformaciones ante cambios en el pH del medio acuoso [26], [27]. A valores de pH mayores a 8,5, se produce un desplegamiento de la estructura de BSA, con pérdida de estructuras secundarias α -hélice y un aumento de la afinidad por ligandos [29]. Más aún, se conoce que, a un pH de alrededor de 11,2, BSA existe en una conformación de glóbulo fundido (*molten globule*), en la que habría una mayor exposición de sitios hidrofóbicos [30]. En base a esto, los tratamientos se realizaron a valores de pH altos, en los cuales la estructura de BSA_n estaría desplegada, lo cual promovería la agregación térmica, a la vez que la alta repulsión electrostática impediría una agregación excesiva con formación de agregados de gran tamaño. Los cambios

conformacionales de BSA_n sometida a los diferentes tratamientos fueron monitoreados a través de mediciones de fluorescencia intrínseca, debida principalmente debido al Trp₂₁₂.

La **Figura 14** muestra los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n tratada bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, y a distintas concentraciones de proteína, en comparación con BSA_n (no tratada) como control. En los espectros se observó que todos los tratamientos aplicados resultaron en una disminución de la intensidad de fluorescencia intrínseca con respecto al control sin tratamiento. Además, se observó en todos los casos un corrimiento hacia el azul de la λ_{\max} , es decir un desplazamiento de λ_{\max} desde valores más altos (aproximadamente 342 nm) hacia valores más bajos (aproximadamente 333 nm).

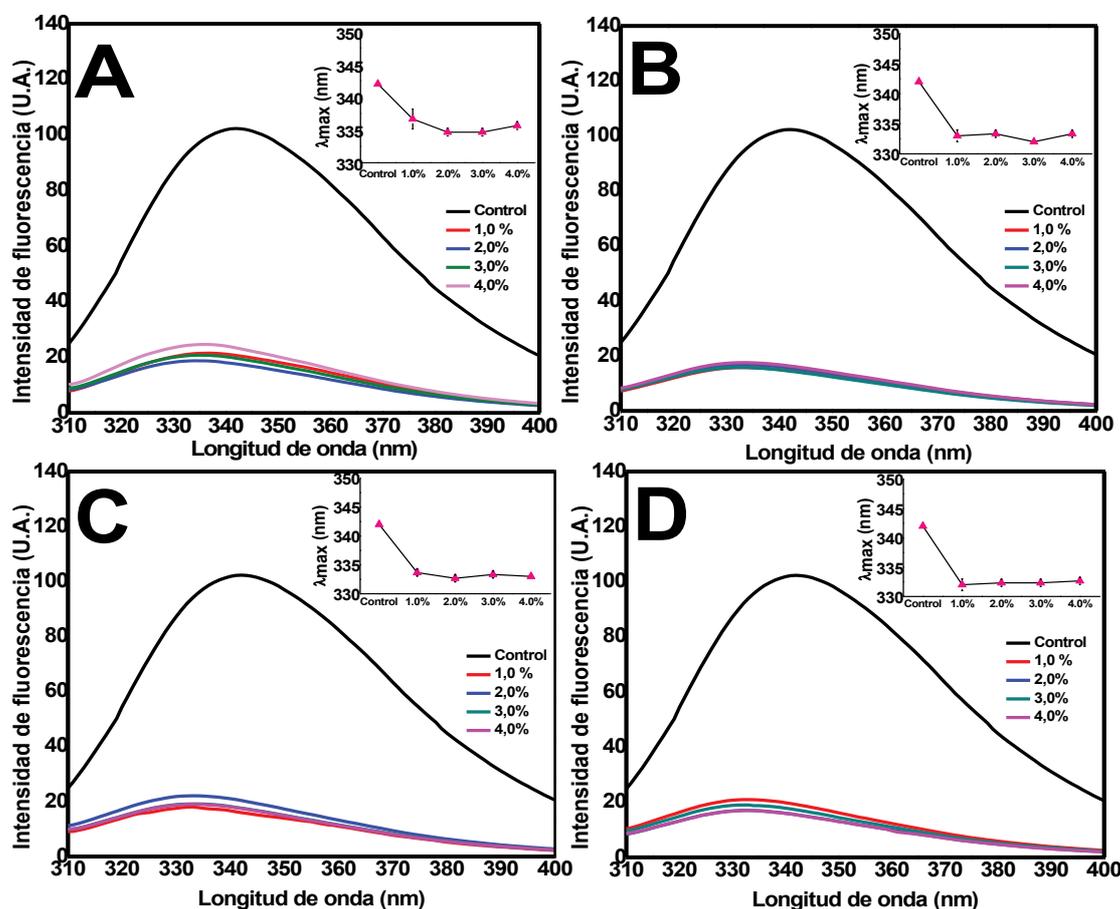


Figura 14. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n tratada térmicamente a 70°C-pH 9,0 (A), 70°C- pH 11,0 (B), 85°C-pH 9,0 (C) y 85°C-pH 11,0 (D) en comparación con BSA_n (Control, sin tratar). Los insertos en la parte superior de cada figura muestran la evolución de λ_{\max} de BSA_n tratada a cada concentración, en comparación con el control sin tratamiento.

Adicionalmente, la **Figura 15** muestra los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia del Trp expresada en términos de intensidad de fluorescencia relativa

(IFR_{Trp}). A partir del gráfico se observó que todas las condiciones de tratamiento evaluadas resultaron en una disminución significativa de IFR_{Trp} con respecto al control de BSA_n sin tratamiento ($p < 0,05$). Además, a una determinada temperatura de tratamiento, la concentración de proteína y el pH del medio acuoso no tuvieron influencia significativa sobre los valores de IFR_{Trp} ($p < 0,05$). A partir de estas observaciones es posible deducir que los tratamientos aplicados produjeron cambios conformacionales en BSA_n, que resultaron en un proceso de autoapagamiento (*self-quenching*) de la fluorescencia del Trp₂₁₂. Se conoce que dicho residuo se encuentra ubicado en un bolsillo hidrofóbico de la proteína, por lo que el corrimiento al azul observado en λ_{max} indicaría que el cambio conformacional de la proteína involucraría una nueva disposición del Trp₂₁₂ desde un ambiente molecular hidrofóbico hacia uno de mayor polaridad.

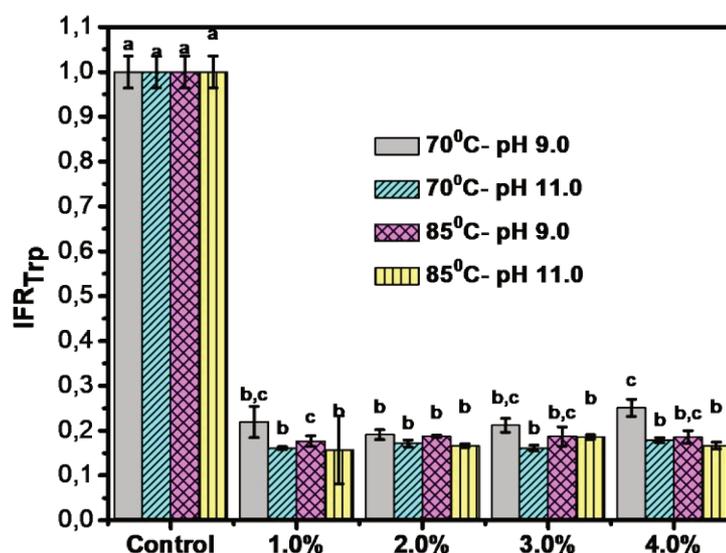


Figura 15. Intensidad de fluorescencia relativa del Trp (IFR_{Trp}) de BSA_n a diferentes concentraciones (1,0-4,0 %p/p) sometida a tratamiento térmico en diferentes condiciones: 70°C/pH 9,0, 70°C/pH 11,0, 85°C/pH 9,0, y 85°C/pH 11,0, en comparación con BSA_n no tratada (Control). Condiciones de medición: 0,01 % p/p BSA en PBS pH 7,4. $\lambda_{ex}=295$ nm.

En base a estos resultados se puede concluir parcialmente que los distintos tratamientos utilizados resultarían en importantes cambios conformacionales de BSA_n, atribuidos a un proceso de agregación inducido térmicamente.

3.4.1.2. Fluorescencia extrínseca

Por otro lado, se monitorearon los cambios en la intensidad de fluorescencia extrínseca, debido a la unión de la sonda fluorescente ANS. En forma previa a los estudios, se evaluó la concentración adecuada de ANS a agregar a la dispersión de proteína, registrando la intensidad de fluorescencia extrínseca de una dispersión de

BSAn del 0,01 % p/p (1,5 μM) a concentraciones crecientes de ANS (0-120 μM). Se observó que la saturación de los sitios de unión de ANS se alcanzó en el rango 20-80 μM (**Figura 16**).

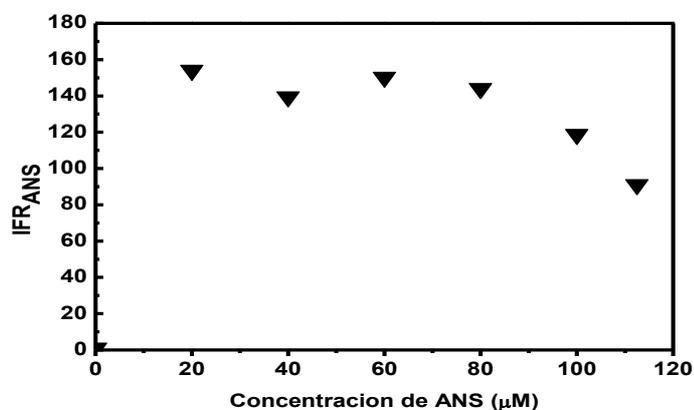


Figura 16. Intensidad de fluorescencia relativa de ANS (IFR_{ANS}) de una dispersión de BSAn al 0,01% p/p con la adición de concentraciones crecientes de ANS (0-120 μM).

A concentraciones mayores a 100 μM de ANS, la IFR_{ANS} disminuyó debido al efecto filtro interno al aumentar la concentración de la sonda no unida a la proteína. Por esta razón, se seleccionó la concentración 80 μM de ANS para los estudios de fluorescencia extrínseca de BSAn tratada térmicamente. Estos resultados se encuentran en concordancia con la bibliografía, en la que se ha reportado que la saturación ocurre a una relación de concentraciones $[\text{ANS}]/[\text{BSA}] = 4$ [27] y se recomienda el uso de una concentración de ANS 50 veces superior a la de la proteína [30], lo cual se cumpliría al considerar una concentración de 1,5 μM de BSAn.

Una vez seleccionadas las condiciones, se procedió al ensayo de titulación donde se agregaron 20 μL de solución acuosa de ANS 8 mM a 2 mL de dispersión de BSAnp, incluyendo BSAn (sin tratar) como control, y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia en el rango 400-600 nm, empleando una λ_{ex} de 390 nm. A partir de los espectros de emisión de fluorescencia de ANS (**Figura 17**), pudo observarse que la intensidad de fluorescencia disminuyó en todas las condiciones de tratamiento con respecto al control. A diferencia de lo observado en el análisis de fluorescencia intrínseca, no se observaron cambios apreciables en λ_{max} en ninguno de los tratamientos aplicados. Estos resultados indicarían que el tratamiento térmico resultaría en una menor disponibilidad de los sitios de unión de ANS en la proteína.

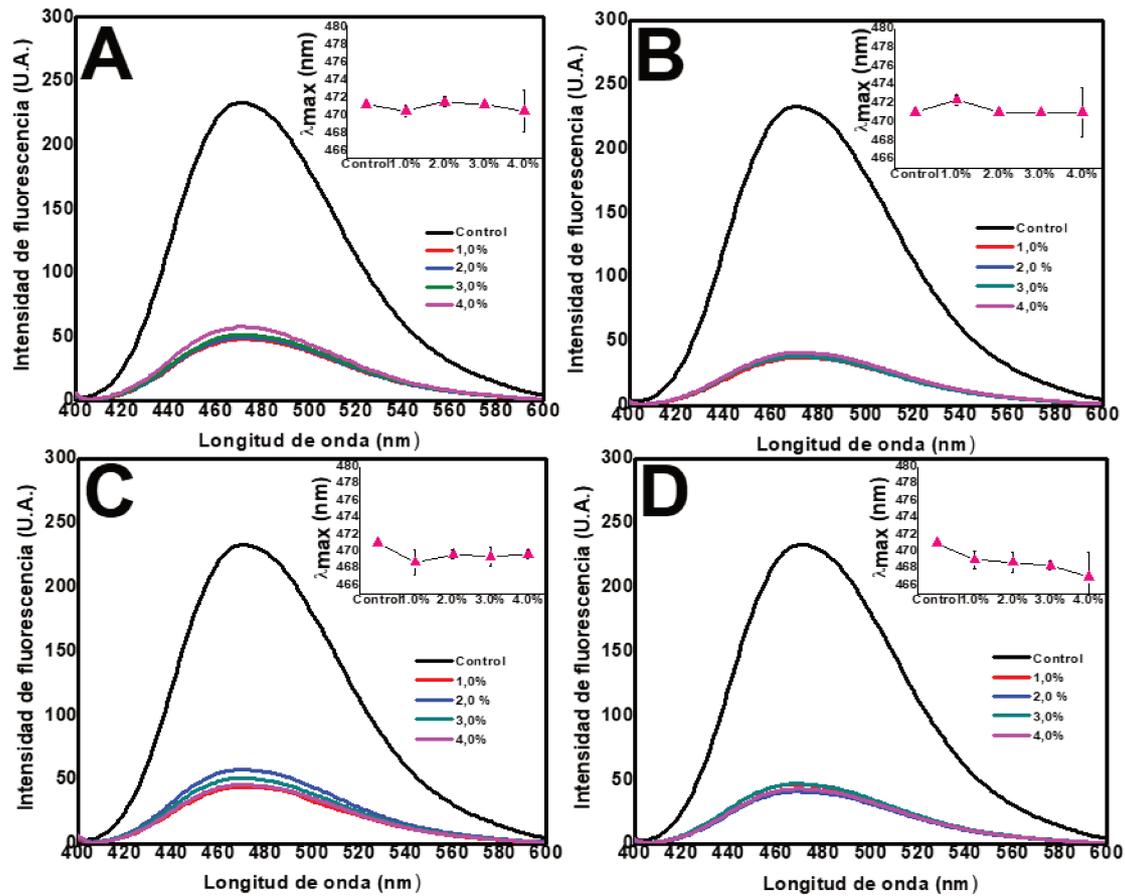


Figura 17. Espectros de emisión de fluorescencia extrínseca de BSA tratada térmicamente en diferentes concentraciones (1,0-4,0 % p/p) a 70°C-pH 9,0 (A), 70°C- pH 11,0 (B), 85°C-pH 9,0 (C) y 85°C-pH 11,0 (D) en comparación con BSA (Control, sin tratamiento). Los insertos en la parte superior de cada figura muestran la evolución de la λ_{max} de BSA tratada a cada concentración, en comparación con el control sin tratamiento.

La **Figura 18** muestra los cambios en la fluorescencia extrínseca expresada como intensidad de fluorescencia relativa (IFR_{ANS}). En este gráfico se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de IFR_{ANS} en BSA tratada en todas las condiciones evaluadas con respecto al control, poniendo en evidencia la oclusión de los sitios hidrofóbicos en BSA, quedando estos menos disponibles para la unión de ANS.

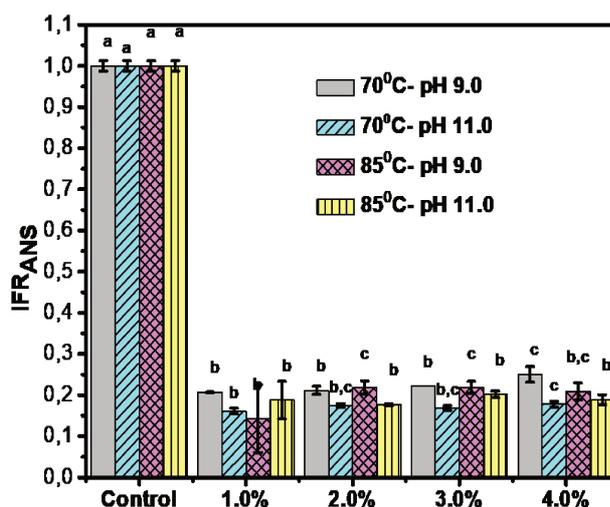


Figura 18. Intensidad de fluorescencia relativa del ANS (IFR_{ANS}) de BSA a diferentes concentraciones (1,0-4,0 %p/p) sometida a tratamiento térmico en diferentes condiciones: 70°C/pH 9,0, 70°C/pH 11,0, 85°C/pH 9,0, y 85°C/pH 11,0, en comparación con BSA no tratada (Control). Condiciones de medición: 0,01 % p/p BSA en PBS pH 7,4. $\lambda_{ex} = 390$ nm.

A partir de los resultados de fluorescencia extrínseca, podría deducirse que el tratamiento térmico de BSA produciría una disminución en la hidrofobicidad superficial debido a cambios conformacionales que involucran oclusión de residuos hidrófobos en un entorno molecular no polar. Estos cambios estructurales también podrían estar relacionados con el proceso de agregación térmica, lo cual se encuentra en concordancia con los resultados de fluorescencia intrínseca discutidos previamente. Aunque el análisis estadístico mostró algunas diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores IFR_{TTP} y IFR_{ANS} para varias concentraciones de BSA, se puede considerar que estas diferencias son prácticamente pequeñas (<6,0% para IFR_{TTP} y <7,5% para IFR_{ANS}).

Por lo tanto, los resultados de fluorescencia intrínseca y extrínseca evidenciarían que el tratamiento térmico aplicado, en todas las condiciones evaluadas, produciría la agregación térmica de monómeros de BSA el cual conduciría a la formación de nanopartículas de BSA (BSAnp). Si bien dentro de un mismo tratamiento las IFR a diferentes concentraciones de proteína arrojaron algunas diferencias significativas, estas fueron consideradas muy pequeñas, por lo que se definió 4,0%p/p la concentración de BSA más apropiada para la obtención de BSAnp. Para la identificación de los diferentes sistemas BSAnp, se estableció la siguiente nomenclatura en base a las condiciones de obtención: BSAnp-70-9 (resultante del tratamiento de BSA a 70°C/pH 9,0), BSAnp-70-11 (70°C/pH 11,0), BSAnp-85-9 (85°C/pH 9,0) y BSAnp-85-11 (85°C/pH 11,0).

3.4.2. Características fisicoquímicas y morfológicas de nanopartículas de BSA

Una vez corroborada la obtención de nanopartículas de BSA (BSAnp), se procedió a su caracterización fisicoquímica en términos de tamaño de partícula, peso molecular, carga neta superficial, y morfología.

3.4.2.1. Determinación de pesos moleculares por cromatografía rápida de proteínas (SEC-FPLC) y tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (DLS)

En primer lugar, se determinaron los pesos moleculares (PM) de los sistemas empleando cromatografía rápida de proteínas por exclusión molecular. Además, se analizó la distribución de tamaño de partícula por DLS. La **Figura 19** muestra los cromatogramas obtenidos por SEC-FPLC de los diferentes sistemas BSAnp, incluyendo BSAn como control (**Fig. 19A**). En paralelo, se muestran las distribuciones de tamaño de partícula en intensidad obtenidas por DLS para cada sistema (**Fig. 19B**).

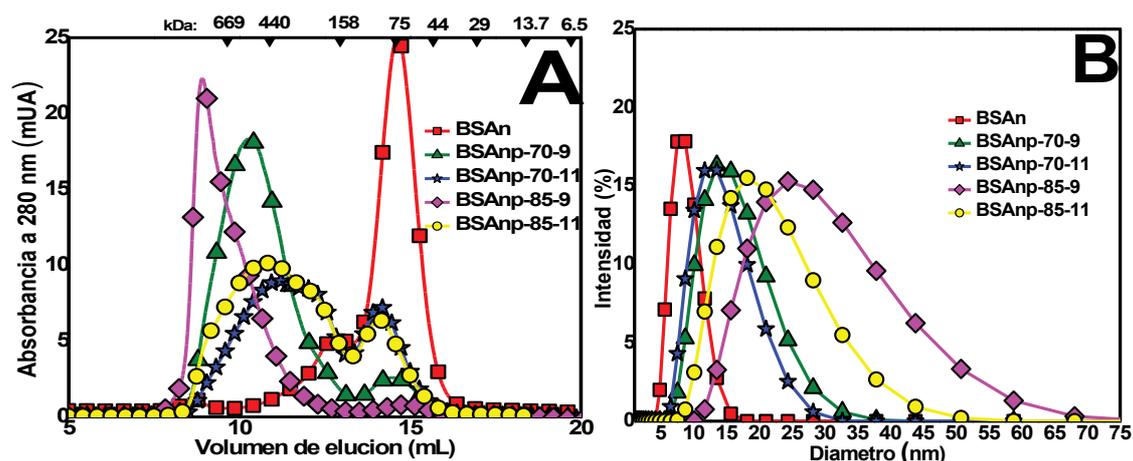


Figura 19. Cromatograma SEC-FPLC (A) y distribución de tamaño de partículas por DLS (B) de BSAn y BSAnp obtenidas bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Concentración de preparación: proteína 4,0% p/p. Las fechas en la parte superior en A indican los volúmenes de elución de las proteínas usadas como estándares en la calibración.

El análisis por SEC-FPLC permitió corroborar la existencia de diferentes poblaciones BSAnp, con valores de PM distintos al de la proteína en su estado nativo (BSAn). De los picos obtenidos en los cromatogramas se puede deducir que los distintos tratamientos térmicos aplicados resultarían en un proceso de agregación térmica de monómeros de BSAn, el cual dependería de las condiciones de pH y temperatura de tratamiento. Además, la naturaleza bimodal de las distribuciones de algunos cromatogramas indicaría que el proceso de agregación de BSA sería incompleto, lo cual podría deberse a la alta concentración proteica empleada (4,0% p/p) o a que el tiempo de tratamiento fue insuficiente.

Con el objeto de facilitar el análisis, la **Tabla 3** resume los valores de PM de cada pico obtenido por SEC-FPLC, diámetro hidrodinámico (d_H), Z-average e índice de polidispersidad (Pdl) obtenidos por DLS.

Tabla 3. Valores de PM obtenidos por SEC-FPLC, diámetro hidrodinámico (d_H) por DLS, Z-average e índice de polidispersidad (Pdl) de los sistemas BSA_n. Los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar y letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Entre paréntesis se indica el porcentaje de área total para pico SEC-FPLC, y el porcentaje en intensidad para el caso del d_H obtenido por DLS (picos con porcentaje de intensidad mayor al 15%).

| Sistema | PM (kDa) | d_H (nm) | Z-average | Pdl |
|--------------------------|--|--|-----------------------------|------------------------------|
| BSA _n | 1200 \pm 200 (7 %) 170 \pm 20 (17 %) 73 \pm 7 (76 %) | 8,4 \pm 0,1 ^a (83,2%) | 9,6 \pm 0,6 ^a | 0,34 \pm 0,04 ^d |
| BSA _n p-70-9 | 530 \pm 80 (69 %) 78 \pm 8 (31 %) | 15,4 \pm 0,1 ^c (94%) | 15,0 \pm 0,1 ^c | 0,23 \pm 0,01 ^c |
| BSA _n p-70-11 | 440 \pm 60 (70 %) 62 \pm 6 (30 %) | 13,6 \pm 0,2 ^b (92,4%) | 13,3 \pm 0 ^b | 0,24 \pm 0 ^c |
| BSA _n p-85-9 | 1000 \pm 200 (89 %) 66 \pm 6 (11 %) | 27,8 \pm 0,1 ^e (99,7%) | 24,7 \pm 0,2 ^e | 0,13 \pm 0 ^a |
| BSA _n p-85-11 | 590 \pm 90 (78 %) 90 \pm 10 (22 %) | 20,3 \pm 0,1 ^d (97,5%) | 18,7 \pm 0 ^d | 0,19 \pm 0,01 ^b |

En la tabla puede observarse que BSA_n, tiene un PM de 73 \pm 7 kDa y un d_H de 8,4 \pm 0,1 nm. Estos valores se encuentran en concordancia con lo reportado en bibliografía [21], [22]. Se observan también dos picos de gran tamaño que están presentes en un bajo porcentaje (<17%), probablemente debido a la presencia de dímeros y trímeros de BSA_n formados bajo las condiciones del ensayo (PBS pH 7,4, con una fuerza iónica de 0,17 M). El valor de Pdl para BSA_n fue cercano a 0,34, sugiriendo una polidispersidad moderada, probablemente debido a la presencia de dímeros y trímeros mencionada anteriormente.

Los diferentes tratamientos evaluados produjeron la agregación de BSA_n, lo cual resultó en la formación de BSA_np con d_H en el rango de 13-28 nm y pesos moleculares en el rango de 400-1.000 kDa. Los valores de Pdl fueron cercanos a 0,24, sugiriendo una polidispersidad moderada. Si bien las distribuciones fueron bimodales y se observó la presencia de picos correspondientes a BSA_n indicando una agregación incompleta, el porcentaje de BSA_n no superó el 31%, por lo que la población mayoritaria sería la correspondiente a BSA_np. Puede notarse que el aumento de la temperatura del tratamiento resultó en un aumento tanto del tamaño como del PM de BSA_np. Los sistemas obtenidos a la temperatura más alta, 85°C, presentaron mayores

d_H y PM (19-25 nm y 600-1.000 kDa) que los sistemas obtenidos a la temperatura más baja, de 70°C (13-15 nm, 400-600 kDa). Esta observación sugiere que el aumento de la temperatura de tratamiento produciría una mayor agregación de monómeros, obteniéndose agregados de mayor PM y gran tamaño. Para un mejor análisis, se graficó el PM de cada sistema en función de su d_H , observándose una correlación lineal entre los dos parámetros (**Figura 20**). De acuerdo con este gráfico, el incremento en el PM de BSA_{np} puede explicarse en un 94% por el incremento en el tamaño de partícula bajo las condiciones del ensayo.

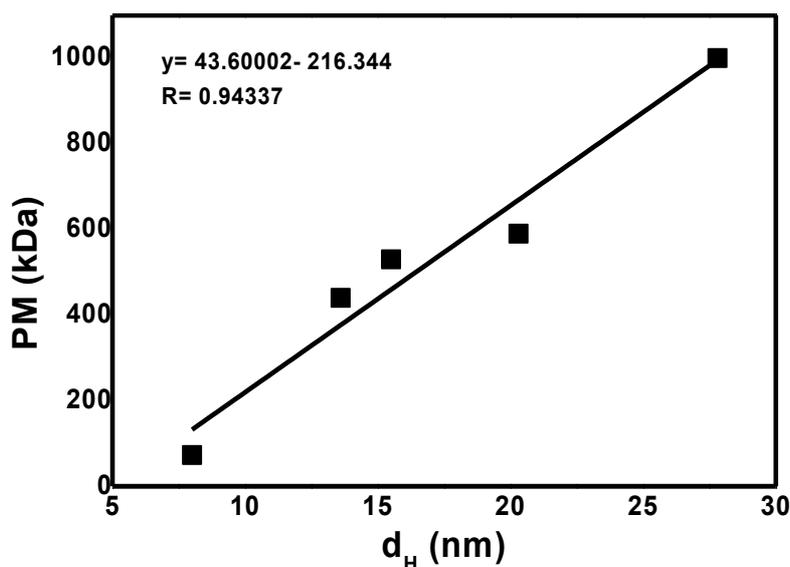


Figura 20. Correlación lineal entre el peso molecular (PM) de BSA_{np} determinada por SEC-FPLC y su diámetro hidrodinámico (d_H) determinado por DLS. Se muestran además la ecuación de la recta ajustada y el valor de R del ajuste.

Con respecto al efecto del pH, se observó que la distribución de PM observada en los cromatogramas de BSA_{np} obtenidas a pH 11,0 fue más amplia que para el caso de pH 9,0. Es importante remarcar que el pH del medio acuoso determina el tipo y distribución de cargas en la superficie de la proteína, lo cual afecta tanto al plegamiento de la misma como a las interacciones intermoleculares proteína-proteína. A esto se le sumaría el efecto de las distintas conformaciones adoptadas por BSA en dependencia del pH del medio acuoso [28], [27]. Por lo tanto, a elevados valores de pH la proteína tendría una mayor densidad de carga existiendo una mayor repulsión electrostática entre monómeros de BSA_{np}, la que se opondría al proceso de agregación, obteniéndose menores tamaños de partícula para BSA_{np} [128]. En estas condiciones, el proceso de agregación estaría gobernado por un balance entre las fuerzas de atracción de naturaleza hidrofóbica, promovidas por el proceso de calentamiento, y las fuerzas de repulsión electrostática promovidas por las condiciones de elevado pH del medio.

3.4.2.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las características morfológicas de las nanopartículas se estudiaron por AFM (Figura 21).

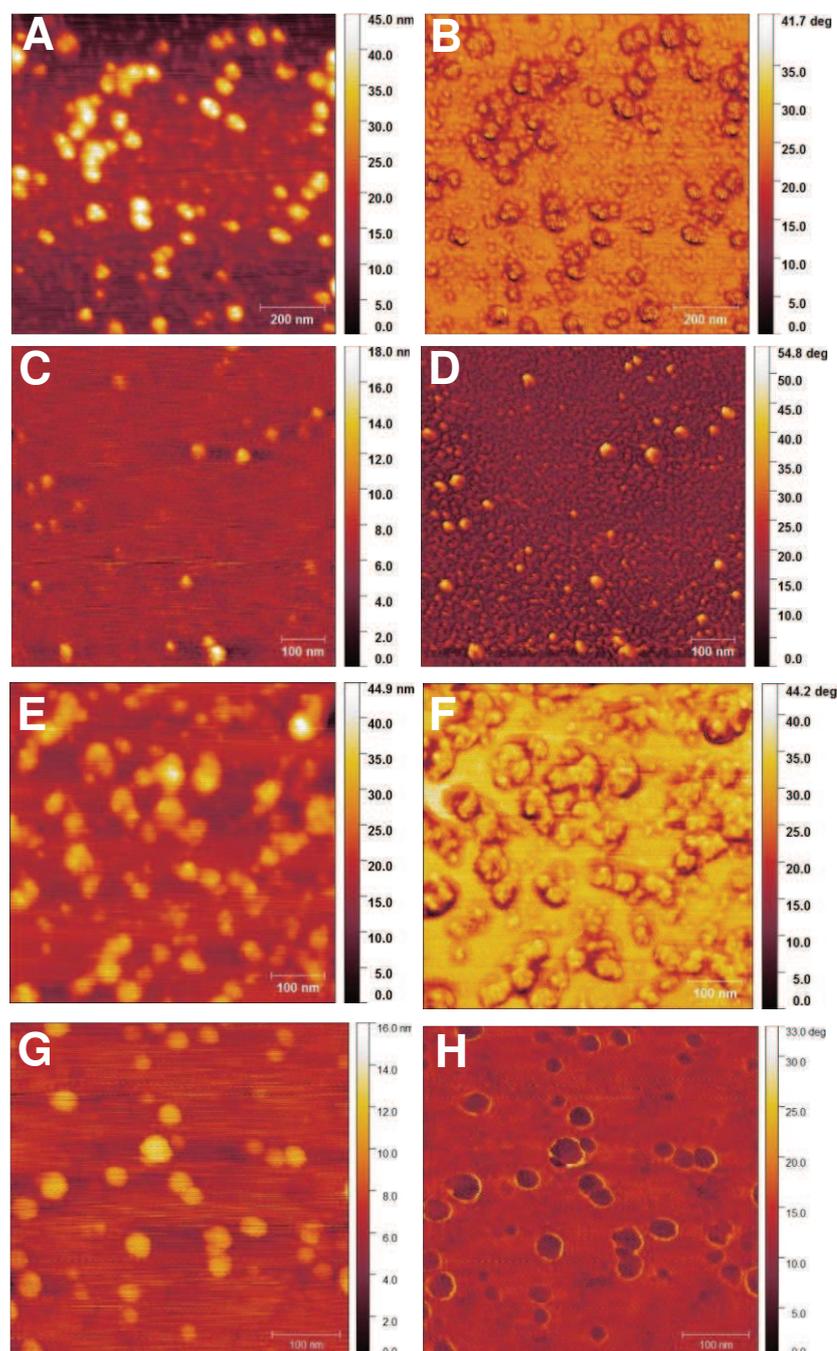


Figura 21. Características morfológicas topográficas y de fase por AFM de los sistemas BSA_np: BSA_np-70-9 (A-B), BSA_np-70-11 (C-D), BSA_np-85-9 (E-F), BSA_np-85-11 (G-H). La concentración de todos los sistemas fue de alrededor de $2,5 \times 10^{-5}$ % p/p.

Cabe señalar que las partículas observadas por esta técnica tienen una relación diámetro/altura muy alta como se observa en las imágenes. Esto podría deberse a que, durante la etapa de secado de la preparación de la muestra, las

partículas se aplastan sobre la superficie de mica [145]. De esta manera, el d_H calculado por DLS, que incluye la capa de solvatación que rodea a la partícula en solución, no podría compararse con el estimado por AFM.

Las imágenes topográficas y de fase de todos los sistemas BSA_{np} evidenciaron partículas con una forma redondeada. Los cuatro sistemas BSA_{np} estudiados mostraron un diámetro promedio comprendido entre 30 y 50 nm, observándose algunas partículas de tamaño inferior. Estas nanopartículas más pequeñas podrían ser resultado de un proceso de agregación incompleta, y no fueron detectadas en el análisis por DLS dado que frecuentemente en esta técnica las partículas más grandes, al producir mayor dispersión de luz, enmascaran a las más pequeñas. Debido a las razones explicadas anteriormente, el diámetro de partícula estimado por AFM fue mayor que el determinado mediante DLS, observándose la misma tendencia de disminución del tamaño de partícula al aumentar el pH. A una misma temperatura de tratamiento, la altura de BSA_{np} obtenida a pH 11,0 (12-35 nm) fue menor a la correspondiente a la BSA_{np} obtenida a pH 9,0 (20-40 nm).

3.4.3. Formación de nanocomplejos entre nanopartículas de BSA y crisina

Una vez obtenidos y caracterizados los distintos sistemas de BSA_{np}, se evaluó la carga de estos con el flavonoide Cris.

3.4.3.1. Fluorescencia intrínseca

La interacción entre Cris y BSA_{np} fue evaluada mediante mediciones de fluorescencia intrínseca. La fluorescencia intrínseca de una proteína es debida a los residuos aminoácidos aromáticos Tyr, Phe y Trp. Tal como se explicó anteriormente, la fluorescencia intrínseca en BSA_n es atribuida principalmente al residuo Trp₂₁₂. Como consecuencia de la interacción entre la proteína y un ligando, la emisión de fluorescencia intrínseca puede variar, resultando en un aumento o disminución de la misma.

Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n y BSA_{np} a concentraciones crecientes de Cris (0-140 μ M) se muestran en la **Figura 22**. Pudo observarse que el agregado de Cris produjo una disminución de la emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n (**Figura 22A**). Esta disminución podría atribuirse a un proceso de *quenching* del Trp₂₁₂, siendo consistente con lo reportado previamente en la bibliografía [41]. En cuanto a los sistemas BSA_{np} (**Figura 22B-E**), la fluorescencia intrínseca inicial (sin agregado de Cris) fue menor debido a un proceso de *self-quenching* resultante del proceso de agregación térmica durante la formación

de BSAnp. Al agregar Cris, la fluorescencia intrínseca disminuyó en todos los sistemas, indicando que la interacción BSAnp-Cris resultaría en un proceso de *quenching* de fluorescencia del Trp₂₁₂. Con respecto a λ_{\max} , para el caso de BSAn se observó un desplazamiento hipsocrómico, es decir, hacia el azul (de 342 nm a 335 nm) mientras que para el caso de BSAnp se observó un desplazamiento batocrómico, es decir, hacia el rojo (de 335 nm a 340 nm).

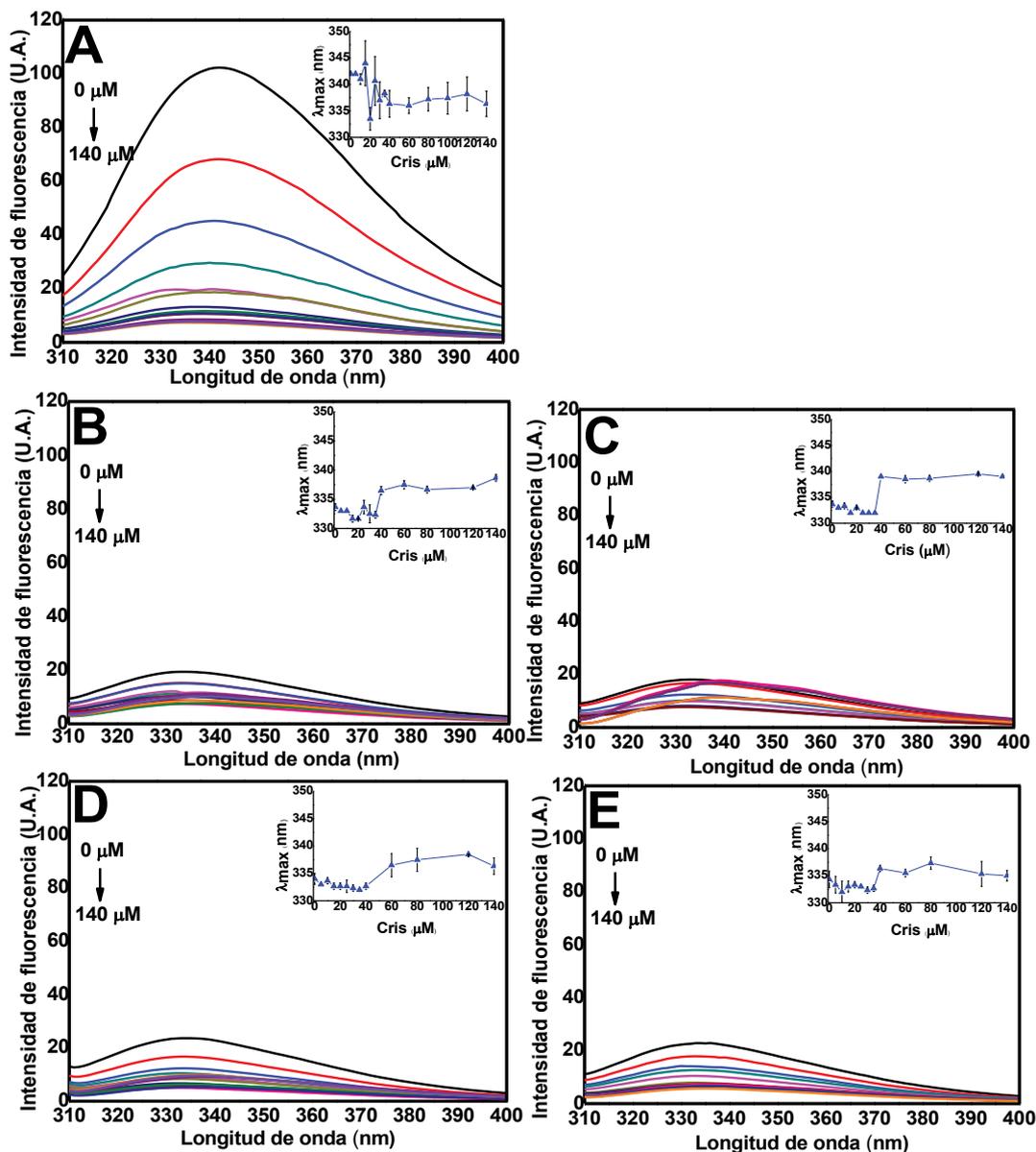


Figura 22. Intensidad de fluorescencia intrínseca de BSAn (A), BSAnp-70-9 (B), BSAnp-70-11 (C), BSAnp-85-9 (D), BSAnp-85-11 (E) tras el agregado de concentraciones crecientes de Cris. En el inserto de cada figura se muestra la evolución de λ_{\max} con la concentración de Cris. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

Para facilitar el análisis, se obtuvieron los gráficos de la evolución de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR_{Trp}) en función de la concentración de Cris, tal como se muestra en la **Figura 23**. En estos gráficos puede observarse que la adición

de Cris resultó en una reducción gradual de IFR_{Trp} , alcanzando la saturación a $\sim 40 \mu\text{M}$. Este comportamiento podría ser atribuido a la formación de un complejo entre los sistemas proteicos (BSAn y BSAnp) y Cris que resultaría en un proceso de *quenching* de la fluorescencia del Trp_{212} . Esta interacción BSAn-Cris fue anteriormente estudiada a pH fisiológico (pH 7,4) y se reportó que la formación del complejo involucra un proceso de *quenching* estático, donde la fuerza intermolecular predominante sería del tipo hidrofóbica, con una constante de unión de $1,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a 25°C [41].

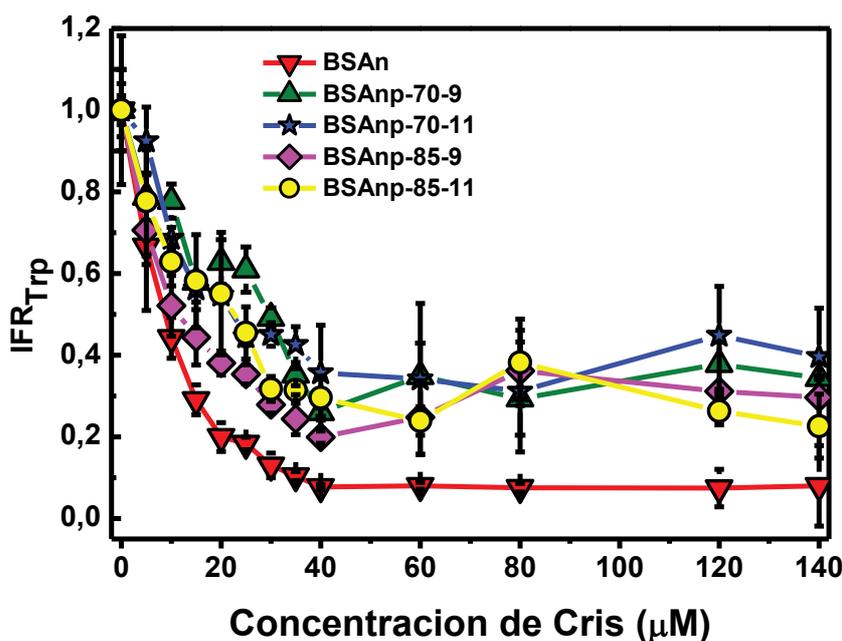


Figura 23. Intensidad de fluorescencia relativa del Trp (IFR_{Trp}) de BSAn y los sistemas BSAnp a concentraciones crecientes de Cris. Todos los sistemas fueron diluidos en PBS pH 7,4 hasta 0,01 % p/p y se agregaron alícuotas de Cris en DMSO en el rango 0-140 μM . $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$.

Es importante señalar que las cantidades de DMSO agregadas ($<2,5\%$ v/v) durante la titulación no produjeron cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca (Apéndice, sección 8.1). Además, la ausencia de solapamiento entre el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de BSAn y el de absorción UV-Vis de Cris (Apéndice, sección 8.2) permitió corroborar que la fluorescencia intrínseca no se encontraría afectada por la absorción de luz de Cris.

En base a estas observaciones pudo deducirse que Cris se une tanto a BSAn como a BSAnp en sitios cercanos al Trp_{212} , produciendo un apagamiento de su emisión de fluorescencia. En el caso de BSAn, la unión de Cris produciría un cambio conformacional que involucraría una traslocación del Trp_{212} hacia un ambiente menos polar, lo cual es evidenciado en el desplazamiento hacia el azul de λ_{max} . Por el contrario, la unión de Cris a BSAnp involucraría un movimiento del Trp_{212} desde un

ambiente de menor polaridad hacia uno más polar, lo cual se evidencia en el efecto batocrómico anteriormente mencionado para estos sistemas.

Con el objeto de caracterizar la unión de Cris a BSAnp, los datos de IFR_{TP} fueron ajustados al modelo de Scatchard modificado [129] y se calcularon los parámetros n (número de moléculas de Cris unidas por monómero de BSA) y K_A (constante de asociación), cuyos valores se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Número de sitios de unión por monómero de BSA (n_m), constante de afinidad (K_A) obtenidos por ajuste al modelo de Scatchard. El número de sitios de unión por vehículo (n_v) se calculó en base al peso molecular presente en mayor porcentaje en cada sistema. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Sistema | n_m | n_v | $K_A (10^6 M^{-1})$ | R |
|-------------|------------------|----------------|---------------------|----------|
| BSAn | 10 ± 2^a | 10 ± 2^a | $1,5 \pm 0,5^a$ | $> 0,93$ |
| BSAnp-70-9 | $17 \pm 4^{b,c}$ | 96 ± 17^b | $3,2 \pm 0,5^{a,b}$ | $> 0,89$ |
| BSAnp-70-11 | 18 ± 1^c | 114 ± 11^b | $3,2 \pm 0,5^{b,c}$ | $> 0,93$ |
| BSAnp-85-9 | $13 \pm 2^{a,b}$ | 237 ± 55^c | $2,0 \pm 0,5^{a,b}$ | $> 0,95$ |
| BSAnp-85-11 | 19 ± 2^c | 143 ± 6^b | $3,8 \pm 0,5^c$ | $> 0,90$ |

El valor de n_m fue mayor en los sistemas BSAnp en comparación con BSAn, lo cual indicaría que los cambios conformacionales inducidos por la temperatura durante la formación de BSAnp resultarían en la exposición de un mayor número de sitios de unión para Cris. Sin embargo, no se observó una relación clara entre n y las variables del tratamiento térmico, por lo que es de esperar que cada sistema BSAnp tenga un modo especial de unir Cris. Adicionalmente, se calculó el número de moléculas unidas por vehículo (n_v) en base al PM de cada sistema BSAnp, lo cual representaría la carga molecular real de Cris en BSAnp. Como puede deducirse, los sistemas BSAnp presentaron mayor capacidad de carga que BSAn. Esta carga aumentó con el tamaño de vehículo, y consecuentemente con la temperatura de tratamiento. En base a estos resultados, puede decirse que los sistemas BSAnp fueron capaces de incorporar Cris en mayor medida que la proteína en su estado nativo. Con respecto a la constante de afinidad, los valores de K_A obtenidos fueron en el orden de los $10^6 M^{-1}$, y mostraron un incremento significativo para BSAnp con respecto a BSAn. Además, se observó que la magnitud de K_A fue mayor en los sistemas obtenidos a pH 11,0 (BSAnp-70-11 y BSAnp-85-11), lo cual podría sugerir que el pH de obtención de BSAnp tendría un efecto sobre la afinidad de unión del flavonoide a las nanopartículas.

3.4.3.2. Fluorescencia extrínseca

Con el objeto de obtener algún conocimiento sobre la unión entre BSA_np y Cris, se evaluó la fluorescencia extrínseca de los sistemas a concentraciones crecientes de Cris (0-140 μM). La **Figura 24** muestra los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca, es decir, debido a la unión de ANS a la superficie de la proteína. En ellos puede observarse una disminución de la fluorescencia extrínseca al aumentar la concentración de Cris, no observándose cambios significativos en la λ_{max} .

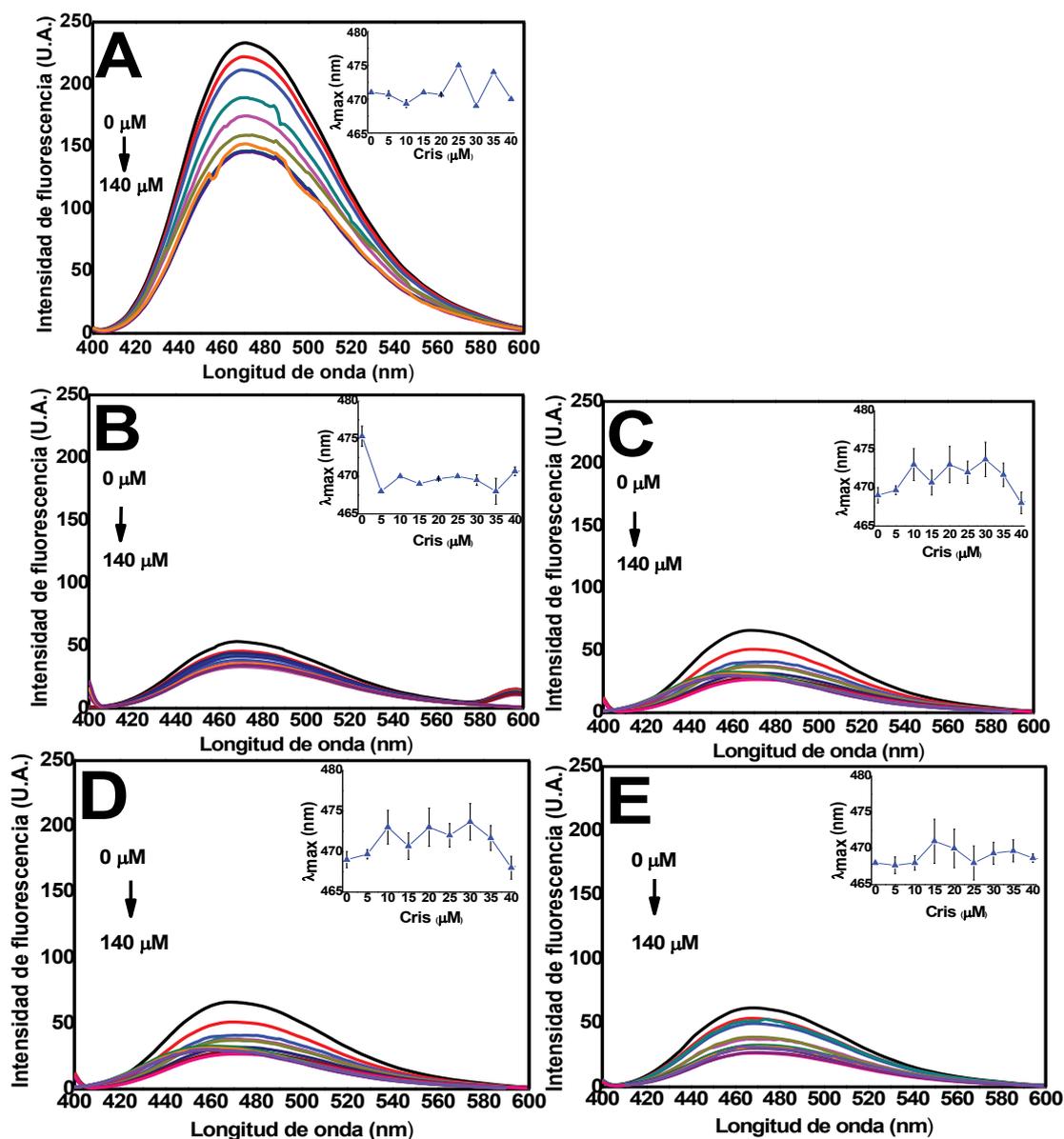


Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia extrínseca de BSA_n (A), BSA_np-70-9 (B), BSA_np-70-11 (C), BSA_np-85-9 (D), BSA_np-85-11 (E) luego de la adición de concentraciones crecientes de Cris. En la misma figura se muestra como inserto la evolución de λ_{max} con la concentración de Cris. $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$.

Las curvas de evolución de IFR_{ANS} en función de la concentración de Cris muestran la misma disminución gradual al aumentar la concentración del ligando

(Figura 25), indicando que la unión de Cris promovería una disminución de la disponibilidad de los sitios de unión de ANS tanto en BSA_n como en BSA_np.

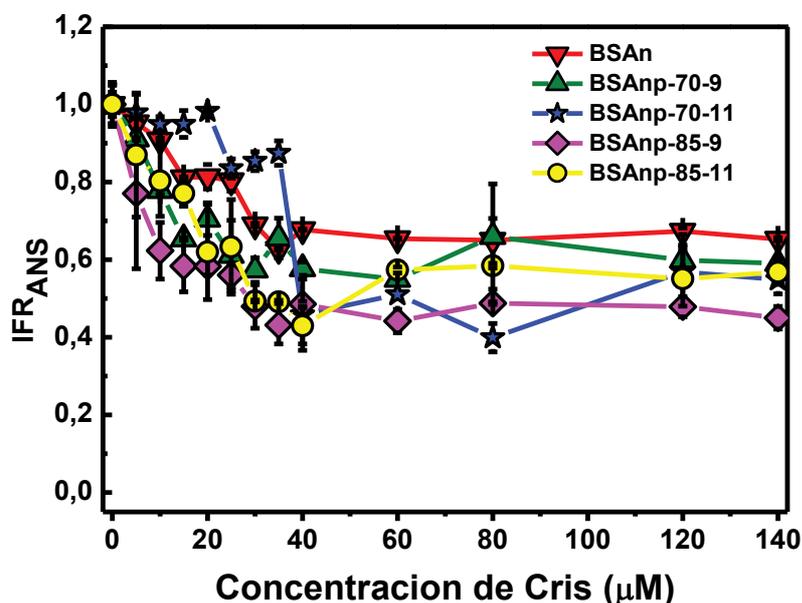


Figura 25. Intensidad de fluorescencia relativa del ANS (RFIANS) de BSA_np-70-9 (A), BSA_np-70-11 (B), BSA_np-85-9 (C) and BSA_np-85-11 (D) a concentraciones crecientes de Cris, en comparación con BSA_n. Todos los sistemas fueron diluidos en PBS pH 7,4 hasta 0,01 % p/p y se agregaron alícuotas de Cris en DMSO en el rango 0-140 μM. λ_{ex} : 390 nm.

En concordancia con los resultados de fluorescencia intrínseca, la fluorescencia extrínseca alcanzó la saturación a ~40 μM. Debido a que la unión de ANS se produce a nivel de regiones hidrofóbicas en la proteína, estos resultados sugerirían que la formación de BSA_np mediante un proceso de agregación inducido por calor conllevaría la oclusión de sitios hidrofóbicos y una disminución de la hidrofobicidad superficial en BSA_np en comparación con la proteína nativa.

3.4.3.3. Distribución de tamaño de partícula y potencial ζ de nanocomplejos con crisina

La **Figura 26** muestra las distribuciones de tamaño de partícula de los distintos sistemas BSA_np, con y sin carga de Cris. En la **Tabla 5** se detallan los resultados de d_H y potencial ζ comparando los sistemas antes y después del agregado de Cris. Se observó que las distribuciones de todos los sistemas BSA_np sin carga de Cris fueron monomodales, mientras que tras la carga con Cris las distribuciones presentaron un pico de mayor tamaño. De acuerdo a los resultados anteriormente discutidos, todos los sistemas BSA_np, tanto con como sin carga de Cris, mostraron un incremento en el d_H en comparación con BSA_n. Los sistemas BSA_np obtenidos a 70°C mostraron un ligero incremento en el tamaño tras la carga con Cris (**Figura 20A**). Por el contrario, este

incremento no fue observado en los sistemas BSAnp obtenidos a 85°C (**Figura 20B**). Por otro lado, la carga de Cris resultó en un incremento en el índice de polidispersidad (Pdl) de los sistemas, lo cual influyó directamente en el valor de Z-average reportado. Esto puede ser atribuido a la presencia de Cris libre, no unida o incorporada en BSAnp, que permanece insoluble en suspensión.

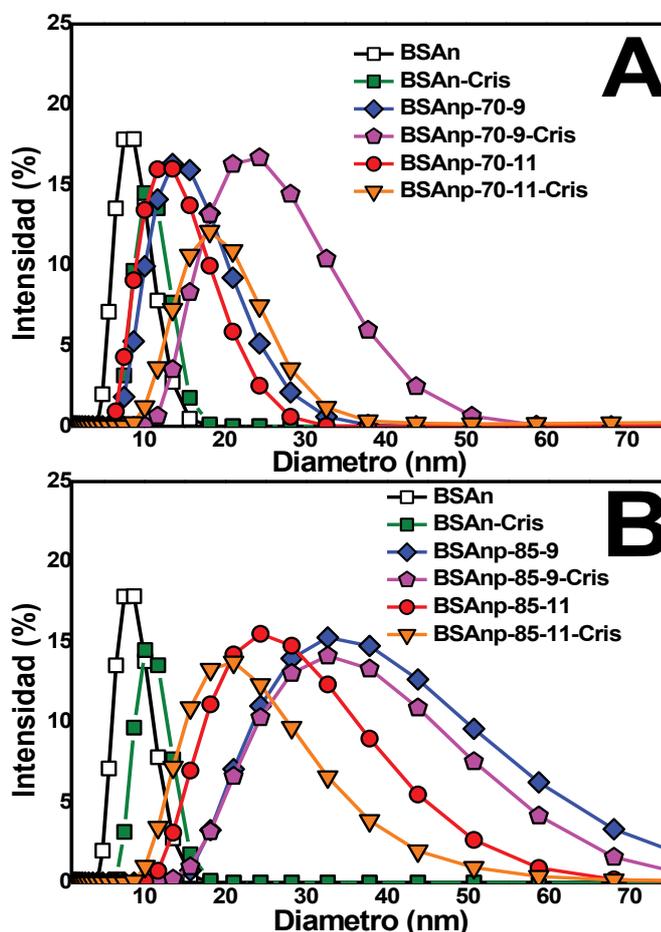


Figura 26. Distribución del tamaño de partículas basado en intensidad (%) de BSAnp con y sin carga de Cris en comparación con BSAn: BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 (A), BSAnp-85-9 y BSAnp-85-11 (B). Las determinaciones fueron realizadas en PBS pH 7,4, a una concentración proteica de 0,05% p/p.

En relación con la carga neta superficial de las nanopartículas, los valores de potencial ζ obtenidos fueron de alrededor de -10 mV para los sistemas BSAnp sin carga de Cris. Tras la carga con Cris, estos valores se tornaron ligeramente más negativos, hasta valores entre -11 mV y -12 mV. Estos resultados son consistentes con los valores de potencial ζ reportados para nanopartículas de BSA cargadas con Cris preparadas mediante el método de desolvatación [59], cuyo d_H medido por DLS fue de alrededor de 127 nm. Como fue explicado anteriormente, es generalmente aceptado que las suspensiones de nanopartículas son coloidalmente estables si sus valores de potencial ζ se encuentran en el rango ± 30 mV [146]. De acuerdo con esta

premisa, los sistemas BSA_np serían coloidalmente inestables. Por otro lado, en aplicaciones de administración parenteral la carga neta superficial de las nanopartículas es un factor importante ya que determina si las mismas interactuarán unas con otras formando agregados en circulación, o si interactuarán con proteínas y otros componentes de la sangre rodeándose de una “corona” formada por macromoléculas de carga opuesta. Se ha propuesto que las nanopartículas con una ligera carga negativa podrían minimizar este contacto con componentes de la sangre, los cuales tienen una considerable carga negativa [61].

Tabla 5. Diámetro hidrodinámico (d_H), Z-average, índice de polidispersidad y potencial ζ de BSA_n y los sistemas BSA_np con y sin carga de Cris. Los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Entre paréntesis se indican los porcentajes en intensidad de cada población cuya distribución de tamaño resultó ser bimodal.

| Sistema | d_H (nm) | Z-average | Pdl | ζ (mV) |
|-------------------------------|---|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| BSA _n | Pico 1 (83 %): $8,4 \pm 0,1^b$ Pico 2 (13 %): 833 ± 431^c | $9,6 \pm 0,6^a$ | $0,34 \pm 0,04^d$ | $-9,9 \pm 0,3^{c,d}$ |
| BSA _n -Cris | Pico 1 (50%): $8,06 \pm 0,03^a$ Pico 2 (35%): 35 ± 1^a | 56 ± 15^c | $0,5 \pm 0,1^e$ | $-11,3 \pm 0,2^b$ |
| BSA _n p-70-9 | Pico 1 (94%): $15,4 \pm 0,1^e$ Pico 2 (6%): 3910 ± 162^g | $15,0 \pm 0,1^{a,b}$ | $0,23 \pm 0,01^{b,c}$ | $-9,5 \pm 0,6^d$ |
| BSA _n p-70-9-Cris | Pico 1 (59%): $16,4 \pm 0,4^f$ Pico 2 (40%): $353 \pm 30^{a,b}$ | 66 ± 12^c | $0,27 \pm 0,02^{c,d}$ | $-11,2 \pm 0,6^b$ |
| BSA _n p-70-11 | Pico 1 (92 %): $13,6 \pm 0,2^c$ Pico 2 (6 %): 3058 ± 59^f | $13,3 \pm 0^{a,b}$ | $0,24 \pm 0^e$ | $-9,8 \pm 0,1^{c,d}$ |
| BSA _n p-70-11-Cris | Pico 1 (59%): $14,2 \pm 0,1^d$ Pico 2 (40%): $237 \pm 112^{a,b}$ | 195 ± 24^d | $0,52 \pm 0,02^b$ | $-13,0 \pm 0^a$ |
| BSA _n p-85-9 | Pico 1 (99.7%): $27,8 \pm 0,1^j$ Pico 2 (0,4%): 1403 ± 477^d | $24,7 \pm 0,2^{a,b}$ | $0,13 \pm 0^{c,d}$ | $-10,8 \pm 0,6^{b,c}$ |
| BSA _n p-85-9-Cris | Pico 1 (90%): $26,3 \pm 0,2^i$ Pico 2 (8%): 2094 ± 374^e | 28 ± 1^b | $0,30 \pm 0,01^a$ | $-10,9 \pm 0,4^{b,c}$ |
| BSA _n p-85-11 | Pico 1 (97,5%): $20,3 \pm 0,1^h$ Pico 2 (2,5%): 4222 ± 231^g | $18,7 \pm 0^{a,b}$ | $0,19 \pm 0,01^{a,b}$ | $-11,8 \pm 0,4^b$ |
| BSA _n p-85-11-Cris | Pico 1 (86%): $17,1 \pm 0,2^g$ Pico 2 (11%): 632 ± 259^c | $18 \pm 1^{a,b}$ | $0,34 \pm 0,02^d$ | -14 ± 2^a |

3.4.3.4. Microscopía electrónica de transición (TEM)

Se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de transición (TEM) de los sistemas BSA_np, con y sin carga de Cris. Las imágenes (**Figura 27**) evidencian la presencia de partículas de forma esférica, tamaño homogéneo y de buena dispersión, lo cual es consistente con la morfología observada por AFM. No se detectó la presencia de agregados, lo cual sugiere que las nanopartículas tienen una naturaleza

compacta y una relativa estabilidad, pudiendo ser consideradas como entidades individuales.

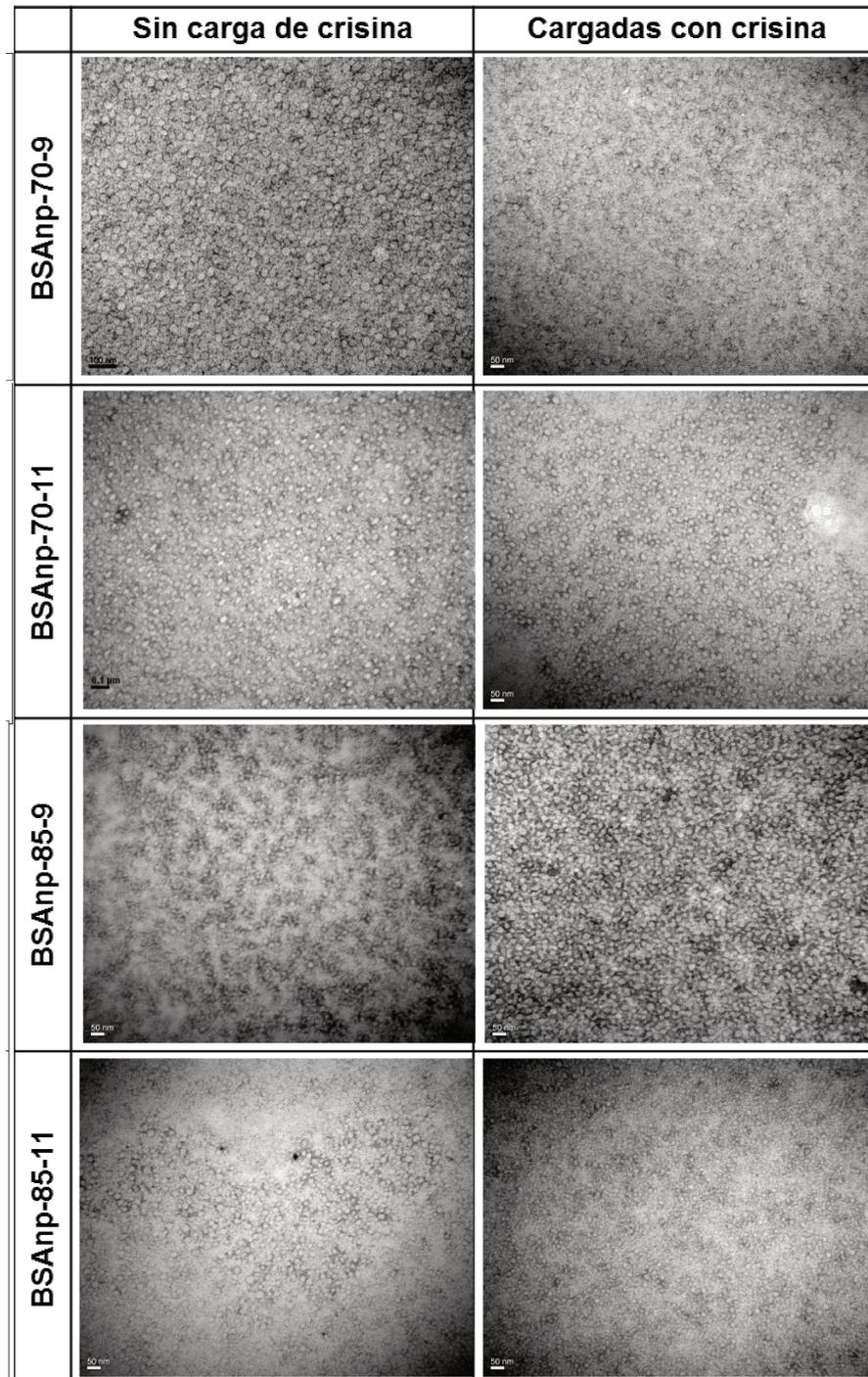


Figura 27. Imágenes obtenidas por TEM de cada sistema BSAnp, con y sin carga de Cris.

Por lo tanto, los valores de potencial ζ obtenidos que sugieren que los sistemas son coloidalmente inestables, pueden explicarse considerando la alta fuerza iónica del PBS (0,17 M) en el cual fueron realizadas las mediciones, la cual podría enmascarar parcialmente la carga neta superficial de BSAnp. Con respecto a los sistemas BSAnp

cargados con Cris, se observó que la inclusión de Cris no produjo cambios notables en el tamaño de BSA_{np}, en concordancia con lo observado por DLS.

3.4.3.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de crisina

Finalmente, se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) de Cris en los diferentes sistemas BSA_{np} aplicando un método indirecto, es decir, por cuantificación de Cris libre o no encapsulada. Los valores obtenidos de EE y LC se muestran en la **Tabla 6**. La mayor EE se obtuvo para el sistema BSA_{np}-85-9 (84% ± 2%), seguido del sistema BSA_{np}-85-11 (65% ± 2%). Los sistemas obtenidos a 70°C (BSA_{np}-70-9 y BSA_{np}-70-11) presentaron valores de EE más bajos, en el rango 44-47%, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores para ambos sistemas. En general, se observó que, a mayor tamaño de nanopartícula, la eficiencia de encapsulación fue mayor. La misma tendencia fue observada en los valores de capacidad de carga (LC), que se encontraron en el rango de 2-7 µg Cris/mg proteína. Por lo tanto, los sistemas con mayor número de monómeros de BSA asociados presentan mayor tamaño y consecuentemente mayor número de sitios de unión de Cris, lo cual resultaría en una mayor EE y LC.

Tabla 6. Eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC) de Cris en nanocomplejos formados con BSA_n y con los diferentes sistemas BSA_{np}. Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar ($n > 3$) y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Sistema | EE (%) | LC (µg Cris/mg proteína) |
|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| BSA _n | 25 ± 2 ^a | 2,1 ± 0,2 ^a |
| BSA _{np} -70-9 | 44 ± 3 ^b | 3,6 ± 0,2 ^b |
| BSA _{np} -70-11 | 47 ± 2 ^b | 3,8 ± 0,2 ^b |
| BSA _{np} -85-9 | 84 ± 2 ^d | 6,9 ± 0,1 ^d |
| BSA _{np} -85-11 | 65 ± 2 ^c | 5,3 ± 0,2 ^c |

3.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permitieron cumplir con los objetivos iniciales del trabajo de Tesis, en cuanto al estudio de la obtención de nanopartículas a partir de la proteína BSA_n, aplicando tratamientos térmicos. Se obtuvieron diferentes BSA_{np} por tratamiento térmico controlado en diferentes condiciones de pH (9,0 y 11,0) y temperatura (70°C y 85°C) y se determinó que la concentración más adecuada para la obtención de BSA_{np} fue 4,0% p/p. La formación

de BSAnp involucraría un proceso de agregación térmica de monómeros de BSAn. En cuanto a sus características fisicoquímicas, las BSAnp presentaron forma esférica y diferentes d_H en el rango de 14-28 nm, PM en el rango de 400-1.000 kDa y potenciales ζ cercanos a $-10,0$ mV. A pH 11,0 se obtuvieron tamaños de partícula menores que a pH 9,0, con una distribución de PM más amplia. Por lo tanto, a elevados valores de pH existiría una mayor repulsión electrostática entre monómeros de BSA, la que se opondría al proceso de agregación, obteniéndose menores tamaños de partícula.

Las BSAnp fueron cargadas con el flavonoide Cris y la unión fue corroborada y caracterizada a través de técnicas espectroscópicas. Se determinó la unión de Cris a BSAn y BSAnp se produjo a nivel del Trp₂₁₂, resultando en un apagamiento de su fluorescencia y un cambio conformacional que resultaría en un aumento de la polaridad del microentorno del residuo. Se estimó que un número de 96-237 moléculas de Cris se unieron a BSAnp con una constante de afinidad en el rango de $2,0-3,8 \times 10^6$ M⁻¹. La máxima eficiencia de encapsulación de Cris en BSAnp fue $\sim 84\%$, para el sistema de mayor tamaño (BSAnp-85-9), representando una capacidad de carga de $6,9 \mu\text{g}$ Cris/mg proteína. Las eficiencias de encapsulación obtenidas se correlacionaron con el tamaño y PM de los sistemas. Todos estos hallazgos podrían ser de interés práctico en el desarrollo de nanopartículas biocompatibles para la vehiculización de compuestos bioactivos y drogas.

4. CAPÍTULO 2

**Obtención de nanopartículas
liofilizadas cargadas con crisina.
Evaluación de su actividad
antitumoral y liberación
gastrointestinal**

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Liofilización de proteínas y nanopartículas proteicas

Uno de los objetivos del desarrollo farmacéutico es obtener una formulación de producto que garantice una estabilidad adecuada en el tiempo. Esto es de fundamental importancia en el caso en que el principio activo sea de naturaleza proteica, dada la baja estabilidad en el tiempo de las proteínas en solución. El proceso más comúnmente utilizado para convertir soluciones o suspensiones en sólidos de suficiente estabilidad para su distribución y almacenamiento en el campo farmacéutico es la liofilización. La liofilización es un proceso industrial que consiste en eliminar el agua de una muestra congelada mediante sublimación y desorción al vacío [147], [148].

Sin embargo, este proceso puede alterar la estructura del principio activo durante las etapas de congelación y secado [149], [150], [151]. Es conocido que la liofilización puede producir modificaciones en la estructura de proteínas conduciendo a su desnaturalización, debido a: (i) la baja temperatura, (ii) la formación de cristales de hielo durante la etapa de congelamiento, que conduce a la crio-concentración de la solución, cambios de pH y separación de fases, y (iii) la remoción de la capa de hidratación de la proteína durante la etapa de secado [148].

En el caso particular de las nanopartículas proteicas, el proceso de liofilización puede producir cambios en sus propiedades superficiales que podrían promover la agregación de las mismas. La formación de agregados irreversibles, incapaces de volver a dispersarse en medio acuoso en nanopartículas con propiedades conservadas conllevaría un aumento de la polidispersidad del sistema luego de la reconstitución del polvo [152], [153], [154]. Por lo tanto, la evaluación de la conservación de las características fisicoquímicas de la nanopartícula después de la reconstitución del polvo es un aspecto necesario de la investigación.

Con el objeto de evitar estas modificaciones, se agregan comúnmente excipientes que protegen al principio activo del estrés por congelamiento (crioprotector) o del secado (lioprotector). Los crioprotectores más utilizados son los azúcares, entre ellos la trehalosa, sacarosa, glucosa y manitol [148], [153].

Aunque el principal uso de la liofilización en el campo de las nanopartículas coloidales es mejorar su estabilidad a largo plazo, la liofilización también se ha aplicado para otros propósitos, como la mejora de la asociación de fármacos a nanopartículas, la preparación de nanopartículas core-shell, la obtención de formas

farmacéuticas sólidas para determinaciones analíticas (por ejemplo, para análisis térmico).

4.1.2. Estrategias contra el cáncer de mama

Durante los últimos 50 años, ha habido un progreso formidable en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados y en el desarrollo de terapias contra el cáncer. Sin embargo, la enfermedad continúa siendo un desafío muy grande para la salud [116].

En general, los tumores de CM que expresan receptores hormonales (RE y RP) se denominan hormono-dependientes y son candidatos para la terapia hormonal como primera opción. Alrededor de un 70% de los casos de CM responden a la terapia hormonal [155], para los cuales pueden administrarse moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (MSRE) o inhibidores de aromatasa (IA). El fármaco del grupo MSRE más conocido es el tamoxifeno, que actúa como inhibidor del receptor de estrógenos, uniéndose al mismo y bloqueando la acción de los estrógenos sobre el tejido mamario. Por su parte, los IA actúan mediante la inhibición de la enzima aromatasa, responsable de catalizar el paso fundamental en la biosíntesis de estrógenos, y entre los IA más utilizados se encuentran el letrozol, anastrozol y exemestano [155], [15].

Por otro lado, se conoce que alrededor del 30% de los tumores de CM sobreexpresan el gen HER2, que codifica la glicoproteína transmembrana P185^{HER2} que actúa como receptor de HER2. La sobreexpresión de HER2 está asociada a un fenotipo clínicamente agresivo de tumor de CM. En estos casos, frecuentemente se indica la terapia con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de HER2. Esta opción no es posible para tumores que no expresan estos receptores, incluyendo tumores triple negativo (TNBC), para los cuales puede indicarse terapias con bevacizumab (anticuerpo monoclonal que reconoce el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF, asociado a metástasis por estar implicado en la angiogénesis) [15].

Con respecto a la quimioterapia, la modalidad actual consiste en la administración de fármacos basados en moléculas citotóxicas, tales como paclitaxel, doxorrubicina, docetaxel, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, entre otros. Sin embargo, estos fármacos son altamente tóxicos, se distribuyen inespecíficamente en el organismo, requieren de altas dosis y producen una amplia variedad de efectos adversos. Por lo tanto, los tratamientos actuales implican numerosos efectos secundarios, que se asocian a la alta toxicidad y baja especificidad del principio activo,

especialmente pérdida del apetito, caída del cabello, inmunodepresión, debilidad, fatiga, menopausia prematura y desarrollo de tumores resistentes [156].

Para evitar estos inconvenientes, una tendencia en el tratamiento es la vehiculización de principios activos antineoplásicos en sistemas a nanoescala. Esta estrategia ofrece numerosas ventajas, como la mejora de la solubilidad y estabilidad del fármaco, la protección frente a la degradación y la excreción y prolongación de la vida media, que en última instancia derivan en una mejor biodistribución y minimización de efectos secundarios. Existen formulaciones de medicamentos antineoplásicos inyectables que involucran nanopartículas de albúmina sérica, específicamente albúmina sérica humana (HSA, apta para uso parenteral). Se puede considerar al producto Abraxane como el principal desarrollo en el campo de estudio, desde su aprobación por FDA en EE.UU. para el tratamiento de cáncer de mama metastásico, que consiste en nanopartículas de albúmina que encapsulan paclitaxel (*nab-technology*).

Por otro lado, ha surgido como estrategia contra el cáncer la quimioprevención, la cual se basa en el uso de compuestos químicos no tóxicos de origen sintético o natural que ejercen su acción en múltiples etapas de la carcinogénesis, con el objeto de inhibir, revertir o retrasar la misma [157]. Entre los compuestos naturales que se han propuesto para quimioprevención del cáncer se encuentran los flavonoides, y dentro de este grupo, se destaca crisina (Cris). Debido a su abundancia en plantas y sus efectos beneficiosos para la salud, se ha propuesto a este flavonoide como potencial agente bioactivo para ser utilizado en terapias quimiopreventivas y tratamiento contra el cáncer.

4.1.3. Crisina en terapias contra el cáncer de mama

En los últimos años, se ha investigado la actividad antitumoral del flavonoide Cris y se ha reportado que presenta citotoxicidad frente a una gran variedad de líneas celulares tumorales de CM, en concentraciones que varían entre 5 μM y 120 μM [109], [120], [158].

Para evaluar el efecto *in vitro* de un compuesto bioactivo sobre la proliferación de líneas celulares tumorales, se recurre a ensayos de viabilidad celular donde se incuban las células en medio de cultivo junto con el compuesto disuelto en un solvente de vehiculización, generalmente dimetilsulfóxido (DMSO), en el cual la mayor parte de los compuestos bioactivos presentan alta solubilidad. Entre las líneas celulares de CM empleadas, se encuentran las líneas MCF-7 (hormono-dependiente) y MDA-MB-231 (hormono independiente, por derivar de un tumor TNBC). Los estudios publicados

sobre la citotoxicidad de Cris sobre ambas líneas celulares mostraron que Cris reduce la viabilidad celular de una manera dosis-dependiente, tras una exposición mayor a 24 h [159], [160]. Según estos estudios, Cris a una concentración de 20 μM redujo significativamente la viabilidad de células MCF-7 luego de 72 h de tratamiento [159], siendo el principal mecanismo de muerte la inducción de apoptosis. Por otro lado, Cris presentó efectos antiproliferativos sobre células MDA-MB-231 en concentraciones que varían entre 20 y 100 μM [115], [159], en tiempos de exposición entre las 48 h y 56 h. Al contrario del efecto observado sobre las células MCF-7, la reducción de la viabilidad de células MDA-MB-231 no estaría relacionada a la inducción de apoptosis.

Además, es interesante destacar que Cris ejerce citotoxicidad preferencial sobre células tumorales por sobre las líneas celulares no tumorales. En este sentido, se ha reportado que líneas celulares de tejidos normales, como las de fibroblastos y células epiteliales son mucho más resistentes al efecto citotóxico de Cris (a una concentración de 20 μM , tras incubación por 72 h) en comparación con líneas celulares de cáncer [83]. Esto permitiría la administración de Cris en terapias selectivas contra el cáncer, minimizando los efectos tóxicos sobre células normales y tejidos sanos.

La combinación de Cris con agentes citotóxicos normalmente utilizados en la quimioterapia tradicional es una estrategia que ha permitido disminuir la dosis del principio activo, resultando en un efecto sinérgico. En este aspecto, se ha reportado que Cris, además de ejercer actividad citotóxica por sí misma, también es capaz de incrementar la actividad antitumoral de drogas utilizadas en quimioterapia contra el CM, entre ellas la doxorubicina [161], el metotrexato [162] y el 5-fluoruracilo [163].

A pesar de su actividad frente a células tumorales y su potencial como agente quimiopreventivo, Cris presenta como principal limitante una baja solubilidad en medio acuoso. Por lo tanto, surge la necesidad de la búsqueda de estrategias que permitan su solubilización y administración. Entre ellas, la nanotecnología ofrece la posibilidad de aumentar la solubilidad en agua, mejorar la biodisponibilidad del activo, proteger contra la degradación o reacciones no deseadas como la oxidación, y retrasar el metabolismo y excreción. En este sentido, se sabe que, tras su administración por vía oral, Cris es conjugada y excretada rápidamente [109], [158]. En consecuencia, se han realizado varios esfuerzos de desarrollo de sistemas de nanopartículas para la vehiculización de Cris [117], [85]. Entre las estrategias utilizadas, se ha reportado la encapsulación de Cris en diferentes tipos de vehículos, entre los que se destacan los sistemas de liposomas [164], micelas [165] y nanopartículas poliméricas [123], [124]. Dentro de las nanopartículas poliméricas, se han empleado diferentes polímeros,

como el quitosano, ciclodextrinas, ácido poliláctico-glicólico (PLGA) [166], [167] y proteínas como las albúminas [60]. Este último enfoque es de especial interés dado que se considera a las albuminas como vehículos biocompatibles y seguros para administración en humanos. Sin embargo, los métodos más estudiados y utilizados para la vehiculización de Cris en nanopartículas de albúminas son la emulsificación y la desolvatación previamente descritos, por lo que la obtención de nanopartículas de albúminas por tratamiento térmico proporciona un método sencillo, de bajo costo, que evita el uso de solventes tóxicos e incompatibles con el medio ambiente, eliminando a su vez variables para la posterior optimización del proceso.

4.1.4. Modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*

En los últimos años, la aplicación de la nanotecnología para la encapsulación de bioactivos y su incorporación en alimentos funcionales constituye un área de interés creciente. Por lo tanto, surge como estrategia de quimioprevención de enfermedades la incorporación de bioactivos en la forma de nanosuplementos. A su vez, los nanosuplementos pueden mejorar propiedades de los compuestos bioactivos, como su solubilidad, la residencia en el tracto gastrointestinal, características de su liberación y eficiencia de absorción intestinal [168], [169].

Luego de ser ingeridos, los alimentos son sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal. Este proceso puede estudiarse utilizando varios métodos o modelos, incluyendo modelos *in vitro* estáticos o dinámicos, cultivos celulares y *ex vivo*, en animales y humanos. En particular, dentro de los modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* pueden distinguirse los modelos estáticos de los dinámicos [170]. Los métodos estáticos son los más simples, incluyen dos o tres etapas de digestión (oral, gástrica e intestinal) y los productos derivados permanecen en gran medida inmóviles en un solo biorreactor estático. Recientemente, se alcanzó un consenso internacional dentro del *COST Action Infogest* [171] y se publicó un protocolo consenso [172], [173] que desde entonces ha sido utilizado internacionalmente. Por lo tanto, los modelos estáticos son los más rápidos y simples, pero debido a que no reproducen el entorno dinámico del tracto gastrointestinal, se utilizan predominantemente para estudios de digestión en alimentos simples y componentes de alimentos aislados o purificados. Por otro lado, en los modelos dinámicos las condiciones dentro de los diferentes compartimentos cambian con el tiempo para simular los procesos de digestión que ocurren *in vivo*. Pueden incluir diferentes secreciones digestivas que se agregan a los compartimentos del modelo en diferentes tiempos, control de pH en tiempo real, la adición de un paso duodenal (donde se neutraliza el pH del quimo), la inclusión de fuerzas físicas a las

que normalmente son sometidos los alimentos (por ejemplo, movimientos peristálticos), y otros factores para mejorar la emulación del proceso.

En base a lo anteriormente expuesto, en este capítulo de tesis se obtuvo una formulación liofilizada de los sistemas BSA_np cargados con Cris, se comprobó la conservación de sus propiedades fisicoquímicas tras la liofilización, y se evaluó su actividad antitumoral *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer de mama. Para evaluar el potencial uso de BSA_np para la encapsulación de compuestos bioactivos en forma de nanosuplementos para la prevención y/o tratamiento del CM, se examinó la liberación de Cris a partir de las nanopartículas luego de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando un modelo estático.

4.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos planteados en este capítulo son:

Objetivo 1: Obtener una formulación mediante liofilización de nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con crisina.

Objetivo 2: Evaluar los cambios en las propiedades térmicas y fisicoquímicas de las nanopartículas tras el proceso de liofilización y reconstitución del polvo.

Objetivo 3: Estudiar los efectos de los polvos reconstituidos sobre líneas celulares de cáncer de mama.

Objetivo 4: Evaluar la liberación de crisina a partir de las nanopartículas bajo condiciones de digestión gastrointestinal.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Materiales

Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA_n, pureza $\geq 96\%$) y Cris (pureza $\geq 96.5\%$) adquiridos en Sigma Aldrich (EE. UU.). Las sales Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl y KCl, fueron obtenidas de Cicarelli (Argentina). El DMSO fue adquirido en Biopack (Argentina). El manitol fue adquirido en Cicarelli (Argentina) y su fracción insoluble fue $<0,01\%$ p/p. Los solventes utilizados para los análisis cromatográficos fueron obtenidos de Pharmco Aaper y Sintorgan y todos fueron de calidad HPLC. Los materiales para cultivos celulares fueron adquiridos en Corning (Princeton, N. J., EE. UU.). El medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el reactivo sustituto de tripsina TrypLE™ fueron adquiridos en Gibco (Gaithersburg, M. D., EE. UU.). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido en Internegocios S.A. (Argentina). Las

sondas fluorescentes anexina V, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ioduro de propidio (IP) y la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fueron adquiridas en Invitrogen Corporation (Buenos Aires, Argentina). La pepsina de la mucosa gástrica porcina (P7000), la pancreatina del páncreas porcino (P7545), el extracto de bilis porcino (B8631), la hemoglobina (H2500), el clorhidrato de éster metílico de N α -p-Tosyl-L-arginina (TAME, T4626) y el inhibidor de proteasas (P2714) se adquirieron de Sigma (EE. UU.). Todos los materiales se almacenaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

4.3.2. Preparación de nanopartículas de albúmina sérica bovina

Se prepararon los sistemas de nanopartículas obtenidos y caracterizados en el Capítulo 1 de la presente tesis, de acuerdo con el procedimiento detallado en la sección 3.3.2. Brevemente, se prepararon dispersiones de BSA_n 4,0% p/p en solución acuosa de NaCl 50 mM, se filtraron con membrana de éster de celulosa de 0,45 μ m y se ajustó el valor de pH de estas a 9,0 y 11,0 por agregado de NaOH 1 M. Se dispensaron 2 mL de dispersión de BSA_n en tubos de vidrio con tapa a rosca y se sumergieron en un baño termostatzado durante 5 min a dos temperaturas: 70°C y 85°C, para obtener los sistemas de nanopartículas: BSA_np-70-9, BSA_np-70-11, BSA_np-85-9 y BSA_np-85-11. Una vez finalizado el tratamiento térmico, los tubos fueron inmediatamente enfriados en baño de hielo. Se utilizó una dispersión de BSA_n (sin tratamiento térmico) como control. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis.

4.3.3. Formación de nanocomplejos con crisina y ensayos de turbidez

En primer lugar, con el objeto de evaluar la concentración máxima de Cris que es posible agregar a la suspensión de BSA_np sin que ocurra precipitación de Cris libre, se realizaron mediciones de absorbancia a 600 nm, como una medida estimativa de la turbidez del sistema [44]. La turbidez puede medirse por este método como absorbancia a 400 nm o a 600 nm. Debido a que el espectro de absorción de Cris tiene un máximo cercano a 400 nm, se empleó la absorbancia a 600 nm.

Para ello, se diluyeron todos los sistemas BSA_np en PBS pH 7,4 hasta una concentración final de proteína de 0,05% p/p. Paralelamente, se preparó una solución stock de Cris 100 mM en DMSO. Luego, se dispensaron 5 mL de dispersión de BSA_np en tubos de vidrio y se agregaron alícuotas crecientes de solución stock de Cris hasta una concentración final de Cris comprendida en el rango 200-2.000 μ M, con incrementos de 200 μ M. Inmediatamente después del agregado de Cris, los tubos se

agitaron en vórtex. El porcentaje final de DMSO en cada tubo fue <2,5% v/v por lo que fue considerado despreciable, ya que se comprobó que en esas concentraciones no produce modificaciones sobre estructura de la proteína (Capítulo 1, sección 3.4.3.1). Los tubos se dejaron equilibrar durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se realizaron mediciones de absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Jenway modelo 7305 (Reino Unido) y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. En forma previa a cada medición de absorbancia, se agitó el tubo con la muestra con el objeto de registrar la turbidez inicial. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente (20°C).

4.3.4. Producción de polvos liofilizados de nanopartículas

4.3.4.1. Obtención de polvos liofilizados de nanopartículas de BSA cargadas con crisina

Para obtener los polvos liofilizados de BSA_np y BSA_n con y sin carga de Cris se preparó una formulación líquida con manitol como agente crioprotector. Para ello, en primer lugar, se diluyeron los sistemas en PBS pH 7,4 hasta una concentración proteica de 1,0% p/p. Para los sistemas cargados con Cris, se agregó solución stock de Cris (100 mM, en DMSO) hasta una concentración final de 400 µM. Luego, se agregó una mezcla de PBS (pH 7,4) y manitol 10% p/p hasta obtener una solución de liofilización con las siguientes concentraciones finales de componentes: 0,5% p/p BSA_n, 200 µM Cris y 5% p/p manitol. Se dispensaron 25 mL de cada solución de liofilización en cristalizadores (90 mm de diámetro) y se congelaron en freezer a -20°C durante 24 h. Finalmente, se liofilizaron utilizando un liofilizador Alpha 1-4 LDplus (Christ, Osterode, Alemania) a una temperatura de bandeja de -60°C y presión de $2,1 \times 10^{-3}$ mbar.

4.3.4.2. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas tras la reconstitución de los polvos liofilizados

Para evaluar si las propiedades de los sistemas de nanopartículas tras la liofilización se conservan, se reconstituyeron muestras de cada liofilizado agregando la misma cantidad de agua eliminada durante la liofilización. Para ello, se pesaron 0,35 g de muestra en frascos por duplicado y se agregaron 5 mL de agua Milli-Q. Las muestras se dejaron hidratar y equilibrar durante 24 h a temperatura ambiente y se efectuaron los análisis detallados a continuación.

4.3.4.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

4.3.4.2.1.1. Fundamentos de calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por las siglas en inglés de *Differential Scanning Calorimetry*) se encuentra comprendida entre las técnicas de

análisis térmico, enfocadas en estudiar y establecer la relación entre la temperatura y las propiedades físicas de materiales. DSC se basa en la medición de la diferencia del flujo de calor absorbido o liberado por una muestra en comparación con un material de referencia, cuando ambos son sometidos a cambios de temperatura controlados [174]. Los componentes básicos de un calorímetro DSC son: una cámara u horno en cuyo interior se colocan posicionadas simétricamente dos celdas: una celda de muestra y una celda de referencia, un sensor y un registrador de datos. Durante un experimento típico de DSC, se proporciona un flujo de calor a velocidad constante simultáneamente a la muestra y a un material de referencia del cual se conoce que no sufre cambios en el intervalo de temperaturas de trabajo. Se registra la diferencia en el flujo de calor que hay que suministrar a la muestra y a la referencia para que ambas se mantengan en la misma temperatura. Esta diferencia está dada por la capacidad calorífica (C_P) de la muestra: si el C_P de la muestra es mayor, habrá que proporcionar mayor flujo de calor para mantener constante la temperatura con respecto a la referencia. A presión constante, el C_P es igual a la derivada parcial del cambio de entalpía (ΔH) con respecto a la temperatura (T) (Ecuación 8):

$$C_P = \left(\frac{\Delta H}{\Delta T} \right)_P \quad (\text{Ec. 8})$$

Por lo tanto, es posible medir por DSC la función entalpía a través de la integración del C_P (Ecuación 9):

$$H(T) = \int_{T_0}^T C_P dT + H(T_0) \quad (\text{Ec. 9})$$

En las curvas típicas de DSC o termogramas (**Figura 28**) se representa el flujo de calor en función de la temperatura, y a partir de ellos es posible detectar cambios endotérmicos o exotérmicos. Las transiciones de primer orden producen picos, como por ejemplo los procesos de cristalización de azúcares o de fusión del agua, lípidos u otros compuestos. Por otro lado, las transiciones de segundo orden producen saltos en el flujo de calor, como lo es la transición vítrea. A partir de estos datos, es posible determinar temperaturas de fusión, cristalización, y de transición vítrea de materiales, y el valor de ΔH asociado.

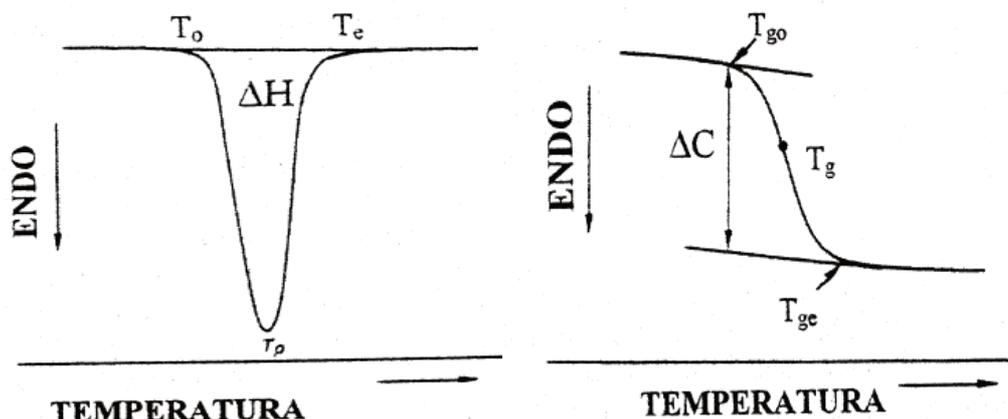


Figura 28. Representaciones esquemáticas de termogramas DSC obtenidos para un proceso endotérmico de primer orden (A) y para un proceso endotérmico de segundo orden (B).

En el estudio de biopolímeros como las proteínas, esta técnica permite además estudiar procesos de desnaturalización y agregación de una proteína en solución (Gill y col., 2010). La desnaturalización térmica de proteínas es una transición de primer orden que ocurre al calentar la proteína en su estado nativo, siempre en presencia de una cantidad importante de agua. En general, la cantidad de calor requerida para la transición es muy pequeña, del orden de los $20 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$. La temperatura correspondiente al punto medio de la transición (T_m) es aquella a la cual el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada, mientras que el otro 50% permanece en su estado nativo. Esta temperatura es característica de cada proteína y depende del pH, fuerza iónica y de la velocidad de calentamiento.

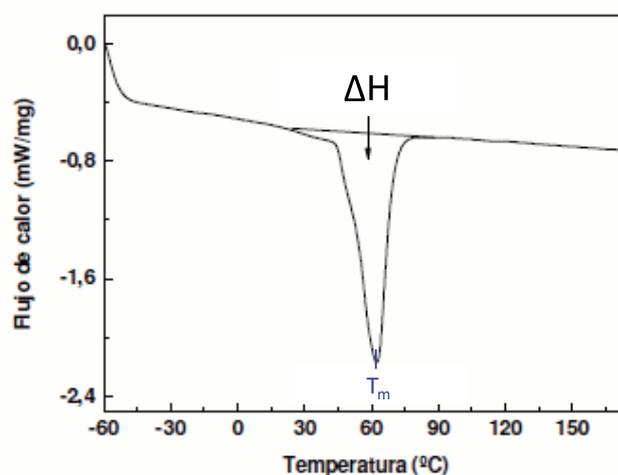


Figura 29. Representación esquemática del termograma DSC obtenido para la desnaturalización térmica de una proteína.

4.3.4.2.1.2. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido

Se analizaron las propiedades térmicas de BSA_np antes y después de liofilizar mediante DSC utilizando un calorímetro Q2000 (TA Instruments, EE. UU.), cuyo rango

de temperatura de trabajo de celda es de -180°C a 400°C . Para ello, se dispensaron $20\ \mu\text{l}$ de dispersión de cada sistema (4,0% p/p de concentración proteica final, pH 7,4) en celdas de aluminio herméticas Tzero (TA Instruments, Suiza) y se registraron los termogramas en el rango $20-80^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Con el objeto de evaluar el efecto del proceso de liofilización sobre las transiciones térmicas de la proteína, se incluyó BSA_n como control.

4.3.4.2.2. Distribución de tamaño de partículas por DLS y potencial ζ

Se determinó la distribución del tamaño de partículas (PSD) de BSA_n y BSA_np por dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) equipado con un láser He-Ne de una longitud de onda de salida de 638,8 nm y un ángulo de dispersión de 90° . El diámetro hidrodinámico de partícula fue obtenido a partir de PSD_i. La curva PSD_v se generó a partir de PSD_i aplicando la teoría de Mie, y fue utilizada para identificar poblaciones mayoritarias. Para realizar las transformaciones, se utilizó un valor de índice de refracción del analito de 1,45, un índice de refracción del solvente de 1,33 y un valor de absorción de 0,001. A su vez, se determinó el valor de potencial ζ a partir de la distribución de la movilidad electroforética de las partículas, aplicando la técnica de velocidad de láser Doppler y la ecuación de Smoluchowski. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado a temperatura ambiente (25°C).

Con el objeto de examinar las principales diferencias entre el tamaño de partícula y la carga superficial de los sistemas antes y después de liofilizar, se calculó la relación entre el valor obtenido antes y después de liofilizar del diámetro de partícula promedio (relación PS) y potencial ζ (relación ZP), como sigue:

$$\text{Relación PS} = \frac{PS_d}{PS_a} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$\text{Relación ZP} = \frac{ZP_d}{ZP_a} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde PS_d y PS_a son los valores de tamaño de partícula obtenidos después y antes de liofilizar, respectivamente, mientras que ZP_d y ZP_a se refieren a los valores de potencial ζ obtenidos después y antes de liofilizar, respectivamente. Según lo propuesto por Fang et al (2009) [141], si la relación se encuentra entre 0,7 y 1,3 (es decir, representa un cambio de $\pm 30\%$ en el parámetro) el sistema de nanopartículas presenta una buena redispersión acuosa, con lo que puede considerarse que el tamaño hidrodinámico de partícula y la carga superficial se encuentran conservadas.

4.3.4.2.3. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de crisina en polvos

Se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) de los polvos reconstituidos aplicando el método de extracción de Cris libre y posterior cuantificación por RP-HPLC, mediante el procedimiento descrito anteriormente (Capítulo 1, sección 3.3.5.3). En primer lugar, se ajustó el pH de las muestras de polvos resuspendidos hasta el punto isoeléctrico de BSA_n (4,7-4,8). Luego, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 30 min para lograr la precipitación de los complejos BSA_n-Cris y BSA_np-Cris, quedando Cris libre en suspensión. Se transfirieron 3 mL de sobrenadante a tubos Falcon limpios, se agregaron 2 mL de acetato de etilo (mezcla 3:2 agua-acetato de etilo), y se centrifugó a 8.000 g durante 10 min, para lograr la separación de las fases. Se tomaron 500 µl de fase orgánica (acetato de etilo), se colocaron en frascos color caramelo con tapa y se evaporó el solvente bajo corriente de gas N₂ hasta sequedad. Las muestras fueron redisueltas agregando 500 µl de metanol para cuantificación de Cris por RP-HPLC en las mismas condiciones anteriormente descritas. Una vez obtenida la cantidad de Cris libre, y conociendo la cantidad total de Cris agregada en la formulación, se calculó la EE de la siguiente manera (Ecuación 12):

$$EE (\%) = \frac{Cris_T - Cris_L}{Cris_T} \times 100 \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde $Cris_T$ corresponde a la cantidad total de Cris presente en la dispersión BSA_np-Cris y $Cris_L$ es la cantidad de Cris libre determinada por RP-HPLC.

La capacidad de carga (LC) se calculó como la masa de Gen cargada en el vehículo (en µg) por miligramo (mg) de proteína (Ecuación 13):

$$LC \left(\frac{\mu g \text{ Gen}}{mg \text{ proteína}} \right) = \frac{\mu g \text{ Gen}_T - \mu g \text{ Gen}_L}{mg \text{ proteína}} \quad (\text{Ec. 13})$$

4.3.5. Evaluación de la actividad antitumoral in vitro de los polvos resuspendidos

4.3.5.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para la evaluación de la actividad antitumoral de los polvos resuspendidos se utilizaron líneas celulares humanas de cáncer de mama: MCF-7 (hormono dependiente) y MDA-MB-231 (hormono independiente) (Corning, USA).

La línea celular MCF-7 fue establecida en 1973 desde una efusión pleural de una mujer caucásica de 69 años con cáncer de mama metastásico, que probó poseer respuesta ante la administración de hormonas [175]. El carcinoma a partir del cual deriva la línea es de tipo ductal invasivo, cuyas células proliferan en presencia de

estrógeno. Las células presentan morfología epitelial, conservando algunas características del epitelio mamario diferenciado, incluyendo la capacidad de producir estradiol a partir de estrógeno presente en el citosol. En cuanto a sus marcadores moleculares, las células expresan RE y RP, no presentando expresión de HER2 [176], y se clasifican bajo el subtipo luminal A. Se determinó que las células son no invasivas, de baja agresividad y bajo potencial metastásico. Debido a la presencia de receptores hormonales y a presentar crecimiento en respuesta a hormonas, esta línea es considerada un modelo idóneo para estudiar la actividad antitumoral basada en drogas anti-estrogénicas como, por ejemplo, el tamoxifeno.

Por su parte, la línea celular MDA-MB-231 fue derivada de un adenocarcinoma mamario metastásico de una mujer caucásica de 51 años, en el M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute [177] por lo que pertenece a la serie MDA de líneas celulares de cáncer de mama. Presenta morfología epitelial, siendo las células altamente agresivas, invasivas y pobremente diferenciadas. Es una línea celular que no expresa RE, PR, ni HER2 por lo que es considerada triple negativa [176]. Debido a la ausencia de receptores hormonales, esta línea es frecuentemente utilizada en investigación sobre terapias no hormonales.

En este trabajo, las líneas celulares fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% p/p de suero fetal bovino (SFB), 100 IU/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, y se subcultivaron utilizando TrypLE™ en microplacas de 96 pocillos durante 24 h.

4.3.5.2. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT

En primera instancia se evaluaron los efectos antiproliferativos de los sistemas utilizando el ensayo colorimétrico MTT [178]. Este ensayo se basa en la reducción metabólica de la sal bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a un compuesto coloreado de color azul oscuro (formazán). La reducción es realizada por enzimas mitocondriales succinato deshidrogenasas presentes en las células a evaluar, por lo que la cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas en fase de crecimiento exponencial. Las mediciones de absorbancia relativas a un control determinan el porcentaje restante de las células viables después de su tratamiento con concentraciones del compuesto a ensayar, por lo cual este ensayo es utilizado para evaluar actividad citotóxica de drogas con precisión y rapidez.

Para realizar el ensayo, las células MCF-7 y MDA-MB-231 (5×10^3 células/pocillo) fueron tratadas con soluciones reconstituidas (a una concentración final

de 100 μ M Cris) a 37°C por 72 h, seguido de incubación con 0,5 mg/mL MTT por 3 h. La concentración de Cris utilizada corresponde a la reportada como efectiva en estudios previos sobre la acción de Cris sobre células MCF-7 y MDA-MB-231 [115], [159]. Se midió el desarrollo de color espectrofotométricamente utilizando un lector de microplaca (7530, Cambridge Technology, Inc., USA) a 570 nm en DMSO (100 μ l por pocillo).

4.3.5.3. Evaluación de mecanismos de muerte celular por marcación con sondas fluorescentes y análisis por citometría de flujo.

4.3.5.3.1. Mecanismos de muerte celular

En base a características morfológicas pueden distinguirse tres tipos principales de muerte celular: apoptosis (tipo I), muerte celular por autofagia (tipo II) y necrosis (tipo II) [179]. Se denomina apoptosis al mecanismo de muerte celular programada puesto en marcha por una célula en respuesta a determinados estímulos. Las células apoptóticas se caracterizan por mostrar condensación de la cromatina, aparición de repliegues en la membrana plasmática (*blebbing*), fragmentación de la cromatina y del núcleo. Estos procesos mediados por la acción de caspasas, las cuales son cistein-proteasas intracelulares que participan en cascadas proteolíticas [179]. La apoptosis culmina en la formación de cuerpos apoptóticos que engloban el material celular y son fagocitados por macrófagos y otras células del sistema inmune, por lo que usualmente este mecanismo de muerte no desencadena respuesta inflamatoria. Por su parte, la necrosis involucra el abultamiento de la célula y sus organelas hasta que se produce la ruptura osmótica de la célula por alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Como consecuencia de la lisis celular se descarga el contenido celular al medio, lo cual frecuentemente desencadena una respuesta inflamatoria [179]. Por último, la muerte celular por autofagia se caracteriza por la formación de grandes vacuolas que secuestran y degradan el contenido citoplasmático, produciéndose una condensación leve de la cromatina, sin fragmentación del ADN [180].

La apoptosis forma parte de la homeostasis normal de los tejidos. Es importante para el desarrollo normal de un organismo pluricelular a la vez que forma parte del sistema de defensa de los organismos vivos puesto que propicia la destrucción de células que suponen una amenaza para el mismo, como lo son aquellas células infectadas por virus o aquellas que presentan daños en el genoma. Los defectos producidos dentro del proceso de apoptosis en células animales pueden derivar en el desarrollo de células tumorales, y posteriormente en cáncer. A su vez,

muchas drogas empleadas en terapias contra el cáncer actúan induciendo la apoptosis de células tumorales [181].

4.3.5.3.2. Detección de poblaciones celulares apoptóticas y necróticas por marcación con anexina V-FITC y yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo.

Las diferencias en las características morfológicas y bioquímicas entre las células apoptóticas y necróticas pueden emplearse para distinguir ambos procesos. Las células viables presentan fosfolípidos distribuidos asimétricamente en las caras interna y externa de la membrana plasmática, con fosfatidilcolina y esfingomiélin en la superficie externa y fosfatidilserina en el lado interno. Al inicio de la apoptosis se producen cambios en la membrana plasmática, entre los cuales se produce la traslocación de fosfatidilserina desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana [180]. La anexina V es una proteína que se une preferentemente a los fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina, y por ello, es un reactivo útil para la detección específica de células apoptóticas. Debido a que no es capaz de emitir fluorescencia, normalmente se la conjuga a un fluorocromo, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otra característica distintiva de las membranas plasmáticas de células viables es que excluyen fluorocromos catiónicos como el yoduro de propidio (IP). En consecuencia, solo las células en una etapa tardía de apoptosis, que poseen alterada la permeabilidad de la membrana celular, captarán este colorante que es capaz de unirse al ADN. Así, el uso combinado de las sondas fluorescentes anexina V-FITC/IP permite la discriminación entre células viables (anexina V-FITC-/IP-), células en apoptosis temprana (anexina V-FITC+/IP-), células en apoptosis tardía (anexina V-FITC+/IP+) y células necróticas (anexina V-FITC-/IP+) [180].

La separación y cuantificación de las diferentes poblaciones celulares es llevada a cabo por citometría de flujo. Dicha técnica utiliza como muestra una suspensión celular y permite la medición simultánea de múltiples características en una célula. El equipo empleado es un citómetro de flujo, el cual detecta y analiza la dispersión de luz combinada con fluorescencia para obtener información de los parámetros de cada célula. La dispersión de luz hacia adelante (*Forward Scatter*, FSC) brinda información acerca del tamaño celular, mientras que la dispersión de la luz a 90° (*Side Scatter*, SSC) es dependiente del contenido de gránulos o complejidad citoplasmática de la célula. La combinación de estos dos parámetros ópticos permite diferenciar células en base a su tamaño y complejidad citoplasmática. Si se realiza en forma previa la marcación de las células con sondas fluorescentes, es posible además medir fluorescencia empleando filtros que seleccionan las longitudes de onda apropiadas. Adicionalmente, los citómetros pueden estar equipados de un separador o

sorter, que permite la separación física de las células con características distintivas. Dentro de estos, los citómetros FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) permiten la separación de poblaciones celulares que poseen diferentes marcadores fluorescentes en su superficie. Los datos almacenados son procesados y analizados por un software, y son presentados utilizando frecuentemente gráficos monoparamétricos como los histogramas o diparamétricos, como los gráficos de puntos o *dot-plot* [182].

En el presente trabajo, se analizó el mecanismo de muerte celular implicado en los sistemas de nanopartículas presentaron mayor actividad citotóxica. Para ello, las células fueron tratadas con muestras de polvos reconstituidos de BSA_n-Cris y BSA_np-Cris en una concentración final de Cris de 100 μ M, durante 72 h. Para realizar la marcación, se realizaron lavados de las células con PBS y se ajustó la concentración celular a 1×10^6 células/mL en buffer de *binding* 1 X. Se mezcló un volumen de 100 μ L de suspensión celular con 2,5 μ L de anexina V-FITC y 2 μ L de yoduro de propidio (IP) y la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, se realizó el análisis por citometría de flujo empleando un citómetro BD FACS Calibur™. Los porcentajes de células según la presencia de marcadores en su superficie se determinaron utilizando el software FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, EE. UU.).

4.3.6. Evaluación de la liberación gastrointestinal *in vitro* de crisina en nanopartículas

Con el objeto de examinar la liberación de Cris a partir de las nanopartículas bajo condiciones de digestión gastrointestinal, se aplicó un protocolo donde se simula este proceso *in vitro* basado en un consenso internacional [173]. El mismo consistió en una fase gástrica y una fase intestinal, donde la muestra de polvos reconstituidos se incubó con fluidos que simulan las condiciones de pH, fuerza iónica y presencia de enzimas correspondientes a cada etapa de digestión.

4.3.6.1. Actividades enzimáticas

Se determinó la actividad de la pepsina de la mucosa gástrica porcina según lo detallado por Anson y Mirsky (1932) [183] y Anson (1938) [184]. El ensayo se basa en la medición espectrofotométrica de los productos solubles en ácido tricloroacético (TCA) derivados de la reacción de la hemoglobina con agua catalizada por la pepsina. Se utilizó como sustrato enzimático hemoglobina 2% p/v a pH 2,0. Paralelamente, se preparó una solución stock de pepsina (1 mg/mL) disolviendo el polvo en NaCl 150 mM -Tris 10 mM ajustado a pH 6,5 y se la mantuvo a 4°C. Antes del ensayo se preparó un rango de 5 a 10 concentraciones de pepsina en HCl 10 mM. Para realizar el ensayo, se agregó 1 mL de hemoglobina y se incubó en estufa a 37°C durante 3-4

min para obtener una temperatura homogénea en el sustrato. Se adicionaron 200 μ L de la solución de pepsina para cada concentración a ser testeada y se incubó 10 min a 37°C de manera de que se produzca la reacción enzimática. Para detener la reacción se agregaron 2 mL de TCA 5% p/v a cada tubo. Con el fin de obtener una solución límpida, se centrifugó a 6.000 g durante 30 min. Se trasvasó la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo, se equilibró a 20°C y se midió la absorbancia a 280 nm. Se realizó un blanco del ensayo usando el mismo procedimiento, pero agregando la pepsina a las diferentes concentraciones usadas luego del TCA. Para el cálculo de la actividad enzimática, se utilizó la siguiente ecuación (Ecuación 14):

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{(A_{280} - A_{280b})}{t \times c} \times 1000 \quad (\text{Ec. 14})$$

donde t es el tiempo de la reacción, C es la concentración de pepsina en la cubeta (mg/mL) y A_{280} y A_{280b} corresponden a la absorbancia a 280 nm de las diferentes concentraciones de enzima y blanco, respectivamente. Es necesario obtener la misma actividad enzimática para las diferentes concentraciones ensayadas.

Por su parte, se determinó la actividad tripsina de la pancreatina derivada de páncreas bovino de acuerdo a Hummel (1959) [185]. Este ensayo se basa en la medición espectrofotométrica del compuesto p-toluensulfonil-L-arginina producido por la reacción del sustrato p-toluensulfonil-L-arginina metil éster (TAME) con agua, catalizada por la tripsina. Para ello, se preparó el sustrato TAME 10 mM y la solución reguladora del pH de reacción que consistió en Tris/HCl 46 mM conteniendo CaCl_2 11,5 mM, ajustando el pH a 8,1 a 25°C. Se prepararon al menos dos concentraciones de enzima (1 mg/mL) disolviendo la pancreatina en HCl 1 mM y se las mantuvo a 4°C. Para realizar el ensayo, se colocaron en la cubeta de cuarzo de medición 2,6 mL de la solución reguladora del pH de reacción y 0,3 mL de TAME. Se mezcló por inversión y se incubó a 25°C por 3-4 min. A continuación, se adicionaron 100 μ L de tripsina a cada concentración a testear y se homogeneizó suavemente. Inmediatamente después, se realizaron mediciones de absorbancia a 247 nm durante 10 min a 25°C, y se determinó la pendiente de la parte lineal de la curva en unidades de absorbancia/min. Se realizó un blanco para el ensayo aplicando el mismo protocolo sin agregar enzima y midiendo la absorbancia a 247 nm por 10 min (para el blanco la pendiente debe ser cercana a cero). Finalmente, se calculó la actividad tripsina de la pancreatina empleando la siguiente ecuación (Ecuación 15):

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{(A_{247} - A_{247b})}{540 \times mg \text{ pancreatina}} \times 1000 \times 3 \quad (\text{Ec. 15})$$

donde A_{247} corresponde a la pendiente de la parte lineal de la curva (unidades de absorbancia/min) para la enzima, A_{247b} es la pendiente de la parte lineal (unidades de absorbancia/min) para el blanco, el factor 3 corresponde a los mL de la mezcla de reacción, 540 es el coeficiente de extinción molar del TAME ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) y *mg pancreatina* es la cantidad en mg de pancreatina en la mezcla de reacción.

Los valores de actividad calculados fueron utilizados para determinar la cantidad de enzima a agregar durante cada etapa del protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* descrito a continuación.

4.3.6.2. Simulación del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*

Se utilizó un modelo estático, en el que se simulan las etapas de la digestión en un solo biorreactor, permaneciendo constante la relación entre la cantidad de alimento, y la de enzimas y sales biliares. El protocolo consta de una fase oral, una gástrica y una intestinal, donde el alimento es sometido a un fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS), los cuales consisten en una mezcla de electrolitos, enzimas, $CaCl_2$, sal biliar para el FIS y agua. En el presente trabajo se omitió la fase oral considerando que las formulaciones líquidas poseen un tiempo de residencia muy corto en la cavidad bucal, por lo que el efecto de esta etapa sobre el proceso global podría considerarse despreciable [172].

Fase gástrica. Durante esta etapa se simula la digestión del alimento en el estómago, por medio de la acción de enzimas en medio ácido (pH 3,0, HCl) y sometido a movimientos peristálticos. En primer lugar, se preparó FGS 1,25X, mezclando las soluciones salinas de manera tal de obtener la siguiente composición: KCl 6,9 mM, KH_2PO_4 0,9 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, NaCl 47,2 mM, $MgCl_2$ 0,1 mM y $(NH_4)_2CO_3$ 0,5 mM. A esta mezcla se le agregó $CaCl_2$ 0,3 M de manera tal que se obtuvo una concentración final de 0,075 M $CaCl_2$. Luego, se mezclaron volúmenes iguales de la solución reconstituida de polvo liofilizado con FGS 1,25X en frascos de vidrio con tapa a rosca de 7,5 mL para obtener una relación de muestra:FGS 50%v/v. Se agregó HCl para ajustar el pH hasta 3,0 y finalmente se agregó la solución de pepsina para obtener una actividad de 2000 U/mL y la cantidad necesaria de agua para la correcta dilución del FGS. Los frascos se incubaron a 37°C bajo agitación orbital a 60 rpm (Agitador Rotativo Múltiple RS-24, BOECO) durante 2 h. Luego de esta fase, tres frascos se utilizaron como blanco de fase gástrica (por triplicado), para lo cual se les agregó inhibidor de proteasas 2 mM (Sigma Aldrich, P2714), mientras que otros tres frascos fueron sometidos a la fase intestinal subsecuente.

Fase intestinal. Durante esta etapa, llevada a cabo en el intestino delgado, se produce la degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos hasta obtener moléculas más simples para que puedan ser absorbidas. En primera instancia, se preparó FIS 1,25X mezclando soluciones salinas de manera tal de obtener la siguiente composición: KCl 6,8 mM, KH₂PO₄ 0,8 mM, NaHCO₃ 85 mM, NaCl 38,4 mM y MgCl₂ 0,33 mM. Luego, se agregó CaCl₂ hasta alcanzar una concentración final de 0,3 M, y la solución de sales biliares hasta una concentración final de 10 mM. A continuación, se agregó la pancreatina porcina disuelta en la solución stock de FIS 1,25X; la cantidad se basó en la actividad tripsina que fue de 100 U/mL en la mezcla final de reacción. Luego, se agregó la cantidad adecuada de agua para la correcta dilución del FIS. A partir de las muestras provenientes de la fase gástrica, se mezclaron volúmenes iguales de muestra y FIS 1,25X en tubos de vidrio con tapa a rosca para obtener una relación quimo gástrico:FIS 50 %v/v. Posteriormente, se adicionó la cantidad necesaria de NaOH 1/0,1 M para ajustar el pH de la mezcla a 7,0. Inmediatamente, los tubos fueron sometidos a las condiciones de digestión intestinal: 2 h a 37°C con agitación orbital (60 rpm). Finalizada la digestión, se agregó inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, P2714) a las muestras en concentración 2 mM para detener la acción enzimática. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis.

4.3.6.3. Determinación de la cantidad de crisina liberada tras la digestión gastrointestinal

Las muestras provenientes de las fases gástrica e intestinal del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* fueron analizadas para determinar la cantidad de Cris liberada a partir de los complejos con nanopartículas. Para ello, se tomaron 4 mL de muestra y se realizó la extracción de Cris libre con acetato de etilo y posterior cuantificación por RP-HPLC mediante el procedimiento descrito anteriormente para la determinación de la eficiencia de encapsulación (Capítulo 1, sección 3.3.5.3). El porcentaje de liberación de Cris (L_{Cris}) durante la digestión gastrointestinal *in vitro* fue calculado mediante la siguiente ecuación (Ecuación 16):

$$L_{Cris}(\%) = \left(1 - \frac{Cris_T - Cris_L}{Cris_T}\right) \times 100\% \quad (\text{Ec. 16})$$

donde $Cris_T$ es la cantidad utilizada de Cris en la formulación de polvo liofilizado, y $Cris_L$ es la cantidad de Cris liberada en la fase acuosa luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

4.3.7. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA utilizando el software StatGraphics Plus 3.0, aplicando el método LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Determinación de la concentración adecuada de crisina para cargar las nanopartículas

La incorporación o carga de Cris en BSA_{np} se realizó utilizando a una técnica antisolvente modificada [186], [187]. Esta técnica se basa en el uso de dos solventes líquidos completamente miscibles entre sí, de los cuales uno es un buen solvente para el compuesto activo y en el otro el compuesto activo presenta una muy baja solubilidad (antisolvente). Generalmente, el antisolvente se agrega para producir la sobresaturación y precipitación del compuesto activo. En la técnica modificada que se utilizó en esta tesis, Cris se disolvió completamente en DMSO y se agregó una alícuota a la solución acuosa de BSA_{np}, produciéndose la insolubilización de Cris en agua, lo cual promovería su posterior unión e incorporación en los dominios hidrofóbicos de BSA_{np}. Sin embargo, una proporción de Cris podría permanecer en estado libre y precipitar en solución, aumentando la turbidez de la solución. Por lo tanto, para evaluar la concentración adecuada de Cris para realizar la carga de BSA_{np} sin que ocurra precipitación apreciable de nanocomplejos o Cris libre, se monitoreó la turbidez (medida como absorbancia a 600 nm) de las dispersiones de BSA_{np} a concentraciones crecientes de Cris (BSA_{np} en una concentración final de 0,5% p/p en PBS pH 7,4 y Cris 200-2.000 μM). El rango de concentración de Cris evaluado previamente (0-140 μM) corresponde al máximo que puede evaluarse por fluorescencia evitando el fenómeno de filtro interno [132], por lo que por turbidez se evaluó un rango de concentraciones mayor (200-2.000 μM). Se contempló que en todos los casos la concentración final de DMSO sea menor a 2,5%v/v, para no producir modificaciones indeseadas en los sistemas proteicos.

La **Figura 30** muestra el efecto de la adición de concentraciones crecientes de Cris sobre la turbidez de los sistemas BSA_{np} obtenidos a 70°C (**Figura 30A**) y 85°C (**Figura 30B**), incluyendo BSA_n como control.

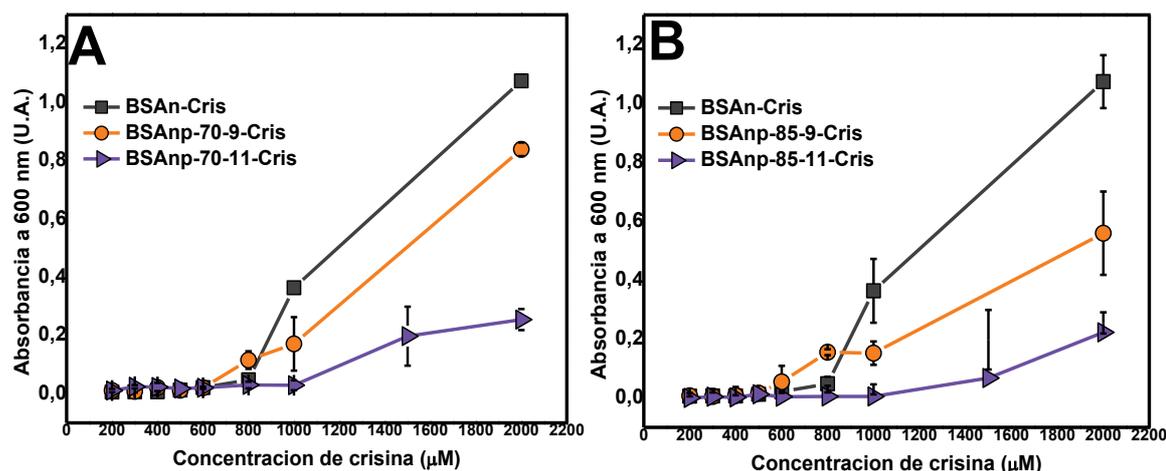


Figura 30. Efecto de la adición de Cris (200 -2000 μM) sobre la turbidez (medida como absorbancia a 600 nm) de cada sistema BSA_np obtenido a 70°C (A) y 85°C (B), en comparación con BSA_n.

En todos los sistemas examinados, la turbidez se mantuvo cercana a cero hasta llegar a una concentración de Cris de aproximadamente 600 μM , por encima de la cual la turbidez aumentó abruptamente con el incremento de Cris, siendo este aumento mayor en BSA_n en comparación con todos los sistemas BSA_np evaluados. A una concentración alta de Cris, el aumento en los valores de absorbancia podría estar vinculado a (i) un aumento en el tamaño de partícula en los sistemas y (ii) un mayor número de especies moleculares capaces de absorber la luz. Para el primer caso, los valores altos de turbidez vinculados a un aumento en el tamaño de partícula sugerirían una tendencia de los sistemas a provocar una desestabilización coloidal en solución acuosa. La desestabilización coloidal podría ser explicada en términos de la formación de asociaciones macromoleculares promovida tanto por las moléculas de Cris libres como aquellas unidas a la superficie de las nanopartículas. Estas últimas actuarían como puentes entre especies macromoleculares incrementando el tamaño de partícula, y a la vez produciendo la precipitación gradual. Este comportamiento fue confirmado, ya que se observó precipitación en todas las soluciones luego de 24 h. Por lo tanto, se puede concluir parcialmente que una concentración de Cris de alrededor de 600 μM no sería adecuada para la preparación de formulaciones liofilizadas de BSA_np-Cris. Las diferencias observadas en los valores de absorbancia para los sistemas BSA_n-Cris y BSA_np-Cris podrían estar relacionadas al modo por el cual se produce la carga de Cris en la superficie de la nanopartícula. Para BSA_n, la carga de Cris podría producirse de manera superficial, lo cual explica los valores altos de absorbancia, mientras que para BSA_np la carga podría involucrar la incorporación de Cris en regiones internas de la estructura de BSA_np. Los valores de absorbancia más altos observados para BSA_np-70-11 y BSA_np-85-11 en comparación con los

sistemas obtenidos a pH 9,0, podrían explicarse considerando que los primeros presentan menor tamaño y valores más altos de potencial ζ (tal como fue descrito en el Capítulo 1, sección 3.4.2).

En base a estos resultados, se concluyó que, para la preparación de formulaciones liofilizadas de BSAnp-Cris, debería utilizarse una concentración de Cris menor a 600 μM . Por lo tanto, se decidió utilizar una concentración de 200 μM para asegurar la estabilidad coloidal.

4.4.2. Efecto de la liofilización sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas

Mediante el proceso de formulación con manitol y liofilización aplicado se obtuvieron polvos compactos, de buen aspecto y color amarillo pálido (**Figura 31**). En la **Tabla 7** se detalla la composición general de los polvos, cuyo peso neto fue de alrededor de 1,62 gramos.

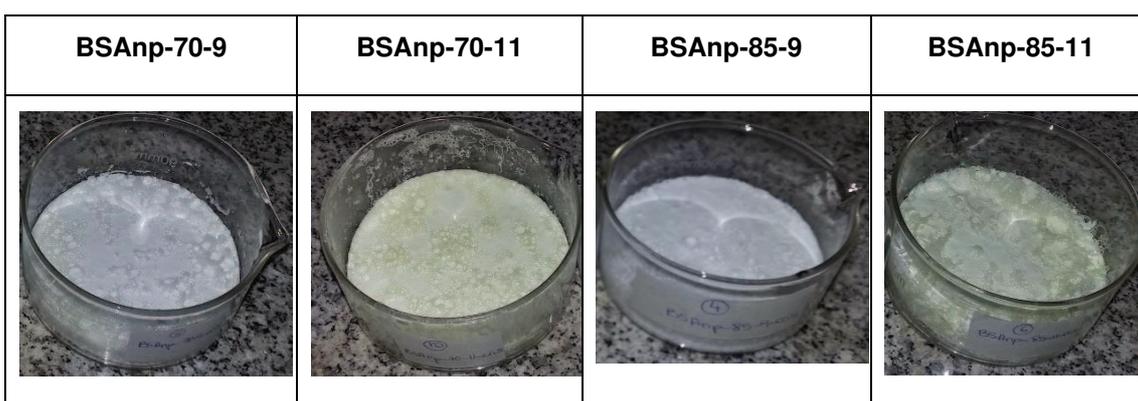


Figura 31. Aspecto de los polvos liofilizados obtenidos de cada sistema de nanopartículas.

Tabla 7. Detalle de los componentes de la fórmula (en % p/p) del producto liofilizado obtenido.

| Componente | Cantidad (% p/p) |
|--|------------------|
| BSAn/BSAnp | 7,7 |
| Crisina | 0,08 |
| Especies de PBS (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄) | 15,4 |
| Manitol | 77,2 |

Los polvos fueron reconstituidos mediante el agregado de agua MilliQ filtrada con filtro de tamaño de poro de 0,45 μM . Se observó una rápida reconstitución de todos los polvos (<1 min). Las soluciones reconstituidas de los sistemas BSAnp sin carga presentaron aspecto límpido, incoloro y ausencia de partículas macroscópicas (**Figura 32**). En contraste, las soluciones de los sistemas cargados con Cris presentaron color amarillo (**Figura 33**), siendo más intenso en el caso de los sistemas

obtenidos a pH 11,0 en comparación con la de los sistemas obtenidos a pH 9,0 lo cual podría estar relacionado con las diferencias existentes en los tamaños de partícula y polidispersidad de estos sistemas.

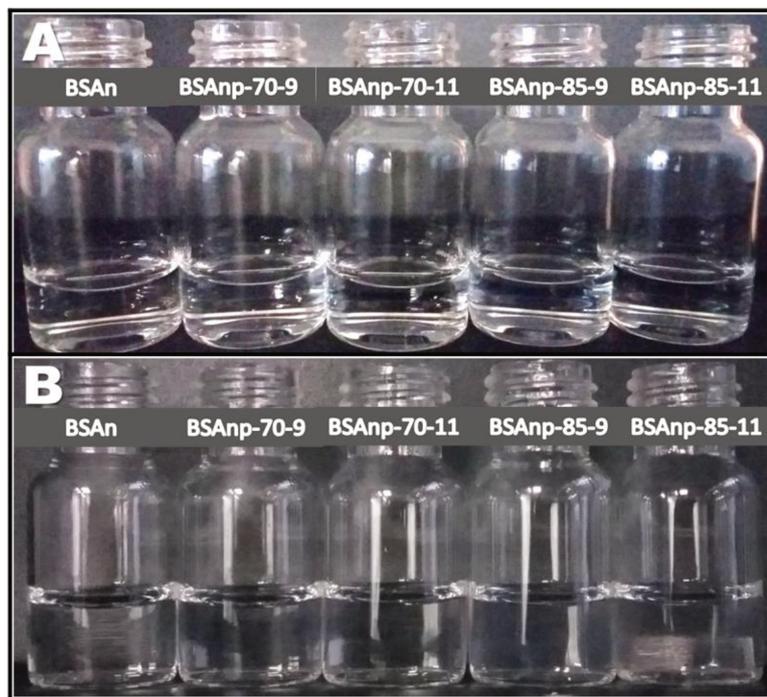


Figura 32. Imágenes de las soluciones de los sistemas BSA_n y BSA_np sin carga, antes de liofilizar (A) y después de la liofilización y reconstitución del polvo (B).

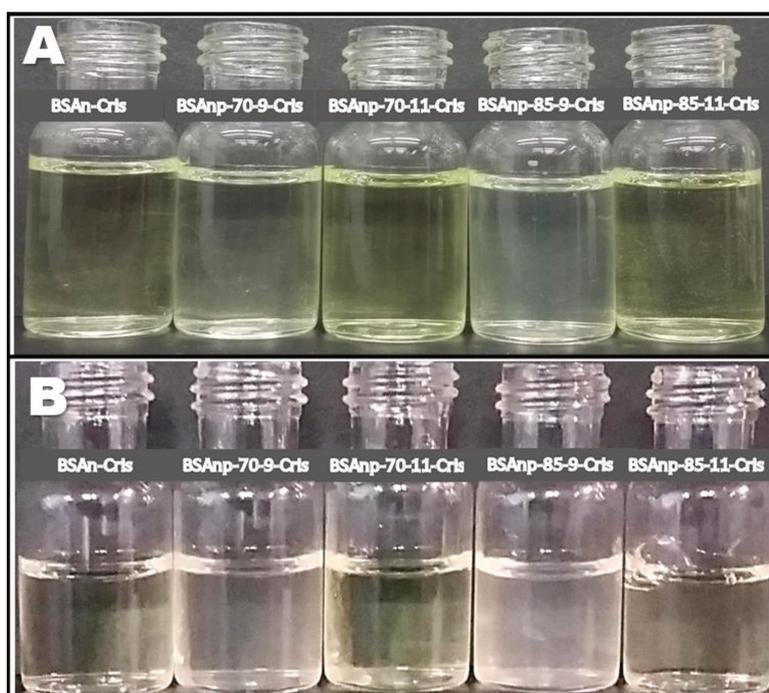


Figura 33. Imágenes de las soluciones de los sistemas BSA_n y BSA_np cargados con Cris, antes de liofilizar (A) y después de la liofilización y reconstitución del polvo (B).

Adicionalmente, se midió la turbidez (absorbancia a 600 nm) y el pH de las soluciones antes de liofilizar y después de la reconstitución del polvo. Todas las soluciones mostraron valores de absorbancia por debajo de 0,1, lo cual indicó una baja turbidez en las soluciones examinadas. No se observaron diferencias significativas entre los valores de pH medidos antes y después del proceso de liofilización. La ausencia de diferencias significativas en el pH y la turbidez después de la reconstitución confirmaron la adecuada reconstitución de todas las formulaciones.

4.4.2.1. Propiedades térmicas

Es bien conocido que el proceso de liofilización puede producir alteraciones en la conformación y consecuentemente, en las propiedades térmicas de proteínas y nanopartículas biopoliméricas [152]. Además, debido a que las BSAnp son obtenidas a través de un proceso de autoensamblado inducido por tratamiento térmico, el análisis de las transiciones que tienen lugar durante el calentamiento es de gran importancia. Por ello, se examinaron por DSC las transiciones térmicas de los polvos reconstituidos (40 mg/mL de proteína, en PBS pH 7,4) de los diferentes sistemas BSAnp, incluyendo BSAn como control.

La **Figura 34** muestra los termogramas registrados antes y después de liofilizar para los sistemas BSAnp obtenidos a 70°C (**Figura 34A**) y 85°C (**Figura 34B**), incluyendo BSAn. En primer lugar, se identificó la transición de primer orden correspondiente a la desnaturalización térmica de BSAn antes de liofilizar a $61,61 \pm 0,06$ °C. Dicha temperatura fue consistente con la reportada para BSAn a pH 7,0 en estudios DSC previos [34]. Después del proceso de liofilización, esta transición se observó a una temperatura más alta (a $68,5 \pm 0,3$ °C). Además, para BSAn en solución antes de la liofilización, el cambio de entalpía involucrado (ΔH) fue de 38 ± 8 J mol⁻¹, mientras que el cambio de entalpía después de la liofilización fue menor (12 ± 2 J mol⁻¹). Estos resultados sugerirían un efecto protector por parte del manitol sobre la conformación de la proteína. Al respecto, se conoce que uno de los mecanismos de estabilización de proteínas en medio acuoso es el de interacción preferencial, por la cual la proteína, en presencia de un agente estabilizante, tiende a interactuar preferentemente con el agua (hidratación preferencial), mientras que el agente es preferentemente excluido del ambiente de la proteína (exclusión preferencial) [147]. En base a esto, la presencia de manitol en la formulación produciría la estabilización de la proteína en solución, por lo que la desnaturalización térmica ocurriría a una mayor temperatura, y en menor medida. Por lo tanto, el proceso de liofilización no causaría cambios significativos en la conformación de BSAn.

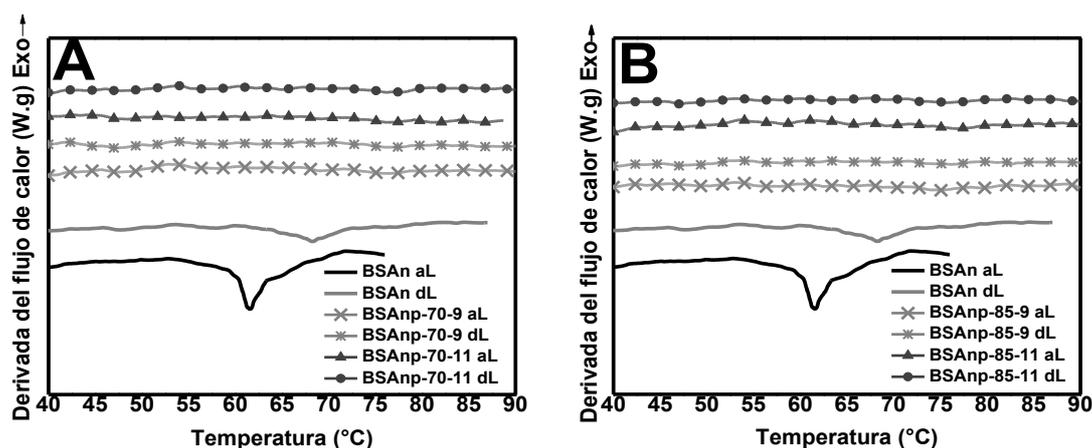


Figura 34. Termogramas DSC de cada sistema BSAnp obtenido a 70°C (A) y 85°C (B), en comparación con BSAn. aL = antes de liofilizar: dL= después de liofilizar.

Con respecto a los termogramas correspondientes a BSAnp, no se observaron transiciones térmicas apreciables en el rango de temperaturas evaluado en ninguno de los sistemas examinados, tanto antes como después de liofilizar. Esta observación es consistente con el hecho de que los sistemas BSAnp son obtenidos mediante un tratamiento térmico a una temperatura superior a la correspondiente a la desnaturalización térmica (alrededor de 61°C). En base a esto, se puede concluir parcialmente que los tratamientos térmicos aplicados, a 70°C y 85°C producirían cambios irreversibles en la conformación de BSAn, los cuales conducirían a un proceso de agregación proteica y la consecuente formación de BSAnp.

4.4.2.2. Tamaño de partícula y potencial ζ

En el proceso de liofilización, durante la etapa de congelamiento, se produce una separación de fases, formándose por un lado agua pura en estado sólido y por otro una solución crio-concentrada. En la fase de solución crio-concentrada se encuentran tanto las nanopartículas como otros componentes (sales, especies de la solución reguladora del pH, compuesto activo, etc.) y esta condición de alta concentración puede promover la agregación irreversible de las nanopartículas [153]. Al respecto, se ha reportado la formación de agregados de tamaño micrométrico de nanopartículas de albúmina sérica humana (HSA) obtenidas por el método de desolvatación, producida por un proceso de liofilización en ausencia de agente crioprotector [149]. Por lo tanto, con el objeto de obtener polvos liofilizados de los sistemas BSAnp cargados con Cris que conserven apropiadamente sus características fisicoquímicas luego de su reconstitución, en este trabajo se utilizó manitol como agente crioprotector y se evaluaron los cambios en el tamaño de partícula y potencial ζ de BSAnp tras la liofilización.

La **Figura 35** muestra los resultados de distribución de tamaño de partícula basado en intensidad (PSDi) de los sistemas BSA_{np} obtenidos a 70°C antes y después de liofilizar, en comparación con BSA_n. En general, no se observaron cambios significativos en la distribución de tamaño de partícula de BSA_n, BSA_{np}-70-9 y BSA_{np}-70-11 antes y después de liofilizar. En los sistemas cargados con Cris (BSA_n-Cris, BSA_{np}-70-9-Cris y BSA_{np}-70-11-Cris) se observó una disminución en la intensidad de los picos principales, junto con la aparición de picos más anchos a mayor tamaño. Sin embargo, estos picos no fueron observados en la distribución en volumen (PSDv), lo cual indicaría que el porcentaje de estas poblaciones no sería significativo.

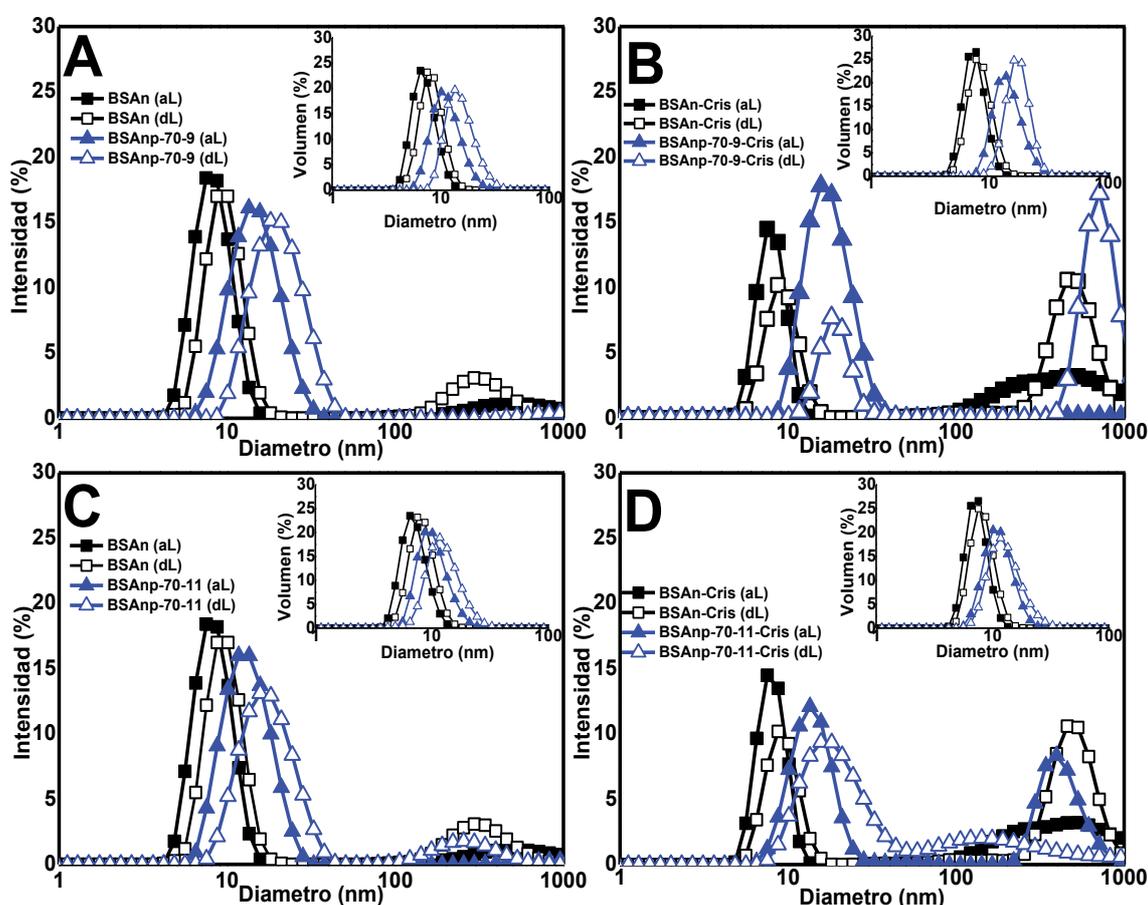


Figura 35. Distribución de tamaño de partícula (PSD) basado en intensidad (%) de los sistemas BSA_{np} obtenidos a 70°C: BSA_{np}-70-9 sin carga (A) y BSA_{np}-70-9 cargado con Cris (B), BSA_{np}-70-11 sin carga (C) y BSA_{np}-70-11 cargado con Cris (D). En cada gráfico se comparan las curvas obtenidas antes de liofilizar (aL) y después de liofilizar (dL), cada una en comparación con BSA_n. El inserto superior muestra PSD basada en volumen (%). Condiciones: 0,05% p/p de proteína en PBS pH 7,4, concentración de Cris de 200 μ M.

Un comportamiento similar fue observado en las distribuciones PSDi para los sistemas obtenidos a 85°C (**Figura 36**), siendo más pronunciada la reducción de la

intensidad del pico principal para el sistema BSAnp-85-11. Sin embargo, no se observaron picos en la distribución PSDv de los sistemas, lo cual permitiría inferir que no existe agregación significativa de las BSAnp tras la liofilización.

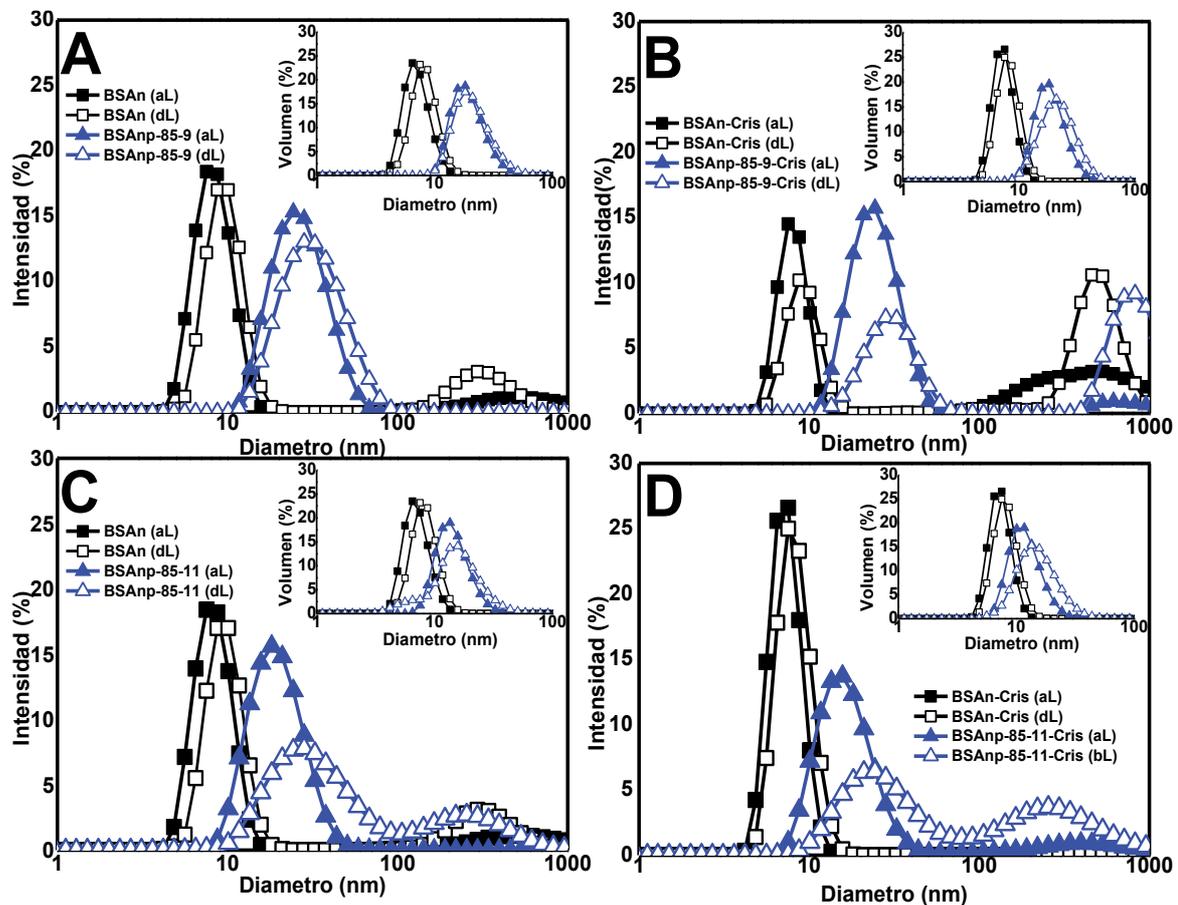


Figura 36. Distribución de tamaño de partícula (PSD) basado en intensidad (%) de los sistemas BSAnp obtenidos a 85°C: BSAnp-85-9 sin carga (A) y BSAnp-85-9 cargado con Cris (B), BSAnp-85-11 sin carga (C) y BSAnp-85-11 cargado con Cris (D). En cada gráfico se comparan las curvas obtenidas antes de liofilizar (aL) y después de liofilizar (dL), cada una en comparación con BSAn. El inserto superior muestra PSD basada en volumen (%). Condiciones: 0,05% p/p de proteína en PBS pH 7,4, concentración de Cris de 200 μ M.

La **Tabla 8** muestra los valores de tamaño de partícula e índice de polidispersidad (Pdl) y potencial ζ obtenidos del análisis por DLS. A partir de estos valores, puede observarse un aumento de tamaño de partícula tras la liofilización para todos los sistemas examinados, el cual fue mayor al tamaño inicial del sistema. Por otro lado, el potencial ζ de todos los sistemas fue de alrededor de -10 mV y no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos antes y después de la liofilización, lo cual permite reforzar la idea de una adecuada reconstitución de los polvos. Con respecto al índice de polidispersidad (Pdl), no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los valores de los sistemas sin carga de Cris antes y

después de liofilizar, mientras que los sistemas cargados con Cris presentaron un aumento de la polidispersidad que podría ser asociado a la presencia de Cris en estado libre que permanecería en solución luego de la reconstitución del polvo.

Tabla 8. Diámetro hidrodinámico (d_H), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial ζ de sistemas BSA_np con y sin carga de Cris, antes (aL) y después de liofilizar (dL). Los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar. Para cada parámetro obtenido antes y después de liofilizar se realizó un ANOVA independiente ($n=3$, $p<0,05$). Para los valores de tamaño de partícula se indica entre paréntesis el porcentaje en volumen que representa esa población.

| Sistema | d_H (nm) | | Pdl | | Potencial ζ (mV) | |
|------------------|--|--|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | aL | dL | aL | dL | aL | dL |
| BSAn | 8,4 \pm 0,1 ^a (83%) | 9,8 \pm 0,3 ^a (75%) | 0,34 \pm 0,04 ^{d,e} | 0,37 \pm 0,05 ^{e,f} | -9,9 \pm 0,3 ^{h,i,j,k} | -9,2 \pm 0,3 ^k |
| BSAn-Cris | 8,06 \pm 0,03 ^a (50%) | 9,4 \pm 0,2 ^a (34%) | 0,5 \pm 0,1 ^g | 0,7 \pm 0,1 ^h | -11,3 \pm 0,2 ^{c,d,e} | -11,2 \pm 0,2 ^{c,d,e,f,g} |
| BSAnp-70-9 | 15,4 \pm 0,1 ^{c,d} (94%) | 21,0 \pm 0,1 ^g (93%) | 0,23 \pm 0,01 ^{b,c} | 0,23 \pm 0,05 ^{b,c} | -9,5 \pm 0,6 ^{j,k} | -10,3 \pm 0,3 ^{g,h,i,j} |
| BSAnp-70-9-Cris | 16,4 \pm 0,4 ^{e,f} (59%) | 19,6 \pm 0,5 ^{f,g} (25%) | 0,27 \pm 0,02 ^{b,c} | 0,88 \pm 0,02 ⁱ | -11,2 \pm 0,6 ^{c,d,e,f} | -11,8 \pm 0,4 ^c |
| BSAnp-70-11 | 13,6 \pm 0,2 ^b (92%) | 18,0 \pm 0,1 ^{e,f} (83%) | 0,24 \pm 0 ^{b,c} | 0,41 \pm 0,06 ^f | -9,8 \pm 0,1 ^{i,j,k} | -11,6 \pm 0,4 ^{c,d} |
| BSAnp-70-11-Cris | 14,2 \pm 0,1 ^{b,c} (59%) | 20,5 \pm 0,9 ^g (69%) | 0,52 \pm 0,02 ^g | 0,53 \pm 0,07 ^g | -13,0 \pm 0,3 ^b | -13,1 \pm 0,4 ^b |
| BSAnp-85-9 | 27,8 \pm 0,1 ⁱ (99,7%) | 33,8 \pm 0,8 ^k (97%) | 0,13 \pm 0 ^a | 0,21 \pm 0,01 ^b | -10,8 \pm 0,6 ^{d,e,f,g,h} | -10,0 \pm 0,4 ^{h,i,j,j,k} |
| BSAnp-85-9-Cris | 26,3 \pm 0,2 ^h (90%) | 31 \pm 1 ⁱ (36%) | 0,30 \pm 0,01 ^{c,d} | 0,76 \pm 0,06 ^h | -10,9 \pm 0,4 ^{d,e,f,g,h} | -10,7 \pm 0,4 ^{e,f,g,h,i} |
| BSAnp-85-11 | 20,3 \pm 0,1 ^e (97,5%) | 35 \pm 3 ^k (70%) | 0,19 \pm 0,01 ^{a,b} | 0,51 \pm 0,06 ^g | -11,8 \pm 0,4 ^c | -11,8 \pm 0,1 ^c |
| BSAnp-85-11-Cris | 17,1 \pm 0,2 ^{d,e} (86%) | 28 \pm 4 ⁱ (51%) | 0,34 \pm 0,02 ^{d,e,f} | 0,71 \pm 0,04 ^h | -14 \pm 2 ^a | -10,4 \pm 1,2 ^{f,g,h,i,j} |

Con el objeto de establecer un criterio mediante el cual se pueda evaluar la conservación de los parámetros fisicoquímicos luego de la liofilización, se calcularon las relaciones PS (tamaño de partícula) y ZP (potencial ζ), como el cociente de los valores después y antes de liofilizar. Según este criterio, el valor de los parámetros se encuentra conservado tras la liofilización si la relación se encuentra dentro del rango 0,7-1,3, lo cual implica un cambio de \pm 30%. Los gráficos de la relación PS y relación ZP para los sistemas examinados se muestra en la **Figura 37**.

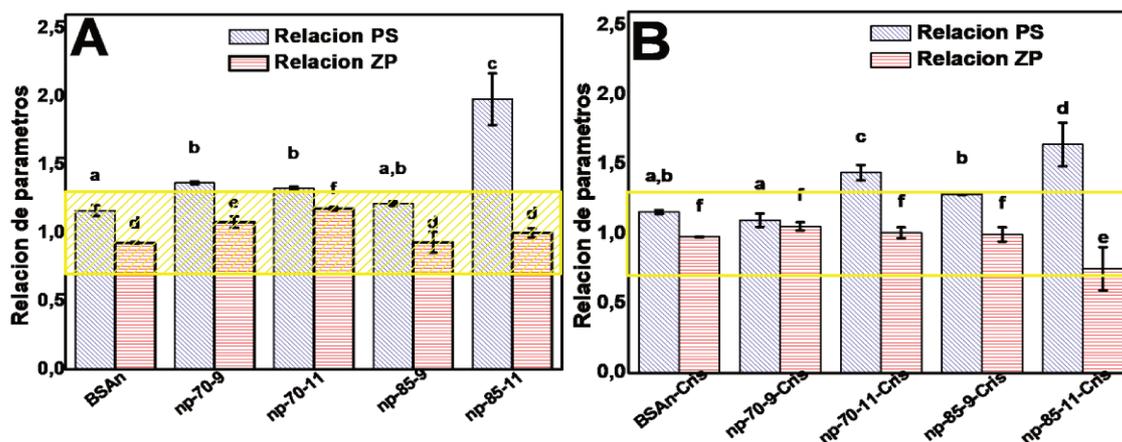


Figura 37. Relación de tamaño de partícula (PS) y potencial ζ (ZP) antes y después de liofilizar de sistemas sin carga (A) y con carga de crisina (B), en comparación con BSAn. La región resaltada entre 0,7 y 1,3 muestra el rango de relación PS dentro del cual se considera una buena reconstitución de los polvos liofilizados. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (test LSD, $p < 0,05$).

A partir del gráfico para los sistemas sin carga de Cris (**Figura 37A**), se pudo detectar que los sistemas BSAn, BSAnp-70-9, BSAnp-70-11 y BSAnp-85-9 presentaron valores de relación PS y ZP dentro del rango 0,7-1,3, por lo que puede inferirse que presentaron una buena reconstitución. El sistema BSAnp-85-11 presentó un valor de relación PS de aproximadamente 2,0 que podría traducirse en un aumento de tamaño de partícula de alrededor del 60%, por lo que este sistema sería el más sensible a la liofilización. Por otro lado, en el gráfico para los sistemas con carga de Cris (**Figura 37B**) puede apreciarse un ligero aumento en la relación PS, el cual fue más pronunciado en BSAnp de mayor tamaño inicial. Este aumento de tamaño podría asociarse, como ya se mencionó anteriormente, a la presencia de Cris libre en solución, que tras la reconstitución contribuiría al aumento de la polidispersidad del sistema. Los valores de relación ZP de todos los sistemas examinados se encontraron dentro del rango asociado a una buena reconstitución, por lo cual el potencial ζ no se encontraría significativamente afectado por el proceso de liofilización. El tamaño de partícula sería el parámetro más afectado tras la liofilización, siendo más pronunciado el cambio a mayor tamaño de partícula inicial. Sin embargo, consideramos que estos cambios fueron en general muy pequeños, por lo que se puede concluir parcialmente que en general las formulaciones liofilizadas se reconstituyen en medio acuoso con cambios de parámetros fisicoquímicos aceptables.

4.4.2.3. Eficiencia de encapsulación

La **Tabla 9** muestra los valores de eficiencia de encapsulación (EE) de los diferentes sistemas BSAnp tras la liofilización, en comparación con los obtenidos antes de liofilizar. Adicionalmente, se presentan los valores de capacidad de carga (LC)

antes y después de liofilizar. Tal como fue discutido anteriormente (Capítulo 1, sección 3.4.3.5), los valores de EE antes de liofilizar para BSAnp estuvieron comprendidos en el rango 44-84% (3,6-6,9 μg Cris/mg proteína en términos de LC), siendo mayores a mayor tamaño de partícula. Luego de la liofilización, se observó un aumento significativo de EE en BSAn, BSAnp-70-9, BSAnp-70-11 y BSAnp-85-11, mientras que en el caso de BSAnp-85-9 se observó una disminución. El aumento significativo en los valores de EE para los sistemas BSAn, BSAnp-70-9, BSAnp-70-11 y BSAnp-85-11 podría indicar que el proceso de liofilización mejoraría la asociación de Cris tanto en BSAn como en BSAnp. En base a este resultado, se podría deducir que el proceso de liofilización mejoraría la carga de Cris en BSAnp de menor tamaño. Por el contrario, la disminución en el valor de EE y LC observado para el sistema BSAnp-85-9 podría atribuirse a su mayor tamaño, lo que afectaría no solo a su estabilidad coloidal sino también a la asociación de Cris.

Tabla 9. Eficiencia de encapsulación (EE, %) y capacidad de carga (LC, en μg Cris/mg proteína) de crisina en sistemas BSAnp antes y después de liofilizar (aL y dL, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas (test LSD, $n=5$, $p < 0,05$).

| Sistema | EE aL (%) | EE dL (%) | LC aL (μg Cris/mg proteína) | LC dL (μg Cris/mg proteína) |
|-------------|-------------------------|---------------------------|--|--|
| BSAn | 25 \pm 2 ^a | 56 \pm 1 ^b | 2,1 \pm 0,2 ^a | 4,5 \pm 0,1 ^a |
| BSAnp-70-9 | 44 \pm 3 ^c | 66 \pm 2 ^{d,e} | 3,6 \pm 0,2 ^b | 5,4 \pm 0,1 ^b |
| BSAnp-70-11 | 47 \pm 2 ^c | 53 \pm 7 ^b | 3,8 \pm 0,2 ^b | 4,3 \pm 0,6 ^a |
| BSAnp-85-9 | 84 \pm 2 ^f | 69 \pm 3 ^{d,e} | 6,9 \pm 0,1 ^d | 5,6 \pm 0,3 ^b |
| BSAnp-85-11 | 65 \pm 2 ^d | 70 \pm 1 ^e | 5,3 \pm 0,2 ^c | 5,73 \pm 0,06 ^b |

4.4.3. Actividad antitumoral *in vitro* de polvos liofilizados reconstituidos

4.4.3.1. Viabilidad celular por ensayo MTT

Una vez realizada la caracterización de los sistemas BSAnp luego del proceso de liofilización, se procedió a evaluar su efecto sobre la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 empleando el método colorimétrico MTT. Las células fueron incubadas en medio de cultivo DMEM puro (control) o con soluciones de los sistemas BSAn-Cris y BSAnp-Cris a 37°C durante 72 h, incluyendo los sistemas sin carga de Cris. La concentración final de Cris en las muestras fue de 100 μM , la cual corresponde a la concentración media máxima eficaz (EC_{50}) reportada en estudios previos para la acción de Cris sobre células MCF-7 y MDA-MB-231 [115], [159]. La **Figura 38** muestra el efecto de cada sistema sobre la

viabilidad celular de cada línea celular evaluada, como porcentaje de viabilidad con respecto al nivel basal (control de medio DMEM). Se observó que todos los sistemas, excepto BSA_n (sin Cris), afectaron la viabilidad celular tanto de MCF-7 como MDA-MB-231. De manera inesperada, los sistemas BSA_{np} sin carga de Cris afectaron también la viabilidad celular de ambas líneas, lo cual sugeriría que poseen una actividad citotóxica intrínseca. Sin embargo, la carga de Cris aumentó la citotoxicidad de los mismos, indicando que la bioactividad del compuesto estaría preservada luego de su carga en los sistemas.

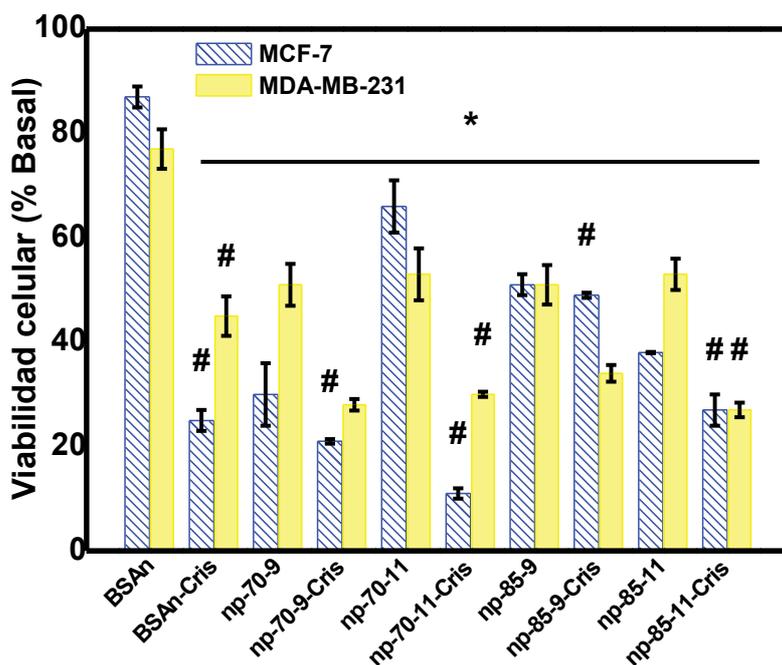


Figura 38. Efecto de los sistemas BSA_n y BSA_{np} con y sin carga de curcumina sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 y MCF-7. Los resultados se expresaron con respecto al nivel basal y representan la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 18$). *diferencia significativa con respecto al nivel basal, # diferencia significativa entre muestras ($p < 0,01$).

Por lo tanto, el sistema que presentó mayor actividad citotóxica fue BSA_{np}-70-11-Cris, el cual redujo la viabilidad en un 70% para las células MDA-MB-231 y en un 85% para MCF-7. Esto podría sugerir que los sistemas de menor tamaño (obtenidos a 70°C) cargados con Cris, producirían mayores efectos citotóxicos.

Por último, es importante destacar que BSA_{np}-70-11-Cris produjo un mayor efecto citotóxico que el sistema BSA_n-Cris, lo cual indicaría que la carga de Cris en BSA_{np} resultaría en mayores efectos citotóxicos en comparación con la proteína nativa asociada al flavonoide.

4.4.3.2. Apoptosis

Con el objeto de estudiar el mecanismo de muerte celular implicado en la reducción de la viabilidad celular observado en el ensayo de citotoxicidad, se incubaron las muestras del sistema que resultó ser más activo (BSAnp-70-11) con las células sobre las cuales presentó mayores efectos (MCF-7) y se realizó la identificación de las células en distintos estadios de apoptosis por marcación con sondas anexina V-FITC e ioduro de propidio (IP) seguido de análisis por citometría de flujo. Se incluyó BSAn con y sin carga de Cris como control. A partir de los gráficos de análisis por citometría de flujo (**Figura 39**), en cuyos cuadrantes Q2 y Q3 se indica la proporción de células en muerte celular por apoptosis, se observó que, si bien en todos los sistemas examinados se indujo la apoptosis, ésta se produjo en mayor proporción en los sistemas con Cris (BSAn-Cris y BSAnp-70-11-Cris). Esta primera observación indicaría que la inducción por apoptosis estaría vinculada a la presencia de Cris.

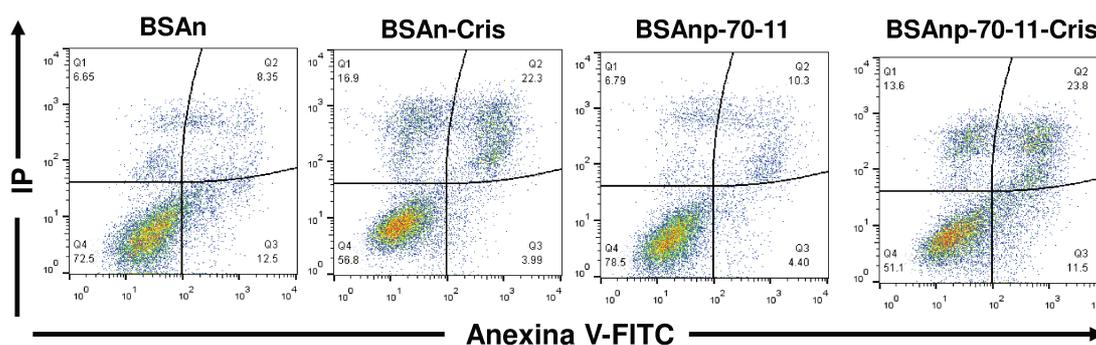


Figura 39. Gráficos de análisis por citometría de flujo obtenidos para células MCF-7 tratadas con BSAn y BSAnp, con y sin carga de crisina en tres experimentos independientes. Los números de los cuadrantes Q3 y Q2 indican las proporciones de células que son anexina V +/IP - y anexina V +/IP +, respectivamente.

Por su parte, la **Figura 40** presenta el gráfico de cuantificación de las subpoblaciones de células según la presencia de marcadores fluorescentes: apoptosis temprana (anexina V+/PI-), apoptosis tardía (anexina V+/PI+) y necrosis (anexina V-/PI+). A partir de este gráfico se observó que BSAn libre provocó un aumento de células en apoptosis temprana en comparación con el control basal, mientras que BSAn-Cris aumentó la población de células en apoptosis tardía. Por otro lado, el tratamiento con BSAnp-70-11 produjo un incremento de las poblaciones celulares en apoptosis tanto temprana como tardía, mientras que la carga de Cris en BSAnp-70-11 resultó en una mayor población de células tanto en apoptosis tardía como necróticas.

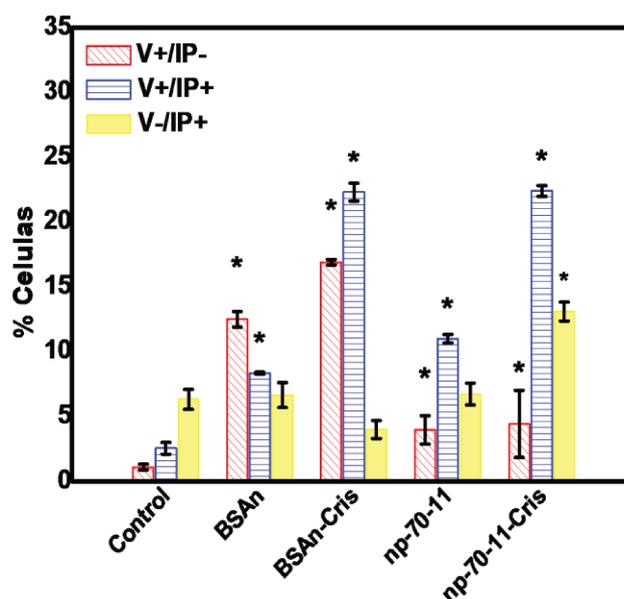


Figura 40. Gráfico del porcentaje de células MCF-7 en apoptosis temprana (anexina V+/IP-), apoptosis tardía (anexina V+/IP+) y necróticas (anexina V-/IP+) analizado por citometría de flujo. Las células fueron incubadas con soluciones de BSAAn y BSAAnp a 37 °C durante 72 h, incluyendo control sin tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al nivel basal y se representan como media \pm error estándar de la media (SEM) (n = 9). *diferencia significativa con respecto al nivel basal (p<0,01).

Además, BSAAnp-70-11-Cris produjo un incremento en las fracciones de muerte celular por apoptosis (anexina V+/PI- y anexina V+/PI+) hasta un 35%, mientras que BSAAn-Cris aumentó las poblaciones de muerte celular solo hasta un 26%, lo que sugiere que BSAAnp-70-11 cargado con Cris ejerció mayores efectos antitumorales que la proteína nativa (BSAAn) cargada con Cris. Según los estudios reportados anteriormente, Cris libre (en DMSO, 20 μ M) redujo en un 73,9% la viabilidad de células MCF-7 luego de incubación por 72 h, siendo la inducción de apoptosis el principal mecanismo de muerte involucrado [159]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio permitirían deducir que Cris cargada en BSAAnp-70-11 permitiría aumentar su solubilidad acuosa conservando su actividad antiproliferativa sobre células MCF-7, ejercida a través de la inducción de la muerte celular por apoptosis.

4.4.4. Liberación de crisina bajo digestión gastrointestinal *in vitro*

Con el objeto de obtener información sobre el comportamiento de degradación de BSAAnp-Cris y el perfil de liberación/retención de Cris bajo condiciones de digestión gastrointestinal, se aplicó un protocolo estático de simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*. Se evaluó el sistema BSAAnp-70-11 (obtenido a pH 11,0 y 70°C), por ser el que presentó mayor citotoxicidad *in vitro* sobre células de cáncer de mama. Por lo tanto, se reconstituyeron muestras de polvos liofilizados de BSAAnp-70-

11 y BSAnp-70-11-Cris y se sometieron a la fase gástrica (pH 3,0, pepsina) seguida de la fase intestinal (pH 7,0, pancreatina + sales biliares).

Bajo la acción de enzimas digestivas presentes en fluidos gástricos e intestinales, la estructura de la nanopartícula puede ser potencialmente hidrolizada y degradada, liberando péptidos de la misma. Este proceso podría ser potencialmente afectado por la presencia de Cris en la estructura de la nanopartícula. Por lo tanto, en primer lugar, se evaluó el efecto de la carga de Cris en BSAnp-70-11 sobre la liberación de péptidos luego de cada etapa de liberación gastrointestinal *in vitro*. La **Figura 41** presenta la cantidad de péptidos liberados (medidos como absorbancia a 280 nm) a partir de BSAnp-70-11 y BSAnp-70-11-Cris luego de la fase gástrica (G) e intestinal (I) del protocolo de simulación de digestión gastrointestinal aplicado.

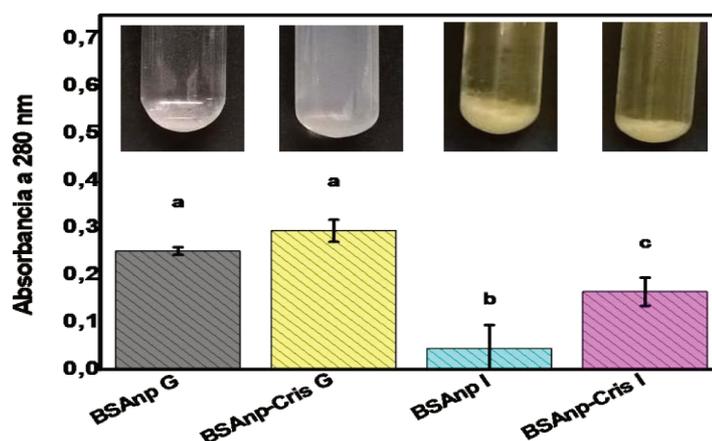


Figura 41. Absorbancia a 280 nm como medida de la cantidad de péptidos liberados de BSAnp y BSAnp-Cris luego de digestión *in vitro* gástrica (G, con pepsina) o intestinal (I, con pancreatina y sales biliares). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). En la parte superior se muestran las fotos de la apariencia macroscópica de cada sistema luego de 24 h.

Luego de la fase gástrica, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la cantidad de péptidos liberados a partir de la nanopartícula cargada con Cris y la nanopartícula sin carga. Por otro lado, luego de la fase intestinal, la cantidad de péptidos liberados a partir de BSAnp-70-11-Cris fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la correspondiente a la nanopartícula sin carga. Estos resultados podrían ser explicados considerando que, durante el proceso de agregación proteica que conduce a la formación de la nanopartícula y su posterior carga de Cris, se expondrían sitios de corte de las enzimas gastrointestinales, por lo que la degradación de BSAnp-70-11-Cris sería mayor que la correspondiente a la de la nanopartícula no cargada. Esto estaría en concordancia con los resultados de los experimentos de fluorescencia

intrínseca, donde se observó que la unión de Cris a BSA_n y BSA_np en sitios cercanos a Trp₂₁₂ produce cambios en la conformación proteica. Adicionalmente, en la misma **Figura 41** puede observarse el aspecto de las soluciones correspondientes a cada etapa y sistema, donde se puede apreciar la presencia de restos de agregados proteicos y partículas en suspensión, que luego de un tiempo de reposo a temperatura ambiente (20°C) precipitaron.

Finalmente, la cantidad de Cris liberada a partir de BSA_np-70-11 luego de la fase gástrica seguida de la fase intestinal fue de $14 \pm 2\%$, lo cual indicaría que una gran cantidad de Cris (aproximadamente un 85%) se encontraría retenida en la superficie de la nanopartícula tras el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Este comportamiento de retención de Cris en la nanopartícula es importante ya que, como se mencionó anteriormente, se conoce que, tras su administración por vía oral, Cris es conjugada y excretada rápidamente. Por lo tanto, la vehiculización de Cris en BSA_np-70-11 aumentaría su estabilidad en el tracto gastrointestinal, lo cual podría aumentar asimismo su tiempo de residencia y potencial absorción en el intestino en aplicaciones de administración oral, como lo son alimentos funcionales y productos nutraceuticos y farmacéuticos.

4.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En esta segunda parte del trabajo de Tesis, es de destacar que se logró obtener polvos liofilizados de los diferentes sistemas BSA_np con y sin carga de Cris, de aspecto aceptable y reconstitución rápida. Se confirmó que tras la reconstitución de los polvos no se produjeron cambios significativos en el tamaño de partícula y carga superficial de los sistemas. En particular, la reconstitución de los polvos fue mejor para el caso de los sistemas BSA_np de menor tamaño, obtenidos a 70°C. Además, mediante un análisis térmico pudo corroborarse la existencia de cambios irreversibles en la estructura de BSA_n que llevan a su agregación y formación de nanopartículas (BSA_np). Con respecto a la carga de bioactivo en las nanopartículas, se determinó la EE y LC de Cris en polvos liofilizados de BSA_np y resultaron ser mayores a las obtenidas antes de liofilizar, por lo que el proceso de liofilización resultaría en una mejora de la asociación de Cris en la estructura de la nanopartícula.

Para estudiar el potencial efecto antitumoral de las formulaciones, se evaluó la actividad citotóxica de los polvos reconstituídos contra células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). Este estudio no solo permitió corroborar la preservación de la actividad de Cris incorporada en las BSA_np, sino que también arrojó información sobre las propiedades antitumorales de BSA_n y BSA_np obtenidas por tratamiento térmico. El

sistema que presentó mayor actividad citotóxica antiproliferativa fue BSAnp-70-11-Cris, el cual corresponde al sistema de menor tamaño de partícula. Con respecto al mecanismo de muerte celular, la actividad estaría mediada por procesos de apoptosis y necrosis.

Por otro lado, a fin de evaluar su potencial uso como suplemento de administración por vía oral, se estudió el perfil de degradación del sistema BSAnp-70-11, con y sin carga de Cris, bajo un protocolo de simulación del proceso de digestión gastrointestinal. Tras el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, el sistema BSAnp-70-11 mostró una gran cantidad de péptidos liberados cuando Cris se cargó en BSAnp a pesar de que la cantidad liberada de Cris fue baja (14%), lo que sugeriría que el sistema de nanopartículas podría degradarse en el tracto gastrointestinal; mientras retiene una gran cantidad de Cris. Esto podría indicar que el sistema BSAnp protegería a Cris durante el proceso de digestión, por lo que sería factible su incorporación en formulaciones para otras terapias de quimioprevención. No obstante, este estudio debería complementarse y ampliarse mediante un estudio del transporte de Cris a través de las células epiteliales intestinales, junto con la evaluación *in vivo* de factores importantes como la tasa de absorción y la biodisponibilidad de Cris en el tracto gastrointestinal.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente Capítulo permitieron cumplir los objetivos planteados, mediante los cuales puede concluirse que los sistemas BSAnp son capaces de cargar Cris conservando su actividad citotóxica, aun después del proceso de liofilización, por lo que podrían emplearse en formulaciones destinadas a la prevención y/o tratamiento del CM. Potencialmente, podría aplicarse a la prevención del cáncer de colon, dado el efecto de protección de Cris y retención en el tracto gastrointestinal.

5. CAPÍTULO 3

Obtención y caracterización de nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con genisteína. Propiedades antitumorales.

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. Genisteína y sus similitudes estructurales con crisina

La genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona, Gen) es la principal isoflavona presente en las plantas de la familia *Leguminosae*, incluyendo a la soja (*Glycine max*). Su nombre deriva del nombre genérico del arbusto *Genista tinctoria*, utilizado para obtener un pigmento de color amarillo-verde, a partir del cual fue aislado el compuesto Gen por primera vez en 1899 [188].

La estructura química de Gen presenta similitudes estructurales con la de Cris (Figura 42). Ambos flavonoides poseen un núcleo flavona compuesto por dos anillos aromáticos fusionados (A y C) y un anillo B fenólico unido al anillo C. Son isómeros en el anillo B (en Gen se encuentra unido al anillo C en posición 3 mientras que en Cris está en posición 2) y comparten dos grupos hidroxilo en el anillo A (5-OH y 7-OH). Adicionalmente, Gen posee un grupo -OH en la posición 4' del anillo B.

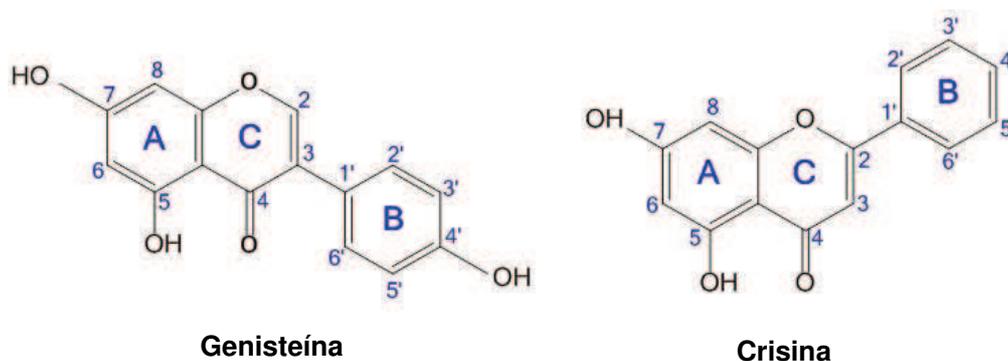


Figura 42. Estructura química de Gen (4',5,7-trihidroxiisoflavona) en comparación con la de Cris (5,7-dihidroxiisoflavona). Elaboración utilizando ChemDraw Professional (PerkinElmer, 2017).

En la soja, Gen está presente en cantidades que varían entre 0,2 y 1,0 mg/g, mientras que las legumbres serían la segunda fuente principal, con cantidades de Gen que varían de 0,002 a 0,006 mg/g [189]. En las plantas, Gen se encuentra principalmente en forma de 7-β-glucósido que recibe el nombre de genistina. La unión de la isoflavona al azúcar aumenta su solubilidad en agua, haciéndola más estable en condiciones fisiológicas. Durante la digestión de genistina se produce deglucosilación de la molécula, liberándose la molécula de azúcar y quedando libre la aglicona Gen [188].

En las últimas décadas, ha habido un interés creciente en el estudio de las propiedades biológicas de Gen, a partir de que varios estudios reportaron que la ingesta de una dieta rica en soja podría ser uno de los factores importantes que

contribuyen a una menor incidencia de cáncer de mama, ovarios y próstata en países asiáticos [190], [191].

5.1.2. Propiedades antitumorales de genisteína

Gen se ha propuesto como un compuesto bioactivo prometedor dado que presenta numerosas propiedades, entre las que se destacan su actividad antioxidante, antiangiogénica e inmunomoduladora, y sus efectos beneficiosos sobre la salud como la reducción de la osteoporosis, disminución en el riesgo de ataques cardiovasculares y el alivio de problemas posmenopáusicos [189]. Además, se ha demostrado que Gen regula ciertas vías metabólicas por lo que podría utilizarse para prevenir y tratar algunos de los trastornos comunes asociados con la obesidad, el síndrome metabólico y el cáncer [192].

Por otro lado, Gen es un fitoestrógeno debido a su similitud estructural con la hormona esteroide 17 β -estradiol (**Figura 43**), lo que le permite unirse a receptores de estrógenos (RE) [192]. La distancia entre los grupos -OH de los carbonos 4' y 7 de Gen es similar a la de los grupos -OH en el estradiol, por lo cual Gen es capaz de unirse a las dos isoformas de RE: α (RE α) y β (RE β). Por esta razón, Gen es considerada dentro del grupo de los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (MSRE) [192] y se ha comprobado que es capaz de actuar tanto como antagonista como agonista de estrógenos [191].

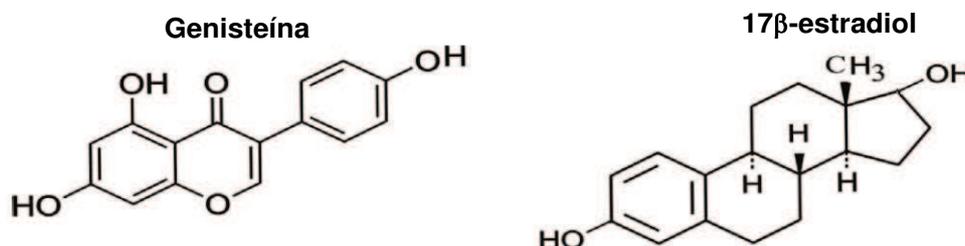


Figura 43. Comparación entre la estructura química de Gen y la de la hormona esteroidea 17 β -estradiol. Figura modificada de Mukund y col., 2017 [191].

Estos receptores cumplen un rol importante en el desarrollo y la progresión de ciertos tipos de cáncer hormonales, como el cáncer de mama (CM) [193]. Con frecuencia, la expresión de RE β se pierde en células de CM, donde su presencia, generalmente, se correlaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad. Por el contrario, la expresión de RE α se asocia al desarrollo de resistencias frente a los fármacos utilizados en el tratamiento de CM.

En los últimos años se han estudiado los efectos de Gen contra el CM y se ha reportado que su actividad antitumoral varía de acuerdo con la expresión celular de RE

y la concentración de Gen. En estudios *in vitro*, se ha comprobado que el efecto de Gen sobre células de CM hormono-dependientes es bifásico: a bajas concentraciones, se promueve el crecimiento de células RE-positivas, mientras que, a concentraciones más altas, se inhibe el crecimiento celular [194]. Además, Gen puede producir efectos antitumorales en células hormono-independientes, incluyendo la línea celular humana MDA-MB-231 [195], [196], reportándose una reducción de la viabilidad celular de ~ 60% a 20 μ M y la línea celular murina F3II [197], [198], sobre la que produce un 50% de reducción de la viabilidad celular en concentraciones de alrededor de 20 μ M. Por lo tanto, Gen es considerada una isoflavona pleiotrópica, debido a que actúa en múltiples vías de señalización, evitando la progresión del cáncer al promover la apoptosis, inducir la detención del ciclo celular, modular las vías de señalización intracelular e inhibir la angiogénesis y la metástasis de células neoplásicas [189].

5.1.3. Antecedentes de la vehiculización de genisteína en nanopartículas

A pesar de que Gen muestra importantes efectos anticancerígenos, su aplicación en terapias de prevención y tratamiento del CM presenta varias limitaciones. En primer lugar, al ser un compuesto lipofílico ($\log P = 3,04$) tiene baja solubilidad en agua (5,3 μ M) a 25°C [199], lo que dificulta su incorporación en matrices acuosas. Además, presenta baja biodisponibilidad debido a su metabolismo rápido y extenso. En este sentido, se sabe que Gen se absorbe rápidamente después de su administración por vía oral. Luego, es conjugada en el intestino e hígado a una alta tasa, principalmente por glucuronidación y sulfatación. Por esta razón, las concentraciones plasmáticas o tisulares de Gen son mucho más bajas que su IC_{50} *in vitro* [192].

Por lo tanto, existe la necesidad de utilizar estrategias que permitan la vehiculización de Gen en medios acuosos y así posibilitar su administración, tanto por vía oral como parenteral. Como se ha explicado anteriormente, la nanotecnología es la estrategia de preferencia ya que posibilita no solo estabilizar en solución acuosa el compuesto sino también mejorar su biodisponibilidad. Al respecto, estudios previos han reportado la carga de Gen en nanopartículas [200] tales como micelas [201], liposomas [202], partículas lipídicas nanoestructuradas [203] y nanopartículas de quitosano [204], [205]. Sin embargo, la incorporación de Gen en nanopartículas proteicas obtenidas por autoensamblado de albúminas no se ha estudiado.

En base a lo anteriormente expuesto, en este capítulo de Tesis se estudió la incorporación de Gen en los sistemas BSA_np que presentaron mayor citotoxicidad sobre células de CM al ser cargados con Cris: BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11. Se

evaluaron las características moleculares de la interacción de Gen con los monómeros autoensamblados de proteína y los resultados fueron comparados con los obtenidos al cargar los sistemas BSAnp con Cris, de manera de inferir sobre la versatilidad de BSAnp para incorporar flavonoides. Por último, se obtuvieron polvos liofilizados y se evaluó la actividad citotóxica de los polvos *in vitro* sobre un modelo murino de células de CM (F3II) a fin de examinar sus potenciales propiedades antitumorales.

5.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos que se plantearon en este capítulo fueron:

Objetivo 1: Evaluar la carga de los sistemas BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 con la isoflavona Gen.

Objetivo 2: Caracterizar mediante parámetros fisicoquímicos los nanocomplejos obtenidos con Gen y realizar una comparación con los obtenidos con Cris.

Objetivo 3: Obtener polvos liofilizados de los nanocomplejos con Gen y evaluar la conservación de sus propiedades fisicoquímicas tras la reconstitución.

Objetivo 4: Estudiar las propiedades antitumorales *in vitro* de los polvos reconstituidos sobre la línea celular de adenocarcinoma de mama murino F3II.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Materiales

Se utilizó albúmina sérica bovina (BSAn, pureza $\geq 96\%$) adquirida en Sigma Aldrich (EE. UU.). El compuesto bioactivo genisteína (Gen) fue adquirido en Indofine Chemical Company Inc. (EE. UU.), y contó con una pureza $\geq 99\%$ determinada por RP-HPLC. Se preparó buffer fosfato salino (PBS), disolviendo sales en agua MilliQ para obtener una composición de 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, and 2,7 mM KCl, pH 7,4, las cuales fueron obtenidas de Cicarelli (Argentina). El DMSO fue adquirido en Biopack (Argentina). El ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) fue obtenido de Fluka Chemie AG (Suiza). El manitol fue adquirido en Cicarelli (Argentina) y su fracción insoluble fue $<0,01\%$ p/p. Los solventes utilizados para los análisis cromatográficos fueron obtenidos de Pharmco Aaper y Sintorgan y todos fueron de calidad HPLC. El medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco con alta glucosa (DMEM High Glucose), el suero fetal bovino (SFB), los compuestos antibióticos y antimicóticos (Penicilina-Estreptocimina-Anfotericina B), la glutamina, y la solución Tripsina-EDTA (0,25%) para los cultivos celulares fueron adquiridos en Gibco™

(Gaithersburg, M. D., EE. UU.). Para medir viabilidad celular *in vitro* se empleó el kit basado en la sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonatofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), adquirido en Biotium (EE. UU.). Para la evaluación de la muerte celular por apoptosis se utilizó el kit de detección de apoptosis basado en anexina V/IP Annexin V-FITC adquirido en BD-Biosciences (EE. UU.).

5.3.2. Preparación de nanopartículas de albúmina sérica bovina

Se prepararon los sistemas de nanopartículas BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Capítulo 1, sección 3.3.2). Brevemente, se prepararon soluciones de BSA_n 4,0% p/p en NaCl 50 mM y se ajustó el pH a 9,0 u 11,0, para obtener BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11, respectivamente. Luego, se dispensaron volúmenes de 2 mL en tubos de vidrio con tapa a rosca que luego se sumergieron en un baño termostático a 70°C durante 5 min. Culminado este tiempo, se retiraron los tubos y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo.

5.3.3. Evaluación de la carga de nanopartículas de albúmina sérica bovina con genisteína

Para la carga de BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11 con Gen, se utilizó la técnica antisolvente empleada en los capítulos anteriores para la carga con Cris (Capítulo 1, sección 3.3.5). Para ello, se preparó una solución stock de Gen 100 mM disolviendo el compuesto en DMSO, y a partir de ésta se prepararon soluciones a concentraciones menores (2 mM y 8 mM). Para la carga con Gen, se agregaron alícuotas (en μL) de solución stock de Gen a la dispersión de BSA_np, contemplando no superar un 2,5% v/v de DMSO, e inmediatamente se agitó con vórtex. La incorporación de Gen en los sistemas BSA_np fue monitoreada mediante mediciones de fluorescencia y turbidez, tal como se describe a continuación.

5.3.3.1. Mediciones de fluorescencia

Se estudió la formación de nanocomplejos entre BSA_np y Gen (BSA_np-Gen) a través de mediciones de fluorescencia. En primer lugar, se realizó una dilución de la solución de BSA_n y las suspensiones de BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11 hasta una concentración final de 0,01 %p/p (1,5 μM BSA) en PBS pH 7,4. Se tituló un volumen de 2 mL de dispersión de BSA_n y BSA_np (1,5 μM BSA) agregando volúmenes crecientes de solución stock de Gen (2 mM u 8 mM, en DMSO) hasta obtener concentraciones finales de Gen en el rango 0-140 μM , contemplando no exceder la concentración final 2,5% v/v de DMSO en los tubos. Inmediatamente después del agregado de Gen, los tubos fueron agitados en vórtex durante 5 s y se dejaron

equilibrar a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h antes de efectuar las mediciones.

Para monitorear la fluorescencia intrínseca (debida principalmente a la emisión del Trp₂₁₂ de BSA), se registraron los espectros de emisión de fluorescencia en el rango 310-400 nm a una longitud de onda de excitación de 295 nm. Por su parte, la fluorescencia extrínseca (debido a la unión de la sonda fluorescente ANS) fue monitoreada agregando 15 µL de solución stock de ANS (8 mM en agua Milli-Q) a 2,0 mL de dispersión. Luego, se registró la emisión de fluorescencia en el rango 400-600 nm a una longitud de onda de excitación de 390 nm. Los espectros fueron obtenidos en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2000 (Japón) utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La resolución espectral fue de 10 nm. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente (25°C) por triplicado.

A partir de los espectros, los datos de intensidad de fluorescencia máxima (IF) fueron expresados en términos de intensidad de fluorescencia relativa (IFR), siendo $IFR = IF/IF_0$, donde IF_0 corresponde a la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína pura (sin agregado de Gen). Los datos de IF fueron utilizados para calcular los parámetros de unión: número de moléculas de Gen unidas (n) y constante de asociación (K_A), ajustando los datos experimentales al modelo de Scatchard [108] previamente utilizado para los nanocomplejos con Cris (Ecuación 17):

$$[P]_{Total}(1 - f_i) = \frac{[Gen]}{n} \left(\frac{1}{f_i} - 1 \right) - \left(\frac{1}{n K_A} \right) \quad (\text{Ec. 17})$$

donde $[P]_{Total}$ es la concentración molar total de proteína (monómero de BSA), $[Gen]$ es la concentración molar de Gen agregada; n es el número de moléculas de Gen unidas en la saturación, y el factor f_i se define como sigue (Ecuación 18):

$$f_i = \frac{FI_i - FI_0}{FI_{max} - FI_0} \quad (\text{Ec. 18})$$

Siendo IF_0 , IF_{max} y IF_i las intensidades de fluorescencia inicial, en la saturación, y a la relación proteína/ligando i, respectivamente.

Adicionalmente, se registraron los espectros de absorción UV-visible de las soluciones de Gen libre (en DMSO), dispersión de BSA_np, BSA_np-Gen con el objeto de analizar los posibles cambios espectrales resultantes de la unión de Gen a la nanopartícula [206].

5.3.3.2. Mediciones de turbidez

La incorporación de Gen en BSAnp fue monitoreada realizando mediciones de absorbancia a 600 nm, la que constituye una medida de la turbidez de la suspensión [126], [127]. Para ello, se diluyeron las dispersiones de BSAnp 4,0%p/p en PBS pH 7,4 hasta una concentración final de proteína de 0,5% p/p y se agregaron alícuotas de una solución stock de Gen (100 mM, en DMSO) para llegar a una concentración final en el rango 200-2,000 μM (incrementos de 200 μM), seguido de agitación en vórtex. El porcentaje final en volumen de DMSO fue menor a 2,5% v/v por lo que fue considerado despreciable. Cada tubo se dejó equilibrar a temperatura ambiente por 30 min. Luego, se registró el valor de absorbancia a 600 nm de cada muestra por duplicado a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) utilizando un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido) equipado con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Para registrar el valor de turbidez inicial, cada muestra se agitó e inmediatamente después se determinó el valor de absorbancia.

5.3.4. Preparación de polvos liofilizados y evaluación de sus propiedades tras la reconstitución

Se obtuvieron polvos liofilizados de los sistemas BSAnp con y sin carga de Gen, incluyendo BSAn como control, mediante el procedimiento descrito en el capítulo anterior. Brevemente, se realizó una dilución de cada dispersión de BSAn o BSAnp hasta una concentración final de proteína de 1,0% p/p en PBS pH 7,4. Luego, se agregó solución stock de Gen (100 mM, en DMSO) hasta una concentración final de Gen de 600 μM , seguido de agitación en vórtex y equilibrado a temperatura ambiente por 1 h. Luego, se agregó una mezcla de PBS (pH 7,4) y manitol 10% p/p hasta obtener una concentración final de 0,5%p/p de proteína (BSAn y BSAnp), 300 μM Gen y 5%p/p de manitol. Se trasvasaron 25 mL de solución a un cristizador (9 mm de diámetro) y se congeló a -20°C durante 24 h. Las muestras congeladas se trasladaron a un liofilizador Alpha 1-4 LDplus (Christ, Osterode, Alemania) donde se realizó un ciclo de liofilización a -60°C durante 24 h, a una presión de $2,1 \times 10^{-3}$ mbar.

Por otro lado, los polvos liofilizados obtenidos fueron reconstituidos agregando la misma cantidad de agua perdida en la liofilización. Para ello, se tomaron muestras de 0,35 g de polvo y se disolvieron en un volumen final de 5 mL de agua Milli-Q. Las muestras se dejaron hidratar y luego se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los sistemas en solución: tamaño de partícula y potencial ζ , eficiencia de encapsulación, capacidad de carga y propiedades citotóxicas sobre células de cáncer de mama, como se describe a continuación.

5.3.4.1. Determinación del tamaño de partícula y potencial ζ

La distribución de tamaño (PSD) y el potencial ζ de los sistemas antes y después de liofilizar se determinaron mediante DLS a 25°C, utilizando un Zeta-Sizer (Nano-ZS 90, Malvern Instruments Ltd, Reino Unido) como se describió en capítulos anteriores (Capítulo 1, secciones 3.3.4.1 y 3.3.4.2).

Tal como se explicó en el Capítulo 2, para evaluar la preservación de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas BSA_n / BSA_{np} con y sin carga de Gen, se calculó la relación de tamaño de partícula hidrodinámico (PS) y la relación de potencial ζ (ZP) antes y después del proceso de liofilización y la reconstitución del polvo. La relación PS se calculó a partir de la relación entre el tamaño de las partículas del sistema después y antes de la liofilización, mientras que la relación ZP se refirió como la relación entre el valor de potencial ζ medido después y antes de la liofilización, como sigue:

$$\text{Relación PS} = \frac{PS_d}{PS_a} \quad (\text{Ec. 19})$$

$$\text{Relación ZP} = \frac{ZP_d}{ZP_a} \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde PS_d y PS_a son los valores de tamaño de partícula obtenidos después y antes de liofilizar, respectivamente, mientras que ZP_d y ZP_a se refieren a los valores de potencial ζ obtenidos después y antes de liofilizar, respectivamente.

5.3.4.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de genisteína

La eficiencia de encapsulación (EE) se refiere a la cantidad de Gen cargada en los sistemas de nanopartículas con respecto a la cantidad total (teórica) añadida. Para determinar la EE de Gen en los sistemas BSA_{np} y en BSA_n, se realizó la extracción y cuantificación de Gen libre, mediante un procedimiento similar al realizado para Cris, descrito anteriormente (Capítulo 1, sección 3.3.5.3). Se tomaron 5 mL de suspensiones de BSA_{np}-Gen y BSA_n-Gen (0,5% p/p BSA y 200 μ M Gen) y se ajustó el pH hasta el punto isoeléctrico de BSA (4,7-4,8), tras lo cual se centrifugó a 10.000 g durante 30 min para lograr la precipitación de los sistemas proteicos junto con Gen encapsulada/cargada. La cantidad de Gen libre presente en 3 mL de sobrenadante, tras la centrifugación, fue extraída agregando 2 mL de acetato de etilo. La mezcla (agua:acetato de etilo, 3:2) se centrifugó a 8.000 g durante 10 min hasta separación de fases. Luego, se tomaron 500 μ L de la fase orgánica (acetato de etilo) y se evaporaron hasta sequedad con corriente de N₂. El residuo de muestra fue disuelto agregando 500 μ L de metanol de grado HPLC y se determinó la concentración de Gen por RP-HPLC

utilizando un método adaptado del certificado de análisis del proveedor. Para ello, se utilizó un equipo HPLC Prominence Serie 20^a (Shimadzu, Japón) con un inyector manual 7725i (Rheodyne, EE. UU.) y detector de arreglo de fotodiodos SPD-M20A (Shimadzu, Japón). Se empleó una columna C18 Waters Symmetry300 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) a temperatura ambiente (25°C). Se prepararon dos fases móviles: agua-ácido acético 0,12% (fase móvil A) y acetonitrilo-ácido acético 0,12% (fase móvil B). Se utilizó un volumen de inyección de 20 µL y el flujo fue de 1 mL/min. El método cromatográfico consistió en un equilibrado inicial con 10% B durante 15 min, seguido de un gradiente lineal con 10–90% B en 12 min, y se finalizó la elución con 90% B durante 8 min. La detección de Gen se realizó por absorbancia a una longitud de onda de 254 nm y para su cuantificación se realizó una curva de calibrado de Gen en el rango 2-135 µg/mL. La linealidad fue verificada en todo el rango de concentraciones evaluado, con un valor de R >0,99.

Una vez cuantificada la cantidad de Gen libre en cada muestra, se calculó la EE como sigue (Ecuación 21):

$$EE(\%) = \frac{Gen_T - Gen_L}{Gen_T} \times 100 \quad (\text{Ec. 21})$$

donde Gen_T corresponde a la cantidad total de Gen presente en la suspensión BSA_n-Gen y Gen_L es la cantidad de Gen libre determinada por RP-HPLC.

Paralelamente, se calculó la capacidad de carga (LC) como la masa de Gen cargada en el vehículo (en µg) por miligramo (mg) de proteína (Ecuación 22):

$$LC \left(\frac{\mu g \text{ Gen}}{mg \text{ proteína}} \right) = \frac{\mu g \text{ Gen}_T - \mu g \text{ Gen}_L}{mg \text{ proteína}} \quad (\text{Ec. 22})$$

5.3.5. Evaluación de propiedades antitumorales *in vitro* de polvos reconstituidos sobre células murinas de adenocarcinoma de mama

5.3.5.1. Línea celular F3II

La evaluación de la potencial actividad antitumoral de los polvos reconstituidos se realizó sobre la línea celular de adenocarcinoma de mama murino F3II, debido a su potencial de formación de tumores altamente invasivos. Esta línea celular fue establecida a partir de una subpoblación clonal de un tumor espontáneo originado en un ratón BALB/c [207], denominado M3. El tumor se clasificó como RE-negativo y moderadamente metastásico hacia el pulmón. A partir de la expansión *in vitro* de suspensiones celulares de tumores primarios preparadas a partir del tumor M3 se obtuvieron diferentes subpoblaciones celulares. Las monocapas F3II de componen

principalmente de células fusiformes, homogéneas en tamaño, forma citoplasmática y nuclear (**Figura 44**). Con frecuencia, las células crecen en forma de espiral [207].

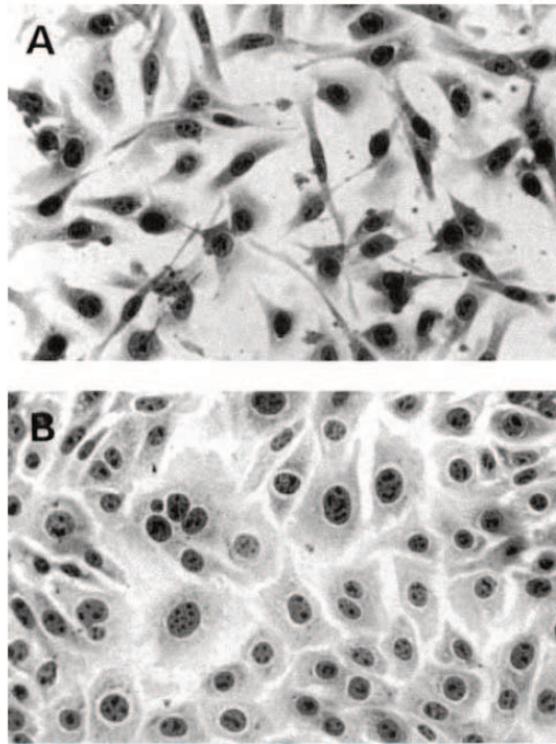


Figura 44. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de células F3II (A) y células M3 (B). Figura modificada de Alonso y col., 1996 [207].

La caracterización celular mostró también que las células F3II son triploides y producen respuestas altamente angiogénicas. En ensayos *in vivo* se comprobó que las células F3II forman tumores altamente invasivos al ser inyectadas por vía subcutánea. Por lo tanto, se considera un modelo adecuado para probar agentes citotóxicos, antiangiogénicos y antimetastásicos.

5.3.5.2. Preparación de las células F3II y condiciones de cultivo

La puesta a punto y el desarrollo de las metodologías detalladas a continuación fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Centro de Medicina Comparada (ICiVet Litoral UNL-CONICET). Como se mencionó anteriormente, la línea celular utilizada fue F3II. Las células F3II fueron cultivadas en medio de Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, compuestos antibióticos-antimicóticos 1X (penicilina-estreptomicina-anfotericina B) y glutamina 1X. La incubación se realizó a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%, en una incubadora orbital.

En primer lugar, las células se incubaron en un matraz de cultivo de 75 cm² hasta alcanzar una confluencia del 70-80% y luego se realizó la digestión con tripsina-EDTA. Las células disgregadas se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo completo. El número de células viables se cuantificó en cámara de Neubauer mediante coloración con el colorante vital azul de tripán.

En base al recuento en cámara de Neubauer, se preparó la cantidad de células necesaria para obtener una suspensión de 100.000 células/mL de medio de cultivo completo y se sembraron 100 µL/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (5 x 10³ células/pocillo), de modo que las células formen una monocapa semi-confluyente. Se incubó la microplaca durante 24 h en incubadora de CO₂ a 37°C. Este período de incubación garantizaría la recuperación celular, la adherencia y progresión al crecimiento en fase exponencial.

5.3.5.3. Determinación de la viabilidad celular

En primera instancia, se evaluaron los efectos antiproliferativos de los polvos reconstituidos de los sistemas BSAnp-Gen a través del ensayo basado en la reducción de la sal soluble en agua 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). Las muestras de polvos reconstituidos se filtraron a través de membrana de 0,22 µm para asegurar su esterilidad. Se incluyó una solución de Gen 100 mM (en DMSO) como control de Gen libre, que también se filtró por 0,22 µm en condiciones de esterilidad. En primer lugar, se evaluaron 4 concentraciones finales de Gen: 25, 50, 100 y 150 µM. Se incluyeron los siguientes controles: PBS, manitol (presente en los polvos liofilizados, por lo que constituye un control de formulación sin activo), medio de cultivo (control de viabilidad) y fenol al 1% v/v (control positivo). Las células F3II previamente fueron cultivadas en microplaca de 96 pocillos (5 x 10³ células/pocillo) y se trataron con las diluciones de las muestras de polvos reconstituidos y controles a 37°C en una incubadora (al 5% de CO₂) durante 72 h (hasta alcanzar una confluencia del 80-90% en las células de control sin tratamiento).

La viabilidad celular se examinó mediante la conversión de la sal XTT en cristales de formazán naranja solubles debido a la acción de las deshidrogenasas mitocondriales. El kit XTT (Cell Viability Kit) se utilizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se homogeneizaron 25 µL de reactivo de activación con 5 mL de solución XTT. Se agregaron 50 µL de la solución XTT activada a cada pocillo y se incubó en estufa durante 4 h. Se agitó suavemente la microplaca para homogeneizar el color en todos los pocillos y se midió el desarrollo de color en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano BGM LABTECH, Offenburg,

Alemania) a 450 nm y 690 nm (como *background*). Se determinó el porcentaje de viabilidad celular como sigue (Ecuación 23):

$$Viabilidad (\%) = \frac{ABS_{muestra}}{ABS_{medio}} \times 100\% \quad (Ec. 23)$$

donde $ABS_{muestra}$ corresponde a la absorbancia registrada para las células tratadas con los diferentes sistemas mientras que ABS_{medio} corresponde a la absorbancia de las células cultivadas en medio de cultivo. Posteriormente, se construyeron las curvas de viabilidad celular (%) en función de la concentración final de Gen, para determinar la concentración a partir de la cual las muestras fueron citotóxicas (viabilidad celular <70%). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Adicionalmente, se observaron los cambios morfológicos en las células F3II tras su exposición a los sistemas BSA_np-Gen a través de un microscopio Zeiss Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

5.3.5.4. Evaluación de apoptosis mediante marcación con sondas fluorescentes y análisis por citometría de flujo

Se detectaron y cuantificaron las diferentes subpoblaciones de células en las etapas temprana y tardía de la apoptosis mediante marcación con anexina V-FITC/IP seguida de análisis de citometría de flujo [208]. Las células F3II se trataron con sistemas reconstituidos cargados con Gen (a 100 μ M y 150 μ M de Gen), y se incubaron como se describió previamente, durante 48 h antes del análisis. Además, se examinaron los controles: (i) control positivo para apoptosis, en el que se añadió H₂O₂ al 5% al medio de cultivo; (ii) control basal, en el que las células se cultivaron en un medio de cultivo puro. Luego de la incubación con las muestras a evaluar, se determinó la muerte celular por apoptosis y/o necrosis utilizando el kit de detección de apoptosis (Annexin V-FITC, BD Biosciences). Brevemente, se agregaron 100 μ L de buffer de *binding* (1X) conteniendo 1 μ L de anexina V-FITC y 0,5 μ L de IP a cada muestra y se incubó durante 15 min en oscuridad. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo Attune NxT (Acoustic Focusing Citometer, A24860, Life Technology). Los porcentajes de células según la presencia de marcadores en su superficie se determinaron tal como fue explicado anteriormente. La apoptosis total (%) se calculó como la suma del porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía.

5.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó de la misma manera que en los Capítulos anteriores. Las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Características moleculares de la unión entre nanopartículas de albúmina sérica bovina y genisteína

En trabajos previos se estudió la unión de Gen a BSA nativa (BSAn) a través de técnicas espectroscópicas [209], [210]. Dado que los sistemas BSAnp se componen de monómeros autoensamblados de BSAn, en este trabajo se estudió la unión de Gen a BSAnp. Los aspectos moleculares implicados en la interacción BSAnp-Gen fueron evaluados por espectroscopía de fluorescencia, tanto intrínseca como extrínseca.

La **Figura 45** muestra los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los sistemas BSAn, BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 a concentraciones crecientes de Gen (0-140 μM) y el inserto en cada panel muestra la evolución de la longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}) con la concentración de Gen. En la misma figura también se muestra la evolución de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR_{Trp}) con la concentración de Gen.

En los espectros se observó que la fluorescencia intrínseca de los tres sistemas ensayados disminuyó gradualmente al aumentar la concentración de Gen, lo cual sería indicativo de un proceso de *quenching* del Trp_{212} . Es necesario destacar que el espectro inicial de BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 (**Figuras 45B y 45C**) (sin agregado de Gen) presenta una intensidad de fluorescencia menor en comparación con el de BSAn (**Figura 45A**), debido a un comportamiento de autoapagamiento (*self-quenching*) de la fluorescencia del Trp_{212} provocado por cambios conformacionales inducidos por tratamiento térmico durante la formación de BSAnp. Este fenómeno fue observado y discutido en el Capítulo 1 del presente trabajo. Además, se observó que los valores de λ_{max} no cambiaron con la adición de Gen, sugiriendo que la unión de Gen no produciría cambios en el entorno molecular del Trp_{212} .

Los valores de IFR_{Trp} para todos los sistemas mostraron una disminución pronunciada al aumentar la concentración de Gen (**Fig. 45D, 45E y 45F**).

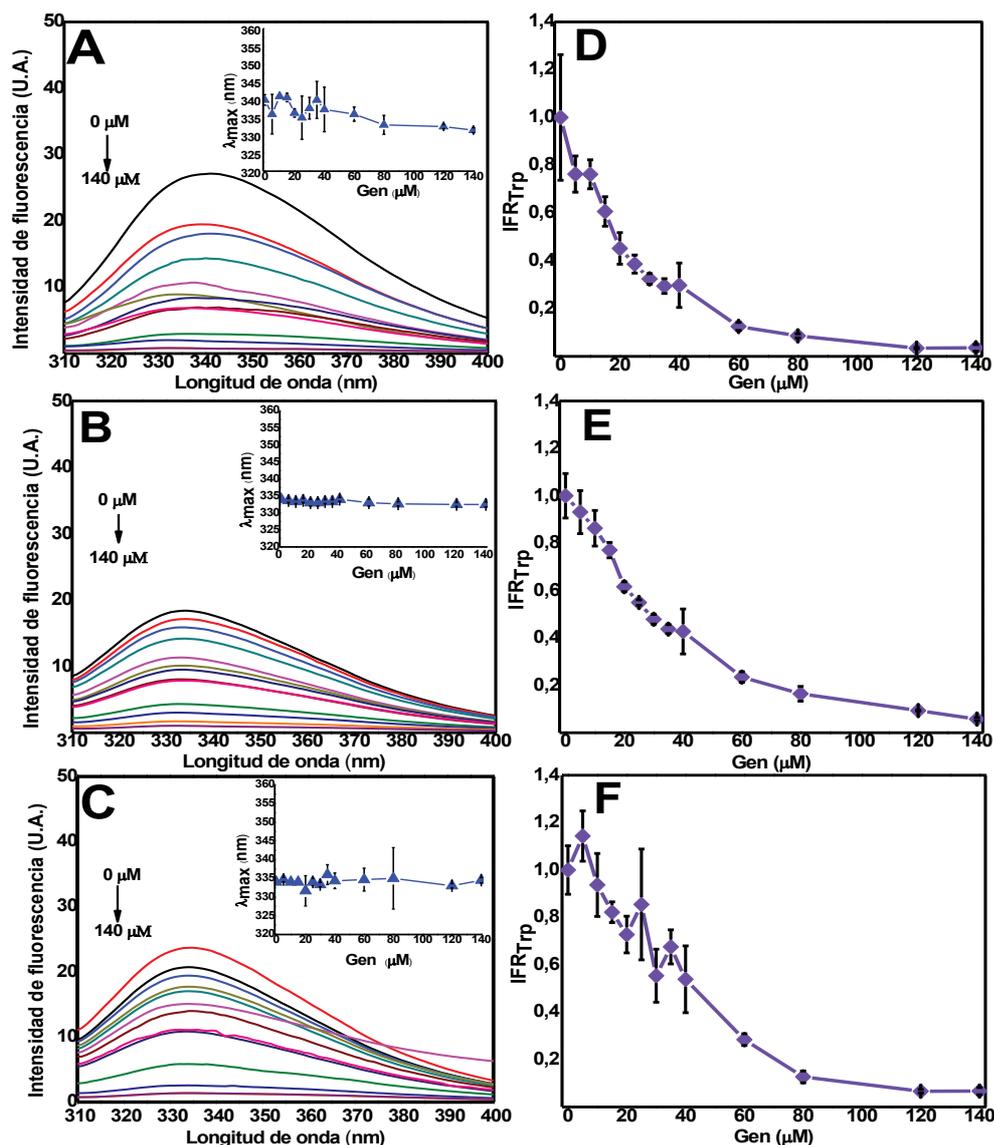


Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de BSA n (A), BSA np-70-9 (B) y BSA np-70-11 (C) (1,5 μ M BSA n) a concentraciones crecientes de Gen (0-140 μ M). Los paneles D, E y F muestran la evolución de la IFR_{Trp} de BSA n, BSA np-70-9, BSA np-70-11 respectivamente, con el aumento de la concentración de Gen.

Este comportamiento podría ser atribuido a la formación de un complejo entre los sistemas BSA n/BSA np y Gen, lo que produciría el apagamiento de la fluorescencia del Trp₂₁₂. Al respecto, se ha reportado en trabajos anteriores que la unión de Gen a BSA n tendría lugar a nivel del sitio de unión 1 de la proteína (subdominio IIA), cercano al Trp₂₁₂ [209], [210]. La formación del complejo entre BSA n y Gen involucraría un proceso de *quenching* estático de Trp₂₁₂, y la unión tendría lugar principalmente a través de interacciones hidrofóbicas. Además, la unión implicaría la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de Gen (-OH) y otros grupos polares en la superficie de la proteína. Según estudios de *docking* molecular realizados, estos residuos de aminoácidos polares serían Leu₁₈₉, Arg₄₃₅, Lys₄₃₁ y Arg₄₂₇ [206].

Es importante señalar que se corroboró que la emisión máxima de fluorescencia para BSA_n no se vio afectada significativamente por el comportamiento de absorción de Gen mediante el solapamiento de los respectivos espectros (Apéndice, sección 8.3), por lo que los fenómenos de transferencia de energía no fueron responsables del fenómeno de *quenching* de fluorescencia observado. Además, se observaron cambios en el espectro de absorción UV para BSA_np en presencia de Gen (Apéndice, sección 8.4) a longitudes de onda en torno a los 208 nm, a la cual absorben los residuos del *framework* de la proteína [211], lo que revela que la formación del complejo BSA_np-Gen involucraría cambios conformacionales en BSA_np.

Por otro lado, la comparación entre los aspectos moleculares de la unión de Gen con los concernientes a la unión con Cris es importante a fin de evaluar la versatilidad de los sistemas BSA_np como vehículos para flavonoides. En el Capítulo 1 de la presente Tesis se discutió la interacción entre Cris y BSA_np, incluyendo BSA_n como control. Para comparar las interacciones BSA_np-Cris y BSA_np-Gen, en la **Figura 46** se muestran las curvas de IFR_{Trp} a concentraciones crecientes de Gen y Cris.

De manera similar a los resultados de fluorescencia para los sistemas con Gen, la adición de concentraciones crecientes de Cris provocó una reducción de la emisión de fluorescencia de Trp₂₁₂, que también se atribuyó a un proceso de *quenching*.

A partir de la comparación de las curvas, se observó que para la adición de Cris los valores de IFR_{Trp} alcanzaron la saturación a 40 μM, mientras que la adición de Gen parecería alcanzar un comportamiento de saturación a concentraciones más altas. Además, se observó un desplazamiento hipsocrómico (hacia el azul) de λ_{\max} para la interacción BSA_n-Cris, lo que sugirió que el entorno molecular de Trp₂₁₂ se tornó cada vez menos polar tras la unión de Cris. Este desplazamiento hacia el azul también se observó en la interacción BSA_n-Gen (**Figura 46A**), por lo que se puede deducir que Gen y Cris se unen a la proteína nativa en sitios similares produciendo cambios conformacionales y, en consecuencia, una disminución de la polaridad alrededor de los residuos de Trp. Por otro lado, para los sistemas BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11, se observó que la unión de Cris resultó en un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) de λ_{\max} , lo que podría indicar que Trp₂₁₂ se movió desde un ambiente hidrofóbico a uno más polar. Por tanto, este comportamiento indicaría que la unión de Cris a BSA_np produce cambios conformacionales de la proteína.

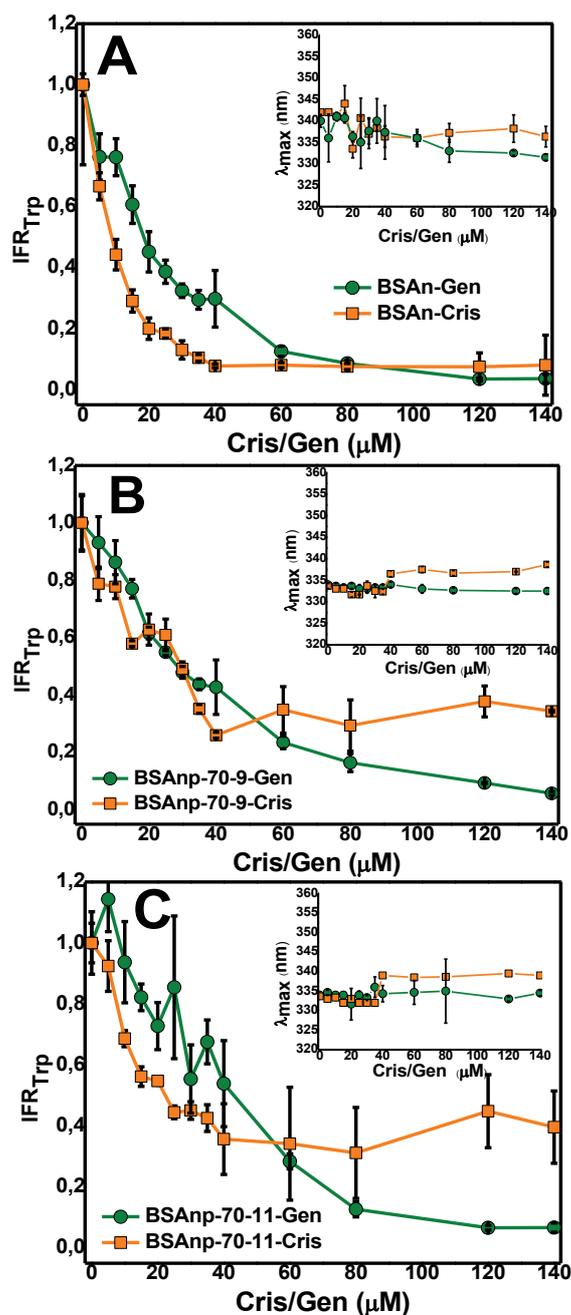


Figura 46. Comparación entre las curvas de evolución de la intensidad relativa de fluorescencia del Trp (IFR_{Trp}) de BSAAn (A), BSAnp-70-9 (B), BSAnp-70-11 (C) a concentraciones crecientes de Gen y de and Cris en el rango 0-140 μM .

Por el contrario, los espectros de fluorescencia a concentraciones crecientes de Gen para los sistemas BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 (**Figura 46B** y **Figura 46C**, respectivamente) no mostraron cambios significativos en λ_{max} . Esta observación podría indicar que la unión de Gen a los sistemas BSAnp no produjo cambios conformacionales significativos y, en consecuencia, no se alteró la polaridad del entorno del residuo Trp₂₁₂.

Para obtener los parámetros de unión, los datos experimentales se ajustaron al modelo Scatchard modificado, y se calculó el número de moléculas Gen unidas por monómero (n_m) y por vehículo (n_v) y la constante de asociación (K_A) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Número de sitios de unión por monómero de BSA (n_m) y por vehículo (n_v), y constante de afinidad (K_A) obtenidos mediante la aplicación del modelo de Scatchard modificado.

| Sistema | n_m | n_v | $K_A (10^6 M^{-1})$ | R |
|-----------------|---------------|----------------|---------------------|----------|
| BSAn-Gen | 36 ± 15^a | 36 ± 15^a | $0,7 \pm 0,4^a$ | $> 0,91$ |
| BSAnp-70-9-Gen | 35 ± 10^a | 286 ± 77^b | $0,3 \pm 0,1^a$ | $> 0,94$ |
| BSAnp-70-11-Gen | 50 ± 7^a | 336 ± 44^b | 5 ± 8^a | $> 0,83$ |

Para todos los sistemas, el número de moléculas de Gen unidas por monómero (n_m) fueron de alrededor de 35-50, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas (en base a comparaciones de Fisher con $p < 0,05$). Este resultado podría indicar que Gen se une a BSAnp de un modo similar a BSAn, por lo que el proceso de formación de BSAnp no alteraría el comportamiento de unión de Gen. En comparación con los valores de n_m para la unión de Cris (10-18, según lo reportado en el capítulo 1), la unión de Gen involucra más moléculas que la unión de Cris. Teniendo en cuenta la estructura química de los flavonoides (**Figura 42**), el grupo -OH adicional en el anillo B podría favorecer el número de moléculas Gen unidas a los sistemas. Además, los valores de n_m para Cris aumentaron para los sistemas BSAnp en comparación con BSAn, mientras que para Gen no se observó este comportamiento. Por otro lado, a partir de los valores de peso molecular (PM) para los sistemas BSAnp (530 kDa y 440 kDa, para BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11, respectivamente) fue posible estimar el número de moléculas Gen unidas por nanopartícula de (n_v , como también se muestra en la **Tabla 10**). A partir de estos valores, se puede deducir que los sistemas BSAnp (como vehículos) tendrían una mayor capacidad de unión de Gen en comparación con el monómero BSAn. Con respecto a la afinidad de unión, los valores de la constante de asociación (K_A) fueron del orden de $10^6 M^{-1}$. Los valores de K_A obtenidos para la unión de Cris a los sistemas BSAn y BSAnp se encontraron en el mismo orden (Capítulo 1, sección 3.3.5.1), lo que sugiere que la afinidad por ambos flavonoides sería similar. El valor más alto de K_A se obtuvo para el sistema BSAnp-70-11-Gen. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

Por otro lado, la **Figura 47** muestra los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca, debida a la unión de ANS a los dominios hidrofóbicos de los sistemas. A

partir de las curvas, se observó una disminución en IFR_{ANS} a medida que aumentó la concentración de Gen para todos los sistemas.

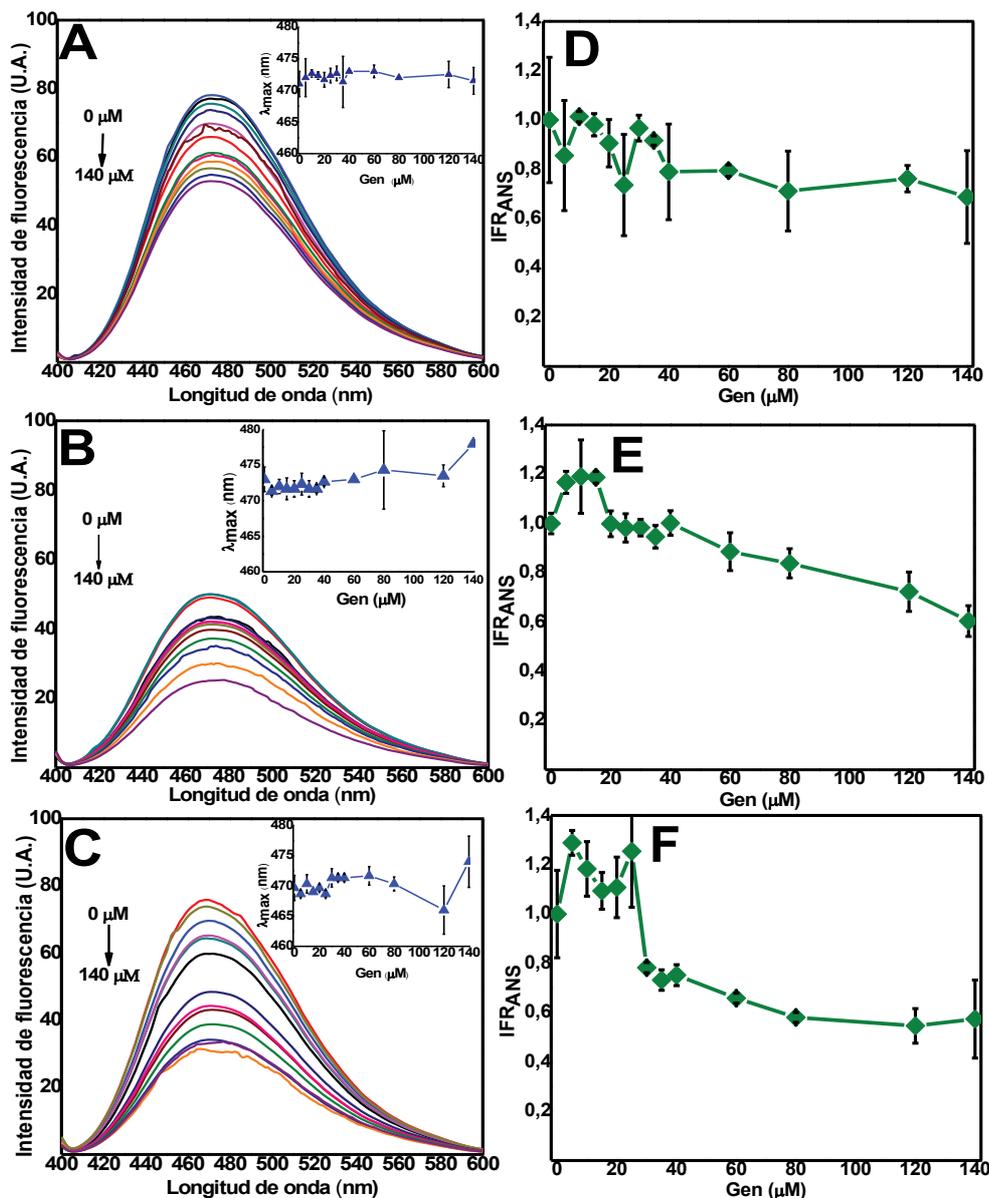


Figura 47. Espectros de emisión de fluorescencia extrínseca de BSA (A), BSAnp-70-9 (B) and BSAnp-70-11 (C) a concentraciones crecientes de Gen (0-140 μM). Los paneles D, E y F muestran la evolución de la IFR_{ANS} de BSA, BSAnp-70-9, BSAnp-70-11 (1,5 μM BSA) respectivamente, con el incremento de la concentración de Gen.

Dado que la unión de ANS a la proteína se considera una medida de la hidrofobicidad superficial, estos resultados podrían sugerir que la formación de BSAnp mediante el proceso de agregación térmica provocaría la oclusión de dominios hidrofóbicos y la formación de estructuras con menor hidrofobicidad superficial en comparación con la proteína nativa. Finalmente, todas estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos previamente para la unión de Cris, en los que se observó prácticamente el mismo comportamiento (**Figura 48**).

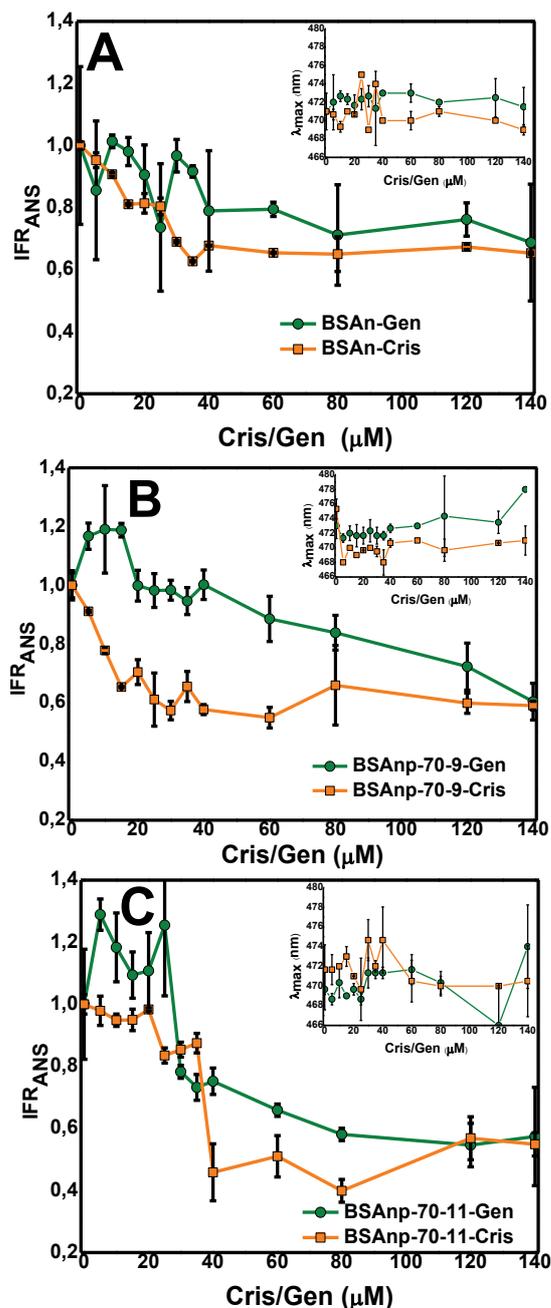


Figura 48. Comparación entre las curvas de evolución de la intensidad relativa de fluorescencia de ANS (IFR_{ANS}) de BSAn (A), BSAnp-70-9 (B), BSAnp-70-11 (C) a concentraciones crecientes de Gen y de Cris en el rango 0-140 μM .

A partir de la comparación de las curvas de IFR_{ANS} , es posible notar que la reducción de fluorescencia extrínseca para los sistemas BSAnp debido a la adición de Cris fue ligeramente más pronunciada que la de la correspondiente a la adición de Gen.

5.4.2. Efecto de la carga de genisteína sobre la turbidez de suspensiones y eficiencia de encapsulación

Debido a su baja solubilidad en agua, es asumido que, al agregar Gen a un medio acuoso, se producirá la precipitación del compuesto. En este aspecto, se ha reportado en estudios previos que las moléculas de Gen, al ser pequeñas e hidrofóbicas, pueden autoasociarse formando cristales grandes que sedimentan en medios acuosos [212]. Teniendo en cuenta estos datos y considerando que los resultados de fluorescencia discutidos anteriormente evidencian la unión BSA_{np}-Gen en sitios cercanos al Trp₂₁₂, al agregar Gen a una suspensión de BSA_{np}, las moléculas de Gen se estabilizarían en suspensión acuosa mediante su unión a BSA_{np}, mientras que las moléculas de Gen libres producirían agregados o cristales que al precipitar podrían medirse en términos de un aumento en la turbidez de la suspensión. Además, un exceso de Gen libre podría promover la asociación entre las estructuras de proteínas al actuar como puente entre estas, y en consecuencia aumentar el tamaño de las partículas del sistema. Para evaluar este comportamiento, se realizaron mediciones de absorbancia a 600 nm (como medida de turbidez) de las suspensiones acuosas de BSA_{np} tras la adición de concentraciones crecientes de Gen (en el rango de 0 – 2 x10³ μM), y se incluyó BSA_n como control. En la **Figura 49**, puede distinguirse claramente que la turbidez aumentó en las suspensiones de los sistemas BSA_n y BSA_{np}-70-11 al aumentar la concentración de Gen.

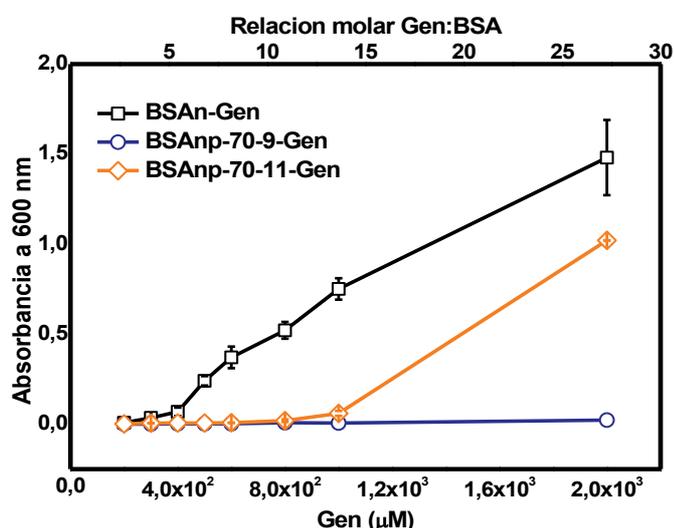


Figura 49. Efecto de la adición de Gen (0 – 2 x10³ μM) sobre la turbidez (medida como absorbancia a 600 nm) de las suspensiones de BSA_n, BSA_{np}-70-9 y BSA_{np}-70-11.

En la solución de BSA_n, la turbidez aumentó después de la adición de 500 μM de Gen, mientras que para la suspensión de BSA_{np}-70-11 este incremento se observó a una concentración de Gen más alta (a ~ 1000 μM). Por el contrario, para la suspensión de BSA_{np}-70-9, se observaron valores de turbidez cercanos a cero en el

rango de concentración de Gen evaluado. De acuerdo con estudios previos, a una relación molar Gen: proteína baja se produciría una mayor carga de Gen, mientras que los aumentos en la relación molar conducirían a la precipitación de una mayor cantidad de moléculas de más moléculas de Gen libre [212]. Al respecto, para BSA_n, el incremento de la turbidez se produjo a una relación molar Gen: BSA_n de 5:1; mientras que para el sistema BSA_np-70-11 se observó una relación molar Gen: BSA_np más alta (10:1). Estas observaciones sugerirían que el sistema BSA_np-70-11 podría cargar una cantidad de Gen dos veces mayor en comparación con BSA_n. Por otro lado, la suspensión de BSA_np-70-9 no mostró valores altos de turbidez, lo que indica que este sería el vehículo más eficiente para solubilizar Gen en medios acuosos. Esta observación concuerda con el tamaño y el PM de los sistemas BSA_np. El sistema BSA_np-70-9 tiene un tamaño y PM elevados (15,4 nm y 530 kDa, respectivamente) en comparación con el sistema BSA_np-70-11 (13,6 nm y 440 kDa), por lo que se podrían cargar más moléculas de Gen. En base a estas observaciones, la carga de Gen se vería favorecida en vehículos de mayor tamaño como sigue: BSA_np-70-9 > BSA_np-70-11 > BSA_n.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para la adición de Cris, se observó un comportamiento similar en las curvas de turbidez para ambos flavonoides (**Figura 50**). En las curvas puede observarse que la adición de Cris dio como resultado una mayor turbidez para la solución de BSA_n en comparación con las suspensiones de BSA_np. Asimismo, también se puede notar que la adición de Gen a la suspensión de BSA_np-70-11 resultó en sistemas más turbios en comparación con la adición de Cris. Sin embargo, la concentración a la que la turbidez de la suspensión de BSA_np-70-11 comenzó a aumentar fue aproximadamente la misma para ambos flavonoides (1.000 μM), lo cual corresponde a una relación molar de flavonoide: BSA_np de 13:1. Por el contrario, la adición de Gen a la suspensión BSA_np-70-9 dio como resultado un ligero aumento de la turbidez, mientras que la adición de Cris, en el rango de 0,8 – 2,0 x10³ μM, produjo un incremento significativo de la turbidez. Estas observaciones podrían indicar que, pese a que la unión de Gen y Cris al sistema BSA_np-70-11 fue similar, los flavonoides tendrían diferentes modos de unión al sistema BSA_np-70-9.

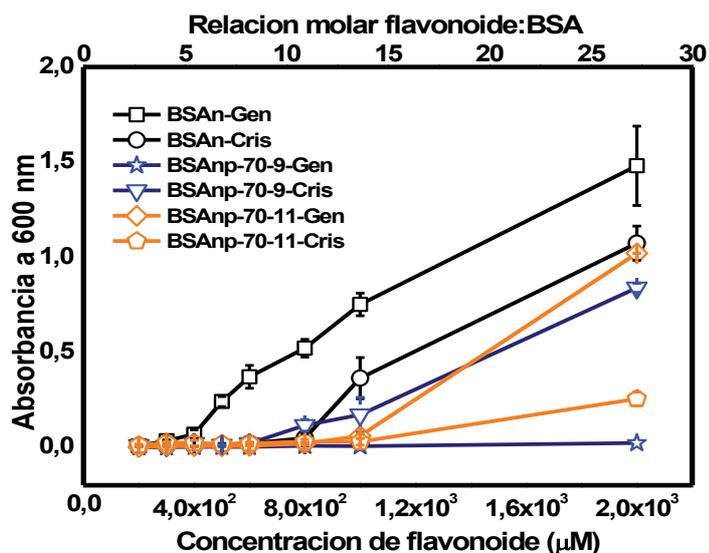


Figura 50. Comparación entre el efecto de la adición de Gen y Cris ($0 - 2 \times 10^3 \mu\text{M}$) sobre la turbidez (medida como absorbancia a 600 nm) de las suspensiones de BSAAn, BSAAnp-70-9 y BSAAnp-70-11.

Finalmente, se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC) de Gen en los sistemas evaluados. Los resultados se resumen en la **Tabla 11**, junto con los valores obtenidos para Cris y otras propiedades fisicoquímicas discutidas anteriormente.

Tabla 11. Resumen de propiedades fisicoquímicas (diámetro hidrodinámico d_H y carga superficial), eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC) de los sistemas BSAAn, BSAAnp-70-9 y BSAAnp-70-11 cargados con Gen y Cris.

| Sistema | d_H (nm) | Potencial ζ (mV) | EE (%) | LC (mg flavonoide/mg proteína) |
|-------------------|----------------|------------------------|------------|--------------------------------|
| BSAAn-Gen | $9,6 \pm 0,9$ | $-10,6 \pm 0,1$ | 16 ± 5 | $1,4 \pm 0,4$ |
| BSAAn-Cris | $9,4 \pm 0,2$ | $-11,2 \pm 0,2$ | 25 ± 2 | $2,1 \pm 0,2$ |
| BSAAnp-70-9-Gen | $21,2 \pm 0,4$ | $-11,0 \pm 0,6$ | 26 ± 3 | $2,1 \pm 0,3$ |
| BSAAnp-70-9-Cris | $19,6 \pm 0,5$ | $-11,8 \pm 0,4$ | 44 ± 3 | $5,4 \pm 0,1$ |
| BSAAnp-70-11-Gen | $15,9 \pm 0,8$ | $-10,6 \pm 0,07$ | 24 ± 6 | $2,1 \pm 0,6$ |
| BSAAnp-70-11-Cris | $20,5 \pm 0,9$ | $-13,1 \pm 0,4$ | 47 ± 2 | $3,8 \pm 0,2$ |

A partir de la tabla, se puede observar que la eficiencia de encapsulación (EE) para Gen en sistemas BSAAnp fue de entre 24-26% con una capacidad de carga (LC) de alrededor de $2,1 \mu\text{g}$ de flavonoide / mg de proteína. Estos valores fueron menores que los obtenidos para Cris (44-47% EE y $3,8-5,4 \mu\text{g}$ de flavonoide / mg de proteína). Por su parte, la EE para Gen en BSAAn fue $16 \pm 5\%$ ($1,4 \pm 0,4 \mu\text{g}$ flavonoide / mg proteína), también inferior al obtenido para Cris ($25 \pm 2\%$ y $2,1 \pm 0,2 \mu\text{g}$ flavonoide/mg

proteína). Estos resultados indicarían que la carga de flavonoide en las nanopartículas se encontraría favorecida de la siguiente manera: BSA_{np}-Cris > BSA_{np}-Gen > BSA_{np}-Cris > BSA_{np}-Gen. Eso significa que la carga de flavonoides es más eficiente en BSA_{np}, lo cual es coherente si consideramos que BSA_{np} está formado por monómeros autoensamblados de BSA_{np}. En términos de estos resultados, se puede deducir que la carga de flavonoides (o solubilización) en los sistemas proteicos estaría fuertemente influenciada por los efectos combinados del estado conformacional de la proteína (nativa frente a agregada), el tamaño de la nanopartícula y la estructura química de los flavonoides. Dado que Gen y Cris son estereoisómeros en el anillo B, las diferencias observadas en la unión de estos flavonoides a BSA_{np} y BSA_{np} podrían ser explicadas en base a las diferencias en sus estructuras químicas. En este sentido, Gen presenta un grupo -OH adicional en el anillo B que podría favorecer el número de moléculas Gen unidas a los sistemas. Además, la posición de la unión del anillo B al anillo C también podría influir en el modo de unión del flavonoide a la nanopartícula. Gen posee el anillo B unido al anillo C en posición 3, mientras que en Cris este anillo se encuentra unido en posición 2. Por lo tanto, la isomería de flavonoides y la cantidad de grupos -OH podrían tener una influencia en el modo de unión a la proteína, afectando a la carga de la nanopartícula.

5.4.3. Propiedades fisicoquímicas de los polvos liofilizados de nanopartículas de BSA cargadas con Gen tras su reconstitución

Luego de corroborar la unión BSA_{np}-Gen y la máxima cantidad de Gen que es posible agregar a la suspensión de BSA_{np} sin que ocurra precipitación apreciable de Gen libre (1.000 μM), se obtuvieron polvos liofilizados de los sistemas BSA_{np} cargados con dicho compuesto. Se siguió un procedimiento general similar al utilizado para la obtención de los polvos de BSA_{np} libre y BSA_{np} cargadas con Cris: se prepararon soluciones de liofilización añadiendo manitol como agente crioprotector en las siguientes concentraciones finales: 0,5% p/p BSA_{np}, 300 μM Gen y 5% p/p manitol, que se congelaron y liofilizaron durante 24 h. Mediante este procedimiento se obtuvieron polvos de aspecto aceptable y reconstitución rápida en agua.

Con el objeto de evaluar la conservación de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas tras el proceso de liofilización, se reconstituyeron muestras de cada sistema (0,35 g en 5 mL de agua Milli-Q) y se midió el tamaño de partícula y potencial ζ por DLS. La observación macroscópica demostró que las soluciones reconstituidas fueron transparentes, límpidas y libres de partículas en suspensión (**Figura 51**).

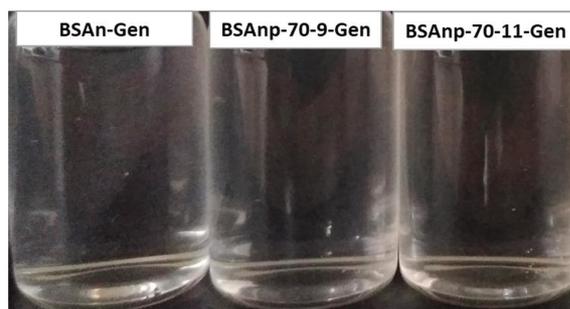


Figura 51. Aspecto visual de las soluciones reconstituidas de polvos de los distintos sistemas BSA_np cargados con Gen, incluyendo BSA_n como control.

Utilizando los datos obtenidos por DLS (ver curvas en Apéndice, sección 8.5), se calcularon las relaciones de los parámetros a partir de los valores del diámetro hidrodinámico de las partículas (relación PS) y del potencial ζ (relación ZP) (**Figura 52**). De acuerdo con lo propuesto por Zhi-gang y col. (2009) [213], si la relación se encuentra entre 0,7 y 1,3 (es decir, representa un cambio de $\sim 30\%$), se considera que el sistema de nanopartículas tiene una buena reconstitución acuosa.

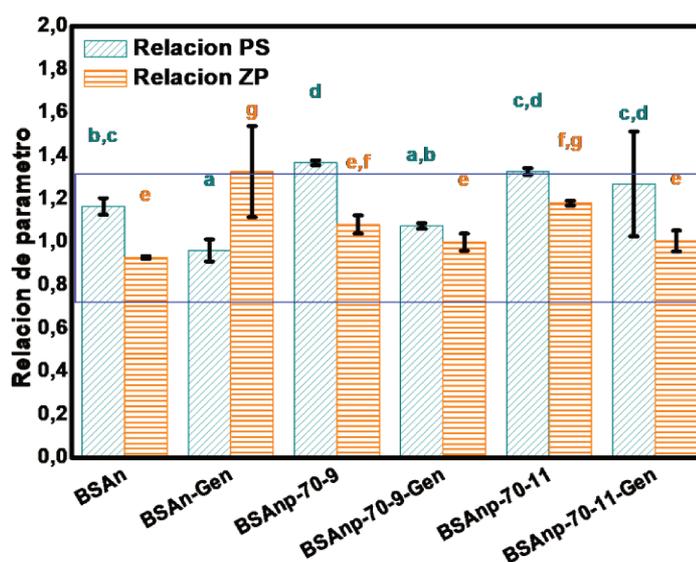


Figura 52. Relación de tamaño de partícula (PS) y potencial ζ (ZP) antes y después de liofilizar de los sistemas BSA_np con y sin carga de Gen, incluyendo BSA_n como control. La zona resaltada indica la región de relación PS entre 0,7 y 1,3 dentro de la cual se considera una buena reconstitución de los polvos liofilizados. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras ($p < 0,05$).

En general, las relaciones PS y ZP no cambiaron más del 30%, lo que sugiere una buena reconstitución de polvos liofilizados. Los resultados fueron similares a los obtenidos para los sistemas BSA_np cargados con Cris, como fue discutido en el capítulo 2, excepto para el sistema BSA_np-70-11-Cris que exhibió un aumento en el tamaño de partícula de $\sim 45\%$ después de la liofilización, probablemente debido a una cantidad de Cris que permanece insoluble después de la reconstitución.

Además, se determinaron los valores de EE y LC de Gen en los sistemas BSAnp tras la reconstitución de los polvos, los que se presentan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC) de los sistemas BSAn, BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 cargados con Gen.

| Sistema | EE (%) | LC (μg flavonoide/mg proteína) |
|-----------------|------------|--|
| BSAn-Gen | 86 ± 2 | $4,5 \pm 0,1$ |
| BSAnp-70-9-Gen | 88 ± 1 | $11,4 \pm 0,2$ |
| BSAnp-70-11-Gen | 86 ± 1 | $11,2 \pm 0,2$ |

Los valores de EE para los sistemas BSAn-Gen, BSAnp-70-9-Gen y BSAnp-70-11-Gen fueron muy similares: $86 \pm 2\%$, $88 \pm 1\%$ y $86 \pm 1\%$, respectivamente. Este resultado fue consistente con los valores de EE después de la liofilización de los sistemas BSAnp cargados con Cris, en los cuales se observó un aumento significativo de EE en comparación con el obtenido antes de la liofilización. Además, los valores de LC fueron $11,1 \pm 0,2$, $11,4 \pm 0,2$ y $11,2 \pm 0,2$ μg de flavonoide/mg de proteína, respectivamente (**Tabla 12**) y fueron el doble del valor de LC obtenido para los sistemas cargados con Cris. De estos resultados, se puede deducir que el proceso de liofilización mejoraría significativamente la asociación de los flavonoides a los vehículos BSAnp.

5.4.4. Efectos citotóxicos de polvos reconstituidos sobre células F3II

En estudios previos, se ha reportado que Gen libre (disuelta en DMSO) produce un efecto antiproliferativo sobre la línea celular F3II, siendo $3 \mu\text{M}$ la concentración media inhibitoria (IC_{50}) para las células tratadas durante 24 h, y $2 \mu\text{M}$ tras 48 h de exposición [197]. La reducción en la viabilidad sería producida por un arresto en la fase G2/M del ciclo celular, asociado un aumento de la expresión de la quinasa p34 fosforilada y la ciclina B1. Por otro lado, en otro estudio se reportó una IC_{50} de $26,3 \mu\text{M}$ luego de incubar las células F3II durante 96 h con Gen [198]. En este estudio se reportó además que Gen es capaz de reducir la migración de las células F3II y de aumentar su adhesión a sustrato en concentraciones en el rango $0,5\text{-}50 \mu\text{M}$, lo cual estaría asociado a la actividad antiangiogénica y antimetastásica de la isoflavona.

Por lo tanto, para evaluar la potencial actividad antitumoral de los sistemas BSAnp cargados con Gen, se examinaron los efectos antiproliferativos de los polvos reconstituidos sobre células F3II mediante el ensayo XTT, incluyendo Gen libre (en

DMSO) como control. En primer lugar, se examinaron distintas concentraciones de Gen con el fin de evaluar la concentración más apropiada a utilizar en ensayos posteriores. Para ello, se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo de las soluciones reconstituidas hasta alcanzar las concentraciones de Gen requeridas: 25, 50, 100 y 150 μM . La **Figura 53** muestra las curvas de viabilidad de las células F3II tras la incubación con los polvos reconstituidos de los sistemas BSA_n/BSA_np durante 72 h.

A partir de las curvas se pudo observar que los sistemas cargados con Gen (BSA_n-Gen, BSA_np-70-9-Gen y BSA_np-70-11-Gen) produjeron una inhibición del crecimiento celular al aumentar la concentración de Gen, mientras que en los sistemas sin Gen la reducción de la viabilidad celular fue muy leve (>20%). La curva correspondiente a Gen libre (en DMSO) muestra que la concentración de Gen a la cual se reduce la viabilidad celular hasta un 70% (criterio para que una sustancia sea considerada citotóxica) fue de aproximadamente 76 μM .

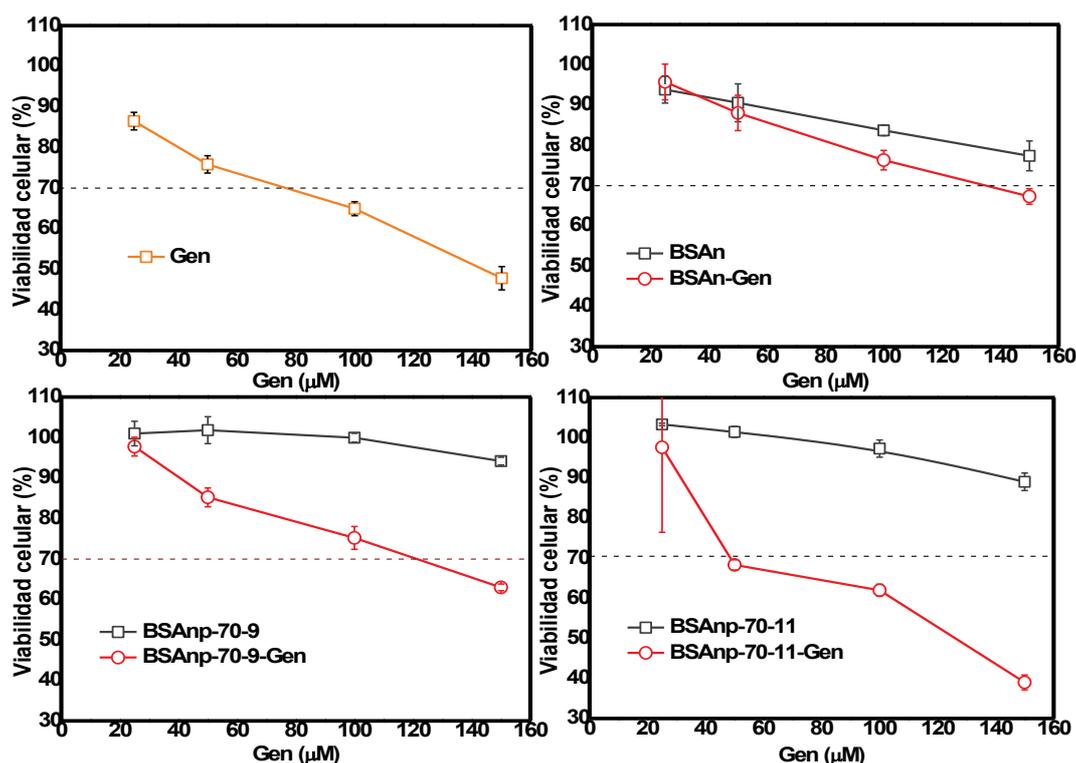


Figura 53. Curvas de viabilidad de células F3II tras su incubación con los sistemas BSA_n-Gen and BSA_np-Gen durante 72 h, incluyendo Gen libre. La línea punteada señala el 70% de viabilidad celular.

Con respecto a la carga de Gen en BSA_np, BSA_np-70-11-Gen produjo efectos citotóxicos más pronunciados en comparación con BSA_n-Gen, lo cual podría sugerir que la carga de Gen en nanopartículas formadas a 70°C y pH 11,0 resultaría en mayores efectos citotóxicos en comparación con los sistemas obtenidos a 70°C y pH

9,0 y la proteína libre. De los sistemas BSAnp, el que produjo mayores efectos citotóxicos fue BSAnp-70-11, con una reducción de la viabilidad celular del 70% a 50 μ M de Gen.

A partir de la observación de que los sistemas presentaron efectos citotóxicos a concentraciones de Gen mayores a 100 μ M, se repitió el ensayo XTT a dos concentraciones finales de Gen: 100 y 150 μ M. La **Figura 54** presenta los porcentajes de viabilidad celular para cada sistema, a las dos concentraciones evaluadas. Tal como fue observado en las curvas de viabilidad preliminares, los porcentajes de viabilidad mostraron una disminución significativa para los sistemas cargados de Gen al incrementar la concentración de Gen, lo que sugiere que la citotoxicidad de los sistemas estaría ligada a la presencia de Gen y sería dosis-dependiente. Además, los sistemas sin carga mostraron una pequeña reducción en la viabilidad celular (<20%), que fue más pronunciada para los sistemas BSAn en comparación con los sistemas BSAnp. Esta observación podría indicar que BSAn tendría una actividad citotóxica intrínseca en el intervalo de concentración proteica ensayado (0,15-0,25% p/p), la cual no se conservaría tras la formación de BSAnp debido al tratamiento térmico. La misma citotoxicidad intrínseca asociada a BSAn se observó anteriormente sobre células MCF-7 y MDA-MB-231 (Capítulo 2), pero en ese caso, los sistemas BSAnp mostraron una citotoxicidad intrínseca más pronunciada en comparación con BSAn, lo que sugiere que los sistemas BSAnp sin carga producen efectos sobre la viabilidad celular dependiendo de las características de la línea celular.

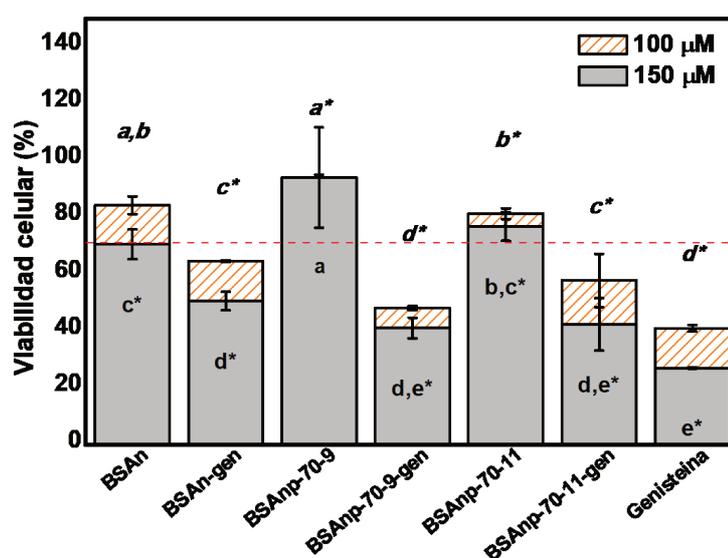


Figura 54. Efecto de los sistemas BSAn y BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 con y sin carga de Gen sobre la viabilidad de células F3II a 100 μ M and 150 μ M Gen, luego de 72 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del nivel basal y se muestran como media \pm desviación estándar (n=3). Letras diferentes en la parte superior (a-d) e inferior (a-e) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras a 100 y 150 μ M, respectivamente. * diferencia

significativa con respecto al nivel basal ($p < 0,05$). La línea de puntos delimita el 70% de viabilidad.

Los sistemas BSAnp-70-9-Gen y BSAnp-70-11-Gen fueron los sistemas más citotóxicos, mostrando una reducción del 60% en la viabilidad celular, y no se observaron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). El sistema BSAn-Gen mostró una reducción menor en la viabilidad celular (~ 50%), lo que sugiere que los sistemas BSAnp serían los sistemas de vehiculización más adecuados para Gen en términos de sus propiedades citotóxicas. Gen libre (en DMSO) mostró la mayor citotoxicidad con una reducción de ~ 70% en la viabilidad celular; sin embargo, es importante resaltar que, al estar disuelta en DMSO, Gen está presente en el medio en una condición de máxima solubilidad que no podría alcanzarse considerando aspectos de administración.

Por otro lado, para obtener información sobre la dependencia de la citotoxicidad con el tamaño de la nanopartícula, se evaluó la citotoxicidad de los sistemas BSAnp obtenidos a 85°C. Tal como se explicó anteriormente (Capítulo 1, sección 3.4.3.3), los sistemas BSAnp-85-9 y BSAnp-85-11 mostraron mayor tamaño (27,8 nm y 20,3 nm, respectivamente) y PM (1.000 kDa y 590 kDa, respectivamente) en comparación con BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11 sistemas (alrededor de 13-15 nm y 440-530 kDa). La **Figura 55** muestra los porcentajes de viabilidad obtenidos para todos los sistemas al ser evaluados frente a células F3II durante 72 h.

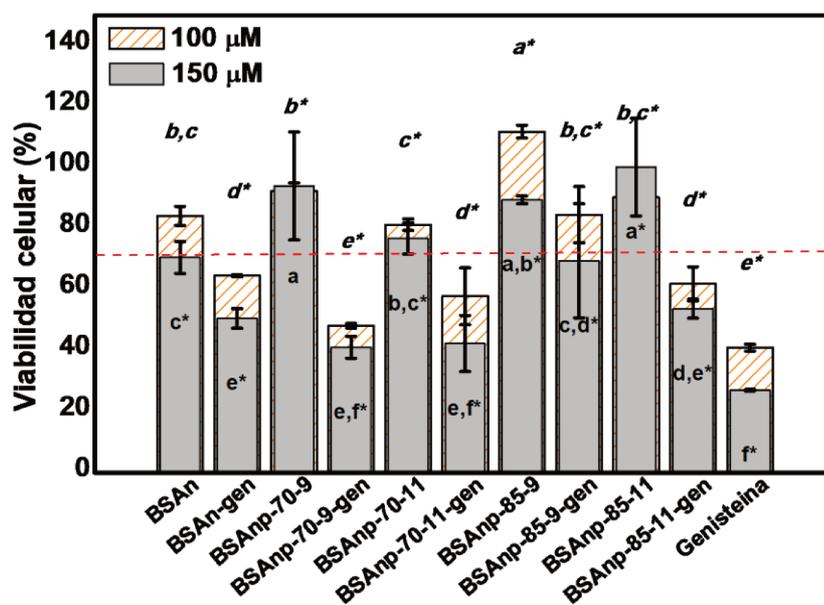


Figura 55. Efecto de los sistemas BSAn y BSAnp con y sin carga de Gen sobre la viabilidad de células F3II a 100 μM y 150 μM Gen, luego de 72 h de incubación. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del nivel basal y se muestran como media ± desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes en la parte superior (a-d) e inferior (a-e) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras a 100 μM y 150 μM, respectivamente. *diferencia

significativa con respecto al nivel basal ($p < 0,05$). La línea de puntos delimita el 70% de viabilidad.

A partir de estas gráficas se puede observar que la carga de Gen en el sistema BSAnp-85-9 produjo una reducción en la viabilidad celular hasta el límite del 70%, mientras que la carga de Gen en el sistema BSAnp-85-11 produjo efectos mayores (reducción hasta ~ 50-60% de viabilidad celular). En base a estos resultados, se puede concluir que existiría una relación entre el tamaño de los sistemas BSAnp y la citotoxicidad celular producida sobre células F3II, siendo mayor el efecto de Gen al ser vehiculizada en BSAnp de menor tamaño (13-15 nm).

Las diferencias en el comportamiento de la citotoxicidad entre los sistemas BSAn y BSAnp podrían explicarse considerando la hipótesis de que todo el sistema flavonoide-albúmina se internalizaría en la célula tumoral. En este sentido, se sabe que los mecanismos subyacentes a la captación de albúmina son diferentes a los de las nanopartículas de albúmina. Por tanto, la captación del sistema BSAn-flavonoide en las células diana podría tener lugar mediante pinocitosis; mientras que para BSAnp-flavonoide podría ocurrir mediante endocitosis [92], [214]. Además, se conoce que la rigidez de las nanopartículas podría afectar su absorción celular. Las nanopartículas más rígidas interactuarían más estrechamente con la membrana plasmática de la célula, lo que provocaría una endocitosis rápida [215].

5.4.5. Inducción de apoptosis sobre células F3II

Una vez que se corroboró la actividad citotóxica de los sistemas BSAnp cargados con Gen, se evaluó la apoptosis en células F3II a la concentración de Gen más alta ensayada (150 μM). Para ello, las células fueron incubadas con soluciones de polvos reconstituidos de BSAn y BSAnp en una concentración final de Gen de 150 μM a 37 °C durante 48 h. La **Figura 56A** muestra el porcentaje para diferentes subpoblaciones de células obtenido por citometría de flujo.

Se pudo observar que el porcentaje de células necróticas fue menor al 5% en todos los sistemas evaluados, incluido Gen libre, por lo que el principal mecanismo de muerte celular es la inducción de apoptosis. Los sistemas sin carga (BSAn, BSAnp-70-9 y BSAnp-70-11) mostraron la existencia de poblaciones de células apoptóticas en aproximadamente el 30%, principalmente células en apoptosis temprana. Esto podría sugerir que la citotoxicidad intrínseca de tanto los sistemas BSAn como BSAnp sobre las células F3II sería producida a través de la inducción de apoptosis. Los sistemas con carga de Gen (BSAn-Gen, BSAnp-70-9-Gen y BSAnp-70-11-Gen) mostraron

porcentajes más altos de células en apoptosis tardía en comparación con los sistemas sin carga, por lo que la apoptosis inducida por Gen ocurriría de manera más extensa.

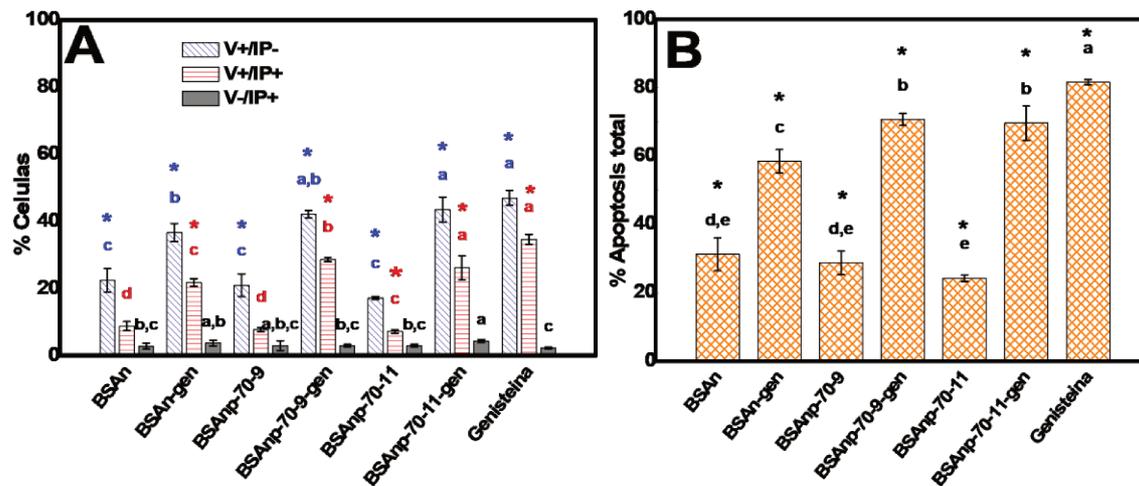


Figura 56. Porcentaje de células F3II en apoptosis temprana (anexina V+/IP-) y apoptosis tardía (anexina V+/IP+) y necróticas (anexina V-/IP+) analizado por citometría de flujo (A) y porcentaje de apoptosis total (B). Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al nivel basal y se representan como promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). *diferencia significativa con respecto al nivel basal ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

A partir de los resultados de la apoptosis total (**Figura 56B**) puede deducirse que los sistemas BSAAnp-70-9-Gen y BSAAnp-70-11-Gen produjeron los porcentajes más altos de apoptosis total (~ 70%). En comparación con estos sistemas, el sistema BSAAn-Gen indujo apoptosis con menor magnitud (58% de la apoptosis total). Gen libre indujo apoptosis en un 81%, y se consideró la actividad máxima en una condición que, como se mencionó anteriormente, no se puede lograr en términos de aspectos de administración (en DMSO).

En cuanto a la morfología celular, se sabe que las células F3II crecen con un patrón en forma de huso [198], [207]. La **Figura 57** muestra los cambios morfológicos que sufren las células F3II tras su incubación con polvos reconstituidos de BSAAn con y sin carga de Gen.

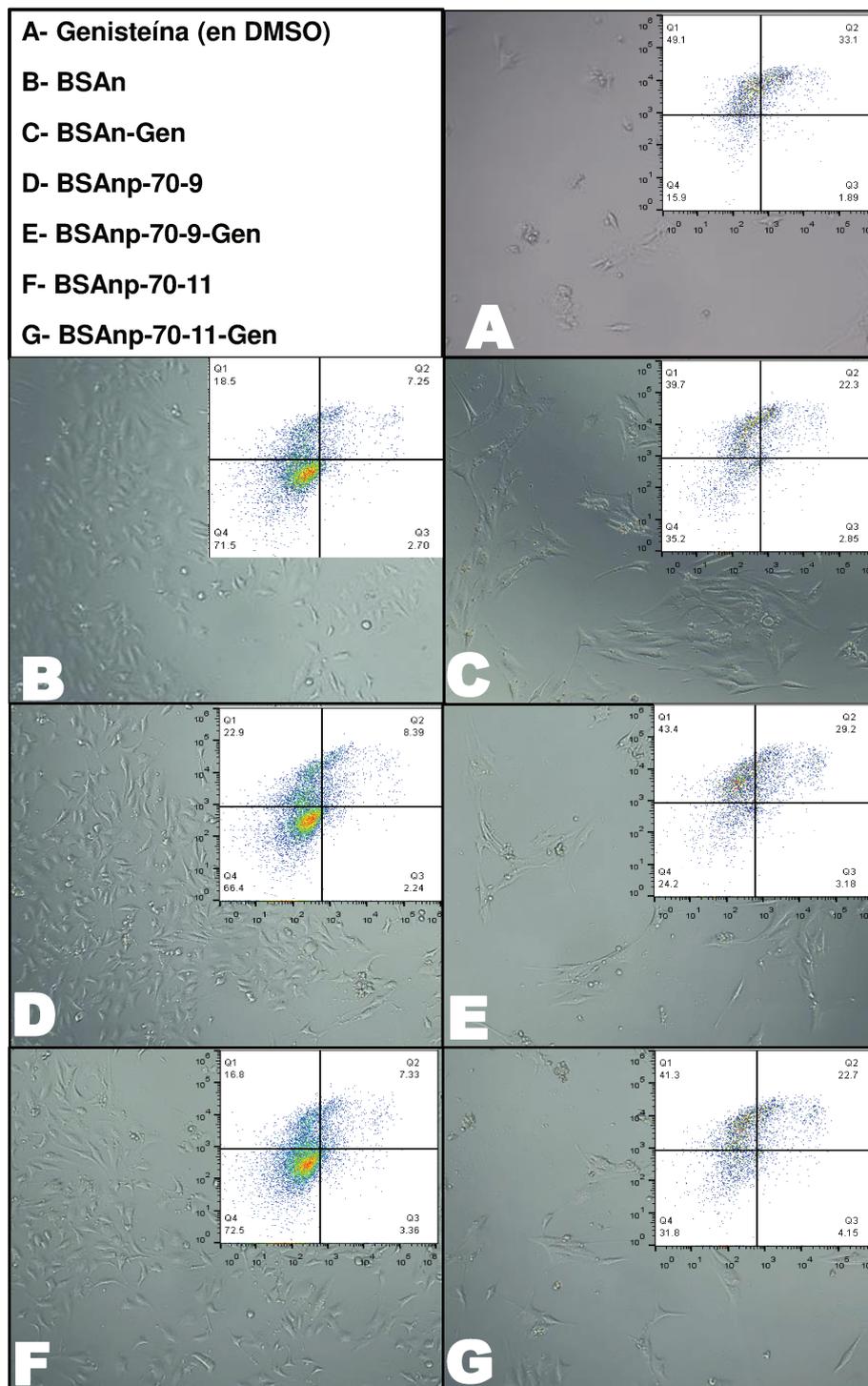


Figura 57. Cambios morfológicos en células F3II inducidos por los sistemas BSA_n con y sin carga de Gen, incluyendo BSA_n como control. El inserto en la parte superior muestra el gráfico obtenido por citometría de flujo.

A partir de las fotografías, se puede apreciar que las células tratadas con sistemas cargados con Gen fueron más alargadas que las tratadas con sistemas sin Gen. Esta observación fue consistente con los estudios *in vitro* mencionados anteriormente, en los que se informó que Gen induce una morfología de células

fusiformes [198]. Además, se reportó que Gen es capaz de incrementar la adhesión celular de la línea F3II [198] y de inducir cambios morfológicos en la línea celular de cáncer de próstata PC3-M [216]. Según estos estudios previos, la inducción de cambios morfológicos en las células tumorales estaría asociado a la inhibición de los factores de transcripción constitutivamente activos NF- κ B y AP-1, lo cual resultaría en la supresión de la secreción del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) [217]. Asimismo, se pudo corroborar que la actividad citotóxica de los polvos de BSA_{np}-Gen estaría relacionada con la presencia de Gen, ya que las células tratadas con BSA_n y BSA_{np} sin carga mostraron una mayor densidad celular.

5.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En esta tercera parte del trabajo de tesis se estudió la incorporación de la isoflavona Gen en los sistemas BSA_{np}-70-9 y BSA_{np}-70-11 y se comparó con los resultados obtenidos para la flavona Cris. A partir de estudios espectroscópicos se determinó que la unión de Gen a BSA_{np} involucró interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. Un número en el rango de 286-336 moléculas de Gen se unió a BSA_{np}, con una constante de asociación de alrededor de 10^6 M⁻¹. En comparación con Cris, la unión de Gen a BSA_{np} involucró más sitios; mientras que la constante de asociación fue similar para ambos flavonoides. Dado que Gen y Cris son estereoisómeros en el anillo B, las diferencias observadas en la unión de estos flavonoides a BSA_n y BSA_{np} podrían ser explicadas en base a las diferencias en sus estructuras químicas.

La carga de Gen en BSA_{np} también fue corroborada por mediciones de turbidez en las que se obtuvo una mejor solubilización en comparación con la carga en la proteína nativa BSA_n. Además, se obtuvieron mayores eficiencias de encapsulación (EE) para Gen en los sistemas BSA_{np} de mayor tamaño. Se concluyó entonces que la carga de flavonoides (o solubilización) en los sistemas de proteínas estaría fuertemente influenciada por los efectos combinados del estado conformacional de la proteína (nativa frente a agregada), el tamaño de partícula y la estructura química de los flavonoides. La cantidad de grupos -OH y posición del anillo B influirían en el modo de unión a la nanopartícula, y determinaría la carga del flavonoide en el sistema proteico.

Por otra parte, se obtuvo una formulación liofilizada de los BSA_{np} cargados con Gen y se comprobó la preservación de sus propiedades coloidales después de la reconstitución. La carga de Gen en los sistemas BSA_{np} fue mayor después del proceso de liofilización, lo que reafirma la hipótesis de que la liofilización mejoraría la asociación de los flavonoides a BSA_{np}. Los sistemas liofilizados se ensayaron *in vitro*

en células F3II de adenocarcinoma mamario murino revelando una reducción en la viabilidad celular y una alteración de la morfología celular, las cuales serían dependientes de la concentración de Gen. Los efectos citotóxicos fueron mayores para BSAnp cargados con Gen en comparación con los de los sistemas BSAn cargados con Gen, lo que sugiere que BSAnp serían los sistemas de vehiculización más adecuados. Finalmente, el principal mecanismo de muerte celular identificado para los sistemas BSAnp cargados con Gen fue la inducción de apoptosis. En resumen, los sistemas BSAnp con tamaños entre 13-15 nm serían sistemas de vehiculización versátiles para la incorporación de flavonoides presentando una mejor solubilidad en agua y efectos citotóxicos conservados sobre células tumorales.

6. CAPÍTULO 4

PEGilación de nanopartículas de albúmina sérica bovina cargadas con genisteína y su efecto sobre células de cáncer de mama

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. PEGilación de proteínas y nanopartículas

El diseño de nanopartículas para la vehiculización y liberación controlada de drogas es cada vez más sofisticado, incluyendo la adición de grupos superficiales para el direccionamiento a sitios *target* y mejoramiento de sus propiedades [218]. Una de las modificaciones más utilizadas es la unión de una o varias moléculas de polietilenglicol (PEG), procedimiento conocido como PEGilación. El PEG es un poliéter lineal que posee un grupo hidroxilo en cada extremo. La parte alifática (etileno) le confiere hidrofobicidad mientras que el oxígeno le permite formar puentes de hidrógeno con el agua, por lo cual es soluble tanto medio acuoso como en una amplia variedad de solventes orgánicos. Puede obtenerse mediante síntesis química controlando el peso molecular y ser modificado mediante la adición de una variedad de grupos funcionales [219]. Debido a la flexibilidad de las cadenas de PEG y su capacidad de coordinar entre 2 y 3 moléculas de agua, las moléculas de PEG tienen un peso molecular aparente entre 5 y 10 veces mayor en relación a proteínas globulares de pesos moleculares comparables [220].

En los últimos 30 años la PEGilación se ha utilizado extensamente para mejorar las propiedades fisicoquímicas, biomédicas y farmacológicas de moléculas terapéuticas, tales como péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos y moléculas pequeñas. Es bien conocido que la unión de PEG a nanopartículas de uso terapéutico permite aumentar la hidrofiliidad superficial y mejorar la vida media en circulación al disminuir las interacciones con proteínas plasmáticas y con el SFM, evitando así el reconocimiento y remoción de las nanopartículas por parte del sistema inmune [96], [97]. Además, el incremento del diámetro hidrodinámico asociado a la PEGilación mejoraría la biodistribución de las nanopartículas en aplicaciones terapéuticas ya que se disminuiría la rápida eliminación renal de las mismas [221], [222].

La PEGilación puede llevarse a cabo a través de diversas técnicas usando derivados de PEG que son unidos covalentemente por reacción química o enzimática, o mediante la adsorción reversible de cadenas de PEG sobre la superficie de una nanopartícula. Debido a que el PEG es un diol (tiene grupos hidroxilo a ambos extremos de la cadena) presenta como desventaja la posibilidad de reacciones cruzadas, y de la unión del PEG a dos macromoléculas por medio de ambos extremos [223]. Para evitar esto, para la PEGilación de polipéptidos y proteínas, con frecuencia se utiliza metoxi-polietilenglicol (mPEG), ya que posee un extremo bloqueado con un grupo metoxilo, y un grupo hidroxilo reactivo en el otro extremo (**Figura 56**).

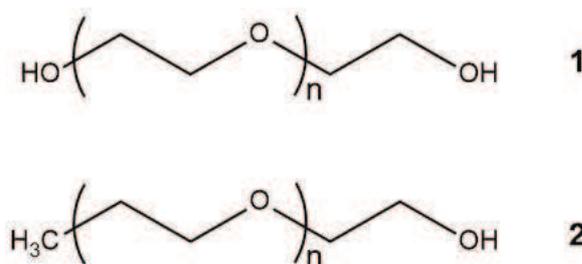


Figura 56. Estructura química de PEG (1) y mPEG (2). Elaboración propia utilizando ChemDraw Professional (Perkin Elmer, 2017).

Para conjugar mPEG a otra molécula en forma covalente es necesario activar la molécula de mPEG obteniendo un derivado que posea un grupo funcional en un extremo. La elección del derivado a obtener se realiza en función del grupo funcional de la molécula a la cual se va a conjugar la cadena. En proteínas, los grupos funcionales más utilizados para PEGilación son los grupos amino primarios (como el grupo amino terminal y el grupo ϵ -amino de los residuos de Lys), el grupo amino secundario de His, el grupo tiol de Cys y, en menor medida, el carboxilo terminal, el grupo carboxilo de Asp y Glu y el grupo hidroxilo de la Tyr, Ser y Thr [220], [224].

Debido a que el grupo hidroxilo terminal de mPEG no es lo suficientemente reactivo para permitir su conjugación a biomoléculas, se utilizan derivados reactivos de mPEG, obtenidos mediante modificación química. En este sentido, existen 3 clases generales de reactivos de mPEG: i) reactivos de acilación, ii) reactivos de alquilación, iii) reactivos selectivos a grupos tiol.

6.1.2. Conjugación al grupo amino como estrategia de PEGilación

Se ha determinado que, para la PEGilación de proteínas, los aminoácidos más adecuados son: Lys > Cys > Tyr > His > Asp > Glu > Arg > Trp > Ser > Thr > Met [220]. Por lo tanto, la estrategia más común para la PEGilación de proteínas y sus nanopartículas derivadas es la conjugación del derivado de mPEG a grupos ϵ -amino de los residuos de Lys, mediante reacciones de alquilación o acilación.

La conjugación de los grupos ϵ -amino de Lys se encuentra favorecida en una condición de $\text{pH} > 8,5$, a la cual se comportan como buenos nucleófilos ya que el pK_a de los residuos de Lys es de alrededor de 9,4 [220]. Por el contrario, en condiciones de pH ligeramente neutro-ácido ($\text{pH} < 8,0$) se produciría la conjugación preferentemente del grupo amino N-terminal de la proteína, al ser este grupo menos básico que el grupo ϵ -amino de Lys. En general, el residuo Lys está ampliamente presente en la mayor parte de las proteínas, representando aproximadamente un 10% del total en una secuencia típica de aminoácidos, por lo que la conjugación al grupo amino de Lys

es considerada una estrategia versátil para la PEGilación de proteínas terapéuticas y, en consecuencia, de nanopartículas proteicas.

Dependiendo del reactivo de mPEG utilizado, la reacción de PEGilación por conjugación al grupo ϵ -amino de Lys puede implicar la formación de un enlace amida o un enlace carbamato y/o uretano. Particularmente, se han estudiado ciertos reactivos de mPEG acilantes que permiten obtener enlaces uretano estables frente a la hidrólisis [223]. Entre ellos, se encuentra el reactivo mPEG-carbonil imidazol (mPEG-Im) (Figura 57), el cual ha sido previamente utilizado para la PEGilación de enzimas y otras proteínas globulares, tales como la enzima superóxido dismutasa, α_2 -macroglobulina, lactoferrina [225], fosfatasa alcalina [226], entre otras.

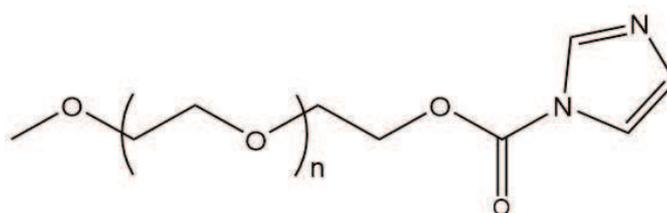


Figura 57. Estructura química del derivado mPEG-carbonil imidazol (mPEG/Im). Elaboración propia utilizando ChemDraw Professional (Perkin Elmer, 2017).

El reactivo de mPEG-Im puede obtenerse mediante síntesis química empleando un mPEG del peso molecular deseado y carbonildiimidazol (CDI) en tetrahidrofurano (THF) a 60°C [224]. Se conoce que el derivado mPEG-Im posee baja reactividad, por lo que la reacción de PEGilación debe efectuarse utilizando altas relaciones molares proteína:mPEG-Im y tiempos de reacción largos.

6.1.3. Antecedentes de PEGilación de albúmina sérica bovina y nanopartículas de albúminas

Para la PEGilación de proteínas y nanopartículas proteicas es necesario que la reacción se efectúe en medio acuoso y en condiciones suaves, es decir, que permitan mantener la estructura y conformación proteica, evitando condiciones de pH y fuerza iónica extremos. Se ha reportado que los factores de control más importantes durante el proceso de conjugación son: concentración de reactivo de mPEG, pH del medio acuoso, tiempo y temperatura de reacción [227].

La PEGilación de BSA se ha reportado hace varios años [228], lográndose una reducción de su inmunogenicidad y una vida media más prolongada. BSA (65,5 kDa) posee 59 residuos de Lys por molécula y un grupo amino en el extremo N-terminal, por lo cual los grupos amino primarios constituyen los sitios más atractivos para la unión covalente de PEG a estas estructuras. Un esquema general de la reacción de

PEGilación de BSA utilizando la conjugación a grupos ϵ -amino de Lys se muestra en la **Figura 58**.

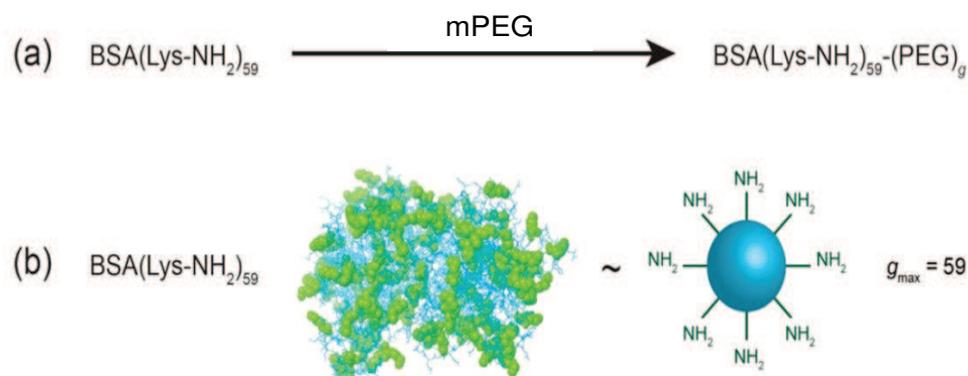


Figura 58. Esquema general de la reacción de PEGilación de BSA (a) junto con la ilustración de BSA y sus 59 residuos de Lys (b). g_{max} = número máximo de moléculas de PEG conjugadas por monómero de BSA. Figura modificada de Ferebee y col., 2016 [229].

Por otro lado, se ha estudiado la PEGilación de nanopartículas de BSA obtenidas por desolvatación y entrecruzamiento con glutaraldehído, utilizando diferentes reactivos de mPEG de una amplia variedad de pesos moleculares [227], [230]. En cuanto a las condiciones de PEGilación reportadas en la bibliografía, en general la reacción se realiza a temperatura ambiente, en medio acuoso (solución reguladora de pH comprendido en el rango 7,0-9,0) y el corte de reacción puede efectuarse por agregado de algún compuesto que reaccione inactivando el mPEG o mediante un aumento de pH por agregado de un ácido o base fuerte. La separación de PEG libre y los productos de PEGilación se realiza frecuentemente mediante centrifugación (para nanopartículas de mayor tamaño), cromatografía de exclusión molecular o ultrafiltración. Luego, la caracterización de los productos de PEGilación obtenidos se realiza empleando diferentes técnicas que incluyen electroforesis, cromatografía, DLS, microscopía confocal y AFM. La adición de un número variable de cadenas de PEG a las nanopartículas sumado a los posibles sitios de PEGilación origina una población de moléculas PEGiladas con una distribución Gaussiana, donde los distintos isómeros posicionales generados son llamados isoformas. Además, según estudios reportados, la PEGilación puede producir un aumento del diámetro hidrodinámico obtenido por DLS [230] y/o de la carga neta superficial de la nanopartícula [227].

En base a lo anteriormente expuesto, en el presente capítulo se evaluó la PEGilación de nanopartículas de albúmina sérica bovina (BSAnp), en particular los sistemas obtenidos mediante tratamiento térmico a 70°C y pH 11,0 cargados con la isoflavona Gen (BSAnp-70-11-Gen). En capítulos anteriores se determinó que BSAnp-

70-11 está constituida por 7 monómeros de BSA, con un peso molecular de 440 kDa, tamaño de partícula de aproximadamente 13,6 nm y potencial ζ de -9,8 mV en PBS. Se utilizó un reactivo de mPEG-Im de 30 kDa, por lo que la adición de más de una cadena de PEG a la superficie de BSAnp resultaría en un aumento apreciable del peso molecular y, por lo tanto, del tamaño de partícula. La PEGilación de BSAnp-70-11-Gen aumentaría su estabilidad en medio acuoso a la vez que permitiría evadir posibles respuestas inmunes al ser administrada en forma parenteral. En este sentido, resulta de importancia la evaluación de su actividad antitumoral *in vitro*, y la conservación de las propiedades antitumorales luego de la PEGilación.

6.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos que se plantearon en este capítulo fueron:

Objetivo 1: Evaluar la PEGilación del sistema BSAnp-70-11-Gen con mPEG-Im de 30 kDa mediante conjugación a grupos ϵ -amino de Lys.

Objetivo 2: Caracterizar mediante parámetros fisicoquímicos los productos de PEGilación obtenidos.

Objetivo 3: Estudiar los efectos citotóxicos y genotóxicos *in vitro* de los productos de PEGilación sobre células de cáncer de mama.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1. Materiales

Se utilizó BSAn y Gen, cuya fuente y características se detallaron en capítulos anteriores. Se prepararon las siguientes soluciones reguladoras: PBS, pH 7,4 y borato 50 mM (pH 8,0) disolviendo las sales (Cicarelli, Argentina) en agua MilliQ. El DMSO fue adquirido en Biopack (Argentina). Para la síntesis del derivado de mPEG reactivo se utilizó mPEG de 30 kDa adquirido en JenKem Technology (Allem, EE.UU.) y N,N'-carbonildiimidazol (CDI) provisto por Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Los solventes tetrahidrofurano (THF) y éter dietílico se destilaron a partir de cetil benzofenona sódica. Se obtuvo diclorometano anhidro mediante destilación en P_2O_5 . Para la evaluación de propiedades antitumorales *in vitro* se empleó medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco con alta glucosa (DMEM High Glucose), suero fetal bovino (SFB), compuestos antibióticos y antimicóticos (Penicilina-Estreptocimina-Anfotericina B), glutamina, y solución Tripsina-EDTA (0,25%) adquiridos en Gibco™ (Gaithersburg, M. D., EE. UU.). Para medir viabilidad celular *in vitro* se utilizó la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) adquirida en Invitrogen (EE. UU.). Para la

evaluación de la muerte celular por apoptosis se utilizó el kit de detección de apoptosis Annexin V-FITC, adquirido en BD-Biosciences (EE. UU.). Para el ensayo de micronúcleos se utilizó citocalasina B y colchicina, ambas adquiridas en Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

6.3.2. Síntesis y purificación de mPEG-carbonil imidazol de 30 kDa

La síntesis y purificación del derivado reactivo mPEG-carbonil imidazol (mPEG-Im) de 30 kDa se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica Aplicada del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, UNL-CONICET). El reactivo fue obtenido siguiendo la estrategia de síntesis reportada por González y col., (2013) [220]. Brevemente, se disolvió 1,2 g de mPEG (30 kDa, 0,1 mmol) en THF anhidro (6 mL) a 60°C. Se añadió CDI (49 mg, 0,3 mmol) y la solución se agitó a 60°C durante 18 h. Luego, se evaporó el solvente mediante vacío, se disolvió el residuo en agua y se realizaron 5 extracciones con 25 mL de cloroformo cada una. La fase orgánica se evaporó a presión reducida y se secó al vacío hasta peso constante. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se disolvió en diclorometano y se purificó por precipitación con éter etílico. El producto obtenido se analizó por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (^1H RMN), registrando el espectro del compuesto disuelto en cloroformo deuterado (CDCl_3) en un espectrofotómetro Bruker Avance de 300 MHz utilizando la señal de solvente residual como referencia.

6.3.3. Preparación de nanopartículas de BSA cargadas con genisteína

Se preparó una suspensión de BSA_{np-70-11} siguiendo el procedimiento descrito en capítulos anteriores. Brevemente, se preparó una solución de BSA 40 mg/mL en NaCl 50 mM y se ajustó el pH a 11,0. Luego, se dispensaron volúmenes de 2 mL en tubos de vidrio con tapa a rosca que luego se sumergieron en un baño termostatzado a 70°C durante 5 min. Culminado este tiempo, se retiraron los tubos y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Se realizó una dilución de la suspensión de BSA_{np-70-11} en solución reguladora del pH consistente en borato 50 mM (pH 8,0) hasta una concentración de BSA de 20 mg/mL y se ajustó el pH a 8,5 por agregado de HCl 1 M. Para realizar la carga con Gen, a un volumen de 2,5 mL de suspensión de BSA_{np-70-11} se agregaron 30 μL de solución stock de Gen 100 mM (en DMSO) y se agitó inmediatamente en vórtex durante 5 s. El sistema se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 1 h. De esta manera se obtuvo una concentración final de Gen de 1,2 mM en 20 mg/mL de proteína lo cual, afectado por la capacidad de carga (LC) de BSA_{np-70-11} (2,1 μg Gen/mg proteína), representa una concentración de 42 μg Gen/mL. El mismo procedimiento de carga de Gen se realizó

para el sistema BSA_n (con una LC de 1,4 µg Gen/mg proteína) obteniéndose una concentración de Gen de 28 µg/mL.

6.3.4. Reacciones de PEGilación de nanopartículas de BSA cargadas con genisteína utilizando mPEG-carbonil imidazol de 30 kDa

Se realizaron reacciones de PEGilación del sistema BSA_np-70-11 cargado con Gen (BSA_np-70-11-Gen) empleando el reactivo mPEG-Im de 30 kDa. Se incluyó la proteína nativa cargada con Gen (BSA_n-Gen) como control. Las reacciones se realizaron empleando la estrategia de conjugación a grupos ε-amino de Lys, solución reguladora del pH borato (50 mM) a un pH de 8,5, condición en la cual los grupos ε-amino encuentran desprotonados y, por lo tanto, son lo suficientemente nucleofílicos para reaccionar con mPEG-Im formando enlaces uretano. La temperatura de reacción fue de 20°C y el tiempo de 24 h. Se seleccionó una relación molar 1:20 para BSA_n:PEG y BSA_np:PEG, en base a ensayos previos donde se evaluaron distintas condiciones de reacción utilizando un reactivo de mPEG éster de 30 kDa (Apéndice, sección 8.6). Para comenzar la reacción, se agregó la masa de mPEG-Im adecuada a un tubo con tapa a rosca conteniendo un volumen de 2,5 mL de sistema (BSA_n-Gen o BSA_np-70-11-Gen) a una concentración proteica de 20 mg/mL y se mantuvo en un baño de agua a 20°C bajo agitación magnética durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizó el corte de reacción por cambio de pH, agregando 25 µL de NaOH 5 M. Se tomaron muestras a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) para su análisis mediante las técnicas que se describen a continuación.

6.3.5. Análisis de los productos de PEGilación

El resultado de las reacciones de PEGilación se evaluó mediante la determinación de los grupos amino disponibles en las muestras tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}). Luego, las muestras se purificaron por cromatografía SEC-FPLC, con el objeto de separar el remanente de mPEG-Im sin reaccionar, y las fracciones obtenidas se analizaron mediante las técnicas que se describen a continuación, con el fin de caracterizar los productos de reacción obtenidos.

6.3.5.1. Determinación de grupos amino disponibles mediante el método de OPA

6.3.5.1.1. Fundamentos del método espectrofotométrico de determinación de grupos amino libres por reacción con o-ftaldehído

El compuesto o-ftaldehído (OPA), en presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol), reacciona con aminas primarias en condiciones de pH por encima de su punto isoeléctrico, formando un derivado isoindol 1,2-disustituido detectable por

absorción espectrofotométrica a 340 nm [231], [232]. La reacción química involucrada se esquematiza en la **Figura 59**.

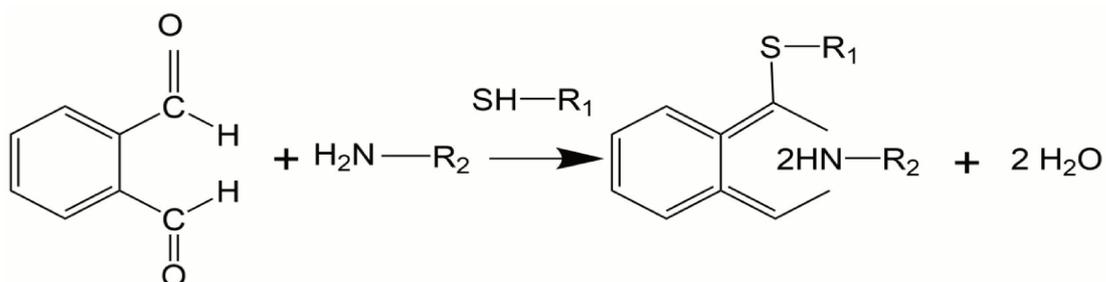


Figura 59. Reacción entre OPA y grupos amino primarios en presencia de un agente reductor (tiol). Elaboración propia utilizando ChemDraw Professional (Perkin Elmer, 2017).

Este ensayo se desarrolló inicialmente para evaluar el grado de proteólisis en proteínas de la leche [233], [234], y luego se adaptó para cuantificar los grupos amino reactivos en péptidos y en superficies de proteínas [235], [236]. La determinación se realiza incubando la muestra con el reactivo conteniendo OPA junto con el agente reductor (β -mercaptoetanol) y el agente tensioactivo dodecil-sulfato de sodio (SDS), adicionado para mejorar el contacto entre la proteína y el reactivo. Luego de unos minutos se mide el valor de absorbancia a 340 nm. Es importante que el tiempo de incubación sea el mismo en todas las muestras, ya que la absorbancia aumenta con el tiempo. La cantidad de grupos amino disponibles se cuantifica mediante una curva de calibrado realizada utilizando soluciones de aminoácidos. De éstos, se conoce que el aminoácido Cys no reacciona con OPA [231] y que los aminoácidos Gly y Lys reaccionan con OPA produciendo valores de absorbancia bajos [233]. Por esta razón, una alternativa conveniente es utilizar el dipéptido N-glicilglicina como estándar.

6.3.5.1.2. Ensayo de determinación de grupos amino disponibles

El reactivo de OPA se preparó de acuerdo a lo detallado por Peñas y col. (2006) [234]. Para ello, se mezclaron 25 mL de solución reguladora del pH borato de sodio 0,1 M, 2,5 mL de SDS 20%, 100 μ L de 2-mercaptoetanol y 40 mg de OPA (disuelto en 1 mL de metanol) en un volumen final de 50 mL de agua destilada.

Las muestras de conjugación de BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) sin purificar se analizaron mediante el método de OPA. Para ello, se tomaron 3 mL de reactivo de OPA y se dispensaron en una cubeta de cuarzo para medición espectrofotométrica. Se agregaron 20 μ L de muestra y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente (20-25°C). Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 340 nm contra blanco de reactivo de OPA sin muestra. Para ello, se

empleó un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido) equipado con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Para la cuantificación de los grupos amino libres se realizó una curva de calibrado con una solución de N-glicilglicina (Gly-Gly) 5 mM en el rango 0,01 – 0,16 mM. La cantidad de grupos amino libres se expresó como mmol Lys/mmol vehículo, teniendo en cuenta los pesos moleculares de los sistemas (65,5 kDa para BSA_n y 440 kDa para BSA_np-70-11). Cada determinación se realizó por triplicado.

6.3.5.2. Purificación por SEC-FPLC preparativo

Las muestras conjugadas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando una columna Superdex 200 (GE Healthcare), cuyo rango de fraccionamiento fue de 10-60 kDa y su volumen total de 24 mL. La columna se conectó a un dispositivo FPLC (Akta Prime, GE Healthcare) y se equilibró con solución reguladora del pH fosfato 50 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 150 mM. El volumen de inyección fue de 500 μ l y el flujo fue de 0,5 mL/min. La elución fue detectada por absorbancia a 280 nm y se recogió en fracciones de 1 mL.

6.3.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia del agente desnaturalizante dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para ello, se prepararon geles a una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 6%p/v. Las muestras se diluyeron en PBS hasta una concentración de 0,75 mg/mL de proteína y se sembraron 25 μ L (18,75 μ g de proteína). Las corridas electroforéticas se realizaron aplicando 200 V durante 40 min. Para la visualización de proteína, se realizó una tinción con *Coomasie Brilliant Blue* seguida por una decoloración hasta aparición de bandas nítidas. La visualización de mPEG se logró mediante un método de coloración con $I_3^-/BaCl_2$ [237], en el cual se sumergió el gel en solución de $BaCl_2$ 5% con agitación suave y luego de enjuagarlo con agua fue colocado en solución de I_3^- 0,1 N durante 10-20 min, seguido a ello se colocó en solución decolorante hasta desaparición de la tinción no específica de fondo.

6.3.5.4. Determinación de la cantidad remanente de mPEG luego de la PEGilación

La cantidad de mPEG presente en el medio sin reaccionar tras la conjugación se detectó y cuantificó mediante la formación de un complejo con $BaCl_2$ y I_3^- , el que absorbe espectrofotométricamente a 535 nm [238]. Para ello, se centrifugaron las muestras a 12.000 r.p.m. durante 50 min para lograr la precipitación de los sistemas proteicos. El sobrenadante fue diluido 1/100 y se incubó con una mezcla $BaCl_2/I_3^-$ durante 10 min. Luego, se midió la absorbancia a 535 nm y la cantidad de mPEG se

cuantificó mediante una curva de calibrado previamente realizada con soluciones de mPEG en el rango 1,5 - 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La cantidad de mPEG remanente luego de la PEGilación se expresó en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.3.5.5. Determinación del tamaño de partícula y potencial ζ

La distribución de tamaño (PSD) y el potencial ζ de las muestras a los tiempos de reacción t_{0h} y t_{24h} para cada sistema se determinaron mediante DLS a 25°C, utilizando el equipo Zeta-Sizer (Nano-ZS 90, Malvern Instruments Ltd, Reino Unido) tal como se describió en capítulos anteriores.

6.3.5.6. Microscopía de fuerza atómica

La muestra BSA_{np}-70-11-Gen tras la PEGilación se diluyó 10 veces en PBS, y se analizó por microscopía de fuerza atómica (AFM) de manera similar a lo realizado en el Capítulo 1 (sección 3.3.4.4). Para ello, alícuotas de la muestra se adsorbieron sobre una superficie de mica (1 cm^2 , pegada a discos de acero) por medio de secado en cámara de vacío a temperatura ambiente. Las imágenes de AFM se realizaron en modo *tapping*, con una frecuencia de oscilación de 280 kHz, utilizando un microscopio Agilent 5400 (EE. UU.). Se utilizaron cantilevers de AFM recubiertos por aluminio (modelo OPUS: 160AC-NA) siguiendo las especificaciones anteriormente detalladas. Las muestras fueron escaneadas a 1 línea/s. Para el procesamiento de imágenes, se utilizó el software Gwyddion 2.44. Las imágenes topográficas y de fase se procesaron a fin de lograr una mejor definición de las partículas. Adicionalmente, se obtuvieron imágenes 3D utilizando el mismo software.

6.3.6. Estudio de propiedades antitumorales *in vitro* sobre células de adenocarcinoma de mama murino

Con el objeto de evaluar si la PEGilación tuvo algún efecto sobre las propiedades antitumorales *in vitro* de BSA_{np}-70-11-Gen previamente estudiadas (Capítulo 3, sección 5.4.4), se examinó la citotoxicidad de las muestras conjugadas a t_{24h} sobre la línea celular murina F3II, incluyendo las muestras no conjugadas (t_{0h}) y Gen libre (en DMSO) como controles. Para evaluar el mecanismo de muerte celular implicado, se estudió la inducción de apoptosis y genotoxicidad en las células tratadas.

6.3.6.1. Cultivo de células F3II

Los ensayos de puesta a punto y el desarrollo de las metodologías detalladas a continuación fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Centro de Medicina Comparada (ICiVet Litoral UNL-CONICET). Se utilizó la línea celular F3II, cuyas características fueron detalladas anteriormente (Capítulo 3, sección 5.3.5.1), y la misma fue evaluada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) frente a

infección con *Mycoplasma*, siendo el resultado negativo. Las células F3II fueron cultivadas en medio de Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, compuestos antibióticos-antimicóticos 1X (penicilina-estreptomicina-anfotericina B) y glutamina 1X. La incubación se realizó a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%, en una incubadora orbital hasta alcanzar una confluencia del 70-80% y luego se realizó la digestión con tripsina-EDTA. Las células disgregadas se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo completo. Se cuantificó el número de células viables en cámara de Neubauer mediante coloración con el colorante vital azul de tripán, tal como se detalló en el Capítulo 3 (sección 5.3.5.2). En base a este recuento, se preparó la cantidad necesaria de células para obtener una suspensión de 1×10^5 células/mL de medio de cultivo completo y se sembraron 100 μ L/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (5×10^3 células/pocillo), de modo que las células formen una monocapa semi-confluyente. Se incubó la microplaca durante 24 h en incubadora de CO₂ a 37°C.

6.3.6.2. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT

Los efectos citotóxicos de las muestras conjugadas a t_{24h} obtenidas a partir de los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen fueron examinados mediante el ensayo basado en la reducción metabólica de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por medio de las enzimas succinato-deshidrogenasas mitocondriales. Se incluyeron las muestras no conjugadas (t_{0h}) como control. En primer lugar, las muestras se filtraron a través de membrana de 0,22 μ m para asegurar su esterilidad. Se incluyó una solución de Gen 100 mM (en DMSO) como control de Gen libre, que también se filtró por 0,22 μ m en condiciones de esterilidad. Las muestras se diluyeron en medio de cultivo hasta alcanzar las siguientes concentraciones finales de Gen: 10, 25, 50, 100, 150 y 200 μ M. Se incluyeron los siguientes controles: PBS, mPEG-Im libre (ya que se evaluaron las muestras sin purificar) medio de cultivo (control de viabilidad) y peróxido al 1% v/v (control positivo). Las células F3II previamente cultivadas en microplaca de 96 pocillos (5×10^3 células/pocillo) se trataron con las diluciones de las muestras y controles a 37°C en una incubadora (al 5% de CO₂) durante 72 h (hasta alcanzar una confluencia del 80-90% en las células de control sin tratamiento).

La viabilidad celular se examinó mediante la conversión de la sal MTT en cristales de formazán. Para ello, se preparó una solución de MTT a 12 mM en PBS 1X estéril, la que se agitó con vórtex y se filtró. Se descartó el sobrenadante de cultivo de cada pocillo, se realizó un lavado con 100 μ L de PBS 1X estéril y se adicionó 100 μ L

de medio de cultivo fresco. Luego, se adicionaron 10 μ L de solución de MTT 12 mM a cada pocillo tras lo cual se incubó durante 3 h a 37°C en incubadora CO₂. Se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 200 μ L de PBS 1X estéril. Por último, se adicionaron 100 μ L de DMSO y la microplaca se incubó 15 min a temperatura ambiente agitando suavemente para homogeneizar el color en todos los pocillos. El desarrollo de color se midió determinando la absorbancia en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano BGM LABTECH, Offenburg, Alemania) a 540 nm y 690 nm (como *background*). Se determinó el porcentaje de viabilidad celular como se detalló previamente (Sección) Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Adicionalmente, se observaron los cambios morfológicos en las células F3II tratadas a través de un microscopio Zeiss Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

6.3.6.3. Determinación de muerte celular por apoptosis mediante marcación con sondas fluorescentes y citometría de flujo

Se detectaron y cuantificaron las diferentes subpoblaciones de células en las etapas temprana y tardía de apoptosis mediante marcación con anexina V-FITC/IP seguida de análisis de citometría de flujo [207]. Las células F3II se trataron con las muestras conjugadas (t_{24h}) y no conjugadas (t_{0h}) obtenidas a partir de los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen (50 μ M de Gen), y se incubaron como se describió previamente, durante 48 h antes del análisis. Además, se examinaron los controles: (i) control positivo para apoptosis (adición de H₂O₂ al 5% al medio de cultivo) (ii) control basal, conteniendo células cultivadas en medio de cultivo puro. Luego de la incubación con las muestras a evaluar, se determinó la muerte celular por apoptosis y/o necrosis utilizando el kit de detección de apoptosis (Annexin V-FITC, BD Biosciences). Brevemente, se agregaron a cada muestra 100 μ L de buffer de *binding* (1X) conteniendo 1 μ L de anexina V-FITC y 0,5 μ L de IP, y se incubó durante 15 min en oscuridad. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo Attune NxT (Acoustic Focusing Citometer, A24860, Life Technology). El porcentaje de células viables, de células en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y en necrosis se determinaron utilizando el software FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, EE. UU.). La apoptosis total (%) se calculó como la suma de los porcentajes de células en apoptosis temprana y tardía.

6.3.6.4. Evaluación de genotoxicidad mediante ensayo de micronúcleos

6.3.6.4.1. Fundamentos del ensayo de micronúcleos

Durante la mitosis se produce la replicación del material genético contenido en el núcleo de las células eucariotas, para luego dividirse equitativamente dando lugar a

dos células hijas idénticas. El material genético (ADN) se organiza en cromosomas, por lo que luego de la replicación, cada copia cromosómica debe desplazarse hacia los polos de la célula en división para integrar cada célula hija. Este proceso es llevado a cabo mediante el huso mitótico, formado por microtúbulos y proteínas asociadas, que enlaza a los cromosomas por sus cinetocoros y los desplaza hacia los polos de la célula. Luego se produce la citocinesis, proceso mediante el cual el citoplasma se divide formándose dos células con el mismo material genético. Si durante la división celular se producen errores, estos pueden conducir una ruptura o pérdida cromosómica, haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, es envuelto por membrana nuclear durante la telofase originando un nuevo núcleo de menor tamaño denominado micronúcleo (MN) [239]. El material genético comprendido dentro de un MN puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica. Entre los agentes químicos que pueden inducir la formación de MN, se distinguen los agentes clastogénicos y los aneugénicos. Los agentes clastogénicos son aquellos que inducen la ruptura de cromosomas, mientras que los agentes aneugénicos impiden la fijación de las fibras del huso mitótico al cinetocoro y, por ende, el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase [240]. Algunos agentes clastogénicos son, por ejemplo, la ciclofosfamida y el benzo- α -pireno. Por su parte, entre los agentes aneugénicos estudiados se encuentran la colchicina, vinblastina y noscapina [241].

Entre los ensayos utilizados para evaluar genotoxicidad, es decir, la muerte celular causada por daños a nivel del material genético de las células, se encuentra el ensayo de MN. Este ensayo se basa en el recuento de la cantidad de MN observados por microscopia de fluorescencia (mediante tinción con una sonda fluorescente) tras realizar un bloqueo de la citocinesis. Para ello se utiliza un agente químico denominado citocalasina-B (cit-B) que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular durante la telofase mitótica [240]. Por lo tanto, cit-B impide la citocinesis a la vez que permite la división nuclear, produciéndose células binucleadas (**Figura 60**).

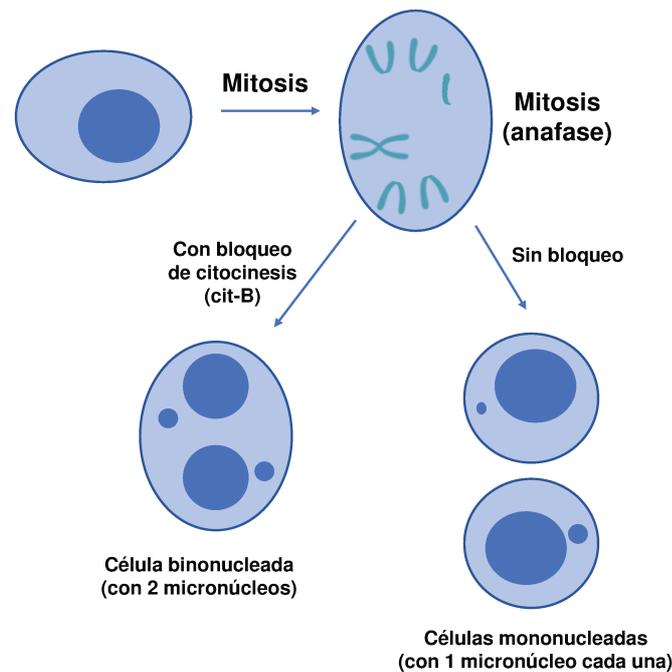


Figura 60. Esquema de formación de micronúcleos a partir de un cromosoma entero y fragmentos de cromosomas. El proceso se ilustra para el caso del bloqueo con citocinesis, que produce células binucleadas y el proceso sin bloqueo, produciendo células hijas mononucleadas. Elaboración propia.

En forma general, el ensayo de MN consiste en tratar las células con la sustancia a evaluar. Luego, las células tratadas se incuban con cit-B, se fijan a un portaobjetos y se realiza una tinción de los núcleos, los que son observados al microscopio para realizar el recuento de MN sobre 1×10^3 células binucleadas. El ensayo de MN constituye un ensayo de referencia a nivel internacional para evaluar mutagénesis inducida por compuestos, por lo que fue incluido en las guías de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por las siglas en inglés de *International Conference of Harmonization*) [242] para la aprobación de medicamentos y en las guías de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) [243].

6.3.6.4.2. Ensayo de micronúcleos sobre células F3II

Se evaluó la genotoxicidad de las muestras conjugadas a t_{24h} y no conjugadas (t_{0h}) obtenidas a partir de los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen sobre la línea celular F3II mediante el ensayo de MN con bloqueo de citocinesis. En primer lugar, las células F3II se sembraron en microplaca de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h hasta confluencia del 85-90%. Las muestras conjugadas a t_{24h} y no conjugadas (t_{0h}) obtenidas a partir de los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen se diluyeron en medio de cultivo hasta una concentración de 10 μ M Gen, las que presentaron una viabilidad celular del 50% por el ensayo MTT (condición necesaria para evaluar

genotoxicidad). Se incluyeron los siguientes controles: mPEG-Im libre, Gen (en DMSO), colchicina 0,6 mg/mL (control positivo [241] y medio de cultivo (control negativo). Luego, las células F3II se trataron con diluciones de las muestras y controles a 37°C en una incubadora (al 5% de CO₂) durante 24 h. El control positivo de genotoxicidad (colchicina 0,6 mg/mL) se incubó durante 3 h seguido por un período de 21 h de recuperación. Los tratamientos fueron realizados por triplicado. Luego del tratamiento, las células se incubaron con cit-B (3 µg/mL en medio de cultivo fresco) durante 18-20 h para realizar el bloqueo de citocinesis, tras lo cual se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X. A continuación, se adicionaron 25-50 µL de tripsina para disgregar las células tratadas adheridas a la microplaca, se centrifugó bajo refrigeración a 800 g por 5 min y se retiró el sobrenadante. La suspensión celular se transfirió a embudos de citocentrífuga y se centrifugó durante 5 min a 700 rpm. Se tomaron muestras en portaobjetos que se dejaron secar al aire durante 10 min y se realizó la fijación con metanol absoluto frío por 10 min seguido de lavado con PBS por 5 min. La tinción de los núcleos se realizó con la sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se une a secuencias enriquecidas en adenina y timina del ADN. Para ello, se agregaron 40 µL de DAPI 0,4 µg/mL a cada portaobjetos y se incubó durante 10 min en oscuridad. Luego, se lavó con PBS, se adicionó solución de montaje y finalmente se colocó el cubreobjetos y se selló.

Se observaron los núcleos de las células en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) a 200 X. Se tomaron 10 imágenes por cada triplicado de muestra y se determinó el número de MN en células binucleadas, por 1 x 10³ células. Los portaobjetos se almacenaron en oscuridad a 4°C o a -20°C hasta que se completó la toma de imágenes (en un periodo comprendido entre 1 a 4 semanas posterior a la fijación).

Se determinó además el número de células mononucleadas (N₁), binucleadas (N₂) y multinucleadas (N₃) presentes en las muestras, a partir de los cuales se calculó el índice de proliferación con bloqueo de citocinesis (IPBC), utilizando la Ecuación 24:

$$IPBC = \frac{[(1 \times N_1) + (1 \times N_2) + (3 \times N_3)]}{\text{número total de células}} \quad (\text{Ec. 24})$$

Se calculó además el índice de replicación (IR), como sigue (Ecuación 25):

$$IR (\%) = \frac{[(1 \times N_2) + (2 \times N_3)] / (\text{Número de células tratadas})}{[(1 \times N_2) + (2 \times N_3)] / (\text{Número de células control})} \times 100 \quad (\text{Ec. 25})$$

donde el número de células tratadas corresponde a las células incubadas con las muestras de los sistemas a evaluar mientras que el número de células control corresponde a las células incubadas con el control negativo (medio de cultivo puro). A

partir del valor de IR, se determinó el porcentaje de citostasis para cada muestra mediante la Ecuación 26:

$$\text{Citostasis (\%)} = 100(\%) - \text{IR}(\%) \quad (\text{Ec. 26})$$

El porcentaje de micronúcleos en células binucleadas (MN Bi %) se calculó a partir de la siguiente Ecuación 27:

$$\text{MN Bi (\%)} = \frac{\text{Número total de MN en células binucleadas}}{\text{Número total de células binucleadas}} \times 100 \quad (\text{Ec. 27})$$

Para evaluar el aumento de la cantidad de MN con respecto al control, se calculó el índice Fold como sigue (Ecuación 28):

$$\text{Fold} = \frac{\text{MN Bi (\%)} \text{ en células tratadas}}{\text{MN Bi (\%)} \text{ en células control}} \quad (\text{Ec. 28})$$

Este índice representa la cantidad de veces que el compuesto evaluado aumentó la formación de MN en comparación con el control negativo.

6.3.7. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA seguido por análisis de comparación entre grupos de medias usando la prueba LSD de Fischer con un nivel de confianza del 95%. Para ello, se utilizó el software StatGraphics Plus 3.0.

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1. Grado de PEGilación por reducción de grupos amino disponibles determinados mediante ensayo de OPA

Como se explicó anteriormente, la estrategia de PEGilación utilizada se basó en la reacción entre el grupo imidazol del reactivo mPEG-Im y los grupos amino disponibles de los residuos de Lys presentes en la superficie proteica, formándose enlaces uretano. El esquema general de reacción se muestra en la **Figura 61**.

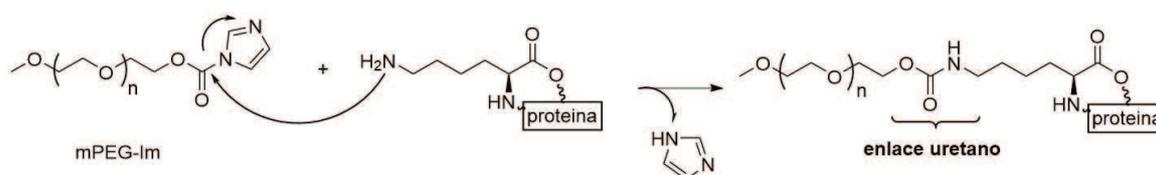


Figura 61. Esquema de reacción de mPEG-Im y grupo amino de los residuos de Lys en la proteína (BSAn) mediante la formación de un enlace uretano. Elaboración mediante ChemDraw Professional (PerkinElmer, 2017).

Con el objeto de evaluar el grado de reacción, se determinó la cantidad de grupos amino disponibles en los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) de PEGilación, mediante el ensayo de OPA. La **Tabla 13** resume los resultados obtenidos de la cantidad de grupos amino disponibles expresados como mmol Lys/mmol vehículo, en base al PM de cada sistema proteico (65,5 kDa para BSA_n y 440 kDa para BSA_np-70-11).

Tabla 13. Contenido de grupos amino disponibles en BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) de PEGilación con mPEG-Im de 30 kDa. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar (n=3). *: diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo inicial.

| Sistema | Grupos amino disponibles (mmol Lys/mmol sistema) | |
|------------------------------|--|---------------|
| | t_{0h} | t_{24h} |
| BSA _n -Gen | 60 \pm 11 | 40 \pm 1* |
| BSA _n p-70-11-Gen | 337 \pm 3 | 280 \pm 20* |

A tiempo inicial (t_{0h}), se observó que el contenido de grupos amino disponibles en BSA_n-Gen fue de 60 \pm 11 mmol Lys/mmol BSA_n, lo cual es consistente con el hecho de que BSA posee en su secuencia un número de 59 residuos de Lys [229]. En base a esto, la nanopartícula BSA_np-70-11, al estar constituida por 7 monómeros de BSA, presentaría un total de 413 residuos de Lys. A partir de la **Tabla 13** se observó que el sistema BSA_np-70-11-Gen presentó un contenido de grupos amino disponibles de 337 \pm 3 mmol Lys/mmol sistema a tiempo inicial (t_{0h}), lo cual fue aproximadamente 6 veces superior al observado para BSA_n, siendo a su vez menor al máximo estimado. Este comportamiento podría ser atribuido al proceso de desnaturalización térmica de BSA, el cual produciría una mayor exposición de estos grupos a la vez que ciertos grupos amino disponibles en BSA_n podrían ser ocluidos en el interior de la estructura de la nanopartícula tras el proceso de agregación.

A tiempo final (t_{24h}), el contenido de grupos amino libres para ambos sistemas fue significativamente inferior ($p < 0,05$) en comparación con el correspondiente al tiempo inicial (t_{0h}), lo que podría poner en evidencia la PEGilación de los sistemas (**Figura 62**). Dicha disminución pareció depender del estado conformacional de BSA, siendo ésta superior para el estado nativo (BSA_n, con una disminución del 33%) en comparación con la nanopartícula (BSA_np-70-11, con una disminución del 17%). Esto

último podría indicar que la PEGilación podría relacionarse con la existencia de un mayor impedimento estérico, lo que podría resultar en un menor grado de PEGilación.

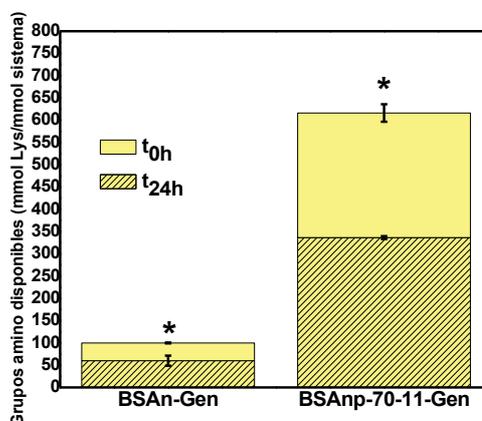


Figura 62. Contenido de grupos amino disponibles en BSAAn-Gen y BSAnp-70-11-Gen a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) de conjugación con mPEG-Im de 30 kDa. *: diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo inicial.

6.4.2. Perfil de isoformas de productos de PEGilación

Con el objeto de separar el mPEG-Im sin reaccionar y poder analizar el perfil de isoformas PEGiladas, las muestras se purificaron por cromatografía SEC-FPLC, recogiendo fracciones de 1 mL para cada corrida cromatográfica. La **Figura 63** muestra el cromatograma obtenido para cada sistema a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) de reacción.

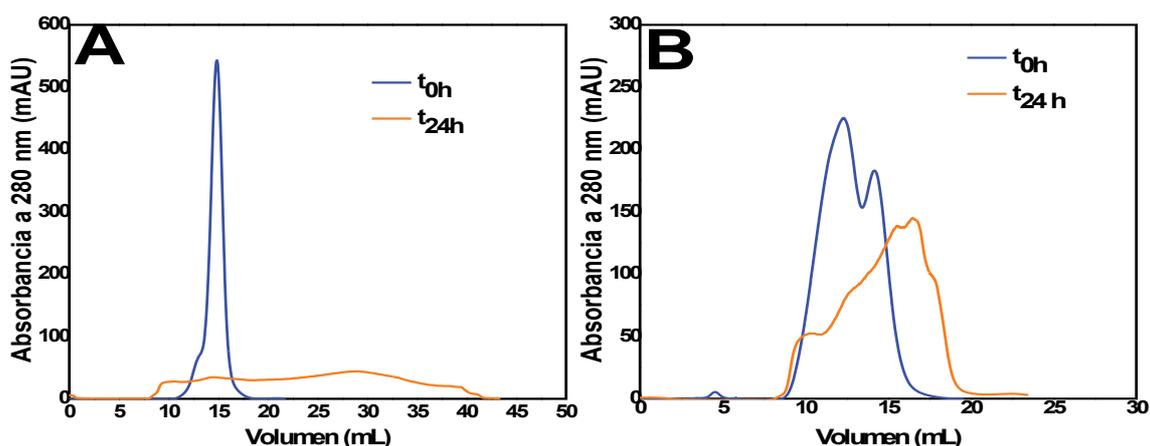


Figura 63. Cromatogramas SEC-FPLC obtenidos para BSAAn-Gen (A) y BSAnp-70-11-Gen (B) a tiempo inicial (t_{0h}) y final (t_{24h}) de conjugación con mPEG-Im de 30 kDa.

A partir de los cromatogramas se observó que BSAAn-Gen presentó un pico de elución a 14,8 mL a t_{0h} (**Figura 63A**), correspondiente a la proteína nativa sin PEGilar. A tiempo final (t_{24h}), se obtuvo un perfil de elución más amplio, en un rango de volumen

de elución (V_e) comprendido entre 8 y 41 mL, sugiriendo la obtención de isoformas de BSA_n-Gen-PEG con diferente número de cadenas de PEG conjugadas.

Por su parte, BSA_np-70-11-Gen (**Figura 63B**) presentó a t_{0h} un perfil de elución similar al obtenido previamente en la caracterización fisicoquímica de este sistema (Capítulo 1, sección 3.4.2.1), presentando dos picos máximos sin resolver completamente: uno a un V_e de 12,4 mL correspondiente a BSA_np-70-11-Gen y otro a un V_e de alrededor de 14,3 mL, que correspondería a los monómeros de BSA_n no agregados durante el proceso de formación de la nanopartícula. Luego de la PEGilación (t_{24h}), se obtuvo un perfil de elución más amplio y desplazado hacia mayores PM, sugiriendo que los productos de conjugación estarían conformados por isoformas PEGiladas BSA_np-70-11-Gen-PEG de distinto PM, probablemente debido a la unión de varias cadenas de PEG. El máximo del pico cromatográfico se presentó a un V_e de 16,6 mL.

Con el objeto de analizar y caracterizar las isoformas PEGiladas, las fracciones de 1 mL recogidas durante cada corrida cromatográfica se mezclaron obteniéndose diferentes *pools*. La **Figura 64** esquematiza el modo de obtención de los distintos *pools* en cada cromatograma.

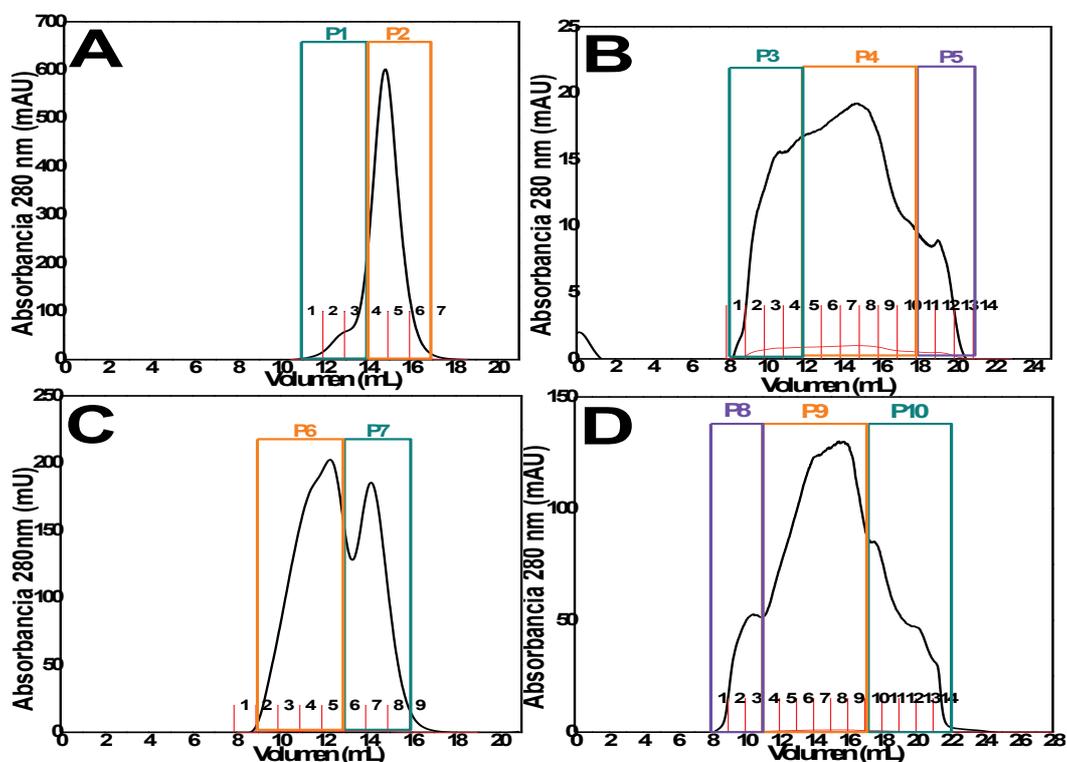


Figura 64. Cromatogramas SEC-FPLC obtenidos para BSA_n-Gen t_{0h} (A), BSA_n-Gen t_{24h} (B), BSA_np-70-11-Gen t_{0h} (C) y BSA_np-70-11-Gen t_{24h} (D). En cada uno se señalan los distintos *pools* (P) obtenidos para el análisis de productos de PEGilación.

Las fracciones obtenidas a partir del perfil de elución de BSA_n-Gen a t_{0h} (**Figura 64A**) se mezclaron y separaron en 2 *pools*: el primero (P1) conteniendo agregados de BSA_n de mayor PM y el segundo (P2) conteniendo el pico principal de elución de BSA_n-Gen. Por otro lado, las fracciones obtenidas para BSA_n-Gen t_{24h} (**Figura 64B**) se mezclaron obteniéndose 3 *pools*: el primero (P3) conteniendo las isoformas de BSA_n-Gen-PEG con mayor PM; el segundo *pool* (P4) contendría una mezcla de BSA_n-Gen sin PEGilar e isoformas PEGiladas BSA_n-Gen-PEG con PM similar al de la proteína nativa, y el tercer *pool* (P5) contendría isoformas BSA_n-Gen-PEG de menor PM. La existencia de un pico de elución a menor PM del correspondiente a la proteína nativa podría explicarse considerando la absorción a 280 nm del grupo imidazol de mPEG-Im, por lo que P5 podría tratarse de mPEG-Im sin reaccionar. Por su parte, las fracciones obtenidas para BSA_np-70-11-Gen t_{0h} (**Figura 64C**) se mezclaron separando el pico cromatográfico en 2 *pools*: P6 conteniendo principalmente BSA_np-70-11-Gen y P7 conteniendo monómeros de BSA_n remanentes del proceso de formación de las nanopartículas. Por último, se obtuvieron 3 *pools* para BSA_np-70-11-Gen t_{24h} (**Figura 64D**): P8 contendría las isoformas BSA_np-70-11-Gen-PEG de mayor PM, P9 contendría BSA_np-70-11-Gen sin PEGilar y algunas isoformas de PM similar al de la nanopartícula, y P10 contendría isoformas PEGiladas retrasadas durante la elución.

Es importante destacar que la cantidad de mPEG-Im presente en el medio tras la PEGilación se determinó mediante la formación de un complejo con BaCl₂ y I₃⁻ en las muestras purificadas de BSA_n-Gen (P3 y P4) y BSA_np-70-11-Gen (P8 y P9) y se comparó con la concentración inicial de mPEG-Im añadida. Para BSA_n-Gen, la concentración inicial de mPEG-Im fue $2,05 \times 10^5$ µg/mL, mientras que la determinación de mPEG-Im en la muestra de PEGilación purificada arrojó una concentración de 82 µg/mL. Por su parte, al inicio de la PEGilación la concentración de mPEG-Im en las muestras de BSA_np-70-11-Gen fue $3,09 \times 10^4$ µg/mL, y luego de la PEGilación y purificación se obtuvo una concentración remanente de mPEG-Im de 0,2 µg/mL. Estos resultados indicarían que la purificación de los productos de PEGilación mediante SEC-FPLC resultaría en una reducción de la concentración de mPEG-Im sin reaccionar de entre 3 y 4 órdenes de magnitud, quedando un remanente en las muestras a una concentración <100 µg/mL.

6.4.3. Análisis de productos de PEGilación por SDS-PAGE

Se realizó una corrida electroforética por SDS-PAGE de las muestras sin purificar y de los *pools* obtenidos en la purificación por SEC-FPLC. Las bandas de proteína se visualizaron mediante coloración con *Coomassie Brilliant Blue*, mientras que

para la visualización de PEG (tanto libre como unido a los sistemas proteicos) se utilizó una coloración con $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$. La **Figura 65** muestra el resultado de la corrida electroforética de BSA_n-Gen a los distintos tiempos de reacción (t_{0h} y t_{24h}).

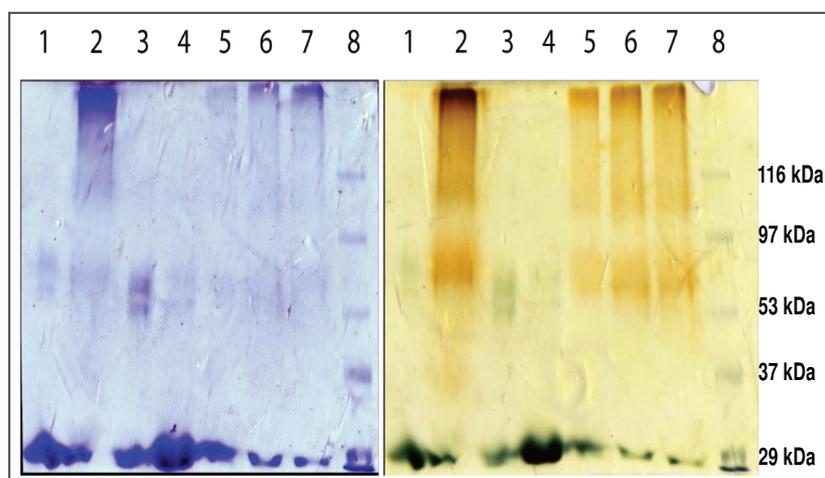


Figura 65. Gel SDS-PAGE al 6%p/v acrilamida/bisacrilamida para BSA_n-Gen, con tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (izquierda) y $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$ (derecha). 1: BSA_n-Gen t_{0h} sin purificar, 2: BSA_n-Gen t_{24h} sin purificar, 3: P1, 4: P2, 5: P3, 6: P4, 7: P5, 8: marcadores de PM.

En las muestras a t_{0h} (calles 1, 3 y 4) se observó una banda de aproximadamente 60 kDa, que correspondería a la proteína nativa BSA_n. En la calle 2 (a t_{24h}) se observó una banda intensa a mayor PM (>116 kDa) que presentó coloración tras la tinción con $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$, lo cual sería indicio de PEGilación de BSA_n. Las calles 5-7 muestran los productos de PEGilación de BSA_n-Gen tras la purificación (P3, P4 y P5), en las que se pudieron distinguir dos bandas tras la tinción con $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$. La banda de 60 kDa no fue visible al teñir con *Coomassie Brilliant Blue*, por lo que podría tratarse de mPEG-Im sin reaccionar ya que se conoce que su PM aparente es de aproximadamente 60 kDa. La otra banda se observó en el rango comprendido entre los 100 y 116 kDa, y se observó también al teñir con *Coomassie Brilliant Blue* por lo que se trataría de las isoformas BSA_n-Gen-PEG. Estos resultados podrían indicar que la reacción de PEGilación resultó en isoformas BSA_n-Gen-PEG con PM mayores a 100 kDa. Dado que se utilizó un mPEG-Im de 30 kDa, la banda a 100 kDa correspondería a isoformas BSA_n-Gen-PEG con 1 cadena de PEG por vehículo, mientras que las bandas a PM mayores corresponderían a isoformas con más de 1 cadena de PEG.

Por otro lado, la **Figura 66** muestra el resultado de la corrida electroforética BSA_np-70-11-Gen a los distintos tiempos de reacción (t_{0h} y t_{24h}).

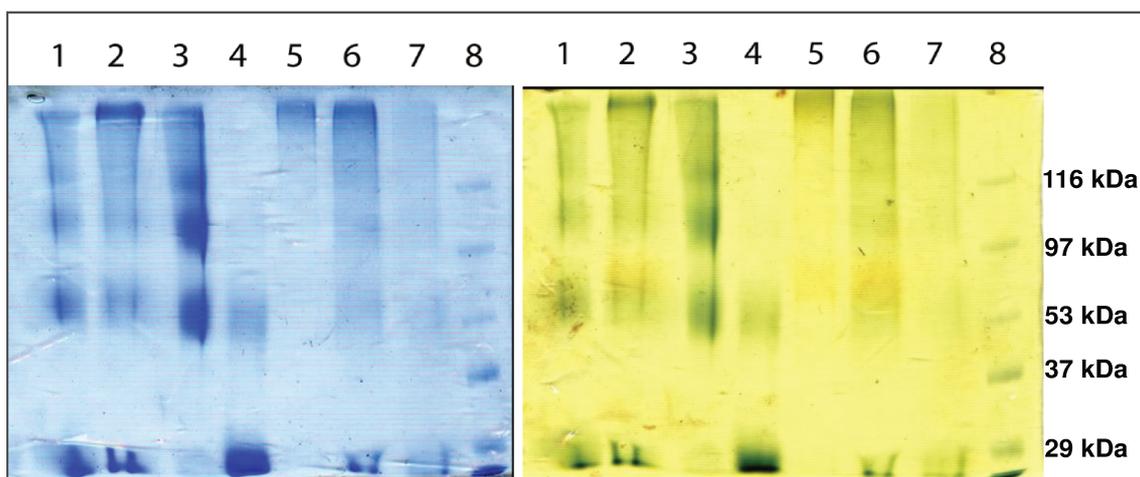


Figura 66. Gel SDS-PAGE al 6%p/v acrilamida/bisacrilamida para BSAnp-7011-Gen, con tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (izquierda) y $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$ (derecha). 1: BSAnp-70-11-Gen t_{0h} sin purificar, 2: BSAn-Gen t_{24h} sin purificar, 3: P6, 4: P7, 5: P8, 6: P9, 7: P10, 8: marcadores de PM.

En la calle 1 se observaron 2 bandas para el sistema BSAnp-70-11-Gen a tiempo inicial (t_{0h}): una de ellas a la altura de 60 kDa, que corresponderían a monómeros de BSAn, y otra más amplia, extendiéndose desde los 100 kDa hasta el principio del gel. Esto podría explicarse considerando que la corrida electroforética se realizó en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS). Por lo tanto, el sistema BSAnp-70-11-Gen, con un PM de 440 kDa, se disociaría en sus monómeros de BSAn (banda a 60 kDa) y agregados de BSAn unidos por puentes disulfuro (banda a PM superiores a 100 kDa). Tras la PEGilación (calle 2), se observó una banda de coloración intensa de alto PM, que además presentó coloración con $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$, lo que cual sería indicio de PEGilación de BSAnp-70-11-Gen. Las calles 3 y 4 muestran las corridas de P6 y P7, observándose las bandas correspondientes a BSAnp-70-11-Gen y a BSAn, respectivamente. Las calles 5-7 muestran las corridas de P8, P9 y P10, correspondientes a BSAnp-70-11-Gen tras la PEGilación y purificación. En la calle 5 se observó una banda retenida en el inicio de la corrida, que correspondería a un PM mayor a 116 kDa. De manera similar, la calle 6 muestra una banda más amplia desde 100 kDa hacia el inicio de la corrida. En ambas calles, las bandas presentaron coloración con $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$, por lo que corresponderían a isoformas BSAnp-70-11-Gen-PEG. En base a estas observaciones, es posible deducir que el *pool* P8 presentaría isoformas PEGiladas de BSAnp-70-11-Gen con mayor grado de PEGilación, mientras que P9 presentaría una mezcla de isoformas BSAnp-70-11-Gen con menor número de cadenas de PEG unidas y BSAnp-70-11-Gen remanente sin PEGilar. Finalmente, la calle 7 no presentó bandas apreciables de naturaleza proteica, por lo que las últimas fracciones del pico de elución obtenido por SEC-FPLC (P10) no contendría BSAnp-70-11-Gen sino probablemente mPEG-Im sin reaccionar. Más aún, en las calles 2, 5 y 6,

correspondientes a productos de PEGilación, se observó una banda de coloración amarilla (tinción con $\text{BaCl}_2/\text{I}_3^-$) a la altura de 60 kDa, consistente con el PM aparente de mPEG-Im de 30 kDa sin reaccionar.

6.4.4. Tamaño de partícula y potencial ζ de productos de PEGilación

Los *pools* (P1-P10) obtenidos por fraccionamiento mediante SEC-FPLC se analizaron mediante DLS para evaluar la distribución de tamaño de partícula y potencial ζ de los sistemas tras la PEGilación. Al utilizar un reactivo de mPEG-Im de alto PM (30 kDa), se esperaba observar cambios apreciables en el tamaño de los sistemas tras la PEGilación. La **Tabla 14** presenta los resultados de diámetro hidrodinámico (d_H) y potencial ζ obtenido para cada *pool*.

Tabla 14. Diámetro hidrodinámico (d_H), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial ζ medidos por DLS para los diferentes pools de BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen a t_{0h} y t_{24h} .

| Sistema | Pool | d_H (nm) | Pdl | Potencial ζ (mV) |
|--|------|-------------------------------------|-------------|------------------------|
| BSA _n -Gen t_{0h} | 1 | 9,2 ± 0,2 (42%) 350 ± 90 (58%) | 0,8 ± 0,1 | -7 ± 1 |
| | 2 | 8,6 ± 0,3 (87%) 550 ± 3 (11%) | 0,26 ± 0,08 | -4,7 ± 0,7 |
| BSA _n -Gen t_{24h} | 3 | 23 ± 1 (13%) 347 ± 6 (86%) | 0,7 ± 0,2 | -6 ± 2 |
| | 4 | 20 ± 1 (43%) 263 ± 1 (54%) | 0,93 ± 0,03 | -1,8 ± 0,7 |
| | 5 | 24 ± 1 (62%) 340 ± 57 (34%) | 0,61 ± 0,02 | -4 ± 1 |
| BSA _n p-70-11-Gen t_{0h} | 6 | 23 ± 1 (91%) 316 ± 96 (5%) | 0,30 ± 0,09 | -3 ± 1 |
| | 7 | 13,6 ± 0,2 (86%) 670 ± 129 (10%) | 0,19 ± 0,07 | -4 ± 1 |
| BSA _n p-70-11-Gen t_{24h} | 8 | 28 ± 0 (61%) 339 ± 37 (36%) | 0,96 ± 0,02 | -9 ± 1 |
| | 9 | 23,8 ± 0,5 (73%) 357 ± 72 (23%) | 0,3 ± 0,1 | -2,9 ± 0,9 |
| | 10 | 22,1 ± 0,7 (85%) 479 ± 137 (9%) | 0,23 ± 0,05 | -5 ± 1 |

Previo a la PEGilación (t_{0h}), BSA_n-Gen presentó un d_H de 8,6 ± 0,3 nm (P2), consistente con lo previamente obtenido (Capítulo 1, sección 3.4.2.1). El mayor d_H obtenido en P1 (9,2 ± 0,2 nm) es esperado ya que se trataría de agregados de BSA_n. Por su parte, los valores de d_H obtenidos para BSA_np-70-11-Gen antes de la

PEGilación (P6 y P7, correspondientes a BSA_{np}-70-11-Gen y monómeros de BSA_n sin agregar) fueron 23 ± 1 nm y $13,6 \pm 0,2$ nm. El mayor valor de d_H obtenido para BSA_n en P7 podría explicarse considerando que los picos en el cromatograma SEC-FPLC no fueron completamente resueltos, por lo que al determinar el d_H por DLS se obtuvo una sobreestimación del tamaño de BSA_n (13,6 nm en vez de 8,6 nm).

Luego de la PEGilación (t_{24h}), el análisis de los *pools* de BSA_n-Gen (P3, P4 y P5) mostró la existencia de 2 poblaciones: una con un d_H en el rango de 20-24 nm y otra con un d_H comprendido entre 260 y 340 nm. Además, se observó una disminución del porcentaje en intensidad para la población de mayor tamaño (~ 300 nm) desde P3 a P5, lo que podría indicar que la población de menor tamaño (~ 20 nm) también podría estar presente en P4 y P5 en mayor proporción. Estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos por SDS-PAGE e indicarían que la población de 20 nm podría tratarse de BSA_n-Gen sin PEGilar (o con bajo grado de PEGilación), mientras que la población de 300 nm se trataría de isoformas de BSA_n-Gen-PEG de mayor PM y, por lo tanto, mayor d_H .

Por su parte, para el sistema BSA_{np}-70-11-Gen a t_{24h} (P8, P9, y P10) se observaron 2 poblaciones de diferentes d_H : una población con d_H comprendido en el rango 20-28 nm y otra de mayor tamaño con un d_H entre 300 y 500 nm. Además, se observó que el porcentaje en intensidad fue siempre mayor para la población de menor tamaño, registrándose un aumento de este porcentaje desde P8 a P10. Asimismo, el índice de polidispersidad (Pdl) fue mayor en P9 y P10, los cuales contendrían mayoritariamente BSA_n-Gen sin PEGilar. Estos resultados indicarían que, si bien existe evidencia de PEGilación de BSA_{np}-70-11-Gen, la misma ocurriría en baja proporción.

Con respecto a la carga neta superficial, en base a estudios de PEGilación de nanopartículas de BSA realizados previamente [227], la formación de enlaces uretano entre los grupos amino en la superficie proteica y el reactivo mPEG-Im, resultaría en una menor cantidad de cargas positivas, por lo que se esperaría observar un cambio en el potencial ζ de los sistemas hacia valores cercanos a 0 o más negativos. Sin embargo, no se observaron diferencias apreciables en los valores de este parámetro para BSA_n-Gen y BSA_{np}-70-11-Gen tras la PEGilación.

En base a los resultados de d_H y PM obtenidos, se estableció que las fracciones purificadas por SEC-FPLC que contendrían la mayor proporción de isoformas PEGiladas serían P3 (BSA_n-Gen t_{24h}) y P8 (BSA_{np}-70-11-Gen t_{24h}). Por lo tanto, los estudios posteriores se realizaron sobre estas fracciones purificadas, y se

compararon con P2 (BSAn-Gen t_{0h}) y P6 (BSAnp-70-11-Gen t_{0h}). La **Figura 67** muestra la distribución de tamaño de partícula obtenida por DLS para BSAn-Gen (**Figura 67A**) y BSAnp-70-11-Gen (**Figura 67B**) a t_{0h} y t_{24h} , luego de la repetición de la reacción de PEGilación y purificación por SEC-FPLC. A t_{0h} se obtuvo para ambos sistemas la distribución de tamaño inicial y a t_{24h} se observó la aparición de las dos poblaciones anteriormente descritas: una a 20 nm y otra de alrededor de 200 nm.

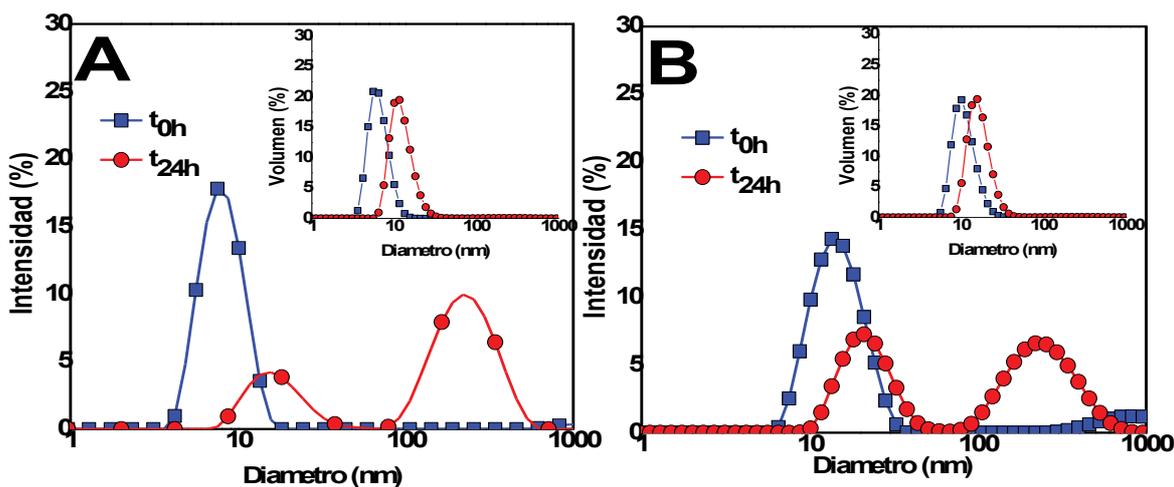


Figura 67. Distribución del tamaño de partículas basado en intensidad (%) de BSAn-Gen (A) y BSAnp-70-11-Gen a t_{0h} y t_{24h} . El inserto muestra la distribución en volumen.

La **Tabla 15** presenta los resultados de d_H , Pdl y potencial ζ de los sistemas antes y después de PEGilar.

Tabla 15. Diámetro hidrodinámico (d_H), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial ζ obtenidos por DLS para BSAn-Gen y BSAnp-70-11-Gen a t_{0h} y t_{24h} .

| Sistema | d_H (nm) | Pdl | Potencial ζ (mV) |
|---------------------------|---|-----------------|------------------------|
| BSAn-Gen t_{0h} | $8,4 \pm 0,2$ (92%) | $0,25 \pm 0,02$ | $-6,9 \pm 0,9$ |
| BSAn-Gen t_{24h} | $17,8 \pm 0,7$ (27%) 239 ± 4 (72%) | 1 ± 0 | $-1,1 \pm 0,6$ |
| BSAnp-70-11-Gen t_{0h} | $15,2 \pm 0,2$ (88%) | $0,28 \pm 0,01$ | $-1,5 \pm 0,9$ |
| BSAnp-70-11-Gen t_{24h} | 23 ± 1 (43%) 260 ± 1 (54%) | $0,82 \pm 0,02$ | $-1,9 \pm 0,7$ |

Por lo tanto, estos hallazgos pondrían en evidencia que tanto BSAn-Gen como BSAnp-70-11-Gen fueron modificadas covalentemente por la conjugación de cadenas de PEG en las condiciones de reacción evaluadas (temperatura ambiente, pH 8,5 y

relación molar BSA: PEG 1:20). Los productos de PEGilación consistirían en isoformas de diferente número de cadenas de PEG unidas, lo cual resultaría en una distribución de PM y de tamaño amplia. La determinación del número de cadenas de PEG conjugadas debería ser determinada mediante estudios moleculares posteriores. El d_H de las isoformas de BSA_n-Gen-PEG y BSA_np-70-11-Gen-PEG sería de entre 200 y 300 nm.

6.4.5. Morfología por microscopía de fuerza atómica de nanopartículas de BSA PEGiladas

Se estudiaron las características morfológicas de BSA_np-70-11-Gen-PEG por AFM (**Figura 68**). Las imágenes topográficas y de fase observadas con un aumento de $1,02 \mu\text{m}$ por $1,02 \mu\text{m}$ (**Figura 68A y 68B**) mostraron la existencia de partículas de forma redondeada, rodeadas de una sustancia adherida a la superficie de mica. Asimismo, se observó una gran heterogeneidad de tamaños, lo cual es consistente con el alto valor de Pdl arrojado por DLS.

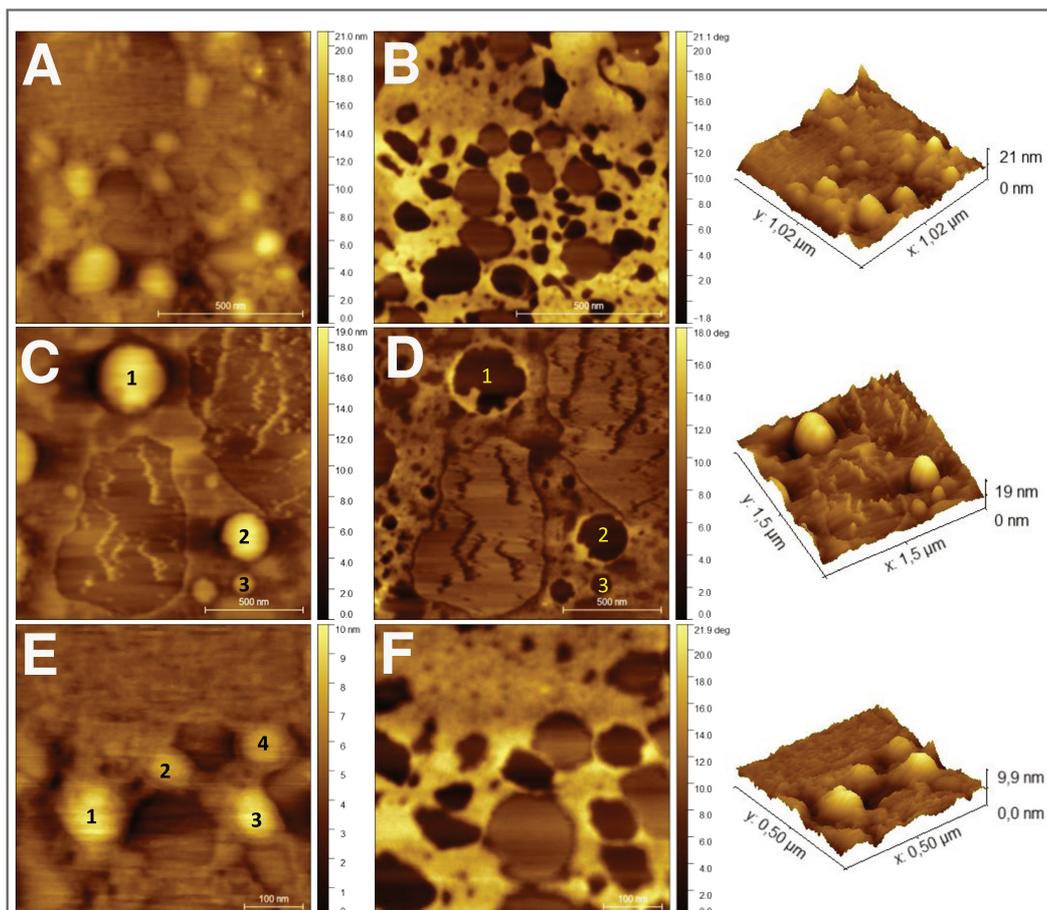


Figura 68. Imágenes AFM topográficas y de fase del sistema BSA_np-70-11-Gen t_{24h} en distintas zonas y con distintos aumentos (A y B: $1,02 \mu\text{m}$ x $1,02 \mu\text{m}$; C y D: $1,5 \mu\text{m}$ x $1,5 \mu\text{m}$; E y F: $0,50 \mu\text{m}$ x $0,50 \mu\text{m}$), a una concentración proteica de $2,5 \times 10^{-5} \%$ p/p.

Al observar otra zona con un aumento de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ se distinguieron 3 partículas de forma redondeada (1, 2 y 3 en **Figuras 68C y 68D**), cuyos valores medidos de diámetro y altura fueron $352 \text{ nm} \times 17 \text{ nm}$ (partícula 1), $235 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$ (partícula 2) $120 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ (partícula 3). Estas observaciones indicarían la existencia de sistemas BSA_np-70-11-Gen-PEG con un diámetro comprendido entre 100 y 300 nm, lo cual sería consistente con los valores de d_H obtenidos por DLS. Tal como se explicó anteriormente en el Capítulo 1, las partículas observadas por esta técnica tienen una relación diámetro/altura muy alta debido a que durante el secado las partículas tienden a aplastarse sobre la superficie de mica [145]. Por lo tanto, el d_H calculado por DLS no sería consistente con el calculado por AFM. Sin embargo, el diámetro promedio de las partículas observadas por AFM antes de PEGilar (Capítulo 1, sección 3.4.2.2) se encontró dentro del rango 30-50 nm, con una altura promedio comprendida entre 12 y 35 nm. A partir de estos hallazgos se podría deducir que la PEGilación de BSA_np-70-11 resultaría en un aumento de tamaño del sistema.

Por otro lado, al observar otra zona de la muestra con un aumento de $0,50 \times 0,50 \mu\text{m}$, se pudieron apreciar 4 partículas de diferentes tamaños (1, 2, 3 y 4 en **Figuras 68E y 68F**) de entre 80 y 120 nm. De manera similar a lo observado en las otras imágenes, las partículas se encontraron inmersas en una sustancia y fue posible distinguir prolongaciones, conectándolas unas con otras. Estas prolongaciones podrían tratarse de las cadenas de PEG unidas a la superficie de las nanopartículas. Las conexiones observadas podrían explicarse considerando que, tras la etapa de secado, las estructuras de las nanopartículas PEGiladas colapsarían quedando muy próximas entre sí, lo cual promovería la interacción interpartícula mediada por las cadenas de PEG.

A partir de estos resultados se puede deducir que la reacción de PEGilación de BSA_np-70-11-Gen con mPEG-Im en las condiciones evaluadas resultaría en la unión de cadenas de PEG a la superficie de la nanopartícula, lo cual produciría un aumento del tamaño y PM de la misma. Asimismo, la unión de un número variable de cadenas de PEG resultaría en un perfil de isoformas BSA_np-70-11-Gen-PEG con una amplia distribución de tamaño de partícula, lo cual se ve reflejado en la heterogeneidad de tamaños observada por AFM, y el alto Pdl arrojado por DLS.

6.4.6. Propiedades antitumorales *in vitro* de nanopartículas de BSA cargadas con Gen tras la PEGilación

6.4.6.1. Citotoxicidad frente a células F3II

Una vez corroborada la existencia de isoformas PEGiladas de BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen, se evaluó la conservación sus propiedades antitumorales frente a

la línea celular de adenocarcinoma mamario murino F3II. Para ello, se evaluó la citotoxicidad de BSA_n-Gen-PEG y BSA_np-70-11-Gen-PEG (sistemas a t_{24h} de PEGilación) mediante el ensayo MTT. Se incluyeron los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen (a t_{0h}) y Gen libre (en DMSO) como controles. Debido a que mediante la purificación de las muestras de PEGilación por SEC-FPLC se obtuvieron sistemas muy diluidos, los mismos fueron examinados *in vitro* sin purificar incluyendo un control de PEG libre (mPEG-1m disuelto en PBS). La **Figura 69** muestra las curvas de viabilidad celular obtenidas tras 72 h de incubación de las células F3II con los sistemas bajo estudio en un rango de concentración de Gen de 10-200 μ M.

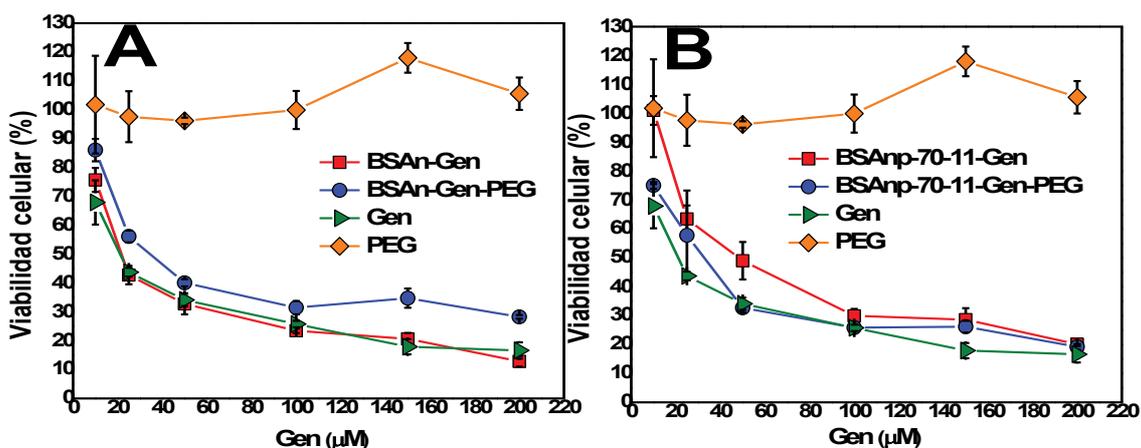


Figura 69. Curvas de viabilidad de células F3II tras su incubación con los sistemas BSA_n-Gen (A) y BSA_np-70-11-Gen (B) PEGilados y sin PEGilar durante 72 h, incluyendo PEG y Gen libre.

Se observó que todos los sistemas con Gen, tanto PEGilados como sin PEGilar, produjeron una disminución de la viabilidad de las células F3II a concentraciones mayores a 10 μ M de Gen. Esta disminución fue progresiva al aumentar la concentración de Gen, en consistencia con los resultados obtenidos previamente (Capítulo 3, sección 5.4.4). En el caso del tratamiento con mPEG-1m libre, la viabilidad celular se mantuvo aproximadamente constante y cercana al 100%, por lo que el mPEG-1m remanente tras la PEGilación no presentaría citotoxicidad en el rango de concentraciones evaluado. Por lo tanto, la presencia de mPEG-1m libre en las muestras no tendría influencia sobre la viabilidad celular y la citotoxicidad observada podría atribuirse directamente a la presencia de Gen.

La **Figura 70** muestra los porcentajes de viabilidad celular de los sistemas a una concentración final de Gen de 50 μ M. A partir de esta gráfica se pudo observar que BSA_n-Gen presentó una reducción de la viabilidad celular ligeramente mayor en comparación con BSA_n-Gen-PEG. Por su parte, BSA_np-70-11-Gen-PEG presentó una mayor reducción de la viabilidad celular en comparación con BSA_np-70-11-Gen y un porcentaje de viabilidad celular similar a Gen libre (disuelta en DMSO).

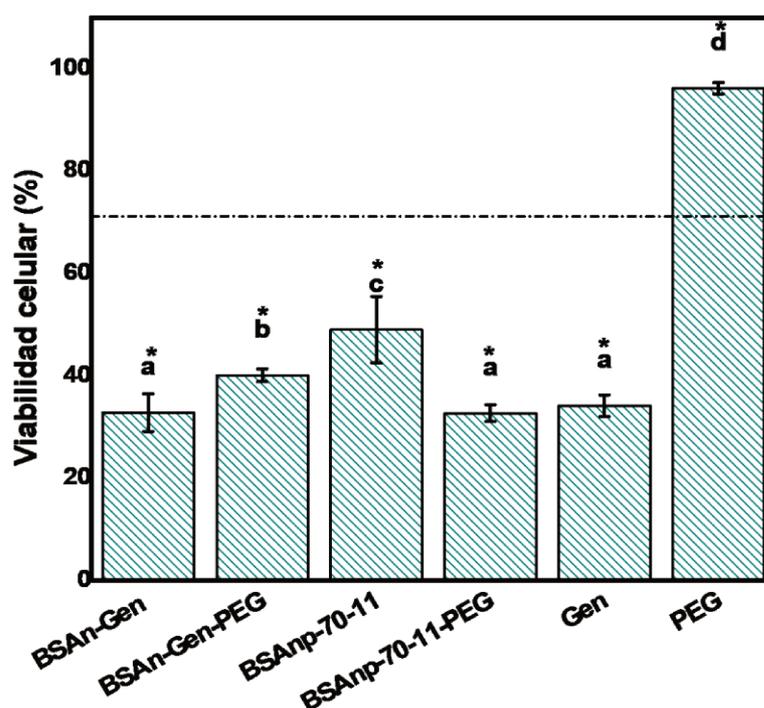


Figura 70. Porcentaje de viabilidad de células F3II tras su incubación con los sistemas BSAAn-Gen y BSAAnp-70-11-Gen a t_{0h} y t_{24h} a $50 \mu\text{M}$ Gen, incluyendo controles de mPEG-Im y Gen libre. La línea punteada señala el 70% de viabilidad celular. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD, $p < 0,05$).

Los datos de las curvas de viabilidad fueron ajustados a un modelo de dosis-respuesta no lineal ($R > 0,9$), a partir del cual se determinó la concentración de Gen a la cual cada sistema produjo una reducción de la viabilidad celular en un 50% (IC_{50}). La **Tabla 16** presenta los resultados de IC_{50} para cada sistema.

Tabla 16. Concentración media inhibitoria máxima (IC_{50}) de BSAAn-Gen y BSAAnp-70-11-Gen a t_{0h} y t_{24h} y Gen, sobre células F3II luego de 72 h de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$).

| Sistema | IC_{50} (μM) |
|----------------------|-----------------------------|
| BSAAn-Gen | 23 ± 3^a |
| BSAAn-Gen-PEG | 31 ± 2^a |
| BSAAnp-70-11-Gen | 43 ± 9^b |
| BSAAnp-70-11-Gen-PEG | 25 ± 3^a |
| Gen | 22 ± 2^a |

Del análisis de la **Tabla 16**, se tiene que la IC_{50} de Gen sobre células F3II fue $22 \pm 2 \mu\text{M}$. El sistema BSAAn-Gen (sin PEGilar) presentó una IC_{50} similar ($23 \pm 3 \mu\text{M}$), no observándose diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto a Gen

libre. Luego de la PEGilación (BSAn-Gen-PEG), se observó un aumento de la IC₅₀ hasta 31 ± 2 μM que no fue estadísticamente significativo, lo que podría indicar que la PEGilación no tendría influencia sobre la citotoxicidad de Gen unida a BSAn. Por otro lado, BSAnp-70-11-Gen presentó la IC₅₀ más alta (43 ± 9 μM) en comparación con los otros sistemas, observándose una disminución significativa tras la PEGilación (BSAnp-70-11-Gen-PEG) hasta 25 ± 3 μM. Este hallazgo podría ser indicio de que la PEGilación produciría un mejoramiento de la citotoxicidad de BSAnp-70-11-Gen, requiriendo una menor concentración de Gen para producir citotoxicidad celular. En base a estos resultados, se puede deducir que la PEGilación de BSAn-Gen con mPEG-Im no produciría efectos significativos (p<0,05) sobre la viabilidad de las células F3II, mientras que la PEGilación de BSAnp-70-11-Gen produciría una disminución de la concentración de Gen necesaria para reducir la viabilidad celular hasta un 50%.

6.4.6.2. Inducción de apoptosis sobre células F3II

Luego de comprobar la actividad citotóxica de los sistemas BSAn-Gen-PEG y BSAnp-70-11-Gen-PEG, se evaluó la inducción de apoptosis en células F3II a una concentración final de Gen de 50 μM. Para ello, las células fueron incubadas con los sistemas a 37 °C durante 72 h, incluyendo los sistemas sin PEGilar, y los controles de mPEG-Im y Gen libres (**Figura 71**).

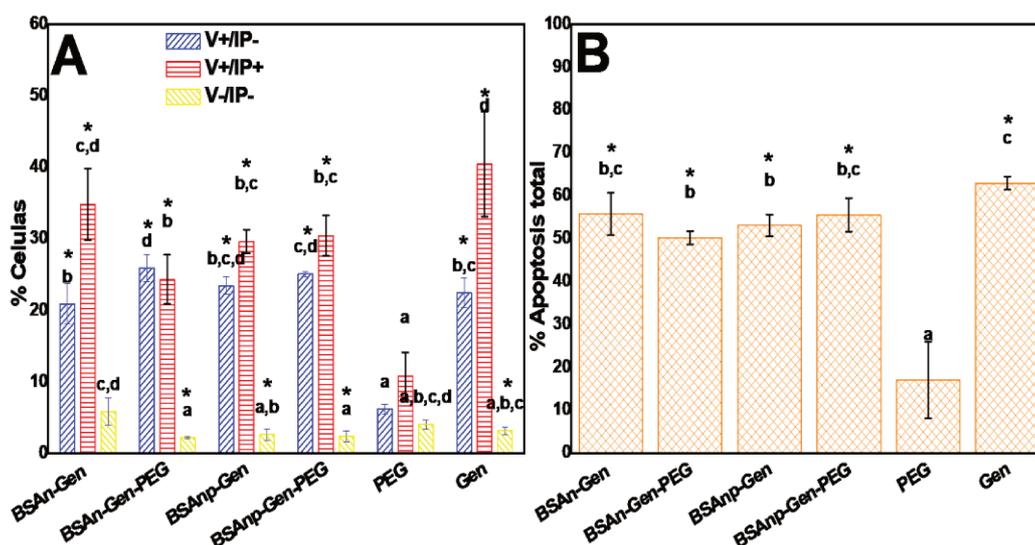


Figura 71. Porcentaje de células F3II en apoptosis temprana (anexina V+/IP-), apoptosis tardía (anexina V+/IP+) y necróticas (anexina V-/IP-) analizado por citometría de flujo (A) y porcentaje de apoptosis total (B). Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar (n = 3). *diferencia significativa con respecto al nivel basal (p<0,05). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre sistemas (p<0,05).

Tal como se observó a partir de los resultados obtenidos en el capítulo anterior (Capítulo 3, sección 5.4.5), el porcentaje de células necróticas fue menor al 5% en

todos los sistemas evaluados incluyendo Gen libre (**Figura 71A**), siendo la inducción de apoptosis el principal mecanismo de muerte celular. A partir de las subpoblaciones celulares en apoptosis obtenidas para BSA_n-Gen, se observó que tras la PEGilación el porcentaje de células en apoptosis temprana aumentó, siendo este significativamente mayor al porcentaje de células en apoptosis tardía. En el caso de BSA_np-70-11-Gen, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de células en apoptosis temprana y tardía antes y después de la PEGilación, lo que podría sugerir que la adición de cadenas de PEG a este sistema no tendría influencia significativa sobre el mecanismo de apoptosis inducido sobre células F3II. Por su parte, el control de mPEG-Im libre mostró un porcentaje de apoptosis total inferior al 20%, lo que confirmaría que el remanente de mPEG-Im no tendría influencia sobre la inducción de muerte en las células F3II. Gen libre (en DMSO) indujo apoptosis temprana y tardía en porcentajes similares a los observados para los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen.

Al analizar la gráfica de apoptosis total (**Figura 71B**), se observó que el tratamiento de las células con Gen libre (en DMSO) resultó en la inducción de apoptosis total en un 65%. En el caso de Gen cargada en los sistemas BSA_n y BSA_np-70-11, el porcentaje de apoptosis total fue levemente inferior al producido por Gen libre (56% y 53%, respectivamente), no encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con los porcentajes obtenidos para BSA_n-Gen-PEG (50%) y BSA_np-70-11-Gen (55%). Esto podría indicar que la PEGilación no tendría influencia sobre la inducción de apoptosis de los sistemas.

Con respecto a la morfología celular, la **Figura 72** muestra los cambios morfológicos producidos sobre las células F3II tras su incubación con los sistemas BSA_n-Gen, BSA_np-70-11-Gen antes y después de PEGilar, en comparación con los controles. De manera similar a lo observado previamente (Capítulo 3, sección 5.4.5), las células tratadas con los sistemas cargados con Gen presentaron una morfología más alargada [198] mientras que el control de mPEG-Im no produjo cambios morfológicos sobre las células. Además, se pudo corroborar que las células tratadas con Gen libre y vehiculizada en los sistemas de BSA mostraron una menor densidad celular.

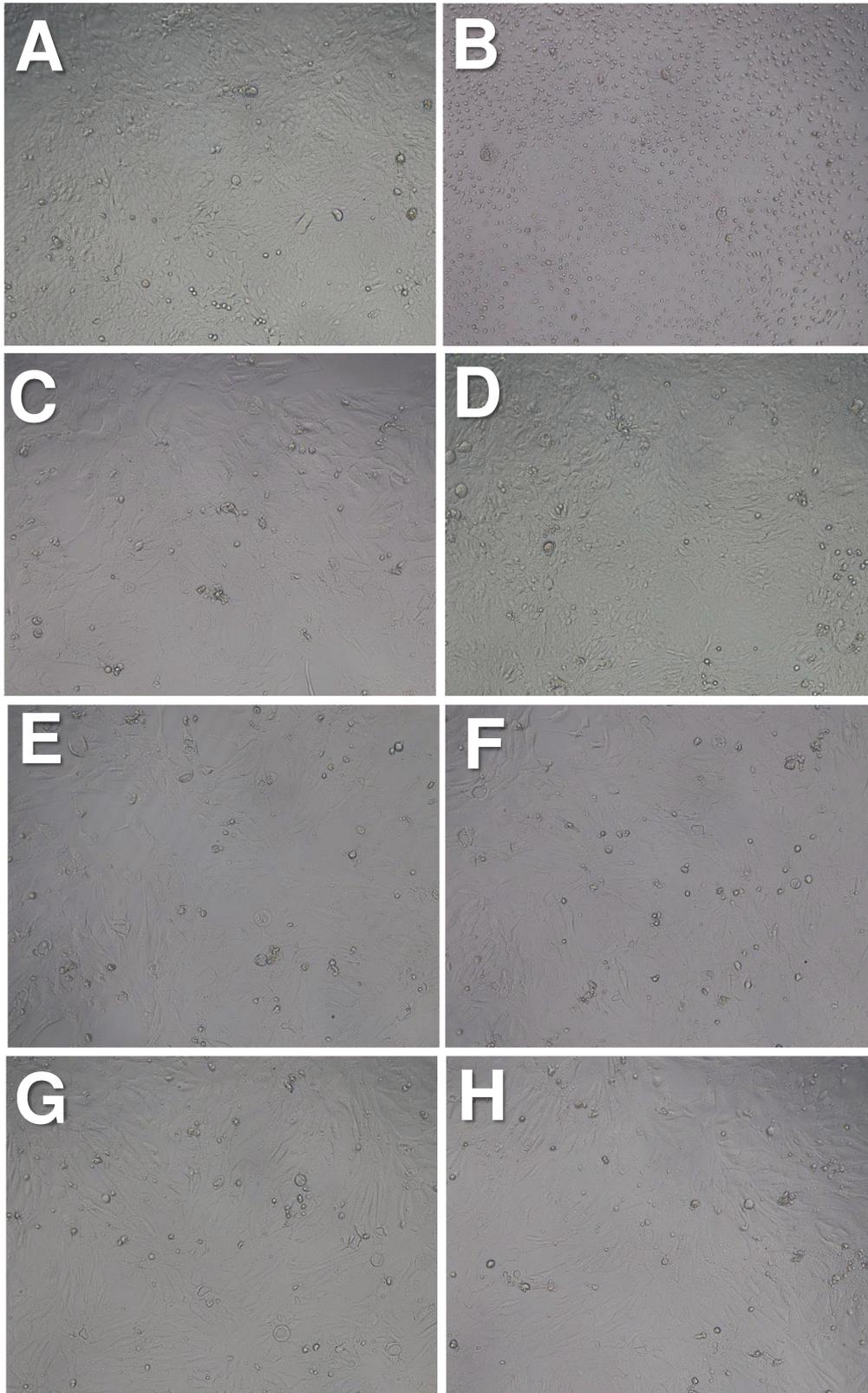


Figura 72. Morfología de células F3II tratadas con los diferentes sistemas. A: medio, B: peróxido (control +), C: Gen, D: mPEG-Im, E: BSAn-Gen, F: BSAn-Gen-PEG, G: BSAnp-70-11-Gen, H: BSAnp-70-11-Gen-PEG.

6.4.6.3. Genotoxicidad sobre células F3II mediante el ensayo de micronúcleos

Por último, se evaluó el efecto genotóxico de los sistemas BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen antes y después de PEGilar, mediante el ensayo de MN sobre células F3II. Se incluyeron Gen y PEG libre, un control negativo (medio de cultivo) y un control positivo que consistió en colchicina (Col) 0,6 µg/mL cuya actividad genotóxica fue comprobada previamente [241]. Las células F3II se incubaron con diluciones de las muestras a una concentración final de Gen de 10 µM, correspondiente a una viabilidad celular del 50% según el ensayo MTT. La **Figura 73** presenta los gráficos del porcentaje de MN en células binucleadas (%MN Bi) y el índice Fold para cada sistema evaluado. A partir del gráfico se pudo observar que los sistemas BSA_n-Gen y Gen (10 µM Gen) indujeron significativamente ($p < 0,05$) la formación de MN en células F3II. Por su parte, Col (control positivo) presentó un %MN Bi similar, no encontrándose diferencias significativas en comparación con BSA_n-Gen y Gen libre.

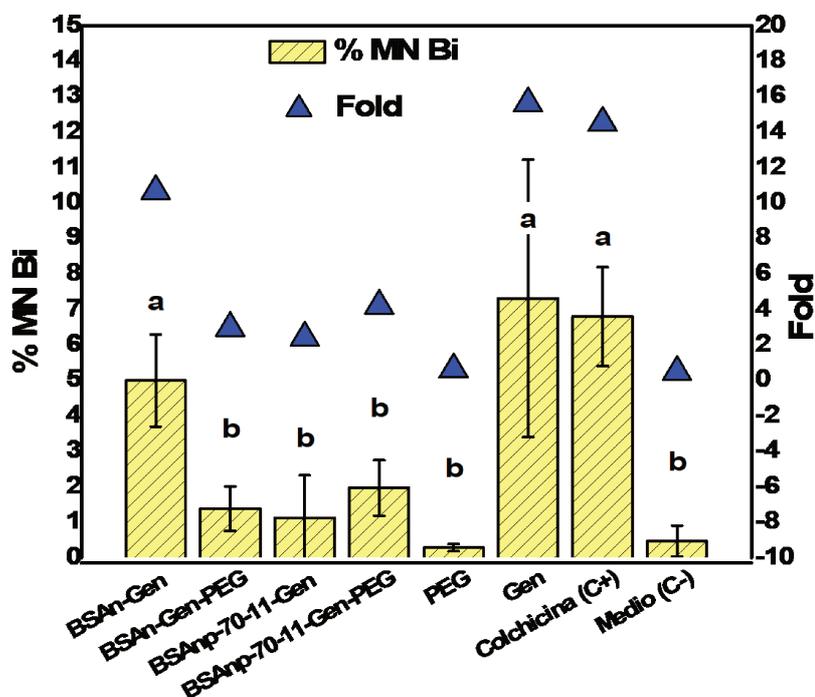


Figura 73. Gráficos del porcentaje de MN en células binucleadas (% MN Bi) y valores de Fold obtenidos al tratar las células F3II con los diferentes sistemas BSA_n-Gen, BSA_np-70-11 y controles. Los gráficos de barras muestran el porcentaje de MN expresado como promedio \pm desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras (LSD, $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de %MN Bi y Fold se detallan en la **Tabla 17**. En base a estos resultados, se determinó que BSA_n-Gen a 10 µM Gen produjo un incremento de alrededor de 11 veces la cantidad de micronúcleos (5% de células micronucleadas). En comparación, los sistemas BSA_n-Gen-PEG, BSA_np-70-11-Gen y

BSAnp-70-11-Gen-PEG (10 μ M Gen) produjeron un incremento de menor magnitud, de entre 2 y 4 veces la cantidad de MN (1,1-2,0% de células micronucleadas). Por su parte, Gen a 10 μ M (en DMSO) presentó la mayor actividad genotóxica, induciendo un aumento de alrededor de 16 veces la cantidad de MN (7% de células micronucleadas), similar a Col.

Tabla 17. Porcentaje de MN en células binucleadas (% MN Bi) obtenidos al tratar las células F3II con los diferentes sistemas (10 μ M Gen) expresado como promedio \pm desvío estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras (LSD, $p < 0,05$). Se incluyen los valores del índice Fold para cada sistema.

| Sistema | MN (%) | Fold |
|---------------------|----------------------------|------|
| BSAn-Gen | 5 \pm 1 ^a | 10,7 |
| BSAn-Gen-PEG | 1,4 \pm 0,6 ^b | 2,9 |
| BSAnp-70-11-Gen | 1,1 \pm 1,2 ^b | 2,4 |
| BSAnp-70-11-Gen-PEG | 2,0 \pm 0,8 ^b | 4,2 |
| Gen | 7 \pm 4 ^a | 15,6 |
| PEG | 0,3 \pm 0,1 ^b | 0,6 |
| Col (Control +) | 7 \pm 1 ^a | 14,5 |
| Medio (Control -) | 0,5 \pm 0,4 ^b | 0,5 |

En base a estos hallazgos, podría inferirse que la PEGilación de BSAn-Gen reduciría su potencial genotóxico. Por su parte, el sistema BSAnp-70-11-Gen no presentaría genotoxicidad significativa ($p < 0,05$) en comparación con el control negativo, y la PEGilación no tendría un efecto significativo sobre su capacidad de inducir la formación de MN sobre células F3II. Adicionalmente, la **Figura 74** muestra las imágenes obtenidas de los núcleos de las células F3II tratadas con los diferentes sistemas, en los que se pudo observar una mayor frecuencia de aparición de MN en las células tratadas con BSAn-Gen, Gen y Col. En las imágenes se pudo comprobar el bloqueo de la citocinesis, resultando en células binucleadas. Al respecto, el índice IPBC obtenido fue > 2 para todas las muestras mientras que el IR fue mayor al 98%.

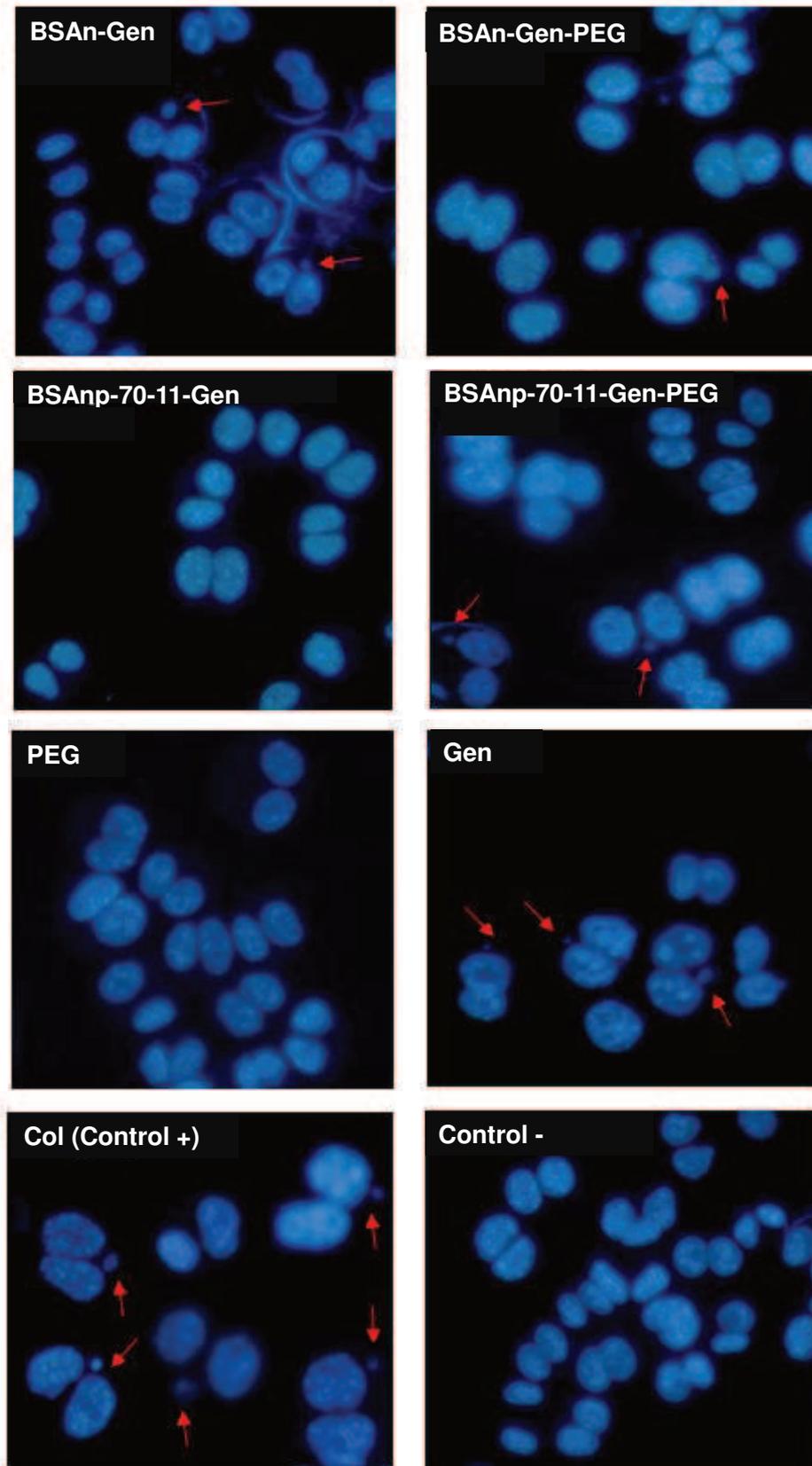


Figura 74. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de las células F3II tratadas con los diferentes sistemas y controles. Las flechas rojas señalan los micronúcleos formados.

Teniendo en cuenta el tamaño y PM, estos resultados podrían indicar que los sistemas de menor tamaño (Gen libre y BSA_n-Gen) producirían una mayor genotoxicidad, derivando en una mayor formación de MN. Esta observación podría explicarse considerando que la genotoxicidad de un compuesto implica que el mismo debe producir un daño a nivel de ADN o de las proteínas involucradas en su replicación o reparación [244]. Por lo tanto, el agente genotóxico debe poder no sólo internalizarse en la célula, sino también ejercer su acción en el núcleo celular de manera directa o indirecta. En base a esto, el menor tamaño de BSA_n-Gen y Gen favorecería su internalización y acceso al núcleo.

Por otro lado, la actividad genotóxica de los sistemas de BSA_n estaría asociada a la presencia de Gen. Estudios previos han reportado que el mecanismo de genotoxicidad de Gen involucraría la inhibición de la enzima topoisomerasa II [245]. Esta enzima es responsable de realizar cortes en ambas hebras del ADN cromosómico, con el objeto de aliviar tensiones de torsión en la estructura superenrollada. Por lo tanto, si se producen fallos en su actividad, estos podrían derivar en la ruptura del ADN generando fragmentos cromosómicos y, en consecuencia, la formación de MN. En este sentido, Gen sería un agente clastogénico [246] y, por lo tanto, una mayor disponibilidad de Gen en el sitio de acción produciría una mayor formación de MN.

A partir de estos resultados, y en comparación con los obtenidos en el estudio de apoptosis, se puede deducir que la vehiculización de Gen en sistemas de menor tamaño (BSA_n) promovería su acción a nivel nuclear en células F3II. La PEGilación de BSA_n-Gen reduciría su capacidad de ejercer genotoxicidad, lo cual estaría asociado al aumento de tamaño del sistema, impidiendo su acceso al sitio *target*. Por su parte, la vehiculización de Gen en BSA_np-70-11 desfavorecería su acción genotóxica, por lo que la citotoxicidad ejercida sobre células F3II sería principalmente debida a la inducción de apoptosis. La misma podría ser iniciada por mecanismos a nivel de la membrana celular o a nivel citoplasmático.

6.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En el presente capítulo se estudió la PEGilación de BSA_np-70-11-Gen, utilizando un derivado reactivo mPEG-Im de 30 kDa, y se comparó con la PEGilación de BSA_n-Gen en las mismas condiciones. En las condiciones de reacción evaluadas (temperatura ambiente, pH 8,5 y relación molar BSA: PEG 1:20), se obtuvo una reducción del contenido de grupos amino disponibles tras 24 h de reacción tanto en BSA_n-Gen como en BSA_np-70-11-Gen, lo cual evidenció la PEGilación de ambos

sistemas. Se observó que la disminución fue mayor en BSA_n (33%) en comparación con BSA_np-70-11 (17%) por lo que el grado de PEGilación dependería del estado conformacional de la proteína, estando favorecida en el estado nativo sin agregar debido a un menor impedimento estérico.

A partir del análisis de PM y d_H de los productos de PEGilación, se observó en general un aumento del tamaño y PM de los sistemas tras la conjugación. En base a estos resultados, la reacción de PEGilación produciría un perfil de isoformas BSA_n-Gen-PEG y BSA_np-70-11-Gen donde cada monómero de BSA_n presentaría un PM mayor a 100 kDa. Por DLS se determinó que BSA_n-Gen-PEG presentó dos poblaciones de diferente d_H , una de alrededor de 20 nm y otra de 200-300 nm, Por su parte, BSA_np-70-11-Gen-PEG presentó una población con d_H comprendido en el rango 20-28 nm y otra de mayor tamaño con un d_H entre 300 y 500 nm. Con respecto a la carga neta superficial, no se observaron diferencias apreciables en los valores de potencial ζ de BSA_n-Gen y BSA_np-70-11-Gen tras la PEGilación, por lo que, en las condiciones de fuerza iónica y pH evaluados, la PEGilación no produciría cambios significativos en la carga superficial de los sistemas. Estos hallazgos fueron consistentes con lo observado por AFM para BSA_np-70-11-Gen-PEG, evidenciando partículas redondeadas de tamaño heterogéneo, unidas por prolongaciones que podrían tratarse de las cadenas de PEG unidas a la superficie de la nanopartícula.

Con el objeto de evaluar las propiedades antitumorales de los sistemas luego de la PEGilación, se estudió el efecto citotóxico de BSA_np-70-11-Gen-PEG sobre células de adenocarcinoma de mama murino F3II, y se comparó con el sistema sin PEGilar, y con BSA_n-Gen y Gen. Los resultados obtenidos permitieron deducir que la PEGilación de BSA_np-70-11-Gen produciría una disminución de la concentración de Gen necesaria para reducir la viabilidad celular hasta un 50%, con un valor de IC_{50} de $25 \pm 3 \mu M$, similar al correspondiente a Gen libre ($22 \pm 2 \mu M$). Por su parte, la PEGilación de BSA_n-Gen con mPEG-Im no produciría efectos significativos ($p < 0,05$) sobre la viabilidad de las células F3II, presentando un valor de IC_{50} de $31 \pm 2 \mu M$. El principal mecanismo de citotoxicidad de los sistemas PEGilados fue la inducción de apoptosis, presentando porcentajes de apoptosis total del 50% (BSA_n-Gen-PEG) y 55% (BSA_np-70-11-Gen-PEG), ligeramente inferiores al correspondiente a Gen (65%). Estos porcentajes fueron comparables a los obtenidos para los sistemas sin PEGilar, por lo que se pudo deducir que la PEGilación no tendría influencia significativa sobre la inducción de apoptosis de los sistemas. Adicionalmente, se observó por microscopía que las células tratadas con los sistemas con Gen presentaron una morfología más

alargada, consistente con los cambios morfológicos inducidos por Gen previamente discutidos.

Por último, se evaluó la genotoxicidad de los sistemas mediante el estudio de la formación de MN. BSA_np-70-11-Gen-PEG produjo un incremento de 4 veces la formación de MN en células binucleadas, con un porcentaje de MN de $2,0 \pm 0,8\%$ a una concentración de Gen de $10 \mu\text{M}$. El porcentaje de MN fue comparable al obtenido para el sistema sin PEGilar, por lo que la PEGilación no tendría influencia en la genotoxicidad de la nanopartícula. En contraposición, BSA_n-Gen indujo la formación de MN en un mayor porcentaje en forma previa a la PEGilación ($5 \pm 1 \%$), en comparación con BSA_n-Gen-PEG ($1,4 \pm 0,6 \%$). Por su parte, Gen a $10 \mu\text{M}$ (en DMSO) produjo la mayor actividad genotóxica, aumentando 16 veces la cantidad de micronúcleos (7% de células micronucleadas), comparable con el control positivo de colchicina. Por lo tanto, la vehiculización de Gen en sistemas de menor tamaño (BSA_n) promovería su acción a nivel del núcleo celular en células F3II. La PEGilación de BSA_n-Gen reduciría su actividad genotóxica, debido a un aumento de tamaño del sistema, lo que impediría su internalización y acceso al núcleo. Por su parte, la citotoxicidad de BSA_np-70-11-Gen-PEG ejercida sobre células F3II sería principalmente debida a la muerte celular por apoptosis, que podría ser activada por mecanismos a nivel de la membrana celular o a nivel citoplasmático.

A partir de estos resultados, es posible concluir que la PEGilación de las nanopartículas de BSA obtenidas por tratamiento térmico constituiría un mejoramiento de la actividad citotóxica del compuesto bioactivo vehiculizado, permitiendo conservar sus propiedades antitumorales *in vitro*. La adición de cadenas de PEG haría factible la administración de los sistemas por vía parenteral para su aplicación en terapias contra el cáncer, en términos de una potencial evasión de la respuesta inmune contra potenciales epitopes antigénicos en la superficie de la nanopartícula.

7. CONCLUSIÓN

En la presente tesis doctoral se logró reunir conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, para la obtención y caracterización estructural de nanocomplejos formados por albúminas y compuestos lipofílicos flavonoides para ser utilizados como potenciales agentes antitumorales.

Mediante un tratamiento térmico controlado se obtuvieron diferentes sistemas de nanopartículas (BSAnp), formadas mediante un proceso de agregación térmica de monómeros de BSA. A partir de diferentes combinaciones temperatura-pH se obtuvieron distintos sistemas: BSAnp-70-9 (por tratamiento a 70°C y pH 9,0), BSAnp-70-11 (70°C y pH 11,0), BSAnp-85-9 (85°C y pH 9,0) y BSAnp-85-11 (85°C y pH 11,0). En condiciones de pH fisiológico (pH 7,4) los sistemas presentaron forma esférica y diferentes d_H en el rango de 14-28 nm, PM en el rango de 400-1.000 kDa y potenciales ζ cercanos a -10,0 mV. Se determinó que la concentración de BSA más adecuada para la obtención de BSAnp fue 4,0% p/p y que las condiciones de pH y temperatura de tratamiento influyeron en el tamaño y PM de las BSAnp obtenidas. A la mayor temperatura de tratamiento (85°C) se produjo la agregación de una mayor cantidad de monómeros, obteniéndose BSAnp de d_H y PM mayores (19-25 nm y 600-1.000 kDa) en comparación con los sistemas obtenidos a 70°C (13-15 nm, 400-600 kDa). A una misma temperatura de tratamiento, las BSAnp producidas a pH más elevado (11,0) fueron de menor tamaño en comparación con las obtenidas a pH 9,0. Por lo tanto, en las condiciones de pH evaluadas, BSA se encontraría en un estado parcialmente desplegado con mayor exposición de sitios hidrofóbicos, por lo que al aumentar la temperatura por encima de su T_m (65°C) se produciría la agregación térmica. Al proceso de agregación se le opondría la repulsión electrostática entre monómeros de BSA, resultando en nanopartículas de menor tamaño a mayor pH del medio.

Luego, se estudió la vehiculización de la flavona Cris en los diferentes sistemas BSAnp obtenidos. Las BSAnp fueron cargadas con Cris empleando una técnica antisolvente y la unión fue corroborada y caracterizada a través de técnicas espectroscópicas. Se estimó que un número comprendido entre 10 y 237 moléculas de Cris se unieron a BSAnp con una constante de afinidad del orden de $10^6 M^{-1}$. Los sistemas BSAnp cargados con Cris fueron caracterizados y se observó que la inclusión de Cris no produjo cambios notables en el tamaño y potencial ζ de BSAnp. Se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC) de Cris, observándose una correlación entre el tamaño de BSAnp y la cantidad de Cris incorporada. La EE de Cris en BSAnp fue de 44-84%, representando una LC en el rango de 2,1-6,9 μg Cris/mg proteína. En comparación con BSA, la incorporación de Cris en BSAnp fue mayor. Por lo tanto, los sistemas con mayor número de monómeros

de BSA_n asociados presentaron mayor tamaño y consecuentemente mayor número de sitios de unión de Cris, lo cual resultó en una mayor EE y LC.

Posteriormente, se obtuvieron polvos liofilizados de los sistemas BSA_np cargados con Cris. Las características fisicoquímicas de BSA_np (tamaño, potencial ζ , propiedades térmicas) fueron conservadas luego de la reconstitución de los polvos en medio acuoso, observándose en algunos casos un aumento de tamaño de partícula promedio debido a la presencia de Cris libre en la formulación. Con respecto a la carga de Cris, la EE y LC aumentaron en los sistemas BSA_np de menor tamaño, sugiriendo que el proceso de liofilización mejoraría la asociación de Cris a estos sistemas. Por lo tanto, la liofilización permitiría obtener una formulación estable de BSA_np, permitiendo recuperar las nanopartículas con sus características iniciales luego de la reconstitución del polvo. Luego, se evaluaron las propiedades antitumorales *in vitro* de los polvos reconstituidos sobre líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), observándose que todos los sistemas produjeron una reducción de la viabilidad celular en ambas líneas celulares, incluso sin carga de Cris, lo cual sugirió que BSA_np posee una citotoxicidad intrínseca sobre estas líneas celulares. La carga de Cris aumentó la citotoxicidad de BSA_np, no observándose efectos citotóxicos en BSA_n-Cris, lo cual indicaría que la carga de la flavona en las nanopartículas resultaría en mayores efectos citotóxicos en comparación con la proteína nativa. El sistema que presentó mayor actividad citotóxica fue BSA_np-70-11, seguido por BSA_np-70-9, y los mecanismos de muerte celular incluirían procesos de apoptosis y necrosis. Además, se aplicó un protocolo estático de digestión gastrointestinal *in vitro* sobre BSA_np-70-11-Cris y se observó una degradación de las nanopartículas, mientras que la liberación gastrointestinal de Cris fue de ~14%, sugiriendo que la vehiculización de Cris en BSA_np-70-11 aumentaría su permanencia en el tracto gastrointestinal.

Por otro lado, se evaluó la vehiculización de la isoflavona Gen en los sistemas BSA_np que presentaron mayor citotoxicidad sobre células de CM al ser cargados con Cris: BSA_np-70-9 y BSA_np-70-11. La interacción entre BSA_np y Gen fue evaluada mediante técnicas espectroscópicas, y se observó que la inclusión de Gen en BSA_np ocurriría mediante la formación de complejos produciendo el apagamiento de la fluorescencia del Trp₂₁₂ y cambios conformacionales en la proteína. En comparación con el complejo BSA_np-Cris, Gen se uniría a una mayor cantidad de sitios en BSA_np (286-336) que Cris, con una constante de afinidad en el mismo orden (10^6 M^{-1}). Además, Cris y Gen presentarían diferentes modos de unión a BSA_np, llegando a una saturación al alcanzar una relación molar de flavonoide: BSA_np de 13:1. Mediante mediciones de turbidez se determinó que la carga de Gen se encontraría favorecida en

vehículos de mayor tamaño. La EE para Gen en BSAnp fue de entre 24-26% con una LC de alrededor de 2,1 μg de Gen/mg de proteína, siendo menor a la obtenida para la carga de Cris en BSAnp. En base a estos resultados, se concluyó que la carga de flavonoides (o solubilización) en BSAnp sería más eficiente en comparación con BSAn, y estaría influenciada por el tamaño de la nanopartícula y la estructura química de los flavonoides. En forma similar a lo realizado con Cris, se obtuvieron polvos liofilizados de BSAnp cargados con Gen y se corroboró su adecuada reconstitución en medio acuoso, conservándose el tamaño de partícula y potencial ζ de los sistemas. Nuevamente, se observó una mayor EE y LC de Gen en los sistemas tras la liofilización (hasta 86-88% y 11,2-11,4 μg Gen/mg proteína). La actividad citotóxica de los polvos fue evaluada *in vitro* sobre un modelo murino de células de CM (F3II) a fin de examinar sus potenciales propiedades antitumorales y se encontró que BSAnp-70-9-Gen y BSAnp-70-11-Gen redujeron la viabilidad celular de F3II en un 60%, no observándose diferencias significativas entre ellos. Esta reducción fue mayor con respecto a la producida por BSAn-Gen (50%), lo que confirmó la hipótesis de que BSAnp serían vehículos más eficientes que la proteína nativa. Además, el efecto citotóxico de Gen sería mayor al ser vehiculizada en BSAnp de menor tamaño (13-15 nm), lo que sugeriría que el complejo BSAnp-Gen sería internalizado en la célula mediante algún mecanismo de endocitosis. El principal mecanismo de muerte celular identificado para los sistemas BSAnp cargados con Gen fue la inducción de apoptosis. Adicionalmente, se observó una alteración de la morfología celular en F3II tras su incubación con los sistemas con Gen, lo cual podría modificar sus propiedades de adhesión y su potencial de invasión.

Por último, se estudió la modificación superficial del sistema BSAnp-70-11 cargado con Gen mediante la adición de cadenas de PEG de 30 kDa, y se comparó con la PEGilación de BSAn-Gen. En las condiciones evaluadas (pH 8,5, temperatura 20-25, relación molar BSA: PEG 1:20, 24 h) se logró la PEGilación de BSAnp-70-11-Gen mediante la reacción entre el grupo imidazol del reactivo mPEG-Im y los grupos amino disponibles en los residuos de Lys presentes en la superficie proteica, disminuyendo el contenido de grupos amino disponibles en un 17%. Esta disminución fue mayor en BSAn (33%) en comparación con BSAnp-70-11 lo que sugirió que la PEGilación se encontraría favorecida en BSAn debido probablemente a que el monómero nativo sin agregar presentaría un menor impedimento estérico. La PEGilación de BSAnp-70-11-Gen resultaría en un perfil de isoformas BSAnp-70-11-Gen-PEG, de forma redondeada y tamaño heterogéneo. La unión de cadenas de PEG a BSAnp produjo un aumento del d_H , no observándose efectos sobre el potencial ζ de los sistemas. Las isoformas

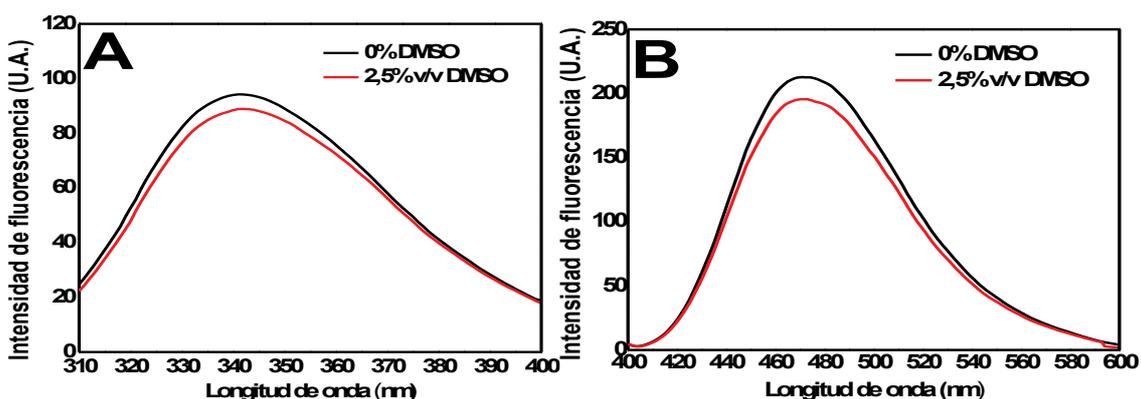
PEGiladas mostraron una distribución de tamaño de partículas bimodal, donde una población tendría un d_H comprendido en el rango 20-28 nm y otra con un d_H mayor, de entre 300 y 500 nm. Luego, se evaluaron las propiedades antitumorales de los sistemas sobre células F3II y se observó que la PEGilación produciría un mejoramiento en términos de citotoxicidad en BSA_{np}-70-11-Gen, ya que se requeriría una menor concentración de Gen para producir citotoxicidad celular, presentando una IC_{50} de 25 μ M. Se evaluaron dos mecanismos de citotoxicidad de los sistemas: inducción de apoptosis y formación de MN (genotoxicidad). En base a estos resultados, se observó que la PEGilación no afectaría a la inducción de apoptosis sobre células F3II, mientras que disminuiría la genotoxicidad de los sistemas, resultando en una menor inducción de la formación de MN (2%, representando un aumento de 4 veces con respecto a las células sin tratar). La adición de cadenas de PEG es relevante ya que haría factible la administración de los sistemas por vía parenteral, dado que permitiría evadir el reconocimiento de potenciales epitopes antigénicos por parte del sistema inmune.

En síntesis, todos estos hallazgos permitirían el desarrollo de formulaciones de nanopartículas de albúminas obtenidas por tratamiento térmico controlado, con propiedades que presentan ventajas en cuanto a estabilidad, protección del compuesto activo encapsulado, y conservación de las propiedades biológicas. Estos sistemas presentan versatilidad para encapsular compuestos lipofílicos como flavonoides, lo que permitiría aumentar su solubilidad en medio acuoso y mejorar su biodisponibilidad, para su potencial uso en formulaciones farmacéuticas y como nanosuplementos para la prevención y/o tratamiento del cáncer. Mediante la PEGilación de estos sistemas podría ser factible la administración de la formulación por vía parenteral, luego de la realización de los ensayos inmunológicos y preclínicos correspondientes. En vistas de que las nanopartículas presentaron una retención de flavonoide al ser sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*, podrían además ser utilizadas en una formulación de administración oral.

8. APÉNDICE

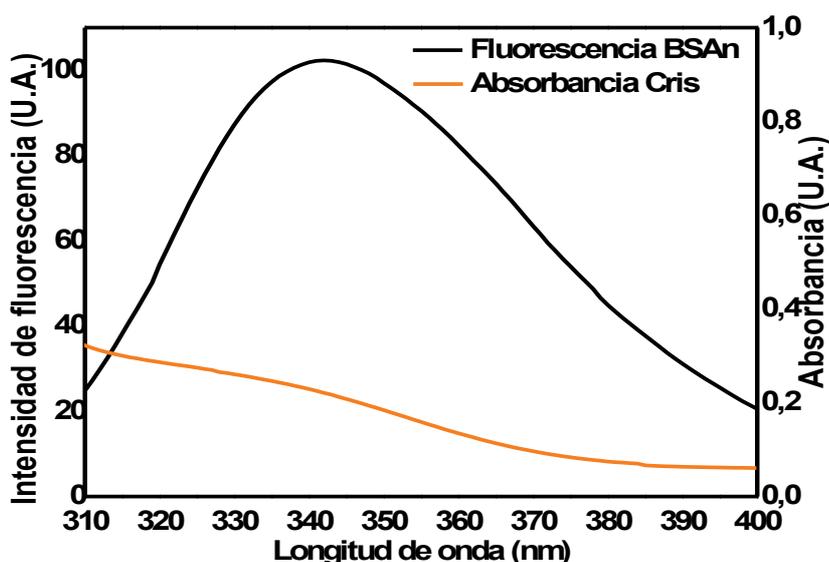
8.1. Efecto del DMSO sobre la emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n

En la siguiente figura se observa el efecto del agregado de DMSO sobre los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca (A) y extrínseca (B) de BSA_n. Condiciones: BSA_n 0,01% p/p con y sin la adición de DMSO hasta una concentración de 2,5% v/v. Dado que no se observaron cambios en los espectros, se concluyó que el agregado de DMSO en la concentración del ensayo (2,5 % v/v) no tendría efecto sobre la emisión de fluorescencia del Trp y de ANS.



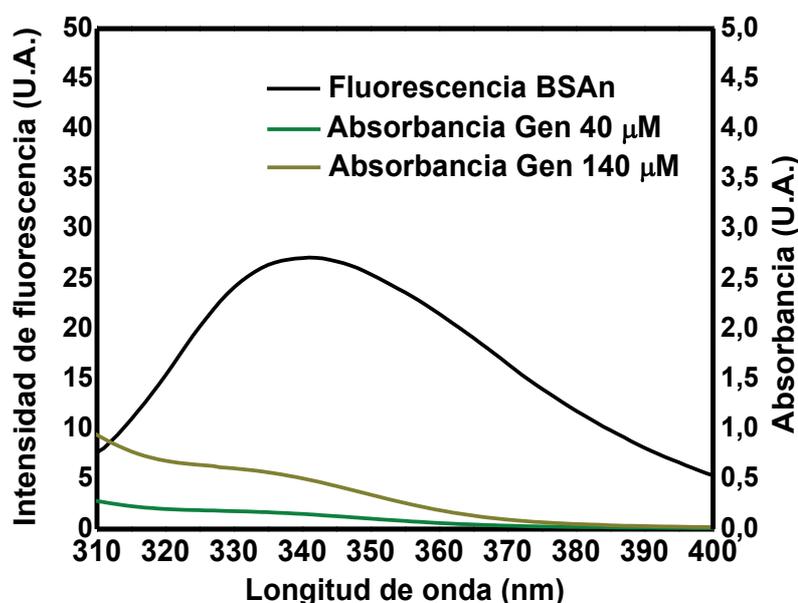
8.2. Solapamiento de espectros de emisión de fluorescencia de BSA_n y absorción de Cris

La siguiente figura muestra el solapamiento entre el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n y el espectro de absorción de Cris. La concentración de BSA_n fue 0,01 % p/p (en PBS pH 7,4) mientras que la de Cris fue 40 Mm (en DMSO).



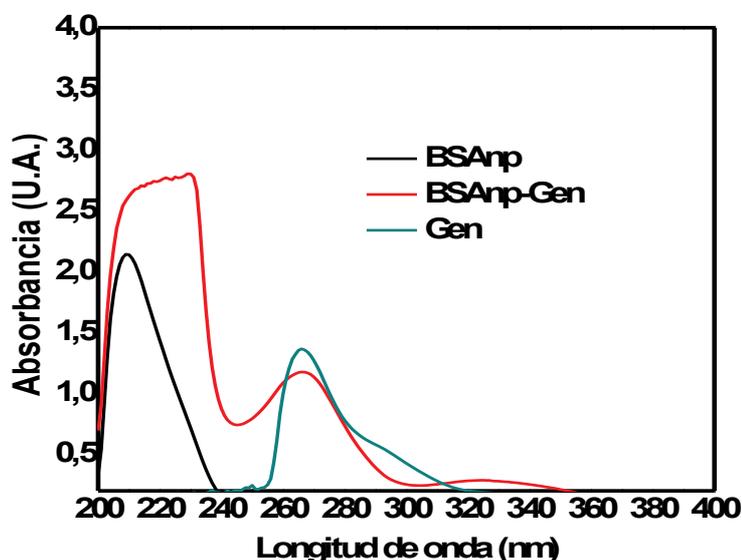
8.3. Estudio del solapamiento de espectros de emisión de fluorescencia de BSA_n y absorción de Gen

La siguiente figura muestra la ausencia del solapamiento entre el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de BSA_n (0,01 % p/p en PBS pH 7,4) y el espectro de absorción de Gen en DMSO a la menor concentración (40 μ M) y mayor concentración (140 μ M) evaluadas.



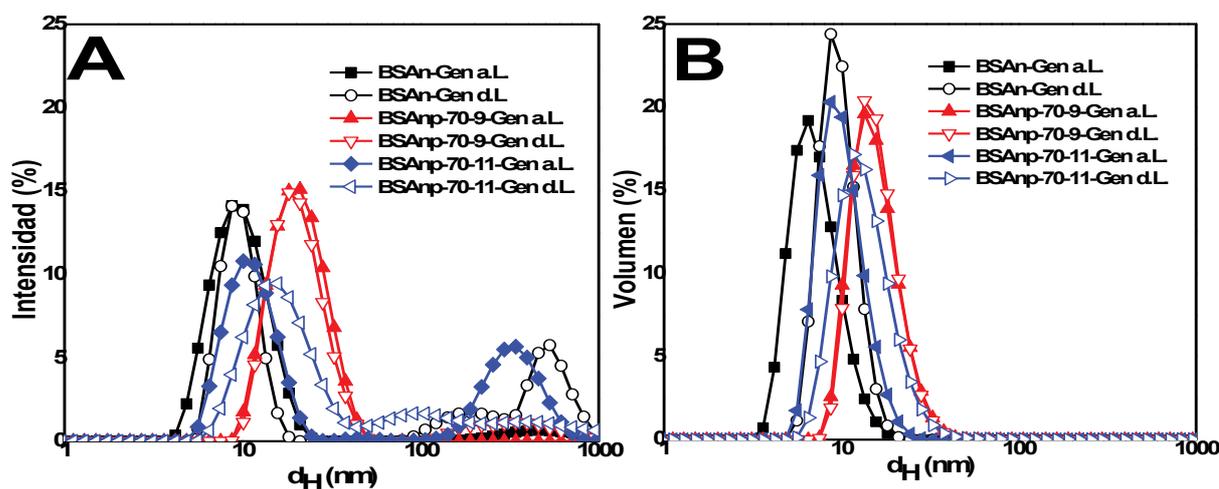
8.4. Espectros de absorción de BSA_np, Gen y del complejo BSA_np-Gen

En la siguiente figura se muestra el solapamiento entre los espectros de absorción del sistema de nanopartículas BSA_np-70-9 (BSA_np) libre, Gen libre (en DMSO) y del complejo entre ambos (BSA_np-Gen). La concentración proteica fue de 0,01 %p/p (en PBS pH 7,4) y la de Gen fue de 140 μ M (en DMSO).



8.5. Distribución de tamaño de partícula de BSA_n y BSA_np cargados con Gen antes y después de liofilizar

La siguiente figura muestra las distribuciones de tamaño de partícula basados en intensidad (PSD_i) (A) y en volumen (PSD_v) (B) de los sistemas BSA_n-Gen, BSA_np-70-9-Gen y BSA_np-70-11-Gen antes de liofilizar (a.L.) y después de la liofilización y reconstitución del polvo (d.L.).



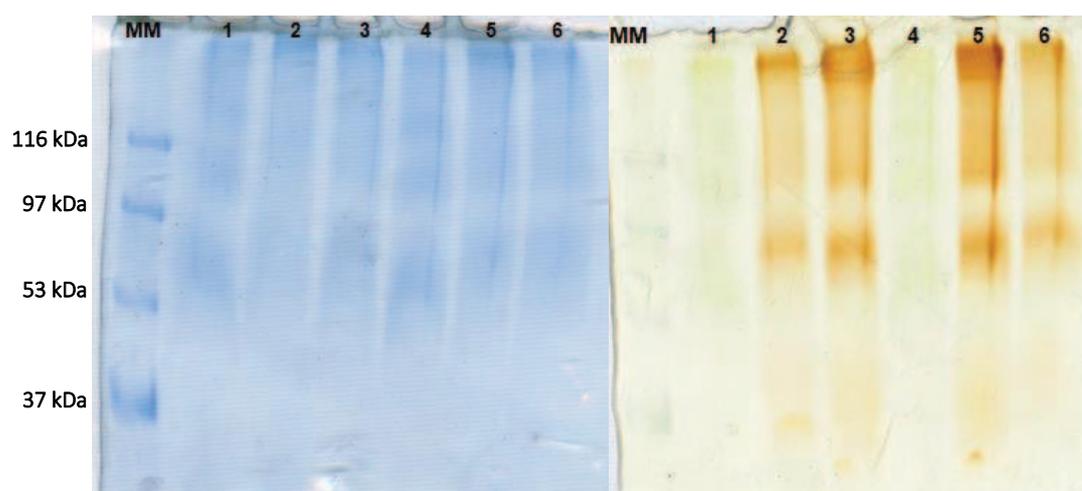
8.6. Ensayos previos de PEGilación de BSA_np a diferentes condiciones de pH y relación molar BSA_np: PEG

En esta sección se describen los resultados obtenidos en un ensayo de PEGilación de BSA_np-70-11 cargada con Gen, utilizando un mPEG éster de 30 kDa. Estos ensayos permitieron seleccionar condiciones de pH y r.m. adecuadas para la PEGilación con mPEG-Im de 30 kDa.

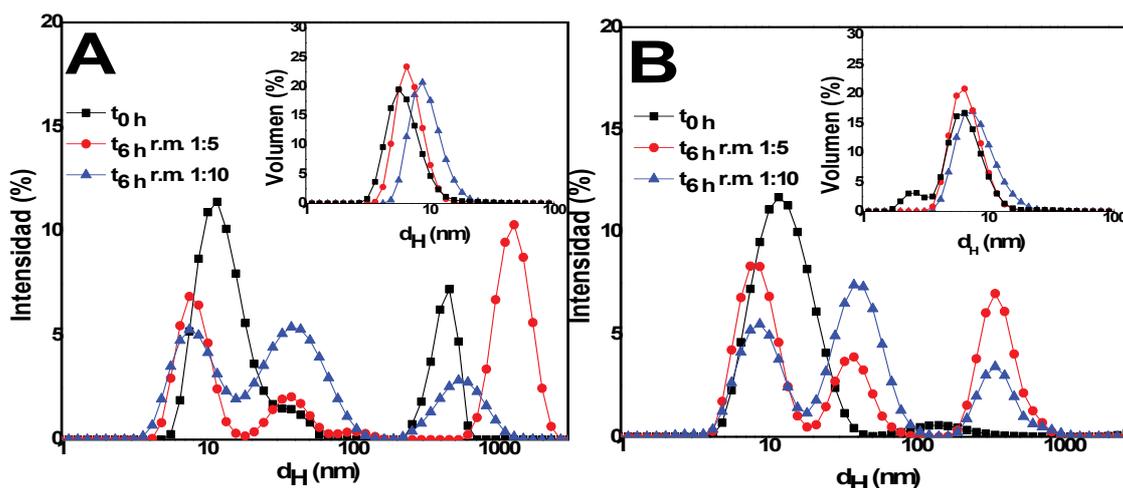
En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del contenido de grupos amino disponibles de BSA_np-70-11-Gen antes (t_{0h}) y después (t_{6h}) de la PEGilación con mPEG éster de 30 kDa, determinado por el ensayo de OPA. La PEGilación se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-25°C) durante 6 h. La concentración de proteína fue de 20 mg/mL, en solución reguladora del pH borato 0,1 M (V= 5 mL) a distintas condiciones de pH (8,0 y 8,5), con el agregado de mPEG hasta dos relaciones molares (r.m.) BSA_np:PEG distintas (1:5 y 1:10). Los resultados de la determinación se expresan en mmol Lys/mmol nanopartícula, considerando un peso molecular de 440 kDa para la nanopartícula (promedio \pm desviación estándar de 2 repeticiones). A tiempo inicial (t_{0h}), no se observaron cambios en el contenido de grupos amino disponibles a las distintas condiciones de pH evaluadas. Luego de la PEGilación, se obtuvo una reducción del contenido de grupos amino disponibles (3%), no observándose diferencias a los distintos pH y r.m. evaluados.

| Condiciones PEGilación | pH 8,0 | pH 8,5 |
|------------------------|--------------|--------------|
| t_{0h} | 284 ± 13 | 288 ± 16 |
| t_{6h} ; r.m. 1:5 | 278 ± 47 | 277 ± 13 |
| t_{6h} ; r.m. 1:10 | 274 ± 8 | 274 ± 13 |

La siguiente figura muestra el gel SDS-PAGE obtenido de las muestras de PEGilación de BSAnp-70-11-Gen con mPEG éster de 30 kDa, en las condiciones anteriormente detalladas. **1:** t_{0h} , pH 8,0; **2:** t_{6h} , pH 8,0 r.m. 1:5; **3:** t_{6h} , pH 8,0 r.m. 1:10; **4:** t_{0h} pH 8,5; **5:** t_{6h} pH 8,5 r.m. 1:5; **6:** t_{6h} pH 8,5 r.m. 1:10. Izquierda: coloración con *Coomasie Brilliant Blue* (visualización de proteína). Izquierda: coloración con $BaCl_2/I_3^-$ (visualización de PEG). En las calles 2, 3, 5 y 6 se observaron bandas que revelan la existencia de isoformas PEGiladas, por lo que las condiciones evaluadas resultaron en la PEGilación de BSAnp-70-11-Gen.



En la siguiente figura se observan las PSD_i y PSD_v determinadas por DLS de los productos de PEGilación de BSAnp-70-11-Gen con mPEG éster de 30 kDa a distintas r.m. (1:5 y 1:10) y condiciones de pH: 8,0 (A) y 8,5 (B). A partir de estas curvas, se pudo observar que la PEGilación resultó en un aumento del d_H de BSAnp-70-11-Gen.



La siguiente tabla detalla los valores de d_H , índice de polidispersidad (Pdl) y potencial ζ obtenidos mediante DLS de las distintas muestras de PEGilación evaluadas. Se observó que la PEGilación resultó en dos poblaciones de nanopartículas de diferente d_H : una de alrededor de 9 nm y otra de alrededor de 40 nm. A la mayor r.m. evaluada (1:10) se observó un aumento del d_H y del porcentaje en intensidad que representa dicha población, por lo que la PEGilación se encontraría favorecida a una mayor r.m. Con respecto al pH, no se observaron diferencias en los d_H obtenidos a pH 8,0 y pH 8,5. Además, a una r.m. de 1:10, el potencial ζ presentó valores más positivos luego de la PEGilación, lo que sugiere que a mayor cantidad de mPEG, la PEGilación ocurriría en mayor grado.

| Condiciones PEGilación | d_H (nm) | Pdl | Potencial ζ (mV) |
|---------------------------|--|------|------------------------|
| t_{0h} pH 8,0 | 13 \pm 3 nm (71%) 234 \pm 17 nm (22 %) | 0,72 | -13,8 \pm 0,5 |
| t_{0h} pH 8,5 | 13,7 \pm 6 nm (88%) 121 \pm 10 nm (6%) | 0,27 | -12,7 \pm 0,8 |
| t_{6h} pH 8,0 r.m. 1:5 | 8 nm \pm 3 nm (31%) 39 nm \pm 12 nm (11%) | 0,9 | -12 \pm 2 |
| t_{6h} pH 8,5 r.m. 1:5 | 9 nm \pm 3 nm (45%) 38 nm \pm 7 nm (20%) | 0,4 | -12 \pm 2 |
| t_{6h} pH 8,0 r.m. 1:10 | 9 nm \pm 3 nm (32%) 42 nm \pm 9 nm (45%) | 0,34 | -7,8 \pm 0,5 |
| t_{6h} pH 8,5 r.m. 1:10 | 9 nm \pm 3 nm (33%) 47 nm \pm 10 nm (47%) | 0,33 | -8,2 \pm 0,7 |

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] SK Kulkarni (2015), Chapter 3 - Applications, En: *Nanotechnology: Principles and practices*, (Ed: SK Kulkarni), Springer International Publishing, p. 317-348.
- [2] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering (2004), What are nanoscience and nanotechnologies? En: *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties*, 5-7.
- [3] European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (2006), Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline. Acceso el 28/07/2021.
- [4] National Science and Technology Council, Committee on Technology (2016) US National Nanotechnology Initiative. Strategic plan. Disponible en: <https://www.nano.gov/2016strategicplan>. Acceso el 28/07/2021.
- [5] European Commission (2011), Recommendation on the definition of a nanomaterial. En: *Official Journal of the European Union: Legislation*, L 275: 38-40.
- [6] WG Kreyling, M Semmler-Behnke, Q Chaudhry (2010) A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today* 5 (3): 165-168.
- [7] J Kreuter (1983) Physicochemical characterization of polyacrylic nanoparticles. *Int J of Pharm* 14 (1): 43-58.
- [8] C Pinto Reis, RJ Neufeld, AJ Ribeiro, F Veiga (2006) Nanoencapsulation i. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2 (1): 8-21.
- [9] SK Sahoo, S Parveen, JJ Panda (2007) The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3 (1): 20-31.
- [10] WB Coleman (2018), Chapter 4 - Neoplasia, En: *Molecular pathology: The molecular basis of human disease*, (Ed: W Coleman y G Tsongalis), Academic Press, p. 71-97.
- [11] JR Foster (2018), Chapter 1 - Introduction to neoplasia, En: *Comprehensive toxicology (Third edition)*, (Ed: CA McQueen), Elsevier, Oxford, p. 1-10.
- [12] V Kumar, AK Abbas, N Fausto and JC Aster (2010), Chapter 8 - Neoplasia, En: *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional (Octava Edición)*, Elsevier, Barcelona, España, p. 259-330.
- [13] International Agency for Research on Cancer (2020) GLOBOCAN 2020, Cancer Fact Sheets, Breast. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>. Acceso el 12/10/2021.
- [14] J Mendelsohn, PM Howley, MA Israel, JW Gray, CB Thompson (2015), Chapter 36 - The molecular biology of breast cancer, En: *The molecular basis of cancer*, (Ed: Saunders), Elsevier, Philadelphia, PA, p. 523-530.
- [15] A Ahmad, F Sarkar (2013), Chapter 4 - Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status, En: *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress (2nd Edition)*, (Ed: A Ahmad), Springer, p. 51.
- [16] A Aghebati-Maleki, S Dolati, M Ahmadi, A Baghbanzhadeh, M Asadi, A Fotouhi, M Yousefi, L Aghebati-Maleki (2020) Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *J Cell Physiol* 235 (3): 1962-1972.

- [17] IJ Joye, DJ McClements (2014) Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 19 (5): 417-427.
- [18] A Matalanis, OG Jones, DJ McClements (2011) Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* 25 (8): 1865-1880.
- [19] F Caputo, R Vogel, J Savage, G Vella, A Law, G Della Camera, G Hannon, B Peacock, D Mehn, J Ponti, O Geiss, D Aubert, A Prina-Mello, L Calzolari (2021) Measuring particle size distribution and mass concentration of nanoplastics and microplastics: addressing some analytical challenges in the sub-micron size range. *J Colloid Interface Sci* 588: 401-417.
- [20] S Sur, A Rathore, V Dave, KR Reddy, RS Chouhan, V Sadhu (2019) Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Struct Nano-Objects* 20: 100397.
- [21] T Peters (1985), Serum albumin, En: *Advances in protein chemistry*, (Ed: CB Anfinsen, JT Edsall, FM Richards), Academic Press, p. 161-245.
- [22] KA Majorek, PJ Porebski, A Dayal, MD Zimmerman, K Jablonska, AJ Stewart, M Chruszcz, W Minor (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol* 52 (3): 174-182.
- [23] AS Rose, AR Bradley, Y Valasatava, JM Duarte, A Prlić, PW Rose (2018) NGI viewer: Web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics* 34 (21): 3755-3758.
- [24] HM Berman, J Westbrook, Z Feng, G Gilliland, TN Bhat, H Weissig, IN Shindyalov, PE Bourne (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 (1): 235-242.
- [25] BX Huang, H-Y Kim, C Dass (2004) Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 15 (8): 1237-1247.
- [26] Y Li, J Lee, J Lal, L An, Q Huang (2008) Effects of pH on the interactions and conformation of bovine serum albumin: Comparison between chemical force microscopy and small-angle neutron scattering. *J Phys Chem B* 112 (12): 3797-3806.
- [27] M Bhattacharya, N Jain, K Bhasne, V Kumari, S Mukhopadhyay (2011) pH-induced conformational isomerization of bovine serum albumin studied by extrinsic and intrinsic protein fluorescence. *J Fluoresc* 21 (3): 1083-1090.
- [28] LRS Barbosa, MG Ortore, F Spinozzi, P Mariani, S Bernstorff, R Itri (2010) The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: A small-angle x-ray scattering study. *Biophys J* 98 (1): 147-157.
- [29] LG Cascão Pereira, O Théodoly, HW Blanch, CJ Radke (2003) Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface. *Langmuir* 19 (6): 2349-2356.
- [30] P Sen, B Ahmad, RH Khan (2008) Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH. *Eur Biophys J* 37 (8): 1303.
- [31] K Takeda, A Wada, K Yamamoto, Y Moriyama, K Aoki (1989) Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *J Protein Chem* 8 (5): 653-659.
- [32] K Murayama, M Tomida (2004) Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* 43 (36): 11526-11532.
- [33] JI Boye, I Alli, AA Ismail (1996) Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (4): 996-1004.

- [34] A Michnik, K Michalik, A Kluczevska, Z Drzazga (2006) Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *J Therm Anal Calorim* 84 (1): 113-117.
- [35] MP Margaron, N Soni (1998) Serum albumin: Touchstone or totem? *Anaesthesia* 53 (8): 789-803.
- [36] S Naveenraj, S Anandan (2013) Binding of serum albumins with bioactive substances – nanoparticles to drugs. *J Photochem Photobiol C* 14: 53-71.
- [37] A Sułkowska (2002) Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *J Mol Struct* 614 (1): 227-232.
- [38] A Sułkowska, J Równicka, B Bojko, W Sułkowski (2003) Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin. *J Mol Struct* 651-653: 133-140.
- [39] PB Kandagal, S Ashoka, J Seetharamappa, SMT Shaikh, Y Jadegoud, OB Ijare (2006) Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. *J Pharm Biomed Anal* 41 (2): 393-399.
- [40] C Dufour, O Dangles (2005) Flavonoid–serum albumin complexation: Determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1721 (1): 164-173.
- [41] G Zhang, X Chen, J Guo, J Wang (2009) Spectroscopic investigation of the interaction between chrysin and bovine serum albumin. *J Mol Struct* 921 (1): 346-351.
- [42] B Elsadek, F Kratz (2012) Impact of albumin on drug delivery — new applications on the horizon. *J Control Release* 157 (1): 4-28.
- [43] AO Elzoghby, WM Samy, NA Elgindy (2012) Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 157 (2): 168-182.
- [44] A Fontana, B Spolaore, P Polverino de Laureto (2013) The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1834 (6): 1125-1143.
- [45] M Fach, L Radi, PR Wich (2016) Nanoparticle assembly of surface-modified proteins. *J Am Chem Soc* 138 (45): 14820-14823.
- [46] A Loureiro, N G. Azoia, A C. Gomes, A Cavaco-Paulo (2016) Albumin-based nanodevices as drug carriers. *Curr Pharm Des* 22 (10): 1371-1390.
- [47] MM Rahimnejad, M Jahanshahi, GD Najafpour (2006) Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. *Afr J Biotechnol* 5 (20): 1918-1923.
- [48] A Maghsoudi, SA Shojaosadati, E Vasheghani Farahani (2008) 5-fluorouracil-loaded BSA nanoparticles: Formulation optimization and in vitro release study. *AAPS PharmSciTech* 9 (4): 1092-1096.
- [49] J Gong, M Huo, J Zhou, Y Zhang, X Peng, D Yu, H Zhang, J Li (2009) Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modified serum albumin micelles. *Int J Pharm* 376 (1): 161-168.
- [50] W Deng, J Li, P Yao, F He, C Huang (2010) Green preparation process, characterization and antitumor effects of doxorubicin–BSA–dextran nanoparticles. *Macromol Biosci* 10 (10): 1224-1234.
- [51] D Zhao, X Zhao, Y Zu, J Li, Y Zhang, R Jiang, Z Zhang (2010) Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Int J Nanomed* 5: 669-677.

- [52] A Jithan, K Madhavi, M Madhavi, K Prabhakar (2011) Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *Int J Pharm Invest* 1 (2): 119-125.
- [53] L Qi, Y Guo, J Luan, D Zhang, Z Zhao, Y Luan (2014) Folate-modified bexarotene-loaded bovine serum albumin nanoparticles as a promising tumor-targeting delivery system. *J Mat Chem B* 2 (47): 8361-8371.
- [54] R Yadav, D Kumar, A Kumari, SK Yadav (2014) Encapsulation of catechin and epicatechin on BSA nps improved their stability and antioxidant potential. *EXCLI J* 13: 331-346.
- [55] B Kim, C Lee, ES Lee, BS Shin, YS Youn (2016) Paclitaxel and curcumin co-bound albumin nanoparticles having antitumor potential to pancreatic cancer. *Asian J Pharm Sci* 11 (6): 708-714.
- [56] S Kumar, R Meena, P Rajamani (2016) Fabrication of BSA–green tea polyphenols–chitosan nanoparticles and their role in radioprotection: A molecular and biochemical approach. *J Agric Food Chem* 64 (30): 6024-6034.
- [57] G Catanzaro, M Curcio, G Cirillo, UG Spizzirri, ZM Besharat, L Abballe, A Vacca, F lemma, N Picci, E Ferretti (2017) Albumin nanoparticles for glutathione-responsive release of cisplatin: New opportunities for medulloblastoma. *Int J Pharm* 517 (1): 168-174.
- [58] KA Gawde, S Sau, K Tatiparti, SK Kashaw, M Mehrmohammadi, AS Azmi, AK Iyer (2018) Paclitaxel and di-fluorinated curcumin loaded in albumin nanoparticles for targeted synergistic combination therapy of ovarian and cervical cancers. *Colloids Surf B* 167: 8-19.
- [59] H Nosrati, R Abbasi, J Charmi, A Rakhshbahar, F Aliakbarzadeh, H Danafar, S Davaran (2018) Folic acid conjugated bovine serum albumin: An efficient smart and tumor targeted biomacromolecule for inhibition folate receptor positive cancer cells. *Int J Biol Macromol* 117: 1125-1132.
- [60] H Nosrati, A Rakhshbahar, M Salehiabar, S Afroogh, H Kheiri Manjili, H Danafar, S Davaran (2018) Bovine serum albumin: An efficient biomacromolecule nanocarrier for improving the therapeutic efficacy of chrysin. *J Mol Liq* 271: 639-646.
- [61] M Salehiabar, H Nosrati, E Javani, F Aliakbarzadeh, H Kheiri Manjili, S Davaran, H Danafar (2018) Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin as controlled release carrier for curcumin delivery. *Int J Biol Macromol* 115: 83-89.
- [62] Y Dong, R Fu, J Yang, P Ma, L Liang, Y Mi, D Fan (2019) Folic acid-modified ginsenoside rg5-loaded bovine serum albumin nanoparticles for targeted cancer therapy *in vitro* and *in vivo*. *Int J Nanomed* 14: 6971-6988.
- [63] PK Borah, AS Das, R Mukhopadhyay, A Sarkar, RK Duary (2020) Macromolecular design of folic acid functionalized amylopectin–albumin core–shell nanogels for improved physiological stability and colon cancer cell targeted delivery of curcumin. *J Colloid Interface Sci* 580: 561-572.
- [64] Y Zhao, C Cai, M Liu, Y Zhao, Y Wu, Z Fan, Z Ding, H Zhang, Z Wang, J Han (2020) Drug-binding albumins forming stabilized nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and resveratrol: *In vitro/in vivo* evaluation and binding properties investigation. *Int J Biol Macromol* 153: 873-882.
- [65] N Desai, V Trieu, Z Yao, L Louie, S Ci, A Yang, C Tao, T De, B Beals, D Dykes, P Noker, R Yao, E Labao, M Hawkins, P Soon-Shiong (2006) Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res* 12 (4): 1317.

- [66] S Dreis, F Rothweiler, M Michaelis, J Cinatl, J Kreuter, K Langer (2007) Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm* 341 (1): 207-214.
- [67] TH Kim, HH Jiang, YS Youn, CW Park, KK Tak, S Lee, H Kim, S Jon, X Chen, KC Lee (2011) Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *Int J Pharm* 403 (1): 285-291.
- [68] R Xu, M Fisher, RL Juliano (2011) Targeted albumin-based nanoparticles for delivery of amphipathic drugs. *Bioconjugate Chem* 22 (5): 870-878.
- [69] J Look, N Wilhelm, H von Briesen, N Noske, C Günther, K Langer, E Gorjup (2015) Ligand-modified human serum albumin nanoparticles for enhanced gene delivery. *Mol Pharm* 12 (9): 3202-3213.
- [70] P Ghosh, A Singha Roy, S Chaudhury, SK Jana, K Chaudhury, S Dasgupta (2016) Preparation of albumin based nanoparticles for delivery of fisetin and evaluation of its cytotoxic activity. *Int J Biol Macromol* 86: 408-417.
- [71] Z Song, Y Lu, X Zhang, H Wang, J Han, C Dong (2016) Novel curcumin-loaded human serum albumin nanoparticles surface functionalized with folate: Characterization and in vitro/vivo evaluation. *Drug Des Dev Ther* 10: 2643-2649.
- [72] T Geng, X Zhao, M Ma, G Zhu, L Yin (2017) Resveratrol-loaded albumin nanoparticles with prolonged blood circulation and improved biocompatibility for highly effective targeted pancreatic tumor therapy. *Nanoscale Res Lett* 12 (1): 437.
- [73] F Galisteo-González, JA Molina-Bolívar, SA Navarro, H Boulaiz, A Aguilera-Garrido, A Ramírez, JA Marchal (2018) Albumin-covered lipid nanocapsules exhibit enhanced uptake performance by breast-tumor cells. *Colloids Surf B* 165: 103-110.
- [74] X Pang, P Yang, L Wang, J Cao, Y Cheng, D Sheng, X Wan, Q Guo, K Qian, Q Zhang, X Jiang (2019) Human serum albumin nanoparticulate system with encapsulation of gefitinib for enhanced anti-tumor effects in non-small cell lung cancer. *J Drug Delivery Sci Technol* 52: 997-1007.
- [75] T Saleh, T Soudi, SA Shojaosadati (2019) Aptamer functionalized curcumin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles for targeted delivery to her-2 positive breast cancer cells. *Int J Biol Macromol* 130: 109-116.
- [76] A Akbarian, M Ebtekar, N Pakravan, ZM Hassan (2020) Folate receptor alpha targeted delivery of artemether to breast cancer cells with folate-decorated human serum albumin nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 152 90-101.
- [77] NP Gullett, ARM Ruhul Amin, S Bayraktar, JM Pezzuto, DM Shin, FR Khuri, BB Aggarwal, Y-J Surh, O Kucuk (2010) Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol* 37 (3): 258-281.
- [78] C Kanadaswami, L-T Lee, P-PH Lee, J-J Hwang, F-C Ke, Y-T Huang, M-T Lee (2005) The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 19 (5): 895.[78] C DiMarco-Crook, H Xiao (2015) Diet-based strategies for cancer chemoprevention: The role of combination regimens using dietary bioactive components. *Annu Rev Food Sci Technol* 6 (1): 505-526.
- [79] H Kikuchi, B Yuan, X Hu, M Okazaki (2019) Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *Am J Cancer Res* 9 (8): 1517-1535.
- [80] LH Cazarolli, L Zanatta, EH Alberton, MSRB Figueiredo, P Folador, RG Damazio, MG Pizzolatti, FRMB Silva (2008) Flavonoids: Prospective drug candidates. *Mini-Rev Med Chem* 8 (13): 1429-1440.

- [81] S Dwivedi, C Malik, V Chhokar (2017), Chapter 9 - Molecular structure, biological functions, and metabolic regulation of flavonoids, En: *Plant biotechnology: Recent advancements and developments*, (Ed: SK Gahlawat, RK Salar, P Siwach, JS Duhan, S Kumar, P Kaur), Springer, Singapore, p. 171-188.
- [82] C Pouget, F Lauthier, A Simon, C Fagnere, J-P Basly, C Delage, A-J Chulia (2001) Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 11 (24): 3095-3097.
- [83] M Cárdenas, M Marder, VC Blank, LP Roguin (2006) Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* 14 (9): 2966-2971.
- [84] C Dima, E Assadpour, S Dima, SM Jafari (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by *in vitro* methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19(6), 2862-2884.
- [85] AR Bilia, B Isacchi, C Righeschi, C Guccione, MC Bergonzi (2014) Flavonoids loaded in nanocarriers: An opportunity to increase oral bioavailability and bioefficacy. *Food Nutr Sci* 5 (13): 16.
- [86] A Albanese, PS Tang, WCW Chan (2012) The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14 (1): 1-16.
- [87] N Desai (2012) Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J* 14 (2): 282-295.
- [88] MJ Ernsting, M Murakami, A Roy, S-D Li (2013) Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release* 172 (3): 782-794.
- [89] M Gaumet, A Vargas, R Gurny, F Delie (2008) Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 69 (1): 1-9.
- [90] F Alexis, E Pridgen, LK Molnar, OC Farokhzad (2008) Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5 (4): 505-515.
- [91] C Tiruppathi, W Song, M Bergenfeldt, P Sass, AB Malik (1997) Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272 (41): 25968-25975.
- [92] S Zhang, H Gao, G Bao (2015) Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano* 9 (9): 8655-8671.
- [93] ST Jahan, SMA Sadat, M Walliser, A Haddadi (2017) Targeted therapeutic nanoparticles: An immense promise to fight against cancer. *J Drug Delivery* 2017: 9090325.
- [94] AC Marques, PJ Costa, S Velho, MH Amaral (2020) Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. *J Control Release* 320: 180-200.
- [95] H Otsuka, Y Nagasaki, K Kataoka (2003) Pegylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Delivery Rev* 55 (3): 403-419.
- [96] FM Veronese, G Pasut (2005) Pegylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* 10 (21): 1451-1458.
- [97] D Pfister, M Morbidelli (2014) Process for protein pegylation. *J Control Release* 180: 134-149.
- [98] M Jahanshahi, Z Babaei (2008) Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *Afr J Biotechnol* 7 (25): 4926-4934.

- [99] B Bhushan, V Khanadeev, B Khlebtsov, N Khlebtsov, P Gopinath (2017) Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv Colloid Interface Sci* 246: 13-39.
- [100] U Scheffel, BA Rhodes, TK Natarajan, HN Wagner (1972) Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J Nucl Med* 13 (7): 498.
- [101] PA Kramer (1974) Letter: Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *J Pharm Sci* 63 (10): 1646-1647.
- [102] ES Lee, YS Youn (2016) Albumin-based potential drugs: Focus on half-life extension and nanoparticle preparation. *J Pharm Invest* 46 (4): 305-315.
- [103] K Langer, MG Anhorn, I Steinhauser, S Dreis, D Celebi, N Schrickel, S Faust, V Vogel (2008) Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *Int J Pharm* 347 (1): 109-117.
- [104] M Merodio, A Arnedo, MJ Renedo, JM Irache (2001) Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and *in vitro* release properties. *Eur J Pharm Sci* 12 (3): 251-259.
- [105] C Weber, J Kreuter, K Langer (2000) Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int J Pharm* 196 (2): 197-200.
- [106] DM Casa, DB Scariot, NM Khalil, CV Nakamura, RM Mainardes (2018) Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. *Exp Parasitol* 192: 12-18.
- [107] ZE Pápay, A Kósa, B Böddi, Z Merchant, IY Saleem, MG Zariwala, I Klebovich, S Somavarapu, I Antal (2017) Study on the pulmonary delivery system of apigenin-loaded albumin nanocarriers with antioxidant activity. *J Aerosol Med Pulm Drug Delivery* 30 (4): 274-288.
- [108] S Le Maux, S Bouhallab, L Giblin, A Brodkorb, T Croguennec (2014) Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: Binding, structural, and biological properties. *Dairy Sci Technol* 94: 409-426.
- [109] R Mani, V Natesan (2018) Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* 145: 187-196.
- [110] S Mehdi, S Nafees, M Zafaryab, M Khan, A Rizvi (2018) Chrysin: A promising anticancer agent its current trends and future perspectives. *Eur Exp Biol* 8 (3): 16.
- [111] L Zhou, P Zhang, G Yang, R Lin, W Wang, T Liu, L Zhang, J Zhang (2014) Solubility of chrysin in ethanol and water mixtures. *J Chem Eng Data* 59 (7): 2215-2220.
- [112] GT Castro, FH Ferretti, SE Blanco (2005) Determination of the overlapping pKa values of chrysin using UV-vis spectroscopy and ab initio methods. *Spectrochim Acta Part A* 62 (1): 657-665.
- [113] H Zheng, S Li, Y Pu, Y Lai, B He, Z Gu (2014) Nanoparticles generated by PEG-chrysin conjugates for efficient anticancer drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 87 (3): 454-460.
- [114] SF Nabavi, N Braidly, S Habtemariam, IE Orhan, M Daglia, A Manayi, O Gortzi, SM Nabavi (2015) Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. *Neurochem Int* 90: 224-231.

- [115] TB Hong, A Rahumatullah, T Yogarajah, M Ahmad, KB Yin (2010) Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (3): 1057-1069.
- [116] ER Kasala, LN Bodduluru, RM Madana, AK V, R Gogoi, CC Barua (2015) Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: Mechanistic perspectives. *Toxicol Lett* 233 (2): 214-225.
- [117] J Jung (2016) Emerging utilization of chrysin using nanoscale modification. *J Nanomater* 2016: 2894089.
- [118] A Thomas, N Ranadive, H Nayak, S Surendran, M Nampoothiri, J Mudgal (2016) In vitro cytotoxicity activity of chrysin, morin and resveratrol against MCF-7 breast cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Res Asia* 13 (3): 1633-1637.
- [119] M Zeinali, SA Rezaee, H Hosseinzadeh (2017) An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother* 92 998-1009.
- [120] T Walle, N Ta, T Kawamori, X Wen, PA Tsuji, UK Walle (2007) Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids—methylated versus unmethylated flavones. *Biochem Pharmacol* 73 (9): 1288-1296.
- [121] YC Kao, C Zhou, M Sherman, CA Laughton, S Chen (1998) Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect* 106 (2): 85-92.
- [122] S Samarghandian, T Farkhondeh, M Azimi-Nezhad (2017) Protective effects of chrysin against drugs and toxic agents. *Dose-Response* 15 (2): 1559325817711782.
- [123] A Eatemadi, H Daraee, HT Aiyelabegan, B Negahdari, B Rajean, N Zarghami (2016) Synthesis and characterization of chrysin-loaded PCL-PEG-PECL nanoparticle and its effect on breast cancer cell line. *Biomed Pharmacother* 84: 1915-1922.
- [124] KM Kim, HK Lim, SH Shim, J Jung (2017) Improved chemotherapeutic efficacy of injectable chrysin encapsulated by copolymer nanoparticles. *Int J Nanomed* 12: 1917-1925.
- [125] AA Perez, RB Andermatten, AC Rubiolo, LG Santiago (2014) B-lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chem* 158: 66-72.
- [126] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara, LG Santiago (2015) Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids Surf B* 128: 219-226.
- [127] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara, LG Santiago (2015) Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids* 48: 165-173.
- [128] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara, LG Santiago (2016) Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chem* 211: 819-826.
- [129] FF Visentini, OE Sponton, AA Perez, LG Santiago (2017) Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. *Food Hydrocolloids* 67: 130-138.
- [130] DA Skoog, DM West, FJ Holler, SR Crouch (2013), *Fundamentals of analytical chemistry*, Cengage Learning.
- [131] JR Albani (2008), *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*, John Wiley & Sons.

- [132] JR Lakowicz (2013) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Singapore, Springer Science & Business Media.
- [133] W Jiskoot, D Crommelin (2005), *Methods for structural analysis of protein pharmaceuticals*, Springer Science & Business Media.
- [134] S Bhattacharjee (2016) DLS and zeta potential – what they are and what they are not? *J Control Release* 235: 337-351.
- [135] J Stetefeld, SA McKenna, TR Patel (2016) Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8 (4): 409-427.
- [136] DJ Ross, R Sigel (2012) Mie scattering by soft core-shell particles and its applications to ellipsometric light scattering. *Phys Rev E* 85 (5): 056710.
- [137] R Xu (2008) Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* 6 (2): 112-115.
- [138] CM Hoo, N Starostin, P West, ML Mecartney (2008) A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanopart Res* 10 (1): 89-96.
- [139] MK Khan, QY Wang, ME Fitzpatrick (2016), Chapter 1 - Atomic Force microscopy (AFM) for materials characterization, En: *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods*, (Ed: G Hübschen, I Altpeter, R Tschuncky, H-G Herrmann), Woodhead Publishing, p. 1-16.
- [140] L Di, EH Kerns (2006). Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization. *Drug Discov Today*, 11(9-10), 446-451.
- [141] R Fang, H Jing, Z Chai, G Zhao, S Stoll, F Ren, F Liu, X Leng (2011) Study of the physicochemical properties of the BSA: Flavonoid nanoparticle. *Eur Food Res Technol* 233 (2): 275-283.
- [142] BJ Inkson (2016), Chapter 2 - Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for materials characterization, En: *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods*, (Ed: G Hübschen, I Altpeter, R Tschuncky, H-G Herrmann), Woodhead Publishing, p. 17-43.
- [143] CB Carter, DB Williams (2016) *Transmission Electron Microscopy: Diffraction, imaging, and spectrometry*, Springer.
- [144] W Mao, MA Schuler, MR Berenbaum (2013) Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honeybee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci* 110 (22): 8842.
- [145] C Arzeni, OE Pérez, AMR Pilosof (2015) Power ultrasound assisted design of egg albumin nanoparticles. *Food Biophys* 10 (4): 439-446.
- [146] VR Patel, YK Agrawal (2011) Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J Adv Pharm Tech Res* 2 (2): 81-87.
- [147] AP MacKenzie (1976) The physico-chemical basis for the freeze-drying process. *Dev Biol Stand* 36 51-67.
- [148] W Wang (2000) Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 203 (1): 1-60.
- [149] MG Anhorn, H-C Mahler, K Langer (2008) Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients. *Int J Pharm* 363 (1): 162-169.
- [150] Y Han, B-S Jin, S-B Lee, Y Sohn, J-W Joung, J-H Lee (2007) Effects of sugar additives on protein stability of recombinant human serum albumin during lyophilization and storage. *Arch Pharmacol Res* 30 (9): 1124.

- [151] A Hawe, W Frieß (2006) Physico-chemical lyophilization behavior of mannitol, human serum albumin formulations. *Eur J Pharm Sci* 28 (3): 224-232.
- [152] W Abdelwahed, G Degobert, S Stainmesse, H Fessi (2006) Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Delivery Rev* 58 (15): 1688-1713.
- [153] W Abdelwahed, G Degobert, H Fessi (2006) Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *European J Pharm Biopharm* 63 (2): 87-94.
- [154] S Jena, J Horn, R Suryanarayanan, W Friess, A Aksan (2017) Effects of excipient interactions on the state of the freeze-concentrate and protein stability. *Pharm Res* 34 (2): 462-478.
- [155] U Veronesi, A Goldhirsch, P Veronesi, OD Gentilini, MC Leonardi (2017), *Breast cancer: Innovations in research and management*, Springer.
- [156] LF Hernandez-Aya, AM Gonzalez-Angulo (2013) Adjuvant systemic therapies in breast cancer. *Surg Clin* 93 (2): 473-491.
- [157] MB Sporn, N Suh (2000) Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21 (3): 525-530.
- [158] ER Moghadam, HL Ang, SE Asnaf, A Zabolian, H Saleki, M Yavari, H Esmaeili, A Zarrabi, M Ashrafizadeh, AP Kumar (2020) Broad-spectrum preclinical antitumor activity of chrysin: Current trends and future perspectives. *Biomolecules* 10 (10):
- [159] S Samarghandian, M Azimi-Nezhad, A Borji, M Hasanzadeh, F Jabbari, T Farkhondeh, M Samini (2016). Inhibitory and cytotoxic activities of chrysin on human breast adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Pharmacognosy magazine*, 12(4), 436-440.
- [160] P Parajuli, N Joshee, AM Rimando, S Mittal, AK Yadav (2009) In vitro antitumor mechanisms of various scutellaria extracts and constituent flavonoids. *Planta Med* 75 (1): 41-48.
- [161] D Baidya, J Kushwaha, K Mahadik, S Patil (2019) Chrysin-loaded folate conjugated pf127-f68 mixed micelles with enhanced oral bioavailability and anticancer activity against human breast cancer cells. *Drug Dev Ind Pharm* 45 (5): 852-860.
- [162] S Davaran, H Fazeli, A Ghamkhari, F Rahimi, O Molavi, M Anzabi, R Salehi (2018) Synthesis and characterization of novel p(HEMA-LA-MADQUAT) micelles for co-delivery of methotrexate and chrysin in combination cancer chemotherapy. *J Biomater Sci, Polym Ed* 29 (11): 1265-1286.
- [163] S Khaledi, S Jafari, S Hamidi, O Molavi, S Davaran (2020) Preparation and characterization of PLGA-PEG-PLGA polymeric nanoparticles for co-delivery of 5-fluorouracil and chrysin. *J Biomater Sci, Polym Ed* 31 (9): 1107-1126.
- [164] M Beyrami, E Karimi, E Oskoueian (2020) Synthesized chrysin-loaded nanoliposomes improves cadmium-induced toxicity in mice. *Environ Sci Pollut Res* 27 (32): 40643-40651.
- [165] A Ghamkhari, A Pouyafar, R Salehi, R Rahbarghazi (2019) Chrysin and docetaxel loaded biodegradable micelle for combination chemotherapy of cancer stem cell. *Pharm Res* 36 (12): 165.
- [1663] E Anari, A Akbarzadeh, N Zarghami (2016) Chrysin-loaded PLGA-PEG nanoparticles designed for enhanced effect on the breast cancer cell line. *Artif Cells, Nanomed, Biotechnol* 44 (6): 1410-1416.

- [167] GM Sulaiman, MS Jabir, AH Hameed (2018) Nanoscale modification of chrysin for improved of therapeutic efficiency and cytotoxicity. *Artif Cells, Nanomed, Biotechnol* 46 (1): 708-720.
- [168] OE Sponton, AA Perez, M Grabois, LG Santiago (2019), - Nanosupplements: Improvements in nutritional functionality of food products, En: *Food applications of nanotechnology*, (Ed: G Molina, Inamuddin, FM Pelissari, AM Asiri), CRC Press, p. 99-118.
- [169] H Rostamabadi, SR Falsafi, S Boostani, I Katouzian, A Rezaei, E Assadpour, SM Jafari (2021), - Chapter 1 - Design and formulation of nano/micro-encapsulated natural bioactive compounds for food applications, En: *Application of nano/microencapsulated ingredients in food products*, (Ed: SM Jafari), Academic Press, p. 1-41.
- [170] T Bohn, F Carriere, L Day, A Deglaire, L Egger, D Freitas, M Golding, S Le Feunteun, A Macierzanka, O Menard, B Miralles, A Moscovici, R Portmann, I Recio, D Rémond, V Santé-Lhoutelier, TJ Wooster, U Lesmes, AR Mackie, D Dupont (2018) Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Crit Rev Food Sci Nutr* 58 (13): 2239-2261.
- [171] Cost Action INFOGEST. Disponible en: <https://www.cost-infogest.eu/>. Acceso el 28/07/2021.
- [172] M Minekus, M Alming, P Alvito, S Ballance, T Bohn, C Bourlieu, F Carriere, R Boutrou, M Corredig, D Dupont, C Dufour, L Egger, M Golding, S Karakaya, B Kirkhus, S Le Feunteun, U Lesmes, A Macierzanka, A Mackie, S Marze, DJ McClements, O Menard, I Recio, CN Santos, RP Singh, GE Vegarud, MS Wickham, W Weitschies, A Brodkorb (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Funct* 5 (6): 1113-1124.
- [173] A Brodkorb, L Egger, M Alming, P Alvito, R Assunção, S Ballance, T Bohn, C Bourlieu-Lacanal, R Boutrou, F Carrière, A Clemente, M Corredig, D Dupont, C Dufour, C Edwards, M Golding, S Karakaya, B Kirkhus, S Le Feunteun, U Lesmes, A Macierzanka, AR Mackie, C Martins, S Marze, DJ McClements, O Ménard, M Minekus, R Portmann, CN Santos, I Souchon, RP Singh, GE Vegarud, MSJ Wickham, W Weitschies, I Recio (2019) INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 14 (4): 991-1014.
- [174] JD Menczel, RB Prime (2009), *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons.
- [175] Ş ComŞA, AM CÎmpean, M Raica (2015) The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res* 35 (6): 3147.
- [176] X Dai, H Cheng, Z Bai, J Li (2017) Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer* 8 (16): 3131-3141.
- [177] R Cailleau, R Young, M Olivé, WJ Reeves, Jr. (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *JNCI* 53 (3): 661-674.
- [178] T Mosmann (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1): 55-63.
- [179] E White, DR Green, AG Letai (2015), Chapter 14 - Apoptosis, necrosis, and autophagy, En: *The molecular basis of cancer*, (Ed: J Mendelsohn, JW Gray, PM Howley, MA Israel, CB Thompson), Saunders/Elsevier Philadelphia, PA, p. 209-227.
- [180] CM Henry, E Hollville, SJ Martin (2013) Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61 (2): 90-97.
- [181] M Hassan, H Watari, A AbuAlmaaty, Y Ohba, N Sakuragi (2014) Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res Int* 2014 150845.

- [182] A Adan, G Alizada, Y Kiraz, Y Baran, A Nalbant (2017) Flow cytometry: Basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37 (2): 163-176.
- [183] M Anson, A Mirsky (1932) The estimation of pepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 16 (1): 59-63.
- [184] ML Anson (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22 (1): 79-89.
- [1854] BCW Hummel (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can J Biochem Physiol* 37 (12): 1393-1399.
- [186] P Zimet, D Rosenberg, YD Livney (2011) Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* 25 (5): 1270-1276.
- [187] S David, Y Zagury, YD Livney (2015) Soy β -conglycinin-curcumin nanocomplexes for enrichment of clear beverages. *Food Biophys* 10 (2): 195-206.
- [188] AA Ganai, H Farooqi (2015) Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 76: 30-38.
- [189] N Jaiswal, J Akhtar, SP Singh, F Ahsan (2019) An overview on genistein and its various formulations. *Drug Res* 69 (06): 305-313.
- [190] DM Tham, CD Gardner, WL Haskell (1998) Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (7): 2223-2235.
- [191] KDR Setchell, A Cassidy (1999) Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129 (3): 758S-767S.
- [192] V Mukund, D Mukund, V Sharma, M Mannarapu, A Alam (2017) Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Crit Rev Oncol Hemat* 119: 13-22.
- [193] M Russo, GL Russo, M Daglia, PD Kasi, S Ravi, SF Nabavi, SM Nabavi (2016) Understanding genistein in cancer: The "good" and the "bad" effects: A review. *Food Chem* 196 589-600.
- [194] L Varinska, P Gal, G Mojzisova, L Mirossay, J Mojzis (2015) Soy and breast cancer: Focus on angiogenesis. *Int J Mol Sci* 16 (5): 11728-11749.
- [195] Z Li, J Li, B Mo, C Hu, H Liu, H Qi, X Wang, J Xu (2008) Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicol In Vitro* 22 (7): 1749-1753.
- [196] H Pan, W Zhou, W He, X Liu, Q Ding, L Ling, X Zha, S Wang (2012) Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-kb activity via the notch-1 pathway. *Int J Mol Med* 30 (2): 337-343.
- [197] AL Hewitt, KW Singletary (2003) Soy extract inhibits mammary adenocarcinoma growth in a syngeneic mouse model. *Cancer Lett* 192 (2): 133-143.
- [198] HG Farina, M Pomies, DF Alonso, DE Gomez (2006) Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncol Rep* 16 (4): 885-891.
- [199] Z Yang, K Kulkarni, W Zhu, M Hu (2012) Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: Mechanistic studies on its ADME. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 12 (10): 1264-1280.
- [100] N Tyagi, YH Song, R De (2019) Recent progress on biocompatible nanocarrier-based genistein delivery systems in cancer therapy. *J Drug Target* 27 (4): 394-407.

- [201] T Zhang, H Wang, Y Ye, X Zhang, B Wu (2015) Micellar emulsions composed of mPEG-PCL/MCT as novel nanocarriers for systemic delivery of genistein: A comparative study with micelles. *Int J Nanomed* 10 6175-6184.
- [202] V Phan, J Walters, B Brownlow, T Elbayoumi (2013) Enhanced cytotoxicity of optimized liposomal genistein via specific induction of apoptosis in breast, ovarian and prostate carcinomas. *Journal of Drug Targeting* 21 (10): 1001-1011.
- [203] NP Aditya, M Shim, I Lee, Y Lee, M-H Im, S Ko (2013) Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: In vitro digestion and antiproliferative activity. *J Agric Food Chem* 61 (8): 1878-1883.
- [204] L Cai, R Yu, X Hao, X Ding (2017) Folate receptor-targeted bioflavonoid genistein-loaded chitosan nanoparticles for enhanced anticancer effect in cervical cancers. *Nanoscale Res Lett* 12 (1): 509.
- [205] F Rahmani, E Karimi, E Oskoueian (2020) Synthesis and characterisation of chitosan-encapsulated genistein: Its anti-proliferative and anti-angiogenic activities. *J Microencapsulation* 37 (4): 305-313.
- [206] Y Guo, L Shen, X Yao, Y Liu, Y Liu, H Chen, K Min, X Zheng (2017) Spectroscopic and molecular docking study on the structure–affinity relationship and mechanism in the interaction of genistein and its derivatives with bovine serum albumin. *Luminescence* 32 (8): 1368-1384.
- [207] DF Alonso, EF Farías, A Urtreger, V Ladeda, MdCC Vidal, EBdK Joffé (1996) Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 62 (4): 288-297.
- [208] I Vermes, C Haanen, H Steffens-Nakken, C Reutellingsperger (1995) A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v. *J Immunol Methods* 184 (1): 39-51.
- [209] A Singha Roy, DR Tripathy, A Chatterjee, S Dasgupta (2013) The influence of common metal ions on the interactions of the isoflavone genistein with bovine serum albumin. *Spectrochim Acta Part A* 102: 393-402.
- [210] X Long, Y-F Zeng, Y Liu, Y Liu, T Li, L Liao, Y Guo (2018) Synthesis of novel genistein amino acid derivatives and investigation on their interactions with bovine serum albumin by spectroscopy and molecular docking. *RSC Advances* 8 (54): 31201-31212.
- [211] EL Gelamo, CHTP Silva, H Imasato, M Tabak (2002) Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Molecular Enzymol* 1594 (1): 84-99.
- [212] G Israeli-Lev, M Pitchkhadze, S Nevo, L Fahoum, E Meyron-Holtz, YD Livney (2017) Harnessing proteins to control crystal size and morphology, for improved delivery performance of hydrophobic bioactives, using genistein as a model. *Food Hydrocolloids* 63: 97-107.
- [213] F Zhi-Gang, P Ping, Y Zhi-Giang, C Ya-Gen, Z Jian-Kang, W Miao, Z Xue-Nong, Z Qiang (2009) Two novel freeze-dried pH-sensitive cyclosporine a nanoparticles: Preparation, in vitro drug release, and in vivo absorption enhancement effects. *Curr Nanosci* 5 (4): 449-456.
- [214] RP Das, BG Singh, A Kunwar, MV Ramani, GV Subbaraju, PA Hassan, KI Priyadarsini (2017) Tuning the binding, release and cytotoxicity of hydrophobic drug by bovine serum albumin nanoparticles: Influence of particle size. *Colloids Surf B* 158: 682-688.

- [215] N Oh, J-H Park (2014) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomed* 9 (1): 51-63.
- [216] R Bergan, E Kyle, P Nguyen, J Trepel, C Ingui, L Neckers (1996) Genistein-stimulated adherence of prostate cancer cells is associated with the binding of focal adhesion kinase to beta-1-integrin. *Clin Exp Metastasis* 14 (4): 389-398.
- [217] T Valachovicova, V Slivova, H Bergman, J Shuherk, D Sliva (2004) Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kB/ap-1-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 25 (5): 1389-1395.
- [218] P Mishra, B Nayak, RK Dey (2016) PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian J Pharm Sci* 11 (3): 337-348.
- [219] CJ Fee, JM Van Alstine (2006) PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chem Eng Sci* 61 (3): 924-939.
- [220] M Gonzalez, SE Vaillard (2013) Evolution of reactive mPEG polymers for the conjugation of peptides and proteins. *Curr Org Chemistry* 17 (9): 975-998.
- [221] JV Jokerst, T Lobovkina, RN Zare, SS Gambhir (2011) Nanoparticle pegylation for imaging and therapy. *Nanomed* 6 (4): 715-728.
- [222] JS Suk, Q Xu, N Kim, J Hanes, LM Ensign (2016) PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Delivery Rev* 99: 28-51.
- [223] M González, NA Ceaglio, M de los Milagros Bürgi, M Etcheverrigaray, RB Kratje, SE Vaillard (2015) Novel reactive PEG for amino group conjugation. *RSC Adv* 5 (18): 14002-14009.
- [224] L Radi, M Fach, M Montigny, E Berger-Nicoletti, W Tremel, PR Wich (2016) Methods of protein surface pegylation under structure preservation for the emulsion-based formation of stable nanoparticles. *MedChemComm* 7 (9): 1738-1744.
- [225] CO Beauchamp, SL Gonias, DP Menapace, SV Pizzo (1983) A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts; effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin, and α 2-macroglobulin. *Anal Biochem* 131 (1): 25-33.
- [226] K Yoshinga, JM Harris (1989) Effects of coupling chemistry on the activity of poly(ethylene glycol)-modified alkaline phosphatase. *J Bioact Compat Polym* 4 (1): 17-24.
- [227] H Kouchakzadeh, SA Shojaosadati, A Maghsoudi, E Vasheghani Farahani (2010) Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology. *AAPS PharmSciTech* 11 (3): 1206-1211.
- [228] A Abuchowski, T Van Es, N Palczuk, F Davis (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem* 252 (11): 3578-3581.
- [229] R Ferebee, IF Hakem, A Koch, M Chen, Y Wu, D Loh, DC Wilson, JL Poole, JP Walker, G Fytas, MR Bockstaller (2016) Light scattering analysis of mono- and multi-pegylated bovine serum albumin in solution: Role of composition on structure and interactions. *J Phys Chem B* 120 (20): 4591-4599.
- [230] E Fahrländer, S Schelhaas, A Jacobs, K Langer (2015) Pegylated human serum albumin (HSA) nanoparticles: Preparation, characterization and quantification of the pegylation extent. *Nanotechnology* 26 (14): 145103.
- [231] FC Church, DH Porter, GL Catignani, HE Swaisgood (1985) An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal Biochem* 146 (2): 343-348.

- [232] EM Mulcahy, M Fargier-Lagrange, DM Mulvihill, JA O'Mahony (2017) Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods. *Food Chem* 229: 66-74.
- [233] PM Nielsen, D Petersen, C Dambmann (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66 (5): 642-646.
- [234] E Peñas, G Préstamo, F Polo, R Gomez (2006) Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly M 1 in the hydrolysates. *Food Chem* 99 (3): 569-573.
- [235] L Zhang, S Hou, S Mao, D Wei, X Song, Y Lu (2004) Uptake of folate-conjugated albumin nanoparticles to the SKNOV3 cells. *Int J Pharm* 287 (1): 155-162.
- [236] AI Ledesma-Osuna, G Ramos-Clamont, L Vázquez-Moreno (2008) Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochim Pol* 55 (3): 491-497.
- [237] MM Kurfürst (1992) Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 200 (2): 244-248.
- [238] XW Gong, DZ Wei, ML He, YC Xiong (2007) Discarded free peg-based assay for obtaining the modification extent of pegylated proteins. *Talanta* 71 (1): 381-384.
- [239] M Fenech, M Kirsch-Volders, AT Natarajan, J Surralles, JW Crott, J Parry, H Norppa, DA Eastmond, JD Tucker, P Thomas (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26 (1): 125-132.
- [241] RP Araldi, TC de Melo, TB Mendes, PL de Sá Júnior, BHN Nozima, ET Ito, RF de Carvalho, EB de Souza, R de Cassia Stocco (2015) Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother* 72 74-82.
- [241] Z Sobol, ML Homiski, DA Dickinson, RA Spellman, D Li, A Scott, JR Cheung, SL Coffing, JB Munzner, KE Sanok, WC Gunther, KL Dobo, M Schuler (2012) Development and validation of an in vitro micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutat Res Gen Toxicol Environ Mutagen* 746 (1): 29-34.
- [242] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2011) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1). Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm074931.pdf>. Acceso el 28/07/2021.
- [243] Organisation for Economic Co-operation and Development (2010), Guideline for Testing of Chemicals. Test No. 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test.
- [244] S Knasmüller, M Fenech (2019), *The micronucleus assay in toxicology*, Royal Society of Chemistry.
- [245] RD Snyder, PJ Gillies (2003) Reduction of genistein clastogenicity in chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids. *Food Chem Toxicol* 41 (10): 1291-1298.
- [246] CB Klein, AA King (2007) Genistein genotoxicity: Critical considerations of *in vitro* exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol* 224 (1): 1-11.