



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Siri, Macarena

Estudio de nanopartículas proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Siri, M. (2019). *Estudio de nanopartículas proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes* <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1412>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio de Nanopartículas Proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales

TESIS DOCTORAL

Macarena Siri
maca.siri@gmail.com

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo caracterizar tanto biofísica, como bioquímicamente una nanopartícula de albumina bovina sérica (BSA) como un potencial vehículo para drogas anti - tumorales. Como potencial sistema de transporte de drogas medicinales se caracterizó la estructura/función y toxicidad de la BSA NP en dispersión acuosa.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**Estudio de Nanopartículas Proteicas y su posible aplicación
como vectores de drogas antitumorales**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de Quilmes

Lic. Macarena Siri

Director: Dra. Silvia del V. Alonso

Co- Director: Dr. Mariano Grasselli

Esta tesis esta dedicada a los que no encuentran sentido en el abandonar algo sólo porque la adversidad es grande... y a todos los que respaldan y alientan tal decisión:

La familia que me preparó desde que fui una idea para transitar por este loco lugar y la que elegí durante el viaje

*“Nací como nace un capullo, como nacemos todos,
junto al amor de los míos, que me dieron el sentido y el cuidado.
Crecí día a día, como lo hemos hecho todos
y al abrigo del hogar fui empezando a entender.
Por momentos jugando, vi las cosas perfectas, y el mundo infinito.
Ah comprendo que el infinito no ha cambiado:
está presente cuando miramos al cielo los que lo amamos.”*

Última poesía de Luis Alberto Spinetta, 12 de Octubre 2012, La Vereda de los Descalzos

Contenido

i.	Congresos y Encuentros Científicos	10
ii.	Publicaciones Científicas	13
iii.	Abreviaturas.....	14
iv.	Resumen	15
v.	Introducción General.....	16
	¿A qué llamamos nanopartículas?	16
	¿Qué aplicación posible tienen las NPs?.....	17
	¿Cuáles son las instancias que se deben cumplir para diseñar NPs eficientes?	18
	¿Cuáles son los materiales más utilizados para obtener NPs?	21
	¿Cuáles son las NPs aprobadas para su uso en tratamientos médicos?.....	22
	¿Cuáles son las características de las NPs de albúmina?.....	25
	I. Aplicaciones de las NPs de albúmina en la industria farmacéutica	26
	II. Métodos de preparación de las NPs de albúmina	27
vi.	Hipótesis de trabajo y objetivos.....	32
	iv.a Hipótesis de trabajo:	32
	iv.b Objetivo del trabajo:	32
	PARTE I: Caracterización Biofísica	34
	Capítulo 1: <i>Caracterización biofísica de la nanopartícula de albúmina</i>	35
	Introducción	35
	1.1 Caracterización de la nanopartícula de albúmina	41
	Materiales y Métodos	41
	□ D.L.S y Potencial Z	41
	□ UV-Visible	41
	• <i>Fluorescencia</i>	41
	• <i>FT-IR</i>	41
	□ <i>Dicroísmo Circular</i>	42
	□ Caracterización de superficie: Tiolatos, Aminos y Carbonilos	42
	<i>Marcación de grupos Tiolatos:</i>	42
	<i>Marcación de grupos aminos:</i>	43
	<i>Marcación de los grupos carbonilos:</i>	43
	□ <i>Determinación proteica</i>	44
	□ <i>Análisis de los datos</i>	44
	Resultados y Discusión.....	45
	• <i>D.L.S y Potencial Z</i>	47
	• <i>Microscopía T.E.M. y A.F.M.</i>	48
	• <i>Aproximaciones matemáticas del volumen y peso molecular de la BSA NP</i> ...	50

• UV-Visible	51
• Fluorescencia.....	54
• FT-IR.....	55
□ Dicroísmo Circular.....	56
• Caracterización de superficie: Tioles, Aminos y Carbonilos	59
• Determinación proteica	65
• Hipótesis sobre la estructura de la BSA NP como cápside vírica	65
Conclusión	69
Capítulo 2: Estabilidad y liofilización de la BSA NP	70
Introducción	70
2.1 Estabilidad en solución de la BSA NP	73
Materiales y Métodos.....	73
• Estabilidad de la NP a diferentes pH	73
• Estabilidad de la NP de presencia caótropos: Urea, SDS y Tween 80	74
• Estabilidad de la NP en soluciones con diferente Fuerza Iónica.....	74
• Estabilidad en función del tiempo	75
Resultados y Discusión	76
• Estabilidad de las NPs en función del pH.....	76
• Estabilidad de la NP en soluciones de caótropos: Urea, SDS y Tween 80% ...	81
• Estabilidad de las NPs en soluciones con diferente Fuerza Iónica	86
• Estabilidad de la NP en dispersión en función del tiempo	87
2. 2 Liofilización de la BSA NP	91
Introducción	91
Materiales y Métodos.....	94
• Liofilización	94
• Potencial Z y tamaño de la nanopartícula	94
• Microscopia Electrónica de Barrido (S.E.M)	94
• Microscopia Electrónica de Transmisión (T.E.M.).....	94
• Microscopia de Fuerza Atómica (A.F.M.)	95
• Fluorescencia.....	95
• Detección de grupos Tiolatos de la NP	95
Resultados y Discusión	96
• Potencial Z y Tamaño de las NPs	96
• Microscopia: T.E.M – S.E.M – A.F.M.....	100
• Fluorescencia.....	102
• Detección de grupos Tiolatos en la BSA NP	103
• Obtención de las constantes de unión (Binding) de la BSA NP-Lyo con una sonda fluorescente MC540	105

Conclusión	109
Capítulo 3: <i>Marcación de la nanopartícula con ligandos funcionales: Ácido Fólico (AF) e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)</i>	110
Introducción	110
3.1 Marcado de la NP con un ligando funcional	112
Materiales y Métodos	112
• Marcado de la BSA NP con AF	112
• Marcado de la BSA NP con FITC.....	112
• Determinación del tamaño de las NPs marcadas.....	113
• Espectroscopía UV-Visible.....	113
• Espectroscopía de Fluorescencia	114
• Medidas de las NPs con Dicroísmo Circular	114
• Interacción AF-BSA NP con emodin (E).....	114
• Determinación de la citotoxicidad en células MCF-7 tratadas con AF-BSA NP	115
• Medición de vida media de F-BSA NP	116
Resultados y Discusión.....	117
• Determinación del tamaño de las NP decoradas	117
• Cuantificación de las moléculas de ligando/ BSA NP	117
• Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: Peso Molecular.....	120
• Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: UV-Vis	122
• Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: Fluorescencia.....	122
• Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: Dicroísmo Circular	123
• Medición de la vida media de la F-BSA NP.....	123
• Funcionalidad preliminar de la AF-BSA NP: Parámetros de interacción.....	124
• Funcionalidad de la AF-BSA NP: Ensayos citotóxicos en línea tumoral MCF-7.	126
Conclusión	127
Capítulo 4: Obtención de los bioconjugados de la BSA NP: drogas anti-tumorales (DAT)	128
Introducción	128
4.1 Obtención de los bioconjugados	130
Materiales y Métodos	130
Resultados y Discusión.....	131
4.2 Comportamiento estructural de la BSA NP conjugada a drogas por Dicroísmo Circular (C.D.).	138
Materiales y Métodos	138
Resultados y Discusión.....	139
4.3 Eficiencia de unión (binding) de los bioconjugados	142

Materiales y Métodos.....	142
Resultados y Discusión	143
4.4 Perfiles de liberación cinética de las drogas	146
Materiales y Métodos.....	146
• Perfiles de la cinética de liberación de las DAT a pH 7,00.....	146
• Perfiles de la cinética de liberación de las DAT a pH 5,5 – 6,5.....	146
Resultados y Discusión	148
• Perfiles de cinética de liberación de las DAT a pH 7,00	148
• Perfiles de la cinética de liberación de las DAT a pH 5,5 – 6,5.....	149
Conclusión	153
Capítulo 5: Estudio del ensamblado y densidad de la nanopartícula de albúmina mediante datos experimentales.....	154
Introducción	154
5.1 Estudio del ensamblado de la BSA NP en diferentes condiciones experimentales mediante un SDS – PAGE	155
Materiales y Métodos.....	155
Resultados y Discusión	156
• Corrida del gel de las distintas BSA NP	156
5.2 Estudio del valor experimental del peso molecular y cantidad de moléculas de albúmina en la BSA NP.....	159
Materiales y Métodos.....	159
• Cálculo experimental de la densidad de la BSA NP	159
• Cálculo experimental del peso molecular de la BSA NP.....	160
• Cálculo experimental de la cantidad de albúminas en la BSA NP en base a microscopia.....	160
Resultados y Discusión	162
• Cálculo experimental de la densidad de la BSA NP	162
• Cálculo experimental del peso molecular de la BSA NP.....	163
• Cálculo experimental de la cantidad de albúminas en la BSA NP en base a microscopías de fuerza atómica.....	163
Materiales y Métodos.....	166
Resultados y Discusión	167
5.4 Reformulación de la hipótesis sobre la estructura de la BSA NP.....	170
Conclusión	174
PARTE II: Ensayos Toxicológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	176
Capítulo 6: Toxicidad <i>in vitro</i> de la nanopartícula de albúmina	177
Introducción	177
6.1 Citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas MCF-7 y PC-3.....	179
Materiales y Métodos.....	179

• Mantenimiento de las líneas tumorales a usar	179
• Medida de metabolismo celular por MTT	179
• Medida indirecta de la ruptura de la membrana mitocondrial por LDH	179
• Medida de vida o muerte celular por Cristal Violeta	180
Resultados y Discusión.....	181
• Ensayos citotóxicos en MCF-7.....	181
• Ensayos citotóxicos en PC-3	183
6.2 Actividad hemolítica de la nanopartícula de albúmina ex vivo en glóbulos rojos humanos.....	186
Materiales y Métodos	186
• Actividad Hemolítica	186
Resultados y Discusión.....	187
• Actividad Hemolítica	187
Conclusión	189
Capítulo 7: <i>Toxicidad in vivo de la nanopartícula de albúmina en modelo Zebrafish</i> (D. rerio)	190
Introducción.....	190
Materiales y Métodos	192
• Mantenimiento de los peces Zebrafish.....	192
• Incubación de las muestras	192
• Medidas de actividad locomotora.....	193
• Estudio sobre la viabilidad	193
• Estudio sobre la morfología de la larva	193
• Estudio sobre la cardiotoxicidad.....	194
Resultados y Discusión.....	195
• Medidas de actividad locomotora.....	195
• Estudio sobre la viabilidad y cardiotoxicidad	197
• Estudio sobre la morfología de la larva	197
Conclusión	200
Capítulo 8: <i>Embriotoxicidad in vivo de la nanopartícula de albúmina en modelo Zebrafish</i> (D. rerio).....	201
Introducción	201
Materiales y Métodos	202
• Mantenimiento de los peces Zebrafish.....	202
• Incubación de los embriones	202
• Estudio de eclosión y mortalidad.....	202
Resultados y Discusión.....	204
Conclusión	206

Capítulo 9: <i>Inmunotoxicidad de la nanopartícula de albúmina en células.</i>	207
Introducción	207
Materiales y Métodos.....	210
• Ensayo en células macrófagas murinas RAW BLUE (RB)	210
• Ensayo de expresión de NFκB	210
• Ensayo de actividad metabólica celular (MTT)	210
• Ensayo de expresión de IL-6 e TNF - α.....	210
• Ensayo en células humanas HEK - 293	211
Transfección	211
Estimulación y medición	212
Resultados y Discusión	213
Conclusión.....	217
Resumen de Resultados	218
Conclusiones Generales	220
Perspectivas a futuro.....	222
AGRADECIMIENTOS	223
Bibliografía General.....	225

i. Congresos y Encuentros Científicos

En esta tesis se encuentran trabajos presentados en los siguientes congresos y encuentros científicos:

2017 IV Nano Córdoba 2017

19 – 20 de Mayo

NANOPARTÍCULA DE ALBÚMINA: OBTENCIÓN NOVEDOSA MEDIANTE IRRADIACIÓN GAMMA, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIDAD. **Macarena Siri**, Malvina Pizzuto, Jean-Marie Ruysschaert, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. ISBN 978-987-688-212-5. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina

International Conference on Applications of Radiation Science and Technology (ICARST-2017)

24 – 28 de Mayo

PROTEIN-BASED NANOPARTICLES PREPARED BY RADIATION-INDUCED CROSS-LINKING. Estefanía Achilli, Constanza Flores, **Macarena Siri**, Silvia del V. Alonso, Mariano Grasselli. Viena, Austria

19th IUPAB congress and 11th EBSA congress

16 – 20 de Julio

Albumin – based γ irradiated nanoparticle with potential for drug delivery systems: Characterisation, Stability and Binding efficiency. **Macarena Siri**, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. Edimburgo, Escocia, Reino Unido

2016 Conferencia Nano 2016

9 – 13 de Mayo

Evidencias experimentales de ensamble molecular de una nanopartícula de albumina. **Macarena Siri**, Estefanía Achilli, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. Buenos Aires, Argentina.

12th International Congress of Cell Biology 2016

21 – 25 de Julio

An Albumin - based Nanoparticles Bound to Anti – tumoral Drug: Effect on Cell Toxicity and Immune Response. **Macarena Siri**, Malvina Pizzuto, Jean – Marie Ruysschaert, Silvia del V. Alonso. Praga, República Checa

III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS) – IX IberoAmerican Congress of Biophysics – XLV Reunion Anual SAB.

23 – 25 de Noviembre

About an albumin based nanoparticle: Structure, Decoration and Immune Activity, **Macarena Siri**, Malvina Pizzuto, Jean – Marie Ruysschaert, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

2015 LI Reunión SAIB 2015

3 – 6 de Noviembre

Cyto- and in vivo toxicity of a bovine albumin nanoparticle. **Macarena Siri**, Silvia del V. Alonso. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

XLIV Reunión Anual SAB 2015

4 – 6 de Noviembre

Interaction of cytotoxic photoproducts of Merocyanine 540 (pMC540) with Bovine Serum Albumin Nanoparticle (BNp). **Macarena Siri**, Nicolas Calzetta, Evelina Maranzana Silvia del V. Alonso. Santiago del Estero, Argentina.

VII Poslatam and Latin American Crosstalk in Biophysics and Physiology. SBF.uy-SAB 2015

22 – 28 de Noviembre

Trehalose lyophilisation stress-down of an albumin based nanoparticle to preserve structure/function, **Macarena Siri**, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. Salto, Uruguay.

2014 *XXIX Reunion Anual de FeSBE*

27 – 30 de Agosto

PROTEIN ALBUMIN NANOPARTICLE: characterization and biotoxicity, **Macarena Siri**, Jimena Prieto, Gabriela Torchio, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. Mina Gerais, Brasil

Drugs and nanocompounds toxicity screening in zebrafish model. Prieto M.J., Calienni M.N, Igartúa D., Feas D, Martínez C., **Siri M.**, Chiaramoni N., Alonso S.dV. Mina Gerais, Brasil

2014 International Biophysical Congress (IUPAB)

3 – 7 de Agosto

Protein nanoparticle bioconjugate: BSAⁿ-Emodin, structure-function and in vivo toxicity, **Macarena Siri**, Maria J. Prieto, Nadia S Chiaramoni, Mariano Grasselli, Silvia del V Alonso. Brisbane, Australia.

XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica

3-5 de Diciembre

Bovine Serum Albumin Nanoparticle (BNp): Structure/Function, **Macarena Siri**, Gabriela Torchio, Ramiro Llovera, Juan Francisco Delgado, Mariano Grasselli, Silvia Alonso. Sierra de la Ventana, Buenos Aires, Argentina

Liposomes and L-cysteine: A potential antioxidant therapy, Ramiro Perrotta, **Macarena Siri**, Nadia Chiaramoni, Silvia Alonso. Sierra de la ventana, Buenos Aires, Argentina.

2 Jornadas de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de CyT

13 – 15 de Octubre

Estudio de una nanopartícula de albumina como posible transporte de fármacos, **Macarena Siri**, Silvia del V. Alonso. Bernal, Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

2013 *57th Annual Meeting Biophysical Society*

2 – 6 de Febrero

Characterization of a Protein Nanoparticle, BSAⁿ and its Interaction With-Emodin, **Macarena Siri**, A. Lis Femia, Maria Julieta Fernandez Ruocco, Nadia S. Chiaramoni, Silvia L. Soto Espinoza, Gonzalo Casajus, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. Filadelfia, Pensilvania, EEUU. Biophysical Journal, Vol. 104, Issue 2, p673a– 674.

1 Jornadas de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de CyT

17 – 19 de Junio

Estudio de nanopartículas proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales, **Macarena Siri**, Nadia S. Chiaramoni, Mariano Grasselli, Silvia del V. Alonso. Bernal, Quilmes, Buenos Aires, Argentina. P6-5, página 78, ISBN 978-987-558-264-4

XXVIII Reuniao Annual da FeSBE

21 – 24 de Agosto

A BSA nanoparticle study for a new drug delivery system, **Macarena Siri**. Caxambu, Mina Gerais, Brasil.

XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica

2 – 4 de Diciembre

Lyophilized nanoparticle albumin-based carrier: manufacturing and application for

pulmonary route, **Macarena Siri**, María Julieta Fernández Ruocco, Valeria Risso, Nadia S. Chiaramoni, Mariano Grasselli, Silvia delV Alonso. Villa Carlos Paz, Cordoba. BBA4, pagina 2, ISBN 978-987-27591-2-4

ii. Publicaciones Científicas

Las siguientes publicaciones científicas contienen resultados de esta tesis:

Publicaciones en revistas científicas con referato	<i>Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish</i> C. Martinez; D. Igartua; N.Calienni; D. Feas; M. Siri; J. Martinetti Montanari; N. Chiaramoni; S. del V. Alonso; J. Prieto. Biophysical Reviews, Julio 2017
	<i>Albumin nanocarriers, γ - irradiated crosslinked, combined with therapeutic drugs for cancer therapy.</i> M.Siri, E. Achilli, M. Grasselli and S. del V. Alonso. Current Pharmaceutical Design, Junio 2017
	<i>Albumin-based nanoparticle trehalose lyophilisation stress-down to preserve structure/function</i> M.Siri, M. Grasselli, S. del V. Alonso. JPBA (2016) dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.04.037
	<i>Preparation of protein nanoparticle by dynamic aggregation and ionizing-induced crosslinking</i> E. Achilli, G. Casajus, M. Siri, C. Flores, S. Kadłubowski, S.del V. Alonso, M. Grasselli. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. (2015). 10.1016/j.colsurfa.2015.09.047
Reportes Técnicos	<i>Radio-synthesis of protein-gold nanoparticles for theranostics applications.</i> E. Achilli, M. Siri, C. Flores, S. del V. Alonso, M. Grasselli. Nanoscale Radiation Engineering of Advanced Materials for Potential Biomedical Applications. (2016); INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA: Anex I, Progress Report
	<i>Nanostructuring materials by ionizing radiation technology: Protein nanoparticle preparation and functionalization of track etched membranes.</i> M. Grasselli, S. Soto Espinoza, L.J. Martinez, G. Casajus, M. Siri, S. Alonso, E.E. Smolko. Nanoscale Radiation Engineering of Advanced Materials for Potential Biomedical Applications. (2015); INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA: ISBN 978–92–0–101815–1. ISSN 2225–8833 (IAEA RADIATION TECHNOLOGY REPORTS No. 5)
	<i>Radiation-induced nano-structuration of biological materials using ionizing radiation.</i> M. Siri, S. del V. Alonso and M. Grasselli. Nanosized Delivery of Radiopharmaceuticals (2014); IAEA Headquarters, Vienna, Austria

iii. Abreviaturas

Albúmina bovina sérica	BSA
Nanopartícula	NP
Nanopartícula de albúmina bovina sérica	BSA NP
Horas	h
Minutos	m
Día	d
Drogas antitumorales	DAT
Emodin	E
Merocianina 540	MC540
Ácido Fólico	AF
Isotiocianato de fluoresceína	FITC
Fenilalanina	Phe
Triptófano	Trp
Tirosina	Tyr
Buffer Fosfato Salino	PBS
Constante de disociación	Kd
Cantidad de droga máxima unida	Bmax
Días post fecundación	dpf
Horas post fecundación	hpf

iv. Resumen

Este trabajo tiene como objetivo caracterizar tanto biofísica, como bioquímicamente una nanopartícula de albumina bovina sérica (BSA) como un potencial vehículo para drogas anti - tumorales. Como potencial sistema de transporte de drogas medicinales se caracterizó la estructura/función y toxicidad de la BSA NP en dispersión acuosa.

Este trabajo de Tesis Doctoral se encuentra dividido en dos partes principales:

Parte I Caracterización Biofísica de la BSA NP¹:

Capítulo 1: Caracterización biofísica de la nanopartícula de albúmina

Capítulo 2: Estabilidad y liofilización de la nanopartícula de albúmina

Capítulo 3: Marcación de la BSA NP con ligandos funcionales: ácido fólico (AF) e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

Capítulo 4: Obtención de los bioconjugados BSA NP: drogas anti – tumorales (DAT)

Capítulo 5: Estudio del ensamblado y densidad de la nanopartícula de albúmina

Parte II Ensayos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*:

Capítulo 6: Toxicidad *in vitro* de la nanopartícula de albúmina

Capítulo 7: Toxicidad *in vivo* de la nanopartícula de albúmina en modelo Zebrafish (D. rerio)

Capítulo 8: Embriotoxicidad *in vivo* de la nanopartícula de albúmina en modelo Zebrafish (D. rerio)

Capítulo 9: Inmunotoxicidad de la nanopartícula de albúmina en células macrófagas murinas.²

¹ Se comparan siempre los datos obtenidos de la NP con la proteína a modo de diferenciar nuestro producto de su materia prima en lo referente a estructura y función.

² Colaboración realizada con el laboratorio del Dr. Jean – Marie Ruysschaert (Estructura y Función de Membranas Biológicas, Universidad Libre de Bruselas, Bélgica) Junio-Agosto 2016.

v. Introducción General

¿A qué llamamos nanopartículas?

A medida que la nanotecnología avanza, también lo hace la definición de los diferentes productos que derivan de esta área. El término general que engloba todos estos productos se denomina nanopartícula (NP). Se clasifican según el método de preparación en: nanocápsulas, nanoesferas o NPs. Las nanocápsulas responden a sistemas en donde la droga se encuentra encerrada por una única membrana de polímero. Nanoesfera es una matriz en donde la droga se encuentra dispersa de manera uniforme.

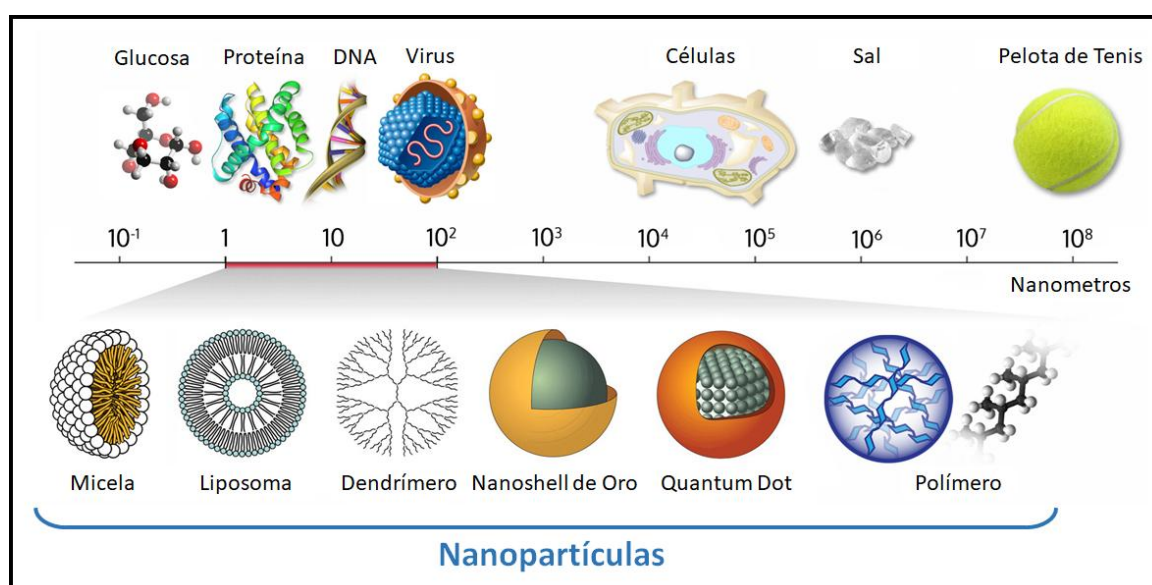


Ilustración 1. Escala de medidas, acentuando donde se sitúan las nanopartículas. Adaptado de WichLab.com

Si bien el término NP es el más utilizado, existen varias definiciones. La que tomaremos en este trabajo es aquella que se encuentra en la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (*The (US-) National Nanotechnology Initiative*). Se define NPs como dispersiones particuladas con un tamaño en el rango entre los 1-100 nm (Ilustración 1). En este rango de dimensiones las propiedades físicas, químicas y biológicas nuevas y diferentes a la de los componentes de base emergen permitiendo aplicaciones originales (Kreyling et al., 2010). En el campo de la medicina resultan de especial interés dado que, en base a su composición, pueden mantenerse en circulación por periodos largos dentro del organismo, soportar stress fisiológico o mejorar la estabilidad biológica de la droga (Mohanraj et al., 2006; Elzoghby et al., 2012).

¿Qué aplicación posible tienen las NPs?

Actualmente las NPs son utilizadas en una amplia gama de productos tales como productos cosméticos y de cuidado personal, parches médicos, pruebas de embarazo, pasta dental, suplementos dietarios, ropa, productos electrónicos y para deporte, entre otros (Ferreira et al., 2013). De acuerdo al producto comercial que contenga a las NPs, será el diseño, tipo y composición de las mismas.

Las NPs pueden ser de tipo: polimérica, lípido-sólido, cerámica, magnética, polimicelar, conjugada del tipo droga-polímero, nanotubo, nanocable, nanocaja, dendrímeros, entre otros (Mohanraj et al., 2006).

Desde que se comenzó a utilizar esta tecnología, se pueden advertir diferentes generaciones de las NPs;

- De 1º generación (2001): llamadas nanoestructuras pasivas (metales nanoestructurados, polímeros, recubrimientos nanoestructurados, etc).
- De 2º generación (2007): nanoestructuras activas (transistores, amplificadores, adaptadores estructurados, sensores, ensayos de diagnóstico, etc).
- De 3º generación (2013): 3-D nanosistemas y sistemas en base a nanosistemas (redes en nanoescala y nuevas arquitecturas, terapias nuevas/ transporte (*delivery*) de la droga marcada para especificidad, etc.).
- De 4º generación (2015): nanosistemas moleculares (equipos moleculares, diseño atómico, etc.) (Ferreira et al., 2013).

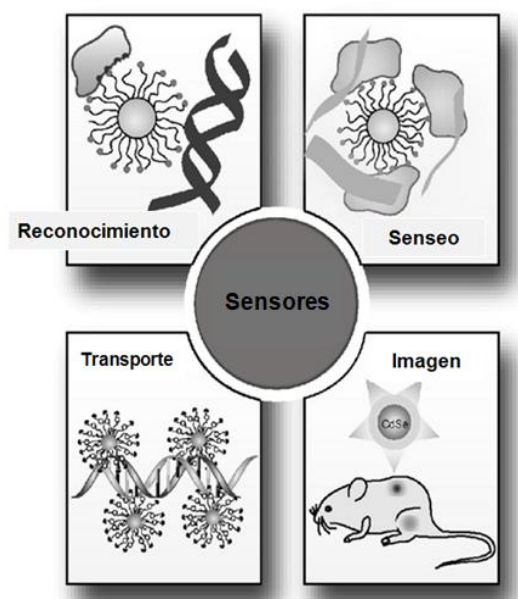


Ilustración 2 Aplicaciones de las NPs en los diferentes campos de la nanobiotecnología. Adaptado de De Jong et al., 2008; Applications of Nanoparticles in Biology.

Este trabajo apunta específicamente a las NPs aplicables al campo biomédico. Algunos de sus usos más frecuentes son: marcadores biológicos fluorescentes, transporte de droga y genes, biodetección de patógenos, detección proteica, sonda para DNA, destrucción térmica de un tumor, separación y modificación de moléculas biológicas y células, etc. (Salata et al., 2004).

Especialmente, el sistema de transporte de fármacos mediante NPs ha cobrado una gran importancia en la industria farmacéutica y médica ya que su principal función es la de proteger a la droga de degradación inespecífica, aumentar la absorción de la misma, mejorar el perfil de distribución en el tejido y farmacocinética, así como también mejorar la penetración intracelular (Elzoghby et al., 2012) (Ilustración 2). Es en la matriz de las NPs que la droga se encuentra disuelta, atrapada, encapsulada o adsorbida (Mohanraj et al., 2006). Este tipo de NPs generalmente cuentan con un centro compuesto por un material inorgánico o polimérico que puede ser utilizado para ensamblar moléculas tanto internamente o en su superficie.

¿Cuáles son las instancias que se deben cumplir para diseñar NPs eficientes?

Para diseñar NPs con aplicación en el campo médico se debe pasar por diferentes etapas que abarcan desde su diseño hasta su utilización en ensayos pre-clínicos (Ilustración 3). En primera instancia, se debe prestar especial atención a características tales como su tamaño y propiedades superficiales. Propiedades que definen el perfil farmacológico cinético de las NPs (Salata et al., 2004). Es por esto que el material de composición es crucial en el diseño. Este dependerá de:

- 1- el tamaño requerido;
- 2- las propiedades de la droga a utilizar;
- 3- la carga y permeabilidad necesaria;
- 4- grado de biocompatibilidad, toxicidad y biodegradabilidad;
- 5- perfil de liberación cinético deseado para la droga; y
- 6- antigenicidad (Mohanraj et al., 2006; Elzoghby et al., 2012).

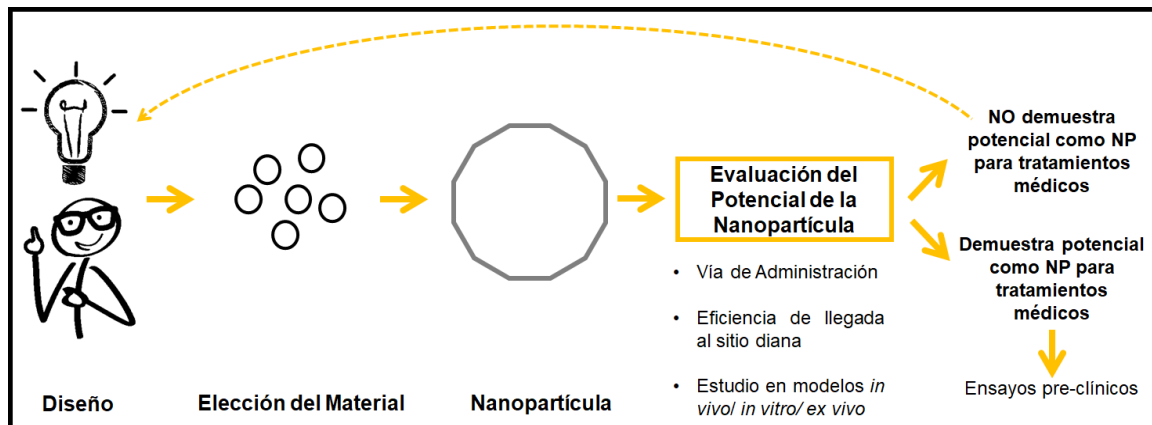


Ilustración 3. Diagrama describiendo las diferentes instancias en el proceso de obtención de una NP para su utilización en medicina.

Además que las NPs sean aprobadas para uso médico, el material elegido debe también cumplir con los siguientes requisitos:

- 7- Tener una respuesta inmune relativamente baja
- 8- Llegar e internalizarse en el tejido diana
- 9- En caso de utilizarse en terapias antitumorales deben poder sufrir un proceso de difusión y extravasación dentro del tumor de manera efectiva
- 10- Presentar un método de obtención reproducible

El material de elección permitirá a su vez la posibilidad de aumentar la especificidad de las NPs con la sola unión de un ligando a su superficie o, utilizando partículas magnéticas como guías; una manera de modificar el sistema para adaptarlo a la vía de administración deseada; ya sea oral, nasal, parental, intra-ocular, intra-venosa, etc (Mohanraj et al., 2006).

Las rutas de administración también han sido un punto de evaluación importante al momento de diseñar NPs, ya que son diseñadas dependiendo del objetivo terapéutico propuesto. Por ejemplo, las NPs utilizadas en la captación de imágenes son generalmente administradas de manera oral, mientras que las utilizadas en tratamientos anticancerígenos son de administración sistémica. Estas últimas son las que mayor

interés reciben debido a la mejoría en los tratamientos que ofrecen (Wilhem et al., 2016).

Direccionalizar las NPs hacia el sitio diana es una tarea difícil. Si la eficiencia con la que llega al sitio es relativamente baja, entonces las características de estas deben modificarse para superar las barreras impuestas y así lograr una mayor llegada de las NPs al sitio de tratamiento. El término “eficiencia” en este caso está delimitado por la cantidad de NPs que llegan al sitio diana y depende del material del cual están compuestas las NPs, su tamaño, carga, y estructura (Siri et al., 2017).

Otra de las principales instancias de evaluación de las NPs es el de la elección del modelo de estudio, ya sea, línea celular, animal o tumoral. Como es sabido, todo modelo presenta limitaciones, por lo que es necesario proponer y caracterizar diferentes NPs, y para ello se necesita hacer uso de más de un modelo. Principalmente se utilizan dos modelos: *in vitro* e *in vivo*, con la ocasional adición del estudio *ex vivo*.

El primer paso para poder comprobar el potencial de un modelo novedoso como transportador de drogas es estudiar su eficiencia en un modelo *in vitro* (cultivo celular). Si bien este modelo puede presentar un panorama acerca del comportamiento de la NP en un ambiente tumoral, las limitaciones yacen en que no se está estudiando el sistema (NPs y células) teniendo en cuenta el ambiente fisiológico real que rodea al tejido tumoral (*in vivo*).

El modelo *in vivo* por su parte ofrece un panorama más realista en cuanto al efecto que puede llegar a generar las NPs en un organismo complejo. Sin embargo, la desventaja principal de éste es que ningún modelo animal va a poder simular en su totalidad el ambiente fisiológico el organismo humano en determinada enfermedad o tratamiento a estudiar. Asimismo, la concentración de NPs utilizada para determinado modelo animal resulta difícil extrapolar al uso terapéutico humano. Por ejemplo, si la eficiencia del efecto de las NPs llegara a ser relativamente baja en el humano, entonces se requerirá administrar una concentración mayor de NPs o un volumen mayor de la dispersión, sin saber las consecuencias que éste cambio producirá y su posible efecto secundario (Wilhem et al., 2016).

Shi et al., 2017, discuten en profundidad las limitaciones encontradas en cada instancia del estudio de una nueva nanotecnología. Plantean como una posible dispersión para los obstáculos encontrados en los estudios *in vitro*, sistemas biomiméticos para así poder entender los efectos del flujo intersticial, unión entre células, acumulación y difusión de las NPs. Los sistemas biomiméticos son aquellos que toman características de la

naturaleza y los adaptan a sus sistemas modelo con el fin de resolver la problemática a estudiar. Son de especial importancia en aquellas investigaciones que apuntan a mejorar el transporte de drogas (Venkatesh et al., 2005).

En cuanto a los estudios *in vivo*, presentan como posibles soluciones a los obstáculos encontrados, humanizar al modelo animal para así poder lograr un acercamiento más aproximado al ambiente fisiológico humano. Esto último hace referencia al desarrollo de modelos animal que pueda mimetizar la heterogeneidad e histología anatómica humana de tumores. Un ejemplo son los ratones repoblados con células hematopoyéticas humanas para el estudio de la hematopoyesis y la función inmune *in vivo* (Rongvaux et al., 2014). Independientemente de cada limitación encontrada, es siempre aconsejable poder realizar ambos estudios al momento de caracterizar un nuevo sistema para ser utilizado como transporte de drogas en tratamientos médicos.

El estudio *ex vivo* hace referencia a procedimientos experimentales realizados en tejidos de un organismo vivo en un ambiente externo a este pero con las condiciones fisiológicas mínimamente alteradas. Este modelo de estudio permite el estudio de un nanosistema nuevo en condiciones más controladas que en un modelo *in vivo*, sin riesgo de estar en desacuerdo con la ética establecida, y con una alteración mínima de las condiciones naturales. Sin embargo, no todos los órganos o sistemas celulares admiten el uso de dicho modelo. Por ejemplo, los modelos *ex vivo* tienen limitación en ciertas condiciones para el estudio de daño hepático (Ong et al., 2013).

En este trabajo se estudió el potencial de una nueva nanotecnología para su aplicación en el campo de la medicina, haciendo uso de ambos modelos. En una primera instancia se utilizaron líneas tumorales inmortalizadas en diferentes ensayos (modelo *in vitro*), para luego poder pasar a la siguiente etapa de evaluación en un modelo animal (modelo *in vivo*). Ambas instancias se complementaron para poder obtener un panorama más detallado sobre el potencial del nanosistema estudiado.

¿Cuáles son los materiales más utilizados para obtener NPs?

Dentro de los materiales que pueden ser usados para la obtención de NPs se encuentran los polisacáridos, proteínas y sistemas poliméricos que dan lugar a NPs poliméricas (Mohanraj et al., 2006). El uso de NPs poliméricas para sistemas de transporte de drogas han demostrado en el transcurso de años recientes un gran potencial terapéutico. Dentro de este gran grupo, las de base en polímeros naturales hidrofílicos, son las más eficientes para encapsular drogas, teniendo mejor

biocompatibilidad y menor afinidad por el sistema reticuloendotelial (RES) (Elzoghby et al., 2012).

Para aquellos que utilizan sistemas de transporte de drogas, las NPs obtenidas a partir de proteínas son una opción porque éstas aportan biocompatibilidad, biodegradabilidad, no son antigénicas y son fáciles de preparar. Además presentan mayor estabilidad durante un almacenamiento de largo tiempo (Yedomon et al., 2013; Elzoghby et al., 2012).

¿Cuáles son las NPs aprobadas para su uso en tratamientos médicos?

A través de los años se han aprobado diversos nanosistemas como transportadores de drogas: liposomas, NPs orgánicas e inorgánicas. De éstas, una pequeña porción responden a nanovehículos utilizados en tratamientos antitumorales que cuentan con la aprobación de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés). Estos incluyen dos conjugados polímeros-proteínas, cinco formulaciones liposomales y una NP polimérica (Danielson et al., 2004). Cabe destacar que para poder recibir la aprobación de la FDA es necesario que el nanosistema a utilizarse en un tratamiento antitumoral cuente con una toxicidad reducida, acumulación dentro del ambiente tumoral, un efecto de permeación y retención aumentado, lo cual llevaría a una gran eficiencia aumentada con respecto al tratamiento sin transportador. Ejemplos de NPs aprobadas con diversos usos terapéuticos son las NPs que cuentan con hierro IV. Estas son coloides de NP con hidróxido de hierro en su centro que asegura una liberación controlada del hierro. De este tipo de NPs las CosmoFer/INFeD/Ferrisat, DexFerrum/DexIron y Ferrlecit son algunas de las que actualmente se encuentran en el mercado (Krishnamurthy et al., 2015)

Por otro lado, los primeros nanosistemas utilizados en terapias antitumorales fueron los liposomas. Estas NPs eran de un tamaño menor a los 100 nm y consistían de varias capas bilipídicas conteniendo drogas hidrofóbicas en su interior y un centro acuoso con drogas hidrofílicas. Algunos de los liposomas utilizados en la industria farmacéutica hoy en día son nombrados en la Tabla 1. Los principales ejemplos de las formulaciones clínicamente aprobadas son Doxil y Myocet (Ma et al., 2013). Otros ejemplos son Adagen, Genexol PM, Eligard y Copaxone.

El Paclitaxel es un agente quimioterapéutico de gran eficiencia, por lo que es comúnmente elegido para poder encapsular a nuevos sistemas para poder reducir sus efectos secundarios y aumentar su potencial.

Tabla 1 Nanosistemas aprobados para tratamientos médicos

Polímero	Lípido	Uso & Droga a conjugar	Modelo Tumoral	Referencias
PLGA	Lecitina, DSPE-PEG	NPs óxido de hierro, Camptotecina	Tumor mamario (células MT2)	Shah et al., 2009
PLGA	DPPC, DSPE-PEG	Nanocristales de oro y paclitaxel en su centro; sora fenib y Cy7 NIR en lípidos	Cancer de colon (células LS174 T)	Green et al., 2006
PLGA	Lecitina, DSPE-PEG	Doxorubicina, Indocianina-verde NIR	Células BCC	Zhang et al., 1996
PLGA	Lecitina de Soja	Nanocristales de oro, quantum dots	N/A	Jin et al., 2008
BSA	PEG	Paclitaxel	Tumor mamario	Desai et al., 2006; Trieu et al., 2006
PLGA	DSPE-PEG	Doxorubicina, combretastatina A4	Células B16F10 y células de Lewis)	Sengupta et al., 2005
HPESO	Tristearina-estearico	Doxorubicina, Elacridar (GG918)	Células MDA435/LCC6/MDR1 y células EMT6/WT	Wong et al., 2007; Prasad et al., 2013
HPESO	Ácido mirístico	Doxorubicina, mitomicina C	MDA-Células MB 435/ LCC6/MDR1	Wong et al., 2006
PLGA	Lecitina de Soja, DSPE-PEG.	2'-Deoxy-5-azacytidina(DAC), doxorubicina	Tumor mamario, (células MDA-MB-231)	Su et al., 2013
PLA-PEG-PLA	PC, colesterol, DSPE-PEG	TGF- β receptor-I inhibidor (SB505124), IL-2	Melanoma (células B16-F10)	Park et al., 2012
PLGA	DSPE-PEG	Doxorubicina, combretastatina A4	Melanoma y carcinoma pulmonar de Lewis (células B16F10y células de Lewis)	Aravind et al., 2012
PLGA	Lecitina, DSPE-PEG	Paclitaxel, AS1411 antinucleolina	Tumor mamario (Células MCF-7)	Bode et al., 2009

Una de sus características más atractivas es el aumento de su solubilidad en agua al conjugarse con polímeros acuosolubles o en sistemas liposomales. Las NPs que lo

contienen van desde varios nanómetros a micrómetros de diámetro. El amplio rango en el tamaño de la NP favorece el transporte de esta droga a través de los diferentes vasos del tumor con un efecto de permeabilidad y retención alta (EPR) (Jin et al., 2008). MediGene cuenta con unos liposomas catiónicos con Paclitaxel llamados Endo TAG-1 con gran potencial antitumoral. Este consiste en una mezcla de los lípidos metilsulfato de N-(1-(2,3-dioleoiloxi) propil)-N, N, Ntrimeti-amonio (DOTAP) and 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) que interaccionan negativamente con las células endoteliales de vasos sanguíneos tumorales (Langer et al., 2003). Algunas NPs poliméricas aprobadas para su uso terapéutico en medicina son descritas en la Tabla 2.

Tabla 2 NPs proteicas y poliméricas aprobadas o en estudio para su uso en tratamientos médicos según *Clinical Trials US* (2016)

Nombre	Nanoconstructo	Activos terapéuticos	Tratamiento	Status
Nab-paclitaxel (Abraxane™)	NP albúmina	Paclitaxel	Tumores mamarios, pulmonares y pancreáticos	Aprobada FDA
SMANCS	Conjugado polimérico	Neocarzinostatina	Tumores hepáticos y renales	Aprobado (Japón)
Nab-rapamicina (ABI-009)	NP albúmina	Rapamicina	PEComa y mTOR	Fase II
CRLX-101	NP polimérica	Camptotecina NSCLC	Metastasis de carcinoma renal y tumor ovárico o peritoneal	Fase II
BIND-014 PSMA-targeting	NP polimérica	Docetaxel	NSCLC and mCRPC	Fase II
SNS01-T	NP Poliethilenimina	siRNA anti eIF5A y eIF5A-K50R	Células B malignas refractarias o recurrentes	Fase I/II
CALAA-01 TfR-targeting	NP polimérica	siRNA anti ribonucleotidos M2 reductasa	Tumores sólidos	Phase I

¿Cuáles son las características de las NPs de albúmina?

Las principales ventajas de utilizar NPs de proteína es la de brindar protección al fármaco de degradación inespecífica, así como también aumentar la farmacocinética y distribución dentro del tejido. Las NPs hechas a base de proteínas son maleables a la hora de definir su tamaño, el cual puede variar entre los 50 – 300 nm de diámetro. Esto ofrece gran estabilidad en el caso de las dispersiones coloidales. Entre todas las proteínas posibles y debido a su gran variedad de aplicaciones en la industria, la albúmina es la proteína más utilizada para diseñar NPs (Rahimnejad et al., 2012).

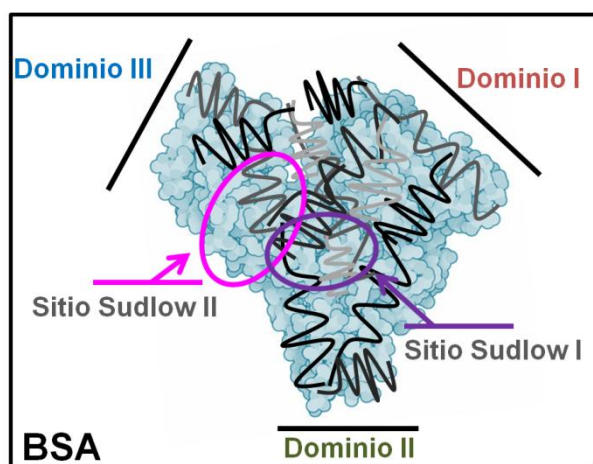


Ilustración 4 Proteína de Albumina Bovina Sérica (BSA) con las características más llamativas resaltadas.

La albúmina sérica es una proteína que fue descrita por primera vez en 1839, por Ancell, como el principal componente de la sangre (50 mg/ml). Contribuye al coloide osmótico de la presión sanguínea en un 80 %, y principalmente mantiene el pH de este tejido (Figge et al 1991). Los mamíferos la sintetizan en el hígado (Peters y Anfisen 1977). La vida media de esta proteína en sangre es de 29 días (Waldmann 1977) (Ilustración 4).

La albúmina bovina sérica (BSA) está formada por tres dominios; I, II, III. Cada uno de ellos está conformado por dos subdominios (A y B) (Ilustración 4). La BSA posee dos bolsillos principales de interacción con sustancias. Estos bolsillos reciben el nombre de Sitios Sudlow I y II, ubicados en el Dominio II y III respectivamente. Además, posee entre un 54-67% de estructura α -hélices unidas por puentes disulfuros (Sevilla et al, 2007; Banerjee et al., 2012). Estos son 17 puentes disulfuros, compuestos por 34 cisteínas. La cisteína que no participa de los puentes disulfuros es la cisteína 34. Esta está expuesta dejando un tiolato hacia la superficie. Cuenta, además, con aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) que permiten el estudio de esta proteína mediante métodos espectroscópicos. Entre ellos, los más importantes resultan ser los Trp y Tyr (Peters, 1995). La albúmina posee dos Trp, el Trp-134, se encuentra en una posición más superficial en el Dominio I. El otro Trp (Trp-212) se encuentra en un ambiente hidrofóbico en el bolsillo principal de interacción con sustancias, en el Sitio Sudlow I ubicado en el Dominio II (Banerjee et al., 2012) (Ilustración 1). El sitio Sudlow II posee únicamente Tyr. Dadas estas condiciones, se puede diferenciar la interacción con

sustancias de los diferentes bolsillos por medio de técnicas espectroscópicas como fluorescencia (Gelamo et al., 2002).

En 1921 se desarrolla el primer ensayo que permitió obtener y caracterizar a la albúmina. P.E. Howe, del Rockefeller Institute en Princeton, NJ, en 1921 precipitó la proteína con la ayuda de sulfato de sodio a 37 °C. En 1932, J. Race publicó la tolerancia inusual de la albúmina en condiciones acídicas (Peters et al., 2013). La proteína presenta gran afinidad con varias sustancias tales como metales, ácidos grasos, aminoácidos, hormonas y distintas drogas. Los complejos que estas sustancias forman con la albúmina se ven involucrados tanto en transporte como en procesos regulatorios (Sevilla et al., 2007). La gran cantidad de residuos ionizables le da a la BSA una carga neta alta (c.a. -20 mV a pH 7,0). Con 185 iones por molécula, a pH 7,0 la proteína es soluble. Además el dominio de aminoácidos ácidos por sobre los básicos, le da una carga neta con valores de -12 a -17. Al ser una proteína sintetizada por el hígado, la BSA es una proteína cuya composición es solo a base de aminoácidos, sin grupo prostético u otra adición (Peters, 1995). Su forma es elipsoide, contando con una relación axial 3.5:1 (Peters, 1995).

Esta proteína ha tenido diferentes usos en el campo de la nanotecnología. Ejemplos de ellos son: recubrir *nanoclusters* o NPs de diferentes metales tales como oro y plata u óxido de zinc (Chib et al., 2015; Zhang et al., 2016; Simonelli et al., 2015). También se utiliza en la búsqueda de mejoras médicas para aumentar el efecto de complejo con fármacos antitumorales (Anjomshoa et al., 2015; Shamsipur et al., 2015). Otros de los múltiples posible usos de la BSA resulta ser la optimización de procesos tales como la nanofiltración de elementos específicos (Nedzarek et al., 2015). En los últimos años se comenzó a explotar la proteína como materia prima para generar NPs de diferentes características. Una de las principales razones de esto se debe a que la albúmina es biodegradable, no-tóxica, su metabolización da lugar a la formación de metabolitos no tóxicos, es no-inmunogénica, de fácil purificación y soluble en agua, lo cual proporciona gran facilidad de administración. Además, debido a sus características como proteína debería facilitar el transporte de drogas. (Gallo et al., 1984; Wartlick et al., 2004; Elzoghby et al., 2012).

1. Aplicaciones de las NPs de albúmina en la industria farmacéutica

Un uso común de dichas NPs es la terapia anti-tumoral en conjunción con drogas como 5-Fluorouracilo, paclitaxel y doxorubicina. Esto se debe a la gran afinidad entre estas drogas y la proteína. La penetración de la albúmina a tejido canceroso, además, se genera de dos maneras: por transporte pasivo o activo (Yedomon et al., 2013). Una de

las principales NPs de albúmina, es la combinada con Paclitaxel llamada Abraxane™. Esta fue la segunda formulación disponible para pacientes: permite una minimización de la biodegradabilidad en el sitio tumoral y el uso de excipientes tóxicos. Se espera una tolerancia mayor a la droga de esta manera, ya que la concentración que se utiliza es menor. Esta NP fue aprobada en el 2005 por la FDA para combatir cáncer metastásico mamario. Siete años después, la FDA aprobó su uso para tratar células tumorales pulmonares de tumores grandes (NSCLC) (Green et al., 2006). Este sistema tiene un tamaño promedio cercano a los 130 nm.

II. Métodos de preparación de las NPs de albúmina

Estas NPs presentan una estrategia atractiva para encapsular droga, ya que dentro de su matriz se encuentran diversos sitios de interacción para que la sustancia pueda unirse a la proteína (Patil, 2003). Debido a la estructura primaria de la BSA, esta permite a su vez, la interacción electrostática con la sustancia sin la mediación de otro ligando (Elzoghby et al., 2012). Actualmente hay diferentes métodos para preparar las NPs de BSA. Los más comunes son aquellos de fácil preparación: coacervación, desolvatación controlada o formación de emulsiones (emulsificación).

- Coacervación: las NPs se obtienen a partir de un goteo continuo adicionando etanol a una dispersión acuosa de albúmina en pH ácido; 5.5. Esto es en agitación continua hasta que se alcanza una dispersión turbia, lo cual indica la pérdida de solubilidad de la albúmina (Langer et al., 2003). Este método no proporciona la estabilidad necesaria para asegurar que una vez cambiado el solvente a agua no se redisuelvan las NPs. Es por esto que luego se mejoró el método al usar como agente ligante entre las albúminas al glutaraldehído (Meziani et al., 2003) (Ilustración 5).
- Emulsificación: se usan dos métodos para obtener NPs por emulsificación; tratamiento térmico o químico. Se generan cuando se homogeniza una solución oleosa de albúmina mientras se estabiliza térmicamente a temperaturas entre 175 y 180 °C durante 10 m. Luego se enfría la muestra y se diluye con étil-éter para reducir la viscosidad para facilitar la separación por medio de centrifugación (Sundar et al., 2010). En el método químico, se emulsifica a la dispersión oleosa de albúmina a 25 °C con algún agente de *crosslinking* como es el formaldehído (Reis et al., 2006).

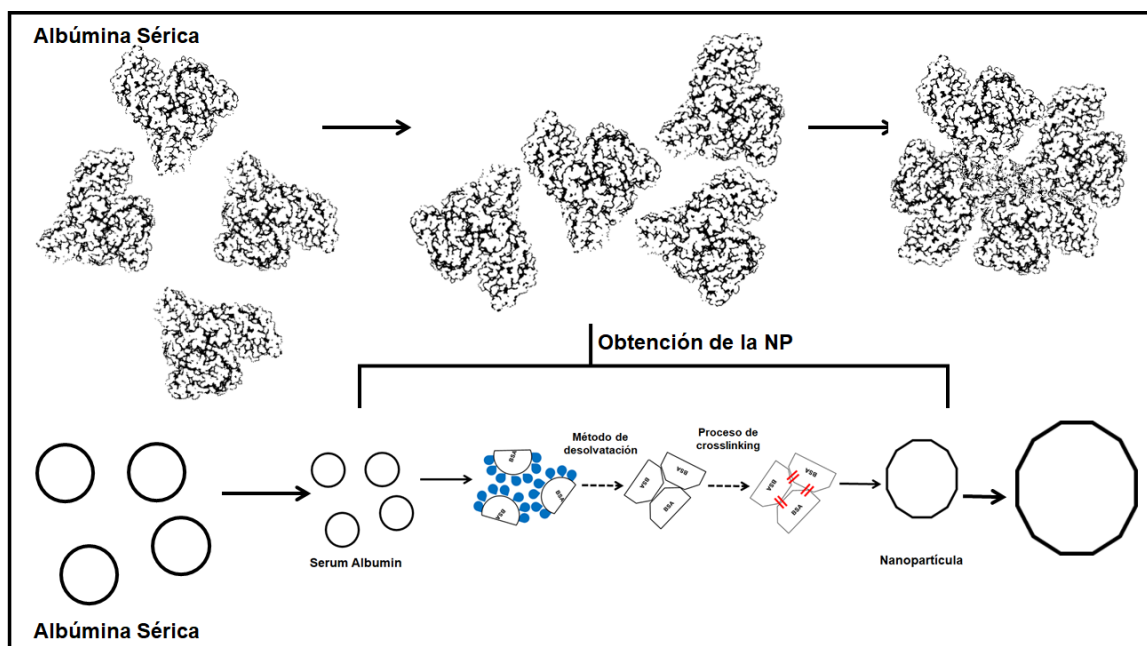


Ilustración 5. Método de coacervación para la obtención de NPs de albúmina combinado con la estabilización del agregado por un agente de *crosslinking*

Además de estas técnicas principales, se encuentran otros como son: gelatinización térmica, el cuál es un proceso secuencial que involucra desnaturalización por calor de la proteína seguido por interacciones de los distintos grupos funcionales de la proteína (Yu et al., 2006); y secado por *nanospray*, usado comúnmente en la industria farmacéutica (Elzoghby et al., 2012).

A fin de poder optimizar el rendimiento en cada paso se debe prestar especial atención a la concentración proteica a usar, el tiempo de emulsificación y potencia de agitación, y estabilización térmica para poder controlar el tamaño del agregado (Müller et al., 1996; Gallo et al., 1984). Todos estos métodos involucran desnaturalización total o parcial de la proteína como consecuencia de la presencia de aceites, surfactantes, gran concentración de alcohol y/o tratamiento térmico. Las desventajas de utilizar emulsificación como método de preparación es la necesidad de utilizar solventes orgánicos para la estabilización de la NP y su posterior extracción de la dispersión. Además, los tamaños obtenidos mediante estos métodos raramente se encuentra por debajo de los 500 nm de diámetro (Rahimnejad et al., 2012).

El proceso de desolvatación es el más común, trabajando en conjunto con una posterior estabilización química del agregado (del inglés *crosslinking*) (Ilustración 5). Las proteínas globulares son macromoléculas muy sensibles al microambiente, por lo que solventes polares orgánicos, etanol principalmente, son capaces de precipitar dichas proteínas sin que se pierda parte de su estructura tridimensional. Esta característica es

utilizada en la industria por su alto rendimiento en la purificación de proteínas (Cohn et al., 1947). El proceso de agregación de albúmina por etanol bajo concentraciones subprecipitantes es lo que comúnmente se utiliza para poder obtener las NPs (Ilustración 6).

Ejemplos de esta técnica son las NPs preparadas en acetona como agente de desolvatación, previa dilución en urea; NPs preparadas por desolvatación etanólica y estabilización con glutaraldehído como agente de *crosslinking* (Jun et al., 2011; Yedomon et al., 2011; Shankar et al., 2013). Algunos trabajos usan otros *crosslinkers* para poder disminuir la toxicidad agregada que aportan a la NP (Cui et al., 2016). Sin embargo, autores como Nguyen et al., 2013 eligen solamente el método de desolvatación etanólica continua o intermitente para preparar las NPs. Otros autores preparan estas NPs variando parámetros tales como la temperatura o el pH a lo largo del proceso. Galisteo-González et al., 2014 varían la temperatura y el pH durante el proceso de desolvatación etanólica antes del proceso de *crosslinking* con el glutaraldehído para la obtención de las NPs de albúmina (Ilustración 6).

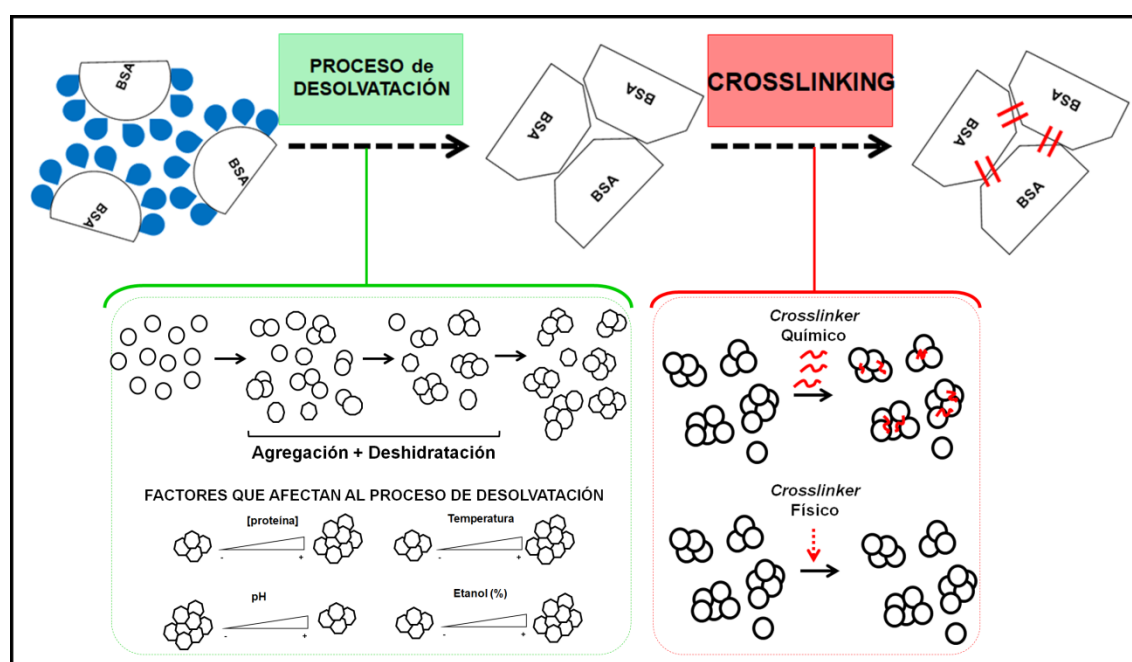


Ilustración 6. Proceso de la obtención de las NPs de albúmina en dos pasos: desolvatación y estabilización del agregado por medio de un agente *crosslinking*. Se muestran detalles dentro de cada uno de los pasos.

Soto Espinoza et al., 2012 propusieron una metodología alternativa para la preparación de la NP de albúmina sin un agente de *crosslinking* químico, evitando así la toxicidad agregada no deseada. Esta consiste en reemplazar el agente de *crosslinking* químico, por uno físico (Ilustración 6).

Esta nueva metodología para obtener NPs de albúmina yace en que partículas poliméricas pueden ser obtenidas mediante radiación ionizante. Dichas radiaciones actúan de agente *crosslinker* de manera intramolecular en una conformación *random coil*. Soto Espinoza et al., 2012 estudió este proceso para la albúmina, que siendo una proteína globular permite procesos de fragmentación y agregación bajo radiación gamma. Los autores probaron diferentes concentraciones de proteína (5 a 40 mg/ml) en una dispersión 40 % v/v de etanol. El tamaño deseado de NP de albúmina (BSA NP) (20 -40 nm), se logró con una concentración de 30 mg/ml luego de exponer a la muestra con radiación gamma. Además, establecieron que un mínimo de 5 kGys de irradiación era necesario para poder estabilizar el agregado de la albúmina luego del paso de desolvatación (Ilustración 7).

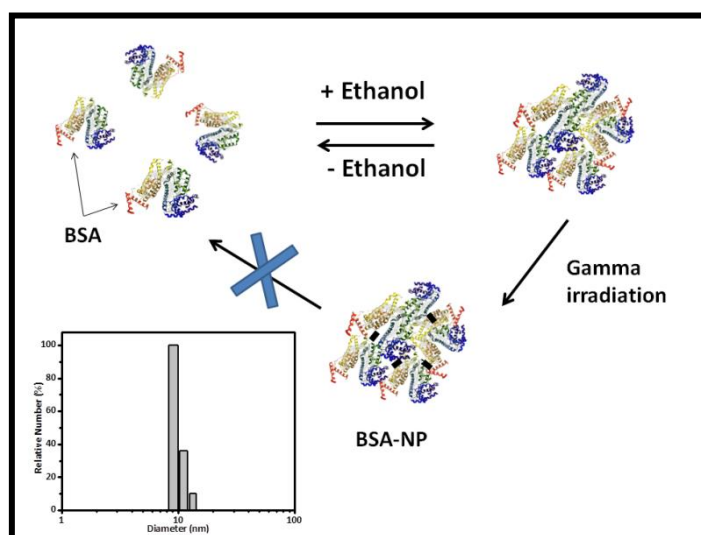


Ilustración 7 Esquema de la preparación de la NP mediante irradiación gamma, con los máximos resultantes entre 8 – 10 nm, figura de Achilli et al., 2015. Con permiso del autor.

En 2015 Achilli et al., lograron dar una explicación satisfactoria por la cual la radiación gamma lograba estabilizar al agregado proteico. La obtención de la BSA NP sucede en dos etapas. La primera etapa consta de la agregación de las moléculas de la proteína en agregados cuyo tamaño final varía de acuerdo a las diferentes concentraciones de etanol. Este primer paso, es una etapa reversible. Sin embargo, luego del proceso de irradiación la NP se estabiliza no pudiendo revertir el estado de la albúmina, obteniendo de esta manera la BSA NP. La irradiación gamma y la aceleración de electrones es un paso necesario e indispensable para estabilizar al agregado proteico etanólico sin que pierda entidad la proteína (Achilli et al., 2015).

La composición óptima para la formación de esta BSA NP fue levemente modificada irradiándose un agregado proteico en una dispersión alcohólica-acuosa 40 % v/v de etanol 96 % y con una concentración de 30 mg/ml inicial. En este trabajo de Tesis

doctoral se estudia la caracterización de esta BSA NP, definiéndolo como una entidad diferente de la albúmina que la compone y el potencial de esta nanotecnología como un transportador de drogas para posibles tratamientos médicos.

vi. Hipótesis de trabajo y objetivos

iv.a Hipótesis de trabajo:

Las NPs de albúmina sérica obtenida bajo irradiación gamma (BSA NP), presentan una estructura única diferente de la proteína.

- El método de preparación mantendrá en un mínimo los cambios conformacionales para que se preserve la función principal como transportador de droga.
- Las NPs serán biodegradables, por estar integrada por albúmina, por lo que generarán una mínima toxicidad en el modelo a usar.
- Las BSA NPs tendrán una estructura independiente; se comportarán como una entidad diferente de la albúmina.
- Las NPs tendrán mayor potencial de transporte de drogas que la proteína.

iv.b Objetivo del trabajo:

Una vez establecida la hipótesis de trabajo se plantea el objetivo principal, desdoblándose en objetivos específicos:

El objetivo general del trabajo es caracterizar estructural y funcionalmente la BSA NP como un sistema de transporte para drogas antitumorales (DAT), eficiente e inocuo para el organismo al que se le está inyectando. Esto implicaría la caracterización de un nuevo transportador con múltiple sitios de unión a DAT.

En base al objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtención y caracterización de la nanopartícula de BSA NP en dispersión acuosa.
- Estabilidad de las BSA NP en diferentes condiciones
- Decoración de la NP con ligando específico: Ácido Fólico e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)
- Obtención y caracterización de complejos de NP-DAT
- Evaluación de citotoxicidad, proliferación y apoptosis en diferentes líneas tumorales
- Evaluación de toxicidad en Zebrafish (*D. rerio*)
- Evaluación de la inmunocitotoxicidad de la BSA NP

“...Al oír esto, el Sombreroero abrió unos ojos como naranjas, pero lo único que dijo fue:

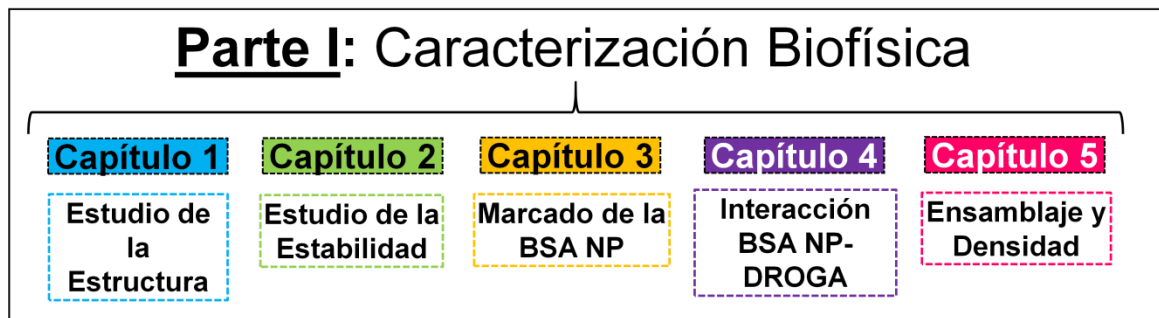
--¿En qué se parece un cuervo a un escritorio?...”

[Alicia en el País de las Maravillas, Lewis Carroll, Capítulo 7: Una Merienda de Locos, 1865.
Penguin Groups, Londres.]

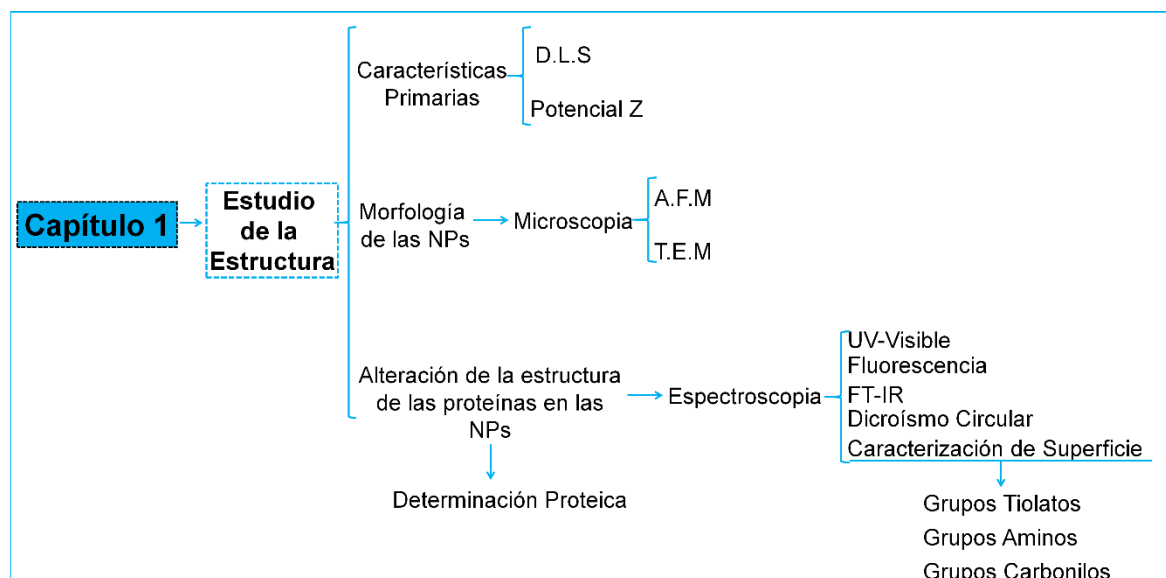
Parte I

Caracterización Biofísica

PARTE I: Caracterización Biofísica



Capítulo 1: Caracterización biofísica de la nanopartícula de albúmina



Introducción

Las NPs de proteínas se pueden obtener por medio de radiación ionizante a partir de una dispersión proteica de una mezcla agua/etanol. La presencia de NPs en una solución, luego de la irradiación, puede confirmarse por efecto Tyndall. Por definición el efecto Tyndall describe un fenómeno físico por el cual es posible la visualización de las partículas coloidales en una dispersión en gas. Dicho efecto se observa fácilmente al hacer atravesar una luz de láser por el recipiente irradiado. La presencia de NPs en la suspensión, será visible siguiendo el haz de un láser (Morcillo, 1981) (Ilustración 8).

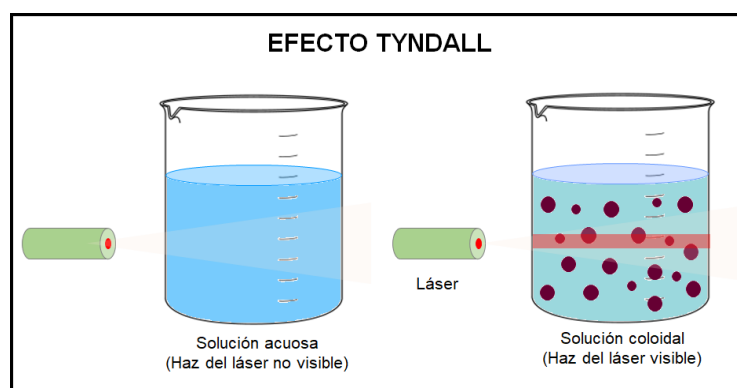


Ilustración 8. Esquema mostrando el efecto Tyndall producido por NPs de tamaño superior al haz de luz.

Este paso resulta entonces, el primero en la confirmación de la dispersión coloidal conteniendo NPs. Una vez confirmada la presencia de NPs por efecto Tyndall, se llevó a cabo el estudio de las características biofísicas de la BSA NP obtenida.

El estudio biofísico incluyó ensayos de espectroscópicos y microscópicos: *Dynamic Light Scattering* (D.L.S), Potencial Z, UV-Visible (UV-Vis), Fluorescencia, Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Se caracterizó además la superficie mediante ensayos colorimétricos que facilitaron la detección de grupos funcionales superficiales como son tioles (-SH), aminos (-NH) y carbonilos (-CO). En base a lo observado, se propuso una posible estructura de las NPs.

Dichas técnicas, se utilizan como métodos básicos en la caracterización y descripción de las proteínas. El tamaño y la carga de las NPs son parámetros muy importantes para determinar la función del sistema en estudio. Por este motivo es que son las primeras características que se estudiarán aquí.

El tamaño puede ser determinado con la técnica de dispersión de luz -*Dynamic Light Scattering* (D.L.S). Dicha técnica utiliza el movimiento Browniano intrínseco que posee la NP en un fluido como el agua, viendo cómo se dispersa la luz en base a este movimiento, la forma y superficie de la NP (Goldburg, 1999). Esta técnica es la más versátil y útil para medir la distribución de tamaño y, en algunos casos, la forma de las NP en solución. Las NPs generalmente arrojan poblaciones dispersas dado que de por sí, dichas partículas no presentan soluciones homogéneas, lo que hace que no tengan coeficientes translacionales homogéneos (Pecora, 2000).

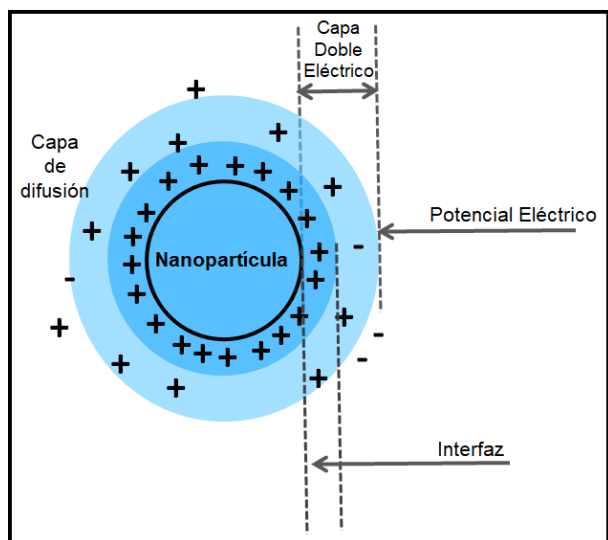


Ilustración 9. Ilustración del potencial Z en una dispersión coloidal de una NP cargada negativamente

Por lo tanto, siempre habrá en la interfaz un cúmulo de cargas dispuestas de manera ordenada generando un potencial. Este ordenamiento se lo denomina universalmente como potencial cero. Cuando los coloides se encuentran en dispersión un potencial es generado, el cual recibe el nombre de potencial de sedimentación. Debido al movimiento continuo de las partículas, la dispersión se encuentra con un flujo de cargas constantes. Esto generará un potencial Z en la muestra.

Dicho potencial estará dado por; (1) el potencial eléctrico; (2) la fuerza de difusión; y (3) el movimiento del *bulk* de carga debido al flujo del líquido (Hunter, 1981). La distribución

del potencial determina la interacción sinérgica entre las partículas y es en muchos casos la responsable de la estabilidad de ellas (Hunter, 1981) (Ilustración 9).

Otro paso fundamental en la caracterización de un nuevo sistema es la microscopía; técnica mediante la cual se obtiene una vista general de la estructura y forma de la NP. Dentro de las distintas clases de microscopía, se encuentra la microscopía electrónica. Esta se presenta como una posibilidad de estudiar muestras completas y en tres dimensiones. Es por ello que en este trabajo se utilizarán como herramientas de caracterización global la microscopía electrónica de transmisión (T.E.M.), de barrido (S.E.M.), y de fuerza atómica (A.F.M.).

Estructuralmente, la BSA cuenta dentro de su secuencia con 2 Trp y 21 Tyr como principales grupos aromáticos. Son estos los que permiten realizar ensayos del tipo espectroscópico a la proteína. Estos ensayos proporcionan simpleza, rapidez, sensibilidad y precisión para el análisis de distintas muestras. Su medición se basa en interacción de las moléculas con las radiaciones electromagnéticas. Por ello se utilizaron las técnicas espectroscópicas:

- UV – Vis: Las proteínas generalmente muestran absorbancia de máximos entre los 275 y 280 nm generados por los aminoácidos aromáticos Trp y Tyr principalmente, y en menor medida por los puentes disulfuros entre cisteínas (260 nm). La absorbancia de estos aminoácidos se ve comprometida por el ambiente que los rodea: los grupos expuestos al solvente tendrán un coeficiente de absorbancia diferente a los que se encuentran en la zona hidrofóbica de la proteína; así los aminoácidos aromáticos que están en el interior de la proteína sufren cambios al estar expuestos, lo que se refleja como cambios en la absorbancia (Schmid, 2001).
- Fluorescencia: Como la albúmina tiene un Trp en uno de los bolsillos interacción principal (Sudlow I), y una Tyr en el otro bolsillo (Sudlow II), permite el estudio mediante fluorescencia. Al encontrarse sus fluoróforos en los sitios de unión, simplifica el estudio no sólo de la interacción de la droga modelo con la NP, sino también, como el bolsillo de interacción cambia luego de formada la NP permite seguir los cambios de fluorescencia. Además, se pueden revelar datos moleculares de las proteínas tales como: exposición de los aminoácidos de las cadenas laterales de la proteína, y la existencia de conformeros, entre otros. Aún más importante, la fluorescencia es utilizada para poder advertir cambios en las propiedades del solvente, variaciones de pH y temperatura, uniones e

interacciones entre ligandos. Esto es, siempre y cuando, la molécula de estudio cuente con un grupo que emita fluorescencia (Eftnik et al., 1991).

- FT-IR: Las vibraciones moleculares captadas por FT-IR, son aquellas que corresponden al estiramiento, rotación, y torsión de los enlaces químicos. Estas corresponden principalmente a grupos como C-O, C=O, COOH, OH y SH. Particularmente en el caso de las proteínas, los grupos amidas en el enlace peptídico engloban las vibraciones características de éstas (Haris et al, 1999). Los espectros en estructuras proteicas, dejan ver las señales de las estructuras principales de estas moléculas: las Amidas I, II y III (responsables de las vibraciones del esqueleto de la proteína). Las dos primeras son las que cuentan con las señales más fuertes en el espectro que se obtiene (Kong et al., 2007). Estas señales dependen de la población de los diferentes tipos de estructuras secundarias (Grdadolnik, 2002).

Para caracterizar la superficie de la BSA NP, se eligieron los métodos colorimétricos de detección para tioles (-SH) (Winther et al., 2013); aminos (-NH₂) (Levine et al., 1994; Buss et al., 1997) y carbonilos (C=O) (Habeeb, 1965) superficiales. Las distintas reacciones aquí empleadas tienen su fundamento en que la unión de los grupos funcionales con cada uno de los reactivos con los que se los incubaba proporciona color en la muestra, permitiendo su medición por absorción de luz. Estimando la cantidad de grupos funcionales en superficie, se puede proponer la hipótesis de cómo es que las moléculas de albúmina están organizadas dentro de las NPs:

- Caracterización de los -SH en la superficie de la BSA NP

Para una detección cuantitativa de grupos -SH se utilizan métodos de formación de cromóforos o fluoróforos. El agente cromogénico clásico para este tipo de métodos es el 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) o reactivo de Ellman (Winther et al., 2013). El compuesto cuenta con una unión disulfúrica altamente oxidante. Este puente es reducido estequiométricamente por tioles libres en una reacción de intercambio. El resultado es una mezcla de disulfuros y la molécula 5-tio- ácido-2-nitrobenzoico (TNB) (Winther et al., 2013). El resultado es una muestra colorimétrica en donde se mide la absorbancia del TNB a 425 nm ($\epsilon = 12400 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Como la reacción es lineal, mediante la concentración de TNB, es posible obtener el número de tioles libres.

- Caracterización de los –NH en la superficie de la BSA NP

Mediante el compuesto ácido 2,4,6-Trinitrobenzenesulfónico (TNBS), se marcaron los grupos aminos expuestos en la superficie y luego se los bloqueó con SDS para poder medirlos espectroscópicamente. El TNBS es un compuesto de color amarillo, que reacciona únicamente con los grupos amino primarios de los aminoácidos de la proteína. La reacción colorimétrica permite el estudio cuantitativo y cualitativo entre ellos (Nitecki et al., 1966). La reacción da un derivado trinitrofenil (TNP), que es la molécula que tiene color (Habeeb, 1965).

- Caracterización de los –CO en la superficie de la BSA NP

Al irradiar las NPs para su obtención, estas pueden ser oxidadas debido al medio en el cual se encuentran. El volumen de etanol más el efecto de la irradiación gamma en el ambiente acuoso, pueden afectar la estructura de la proteína. Por ende, es posible encontrar gran cantidad de grupos carbonilos en la superficie de las BSA NPs.

La oxidación de las proteínas se puede dar de diversas maneras (Levine et al., 1994):

- Modificaciones primarias: oxidaciones catalizada por metales, mediadas por irradiación y por ozono u óxidos de nitrógeno.
- Modificaciones secundarias: la oxidación se da por moléculas generadas por oxidación de otras moléculas

Los grupos carbonilos pueden introducirse en cualquiera de estas reacciones. Es la presencia de estos grupos que dan evidencia de que la molécula está oxidada (Levine et al., 1994). La 2,4-dinitrofenilhidracina (DNP) es un compuesto orgánico, que puede usarse para detectar los grupos carbonilo de cetonas y aldehídos.

Los ensayos de cuantificación proteica de una muestra también resultan útiles para describir el estado de la estructura de las moléculas de albúmina una vez formadas las NPs. Existen varios ensayos para cuantificar las proteínas, cada uno actúa para tal fin en zonas diferentes. En éste trabajo se utilizaron dos métodos de cuantificación para poder luego dar una hipótesis describiendo la estructura de las NPs:

- Cuantificación por ácido bicinconínico: Este método es un reactivo cromogénico específico para convertir Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas. La reacción que se lleva a cabo es conocida como la reacción de Biuret e involucra cuatro

aminoácidos: cisteína, cistina, tirosina y triptófano al igual que la cadena peptídica (Noble et al., 2009).

- Cuantificación por Bradford: Este método se basa en una reacción entre el colorante Coomassie G-250 y la proteína, específicamente a los residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina (Noble et al., 2009).

Se relacionó la absorbancia de las NPs obtenida en cada caso con la exposición de los grupos que cada reacción involucra. De acuerdo a lo obtenido en estos ensayos y los otros realizados se describió una posible estructura de las BSA NPs, a la cual se le estimó un volumen, peso molecular y un total de moléculas de albúmina por cada NP.

1.1 Caracterización de la nanopartícula de albúmina

Materiales y Métodos

En todos los casos se utilizaron de soluciones de BSA y BSA NP 450 μ M y 555 nM respectivamente. Dichas muestras ya se encontraban en una dispersión acuosa PBS 30 mM, pH 7,0. La concentración de BSA NP en las dispersiones se estimó a partir de datos experimentales obtenidos en esta primera parte del trabajo que permitieron calcular el peso molecular de la NP.

La BSA 98% (electroforesis en gel de agarosa) en polvo, liofilizada 7,1% en 0,15 M NaCl se compró en Sigma-Aldrich, Co, St. Louis, USA. El buffer utilizado (PBS pH 7,0, 30mM) fue de grado analítico. El etanol (grado de pureza HPLC) corresponde a Sintorgan, SA, Buenos Aires, Argentina.

- *D.L.S y Potencial Z*

Se midieron 1ml de muestras de soluciones stock de BSA NP en una dilución final 1 en 10 en un analizador de tamaño de partículas y analizador de carga 90 Plus/Bi-MAS, cuya fuente de luz es de 632.8 nm con láser. Las muestras se midieron a 25 °C en una autocorrelación de 90 grados del ángulo de dispersión. Las medidas tomadas son el promedio de 5 corridas con un índice de refracción 1,45. El ensayo se realizó por triplicado en cada caso.

- *UV-Visible*

Se realizaron diluciones 1/10 de BSA y BSA NP en PBS 30 mM pH 7,0. Se midió la absorbancia en UV-Vis de cada muestra en un 1000-Nanodrop ThermoScientific entre 230- 500 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

- *Fluorescencia*

Se diluyeron las concentraciones stock de BSA y BSA NP hasta llegar a una concentración final de 15 μ M y 18,5 nM respectivamente. Se midió la emisión de fluorescencia de cada muestra en un fluorómetro SCINCO S2, donde la longitud de onda de excitación (λ_{ex}) fue de 295 nm y la emisión (λ_{em}) de 337 nm. El espectro de emisión fluorescente se midió entre 290 – 400 nm. Las rendijas del fluorómetro contaron con una apertura de 2,5 nm, en donde la corrida fue llevada a cabo a 60 nm/min. Se realizó el ensayo por triplicado.

- *FT-IR*

El equipo a utilizar fue ATR – Affinity Shimadzu. Los espectros son un promedio de 120 escaneos con una redispersión de 1 cm^{-1} . Las soluciones de BSA y BSA NP fueron diluidas hasta llegar a una concentración final de 45 μ M y 55 nM respectivamente. Para

el ensayo de espectroscopia FT-IR Infrarroja, 500 µl de cada muestra fueron secados en un cristal de ZnSe con una inclinación de 45 grados. Los resultados se analizaron con el software IRSolution. Los gráficos se realizaron y analizaron con el software GraphPad Prism 5.0 v.

- *Dicroísmo Circular*

Se utilizó un espectropolarímetro Jasco 810. Las muestras fueron medidas a temperatura ambiente en el CD – cercano (240 – 400 nm), en concentraciones BSA 15 µM y BSA NP 555 nM, y CD – lejano (180 – 280 nm), en concentraciones BSA 1 µM y BSA NP 37 nM. Las medidas contaron con una redispersión de 0.1 nm, promedio de 5 espectros consecutivos. Los gráficos se realizaron y analizaron con el software GraphPad Prism 5.0 v.

- *Caracterización de superficie: Tiolatos, Aminos y Carbonilos*

Marcación de grupos Tiolatos:

Para la detección de tioles libres se prepararon buffers PBS pH 6,0 y 8,0, ambos 1 M, y una dispersión de 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, también llamado Reactivo de Ellman) 3,9 mg/ml en PBS 0,1 M. Se realizaron diluciones 1/10 de BSA y BSA NP.

Determinación del contenido de Tioles libres: Se realizó un barrido en el espectro UV-Vis de la BSA NP sin tratar para medir su absorbancia a 425 nm. Luego se agregó 5 µl de DTNB a cada muestra y se lo mezcló por inversión, se incubó entre 5 y 15 m para obtener una lectura estable. A estas muestras se les midió la absorbancia UV-Vis a 425 nm. El mismo procedimiento se realizó pero con un agente reductor de puentes disulfuros: ditiotreitól (DTT). Este compuesto tiene la propiedad de poder reducir puentes disulfuros expuestos. De esta manera se buscó poder maximar la cantidad de tioles cercanos a la superficie disponibles para futuros procesos de marcación. Se agregaron 55 µl a la dispersión de BSA/ BSA NP previo al agregado de DTNB, dejándolo en incubación en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h.

Cálculos: A partir de los espectros, se estimó la concentración de proteína a través de su absorbancia a 280nm. El coeficiente de extinción molar de BSA es 44200 M⁻¹cm⁻¹. La cantidad de tioles libres por molécula se calcula como:

$$n = \frac{Abs_{425nm}^{DTNB} - Abs_{425nm}^{blanco}}{\epsilon_{425nm}^{DTNB}} \frac{1}{C_{BSA}}$$

dónde n es moles de tiol por mol de proteína, $\epsilon_{\text{DTNB}425\text{nm}} = 12400 \text{ (mol cm)}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del DTNB y C_{BSA} es la concentración molar de BSA o BSA NP según corresponda. A esta longitud de onda y en las condiciones descritas, la absorbancia del reactivo de Ellman es despreciable frente a la absorbancia del producto de reacción y eventualmente puede omitirse el blanco sin proteína (Ellman, 1959).

Marcación de grupos aminos:

Para la marcación de los grupos aminos se prepararon soluciones 4% NaHCO_3 , pH 8,5, 0,1% ácido 2,4,6-Trinitrobenzenesulfónico (TNBS), HCl 1N y dodecilsulfato sódico (SDS) 10%. De soluciones stock de BSA y BSA NP, se hicieron diluciones 1/30 para poder llevar a cabo el ensayo.

Reacción con el TNBS: A un 1 ml de muestra se le agregó 1 ml de la dispersión de NaHCO_3 y 1 ml de TNBS. Se lo dejó incubar por 2 h en una estufa a 42 °C. Luego se le agregó a la dispersión 1 ml de SDS para solubilizar la proteína y 500 μl de HCl para evitar su precipitación. Se midieron las muestras a una longitud de onda de 335 nm y se las comparó con un control negativo (dispersión sin muestra). El procedimiento se realizó con y sin SDS; el SDS se utilizó como agente desnaturizante, por lo que la falta de este permitió marcar los grupos aminos en el estado nativo de la BSA y BSA NP.

Cálculos: Para poder saber la concentración de TNBS en cada medida adherido a la proteína por el grupo amino, se realizó una curva de calibración. Luego se calculó la relación entre [TNBS] y [BSA] con la fórmula: $[\text{TNBS}] / [\text{BSA}]$. La concentración de BSA se calculó midiendo las muestras a 280 nm y utilizando su coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 44200 \text{ (cmM)}^{-1}$).

Marcación de los grupos carbonilos:

Para la marcación de grupo carbonilos se prepararon soluciones HCl 2 M, cloruro de guanidinio 6 M en PBS 0,5 M pH 2,5, 2,4-dinitrofenol (DNP) 10 mM en HCl 2 M, ácido tricloroacético (TCA) 20 % p/v y 1:1 etanol: acetato de etilo. Se realizaron diluciones 1/10 de la BSA y BSA NP con las cuales trabajar.

A 200 μl de muestra se la incubó con 800 μl de DNP durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Cada 15 min se la agitó vigorosamente la muestra para asegurar un buen mezclado en la solución. Luego se le agregó 1 ml de TCA, y se incubó a las muestras 5 min en hielo antes de centrifugarlas por 10 min a 10000xg a 4 °C.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de la dispersión etanol: acetato de etilo. Nuevamente, se resuspendió el pellet y agitó vigorosamente para luego

centrifugar durante 10 m a 4 °C, 10.000xg. Se repitió este paso por duplicado. El ensayo se realizó con y sin DNP, ya que este fue el agente desnaturalizante de carbonilos y la ausencia de este permitió la marcación de los grupos de la BSA NP/BSA en estado nativo.

Se resuspendió finalmente el pellet en 500 µl cloruro de guanidinio agitando vigorosamente. Luego se lo centrifugó durante 10 m a 4 °C, 10000x g. Se midió la absorbancia del sobrenadante por UV-Vis a 370 nm, $\epsilon_{(DNP,370nm)} = 22000 \text{ (Mcm)}^{-1}$

Cálculos: Los cálculos son los mismos realizados para la detección de tioles

- *Determinación proteica*

Se determinó la concentración de proteína en las muestras de BSA NP y BSA. La medición se realizó por el método de Bradford y de B.C.A. Las mediciones contaron con su curva de calibración de BSA para poder obtener la concentración de proteína.

Para el método de Bradford 10 µl de cada muestra fueron incubados con 300 µl de una dilución 1/5 del reactivo stock de Bradford. Luego de 10 m se midieron las muestras mediante un lector de placa a 595 nm. Para el método de B.C.A 25 µl de cada muestra en diluciones al medio de la dispersión stock de BSA (25 mg/ml) fueron incubadas con 200 µl del reactivo B.C.A., la placa fue incubada a 37 °C durante 30 m. Luego de este periodo, se la leyó por lector de placa a 562 nm.

Las medidas en ambos casos fueron tomadas por duplicado. Así mismo, se descartaron las medidas obtenidas por la lectura de las muestras con EtOH, ya que el solvente interfería con las medidas.

- *Análisis de los datos*

Los datos de todos los ensayos fueron analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

Resultados y Discusión

Luego del proceso de obtención, se corroboró la presencia de NP por efecto Tyndall. De generarse el efecto se conservó la muestra para seguir estudiándola, de lo contrario se la descartó (Figura 1a).

En este trabajo se estudió a la BSA NP en dispersión PBS 30 mM, pH 7,0, dado que el objetivo final fue el de describir su potencial como transportador de drogas para ser utilizado en la industria farmacéutica. Al obtener de una dispersión etanólica al 35 % v/v, previo a cualquier ensayo se debió cambiar el solvente en el cual se encontraba por uno más adecuado. Por ello, cada dispersión de BSA NP fue eluída por una columna de exclusión molecular PD-10 luego de su irradiación y así obtenerla en dispersión PBS 30 mM, pH 7,0 (Figura 1b).

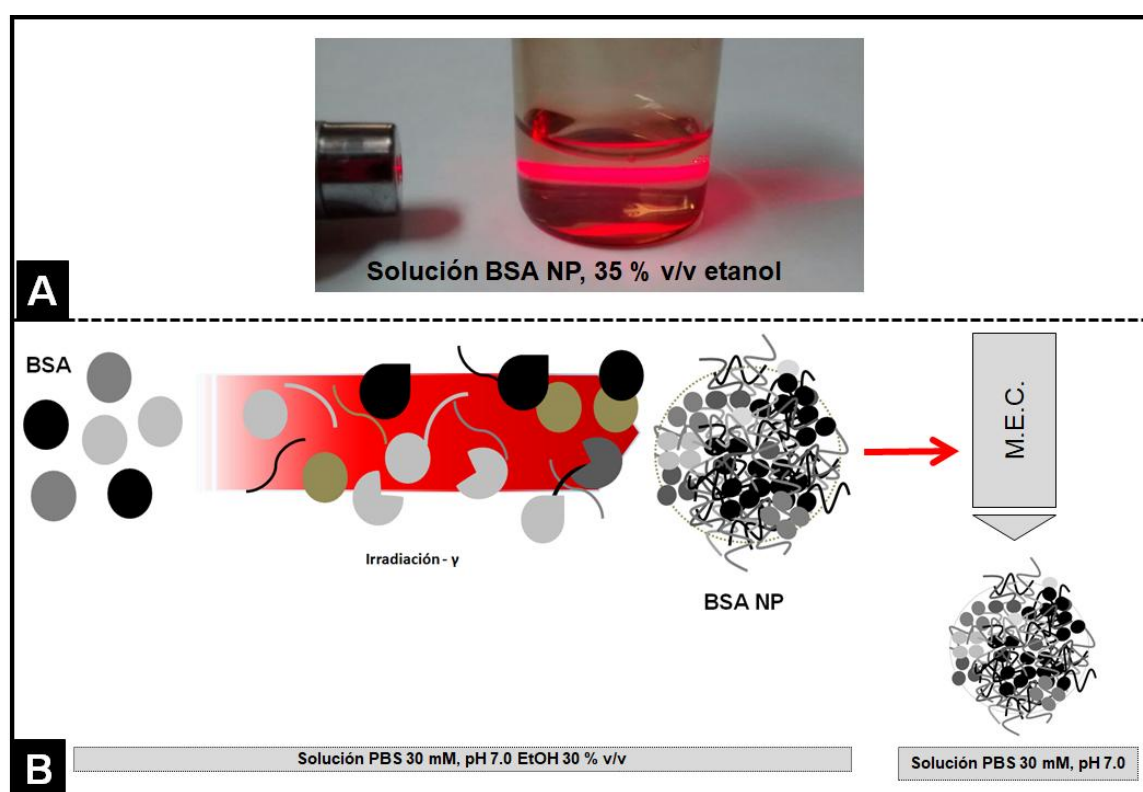


Figura 1 (a) Prueba del efecto Tyndall por existencia de la BSA NP en la dispersión luego del proceso de obtención (desolvatación etanólica + irradiación gamma). (b) Esquema del proceso de intercambio del solvente (PBS 30 mM, pH 7,0/ 40 % v/v etanol) de preparación de la BSA NP, por el solvente (PBS 30 mM, pH 7,0) en el cual va a ser estudiada para observar sus características en un medio similar al pH fisiológico.

El siguiente paso fue el de estimar la eficiencia del proceso de obtención de la BSA NP. Se realizó una corrida por columna cromatográfica para poder separarla de la albúmina remanente en la solución. La columna cromatográfica utilizada en este ensayo fue una columna de Sephadex (G-200). Para que dicho proceso se considere eficiente, la población mayoritaria en dispersión luego de irradiar la muestra debe ser aquella correspondiente a la BSA NP. Se observó el perfil de absorbancia de cada una de las poblaciones a medida que estas eluyeron de la columna (Figura 2). Se obtuvo un

máximo de una población de gran tamaño en primer lugar (NP), seguido un segundo máximo de menor tamaño (proteína). A mayor absorbancia del máximo, mayor será la concentración de la molécula. Es posible obtener la cantidad de BSA NP obtenida (primer máximo del perfil), definida como rendimiento de las NPs (Y_{NP}) y la cantidad de BSA remanente en la dispersión (Y_{BSA}) (segundo máximo en el perfil de elución) (Figura 2a). Estos valores se muestran en forma de porcentajes; siendo $Y_{NP} = 80 \%$, mientras que $Y_{BSA} = 20 \%$, por lo que el proceso de obtención de las NPs es considerado como eficiente.

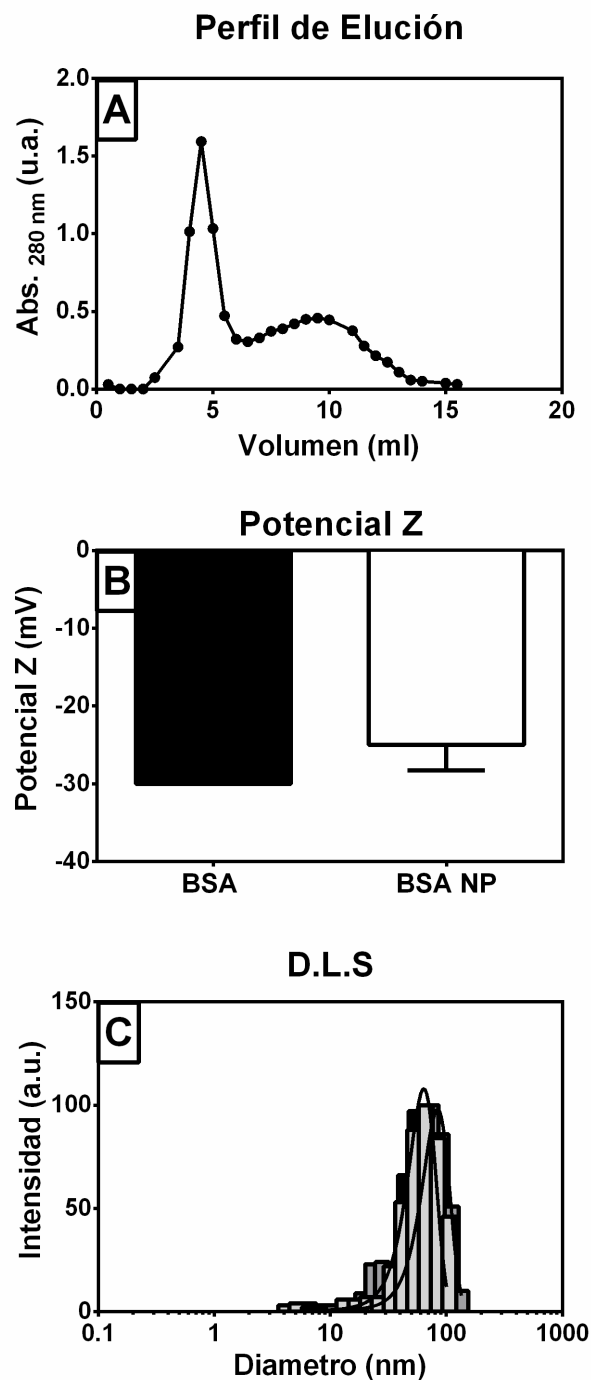


Figura 2 (a) Perfil de elución de la BSA NP en una columna G-200. (b) Se describen los valores obtenidos del potencial Z de la BSA y BSA NP. Los valores del Potencial Z de la BSA fue obtenido de Jachimska et al., 2012. Las mediciones fueron realizadas por triplicado. (c) Se muestra los diámetros obtenidos de la BSA NP mediante D.L.S. Lo representado corresponde a triplicados.

- *D.L.S y Potencial Z*

El valor que se obtiene de la medida del potencial Z es indicativo de las fuerzas repulsivas presentes, siendo un factor importante que determina la estabilidad del producto a largo plazo (Paranjpe et al., 2014). Si el valor que presenta la NP es lo suficientemente alto en solución, las mismas tenderán a repelerse evitando así la

agregación. Si por el contrario, el módulo del potencial no llega a valores relativamente altos, entonces las NPs presentes tenderán a la agregación. Los valores a los cuales los módulos deben llegar para considerar una NP estable o no, depende de la composición de esta (Paranjpe et al., 2014).

La NP estudiada tiene un potencial Z -25 mV (Figura 2b). En una dispersión coloidal, es necesario que la NP en esta tenga un potencial Z con un valor mayor al módulo 20 mV. Por ende, las BSA NPs en la dispersión coloidal evitan la aglomeración entre ellas (Paranjpe et al., 2014).

A continuación se midió el tamaño de la NP de diferentes muestras, obtenidas en diferentes lotes para poder así abarcar mayor variabilidad del tamaño de la NP. Se presentan en las diferentes medidas, poblaciones poco polidispersas centrándose siempre entre los 50 y 80 nm como los valores de radio hidrodinámico en donde alrededor de los 70 nm es que se encuentran las poblaciones mayoritarias (Figura 2c). Según el trabajo de Soto Espinoza et al., 2012, su tamaño se encuentra en torno a los 20 y 40 nm. El tamaño de las NPs que se estudiarán en este trabajo puede diferir del previo ya que las NPs se encuentran en un solvente diferente: PBS 30 mM, pH 7,0.

- *Microscopía T.E.M. y A.F.M.*

Al diseñar una nueva NP es necesario poder observar la morfología de la misma. Para ello, se tomaron diferentes microscopias: T.E.M y A.F.M. De las microscopias T.E.M tomadas se pudieron medir un total de 340 NPs con las cuales se generó un histograma de los tamaños hallados. En este caso, las microscopias revelaron que el tamaño mayoritario de las BSA NP descritas se encontraba alrededor de los 35 nm aproximadamente con una polidispersidad baja en una $35,4 \pm 0,35$ nm (Figura 3a-c). Si bien dichos valores difieren de lo obtenido por D.L.S, el medio en que se encuentran las NPs difiere ampliamente. Las diferencias de tamaño obtenidas por ambos métodos se adjudican a las distintas condiciones experimentales de cada uno. Al realizar la microscopia, se somete a la BSA NP a una situación desnaturalizante (deshidratación) que puede llevar a una pérdida de estructura generando un cambio de tamaño o de agregación entre NPs. Por su parte, el ensayo de D.L.S mide el radio hidrodinámico de las NPs en solución, siendo una medida de las NPs hidratadas.

Al tomar las microscopias de A.F.M, se pudo observar que efectivamente la dispersión de BSA NP está compuesta por NPs de diferentes tamaños, su mayoría centrada en el rango de 20 -70 nm (Figura 3d-e), con algunas partículas de tamaños mayores a 100 nm hasta unos 250 nm (Figura 3f-g). Algunas de las NPs mostraron agregación con BSA remanente en la dispersión coloidal (Figura 3g). Se observa una

magnificación de una de las NP en donde se aprecia que esta posee una superficie heterogénea con bordes definidos (Figura 3h). El tamaño del radio hidrodinámico de esta es de 64 nm, encontrándose dentro del rango obtenido por D.L.S.

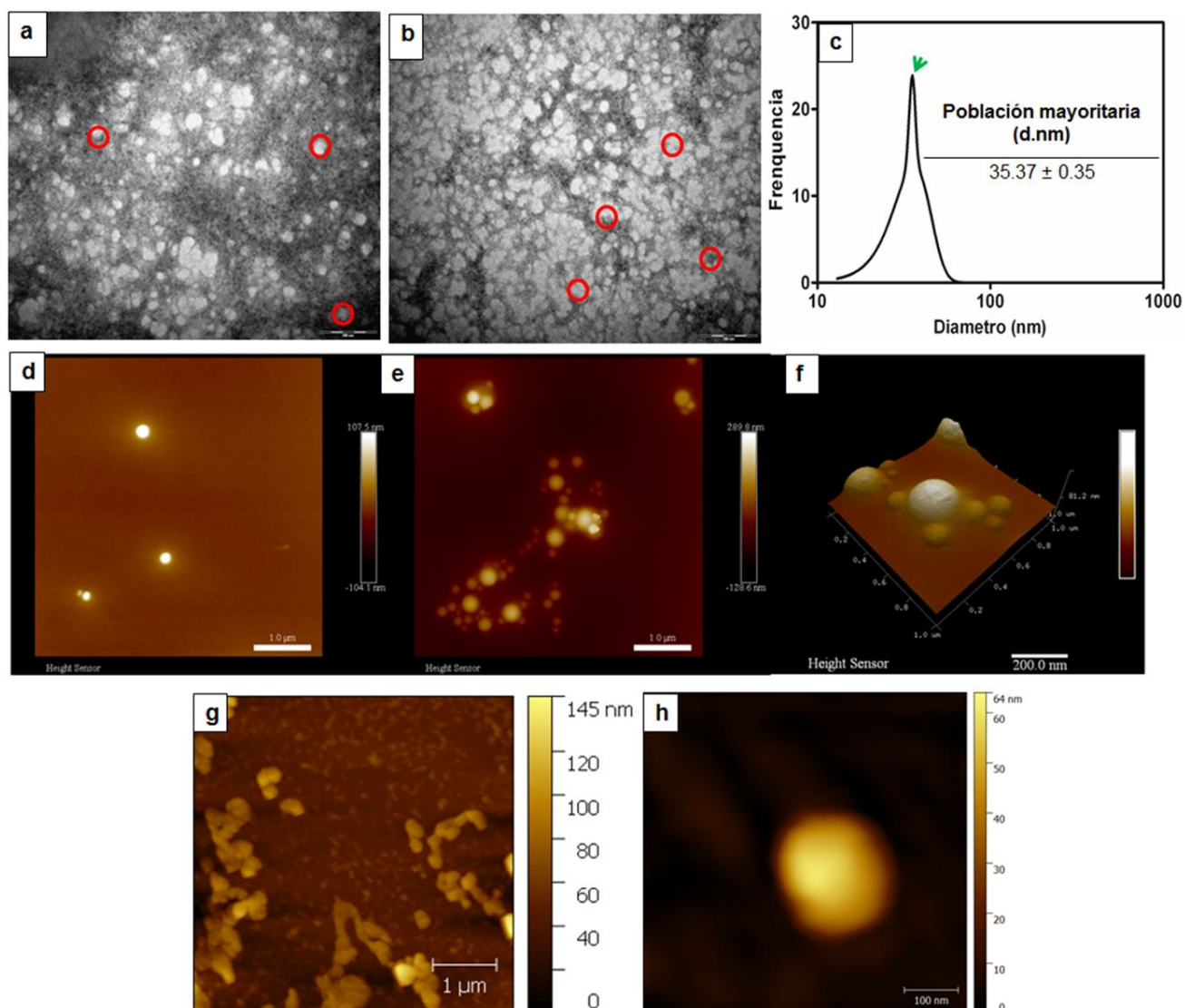


Figura 3 Se representan las microscopías tomada por T.E.M de la BSA NP (a,b). La escala responde a 200 nm. Los círculos rojos encierran algunos ejemplos de las NPs halladas en los campos tomadas. Las microscopías responden a diferentes campos de las muestras tomadas. (c) Representa el histograma obtenido de analizar las microscopías mediante el software ImageJ. (d -f) Microscopías de Fuerza Atómica (A.F.M) de la BSA NP tomadas en aire. Las microscopías corresponden a imágenes topográficas PFQNM en donde (d) y (e) son bidimensionales y (f) corresponde a una imagen tridimensional de la BSA NP.

La agregación que se observó se puede deber a que la irradiación no es un proceso limpio ya que es un proceso aleatorio donde se agregan las moléculas de BSA. Además, al eluir la dispersión por una columna para poder cambiar el etanol presente en

la solución, es posible que ocurra agregación entre algunas NPs. Sin embargo, las partículas con mayor tamaño son minoría en la dispersión obtenida (Figura 3e;g).

El tamaño del diámetro de las BSA NPs, implica que como vehículo de sustancias, la relación entre volumen y superficie expuesta tendrá en una relación óptima en donde la tensión superficial se verá reducida. Debido a que la morfología se asemeja a un elipsoide, es una NP con potencial a ser utilizada en administración intravenosa (IV), por ser poco probable la adherencia a las paredes de los vasos sanguíneos (Morris et al., 1999).

La existencia de la BSA NP queda confirmada por el método de cromatografía separativa por columna de G-200. El primer máximo, correspondiente a la BSA NP, se encuentra separado del máximo perteneciente a la proteína en estado molecular. Por medio de D.L.S y microscopias se pudo observar que las NPs poseen una estructura esférica de bordes definidos y superficie heterogénea, con un radio hidrodinámico en dispersión de 70 nm de población mayoritaria. Los datos obtenidos en las microscopias T.E.M coinciden con los datos de tamaño descriptos por Soto Espinoza et al., 2012 en el que las BSA NPs se obtienen en dispersión 40 % v/v etanólica poseen un tamaño entre los 20 – 40 nm.

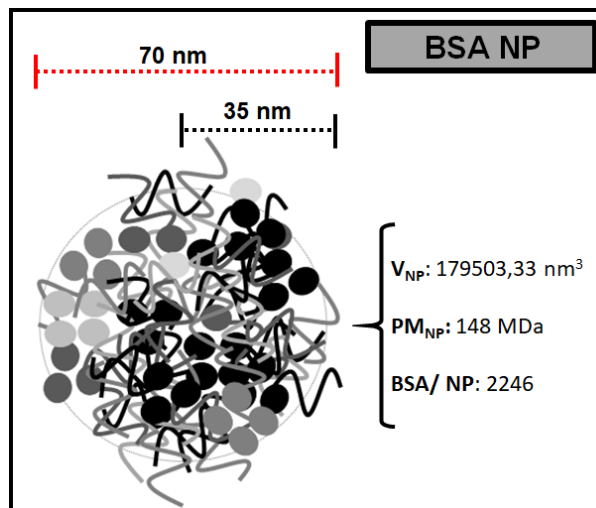
- *Aproximaciones matemáticas del volumen y peso molecular de la BSA NP*

Con los resultados obtenidos hasta el momento se pudo realizar algunas estimaciones matemáticas con el fin de poder adjudicarle un volumen y peso molecular teórico aproximado a las BSA NPs. Se estimó el volumen de la BSA NP (V_{NP}) por la ecuación de volumen de la esfera $V = \frac{4}{3} \pi R^3$. Una vez que logramos estimar el V_{NP} es posible calcular la masa de las NPs utilizando la fórmula $m_{NP} = \delta_{BSA} * V_{NP}$, en donde m_{NP} hace referencia a la masa de la BSA NP y la δ_{BSA} corresponde a la densidad de la BSA corresponde a 1.37 g/cm³ (Gutenwick et al., 2004). Si a este valor se lo multiplica por el número de Avogadro, tendríamos el peso molecular de la BSA NP (PM_{NP}), que al dividirlo por el peso molecular de la albúmina (66 kDa), nos daría el total de moléculas de BSA que conforman una NP (Tabla 3).

Tabla 3. Valores teóricos del volumen, peso molecular y proteínas totales por BSA NP obtenidos en base a los datos experimentales de D.L.S y microscopía.

Diametro (nm)	Radio (nm)	V_{NP} (nm ³)	m_{NP} (g)	PM_{NP} (MDa)	Total de BSA/NP
70	35	1,80E+05	2,46E-16	148	2246

En base a los resultados de la Tabla 3, la BSA NP es una estructura esférica de bordes definidos de un diámetro hidrodinámico de 70 nm, un volumen de $1,80 \times 10^5 \text{ nm}^3$, un PM_{NP} de 148 MDa, lo que daría un total de 2246 moléculas de BSA por NP aproximadamente (Esquema 1).



Esquema 1 Esquema del volumen y peso molecular de la BSA NP propuesto mediante datos experimentales

- *UV-Visible*

Como fue mencionado anteriormente, la espectroscopia UV-Vis sirve para poder estudiar el perfil de absorbancia de la proteína. Una modificación en él indica una alteración en su estructura (Rohiwal et al., 2015). Es así que se utiliza esta técnica como un paso inicial para poder observar si aún en las NPs se preserva la estructura de la BSA. Si el perfil no coincide con el de la BSA en estado monomérico, entonces cuando forma parte de la BSA NP se sugiere que el monómero presenta algún tipo de alteración de conformación.

El perfil de absorbancia de las BSA NPs presenta diferencias con el de la proteína: lo que indicaría en una primera instancia que dentro de la composición de las NPs hay una porción de moléculas de BSA que no preserva su estructura nativa (Figura 4a). El máximo principal de la BSA (283 nm) experimenta un desplazamiento hacia longitudes de onda menores (277 nm) por lo que se supone que el ambiente de los aminoácidos aromáticos (Trp principalmente) presenta algunas variaciones. El hombro del Trp presenta un ensanchamiento de unos 7 nm (de 18 a 25 nm), lo cual según Rohiwal et al., 2015, sugiere un cambio en el tamaño de la molécula en la suspensión coloidal (Figura 4a).

Por otro lado la BSA NP absorbe menos que la BSA, lo que indica que los grupos involucrados, Tyr y Trp, no se encuentran tan expuestos como lo están en la albúmina, impidiendo que absorban la misma cantidad de luz. Esto sugiere en una primera instancia una alteración entre la estructura de la BSA NP y la albúmina molecular (Figura 4a). Es así, que debido al apantallamiento de los grupos que absorben luz, no es posible calcular la concentración de la NP en la dispersión por medio de esta técnica. Al variar levemente el perfil de absorbancia, no es posible utilizar el mismo coeficiente de extinción molar para estimar la concentración de la BSA NP.

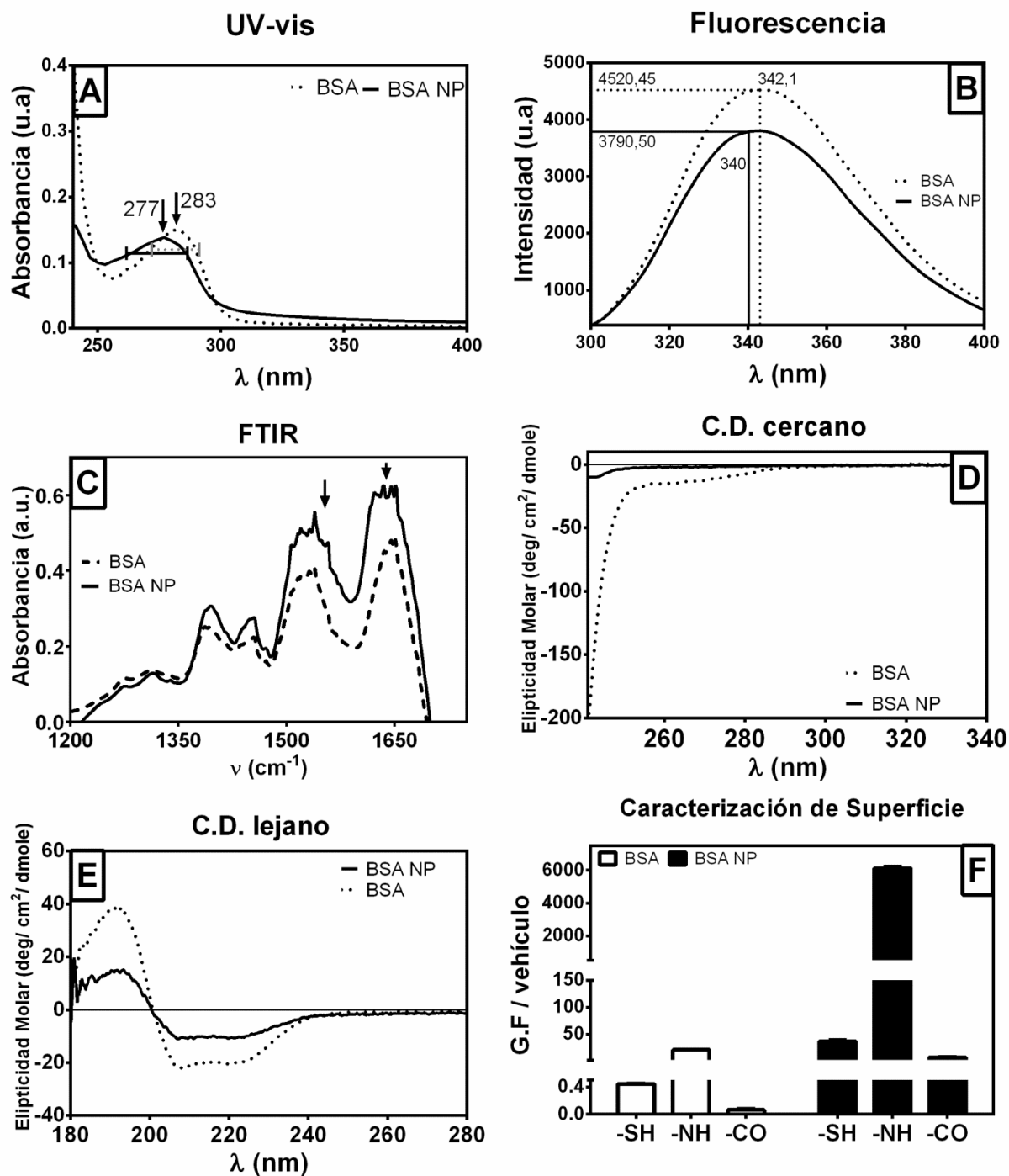


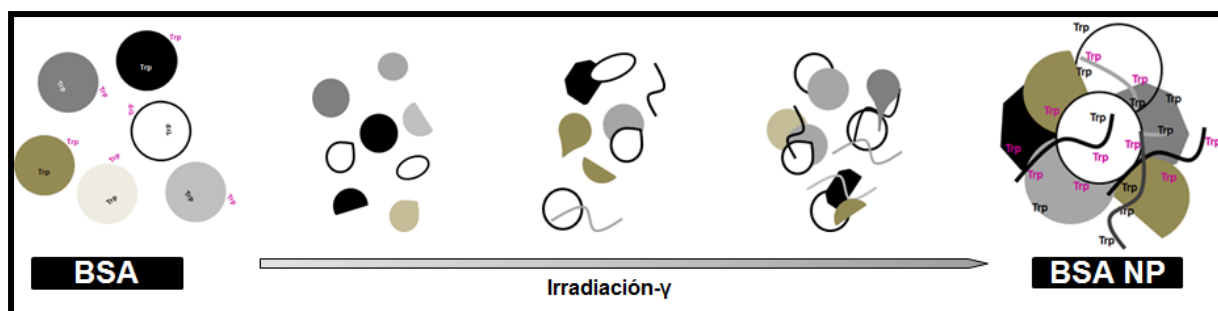
Figura 4 (a) Se representa el perfil de la BSA (línea llena) y de la BSA NP (línea guionada) obtenido por espectroscopia UV-Vis. Los perfiles responden a triplicados de las muestras. (b) Se presentan los espectros de emisión de fluorescencia de la BSA (línea llena) y BSA NP (línea discontinua) cuando se excita a una longitud de onda de 295 nm (Trp). Corresponden a triplicados de medidas. (c) Se presentan los espectros obtenidos mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR) de BSA (línea llena) y BSA NP (línea discontinua) de la zona de las Amidas ($900\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$). Corresponden a 64 scans con una redispersión de 1 cm^{-1} . (d-e) Se presentan los perfiles de señal dicroica obtenidos de las muestras BSA y BSA NP al ser estudiados en el CD – cercano (d) y CD – lejano (e). En el CD – cercano se pueden observar las señales emitidas por los aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe), mientras que en el lejano se observan las señales emitidas por los carbonos quirales de las α -hélice y láminas β . (f) Se representa la caracterización de los grupos superficiales --SH , --NH y --CO mediante métodos colorimétricos en la BSA (blanco) y BSA NP (negro).

- *Fluorescencia*

Para poder estudiar en mayor profundidad la alteración de estructura observada en el perfil de absorbancia UV-Vis, se realizó un ensayo de espectroscopía de fluorescencia. Como se ha explicado anteriormente, la albúmina bovina sérica cuenta con dos Trp. El Trp-134 ubicado en el dominio IA, cercano a la superficie de la proteína; y el Trp-212 ubicado en el dominio IIA, dentro del bolsillo Sudlow I. Este último Trp, es el principal responsable de la emisión de fluorescencia de la proteína (Banerjee et al., 2012), encontrándose en el principal sitio de interacción con drogas y otras sustancias (Sevilla et al., 2007). Además, corresponde al bolsillo más hidrofóbico de la proteína. Al excitar las muestras a la longitud de onda 295 nm, se asegura únicamente la contribución de los Trp de la NP ($\text{Trp}_{\text{BSA NP}}$). Este perfil de emisión fluorescente brindará información más detallada del indicio de alteración de estructura observado por absorbancia UV-Vis. Además, se puede observar si el bolsillo principal de interacción sigue estando disponible una vez formada la NP. De perderse la emisión de fluorescencia, se sugiere un impedimento del Trp para emitir señal, por ende un bloqueo en el bolsillo de interacción de la NP.

Al estudiar el perfil de emisión fluorescente de los Trp presentes tanto en la BSA como en la NP, se observa una menor intensidad por parte de la NP comparada con la proteína (Figura 4b). Además, se observa un leve desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda menores. La menor intensidad de emisión fluorescente, hace referencia a una posible atenuación de los $\text{Trp}_{\text{BSA NP}}$ (Gelamo et al., 2002). El desplazamiento del espectro indica un ambiente más hidrofóbico en los cuales se encuentran los Trp de las proteínas formando la NP.

La BSA NP es un agregado de proteína compacto en el que la gran proximidad a la cual se encuentran los $\text{Trp}_{\text{BSA NP}}$ hace que se genere un efecto de atenuación interna, generando una menor emisión fluorescente. Por otro lado, el desplazamiento hacia menores longitudes de onda, denota una NP más hidrofóbica, respaldando la idea de una BSA NP compacta (Esquema 4).



Esquema 2 Descripción gráfica de lo que sucede durante el proceso de irradiación con los Trp de la albúmina, hasta formar parte de la NP.

- *FT-IR*

La espectroscopia infrarroja (FT-IR) es utilizada para poder estudiar las señales emitidas de los distintos grupos funcionales presentes en cada proteína. Las señales emitidas responden a libertad de movimiento de dichos grupos: cuanto más grande la señal (desplazamiento hacia mayores frecuencias de onda), mayor libertad de movimiento. En particular, para el estudio de proteínas el análisis está puesto en las regiones de absorbancia de las estructuras llamadas Amidas. Las regiones están divididas en tres: Amida I, II y III. En la región de la Amida III ($1200-1350\text{ cm}^{-1}$), se manifiestan las señales de estiramiento de grupos CN y de *bending* de grupos NH. La región entre $1480-1575\text{ cm}^{-1}$, corresponde a la Amida II, en donde se pueden observar señales de estiramiento de grupos CN y de *bending* de grupos NH. Por último, entre $1600-1690\text{ cm}^{-1}$, se manifiesta la Amida I, que corresponde a señales de *stretching* de C=O. Esta última Amida es la principal en el estudio de FT-IR para estructura secundaria ya que a 1650 cm^{-1} aproximadamente, se ubica el máximo para la el dominio α -hélice. Siendo éste un dominio mayoritario en la BSA (70 %), resulta útil para poder estudiar el estado de la estructura secundaria global de la proteína (Grdadolnik 2002).

Se observan diferencias entre los espectros de BSA y BSA NP (Figura 4c). Las NPs presentan un desplazamiento de máximos hacia frecuencias de onda menores a comparación de la BSA denotando menor movimiento de grupos como C=O y CN y NH. A su vez, los grupos carbonilos que no aceptan uniones por puente de hidrógeno en las BSA NPs no emiten señal (1639 cm^{-1}), mientras que lo hacen para la BSA (Grdadolnik, 2000). Lo estudiado en estos espectros sugiere que la BSA NP posee una estructura más compacta que la proteína, haciéndola más estable. Sin embargo, al estar representados máximos característicos de la estructura secundaria 1650 cm^{-1} , para la α -hélices y el 1540 cm^{-1} para hojas lámina β , se cree que no hay pérdida de estructura en la totalidad de las proteínas que componen a las NPs.

- *Dicroísmo Circular*

Se observa en los espectros obtenidos por CD agregación en las proteínas componiendo las NPs (Figura 4d-e). La agregación se presenta como una baja señal emitida por los aminoácidos aromáticos en el CD – cercano de la BSA NP (Figura 4d). Por otro lado, se observa una disminución en las señales de los carbonos quirales en los dominios de estructura secundaria correspondientes a la BSA NP con respecto al espectro de CD de la BSA (Figura 4e). Esto puede estar dado por desnaturalización de la proteína, impidiendo que los grupos emitan señal.

Las técnicas de UV-Vis, Fluorescencia, FT-IR y C.D., sugieren cambios en la estructura en las proteínas formando parte de las NPs. Estos cambios responden a la agregación generada por el efecto de la desolvatación debido al etanol en la dispersión madre y al ser irradiados para su estabilización. Al estudiar los espectros de espectroscopia UV-Vis de las BSA NPs, se observa que la estructura de una porción de proteína que la compone posee cambios conformacionales. Indicio de esto son el cambio del tamaño de la molécula en la suspensión coloidal, observado por el ensanchamiento del hombro del Trp, y la menor absorbancia del perfil de las BSA NPs que junto con el desplazamiento de 6 nm hacia el azul del perfil (Tabla 4), lo que sugiere cambios estructurales en una porción de la población de la BSA en las NPs. Sin embargo, al no perder la totalidad de la forma del perfil de absorbancia de la BSA en el de las NPs, la estructura de gran parte de proteína no se encuentra alterada.

Tabla 4 Valores de la ubicación del máximo de señal más importante de la BSA y BSA NP en cada técnica utilizada de acuerdo con los resultados obtenidos.

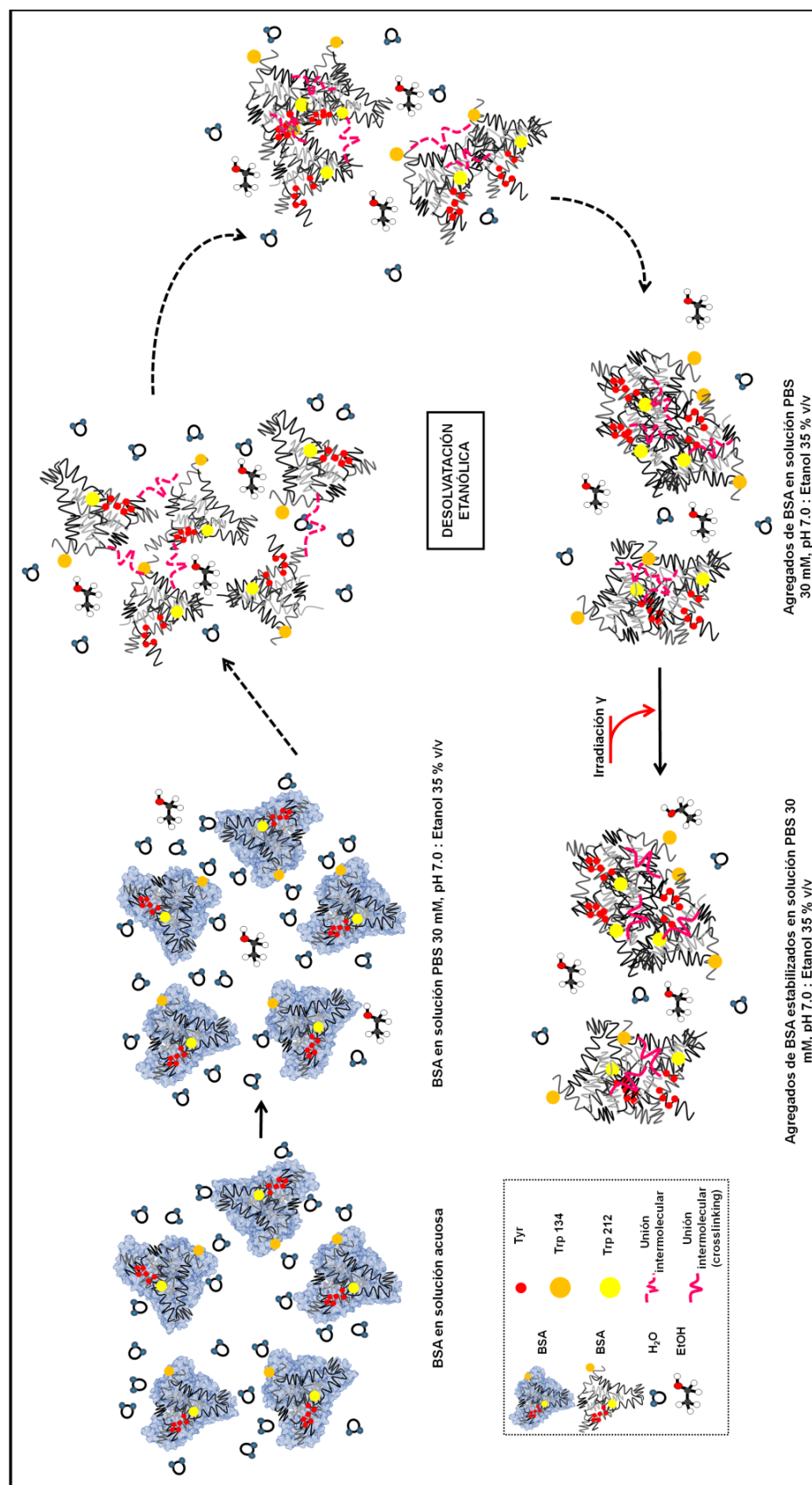
	UV -vis	Fluorescencia	FTIR
BSA	283 nm	342 nm	1643 cm ⁻¹
BSA NP	277 nm	340 nm	1643 cm ⁻¹

Por el método de espectroscopia de fluorescencia se pudo estudiar el entorno en el cual se encuentra el Trp_{BSA NP}. El espectro fluorescente de la BSA NP presentó un desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda menores (Tabla 4) y una disminución de la intensidad de fluorescencia respecto a aquél de la BSA. El desplazamiento hacia longitudes de onda menores indica un ambiente más hidrofóbico rodeando al Trp en las NPs; al ser más hidrofóbico el bolsillo en el cual se encuentra el Trp, este se encuentra más compacto impidiendo así la entrada de agua. Si el bolsillo se encuentra más compacto en las BSA NPs que en la BSA, significa que las NPs poseen una estructura más hidrofóbica. Esto es respaldado a su vez por una menor intensidad

de fluorescencia del Trp en las BSA NPs. La disminución en la intensidad indica un apantallamiento de los Trp entre sí. Al estar más cercanos los unos de los otros, es posible que entre ellos se apantallen resultando en una menor emisión de fluorescencia (Esquema 2).

Es, principalmente, en los espectros obtenidos por FT-IR y C.D. que se obtienen las diferencias de estructura entre las BSA NPs y BSA. La pérdida de estructura proteica es detectada sobre todo en el ensayo de C.D. La menor emisión de los carbonos quirales tanto en el C.D.- lejano como en el cercano, indica no solo alteración en la estructura, pero también sugieren agregación de las proteínas. Por FT-IR se observa una mayor concentración de máximos en la zona de emisión de estructuras tipo lámina – β . Se puede interpretar como unión de grupos -NH con -CO intermoleculares entre BSA, producto de la desolvatación por el etanol. Estas uniones, simulando la unión lámina- β , se debe al reemplazo que las proteínas buscan al verse desprovistas de moléculas de agua (Esquema 6).

La pérdida de estructura en la BSA NP es esperable dado al estrés sufrido por las proteínas durante la obtención de la NP. Sin embargo, la pérdida de estructura proteica responde solamente a una porción del total de las proteínas en la BSA NP. De ser total, los espectros de UV-Vis, fluorescencia y FT-IR deberían verse alterados completamente respecto del de la albúmina. Se cree entonces que el agregado que se forma durante la irradiación posee algunas albúminas expuestas en la superficie mientras otras quedan escondidas, ó con su estructura alterada (Esquema 6).



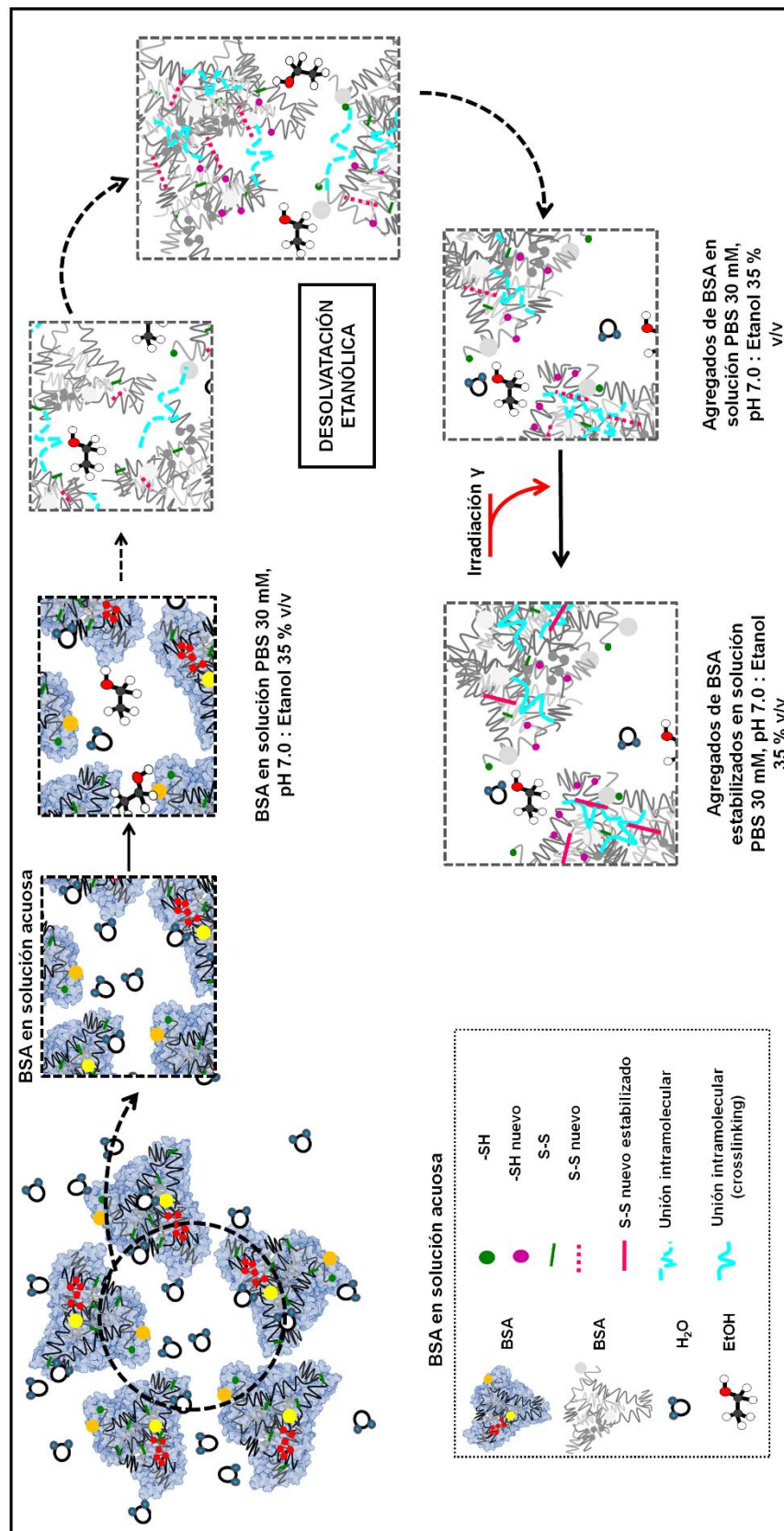
Esquema 3 Se esquematiza el proceso mediante el cual se obtiene la BSA NP. Se resaltan los grupos aromáticos de las moléculas de albúmina para poder seguir a su entorno y a ellos a lo largo del proceso de desolvatación e irradiación. Mostrando como una vez formado el agregado proteico, la proximidad entre los grupos de distintas moléculas aumenta, generando un apantallamiento observado en los ensayos espectroscópicos.

- *Caracterización de superficie: Tioles, Aminos y Carbonilos*

Una vez estudiadas las características más intrínsecas de las BSA NPs, se llevó a cabo la caracterización de la superficie de las NPs. Es así entonces que mediante ensayos colorimétricos se observaron los diferentes grupos funcionales presentes y sus diferencias en cantidad entre las superficies de BSA y de BSA NPs.

En primera instancia se llevó a cabo un ensayo de detección de los tioles libres de la BSA NP, y luego de ser tratada con un agente reductor de puentes disulfuro. Debido a que se trata de un agregado de proteínas, se supone que tendrá más tioles libres expuestos en su superficie para interactuar con moléculas. Contar con esta información, nos permite diseñar un modo de unir moléculas como ácido hialurónico, fólico o bombesina, para así mejorar la especificidad de la molécula. Cuando se la trata con DTT, se reducen todos los tioles que estén formando puentes disulfuro cercanos a la superficie. Esto proporciona información acerca del proceso de unión entre moléculas de albúmina durante el proceso de obtención de BSA NPs.

La BSA NP sin estar tratada con el agente reductor, muestra mayor señal que la proteína molecular (Figura 4e; Tabla 6). Las NPs están formadas por irradiación gamma; este tipo de radiación aporta la energía requerida para romper los enlaces disulfuro. El porcentaje de etanol en la dispersión de BSA NP actúa como deshidratante generando una reorganización en las estructuras de las proteínas. Al mismo tiempo por intercambio de puentes de H entre el etanol y agua las moléculas de albúmina se ven forzadas a unirse entre ellas para suplantar estas uniones (Esquema 4). Por ende, al irradiarse y aglomerarse parte de las moléculas involucradas en la NP pierden su estructura reduciendo puentes. Otras, simplemente se pliegan de tal manera que la proteína pierde su estructura secundaria original, exponiendo así, sus puentes S-S (Esquema 4).



Esquema 4 Ilustración del proceso de la reorganización de los tioles (-SH) y puentes disulfuros (S-S) durante el proceso de obtención de la BSA NP. Se presentan detalles de como afectan las dos etapas del proceso: desolvatación (deshidratación etanólica) y estabilización de los agregados (crosslinking).

Al tratar la NP con el agente reductor, la señal se duplica aproximadamente. Esto quiere decir que durante la irradiación, la reorganización de la estructura de las proteínas componiendo la NP dió como resultado que una gran porción de puentes disulfuro se encuentren cercanos a la superficie de la NP (Tabla 6) (Esquema 4).

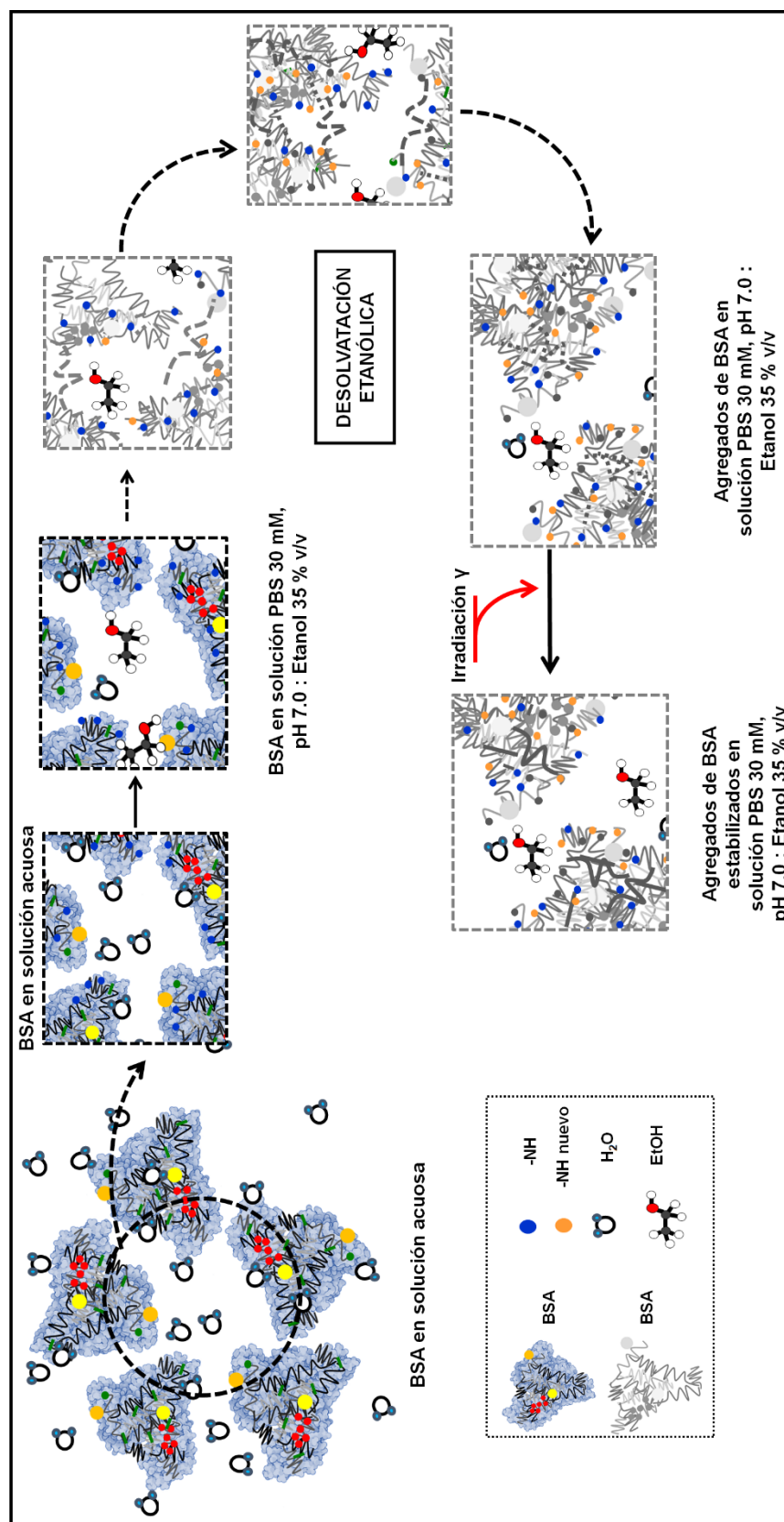
Tabla 5 Se representan los valores obtenidos en los distintos ensayos para el estudio de la caracterización de superficie de la BSA NP en búsqueda de: grupos tiolatos (primer columna); grupos aminos (segunda columna); grupos carbonilos (tercer columna). Los valores nacen de triplicados.

Muestra	-SH/ NP	-NH/NP	-CO/NP
BSA	0,44 ± 0,01	30,37 ± 0,47	0,065 ± 0,02
BSA (DTT)	0,67 ± 0,07	-	-
BSA (SDS)	-	28,65 ± 1,22	-
BSA (DNP)	-	-	0,38 ± 0,15
BSA NP	37,00 ± 1,90	6,12 e3 ± 1,04 e2	7,21 ± 1,03
BSA NP (DTT)	59,40 ± 7,84	-	-
BSA NP (SDS)	-	4,04 e4 ± 7,14 e2	-
BSA NP (DNP)	-	-	28,86 ± 0,19

En forma paralela e independiente se llevó a cabo la detección de aminos mediante marcación con TNBS para poder comprender de mejor manera la estructura del agregado de proteínas. Al tratarse de un agregado de proteínas, se supone que tendrá menos grupos -NH expuestos en su superficie para interactuar con moléculas.

La Tabla 6 muestra los valores obtenidos a partir de la reacción de la BSA y la BSA NP con el TNBS cuando a una alícuota se la desnaturaiza con SDS y otra se mantiene en estado nativo. Se observa un gran aumento de los -NH expuestos de la BSA NP (Esquema 5). Esto indica que hay aproximadamente 2000 grupos -NH por NP, siendo esto una prueba de que la BSA NP está formada no solo por un gran número de moléculas de BSA aglomeradas, pero que una porción de estas sufrieron una alteración en su estructura (Figura 4e; Tabla 6).

Al desnaturizar la NP con SDS, se observa un aumento de los -NH expuestos a la superficie (Tabla 6). Confirmando una vez más la suposición de una reorganización de algunas moléculas de la proteína formando la NP.

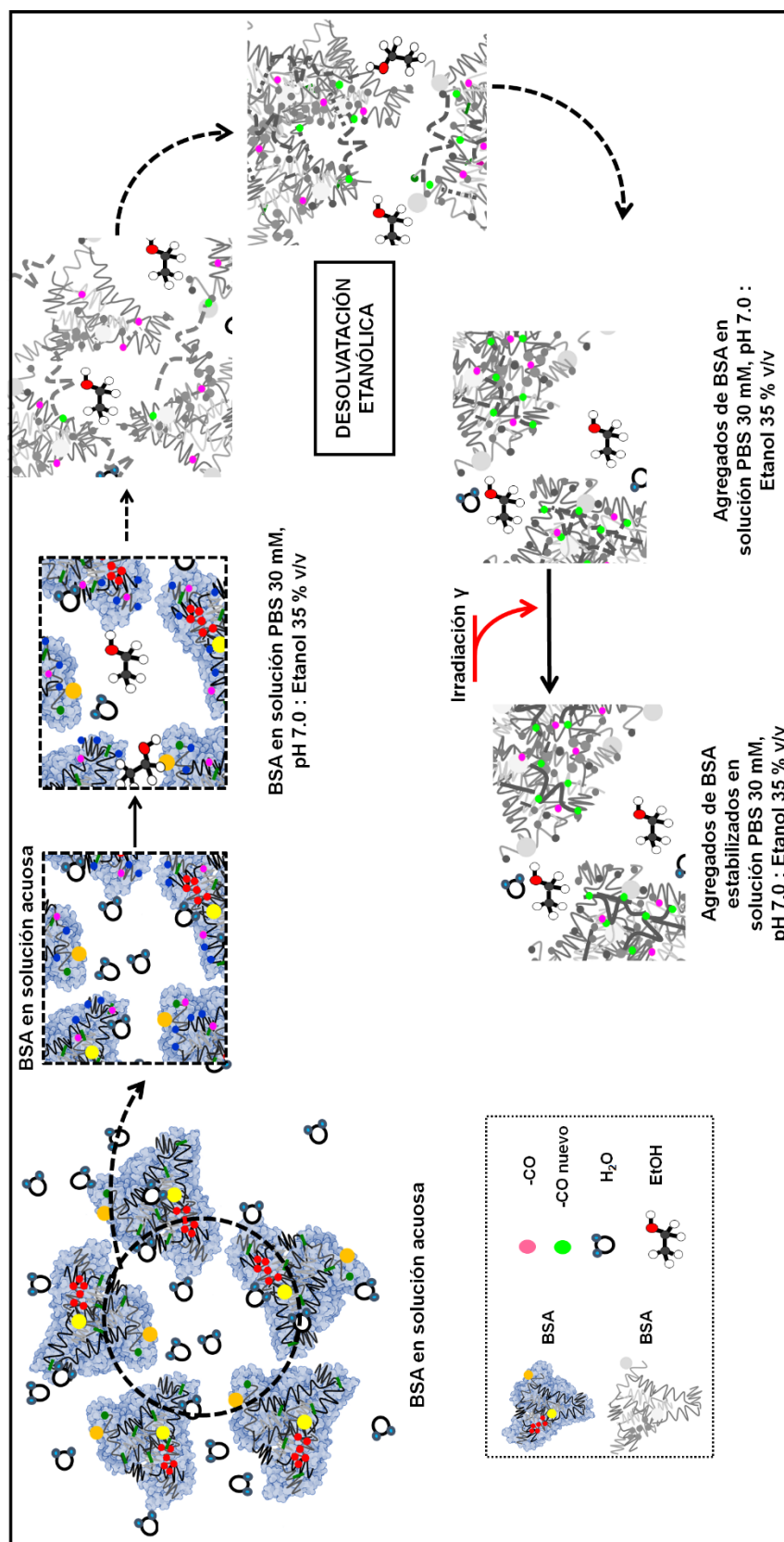


Esquema 5 Descripción de la reorganización de los grupos NH en las BSA en su estructura debido al proceso de obtención de las NPs en dos pasos.

Por último, se realizó una detección de los grupos carbonilos presentes en la NP para estudiar su oxidación con respecto a la BSA. Al irradiarse, la partícula sufre oxidación por el proceso mismo: la presencia de radicales de oxígeno debido a la solución etanólica y la radiación generan un ámbito propicio para la oxidación de las proteínas.

En la Tabla 6 se representan los valores obtenidos mediante la reacción con DNP. Se observa un gran aumento de los grupos carbonilos en la superficie de la BSA NP. Se encuentran aproximadamente 7 veces más de carbonilos en su superficie luego del proceso de irradiación (Figura 4e; Tabla 6). Si bien no se descarta la idea de la oxidación de la proteína durante la irradiación para formar la NP, se sugiere que los grupos carbonilos generados en este proceso se reorganizan durante la desnaturalización de las proteínas al momento de agregarse entre sí, quedando expuestos. Debido al aumento de grupos -CO detectados luego de tratar la BSA NP con el agente reductor, se cree que la reorganización lleva a que estos grupos interactúen con los grupos aminos o entre ellos a fin de generar enlaces intermoleculares entre proteínas. Estas interacciones pueden dar origen a estructuras del tipo lámina β o enlace tipo enlace peptídico entre las moléculas de BSA construyendo así la NP (Esquema 6). Como se ha estudiado mediante espectroscopia FTIR anteriormente, hay un aumento de estructuras similares a esta.

Los ensayos de detección de los grupos funcionales de la superficie de la NP, avalan la propuesta de una disposición irregular de las albúminas en las NPs. Así es que al no tener todos los grupos que se esperaba expuestos y en concordancia con las microscopias T.E.M. y A.F.M, se piensa a la NP como una estructura de tipo esférica, con gran cantidad de grupos funcionales expuestos hacia su superficie.



Esquema 6 Descripción de la reorganización de los grupos NH en las BSA en su estructura debido al proceso de obtención de las NPs en dos pasos.

- *Determinación proteica*

Para la determinación proteica se compararon dos métodos de medición (Tabla 7; Tabla 8). Las diluciones de las muestras se realizaron acorde a la concentración de BSA inicial. Los valores obtenidos corresponden a las proteínas que lograron interaccionar con los reactivos.

Tabla 6 Los valores que se muestran en la tabla corresponden a las medidas obtenidas por Bradford de las muestras de BSA NP en buffer. Las medidas corresponden a duplicados.

	mg/ml					
[BSA] _T	25	12,5	6,25	2,5	1,25	0,625
[BSA NP]	0,83 ± 0,09	0,15 ± 0,17	0,14 ± 0,12	-	-	-

Tabla 7 Los valores que se muestran en la tabla corresponden a las medidas obtenidas por B.C.A. de las muestras de BSA NP en buffer. Las medidas corresponden a duplicados.

	mg/ml					
[BSA] _T	25	12,5	6,25	2,5	1,25	0,625
[BSA NP]	0,28 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,00	-	-	-

Mediante ambos ensayos de detección proteica, no se logró detectar la concentración teórica de proteína en cada solución. En ambos casos se observa una detección parcial de los –NH de los enlaces amidas de las proteínas conformando las BSA NPs. Este resultado respalda la teoría que describe un proceso en el cual al deshidratar las proteínas para la formación de agregados, éstas buscarán reemplazar los enlaces que tenían con las moléculas de agua, uniéndose unas con otras con grupos simulando dichos enlaces perdidos. Como resultado de ello, grupos como – SH, –NH y –CO se verán involucrados en uniones entre moléculas, o estarán en microambientes inaccesibles para poder reaccionar con los reactivos de los ensayos. Esto dará como resultado un menor detección del método para la concentración proteica.

- *Hipótesis sobre la estructura de la BSA NP como cápside vírica*

Con los experimentos realizados se elaboró una hipótesis sobre la estructura y ensamblado posible de la NP asimilándola a una partícula viral: por similitud de tamaño y forma.

Las partículas de virus pueden dividirse en tres grupos de morfología diferente: simetría hélice, simetría cúbica y otras simetrías. Dentro de la simetría cúbica, se conocen limitaciones en el ordenamiento de los capsómeros (proteínas formando la cápside). Se sabe que dichos capsómeros pueden ser hexágonos o pentágonos con una simetría

5:3:2, en donde mediante el simple cálculo $N = 10(n-1)^2 + 2$, se puede sacar el número de capsómeros formando la cápside (Horne et al., 1961).

Watson y Crick (1956, 1957) fueron quienes propusieron un arreglo simétrico de subunidades idénticas para la formación de la cápside encerrando la molécula de RNA. Si el arreglo resulta ser de simetría cúbica, entonces este cuenta con ejes en los cuales al rotarlo da apariencias idénticas.

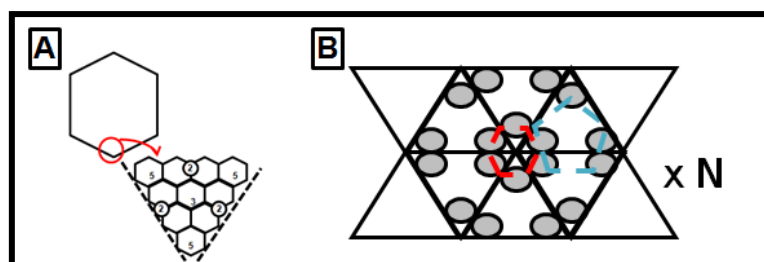
Dentro del arreglo cúbico simétrico se hallan tres sub categorías: tetraédrica (simetría 3:2), cúbica u octaédrica (simetría 4:3:2) y la dodecaédrica o icosaédrica (simetría 5:3:2) (Horne et al., 1961). En particular, diferentes autores estipulan que cuando hay simetría 5:3:2, la forma geométrica generada debe estar compuesta por unidades relacionadas idénticamente, acomodadas asimétricamente en donde sus ejes no coinciden simétricamente (Caspar 1956; Kulg et al., 1957; Watson y Crick 1956, 1957). El número total de estas unidades debe ser múltiplo de 60. Sin embargo, Wildy et al., 1960 refutó dicha hipótesis, afirmando que los capsómeros de dichas estructuras debían estar formados por subunidades asimétricas, resultando en capsómeros simétricos en forma de astilla.

Focalizando en la simetría 5:3:2, los capsómeros pueden ser representados por hexágonos o pentágonos. De estar formado por pentágonos, se aplicaría el teorema de Euler: vértices-ejes + caras=2, lo que daría un total de 12 pentágonos (Horne et al., 1960).

Sin embargo, si se piensa a la estructura como formado por hexágonos, el límite con el cual se debe trabajar es la simetría 5:3:2. De acuerdo con esto los hexágonos podrían estar ubicados de la siguiente manera:

- Sobre los ejes con simetría doble (de 0 a 30 capsómeros)
- Sobre los ejes con simetría triple (de 0 a 20 capsómeros)
- En diferentes sitios (total de capsómeros múltiplos de 60)

Así, mediante la fórmula $10x(n-1)^2 + 2$, siendo $x=1$ se puede elucidar la cantidad de capsómeros en una cápside en donde su formación está compuesta por hexágonos empaquetados en caras triangulares equiláteras (Horne et al., 1960).



Esquema 7 Esquema (A) del empaquetamiento de las caras triangulares equiláteras compuestas por hexágonos para las capsides con simetría 5:3:2 (B) modelo propuesto por Caspar-Klug 1961 en una estructura icosaédrica

Caspar y Klug 1961, establecieron un modelo matemático para el cálculo de capsómeros en virus cuya cápside representaba un icosaedro. Dicho modelo sirve para cuando los capsómeros se encuentran como hexágonos (Esquema 8). Para poder describir la disposición de los capsómeros ubican la superficie del icosaedro en una matriz hexagonal. Reemplazan a su vez cada hexágono por seis triángulos también compatibles con la estructura icosaédrica. Cada cara triangular representa entonces la ubicación de tres subunidades proteicas en sus vértices. Se obtienen por ende, 5 subunidades proteicas multiplicado por 5 veces en los ejes de la simetría icosaédrica y grupos de 6 subunidades proteicas (Twarock 2006) (Esquema 8). Así cada icosaedro tiene entonces caras triangulares de acuerdo a la serie Caspar-Klug.

De acuerdo con el modelo explicado se sugiere una estructura similar a la cápside viral con simetría 5:3:2 para la BSA NP. De tener una estructura icosaédrica, podemos encerrar a la BSA NP dentro de una esfera (Esquema 9).

Como se ha mencionado anteriormente, con los datos experimentales de D.L.S y las microcopias de las BSA NPs, se estimó un $V_{NP} = 1,8 \times 10^5 \text{ nm}^3$, un $PM_{NP} = 148 \text{ MDa}$ y un total de 2246 moléculas de BSA por NP. Para calcular cuántas BSA superficiales posee una BSA NP se utiliza la ecuación descripta para estimar los capsómeros de la cápside vírica (Esquema 9). La ecuación es:

$$N = 10 (n-1)^2 + 2$$

N representando a la cantidad de capsómeros o BSA superficiales (BSA_s), y “n” representa a la arista de los hexágonos. Como se observa en el Esquema 9, la arista del hexágono representa al lado de uno de los seis triángulos equiláteros formando el hexágono. Esto se traduce como el diámetro de una de las BSAs. Esto se debe a que en cada hexágono por lo modelado por Caspar y Klug, puede dividirse en 6 triángulos, cada uno encerrando a una molécula de albúmina. Así entonces:

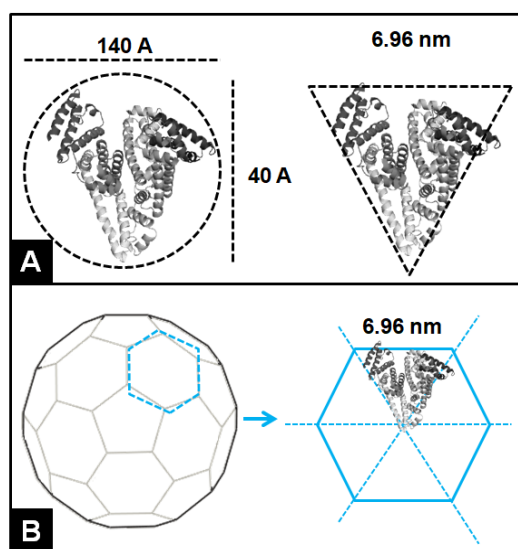
$$BSA_s = 10 (D_{BSA}-1)^2 + 2$$

En donde $D_{BSA} = 6,96 \text{ nm}$. Esto daría un total de 357 BSA_s .

De acuerdo con los ensayos obtenidos hasta el momento de caracterización de superficie, se observan; 37 tioles libres, 6,12 e03 aminos y 7,21 carbonilos en la superficie de la NP.

De datos bibliográficos se estima un $-SH$ por proteína de BSA (Peters, 1995). De ser así, y en concordancia con lo obtenido en el ensayo de marcación de tioles, habría aproximadamente 40 BSA con el grupo $-SH$ expuesto a la superficie de las BSA NPs. Esto supone que de las 357 BSA expuestas hacia la superficie calculadas, solo 40 de ellas tendrían su grupo $-SH$ disponible para poder interaccionar con un ligando (11,20 % del total de las BSA_s).

Por BSA debería de haber 30 grupos $-NH$ expuestos a la superficie (Habeeb et al., 1966). Si este número se multiplica por la cantidad de BSA superficiales en la NP, entonces deberíamos tener 10710 aminos superficiales. Sin embargo, contamos con aproximadamente 6000 $-NH$ por BSA NP, 4000 menos de los calculados teóricamente (57 % del total de las BSA_s). Esto sugiere que las 357 moléculas de BSA expuestas en la superficie de la NP solo cuentan con porciones de moléculas expuestas hacia la superficie.



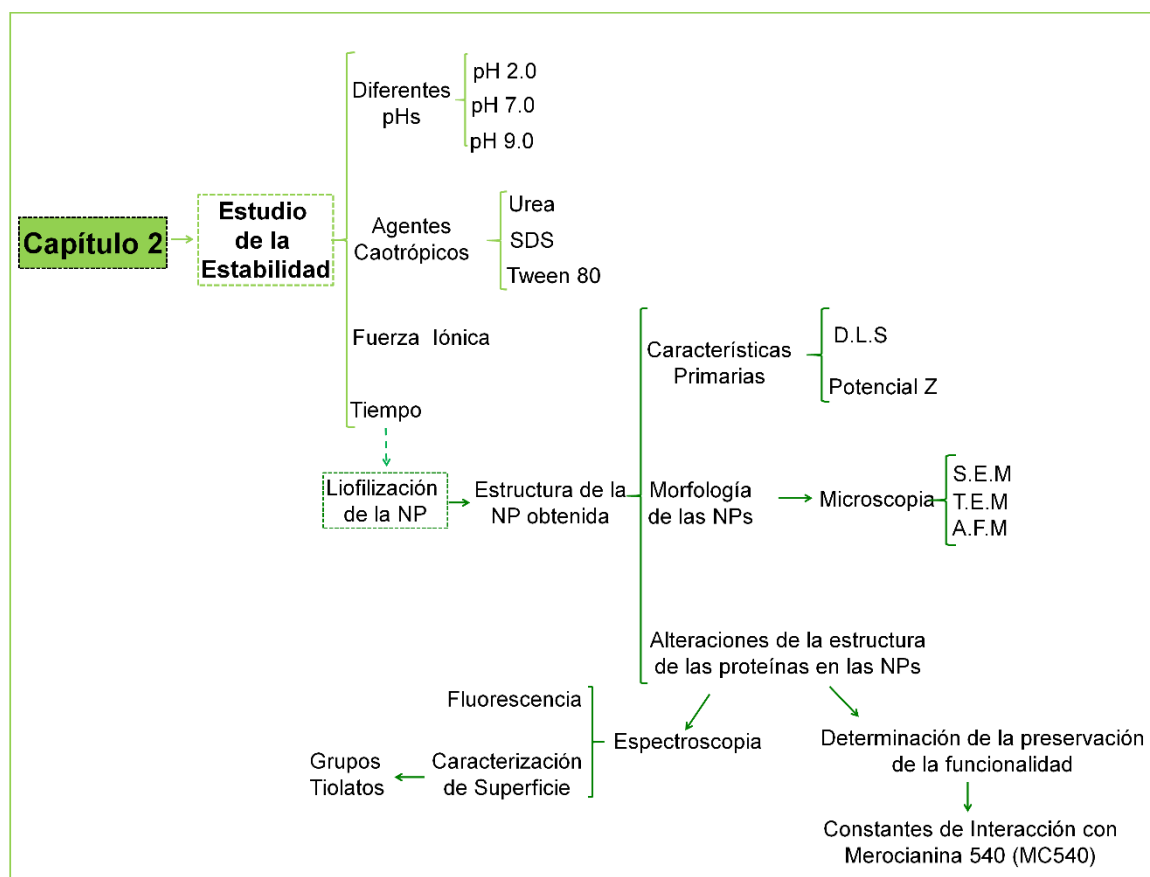
Esquema 8 Modelo de la BSA NP como un icosaedro (a). Triángulo equilátero que forma los hexágonos, el que a su vez representa una molécula de BSA.

Conclusión

A partir de los resultados en esta sección se concluye:

- La NP es una entidad diferente de la BSA molecular.
- Por microscopía T.E.M y A.F.M, se observó que la BSA NP cuenta con una estructura que se asemeja a una esfera. Su superficie no es uniforme debido a la estructura irregular y triangular de la BSA en su estado molecular. Por ello, se propone usar la geometría icosaédrica, alegando que la organización de las moléculas de albúmina forman la NP de manera similar a la de los capsómeros en una cápside de un virus.
- Las BSA NPs cuentan con un diámetro hidrodinámico de 70 nm, un volumen de $1,80 \times 10^5 \text{ nm}^3$, un PM_{NP} de 148 MDa, lo que daría un total de 2246 moléculas de BSA por NP aproximadamente, 357 de las cuales se encuentran expuestas hacia la superficie. Además, su potencial Z (c.a. – 25 mV) sugiere una dispersión coloidal estable en donde las NP no tienden a la agregación
- Los espectros de las distintas espectroscopias realizadas describen a los Trp en una proximidad más alta, lo cual junto con indicios de agregación de la estructura de las proteínas indicaría una estructura más hidrofóbica de las NPs. Así se describe a la BSA NP como un agregado condensado de proteínas.
- La caracterización de la superficie de las NPs permitieron observar la reorganización que conlleva a un elevado número de grupos superficiales en la NP. Además, indica desnaturalización parcial de las proteínas y reorganización de los grupos funcionales (-SH y -NH en especial) para lograr el *crosslinking* del agregado proteico. Esto facilita una posible conjugación de un ligando a futuro con el fin del aumento de la especificidad

Capítulo 2: Estabilidad y liofilización de la BSA NP



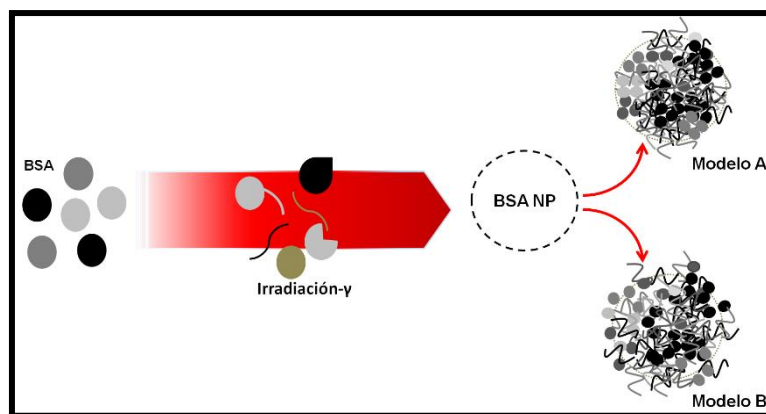
Introducción

Una NP puede considerarse como un nanovehículo proteico con gran potencial para el transporte de drogas si preserva su función ante condiciones experimentales adversas. Una manera de lograrlo es mediante el estudio de la estabilidad en dispersión estructural de la BSA NP. La función de las proteínas en su totalidad depende de su conformación estructural. De perder la conformación nativa, su función se vería comprometida.

Se propone en éste capítulo un estudio de la estabilidad de la NP frente a diferentes condiciones experimentales que consideramos adversas para la proteína que la compone. Entre ellas, se estudiará la estabilidad de la BSA NP en soluciones de diferentes pH, concentraciones salinas, agentes caotrópicos y en función del tiempo con ensayos principalmente de espectroscopía. Los datos obtenidos sobre la estabilidad en dispersión de la BSA NP nos permitirán completar la descripción de la estructura de la NP.

Con los resultados obtenidos hasta ahora se pueden proponer dos posibles modelos de agregado proteico (Esquema 11): la BSA NP puede adoptar un agregado compacto de

proteínas en el cual las moléculas de albúmina se encuentran formando una estructura rígida. Este modelo cuenta con las moléculas de proteína unas muy cerca de las otras (BSA NP modelo A). El otro modelo posible, es que las moléculas formen el agregado de proteína de manera más laxa: es decir, que las proteínas no estén unidas muy cercanas unas de otras, sino que haya espacio libres entre ellas. En este modelo habría mayor cantidad de moléculas de BSA expuestas hacia la superficie de la NP (BSA NP modelo B).



Esquema 9 Esquema de la hipótesis presentada sobre los dos posibles modelos que puede adoptar el agregado de proteína una vez formada la nanopartícula.

Las NP destinadas a ser consideradas como nanovehículos en el transporte de drogas deben tener como parámetros de diseño: el tamaño, carga y características físicas y químicas superficiales que pueden afectar en gran medida su comportamiento farmacocinético una vez dentro del organismo huésped (Pavlin et al., 2012).

El diseño de una particular debería tener en cuenta los siguientes factores

- (1) Presentar estabilidad en una suspensión biológica (pH 7,4 aproximadamente) y soportar grandes concentraciones salinas y tener estabilidad temporal.
- (2) Contar con un mecanismo de evasión a la captura inmediata por parte del sistema reticuloendotelial
- (3) Contar con grupos funcionales en su superficie que permitan una futura conjunción con un ligando para aumentar la especificidad
- (4) Poder resistir situaciones de estrés, como valores de pH bajos (Neuberger et al., 2005).

Estudiar la estabilidad de la NP frente a cambios de pH, cambios de fuerza iónica, presencia de SDS, urea y Tween 80.

Además, se estudiará su estabilidad en el tiempo. Esto último es de gran importancia ya que permitirá dilucidar si la NP en buffer soporta un almacenamiento de largo plazo o no. Particularmente, este dato será útil para futuras aplicaciones médicas.

Estos ensayos de estabilidad se realizaron utilizando espectroscopia de fluorescencia. Para ello se siguió la emisión fluorescente de los Trps de la NP ya que permiten describir cambios en la estructura de la NP (Gelamo et al., 2002).

2.1 Estabilidad en solución de la BSA NP

Materiales y Métodos

Para el ensayo de fluorescencia se utilizó un espectrofluorómetro FS2- Scinco. Para el ensayo de FT-IR se utilizó un ATR – Affinity Shimadzu, analizándose en primera instancia los espectros en el software IRSolution. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software GraphPad Prism v5.0.

Por espectroscopía UV-Visible, se realizaron los espectros en el rango de 250-350 nm. Para la espectroscopía FTIR, se secaron las muestras hasta obtener un film sin agua. Luego se las midió haciendo por medición 120 escaneos por muestra a una redispersión de 1 cm^{-1} .

- *Estabilidad de la NP a diferentes pH*

Se realizaron ensayos por espectroscopia UV-Vis, FT-IR y fluorescencia para estudiar los posibles cambios en la estructura global de la NP. Para ello, de las soluciones stock de BSA y BSA NP se realizaron diluciones hasta alcanzar concentraciones de $45\text{ }\mu\text{M}$ de BSA y 55 nM de BSA NP para los ensayos de FTIR y UV-Visible. Para el ensayo de fluorescencia se utilizaron concentraciones de BSA $2,25\text{ }\mu\text{M}$ y BSA NP $2,75\text{ nM}$.

Se incubaron muestras de las partículas en soluciones de diferentes pH. Los valores de pH se eligieron en base a las posibles vías de administración de la BSA NP. Una de las vías es la oral, por lo que se seleccionó el pH 2,0 (estómago), mientras que el pH 7,0 se eligió porque es semejante al pH fisiológico de la sangre. Para tener un parámetro del comportamiento de las NPs a pH alcalinos, se eligió una dispersión de pH 9,0.

Se compararon los espectros obtenidos en todos los casos. Los parámetros experimentales utilizados en estos dos ensayos espectroscópicos fueron similares a los utilizados para los ensayos descriptos en el Capítulo 1.

Para los experimentos por espectroscopía de fluorescencia, se diluyó la muestra para evitar el posible efecto de dispersión de luz a altas concentraciones (*scattering*). Los parámetros experimentales utilizados aquí fueron similares a los utilizados para el ensayo de fluorescencia de las BSA NPs en el Capítulo 1. Luego se calculó el centro de masa (MC) y se graficó el pH vs el MC.

$$(1) \text{ MC} = \frac{\sum \text{intensidad de la medición} \times \text{longitud de onda}}{\sum \text{longitud de onda}}$$

- *Estabilidad de la NP de presencia caótopos: Urea, SDS y Tween 80*

→ Estabilidad de la NP en dispersión de SDS

Para estudiar el efecto que los detergentes iónicos pueden tener sobre las NPs, se realizaron ensayos de fluorescencia en donde se mantuvo la concentración de BSA NPs constante, mientras que se aumentó la concentración del detergente. En este caso se utilizó el detergente iónico dodecilsulfato sódico (SDS) como agente desnaturizante, en un rango de concentración 0,00 - 16 μ M. El registro de los distintos espectros se llevó a cabo de la misma manera en que se realizó el ensayo de fluorescencia en el Capítulo 1. Las medidas fueron realizadas en triplicado. Los datos fueron analizados para obtener el centro de masa (MC) como lo muestra la ecuación (1).

→ Estabilidad en Urea

Se estudió la estabilidad de las NPs en concentraciones crecientes de urea en un rango de concentración entre 0,0 – 9,0 M utilizando espectroscopia de fluorescencia. Las medidas fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales que las usadas al estudiar la estabilidad de las NPs en dispersión de SDS.

→ Estabilidad con Tween 80

Se estudió la estabilidad de las BSA NPs frente a concentraciones crecientes del detergente no iónico Tween 80 % en un rango desde 0,0% a 90,0% v/v. Para este ensayo en particular, las concentraciones de BSA y BSA NP utilizadas fueron de 4,5 μ M y 5,5 nM respectivamente. Las medidas fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales que las usadas al estudiar la estabilidad de las NPs en SDS, al igual que el análisis de datos.

- *Estabilidad de la NP en soluciones con diferente Fuerza Iónica*

Se estudió la estabilidad de las BSA NPs en soluciones de fuerza iónica creciente con el fin de saber si las NPs son estables tanto en el ambiente extra como intra-celular. Para el ensayo se utilizó una centrifuga MICRO 17 TR (Micro High Speed Centrifuge). Para las mediciones en UV-Vis se utilizó un Nano-drop Thermocientific 1000. Muestras de BSA NP y BSA (25 nM y 20 μ M) en PBS 30 mM, pH 7,0 fueron incubadas en concentraciones crecientes de NaCl, por un lado, y KCl por el otro. El rango de concentración salina fue desde 0,0 a 1,9 M. Se dejó las muestras incubando 1 h en hielo (4 °C) para luego centrifugarlas durante 10 m a 4000 g. Se midió el sobrenadante por UV-Visible a una longitud de onda de 280 nm para calcular la concentración proteica

según la absorbancia medida. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía con post test Dunnett (el control fue la proteína en PBS 30 mM, pH 7,0).

- *Estabilidad en función del tiempo*

Se estudió la estabilidad de las NPs en función del tiempo en una dispersiónbuffer PBS 30 mM, pH 7,0., para determinar cuál es el posible período de almacenamiento. Caso contrario, nuevas estrategias deben ser elaboradas para almacenar las BSA NPs por períodos prolongados.

Se estudió la estabilidad de las NPs durante dos meses por espectroscopia de fluorescencia, FT-IR y D.L.S. Las condiciones experimentales de cada una de las técnicas utilizadas fueron las de Capítulo 1. Las muestras se mantuvieron a 5 °C durante el ensayo, los días de medición de las mismas fueron: 0; 15; 30 y 60.

Resultados y Discusión

- Estabilidad de las NPs en función del pH

Frente a la posibilidad de poder utilizar las BSA NPs en tratamiento médico, se estudió su estabilidad en diferentes valores de pH, pensando en posibles vías de administración. Se estudiaron soluciones de pH 2,0; 7,0 y 9,0; pH 2,0 corresponde al valor del pH del jugo gástrico, mientras que el pH 7,0 hace referencia a un valor de pH fisiológico y en donde la proteína se encuentra en su forma nativa. El valor de pH 9,0 se eligió en relación al cambio de estado de la BSA en pH alcalino cuando esta pasa de su forma N (nativa) a una forma B (ligeramente desnaturalizada) y como situación extrema para compararla con los otros dos pH.

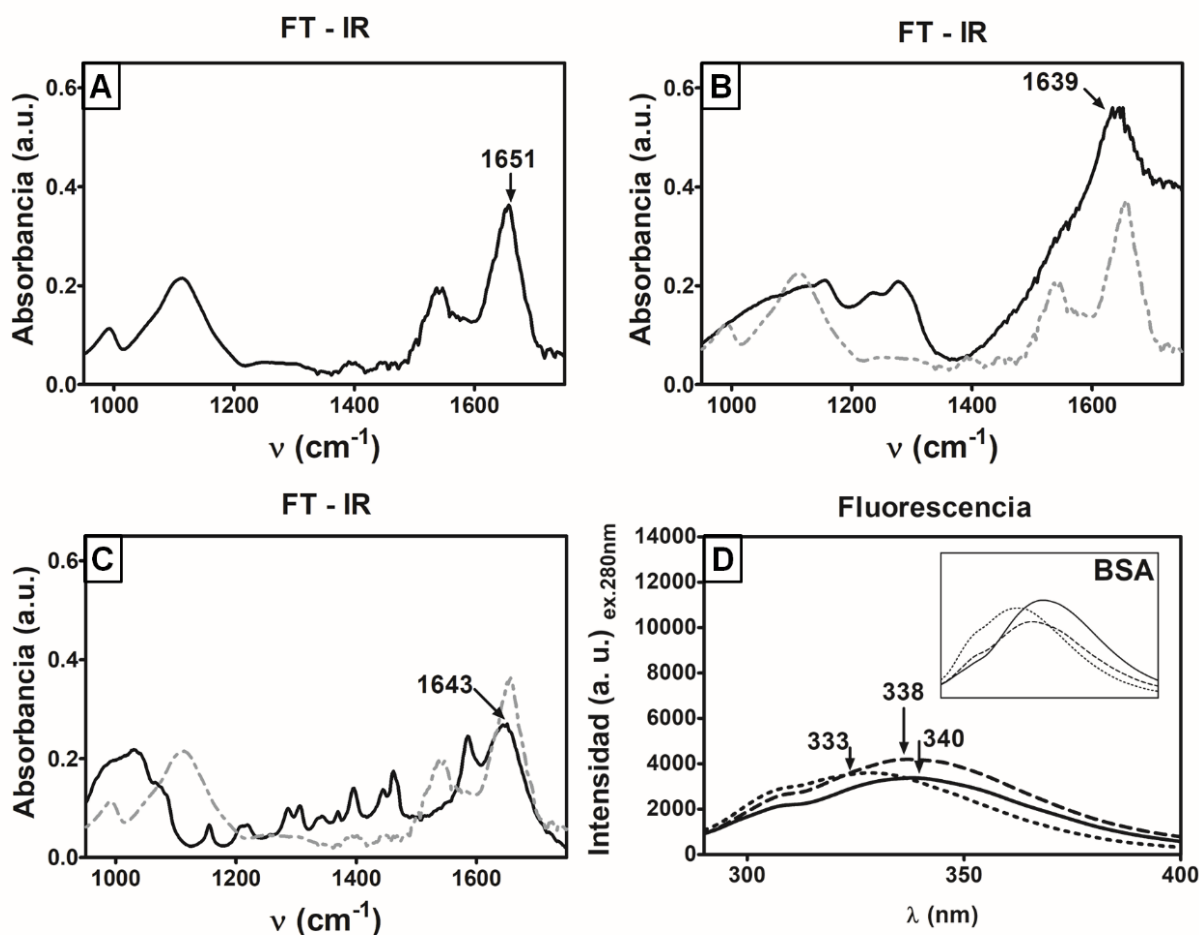


Figura 5(a – c) Los espectros de BSA NP obtenidos por espectroscopía FITR a (a) pH 7,0; (b) pH 2,0 (línea llena) y (c) pH 9,0 (línea llena). Para los gráficos (b) y (c) se incluyó el espectro de la BSA NP a pH 7,0 en línea punteada gris, a fin de facilitar el análisis. Las medidas contaron de 100 escaneos con una redispersión de 1 cm^{-1} . (d) Espectro de fluorescencia de la BSA NP en diferentes pH, con los espectros de BSA embebidos. Los espectros responden a un triplicado de la medida.

La estabilidad en diferentes pH se estudió mediante espectroscopía FT-IR (Figura 5a-c). Se prestó especial atención a la señal emitida por la Amida I, por ser el principal

indicador de cambios en la estructura global de la proteína frente a situaciones de estrés.

A pH 7,0 se observaron las señales tanto para la estructura lámina- β , a 1550 - 1600 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} , como para el dominio α -hélice a 1651 cm^{-1} (Figura 5a). También se pueden observar señales correspondientes a la Amida II a 1300 y 1450 cm^{-1} , correspondientes a grupos C=C, C=O, y C-C. El espectro adquirido a este pH fue utilizado como referencia para el análisis de las alteraciones estructurales producidos en las BSA NPs por el cambio de pH (Figura 5a).

A pH 2,0 las señales correspondientes a C=C, C=O, C-C si bien están presentes, se encuentran a menores frecuencias de onda (cambio al azul) (Figura 5b). Por otro lado, hay un corrimiento hacia el azul de la señal correspondiente al máximo de la α -hélice correspondiente a la Amida I. Dicho cambio indica una estructura más laxa en la que los grupos involucrados cuentan con mayor grado de libertad. Las observaciones descritas son indicios de una pérdida de estructura (Figura 5b).

El espectro obtenido a pH 9,0 presenta vibraciones a frecuencias menores para las regiones de interés, presentando menor corrimiento hacia el azul que el obtenido a pH 2,0 (Figura 5c). Estos corrimientos en las frecuencias de vibraciones sugieren movimientos de los grupos con mayor grado de libertad. Sin embargo, dicho cambio no es tan marcado como el obtenido a pH 2,0, por lo que los cambios a considerar en la estructura de la NP no son tan importantes (Figura 5c).

El Trp en la albúmina, presente en el bolsillo de unión a diferentes sustancias sirve para estudiar por espectroscopia de fluorescencia el microambiente que rodea al aminoácido y, de esta manera, poder predecir cómo se encuentra la estructura de la NP. Esta técnica sirve además para detectar el carácter hidrofóbico de ciertas zonas de las NPs a cierto pH, considerando que la unidad de las NPs es un agregado de albúminas individuales. (Figura 5d).

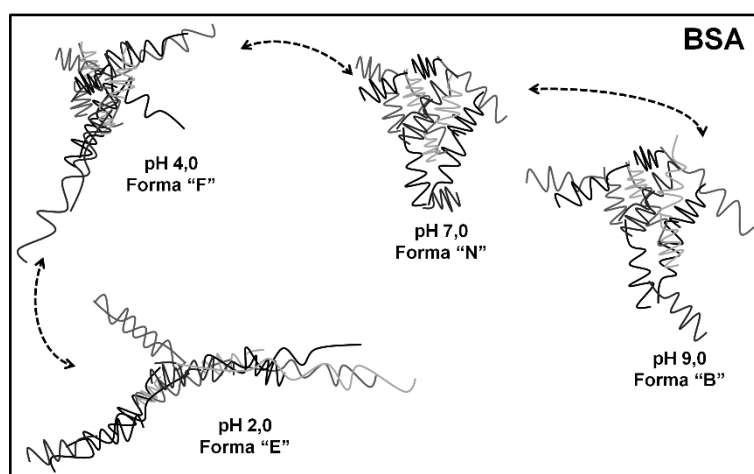
Como punto de comparación se utilizó el perfil de emisión de fluorescencia de las NPs a pH 7,0 (Figura 10d). El máximo de fluorescencia en condiciones de pH fisiológico la señal del Trp_{NP} se encuentra situado a 340 nm. Mientras que a valores ácidos de pH (2,0) se produce un desplazamiento del máximo hacia el azul, desde 340 nm a 333 nm (c.a. 7 nm), a valores alcalinos de pH (9,0) el cambio del espectro hacia el azul es menor ya que sólo experimenta un corrimiento desde 340 a 338 nm (c.a. 2 nm) (Figura 5d).

Gelamo et al., 2002, establecen una relación entre el desplazamiento en los máximos de emisión de fluorescencia con respecto al carácter hidrofóbico del microambiente rodeando al Trp: a desplazamientos hacia menores longitudes de onda, aumenta la hidrofobicidad en la vecindad del Trp. Considerando que la unidad de las NPs son

albúminas podemos inferir que ambos cambios en el perfil del espectro de la BSA NP significan un microambiente más hidrofóbico rodeando al Trp_{BSA NP}.

A su vez, Itri et al., 2004, correlaciona un incremento en la emisión de fluorescencia del Trp, con una mayor exposición hacia la superficie. En base a esto y haciendo la misma consideración del párrafo anterior, a pH 9,0 el Trp_{BSA NP} estaría más expuesto al solvente comparando su posición en las BSA NPs en una dispersión a pH 7,0. Por el contrario, cuando las NPs se encuentran en una dispersión pH 2,0, el Trp se encuentra en una posición más alejada a la superficie que a pH 7,0. A pesar de las diferencias encontradas en ambos casos, ambos representan cambios en la estructura de las BSAs que forman parte de la NP.

Otros autores han estudiado el comportamiento de la BSA en diferentes condiciones y los cambios estructurales que estas generan en la proteína. Michnik et al., 2005 describió los diferentes estados en los que se encuentra la albúmina a diferentes valores de pH por medio de desnaturalización térmica. Entre los valores de pH 4,5-7,0, la BSA adopta su estructura nativa denominada "N". Si el valor de pH se encuentra entre 4,5-4,0, se produce una transición a una estructura de rápida migración (F), comenzando así la pérdida de estructura secundaria de la proteína. La transición se completa por valores de pH menores a 4,0. A partir de pH 3,9 la forma predominante se denomina "E", estructura totalmente expandida de la albúmina. En este estado la albúmina no posee estructura secundaria alguna (Michnik et al., 2005) (Esquema 10).

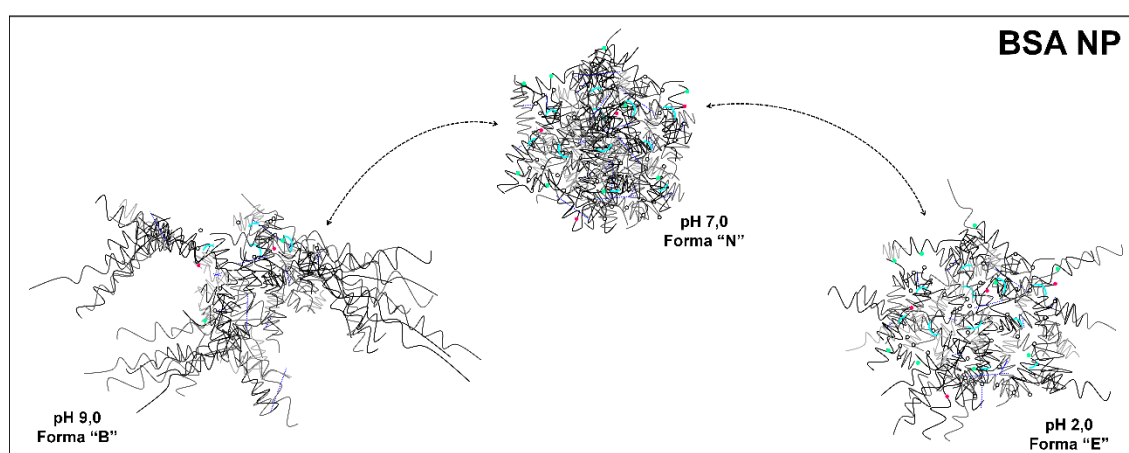


Esquema 10 Esquema de los diferentes estadios conformacionales de las BSAs según el pH de la dispersión en donde se encuentra. A pH 7,0 las proteínas se encuentran en su estado nativo o forma N, mientras que a pH 2,0 las albúminas se encuentran totalmente desnaturalizadas o en su forma E, haciendo referencia al estado completamente extendido que adopta su estructura. A pH 4,0 la proteína experimenta un cambio conformacional rápido llamado "F", en donde su estructura comienza a desplegarse. A pH 9,0, las BSAs se encuentran en una forma B, haciendo referencia a un estado en el cual parte del agregado ha perdido su conformación nativa, pero no se encuentra en un estado completamente extendido o desnaturalizado como a pH 2,0.

Los resultados de Barbosa et al., 2010, son coincidentes con estos autores, pero agrega la descripción de un estado de estructura diferente al nativo de la albúmina entre los valores de pH 8,0-9,0. Este estado es denominado “B” por transición básica. En este caso, la pérdida de estructura es parcial, es decir, su estructura se torna más laxa sin generar pérdida total de esta (Esquema 10).

Las alteraciones de estructura de la BSA NP se deben a cambios en el entorno detectados principalmente por los grupos Trps. Especialmente en espectroscopia de fluorescencia dicho aminoácido actúa como un reportero sobre la estructura de la BSA NP. De acuerdo con los resultados obtenidos de este capítulo, se intenta describir los cambios en el entorno de estos grupos de la NP en las diferentes condiciones experimentales.

La BSA NP en condiciones ácidas (pH 2,0) presenta un estado máximo de desnaturalización en el cual se encontraría totalmente desplegada y con un máximo de asimetría en su estructura comparada con los datos experimentales obtenidos para la BSA en solución (Barbosa et al., 2007; Zhang et al., 2007). La desnaturalización que se considera es debido a que durante la formación de la NP, las proteínas experimentaron alteraciones estructurales entre las que se encuentra la exposición de sus regiones hidrofóbicas hacia la superficie, lo cual sugiere que dichas moléculas se encuentran de manera parcial en un estado “E” (Siri et al., 2016). De acuerdo con esta propuesta, Li et al., 2016, describieron un aumento de concentración de las estructuras lámina- β y una disminución del dominio α -hélice en la albúmina expuesta a condiciones ácidas por debajo de pH 2,0.



Esquema 11 Esquema de los diferentes estadios conformacionales de las BSA NPs según el pH de la dispersión en donde se encuentra. A pH 7,0 las NPs se encuentran en su estado nativo o forma N, mientras que a pH 2,0 las NPs se encuentran totalmente desnaturalizadas o en su forma E, haciendo referencia al estado completamente extendido que adopta la estructura del agregado. A pH 9,0, las NPs se encuentran en una forma B, haciendo referencia a un estado en el cual parte del agregado ha perdido su conformación nativa, pero no se encuentra en un estado completamente extendido o desnaturalizado como a pH 2,0.

Esto se puede comprobar por medio de un desplazamiento hacia el azul por espectroscopía de fluorescencia y diferentes cambios espectrales observados por espectroscopía FTIR. En este último se observaron desplazamientos del espectro hacia frecuencias de onda menores, que sugieren un comportamiento similar en la NP a estos pH ($1055 - 1650 \text{ cm}^{-1}$). A pH 2,0, el desplazamiento del contenido α -hélice de la BSA NP hacia frecuencias de onda menor resulta de 12 cm^{-1} , sugiriendo pérdida de estructura, mientras aparecen señales adjudicadas a la estructura lámina- β (Figura 5b). El conjunto de estos resultados marcan un posible estado “E” propio de la NP. Si esta afirmación es correcta y considerando que una pérdida de estructura equivale a pérdida de funcionalidad, la BSA NP entonces no resultaría viable a pH ácidos.

A pH 9,0 se observa un menor grado de desnaturalización de la NP que a pH 2,0. El espectro de FTIR de la NP a dicho pH describe tanto un desplazamiento hacia el azul (8 cm^{-1}) de la señal correspondiente al contenido α -hélice como un aumento de la señal que corresponde a la estructura lámina- β (Figura 5c). Este desplazamiento importante de la señal que se observa es indicativo de agregación (Xie et al., 2012), mientras que el menor desplazamiento del contenido de α -hélice sugiere una leve alteración de dicho dominio secundario. El cambio en la estructura y por consiguiente, su desnaturalización a estos pH alcalinos, no es tan marcado como los cambios a pH 2,0. Entre los valores 8.0 – 9.0 la BSA experimenta un cambio desde la forma nativa (N) a una forma más extendida (B) con un incremento del área superficial (Michnik et al., 2002; Barbosa et al., 2007). En este punto, hay varias regiones de la estructura de la BSA que se encuentran alteradas, pero no la totalidad de la molécula. En vistas de esto, se sugiere un comportamiento similar para la BSA NP, en la que esta se encuentre en su propia forma “B” en donde no presenta una estructura totalmente extendida, pero tampoco una estructura totalmente agregada (Esquema 11).

Los resultados obtenidos por fluorescencia concuerdan con lo visto por espectroscopia FTIR. Gelamo et al., 2002 establece una correlación entre el carácter hidrofóbico en el ambiente que rodea al Trp y el desplazamiento que puede experimentar el espectro: a mayor corrimiento hacia el azul, mayor es la hidrofobicidad.

A pH ácido, el desplazamiento hacia el azul del espectro de la BSA NP es de 7 nm, mientras que a pH 9,0, el desplazamiento es de 2 nm (Figura 5d). Las diferencias entre los desplazamientos, sugiere diferentes alteraciones en la estructura de la BSA NP a cada pH. Siguiendo el razonamiento planteado por Gelamo et al., 2002, la BSA NP presenta un mayor carácter hidrofóbico a pH 2,0 que a pH 9,0.

De acuerdo con esto, a valores ácidos de pH, la NP tendrá un mayor grado de desnaturalización, reforzando el concepto de que se encuentra en una forma “E”. Por otro lado, el menor grado de desnaturalización observado a pH alcalino refuerza el concepto de que la NP presenta una estructura en una forma “B” a este pH, coincidiendo con lo observado por medio de la espectroscopia FTIR. Si la pérdida de estructura se relaciona con una pérdida de función de la molécula, se asume que la NP no podrá llevar a cabo su función de nanovehículo a pH 2,0, por lo que no se recomienda su uso para una administración oral.

- *Estabilidad de la NP en soluciones de caótrópos: Urea, SDS y Tween 80%*

Se utilizaron diferentes soluciones de agente caotrópicos con el fin de estudiar si es posible una interacción entre BSA NP y drogas solubles en agentes orgánicos como SDS. Para ello se eligieron soluciones con concentraciones crecientes de SDS, urea y Tween 80 % v/v. Se analizó el cambio de estructura de las NPs dependiendo de la presencia de tres especies diferentes en la soluciones: (1) el nanovehículo en estado nativo, (2) el complejo formado por nanovehículo y agente caotrópico, y (3) el nanovehículo en su estado de máxima desnaturalización (Gelamo et al., 2002). Un desplazamiento de longitudes de onda del espectro de emisión fluorescente tanto hacia el rojo o azul, sugiere un cambio en el carácter hidrofóbico del Trp_{BSA NP}. Por su parte, un aumento o disminución en la intensidad de la emisión de fluorescencia sugiere mayor o menor exposición del Trp_{BSA NP} hacia la superficie de la NP (Barbosa et al., 2010; Gelamo et al., 2002; Zhang et al., 2007).

A medida que se incrementa la concentración de SDS, el máximo de fluorescencia del Trp se desplaza hacia menores longitudes de onda desde 335 a 325 nm, y una disminución de la intensidad de la fluorescencia del 6 % con respecto a la inicial (Figura 6a-b). Cuando la relación [SDS]/ [BSA NP] es de 1603, ocurre un desplazamiento desde 335 nm a 327 nm del máximo de fluorescencia con una disminución de la intensidad del 20 % con respecto a la inicial. Estos cambios denotan un microambiente más hidrofóbico rodeando al Trp_{BSA NP} junto con una menor exposición del aminoácido al solvente (Figura 6b). Hacia el final del experimento ([SDS]/ [BSA NP]= 5617) el corrimiento hacia la zona del azul es desde 335 nm a 325 nm, junto con una disminución en la emisión de fluorescencia del 6 %. En este punto el Trp_{BSA NP} se encuentra en una posición con mayor exposición hacia la superficie que en el punto anterior, y con un aumento en el carácter hidrofóbico (Figura 6b).

A medida que aumenta la concentración de SDS en las muestras que contiene BSA NP, ocurre un cambio de conformación en la estructura de la NP: aumenta la hidrofobicidad en la vecindad del Trp, y una reorganización de los grupos cercanos a dicho aminoácido haciendo que éste también varíe su posición con respecto al solvente (Figura 6a). La reorganización ocurre en dos pasos; primero disminuye la exposición del Trp_{BSA NP} hacia el solvente, hasta llegar a un máximo de protección, hacia el final del ensayo, en el interior del nanovehículo (Equema 11).

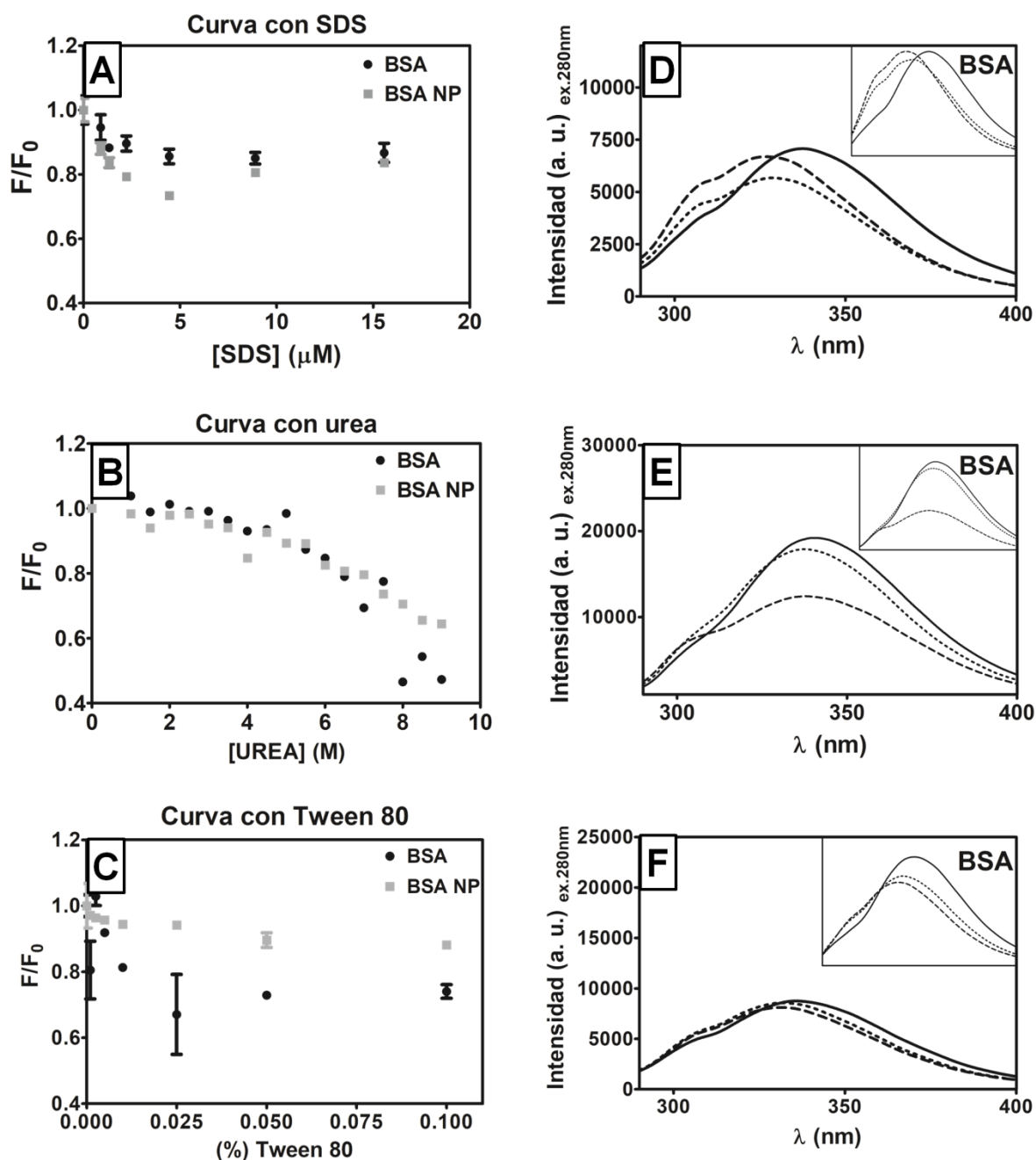


Figura 6 Comportamiento de la BSA NP bajo la influencia de diferentes caótrofos. (a-b) SDS; (a) curva de desnaturación a concentraciones crecientes de SDS donde [SDS]/ [BSA NP] = 0.0 – 5617; (b) espectros de emisión de fluorescencia de las tres especies principales en diferentes momentos del ensayo de la BSA NP en dispersión SDS. Se representan los espectros de emisión de fluorescencia de las tres especies

principales en diferentes momentos del ensayo de la BSA en dispersión SDS en el cuadro superior derecho. (c-d) urea; (c) curva de desnaturalización a concentraciones crecientes de urea donde $[urea]/[BSA\ NP] = 0.0 - 7.2e13$; (b) espectros de emisión de fluorescencia de las tres especies principales en diferentes momentos del ensayo de la BSA NP en dispersión de urea. Se representan los espectros de emisión de fluorescencia de las tres especies principales en diferentes momentos del ensayo de la BSA en dispersión de urea en el cuadro superior derecho. (e-f) Tween 80 %; (e) curva de desnaturalización a concentraciones crecientes de tween 80 % donde $[tween\ 80\ \%]/[BSA\ NP] = 0.0 - 1.3e06$; (b) espectros de emisión de fluorescencia de las tres especies principales en diferentes momentos del ensayo de la BSA NP en dispersión de tween 80 %. Se representan los espectros de emisión de fluorescencia de las tres especies principales en diferentes momentos del ensayo de la BSA en dispersión de tween 80 % en el cuadro superior derecho. Las tres especies representadas en (b; d; f) representan a la BSA NP en su estado nativo (línea llena); complejo BSA NP-caótopo, en donde la BSA NP comienza a experimentar cambios conformacionales (línea punteada); BSA NP en el máximo estado de desnaturalización alcanzado en base a la máxima concentración de caótopo (línea de puntos).

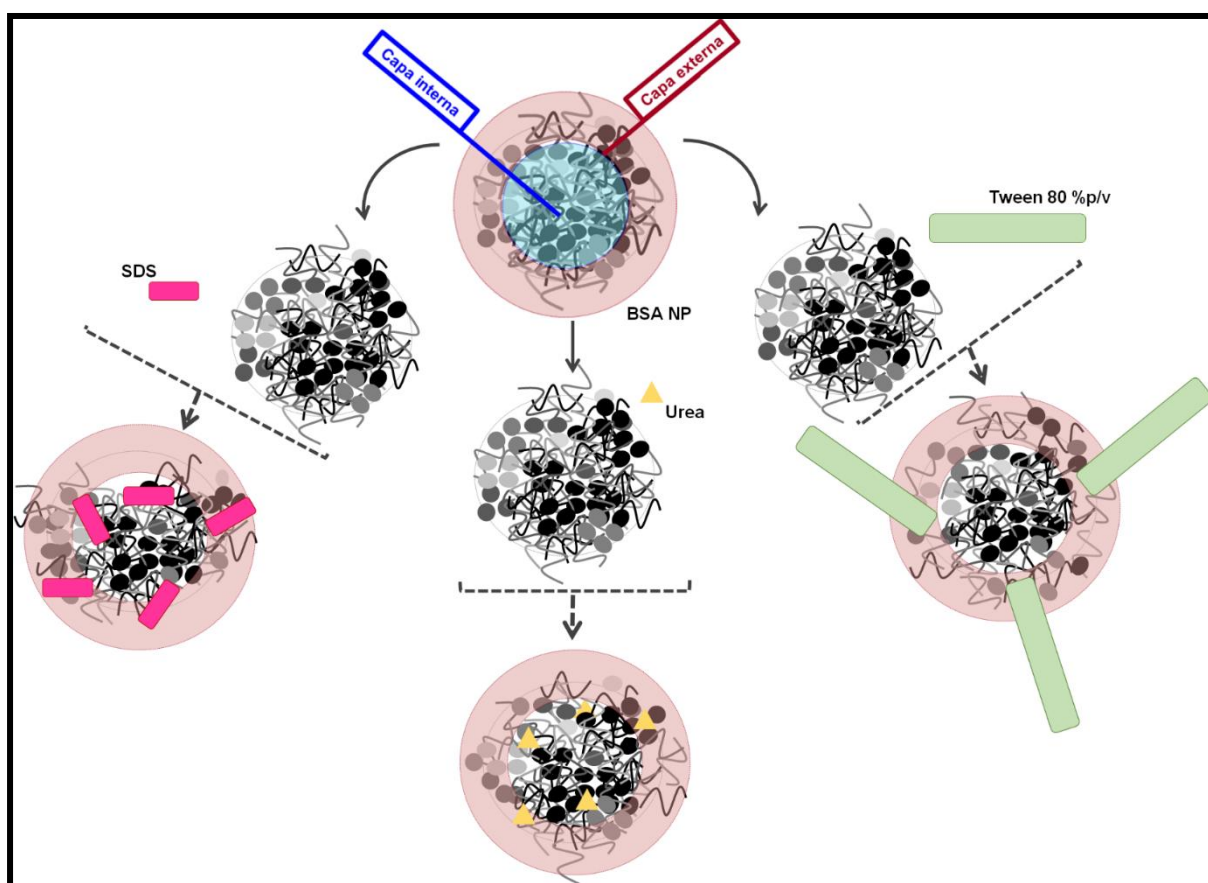
A medida que se incrementa la concentración de urea, el máximo de fluorescencia del Trp se desplaza hacia menores longitudes de onda desde 340 a 337 nm, teniendo a su vez, una disminución de la intensidad de la fluorescencia del 8 % inicial (Figura 11 c-d). Cuando la relación $[urea]/[BSA\ NP]$ es de $7,2\ e13$, ocurre un desplazamiento desde 340 nm a 336 nm del máximo de fluorescencia con una disminución de la intensidad del 35 % con respecto a la inicial. Estos cambios denotan un microambiente más hidrofóbico rodeando al $Trp_{BSA\ NP}$ junto con una menor exposición del aminoácido al solvente (Figura 6c). Hacia el final del experimento ($[urea]/[BSA\ NP] = 1,6\ e14$) el corrimiento hacia azul es desde 340 a 337 nm, junto con una disminución en la emisión de fluorescencia del 8 %. En este punto el $Trp_{BSA\ NP}$ se encuentra en una posición con menor exposición hacia la superficie que en el punto anterior, pero con un carácter hidrofóbico del microambiente rodeando al $Trp_{BSA\ NP}$ similar (Figura 6c). Por ende, los grupos cercanos a donde está situado el $Trp_{BSA\ NP}$ se reorganizan de tal manera que el $Trp_{BSA\ NP}$ quede hacia el centro del nanovehículo.

A medida que aumenta la concentración de urea en las muestras de BSA NP, ocurre una reorganización de los grupos cercanos al $Trp_{BSA\ NP}$ variando su posición con respecto al solvente (Figura 6d). Sin embargo, el carácter hidrofóbico del bolsillo en donde se encuentra el $Trp_{BSA\ NP}$ no cambia más su estructura a lo largo del ensayo (Esquema 12)

A medida que se incrementa la concentración de Tween 80, el máximo de fluorescencia del $Trp_{BSA\ NP}$ se desplaza hacia menores longitudes de onda desde 335 a 330 nm, teniendo a su vez, una disminución en la intensidad de la fluorescencia del 8 % inicial (Figura 6e-f). Cuando la relación $[Tween\ 80]/[BSA\ NP]$ es de $1,8\ e06$, ocurre un desplazamiento desde 335 nm a 332 nm del máximo de fluorescencia con una disminución en la intensidad del 3 % con respecto a la inicial. Estas alteraciones en el espectro no representan un microambiente más hidrofóbico rodeando al $Trp_{BSA\ NP}$, ni una menor exposición del aminoácido al solvente (Figura 6f). Hacia el final del experimento

([Tween 80]/ [BSA NP]= 1,8 e07) el corrimiento hacia azul es desde 335 a 330 nm, junto con una disminución en la emisión de fluorescencia del 8 %. Estos cambios no denotan un microambiente más hidrofóbico rodeando al Trp_{BSA NP}, o una menor exposición del aminoácido al solvente (Figura 6f).

A medida que aumenta la concentración de Tween 80 en las muestras de BSA NP no se produce alteración alguna en la estructura de la NP. El cambio hacia el azul que ocurre a lo largo del experimento, no muestra cambios significativos en el carácter hidrofóbico del bolsillo en donde se encuentra el Trp_{BSA NP}, ni tampoco incidencia sobre la exposición del Trp_{BSA NP} (Figura 6f) (Esquema 12).



Esquema 12 Ilustración de la BSA NP una vez expuesta a soluciones de Tween 80 %p/v (verde); urea (amarillo) y SDS (rosa). Se centra la atención en el efecto del caotropo en ambas capas de la BSA NP (interna y externa)

La BSA NP resultó ser sensible a la presencia de urea en la dispersión (Esquema 11). Se observó que a concentraciones crecientes del agente, el microambiente rodeando el Trp_{BSA NP} aumentaba su carácter hidrofóbico, mientras que el aminoácido se ocultaba más de la superficie de la NP (su emisión fluorescente disminuyó en un 35 %) (Figura 11c-d). La disminución de la emisión de fluorescencia puede estar relacionada con la repulsión electrostática entre los grupos cargados de la NP a los grupos iónicos del

surfactante y crece en función de concentraciones crecientes del mismo (Gelamo et al., 2007; Achilli et al., 2015). De ser así, la NP presentaría un comportamiento similar al de la BSA en una solución de urea. Entre los factores que pueden alterar la estructura de una proteína, como son temperatura, presión y urea, es esta última la que afecta en mayor grado a la albúmina (Hakawa et al., 1992). La razón es que los puentes de hidrógeno entre la NP y el agua, se desorganizan en presencia de urea, favoreciendo la desnaturalización proteica (Hakawa et al., 1992) (Esquema 12).

Otros agentes caotrópicos fueron utilizados, entre los que se encuentra el detergente no iónico Tween 80 % v/v, también conocido como Polisorbato 80. Es un compuesto utilizado en la industria alimenticia como aditivo alimentario con acción detergente. Tiene el poder de emulsionar y disolver grasas. Si bien la BSA NP presentó alteraciones en su estructura en una dispersión con dicho detergente, estas fueron menores que las observadas en la dispersión de urea (Esquema 12).

El efecto que el Tween 80 % v/v tuvo sobre la NP puede explicarse en términos de tamaño y carga. El detergente es una molécula de gran tamaño por lo que presenta dificultades a la hora de acceder a las capas más internas de la NP: el efecto desnaturalizante llega solamente a las capas superficiales de ésta. La carga del detergente también es responsable del poco efecto sobre la NP. Al ser un agente no iónico y al poseer gran tamaño, resulta difícil desestabilizar a la NP: la partícula además, puede no tener suficientes grupos no cargados en su superficie, dificultando aún más la tarea del Tween 80 % v/v (Esquema 12). Por el contrario, Arakawa et al., 1999, estudiaron el efecto de este detergente como protector de la albúmina en una desnaturalización térmica. Demostraron que la función de protección era parcial, ya que alteraba el comportamiento de la proteína durante la experiencia. En este sentido, la NP presenta una ventaja por sobre la BSA en cuanto a estabilidad en una solución de Tween 80 % v/v. En cambio, el efecto de un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS), según Hakawa et al., 1992, no es tan marcado debido a que solamente ataca las regiones hidrofóbicas de la BSA, por lo que solamente desnaturaliza estas regiones. Para la BSA NP el efecto del SDS es similar al de la BSA (Esquema 12).

Tanto la urea como el SDS poseen tamaño pequeño para reaccionar con los sitios de la NP desnaturalizándola. Ambas son moléculas relativamente pequeñas comparadas con el Tween 80 % v/v, por lo que pueden cambiar la hidrofobicidad cercana al Trp_{BSA NP}, así como su exposición con respecto a la superficie de la NP. También hay que considerar que el SDS es una molécula cargada, lo que representa una ventaja para penetrar hacia las capas internas de la NP desestabilizando su estructura (Esquema 12).

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, drogas cuya disolución se llevan a cabo en urea o Tween 80 % v/v pueden ser encapsuladas por la NP para su vehicularización. Ambas soluciones no indujeron grandes alteraciones conformacionales en la BSA NP, lo que sugiere que su funcionalidad, a priori, se conservará.

La urea aumenta levemente el carácter hidrofóbico del bolsillo donde se encuentra el Trp (desplazamiento hacia el azul de 3 nm) y disminuye la exposición del aminoácido hacia la superficie en un 35 %, lo cual no necesariamente sería una desventaja con respecto a la funcionalidad del sitio (Figura 6d). Las drogas hidrofóbicas presentan una predilección por los sitios hidrofóbicos, por lo que este cambio sería una ventaja del nanovehículo dependiendo de la droga a transportar. Al utilizar Tween 80% v/v como agente desestabilizador, no se observó una alteración conformacional de la BSA NP: el microambiente del Trp no cambia su carácter hidrofóbico a lo largo del ensayo, así como tampoco se altera la posición del aminoácido Trp con respecto a la superficie de la NP (Figura 6f). Por lo que se infiere que no se verá afectada la función de la NP.

El SDS en cambio, altera en gran medida la conformación de la NP, por lo que podría afectar seriamente la función del sitio de unión (Esquema 12). El desplazamiento hacia el azul que se observa es el mayor (10 nm): el microambiente que rodea a los Trp de la BSA NP adquieren un carácter más hidrofóbico conforme aumenta la concentración del detergente, presentando un desplazamiento similar al que encuentra la NP en soluciones de pH ácidos (Figura 5c): corresponde a una estructura con forma "E". Asimismo, la exposición del Trp hacia el solvente es cada vez menor (Figura 6a). La BSA NP no puede usarse como transporte de fármacos solubles en SDS.

- *Estabilidad de las NPs en soluciones con diferente Fuerza Iónica*

Para una administración IV, es necesario que la BSA NP sea estable en las concentraciones salinas semejantes a las que se encuentran tanto intra como extracelularmente. Se realizaron experimentos en los cuales se expuso a la NP a concentraciones de Na y K mayores a las que se encuentran en estos ambientes (Lodish et al., 2000). Se midió entonces, la degradación proteica como señal de desnaturalización en la BSA NP.

No se observó precipitación proteica significativa en las condiciones experimentales usadas (Figura 7). Se usó una concentración de sales de 1,9 M; esta es mayor que la que existe en los ambientes intra ([K+]= 400 mM; [Na+]= 50 mM) y extra celular ([K+]= 20 mM; [Na+]= 440 mM; Lodish et al., 2000). Esta, no fue suficiente para inducir

precipitación de la BSA NP. Estos resultados indicarían que la BSA NP no experimentó una alteración conformacional debido al cambio de la fuerza iónica del ambiente.

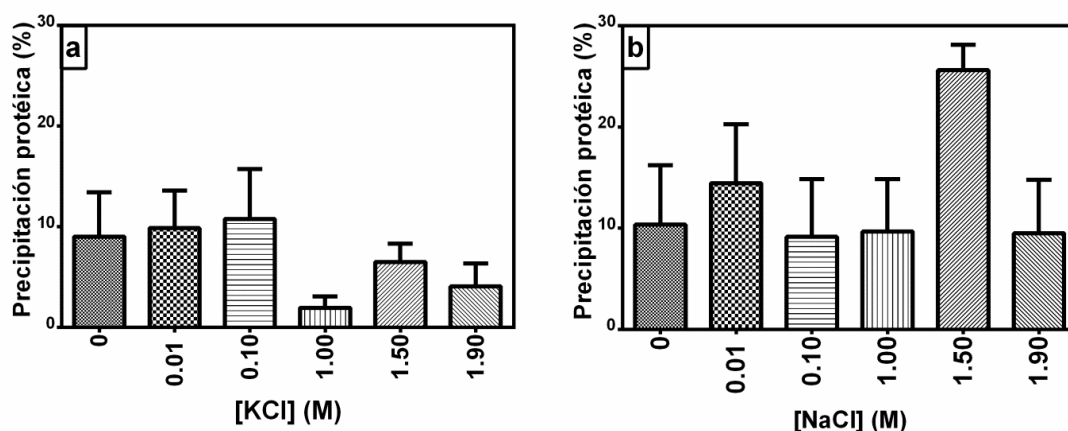


Figura 7 Se representan los porcentajes de proteína precipitada en la BSA NP de acuerdo a diferentes concentraciones de KCl (a), y NaCl (b). Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía con post test de Dunnett, $P < 0.05$ para cada caso (Control: BSA NP en PBS pH 7,0 sin tratar). Las medidas se realizaron por triplicado.

Estos resultados implicarían que la BSA NP va a ser estable en ambientes de alta concentración salina tanto celulares y extracelulares.

- *Estabilidad de la NP en dispersión en función del tiempo*

Un factor importante a tener en cuenta al trabajar con NPs es cuan estable será en la dispersión en la cual esta disuelta. Procesos de agregación y/o cambio de estructura al transcurrir un determinado tiempo puede resultar en pérdida de función de transporte de la NP. Resulta, por lo tanto, necesario estudiar la estabilidad de la BSA NP en la dispersión de PBS 30 mM, pH 7,0, medio utilizado para los ensayos.

Las soluciones de BSA NP en PBS 30 mM, pH 7,0 a 5 °C, a los días 0, 15, 30, y 60 del ensayo, fueron medidas mediante D.L.S., espectroscopía fluorescente y FTIR. Al inicio del ensayo (día 0) se realizaron las medidas de referencia para los días consecutivos de medida con los cuales comparar los cambios (Figura 8).

El radio hidrodinámico obtenido por D.L.S. de la BSA NP fue de 71,53 nm. Al finalizar el ensayo (día 60), el tamaño se incrementó en 100 veces: 7359,7 nm (Figura 8a), por lo que las NPs se agregan entre ellas. A los 15 días de comenzado el ensayo se observó el primer incremento en el tamaño. Sin embargo, este incremento no fue tan marcado como al día 60: 118,5 nm. A los 15 días se duplicó el tamaño de la NP. Al día 30 el tamaño de la NP se cuadruplicó con respecto al tamaño original c.a. 258,16 nm (Figura 8d).

Por espectroscopia de fluorescencia no se observaron desplazamientos en el espectro de la BSA NP, pero sí se observaron cambios en la emisión fluorescente (Figura 8b). Utilizando el espectro de BSA NP del día 0 como referencia, y comparándolo con aquellos obtenidos al día 15, 30, y 60, se observó una disminución de la emisión de fluorescencia del 75, 82, y 87 %, respectivamente. La disminución de la intensidad de fluorescencia está relacionada con la exposición del Trp hacia el solvente (Gelamo et al., 2002). Al no haber desplazamiento del espectro en su longitud de onda, se asume que el microambiente en el cual se encuentra el Trp no cambia su carácter de hidrofobicidad. Por ende, la disminución de la emisión de fluorescencia del Trp se debe exclusivamente a la agregación entre las NP al interactuar unas con las otras; mediante este proceso, el Trp de una NP al aproximarse al otro provoca una atenuación en la emisión de fluorescencia (Figura 8b; Esquema 13).

Para poder analizar lo que sucedía con la NP a través del tiempo mediante microscopía FT – IR, se siguieron los cambios en el máximo de 1654 cm^{-1} representativo del dominio α – hélice (Figura 8c). Dicho máximo es muy sensible a los cambios del ambiente en el cual se encuentra la nanopartícula. Si hubiere alteraciones de la estructura, este se verá reflejado en dicho máximo.

A los 15 días de haber comenzado el ensayo, se observa un desplazamiento del máximo hacia frecuencias de onda menores, llegando a los 1652 cm^{-1} (Figura 8c). El desplazamiento mencionado indica menor grado de libertad de movimiento de los grupos involucrados en el dominio α – hélice, lo que indica agregación de las NPs. Luego de los 15 días, no se observa cambios en el máximo del dominio de la BSA NP, manteniéndose en los 1652 cm^{-1} . El resultado obtenido respalda aquellos obtenidos por los ensayos de fluorescencia y D.L.S.: la mayor alteración de estructura se produce hasta el día 15, luego las NPs continúan agregándose, pero no hay cambio de estructura visible (Figura 8d).

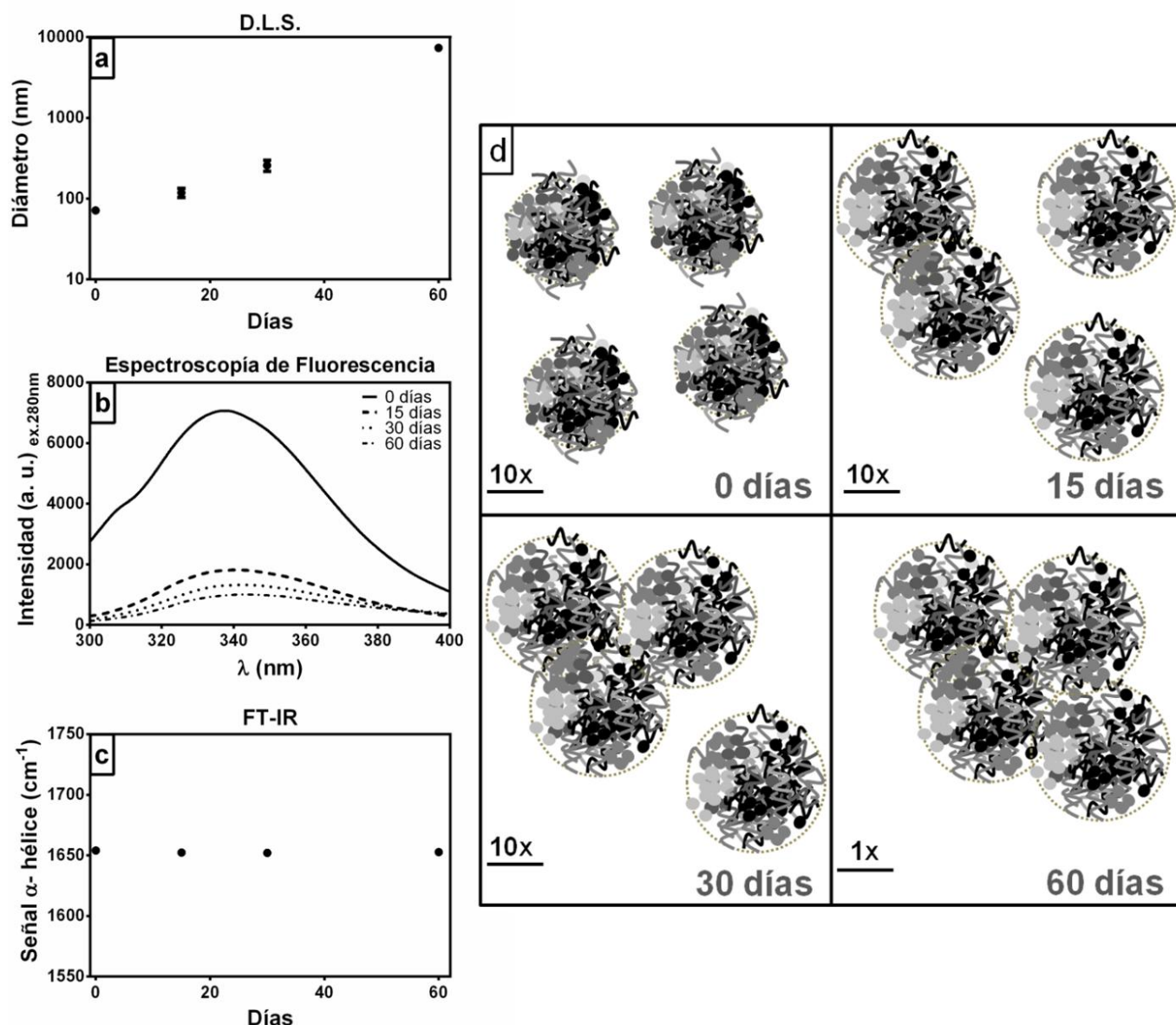
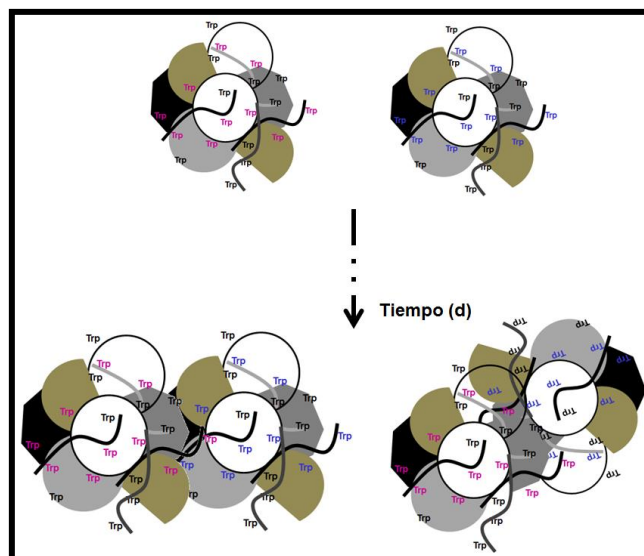


Figura 8 Estabilidad en el tiempo de la BSA NP medida por (a) DLS (*Dynamic light Scattering*); (b) espectroscopía de fluorescencia; (c) FTIR mostrando la absorbancia correspondiente a la señal de α -hélice. Los días de medición fueron a los días 0, 15, 30 y 60 del experimento. (d) Esquemas del comportamiento de la BSA NP según cambios en el tiempo

La BSA NP no es estable a partir de 15 días en una dispersión de PBS 30 mM, pH 7,0 a 5 °C. La dispersión coloidal presentó agregación de las NPs, lo que conlleva a una posible alteración de sus propiedades físico – químicas.

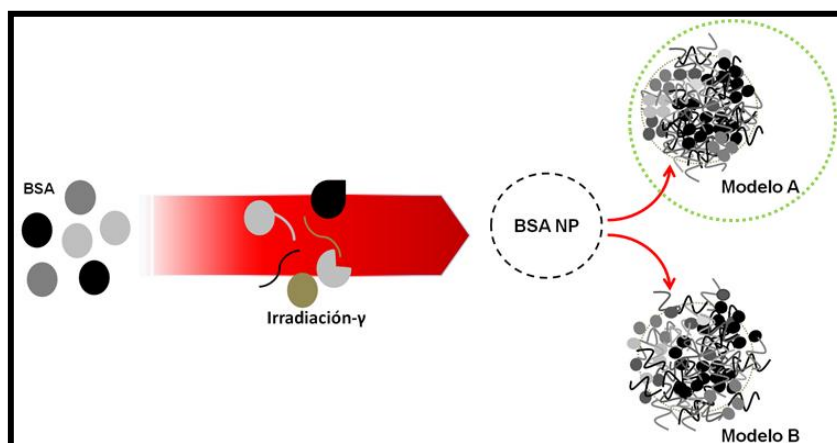
Estos resultados permitieron discernir cual de los dos modelos propuestos al comienzo del capítulo describía mejor la estructura de las BSA NPs (Esquema 9; Esquema 14). Si la BSA NP fuese un agregado de proteínas con una estructura más bien laxa, el Tween 80% v/v, podría alterar la estructura secundaria de la NP sin problema penetrar hasta el centro (*core*) desestabilizándolo. Los agentes iónicos tendrían aún más efecto del que

mostraron tener sobre las NPs, por lo tanto este modelo no se ajusta a lo observado en los ensayos, por lo que se descarta.



Esquema 13 Representación esquemática de la agregación y disminución de la fluorescencia de los Trp de la BSA NP a medida que transcurre el tiempo, NPs en dispersión de PBS 30 mM, pH 7,0.

Sin embargo, el modelo de un agregado de proteínas compacto resulta una explicación más acertada, ya que explicaría la mayor resistencia al cambio por parte de un detergente como el Tween 80 (molécula grande y de carga neutra). Es por esto que se descartó el modelo “B” de la BSA NP y se cree que las NPs responden a un modelo similar al “A” (Esquema 14).



Esquema 14 Ilustración de los modelos propuestos que podría adoptar el agregado de albúmina luego de la irradiación. Se circula con verde el modelo de estructura a tomar en base a los resultados discutidos en esta sección. **Modelo A:** BSA NP como agregado denso de moléculas de BSA en forma tanto nativa como desnaturizada. **Modelo B:** BSA NP como un agregado de moléculas de BSA laxo, en donde las moléculas de proteína se unen solo en la superficie, siendo hueco en su interior

2. 2 Liofilización de la BSA NP

Introducción

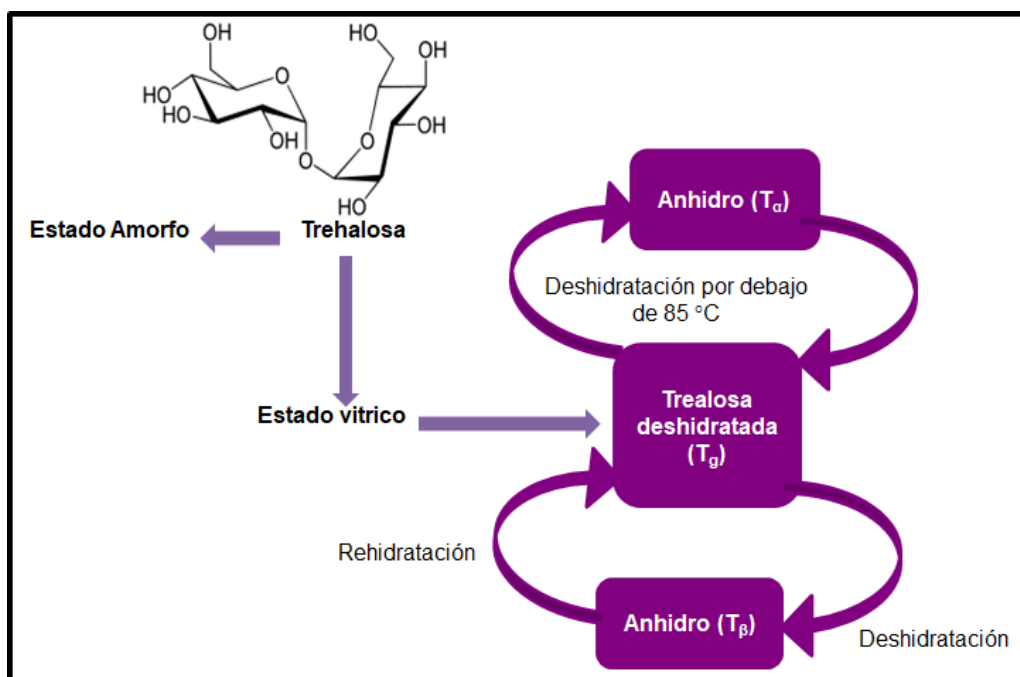
Se realizaron ensayos de liofilización con el fin de ponerlo a prueba como método práctico y útil de almacenamiento a largo plazo de la BSA NP, previniendo así la desnaturalización de la NP. A su vez, el método es útil para controlar estabilidad del tamaño de la BSA NP.

La liofilización es un método por el cual se remueve el solvente de una muestra congelada por medio de la sublimación. Se utiliza para mantener estables materiales tales como proteínas y productos biotecnológicos: como un método para preservar a largo plazo una muestra determinada. (Constantino et al., 2001; Chang et al., 2005).

Sin embargo, durante este proceso las proteínas pueden experimentar degradación o alteración de su estructura. Por ello se usan estabilizadores, que son moléculas que se usan específicamente para disminuir las condiciones de estrés durante la liofilización (Chang et al., 2005; Kumar et al., 2008).

Se propone entonces la liofilización de la NP como una manera de mantener estable a la NP por un período de tiempo prolongado usando un estabilizador, tanto su estructura como su función. El estabilizador elegido es trehalosa. Este trehalosa es un disacárido que presenta una unión α - α -1,1-glucosídica entre dos unidades de glucosa. Posee la propiedad tanto de proteger a la célula de disrupción celular como de ser antioxidante. En esta oportunidad es utilizado como crioprotector para la NP dado que el trehalosa preserva su tamaño y estructura original luego de congelar (Constantino et al., 2001). El Esquema 15 describe en forma resumida como es que la trehalosa cumpliría su función de crioprotector.

La trehalosa presenta dos formas polimórficas: uno amorfo y otro deshidratado. La trehalosa deshidratada puede dar lugar a dos anhidros; α y β . Cada uno de ellos es capaz mediante rehidratación de volver al estado original (hidratado). Esto último es lo que hace de la trehalosa un crioprotector eficiente. Además, la trehalosa es capaz de reordenar las moléculas de agua y disminuir el punto de congelación de la muestra, aumentando la estabilidad de la misma.



Esquema 15 Esquema resaltando las propiedades de la trehalosa como crioprotector.

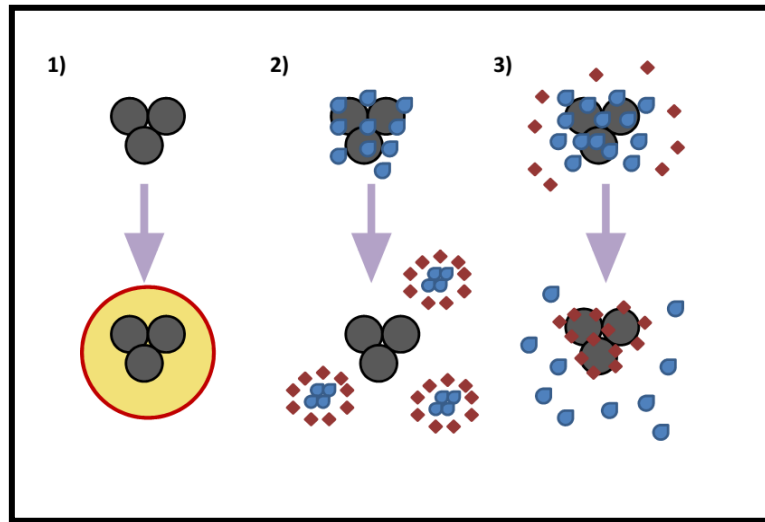
Los posibles mecanismos de acción de la trehalosa son tres (Esquema 16):

- Teoría Vítrica (1): La trehalosa posee una temperatura de transición hacia una fase más vítrea en la que no hay formación de cristales. Es entonces dentro de la red formada, que la molécula gana estabilidad.
- Teoría de Exclusión Preferencial (2): Aquí no hay interacción entre la molécula y el trehalosa. Aquí la trehalosa encierra volúmenes de agua en esferas para así poder estabilizar la molécula.
- Teoría del Reemplazo de Agua (3): La interacción es entre la trehalosa y la molécula. La trehalosa genera puentes de hidrógeno con la molécula desplazando el agua para poder estabilizar la molécula.

Para poder estudiar la eficiencia de la liofilización en la NP, se realizan dos condiciones experimentales:

- a- BSA NP disuelta en buffer,
- b- BSA NP disuelta en agua MQ con concentraciones crecientes de trehalosa.

Las BSA NPs resultantes de cada procedimiento experimental se estudiaron por técnicas de microscopía, D.L.S, Potencial Z y fluorescencia. El protocolo por el cual se preserva la estructura de las BSA NPs será elegido luego para realizar los ensayos de funcionalidad de las NPs como vehículos de transporte de drogas mediante la unión de una sonda fluorescente: Merocianina (MC540).



Esquema 16 Posibles mecanismos por los que actúa la trehalosa

Materiales y Métodos

- *Liofilización*

El proceso de liofilización se llevó a cabo en un equipo Labconco Freeze Dry System/Freezone 4, 5. Se dejaron las muestras durante 24 h llegando a un vacío menor a 133 μ bar. Las muestras se prepararon de dos maneras diferentes:

- Una dispersión de BSA NP 555 nM en PBS 30 mM, pH 7,0 fue congelada a -80 °C 24 hr anterior a la liofilización. Luego de liofilizarse se resuspendió en el mismo buffer.
- La dispersión BSA NP luego de su irradiación fue eluida por una columna con Sephadex PD-10 para cambiar su solvente a agua miliQ. Luego se agregó a cada muestra una concentración creciente de trehalosa, manteniendo constante la concentración de BSA NP en 138,75 nM. La concentración de trehalosa se varió entre 0,0 y 400 μ M de acuerdo a la ecuación eq. 1.

(eq. 1) $R = [\text{Trehalosa}] / [\text{BSA NP}]$

- *Potencial Z y tamaño de la nanopartícula*

Se midió 1 ml de muestras de soluciones BSA NP-Lyo; BSA NP-Lyo-MQ y BSA NP-Lyo-T en una dilución final de 1 en 10, partiendo de soluciones 555 nM. Las mediciones se realizaron en un analizador de tamaño de partículas y analizador de carga 90 Plus/Bi-MAS, cuya fuente de luz laser de 632,8 nm. Las muestras se midieron a 90 grados del ángulo de dispersión, 25 °C y aplicando una función de autocorrelación *ad hoc*. Se tomó el promedio de 5 corridas con un índice de refracción de 1,45. El ensayo se realizó por triplicado en cada caso.

- *Microscopia Electrónica de Barrido (S.E.M)*

Las microscopias fueron realizadas en un microscopio electrónico SEM- Carl Zeiss NTS-SUPRA 40 (Centro de Microscopia Avanzada, Pabellón I, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Ciudad Universitaria, UBA, Buenos Aires, Argentina).

- *Microscopia Electrónica de Transmisión (T.E.M.)*

Las microscopias se obtuvieron en un microscopio Philips High Resolution de Microscopia Electrónica de Transmisión EM 10 A/B 60 KV (Centro de Microscopia

Avanzada, Pabellón I, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Ciudad Universitaria, UBA, Buenos Aires, Argentina). A las muestras se les realizó una tinción previa con acetato de uranilo.

- *Microscopia de Fuerza Atómica (A.F.M.)*

La muestra liofilizada fue analizada en un microscopio de Fuerza Atómica AFM-DI-VEECO-MMAFM Nanoscope III (Centro de Microscopia Avanzada, Pabellon I, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Ciudad Universitaria, UBA, Buenos Aires, Argentina). Diferentes campos de las muestras fueron tomados a medida que fue posible. La magnificación a usar fue variando para asegurar tener variabilidad de fotografías.

- *Fluorescencia*

Soluciones 2,5 μM de BSA y 1,2 nM BSA NP en concentración final fueron medidas en un fluorómetro SCINCO S2, donde la longitud de onda de excitación (λ_{ex}) fue de 295 nm y la excitación (λ_{em}) de 337 nm. Las rendijas del fluorómetro tuvieron una abertura de 2,5 nm, con una velocidad de 60 nm/min y dentro del rango de 290 a 400 nm. Una vez más la concentración de trehalosa fue de concentraciones crecientes. Se realizó el ensayo por triplicado. Para el análisis de los gráficos se utilizó el software GraphPad Prism 5.0 v.

- *Detección de grupos Tiolatos de la NP*

Para este ensayo se utilizaron las muestras BSA NP, BSA, BSA NP-Lyo y BSA NP-Lyo-T. El protocolo seguido es el mismo descripto en el Capítulo 1 (página 42)

Resultados y Discusión

- *Potencial Z y Tamaño de las NPs*

Para caracterizar el producto liofilizado (BSA NP liofilizada en buffer, ó en miliQ con concentraciones crecientes de trehalosa), se estudió su diámetro hidrodinámico y su valor de potencial Z. Como se vió anteriormente en el Capítulo 1, el valor del potencial Z obtenido para la BSA NP sin liofilizar es de -25 mV, para aquella liofilizada en PBS, (BSA NP-Lyo), su valor es de -37 mV, mientras que el de la BSA NP-Lyo-MQ es de -28 mV. Al liofilizar las NPs en agua miliQ con concentraciones de trehalosa crecientes (BSA NP-Lyo-T), el valor de su potencial Z cambia a -20 mV (Tabla 8).

Nuestro objetivo fue obtener BSA NPs que luego de liofilizarse conserven estructura y función a las BSA NPs antes de la liofilización. Por ende, si las NPs en cuestión tienen un valor de potencial Z suficiente (-20 o más para las NP), tenderán a repelerse entre ellas, evitando así la agregación. Pero si su módulo de potencial Z es menor, entonces tenderán a agregarse (Parajne et al., 2014). En base a lo observado, ninguna de las dispersiones estudiadas presentarán tendencia a agregarse (Tabla 8).

Tabla 8 Se detallan los valores del potencial Z de las diferentes muestras analizadas y comparadas. Cada valor responde a 10 escanéos llevados a cabo por medida.

Sample	/Z Potential/ (mV)
BSA	30.00 ± 0.00
<i>BSA NP</i>	24.99 ± 13.96
<i>BSA NP-Lyo</i>	37.05 ± 8.21
<i>BSA NP-Lyo-MQ</i>	27.87 ± 18.81
<i>BSA NP-Lyo-T 0.2</i>	24.03 ± 7.31
<i>BSA NP-Lyo-T 0.4</i>	20.08 ± 5.42

Mientras la BSA NP-Lyo presentó mayor polidispersidad en sus medidas de D.L.S (diámetro hidrodinámico), la BSA NP-Lyo-T presentó poblaciones más monodispersas (Figura 9a-b). Una de las razones de gran polidispersidad dentro del grupo de BSA NP-Lyo es que luego de la liofilización las muestras variaban en aspecto. Aquellas con apariencia más similar a talco resultaron de fácil re-suspensión en buffer, mientras que otras con aspecto símil-algodón resultaron más difíciles de resuspender. En este caso,

el proceso de liofilización no fue reproducible y por lo que no se preservó la estructura de las BSA NPs originales.

En la BSA NP-Lyo-T se pudo observar diferencias en cuanto a los tamaños obtenidos que resultaron en función de la concentración de trehalosa utilizada (Figura 9d). Aquellas muestras que poseen mayor desvío, son aquellas que presentaron mayor polidispersidad. Así mismo, se observó que la polidispersidad varió de acuerdo a la concentración del liopreservante utilizado. De acuerdo con bibliografía consultada, esto pudo deberse a que a concentraciones mayores (variable dependiendo de la muestra a liofilizar), la trehalosa pierde su capacidad de lio y criopreservante. Su capacidad para absorber humedad y así evitar la formación de cristales se ve comprometida, generando el efecto contrario, favoreciendo el fenómeno de agregación (Jain et al., 2009).

A pesar de que la presencia de diferentes concentraciones de trehalosa indujo diferentes tamaños de NPs, no se observó una tendencia determinada. La relación que mostró el mayor éxito resultó ser aquella que tiene una relación trehalosa/ NP= 325. Esto quiere decir que por cada un mol de BSA, hay 325 moles de trehalosa en solución; obteniéndose NPs de 70 nm.

Al estudiar en detalle tres muestras independientes, se observó que no hubo mayor polidispersidad (Figura 9b) y, que de haberla, esta fue menor a la presentada por BSA NP-Lyo (Figura 9a). La población con mayor tamaño alcanzada por BSA NP-Lyo-T, tuvo un diámetro menor a los 100 nm.

En contraste, cuando la liofilización se llevó a cabo en presencia de buffer y sin un liopreservante, los resultados que se obtuvieron no fueron reproducibles. Según Jain et al., 2009, explica que cuando se liofiliza sin la presencia de un estabilizador y en *buffer*, se pueden esperar ciertos cambios en la estructura y estabilidad de la muestra. El proceso de liofilización es un proceso en el cual tienden a aumentar las fuerzas hidrofóbicas; por ende, al utilizar *buffer* como solvente se puede alterar el pH de la muestra. La sal que queda al sublimar el agua puede hacer variar el pH de la dispersión después de liofilizar hasta dos puntos, hacia ambos extremos. Esto puede inducir una degradación y desnaturalización de la proteína. Además, puede favorecer el proceso de agregación. Solamente la remoción de agua puede generar cambios que alteran tanto la estructura como la estabilidad de la proteína (Kumar et al., 2009). Esta explicación describe la razón de la agregación entre BSA NP una vez que se resuspendió las muestras en este trabajo.

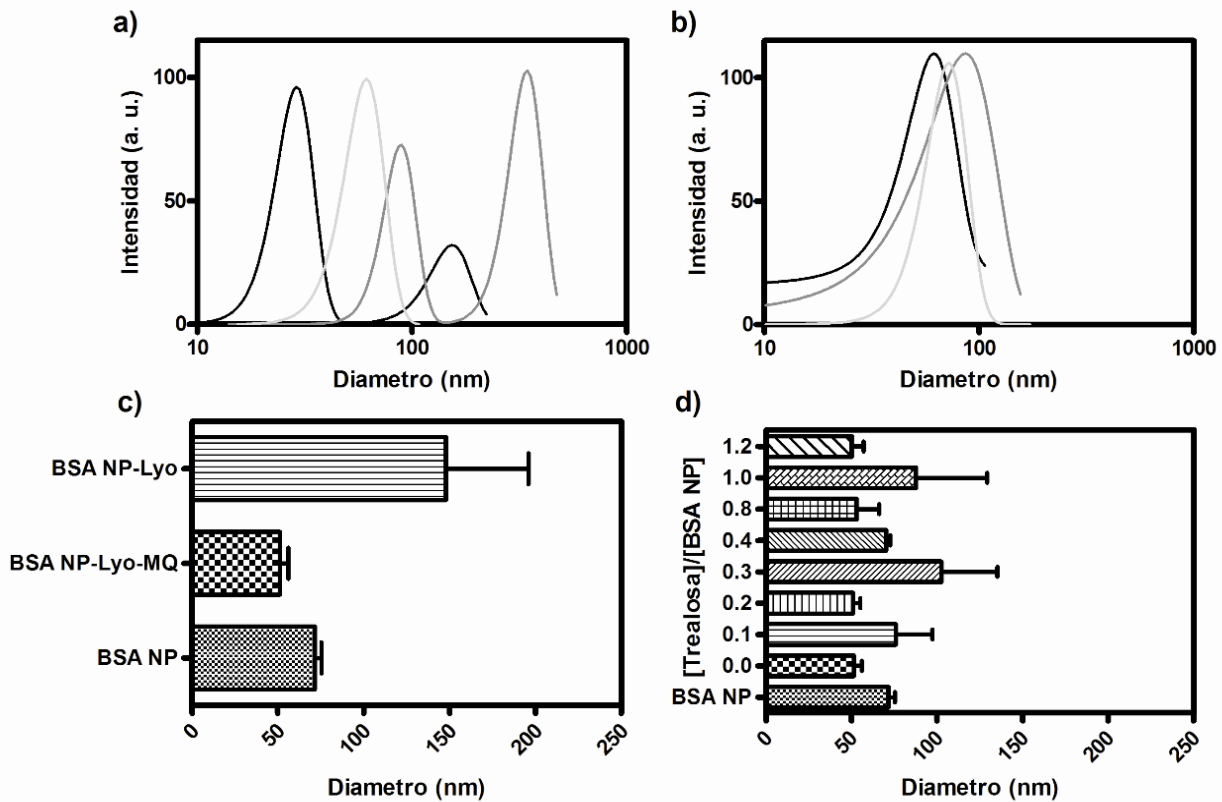


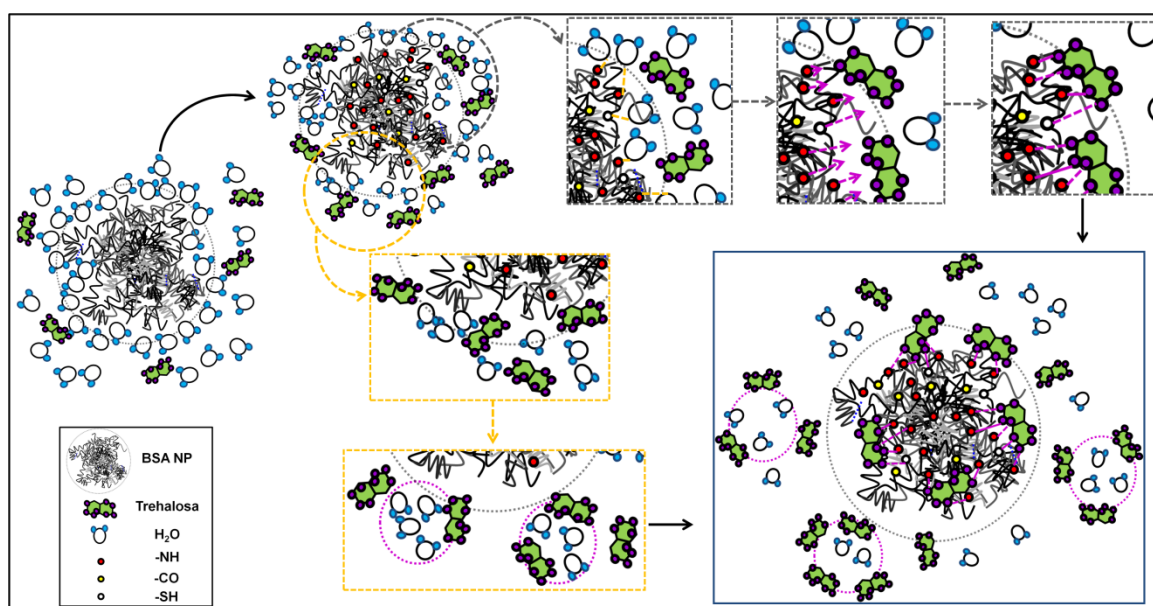
Figura 9 Medidas obtenidas por D.L.S de las muestras BSA NP-Lyo y BSA NP-Lyo-T. (a) Tamaño según diámetro (nm) de la BSA NP liofilizada en PBS, corresponde al promedio de 5 muestras independientes. (b) Diámetro (nm) de la BSA NP liofilizada en agua miliQ y con una concentración de trehalosa (100 μ M), y corresponde a un promedio de 5 muestras independientes. (c) Representa las diferencias en diámetro de BSA NP-Lyo_MQ y BSA NP-Lyo con la BSA NP antes de ser liofilizada. (d) Representa la diferencia entre las distintas BSA NP-Lyo-T en función de la concentración de trehalosa y comparada con la BSA NP antes de ser liofilizada. Las poblaciones descritas en (c) y (d) corresponden a las poblaciones mayoritarias encontradas en cada muestra analizada correspondiente a medidas de 5 muestras independientes.

En cambio, cuando se utilizó como solvente agua miliQ y trehalosa, lo que se obtuvo fue una población más definida (Gaussiana), en donde si hay agregados se dan en pequeñas poblaciones no detectables. Se considera, entonces a la trehalosa necesaria en su función de crio y lioprotector (Jain et al., 2009). Al liofilizar en ausencia de trehalosa y en agua miliQ, también se observó una baja dispersión del tamaño de las poblaciones. Esto puede deberse a que al no haber sales en la solución, el pH no varía de manera considerable generando así que no se produzcan grandes alteraciones de estructura de la NP.

Cuando la liofilización se realizó en agua miliQ, el tamaño de NP obtenido es de 51 nm (Figura 9c). Sin embargo, el tamaño de la NP original fue de 71 nm. Esto implica que por este método la NP no experimenta modificaciones mayores, pero se compacta en una estructura más hidrofóbica obteniéndose un tamaño ligeramente menor al original. Por lo tanto, su tamaño no se preserva. En cambio, utilizando trehalosa como lio y crioprotector, se llega a un tamaño de la NP similar al original (70 nm).

Con otras concentraciones de trehalosa se observaron variaciones en la polidispersidad de la muestra. Según Kumaer et al., 2009, a partir de cierta concentración la capacidad del trehalosa de absorber la humedad del ambiente previniendo la formación de cristales, se ve opacada por su propia tendencia a promover la formación de cristales. Por ello por lo obtenido por las mediciones de D.L.S, la mejor condición para la liofilización fue aquella en la que la trehalosa se encontró en una concentración 100 μM . Es decir, cuando está en una relación 1:4 con respecto a la BSA NP. Por encima de dicha condición se pudo apreciar mayores variaciones en la polidispersidad de la muestra. A menor concentración del trehalosa se pudo observar diversidad en el tamaño, resultando no similar al original de la NP.

La trehalosa cuenta con 8 grupos $-\text{OH}$ por moléculas, por lo que en una concentración de 100 μM del trehalosa habrá en la dispersión 800×10^{-6} moles de $-\text{OH}$. De los grupos funcionales expuestos hacia la superficie de las BSA NPs, solo los grupos $-\text{NH}$ y $-\text{CO}$ son capaces de formar puentes H con los $-\text{OH}$ de la trehalosa (Esquema 17). En la concentración a la que se encuentra la dispersión de NP al momento de liofilizar (308 nM), habrá un total de 2×10^3 grupos funcionales en la dispersión (6129 $-\text{NH}$ y $-\text{CO}$ por BSA NP). Esto quiere decir que con solo un 40 % de los grupos funcionales de las NPs bloqueados por la molécula de trehalosa, a razón de 8 grupos funcionales por molécula del trehalosa, se preserva la estructura original de esta (Esquema 17).



Esquema 17 Esquema descriptivo de las interacciones entre BSA NPs y las moléculas de agua y su reemplazo por moléculas de trehalosa. Los $-\text{OH}$ de la trehalosa pueden interactuar con un máximo de 8 grupos funcionales de las BSA NPs ($-\text{NH}$ y $-\text{CO}$) (ruta gris). A su vez las moléculas del trehalosa pueden

encerrar a las moléculas de agua *bulk*, evitando que al congelarse los cristales modifiquen la estructura de las BSA NPs (ruta amarilla).

Según Lins et al., 2004, la trehalosa compite con el agua por uniones del tipo puente de H con las NPs. Chang et al., 2005, también propone que el trehalosa tendría un tipo de mecanismo de acción, que se puede considerar también con las NPs: Reemplazo del agua y la Teoría de Exclusión Preferencial (Esquema 17). Teniendo en cuenta estos mecanismos y pensando en la conformación de las BSA que forman la NP no podemos descartar la posibilidad de que las NPs tendrán pocos grados de libertad modificando, por lo tanto, levemente su conformación nativa. De suceder esto, el cambio generado en las NPs sería despreciable.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección y considerando el tamaño original de la NP como de 70 nm y, de acuerdo con la teoría presentada por Erickson et al., 2009, se realizó un cálculo aproximado del peso molecular de las distintas NPs observadas en esta sección (Tabla 10).

Tabla 9 Valores del peso molecular de las NP según el tratamiento recibido. Cálculo basado en los valores obtenidos por DLS

Muestra	Peso Molecular (MDa)
BSA NP	148
BSA NP-Lyo-T	148
BSA NP-Lyo	8.0-750
BSA	66 E-03

- *Microscopia: T.E.M – S.E.M – A.F.M*

Se estudiaron las BSA NPs mediante técnicas de microscopia: según la muestra a estudiar será microscopia SEM (Figura 10 a-b), TEM (Figura 18 e) ó microscopia AFM (Figura 10 c-d). Para una mejor comprensión se señalan en las microscopias con flechas las NPs que se describen (Figura 10).

Las microscopías S.E.M. tomadas corresponden tanto a (a) BSA NP-Lyo como a (b) BSA NP-Lyo-T, (esta última corresponde a la muestra que tiene una relación entre trehalosa/BSA de 0,4). La muestra de BSA NP-Lyo que contó con presencia de sales luego de liofilizada, presentó un aspecto más denso en donde se pueden observar agregados no definidos (Figura 10a). Los agregados de mayor tamaño presentes en la microscopia se encontraron en el rango entre 200-400 nm. Una posible razón por la cual se presentó esta situación es que durante la liofilización quedan vacíos los espacios

ocupados anteriormente por el agua; esto favorece el incremento de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno entre proteínas adyacentes.

Por el contrario, al estudiar la microscopia de BSA NP-Lyo-T, liofilizada en ausencia de sales, se observó una muestra donde las unidades de la NP poseen mayor diferenciación entre sí (Figura 10b). De ambas muestras se hicieron microscopias A.F.M (Figura 10c-d). Para el caso de la BSA NP liofilizada en presencia de trehalosa mantuvo su unidad; no presentó agregados, excepto por unos pocos en el rango mayor a 100 nm (Figura 10c). Por el contrario, cuando la liofilización ocurre en ausencia de trehalosa, se observa que la BSA NP presenta agregados. Dichos agregados se mostraron en estructuras alargadas símil fibrillas, las cuales tienen diferentes tamaños, desde 20 a 20000 nm (Figura 10d). Asimismo, se observó que la BSA NP-Lyo-T presentó una estructura esférica de superficie homogénea. Se tomaron microscopias T.E.M. a la NP liofilizada en presencia de trehalosa, derivando de ellas un histograma (Figura 10e-f). En esta microscopía fue posible observar que luego de ser resuspendida la muestra no presentó agregados, sino por el contrario, se pueden observar aun las unidades de la BSA NP-Lyo-T entre el rango de 35 y 70 nm.

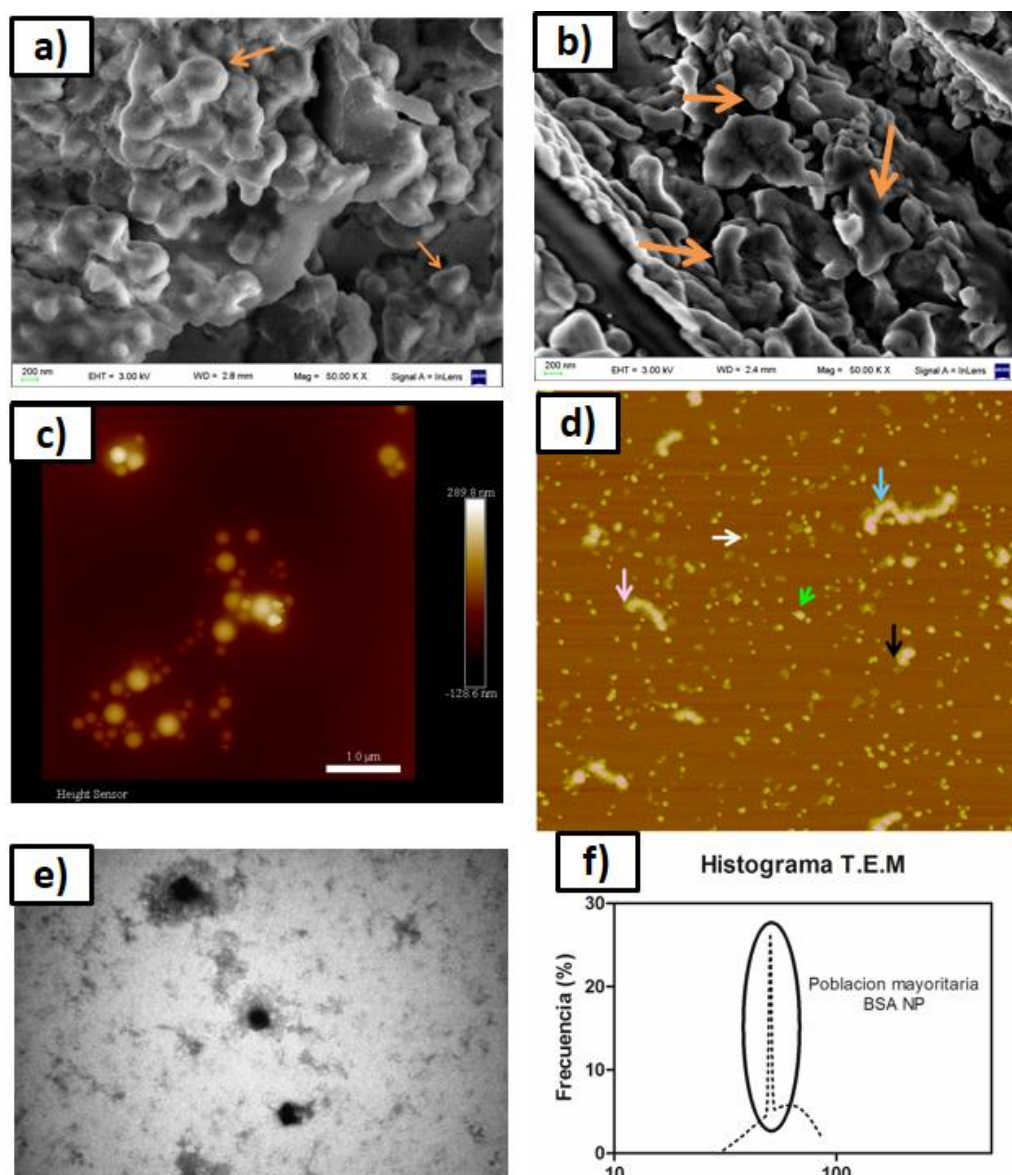


Figura 10 Microscopia S.E.M de la BSA NP liofilizada en buffer (a) y la BSA NP liofilizada en agua miliQ en presencia de trehalosa (b); mag 50 K, la escala corresponde a 200 nm, EHT 3.00 kV, WO 2.8 mm y la señal fue A= In Lens. (c) Microscopia A.F.M. de BSA NP liofilizada en presencia de trehalosa, se observan agregados dentro del rango 25 a 250 nm. (d) Microscopia A.F.M de BSA NP liofilizada en buffer; se observan los diferentes agregados obtenidos por la microscopia: 20 nm (flecha blanca), 40 nm (flecha verde), 60 nm (flecha negra), 1000 nm (flecha rosa), 20000 (flecha azul). (e) Microscopia T.E.M de la BSA NP-Lyo-T resuspendida en *buffer* luego de ser liofilizada; la escala representa 200 nm, la muestra fue anteriormente tratada para su tinción con acetato de uranilo. (f) Histograma de la microscopia T.E.M de la BSA NP liofilizada en presencia de trehalosa representando la población mayoritaria de esta correspondiente a 35 -50 nm.

- *Fluorescencia*

Se realizó un ensayo por espectroscopía de fluorescencia para comprobar si efectivamente el trehalosa generaba algún tipo de agregación en las muestras. Luego de resuspender la BSA NP-Lyo, liofilizada en agua miliQ y en presencia del trehalosa, se midió su espectro de emisión de fluorescencia a las diferentes concentraciones de trehalosa medidas (Figura 11c). Este mismo procedimiento se repitió para BSA (Figura 11a) y BSA NP sin liofilizar (Figura 11b). Las muestras de BSA, BSA NP y BSA NP-Lyo-

T, liofilizadas en presencia de trehalosa, no presentaron modificaciones en sus perfiles de emisión fluorescente cuando se agregaron concentraciones crecientes del trehalosa. El trehalosa no favoreció a la agregación ni alteró en gran medida la estructura de las NPs: al no observar una disminución significativa de la emisión de la fluorescencia del Trp, la trehalosa no estaría en las cercanías del mismo, por lo que no modificó el microambiente en el que el amino ácido se encuentra.

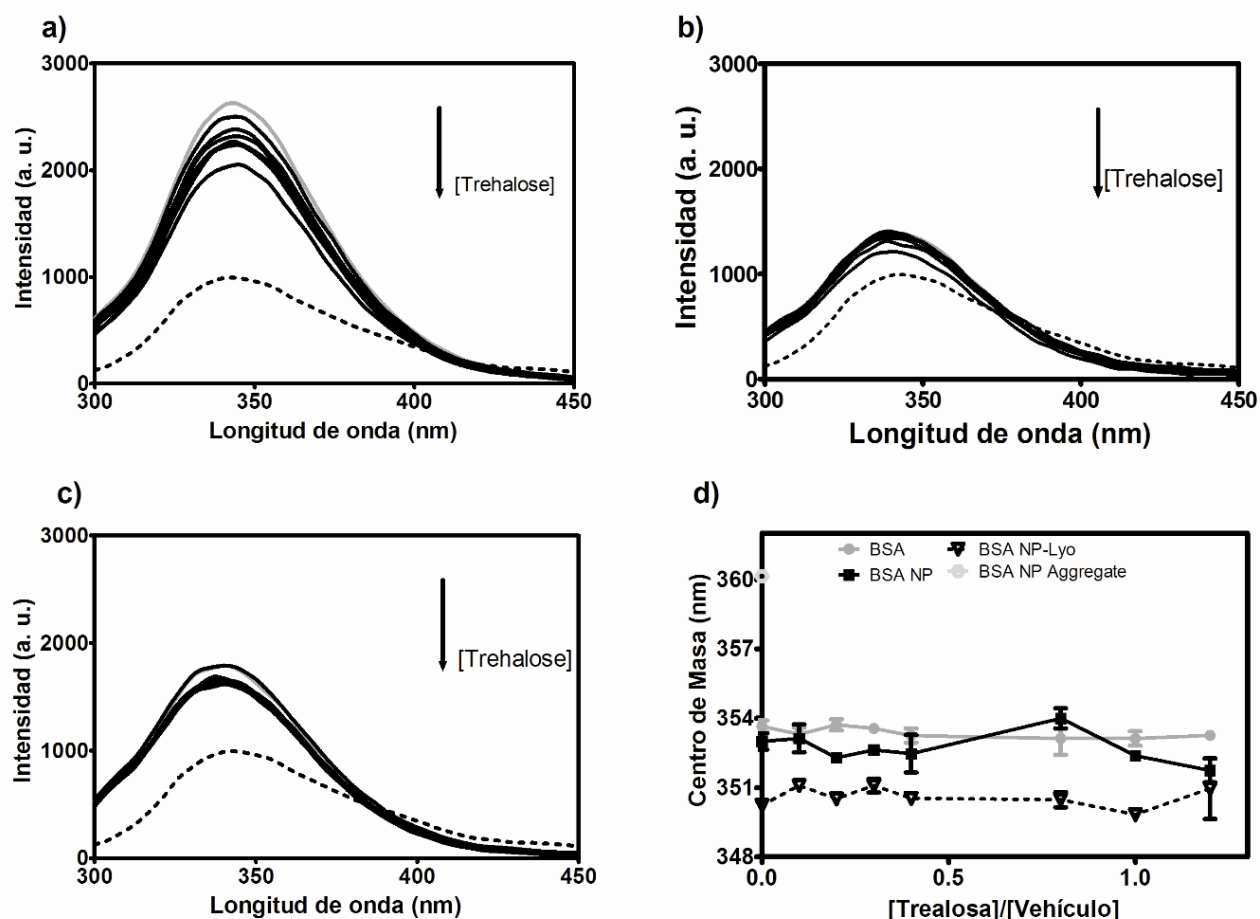


Figura 11 Espectros de fluorescencia de BSA (a), BSA NP (b) y BSA NP-Lyo (c) en presencia de trehalosa en concentraciones crecientes. (d) Curva de agregación de las muestras con la trehalosa representada mediante su centro de masa. Para facilitar la comprensión, se agregó además como se comporta el centro de masa en una BSA NP que se agrega (línea punteada). Las medidas corresponden a triplicados, todos excitados a una longitud de onda de 295 nm; aperturas (*slits*) a 1 nm de distancia.

- *Detección de grupos Tiolatos en la BSA NP*

El ambiente redox de una dispersión en la cual está disuelta una proteína se puede ver alterada por el proceso de irradiación gamma. Esto está relacionado con lo que sucede con las BSA NPs durante su síntesis. Para poder observar algún cambio en su estructura es que se estudian los grupos tiolatos de las NPs luego de la liofilización. Se debe recordar que durante la irradiación los tiolatos presentes en la BSA formando las NPs cambian debido a la energía de la irradiación- γ . Esta tiene suficiente energía como

para romper algunos puentes disulfuro, reacomodándolos, exponiendo a la superficie de las NPs nuevos grupos tiolatos y recubriendo otros.

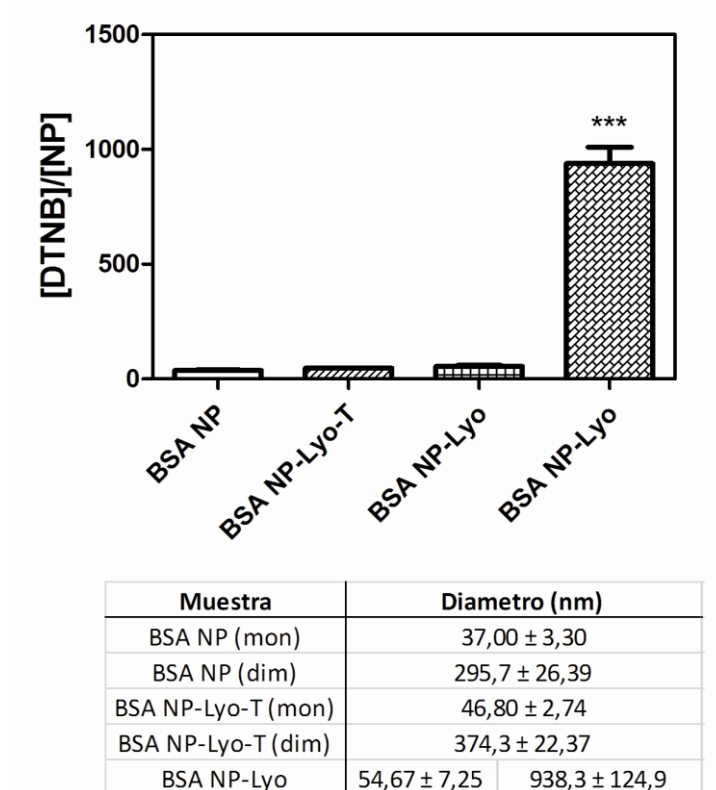


Figura 12 Detección de los tioles libres superficiales en las distintas muestras por medio del método de Ellman. Los resultados obtenidos responden promedios de triplicados de medidas. El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de UNA VIA, $P < 0.0001$. Se muestra una tabla con los valores obtenidos, teniendo en cuenta si se trata a la NP como un dímero o monómero de la unidad correspondiente.

Se observó que la BSA NP-Lyo-T no presenta en su totalidad diferencia significativa con la BSA NP original (previa a la liofilización), (Figura 12). No se infirió un cambio estructural a partir de la cantidad de tioles libres en las NPs. Además, como no se encontraron diferencias en la cantidad de tiolatos expuestos a la superficie entre las NPs, no implica que todos tienen el mismo número de tiolatos sino que algunas moléculas de BSA no estarían expuestas en las NPs.

Por la concentración usada las muestras medidas contenían un total de 10^{13} BSA NPs. En base a esto se puede decir que por cada NP hay 37 grupos tiolatos expuestos a su superficie (o 37 moléculas de BSA). Para la BSA NP-Lyo-T, con la cual se obtuvieron resultados similares, la cantidad de tioles libres fue de 47. La BSA NP-Lyo por su parte se dividió en las dos poblaciones extremas que se obtuvieron de toda la polidispersidad arrojada por el ensayo de D.L.S; así, su población más pequeña contó con 54 tiolatos

superficiales, mientras que la población de mayor tamaño conto con 983 tioles superficiales.

Al liofilizar las NPs en presencia de sales y ausencia de trehalosa, se observa un incremento en los tioles detectados, especialmente allí donde los agregados se hacen mayores (Figura 12). Jain et al., 2009, proponen que en el estado sólido, la muestra liofilizada en presencia de sales absorbe humedad, lo que incrementa la posibilidad de ganar flexibilidad y provocar reacciones químicas como un intercambio tiol-sulfato, ó una eliminación- β , reorganizando de esta manera la nanoestructura. Esto explicaría aumento en la cantidad de tioles detectados en la BSA NP-Lyo, se esperaba encontrar el aumento de dichos grupos. El que se haya encontrado una menor cantidad de tioles haría suponer que la unión entre las BSA NPs para formar los diferentes agregados se generó mediante la interacción entre grupos -SH de cada NP; generándose un tipo de *crosslinking* a la vez que un cambio en la estructura original de la BSA NP.

Por el contrario, no se encontró una diferencia marcada entre BSA NPs y BSA NP-Lyo-Ts. Si bien hubo un aumento de los grupos -SH para las BSA NP-Lyo-Ts, esto se puede deber a que aún protegida por el trehalosa, algunos cambios menores ocurren en la BSA NP al liofilizarse.

De acuerdo a los resultados y la discusión de los mismos se propone la siguiente hipótesis; durante el proceso de irradiación en la BSA se generan fenómenos que permiten que se rompan ciertos puentes S-S dentro de la proteína, generándose así grupos -SH. Estos grupos con otros ya existentes, cambian su posición original para posicionarse más cerca de la superficie debido a la energía de irradiación. De esta misma manera, la liofilización de las NPs puede producir una nueva disposición espacial de los grupos -SH modificando su exposición hacia la superficie. Si el proceso se lleva a cabo en ausencia de trehalosa, las modificaciones generadas durante la irradiación serán más pronunciadas que en presencia del trehalosa, tal como fue observado en este ensayo.

- *Obtención de las constantes de unión (Binding) de la BSA NP-Lyo con una sonda fluorescente MC540*

Ya establecido el hecho de que la BSA NP-Lyo-T es quien preserva la estructura original de la BSA NP una vez liofilizada, se procede a poner a prueba la funcionalidad de esta. Para ello se utiliza la sonda fluorescente Merocianina 540 (MC540). El ensayo permitió observar si la MC540 posee afinidad alguna con las NPs luego de liofilizar o no; la BSA como se sabe, posee gran afinidad con una amplia gama de drogas, entre ellas

se encuentra la MC540. La interacción entre ambas unidades, se debiera observar como una disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia del Trp en la BSA NP con respecto al Trp-212 de la BSA, conforme se aumenta la concentración de

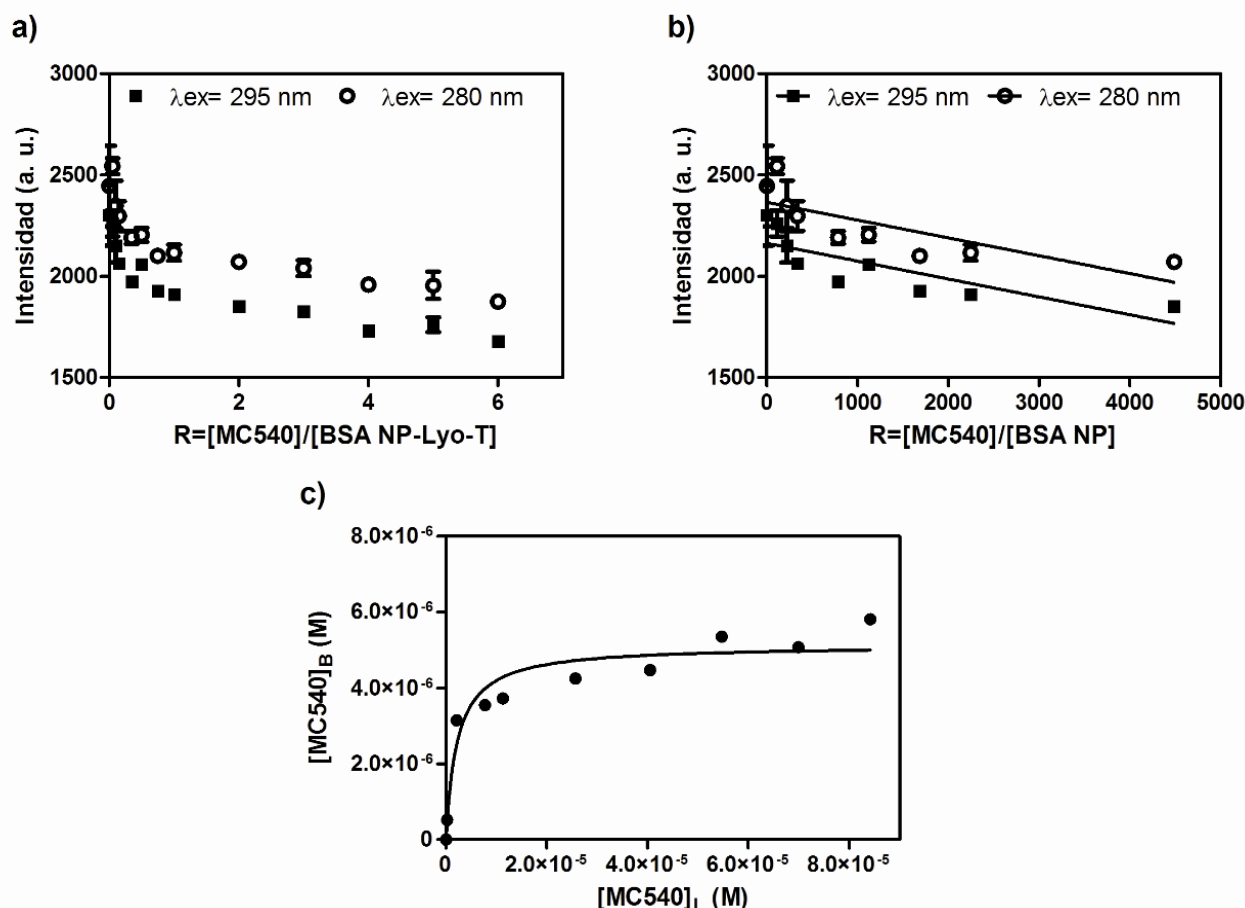


Figura 13 Describe el proceso de apagado (*quenching*) que ocurre debido a la interacción de la sonda con el Trp de la BSA NP-Lyo-T (a). Se representa el gráfico del cual se obtiene la ecuación Scatchard para luego poder obtener los valores de B_{mx} y K_d (b). El ajuste generado en el gráfico (b) responde a "One site binding (hyperbola)" from Non-linear regression fit curve.

MC540 en la muestra. El resultado de esto es una curva con disminución en la u.a. de emisión. A partir de la curva de intensidad de emisión se puede calcular las constantes de interacción. Una vez calculada la constante de interacción entre droga y vehículo se lo compara con lo obtenido para la BSA NP antes de liofilizar con MC540. De ser similar los valores obtenidos se podrá especular sobre una funcionalidad preservada de la NPs (Figura 13).

Al realizarse el ensayo, se observó interacción entre BSA NP-Lyo-T y MC540, por lo que se obtuvieron dos curvas de atenuación: una al excitar las muestras a 280 nm y otra a 295 nm (Figura 13a). A primera vista, dichas curvas parecen ser similares. Para poder corroborar esta suposición, se tomaron los primeros puntos de cada curva y se realizó

un ajuste de regresión lineal y se calculó el valor de cada pendiente (Figura 13b). Las pendientes mostraron tener valores similares; $-8,80 \text{ e-}2 \pm 2,28 \text{ e-}2$ y $8,82 \text{ e-}2 \pm 1,82 \text{ e-}2$, para las excitaciones a 280 nm y 295 nm respectivamente. Esto indica que las curvas de atenuación excitando la muestra a longitudes de onda diferentes; 295 nm (el Trp solamente) y 280nm (para Tyr y Trp), son similares entre sí (Figura13a). Al ser ambas curvas similares, se sugiere que el sitio que interactúa con la MC540 en este caso es únicamente aquel que tiene presente al Trp (Sudlow I), mientras que el que posee Tyr se encuentra bloqueado (Sudlow II) (Achilli et al., 2015). De poder interactuar las Tyr con la MC540 se debería haber observado diferencias en la curva de disminución de intensidad a 280 nm comparada con la de 295 nm (curva que responde a la excitación de los Trp en la NP únicamente). Si no hay diferencia de emisión entre los dos sitios la interacción es únicamente MC540 con el sitio que contiene solo Trp. Como en nuestro caso coinciden los cálculos se realizan con los datos pertenecientes a la excitación del Trp únicamente (295 nm). Mediante un ajuste matemático utilizando la ecuación Scatchard se obtuvieron las constantes de interacción entre la BSA NP-Lyo-T y la MC540: cantidad de droga máxima unida (B_{max}) y la constante de disociación (K_d). Como se puede observar, la interacción entre la MC540 y la NP muestra una cinética de un solo paso (Figura 13 c). Esto es indicativo de una interacción que es semejante a la de la albúmina libre y que esta función se preserva en la NP, que son las siguientes constantes de interacción obtenidas mediante la ecuación de Scatchard (Tabla 7).

Tabla 10 Se describen los resultados obtenidos por medio de la ecuación Scatchard, calculado a partir de el grafico de la Figura 31 b.

Parámetros	$\lambda_{\text{ex}} = 295$
B_{max}	$5,31 \text{ e-}06 \pm 2,79 \text{ e-}07$
K_d	$2,22 \text{ e-}06 \pm 8,30 \text{ e-}07$
R^2	0,93

De acuerdo con estudios realizados previamente, la K_d de la interacción entre MC540 y BSA es de $6,30 \text{ e-}04$ (Achilli et al., 2015). La NP en esta sección estudiada cuenta con una constantes dos órdenes menor que el de la proteína libre ($2,22 \text{ e-}06$). Cuanto más pequeña la K_d , más afín serán los compuestos interaccionando entre sí. En base a esto, la BSA NP-Lyo-T es 100 veces más afín a la sonda que la proteína. En Achilli et al., 2015, se estudia a su vez la K_d entre MC540 y BSA NP, siendo esta de $2,80 \text{ e-}04$. Esto quiere decir que la NP liofilizada en presencia de trehalosa, no solamente conserva su función original, sino que incrementa la afinidad del sitio por una droga amfifílica como lo es la MC540. Una posible explicación sería que, como se confirmó por fluorescencia, la

NP al liofilizarse adquiere un carácter ligeramente más hidrofóbico, esto se traduciría en un incremento de la afinidad del sitio de unión de la NP por ciertas drogas. Este aumento de hidrofobicidad local no necesariamente implica un cambio en la conformación.

Durante el proceso de liofilización hay remoción de puentes de hidrógeno del agua y reemplazo por los –OH de la trehalosa. A pesar de que al resuspender, no se altera la estructura de la NP liofilizada por estar en presencia de trehalosa, no se descarta que al haber estado en un ambiente más hidrofóbico, la NP se compacte un poco más de lo que originalmente se encontraba. Esto explicaría la mayor afinidad de la NP con la sonda.

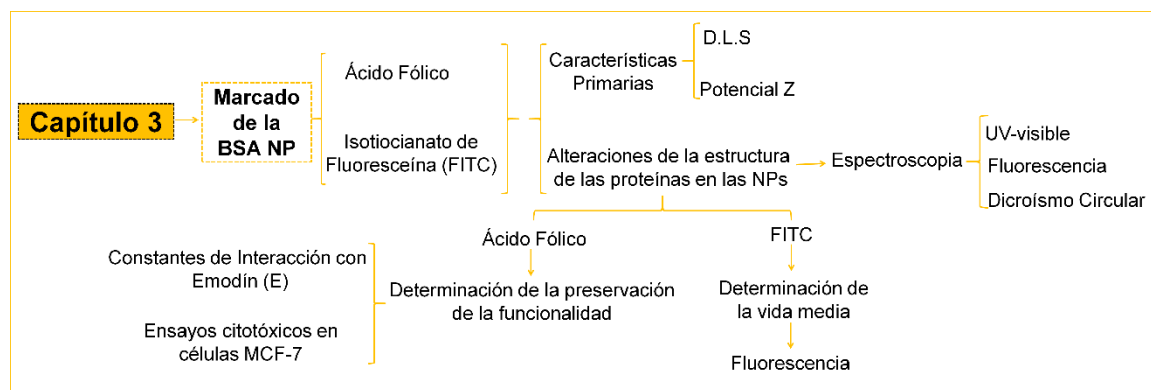
En esta parte del trabajo se han descrito dos métodos distintos de liofilización para poder preservar la estructura y función de la NP durante largos periodos de tiempo mediante liofilización. Uno de los métodos fue liofilizar la BSA NP en buffer y ausencia de lio-crio perseverante, que no resultó un método eficiente. Se obtuvo por medio de este método agregados que ocupan el rango de tamaño entre 30 a 350 nm. El otro método estudiado fue el de liofilizar la BSA NP en agua miliQ y presencia de trehalosa en una relación trehalosa: BSA NP (325:1). Este último protocolo fue el que logró preservar no solo el tamaño, pero también la función de la BSA NP.

Conclusión

En base a la información obtenida en este capítulo sobre la estabilidad y liofilización de las BSA NPs se concluye:

- Las BSA NPs presentan un comportamiento a distintos pH similares al de la albúmina, presentando una estructura totalmente extendida E a pH ácidos, y una estructura desnaturalizada semi extendida B a pH alcalino.
- Las BSA NPs no pierden estructura en soluciones de urea (hasta concentraciones 9 M) y Tween 80 % v/v (hasta concentraciones 0,1 %), por lo que preservaría su función de vehículo para drogas solubles en estos solventes. Sin embargo, no es posible unir drogas solubles en presencia de SDS, ya que este solvente desnaturaliza a las NPs.
- Mientras que la BSA NP es estable en concentraciones salinas altas (hasta 2 M), solamente es estable en solución PBS 30 mM, pH 7,0 a 5 °C durante 15 días de almacenamiento.
- Se propone una estructura de agregado proteico compacto de la BSA NP debido a su comportamiento frente a los diferentes agentes caotrópicos.
- La manera más eficiente de liofilizar a las BSA NPs preservando la estructura es utilizando una concentración de trehalosa 100 μ M para una concentración 308 nM de BSA NPs en agua miliQ.
- Luego de la liofilización las BSA NPs aún tienen una afinidad alta por la droga anfifílica MC540. Ésta aumentó 100 veces.
- La liofilización es el método elegido por conservarse tanto el tamaño como la funcionalidad de la NP para un almacenamiento prolongado. Este método es el óptimo para la almacenar las NPs como vehículo de fármacos sin alterar su estructura/función; siendo la proporción 325:1 a utilizar de trehalosa: BSA NP.

Capítulo 3: *Marcación de la nanopartícula con ligandos funcionales: Ácido Fólico (AF) e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)*



Introducción

Una vez obtenidas y caracterizadas las NPs, pueden modificarse para mejorar ciertas características superficiales o para darles especificidad en una actividad dada. Por ejemplo, para lograr la especificidad de un sistema transportador de droga en un tratamiento médico determinado, a menudo se busca modificar el vehículo en el cual viaja la droga. En particular, las terapias contra el cáncer han ido desarrollándose en dos vías distintas; (i) la utilización de compuestos que funcionen como agentes bloqueadores de vías o expresión de proteínas, o que sean receptores sobreexpresados en células malignas y (ii) la utilización de un ligando que se una a un receptor de mayor expresión en células malignas (Xia et al., 2010).

Esta parte del trabajo se marcó las BSA NPs con ácido fólico (AF) como ligando con el fin de aumentar la llegada específica de las NPs a células tumorales con el receptor para esta molécula sobreexpresado. El AF es una vitamina hidrosoluble del complejo de vitaminas B, necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina. Además, resulta esencial para la proliferación y manutención de todas las células. Su receptor esta sobreexpresado en líneas tumorales (ovario, pulmón, riñón, endometrio, mama, cerebro, colon y células hematopoyéticas mieloides), macrófagos y células tubulares proximales de riñón (Xia et al., 2010), mientras suele estar ausente en células no malignas. Esta diferencia es la que hace de esta molécula, un ligando adecuado para incrementar especificidad en las NPs (Shen et al., 2011).

Otro fin por el cual las NPs se marcan sería como detector de células malignas (Wischke et al., 2006) en diagnóstico por imágenes o como método para cuantificar NPs en el sitio diana o por citometría. Uno de los fluoróforos más utilizados para marcar

proteínas es el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Dicha molécula es un derivado de la fluoresceína que se usa comúnmente como un marcador que reacciona con los grupos aminos y sulfhídricos de las proteínas (Hungerford et al., 2007).

En esta parte del trabajo se discuten los resultados de la obtención y caracterización inicial de dos tipos de marcación realizadas en la BSA NP: marcación con AF y con FITC.

3.1 Marcado de la NP con un ligando funcional

Buscando mejorar el rendimiento como nanovehículo de la BSA NP, se marcó con dos ligandos diferentes. Uno de ellos fue AF, una molécula que posibilitará un aumento de la especificidad de las BSA NPs. El otro fue FITC, molécula fluorescente que servirá como modelo para proponer a las BSA NPs marcadas como un marcador para captación de imágenes (*imaging*).

Materiales y Métodos

- *Marcado de la BSA NP con AF*

La decoración con AF se llevó a cabo como se describe en Du et al., 2013. Brevemente, se mantuvo en oscuridad bajo agitación constante 1 ml de una solución de AF 5 mg/ml, a la cual se le agregó 3 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI) y 2 mg de N-hidroxi-succinimida (NH) gota a gota. La incubación de la solución duró 4 h, tiempo suficiente para que el AF se active. Luego, a una solución de BSA 30 mg/ml, se le agregó 1 ml de AF activado. Esta dispersión se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante la noche.

La BSA marcada con AF (AF-BSA) fue separada de AF libre por centrifugación en una columna *ad hoc* de 1 ml con Sephadex G50 a 2000 rpm durante 2 m a 4 °C. Una vez finalizado este paso, AF-BSA se agregó a una solución etanólica de BSA sin marcar para llegar a una dispersión 35 % p/v de etanol. Esta solución fue irradiada con radiación gamma como se describe en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 para la formación de la BSA NP (Esquema 17).

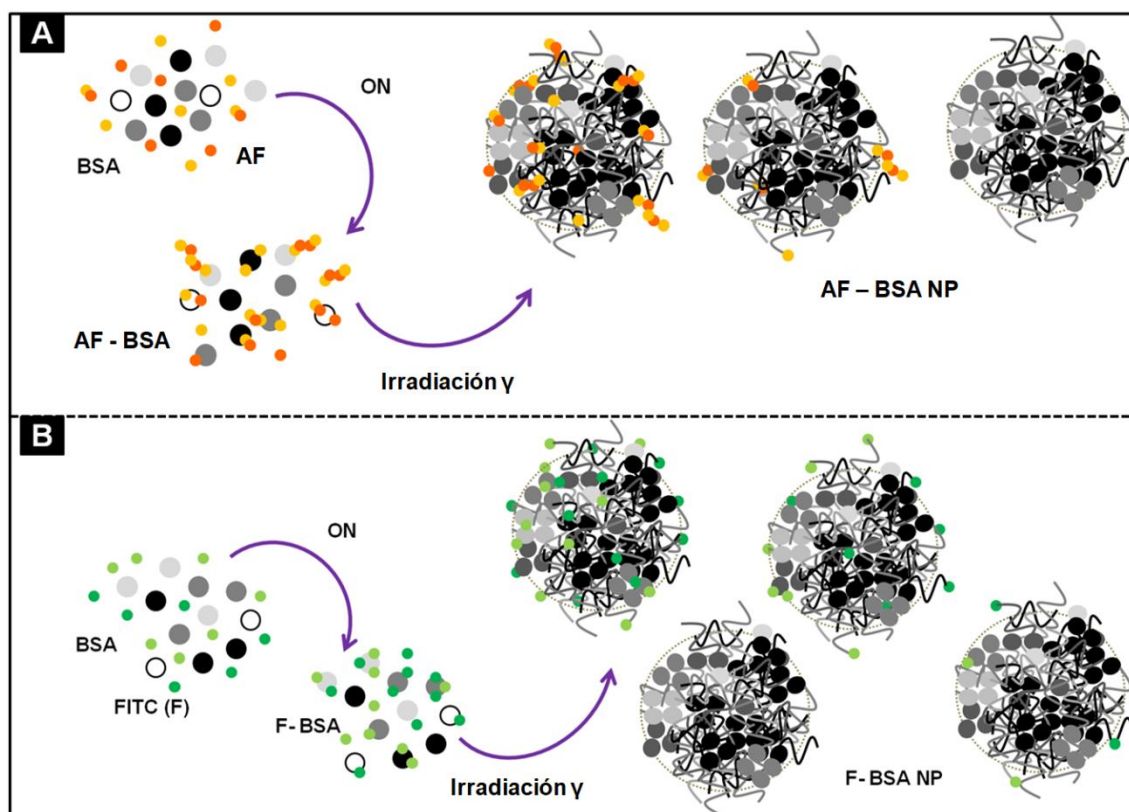
Una vez formada la AF-BSA NP, se intercambié la dispersión etanólica al 35 % v/v por una dispersión de PBS 30 mM, pH 7,0 utilizando una columna de exclusión molecular. Posteriormente se midió absorbancia en UV-Vis a la longitud de onda a 363 nm para poder cuantificar mediante curva de calibración la cantidad de AF unido a cada NP.

- *Marcado de la BSA NP con FITC*

Para marcar con FITC la BSA NP se incubó por 12 h una solución 30 mg/ml BSA con una solución 1 mg/ml FITC en *buffer* NaHCO₃ a pH 9,0 a 4 °C en oscuridad. El FITC libre fue separado de la BSA con FITC (F-BSA) mediante centrifugación en una columna *ad hoc* de 1 ml de Sephadex G50 a 2000 rpm durante 2 m a 4 °C. Una vez finalizado este paso, se agregó la F-BSA a una solución etanólica de BSA sin marcar para llegar a una solución 35 % v/v etanol. Esta solución fue tratada con radiación gamma como se

describe en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 para la formación de la BSA NP (Esquema 17).

Una vez formada la F-BSA NP, se cambió la dispersión etanólica al 35 % v/v por una dispersión de PBS 30 mM, pH 7,0 utilizando una columna de exclusión molecular. Posteriormente se midió la intensidad de emisión fluorescente de la NP a λ_{ex} = 495 nm y λ_{em} = 525 nm, con una apertura de 1,5 nm para cuantificar aproximadamente mediante curva de calibración la cantidad de FITC unido a la NP.



Esquema 18 Marcado de la BSA NP con (A) AF y con (B) FITC esquematizado.

- *Determinación del tamaño de las NPs marcadas*

Se midió el tamaño a 1ml de dispersión de BSA NP llevada hasta una dilución final 1/10 en un analizador de tamaño y carga de partículas en un 90 Plus/Bi-MAS, cuya fuente de luz es de 632,8 nm con láser. Las muestras se midieron a 25 °C y 90 grados de ángulo de dispersión y con una autocorrelación *ad hoc*.

- *Espectroscopía UV-Visible*

Se midió la absorbancia UV-Vis en un 1000-Nanodrop ThermoScientific entre 230- 500 nm a soluciones de BSA NP 462 nM en PBS 30 mM pH 7,0. Los gráficos se realizaron y analizaron usando GraphPad Prism 5.0 v.

- *Espectroscopía de Fluorescencia*

Soluciones de BSA NP 5,5 nM NP PBS 30 mM pH 7,0 fueron medidas en un fluorómetro SCINCO S2, donde la longitud de onda de excitación (λ_{ex}) fue de 295 nm y la emisión (λ_{em}) de 337 nm. Las rendijas del fluorómetro tuvieron una abertura de 1,0 nm, y la corrida fue llevada a cabo a una velocidad de 60 nm/min. Los espectros obtenidos cubrieron el rango de 290 a 400 nm. Los gráficos se realizaron y analizaron usando el programa GraphPad Prism 5.0 v.

- *Medidas de las NPs con Dicroísmo Circular*

Las muestras de NP (1 nM) fueron medidas por dicroísmo circular utilizando un equipo Jasco 810 espectropolarímetro. Las muestras fueron medidas a temperatura ambiente en el CD – lejano (180 – 280 nm). Las medidas contaron con una redispersión de 0,1 nm, se tomaron 5 espectros consecutivos de cada muestra que luego se realizó un promedio. Los gráficos se realizaron y analizaron usando el programa GraphPad Prism 5.0 v.

- *Interacción AF-BSA NP con emodin (E)*

Se prepararon soluciones en concentraciones bajas AF- BSA NP (18,4 nM) para evitar el fenómeno de dispersión de luz (*scattering*) que puede ocurrir durante el ensayo. De una dispersión de E de concentración 450 μ M se realizaron diluciones para lograr concentraciones dentro del rango $[E]/[AF-BSA\ NP]=0,00 - 12000$, siendo la concentración máxima de E alcanzada 90 μ M.

Para hacer las mediciones se utilizó un fluorómetro S2 Scinco. Las muestras fueron excitadas a 295 (Trp) y 280 (Tyr y Trp) nm. Las emisiones se dieron en los 340 y 337 nm respectivamente. Los resultados se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.

Determinación de la constante de afinidad (Según Sevilla et al., 2007)

La constante de disociación K_d y B_{max} , que corresponden al máximo de E unido a la proteína por cada sitio de unión a la BSA, fue determinado usando cambios conformacionales seguidos por espectroscopia de fluorescencia. Dichos cambios son inducidos por la unión de la droga a los sitios de unión con la proteína que forman la NP.

La concentración de E unido a la AF-BSA NP (B) fue la variable en el ensayo. Cuando la proteína se encontraba en exceso, $[E]$ sería 0. Por ende, se graficó la absorbancia relativa (Abs) en función de la relación $[E]/[AF-BSA\ NP]$.

$$(1) \quad \text{Abs} = \text{Abs}_0 + m_i v$$

De la ecuación (2) se determina a “mi” como la pendiente de la curva y $v = B/[AF\text{-BSA NP}]$. Con los datos experimentales entonces se puede calcular B de acuerdo con

$$(2) \quad B = v * [AF\text{-BSA NP}]$$

La cantidad de ligando libre, L, se obtiene de la diferencia entre la cantidad total de ligando y la cantidad de ligando unido, según lo calculado por la ecuación (3). Con estos datos es posible graficar un diagrama de Scatchrad.

$$(3) \quad v/L = nK_d - vK_d$$

en donde “n” es el número de sitios de unión y “K_d” es la constante de disociación para la formación del complejo. Para obtener la constante de cada sitio Sudlow de la BSA, se analizaron los datos con el software GraphPad Prism 5.0. El análisis de los datos experimentales se llevó a cabo luego de obtener un gráfico y ajustar la curva utilizando la ecuación modelo de “*One Site-Specific Binding with Hill slope*”.

- *Determinación de la citotoxicidad en células MCF-7 tratadas con AF-BSA NP*

Se estudió la funcionalidad de la AF-BSA NP y del complejo AF-BSA NPE mediante un ensayo de actividad metabólica en la línea tumoral de carcinoma mamario humano (MCF-7), células que poseen el receptor sobre expresado.

Las células se mantuvieron en estufa a 37 °C con una inyección de 0,5 % de CO₂ con medio MEM, 10 % suero fetal bovino mientras no se utilizaron. El ensayo de actividad metabólica se llevó a cabo mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Brevemente, las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos por 4, 24 y 48 h. Al terminar el tiempo de incubación se lavó la placa de 96 pocillos por inversión y se les agregó 100 µl del reactivo MTT dilución 1 en 10 de una dispersión 2 mg/ml. Al cabo de 45 m se lavó la placa se descartó el sobrenadante por inmersión. Se reveló con la adición de 200 µl de DMSO. Se leyó la absorbancia de cada pocillo de la placa con un lector de placa de ELISA a 590 nm.

De acuerdo a la lectura del control (células sin tratar) se relativizaron los valores leídos de cada pocillo siendo el control el 100 % de la actividad metabólica. El ensayo se repitió tres veces con un n= 12 por placa.

- *Medición de vida media de F-BSA NP*

Para estudiar la funcionalidad de la F-BSA NP se la incubó en una placa de 96 pocillos para fluorescencia en una dispersión 555 nM, PBS 30 mM, pH 7,0. Se midió una cinética de vida media en donde la placa estuvo en oscuridad constante a 37 °C en un equipo Cytation 5, en donde cada 15 m se excitaba la placa a 495 nm y se medía su emisión a 525 nm. Se graficó una curva en base a estos datos utilizando el software GraphPad Prism 5.0 v 5.

Resultados y Discusión

- *Determinación del tamaño de las NP decoradas*

La decoración de las NPs con los diferentes ligandos se llevó a cabo como lo indica el Esquema 17. El radio hidrodinámico de las distintas NPs formadas fue medido luego de pasarlas por una columna de exclusión molecular a fin de intercambiar la dispersión etanólica por dispersión acuosa PBS 30 mM, pH 7,0.

La BSA NP marcada con FITC (F-BSA NP) muestra una disminución en el diámetro hidrodinámico ($39,6 \pm 0,70$ nm), mientras que la BSA NP marcada con AF (AF-BSA NP) muestra un aumento en su diámetro hidrodinámico ($332,1 \pm 95,56$ nm) con respecto a la BSA NP ($71,53 \pm 6,66$ nm) (Figura 14). El cambio de diámetro en las NPs sugiere cambios en la estructura de NPs debido a la adición de estas moléculas.

La dispersión coloidal de la BSA NP es en su mayoría monodispersa, mientras que la AF-BSA NP muestra gran polidispersidad. Una de las causas de esto puede ser que el AF haya quedado adsorbido de manera no homogénea entre NPs, por lo que su polidispersidad aumentaría variando entre tamaños con NPs sin AF y NPs con AF (Esquema 17A, Figura 14.1.a). El AF además tiene tendencia a formar polímeros durante su proceso de activación, generando cadenas de la misma molécula de diferente tamaño que luego se unirán a moléculas de albúmina. Esta unión se da entre el NH terminal activado y el grupo CO de la molécula de AF (Du et al., 2013).

- *Cuantificación de las moléculas de ligando/ BSA NP*

Para saber cuántas moléculas de ligando fueron adsorbidas por cada NP, se hicieron determinaciones por espectroscopias de UV-Vis (AF-BSA NP) y de fluorescencia (F-BSA NP). Ambas técnicas incluyen una curva de calibración con la molécula ligando (AF ó FITC). La cuantificación de las moléculas de ligando nos basamos en la señal emitida por las NPs (Figura 14.1.b-c) (Tabla 12).

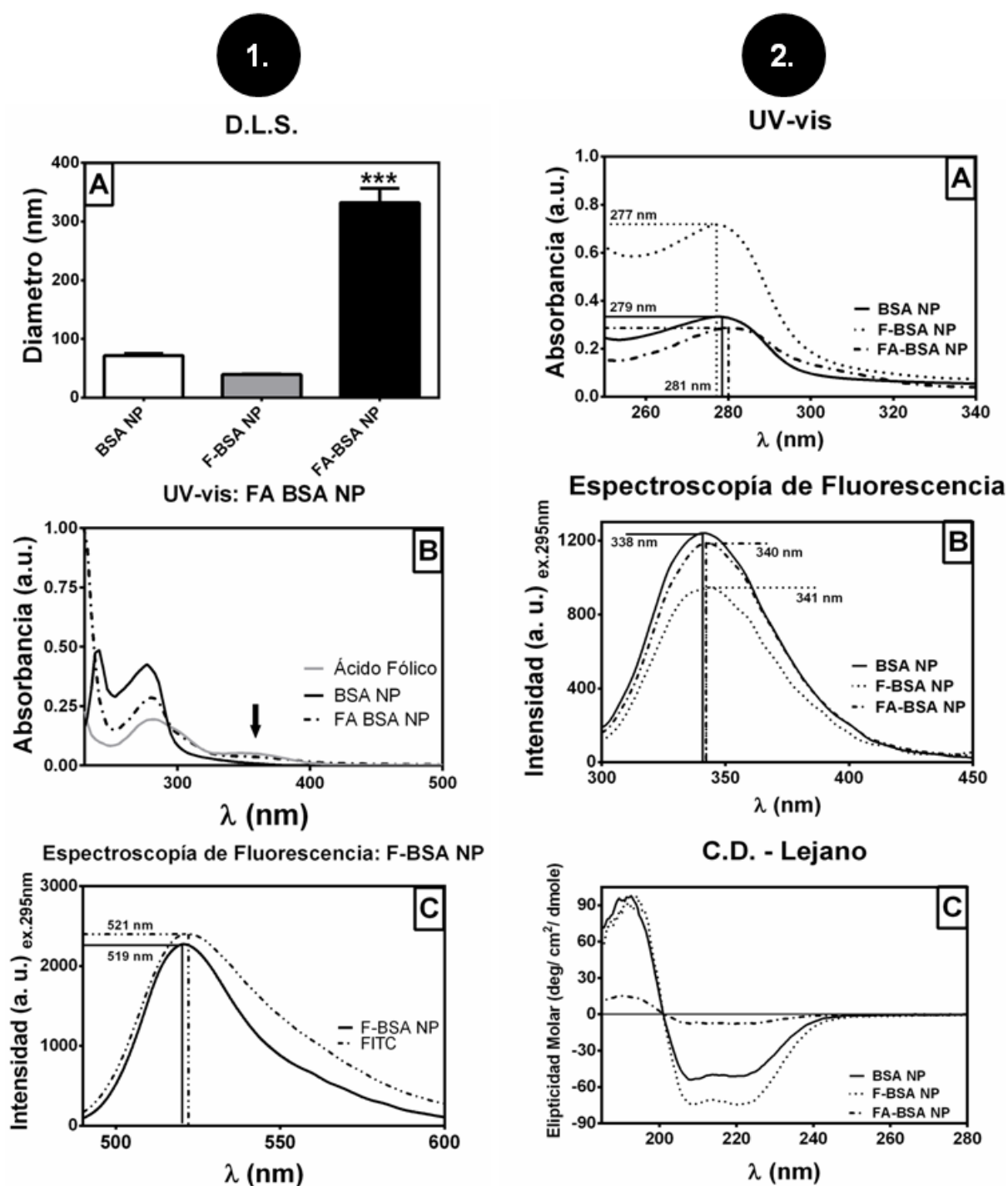


Figura 14 Caracterización de las NP decoradas con AF y con FITC: 1-(A) D.L.S de la BSA NP, F-BSA NP y AF-BSA NP en dispersiones de PBS 30 mM, pH 7,0. (B) Espectroscopia UV-Vis de la FA BSA NP confirmando la existencia de una nueva NP mediante la absorción a los 350 nm aproximadamente. El espectro fue tomado en el rango de 270 – 500 nm. (C) Espectroscopia de fluorescencia sobre la F-BSA NP excitando el fluoróforo (FITC) en ella. 2-(A) Espectroscopia UV-Vis de last res NP: BSA NP; AF-BSA NP y F-BSA NP en el rango 270 – 340 a igual concentración teórica. (B) Espectroscopia de Fluorescencia de last res NPs en el rango 300 – 450 nm, existiendo al Trp de la NP. (C) Perfil de las tres NPs obtenido por CD-lejano describiendo la señal de las estructuras α hélice y lamina β (180 – 280 nm). Para todos los casos: BSA NP (línea llena); F-BSA NP (línea punteada); AF-BSA NP (línea con puntos y guiones).

Específicamente con las muestras de AF-BSA NPs se medieron por UV-Vis estudiando su absorbancia a 393 nm, longitud de onda en donde absorbe el AF (Figura 14.1.b). El

perfil de absorbancia de las AF-BSA NPs difiere del de las BSA NPs por contar con un hombro de absorción después de los 300 nm. Como las muestras fueron separadas de las moléculas de AF libres, en la suspensión coloidal, la presencia de un hombro indica un nuevo compuesto distinto al de BSA NPs y el AF de partida. Según los cálculos realizados, por cada AF- BSA NP hay adsorbidas 6,71 moléculas de AF (Tabla 11). Durante la irradiación algunos polímeros de AF pueden romperse en polímeros más pequeños o quedar en el interior de la NP debido a la organización de las moléculas de BSA formando la NP. Esta podría ser la razón de la baja cantidad de AF por AF-BSA NP obtenida.

Las muestras de F-BSA NP fueron medidas por espectroscopia de fluorescencia; excitándose la muestra a una longitud de λ_{ex} = 495 nm, con una λ_{em} = 525 nm. De esta manera se logró observar únicamente la emisión del FITC adsorbido a las NPs (las muestras fueron separadas de las moléculas de FITC libres de la suspensión coloidal) (Figura 14.1.c) (Tabla 11). El perfil de emisión de fluorescencia de la F-BSA NP tiene el máximo en 519 nm, mientras que el del FITC solo se encuentra a 521 nm. Si bien el corrimiento hacia el azul es mínimo, sugiere la unión entre FITC y las BSA NPs (Figura 14.1.c). Según los cálculos llevados a cabo en base al dato experimental de la intensidad de fluorescencia extrapolado de una curva de calibración, cada 1 molécula de F - BSA NP, hay 0,31 moléculas de FITC (Tabla 11). La baja cantidad de moléculas de FITC por BSA NP detectadas con respecto a la inicial puede deberse a la organización de estas durante el proceso de irradiación: parte de las moléculas del fluoróforo pueden quedar escondidas en el interior de las NPs. La otra posibilidad es que la gran cantidad de moléculas de FITC cercanas unas a otras, puede generar una auto atenuación, obteniéndose así una intensidad de fluorescencia emitida aparente. Por estas razones el resultado de la estimación de moléculas de FITC por NP es aparente.

Tabla 11 Cantidad de moléculas de ligando por NP en un ml de dispersión de acuerdo a los valores experimentales de cada NP obtenida del análisis según la Figura 2b-c de ligando por NP. En amarillo se muestran los valores referidos a la AF - BSA NP, y en verde se muestran los valores referidos a las F - BSA NP

[BSA NP] (mg/ml)	PM (Da)	moléculas NP/ml	[Ligando] (mg/ml)	PM (Da)	Ligando moléculas/ml	Ligando/ BSA NP
30	1,48E+08	1,22E+20	6,00E-01	4,41E+02	8,19E+20	6,71E+00
30	1,48E+08	1,22E+20	2,50E-02	3,89E+02	3,87E+19	3,17E-01

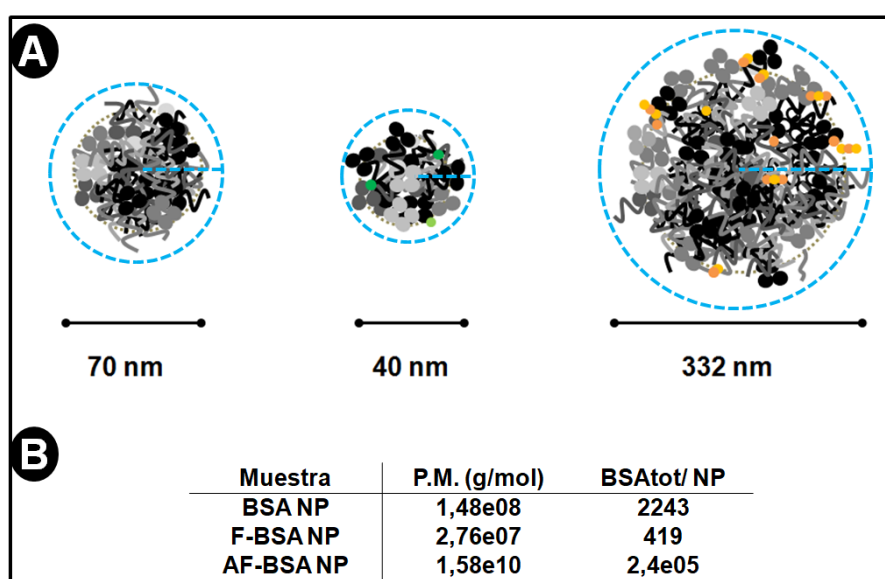
La eficiencia aparente de las distintas NPs marcadas es del 670 % para las AF-BSA NPs y del 37,1 % para las F-BSA NPs. Si bien la eficiencia de formación del conjugado con el FITC parece ser baja, un ml de la dispersión coloidal de F-BSA NP contiene 1,22

e20 moléculas de NPs, de las cuales 3,87 e19 de ellas se encuentran marcadas con el fluoróforo. Por esto es que aún con una baja eficiencia logramos tener una señal de emisión fluorescente relativamente alta (c.a. 2260,8 RFU) (Figura 14.1.c). Según Wischke et al., 2005, una proteína marcada por más de una molécula del fluoróforo permite la asociación de ellos en dímero no fluorescentes. Esto es debido a un efecto de atenuación dado por la concentración del ligando en cada proteína.

Además, debe considerarse la transferencia de energía mediada por resonancia o RET por sus siglas del inglés: una molécula de FITC puede transferir energía en su estado excitado a un dímero no fluorescente lo que aumenta la pérdida de emisión fluorescente de la molécula resultante. Para que RET ocurra se necesita de una distancia dada de 20 a 42 Å la BSA cuenta con una distancia de una punta de su estructura en forma de corazón de unos 45 – 60 °A, por lo que esta posibilidad existe (Wischke et al., 2005). Dentro de las NPs la distancia entre monomero de albúmina admite una distancia en la cual RET suceda entre dos moléculas de FITC. Debido a esto se estima que la fluorescencia percibida en el ensayo sea solo aparente y no describa la totalidad de las moléculas de FITC adsorbidas a las BSA NPs.

- *Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: Peso Molecular*

Mediante la caracterización realizada de las NPs y descritas en esta sección: F-BSA NPs y AF-BSA NPs, se realizaron cálculos matemáticos basados en el diámetro de cada NP, para obtener un peso molecular estimado (Esquema 18).



Esquema 19 Esquema de los tamaños de las diferentes NP (A) y sus respectivos pesos moleculares y moléculas de albúminas estimadas por NP (B)

Retomando las ecuaciones para el cálculo de la masa molecular de la NP y comprobar la hipótesis sobre la estructura de la NP propuesta en el Capítulo 1, y considerando como despreciable tanto el tamaño del FITC como del AF frente al de las BSAs que forman las NPs y nos permite calcular el número de moléculas de BSA superficiales. Dicho número depende del diámetro de la proteína, por lo que será un valor constante. Tomando estas consideraciones la cantidad de albúmina superficial en toda NP es de 357 moléculas aproximadamente.

En base a los pesos moleculares estimados, se recalculó el rendimiento de cada proceso de marcación. De acuerdo con el peso molecular de las AF-BSA NP ($1,58 \times 10^5$ g/mol), en 1 ml de dispersión habrá $1,30 \times 10^{13}$ NPs, y siguiendo con la concentración inicial de AF utilizado, $8,19 \times 10^{20}$ moléculas del ligando. Lo que se estima en $6,32 \times 10^7$ moléculas de AF por NP (Tabla 12). Para el caso de las F-BSA NPs, su peso molecular ($2,76 \times 10^7$ g/mol) indican que en 1 ml de dispersión habrá $7,42 \times 10^{15}$ NPs, y siguiendo con la concentración inicial de FITC utilizado, $3,87 \times 10^{19}$ moléculas del ligando. Se estiman, de esta manera $5,21 \times 10^3$ moléculas de AF por NP (Tabla 12).

Tabla 12 Cálculo de la cantidad de moléculas de ligando por NPs en un ml de dispersión coloidal en base a los valores experimentales del diámetro hidrodinámico de cada NP. En amarillo se muestran los valores referidos a la AF - BSA NP, y en verde se muestran los valores referidos a las F - BSA NP

[BSA NP] (mg/ml)	PM (Da)	moléculas NP/ml	[Ligando] (mg/ml)	PM (Da)	Ligando moléculas/ml	Ligando/ BSA NP
0,34	$1,58 \times 10^5$	$1,30 \times 10^{13}$	$6,00 \times 10^{-1}$	$4,41 \times 10^2$	$8,19 \times 10^{20}$	$6,32 \times 10^7$
0,6	$2,76 \times 10^7$	$7,42 \times 10^{15}$	$2,50 \times 10^{-2}$	$3,89 \times 10^2$	$3,87 \times 10^{19}$	$5,21 \times 10^3$

Cabe destacar que los valores obtenidos en esta sección son mayores a aquellos que utilizan el peso molecular de las BSA NPs. Indican una marcación eficiente en donde por cada NP hay gran cantidad de ligandos.

Cada AF – BSA NP está compuesta por $2,4 \times 10^5$ moléculas de albúmina (Esquema 18), estimándose de manera lineal para la BSA NP, las AF- BSA NPs contarían con un total de $6,54 \times 10^5$ –NH superficiales (Tabla 13). De acuerdo con esto, la totalidad de estos grupos se encuentran interactuando con moléculas de AF; aún considerando moléculas del ligando en forma polimérica en el sobrenadante, generados como producto en el proceso de marcación.

Con la relación FITC y F-BSA NPs sucede algo similar: cada F – BSA NP está compuesta por 419 moléculas de albúmina, estimando de manera lineal y tomando como base la BSA NP, las AF- BSA NPs cuentan con un total de $1,14 \times 10^3$ –NH

superficiales (Tabla 13). De acuerdo con esto, la totalidad de estos grupos se encuentran interactuando con moléculas de F, al tener moléculas poliméricas del ligando en el sobrenadante, generadas en el proceso de marcación. Cabe destacar que esta NP cuenta con un menor grado de polímeros unidos a la NP que la AF-BSA NP.

Tabla 13 Total de grupos –NH superficiales por NP realizando una estimación lineal con la BSA NP sin modificar.

NP	BSA totales	NH
BSA NP	2,25E+03	6,12E+03
AF- BSA NP	2,40E+05	6,54E+05
F- BSA NP	419	1,14E+03

- *Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: UV-Vis*

Los perfiles de absorbancia de ambas NP marcadas muestran corrimientos de la longitud de onda hacia el rojo comparados con aquel de la BSA NP (Figura 14.2.a). Este corrimiento denota en ambos casos un carácter menos hidrofóbico de las NPs marcadas. Sumado a estos cambios, ambos espectros presentan cambio en el ancho del hombro correspondiente a la absorbancia del Trp y la intensidad de la absorbancia.

Como ya se ha mencionado previamente, un cambio en el ancho del hombro del Trp responde a un cambio en el tamaño de las NPs en la dispersión coloidal (Rohiwal et al., 2015; Siri et al., 2017); cuanto más ancho el hombro es, mayor el tamaño de las NPs. Para las BSA NPs el ancho del hombro corresponde a unos 15 nm, teniendo una absorbancia de 0,331. La AF-BSA NPs presentan un hombro 6 nm más ancho que el de las BSA NPs (21 nm) lo que permite inferir un aumento en el tamaño de las NPs marcadas con AF (Figura 14.2a). En cambio, para las F-BSA NPs, el hombro del Trp presenta una disminución del ancho de 2 nm (13 nm), lo que indica un tamaño menor de las NPs (Figura 14.2a). Los resultados aquí expuestos respaldan lo obtenido por DLS (Figura 14.1.a).

- *Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: Fluorescencia*

Al excitar mediante fluorescencia el Trp de cada BSA NPs descritas en esta sección, se observaron diferencias significativas entre los perfiles de emisión de fluorescencia (Figura 14.2.b). El máximo para el Trp en las F-BSA NPs se encuentra en los 341 nm, el de AF-BSA NPs en los 340 nm, mientras que el de las BSA NPs se encuentran en los 338 nm. Los Trp de ambas NPs marcadas se encuentran en ámbitos con índice de hidrofobicidad similar, al experimentar un corrimiento hacia el rojo, se infiere un

ambiente menos hidrofóbico del bolsillo principal de unión en las NPs (Gelamo et al., 2002) (Figura 14.2.b).

Las F-BSA NPs tienen una menor emisión de fluorescencia que las BSA NPs, mientras que las AF-BSA NPs cuentan con una emisión de fluorescencia similar a la de las BSA NPs. Estas características sugieren que el Trp en las F-BSA NPs se encuentra menos expuesto hacia la superficie, pero que el Trp de la AF-BSA NP no varía su posición con respecto al de la BSA NP (Figura 14.2.b).

- *Caracterización de las F-BSA NP y AF-BSA NP: Dicroísmo Circular*

Se estudiaron cambios en la conformación α -hélice de las diferentes NPs mediante C.D. (Figura 14.2.c). Para las F-BSA NPs se observa mayor intensidad de las señales dicroicas lo que se interpreta como una estructura menos agregada, más laxa (Figura 14.2.c). Al observar el perfil dicroico de las AF-BSA NPs y compararlo con el de las BSA NPs se observa menor señal dicroica, lo que indica agregación de las NPs marcadas con AF (Figura 14.2.c).

- *Medición de la vida media de la F-BSA NP*

Una vez caracterizada la estructura de las F-BSA NPs se procedió a estudiar su funcionalidad si son utilizadas como NPs para diagnóstico por imágenes. Para ello, se incubó la dispersión F-BSA NP a 37 °C en oscuridad total, midiendo cada 15 min la emisión de fluorescencia del fluoróforo (FITC) (Figura 16). Se observa un decaimiento de la fluorescencia del fluoróforo del 25 % luego de 2 h de incubación.

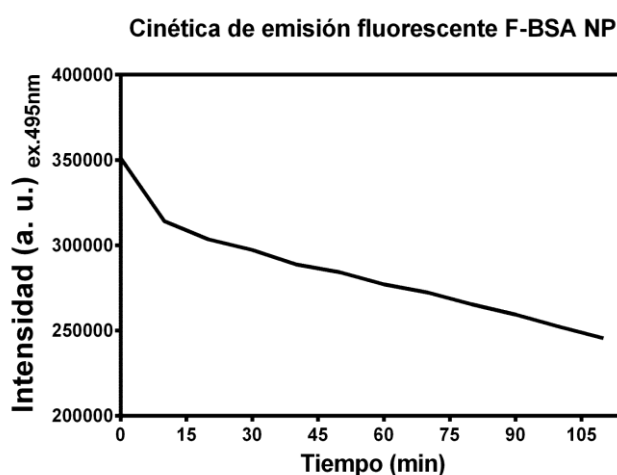


Figura 15 Perfil de la atenuación de fluorescencia de la F-BSA NP incubada en oscuridad con mediciones a intervalos de 15 min a 37 °C.

Este resultado sugiere no proponer el uso de la NP para diagnóstico por imagen. Se estima que una vez internalizada en el organismo la atenuación por interferencia de otras moléculas será tal que inhabilitará la detección de la F-BSA NP.

- *Funcionalidad preliminar de la AF-BSA NP: Parámetros de interacción*

Para poder estudiar la funcionalidad de las AF-BSA NPs se estudió su actividad como transportador de drogas. Para ello se eligió una droga hidrofóbica con potencial antitumoral llamada Emodin (E). El E es una molécula con estructura similar a la del antraceno, presentado un equilibrio ácido-alcalino en soluciones acuosas intercambiando entre especies neutras, mono y di-aniónicas (Sevilla et al., 2007). La característica de mayor relevancia para este ensayo es la habilidad de la droga de unirse a proteínas formando complejos (Sevilla et al., 2007).

Para estudiar la interacción entre las NPs y la droga se realizó un ensayo por espectroscopia de fluorescencia mediante el cual se pudieron obtener las constantes de interacción: la constante de disociación (K_d) y cantidad de droga máxima interactuando con el vehículo (B_{max}) (Figura 17). A partir de la curva de atenuación del Trp de las F-BSA NPs por concentraciones crecientes de E, se procedió a calcular los parámetros de interacción. Una atenuación en la emisión de fluorescencia del aminoácido aromático indica un tipo de interacción entre el Trp y el E ya que para que esto suceda se necesita una distancia mínima de 5 nm de distancia entre una molécula y otra (Figura 17a). En base a esta interacción se puede graficar la curva de interacción perteneciente al sistema de estudio (Figura 17b). De este último gráfico se realizó un ajuste matemático con la ecuación Scatchard de la cual se obtuvieron las constantes de interacción (Tabla 14).

Siempre que el valor de la K_d es grande, la constante de asociación (K_a) es pequeña, por lo que a mayor K_d , menor afinidad entre droga y vehículo. Las AF-BSA NPs presenta una K_d de bajo valor (en el orden de $10e^{-05}$), lo que sugiere una afinidad alta entre NPs y E (Sevilla et al., 2007; Banerjee et al., 2012) (Tabla 14).

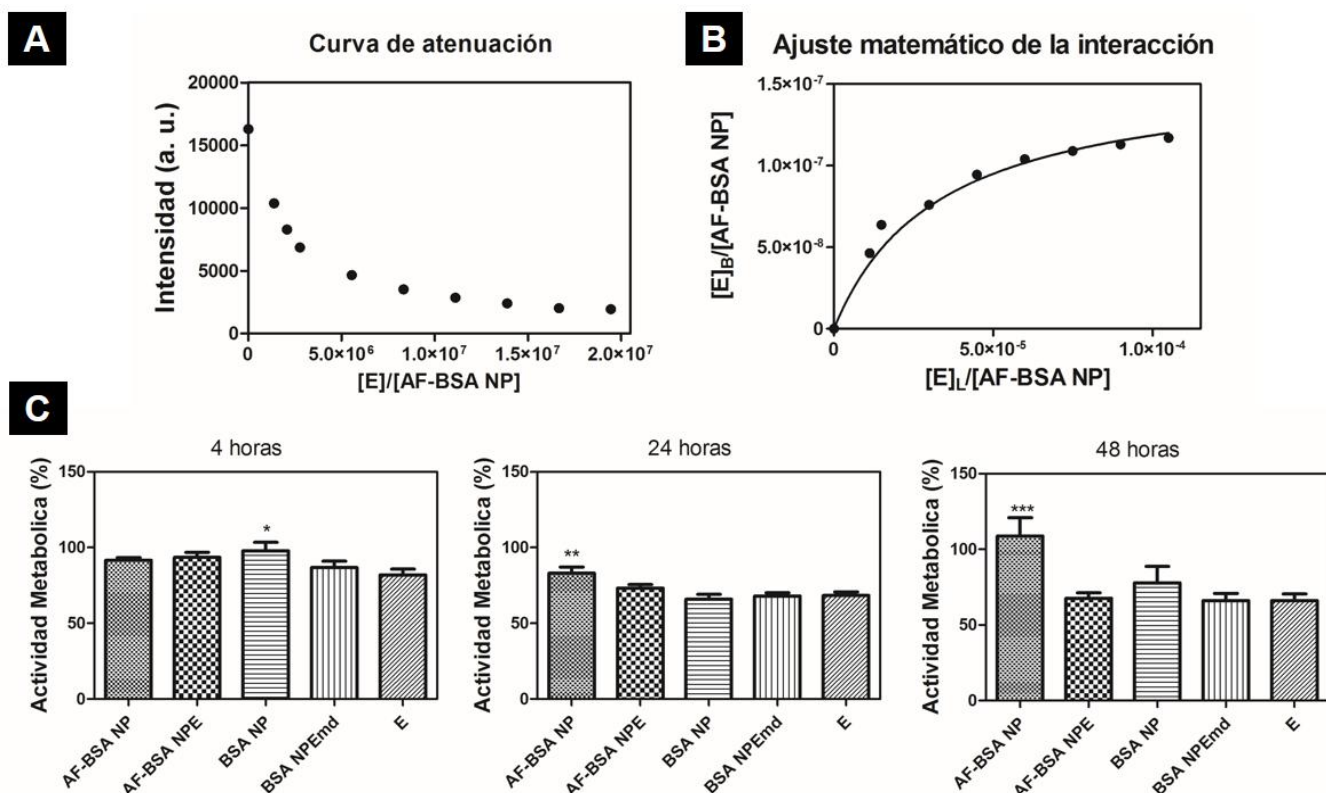


Figura 16 Se representa el estudio de la función de la AF-BSA NP como nanovehículo en un sistema de transporte de drogas con E unido. (A) Curva de atenuación de la emisión de excitación del Trp ubicado en el sitio principal de unión a drogas de la AF-BSA NP indicando una interacción de ésta con el E. (B) Ajuste matemático de la Figura 12A con la ecuación Scatchard para poder obtener los parámetros de interacción. (C) Citotoxicidad de la AF-BSA NP y AF-BSA NPE en línea tumoral MCF-7 a 4, 24 y 48 h de incubación. Los datos graficados se encuentran relativizados a células control (células sin tratamiento).

La K_d para la BSA y el E varía entre los ordenes 10^{-8} y 10^{-6} (Sevilla et al., 2007). En este trabajo la K_d tiene un valor en el orden de 10^{-6} . La diferencia del valor de la constante está directamente relacionada con la derivatización de la NP. Al marcar las moléculas de BSA con AF antes de su irradiación, genera que al momento de formar la NP la organización con las moléculas de AF logren una compactación en la NP. Esto se comprueba al calcular la cantidad de BSAs totales y superficiales en la AF-BSA NP (Figura 15). Esta NP cuenta con un total de 240000 proteínas totales de las cuales 357 son superficiales. Si esto fuese así, entonces la AF-BSA NP cuenta con una estructura más compacta que la BSA NP (con 2243 proteínas totales y 357 superficiales). Esta compactación lleva a una alteración conformacional de la NP la que conlleva a variar su afinidad por el E. Dicha variación puede estar dada por la exposición o microambiente que rodea al Trp ubicado en el sitio activo de la NP. Si bien se observó que la exposición del aminoácido no varía, el espectro de fluorescencia se corre hacia el rojo (Figura 14.2.b), por lo que significa un ambiente del sitio activo menos hidrofóbico. Esto podría significar una disminución de la afinidad entre la droga y la NP ya que la predilección de la molécula por el bolsillo de la NP se ve disminuido por el cambio de

hidrofobicidad. Sin embargo, al no ser un cambio tan marcado, se preserva la afinidad que tenía antes.

Tabla 14 Valores de los parámetros de interacción de la AF-BSA NP con la droga E. Los valores corresponden a cálculos realizados con datos extraídos de la Figura 12B.

Parametros	AF-BSA NPE
B_{mx}	$1,4 \text{ e-}07 \pm 4,2 \text{ e-}09$
K_d	$2,1 \text{ e-}05 \pm 2,1 \text{ e-}06$
R^2	0,99

- *Funcionalidad de la AF-BSA NP: Ensayos citotóxicos en línea tumoral MCF-7.*

Se estudió el efecto citotóxico de la AF-BSA NP midiendo la actividad metabólica celular de la línea tumoral celular humana MCF-7 (tumor mamario humano). El máximo de actividad obtenida fue a las 48 h post incubación; en la literatura éste es el máximo de actividad observada para el E (Figura 17c).

Luego de 4 h de incubación, el complejo AF-BSA NPE logra una disminución de la viabilidad celular del 10 %, siendo ligeramente menos tóxico que E, pero ligeramente más tóxico que la NP sin la droga (Figura 17c). A las 24 h se puede observar un descenso de la viabilidad del 30 % causado tanto por el complejo como por la droga en estado libre. Finalmente, a las 48 h se observa una viabilidad celular de las células tratadas con el complejo del 55 %, similar a la alcanzada por el E (Figura 17c) (Shen et al., 2011). Las AF-BSA NPs no generan citotoxicidad significativa a lo largo del ensayo: la viabilidad celular de las células tratadas con NPs no muestran ningún cambio.

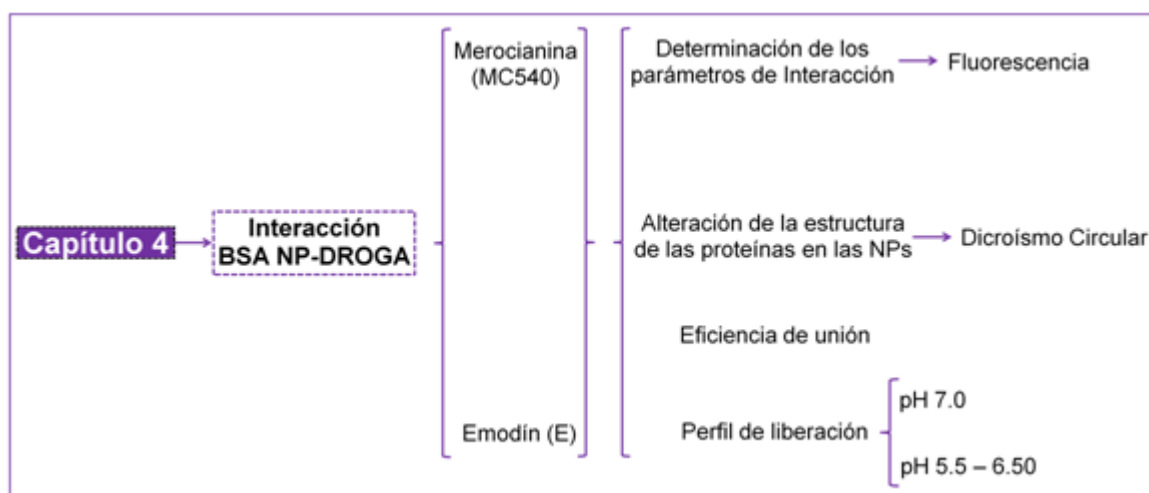
La AF-BSA NP no muestra signos de citotoxicidad al estudiar el metabolismo celular de la línea MCF-7 (Figura 17c). Esto sugiere una muy buena compatibilidad entre la NP y la célula, por ello la célula reconocerá como propio al sistema, siendo sólo tóxica la droga que transporta.

Conclusión

En base a la información obtenida en este capítulo sobre la marcación con distintos ligandos funcionales de las BSA NPs se concluye:

- Las AF-BSA NPs poseen un porcentaje de eficiencia del protocolo de marcación superior al de F-BSA NPs. Se logra unir una cantidad sustancial de moléculas ligando por NPs: $6,37 \times 10^7$ AF/ NP y $5,21 \times 10^3$ FITC/ NP.
- Los datos recolectados en esta sección muestran a la AF-BSA NP como un nano-vehículo con potencial para ser utilizado como sistema transportador de droga para tratamientos médicos. Así mismo, se demuestra que no es posible utilizar la F-BSA NP como un sistema para diagnóstico por imágenes.

Capítulo 4: Obtención de los bioconjugados de la BSA NP: drogas anti-tumorales (DAT)



Introducción

Una vez caracterizada la BSA NP, se estudio su funcionalidad. Para ello se conjugó a la NP con dos drogas modelo. Particularmente se dirigió la atención hacia drogas que servirían en terapias antitumorales.

La primera droga elegida es el Emodin (E) (6-metil-1,3,8-trihidroxiantraquinona), la cual es estudiada como un fármaco con potencial contra la diabetes tipo II, por ser un inhibidor de la enzima 11 β -HD1, la cual también se ha comprobado que en su estado más puro, posee efectos anticancerígenos en varios tipos de cáncer (Feng et al., 2010) (Ilustración 10). Otra de las propiedades que muestra el E, es el de posible neuroprotector contra toxicidad por glutamato.

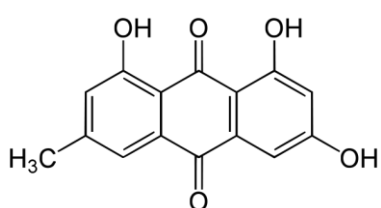


Ilustración 10 Estructura del Emodin (E)

En la actualidad, el E no es utilizado como tratamiento médico debido a su alta toxicidad sistémica. Por esta razón es que se lo seleccionó como droga modelo para el estudio; para asegurar que el sistema de transporte de droga elegido actúe protegiendo al organismo de toxicidad inespecífica, y a la vez proteja a la droga de degradación específica. De esta manera, las diferencias entre droga libre y droga encapsulada serían visibles.

La Merocianina 540 (MC540) es un cromóforo heterocíclico cargado negativamente (Ilustración 11).

Pertenece al grupo de las cianinas (Banerjee et al., 2012). Es sabido que la MC540 al

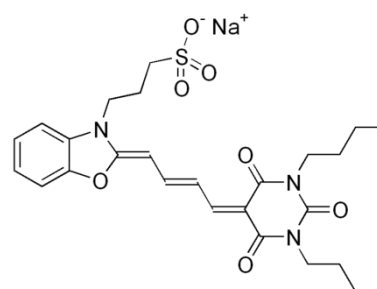


Ilustración 10 Estructura de la Merocianina 540 (MC540)

igual que el Emodin, presenta propiedades anti- tumoral y anti-viral (Sieber et al., 1987, O'Brien et al., 1991, Banerjee et al., 2012). Tradicionalmente se la ha utilizado como una sonda óptica para estudiar la estructura y función biológica de las membranas, ya que se une a la parte hidrofóbica de ellas preferentemente (Banerjee et al., 2012).

Se eligió esta droga por las posibilidades que presenta en su uso en terapias fotodinámicas (PDT), así como uso teragnóstico (Lin et al., 2004, Tsujino et al., 2006). Este capítulo tiene como objetivo estudiar el mecanismo de unión entre droga y BSA NP. Si el sitio de unión sigue cumpliendo con su función se obtendrá además mayor información acerca de la estructura y ensamblado de las BSA NPs.

4.1 Obtención de los bioconjugados

Materiales y Métodos

Se prepararon soluciones en concentraciones bajas de BSA (15 μ M) y BSA NP (18,4 nM) para evitar pérdidas de absorbancia por dispersión de luz (*scattering*) en las muestras. Se partió de una concentración inicial de las soluciones de drogas antitumorales (DAT) de 450 μ M y se realizaron diluciones hasta una concentración final dentro del rango [DAT]/ [BSA]=0,00 - 12000, siendo la concentración máxima de DAT alcanzada 90 μ M.

Para hacer las mediciones se utilizó un fluorómetro S2 Scinco. Las muestras fueron excitadas a 295 (Trp) y 280 (Tyr y Trp) nm. Las emisiones fueron a los 340 y 337 nm respectivamente. Los resultados se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.

Determinación de la constante de afinidad (Sevilla et al., 2007)

La constante de disociación K_d y B_{max} , que corresponden al máximo de DAT unido a la proteína por cada sitio de unión de la BSA NP, y fue determinado siguiendo los cambios en la señal de fluorescencia. Dichos cambios son inducidos por la unión de la droga con la proteína.

La concentración de DAT unido al vehículo (B) fue la variable en el ensayo. Cuando la proteína se encontraba en exceso, [DAT] tendería a 0. Por ende, se graficó la fluorescencia relativa, F, contra la relación [DAT]/[vehículo].

$$(1) F = F_0 + m_i v$$

De la ecuación (1) se determina a “ m_i ” como la pendiente de la curva y $v = B / [BSA \text{ NP}]$. Con los datos experimentales entonces se puede calcular B de acuerdo con

$$(2) B = v * [\text{vehículo}]$$

La cantidad de ligando libre, L, se obtiene de la diferencia entre la cantidad de ligando total y la cantidad de ligando unidos, calculada por la ecuación (2). Con estos datos es posible graficar un diagrama Scatchard.

$$(3) v/L = n K_d - v K_d$$

en donde “n” es el número de sitios de unión y “ K_d ” es la constante de disociación para la formación del complejo. Para obtener la constante de cada sitio de Sudlow de la BSA NP, se analizaron a los datos con el software GraphPad Prism 5.

Resultados y Discusión

Al excitar a dos longitudes de onda diferentes: 295 nm (Trp) y 280 nm (Tyr y Trp), se obtiene información acerca de que grupos en los bolsillos están interactuando con la droga. A modo de recordatorio; la BSA contiene dos triptófanos (Trp-134 y Trp-212) y veintiún tirosinas (Tyr). A su vez, contiene dos bolsillos hidrofóbicos uno en el Subdominio IIA, gobernado por el Trp 212, llamado sitio Sudlow I y el otro bolsillo hidrofóbico gobernado principalmente por Tyr llamado sitio Sudlow II. (Sevilla et al., 2007). Estos bolsillos son los principales sitios de unión a droga. De los dos Trps el Trp-134 es él que se encuentra en el subdominio IA en una posición superficial, por lo que su emisión de fluorescencia intrínseca se debilita por su interacción con el solvente. Además, tiene un carácter más hidrofílico que el Trp-212, descartándose una posible interacción con cualquier droga de carácter negativo como son E y MC540.

Al excitar la BSA NP en ambas longitudes de onda se obtienen curvas de disminución de fluorescencia similares entre sí cuando el vehículo se encuentra interactuando en concentraciones crecientes de E (Figura 18a). Ambas curvas saturan cuando la relación $[E]/[\text{vehículo}] = 6000$. Se sugiere que cuando hay 6000 moles de E por mol de vehículo se establece el equilibrio entre droga libre y encapsulada (Figura 18a).

La estructura de la BSA presenta solamente un Trp en el interior del sitio de unión Sudlow I, mientras que la mayoría de las Tyr de la proteína se encuentran situadas en el sitio Sudlow II (Sevilla et al., 2007). Si la droga interactuara de manera diferente con los bolsillos, se deberían observar diferencias entre las curvas de atenuación siendo que al excitar a 280 nm se excitan las Tyr y Trp, pero al excitar a 295 nm se excita únicamente el Trp. Como para la BSA NP las curvas de atenuación no muestran diferencias entre sí, se realizó un ajuste matemático de regresión lineal a los primeros puntos de la curva de atenuación. Parte de los datos obtenidos donde la disminución de emisión fluorescente es pronunciada (Figura 18b). Una vez realizado el ajuste, se obtienen los valores de las pendientes de las distintas curvas. De esta manera queda explícito que no se encuentran diferencias significativas entre las pendientes de las curvas siendo $-5,20 \times 10^{-4} \pm 5,8 \times 10^{-5}$ y $-4,92 \times 10^{-4} \pm 9,8 \times 10^{-5}$ al excitar la muestra a 280 y 295 nm respectivamente (Figura 18b). Por ello, para la BSA NPE, al no haber diferencia entre una curva y otra, entonces al interactuar con E el único bolsillo que está participando de la unión es aquel que contiene el Trp: Sitio Sudlow I.

Otra posible explicación es que, al no haber diferencias entre las curvas de atenuación entre ambas longitudes de excitación, se estaría anulando la emisión de fluorescencia

que corresponde al bolsillo que contiene Tyr (Sudlow II) por interferencia destructiva entre ambas.

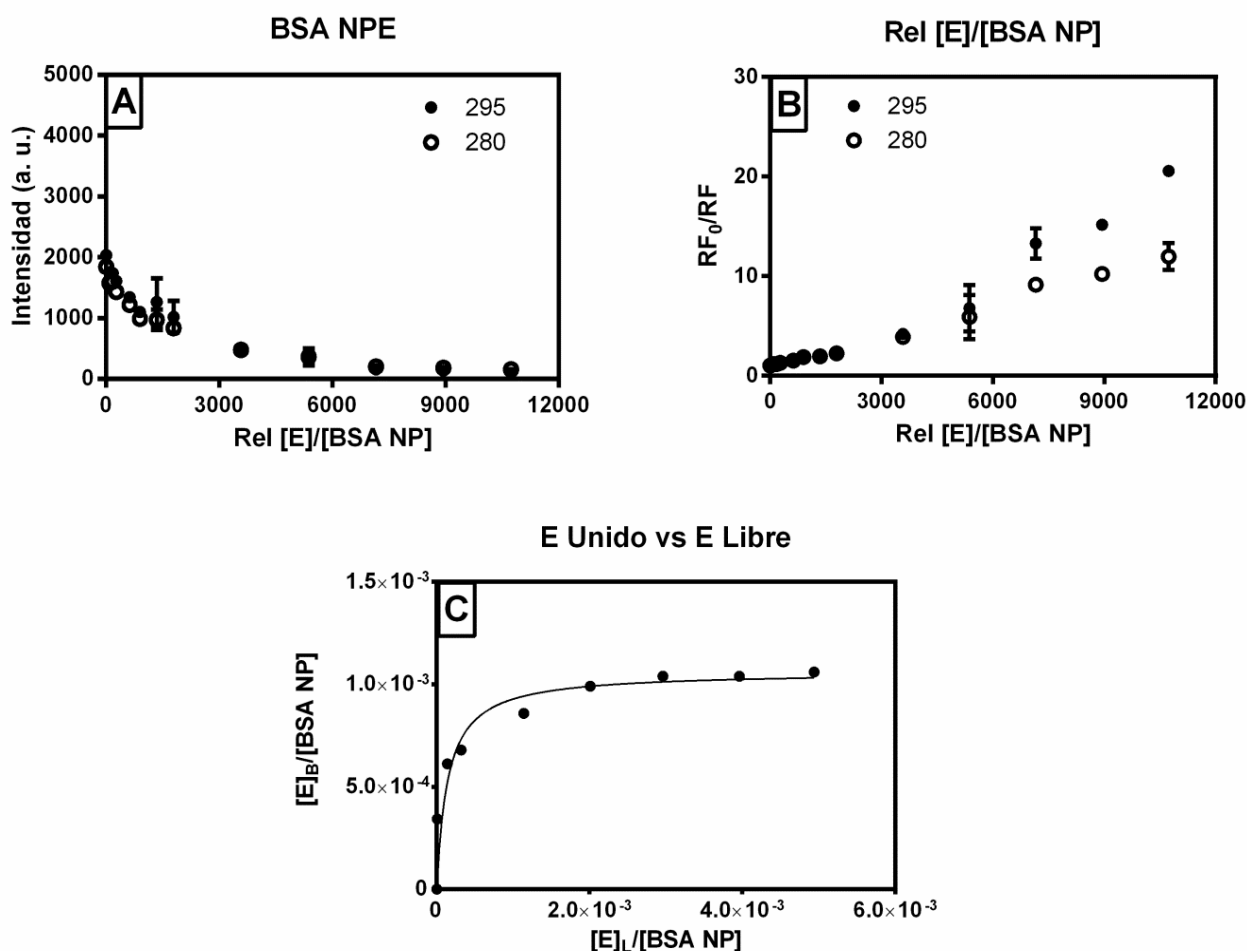


Figura 17 Se representan las curvas de atenuación de la BSA (a) y (c), y de la BSA NP (b) y (d) al interaccionar E con concentraciones crecientes (0.0 – 90.0 μ M). Las muestras se excitaron a 280 y 295 nm, con una emisión a 340 y 338 nm, respectivamente. Los datos corresponden a triplicados de las medidas. Representación de las pendientes resultantes de la interacción de E con (a) BSA y (b) BSA NP al excitar las muestras a 280 y 295 nm. Representación gráfica de ajuste usando la ecuación de Scatchard, a partir de la información recolectada según la Figura 35. En este caso, el ajuste se realizó considerando el modelo de regresión no lineal de un sitio de unión (hipérbola) ("One site binding (hyperbola)" from Non-linear regression fit curve).

Cabe destacar que en forma paralela el mismo análisis se realizó para estudiar la interacción entre BSA y E y con el fin de comparar resultados con nuestro nuevo sistema. Lo que se destaca del análisis de la interacción BSAE es la diferencia entre los valores de las pendientes de las curvas de atenuación: siendo $-1468 \pm 161,5$ y $-2406 \pm 106,5$ al excitar la muestra a 280 y 295 nm respectivamente. Esto indica la mayor diferencia entre la proteína en estado molecular y la NP: la primera permite a la droga interactuar con ambos bolsillos (el de mayor interacción y luego con el de menor),

mientras que el sistema nuevo permite solo la interacción con aquel que interactúa más fuertemente.

Para calcular las constantes de interacción entre el E y el vehículo, se ajustó matemáticamente la curva de atenuación de la emisión fluorescente con la ecuación Scatchard (Figura 18c). Se obtuvo la cantidad máxima de droga que interactúa con el vehículo (B_{max}) y la constante de disociación (K_d) para el sistema BSA NPE (Tabla 15). Se debe recordar que cuanto mayor sea la K_d , menor será la afinidad por la droga ya que la constante de afinidad (K_a) será menor.

Tabla 15 Se detallan los valores de B_{max} y K_d que se obtuvieron a partir de la Figura 18 tanto para BSA como para BSA NP conjugados con E.

Parametros	BSAE	BSA NPE
B_{max}	$2,55 \text{ E-}05 \pm 8,04 \text{ E-}07$	$3,01 \text{ E-}05 \pm 1,34 \text{ E-}06$
K_d	$1,25 \text{ E-}06 \pm 2,93 \text{ E-}07$	$2,60 \text{ E-}06 \pm 5,91 \text{ E-}07$
R^2	0,98	0,97

Al estudiar dichas constantes se observa que la K_d para ambas, BSA y BSA NP, se encuentran en el mismo orden; $1,25 \text{ E-}06$ y $2,60 \text{ E-}06$ respectivamente. Por lo que no sólo hay interacción entre droga y NP, sino que la afinidad por esta droga se conserva (Tabla 15).

Si bien la K_d es del mismo orden en la NP que en la BSA, la diferencia entre NP (B_{max} : $3,01 \text{ E-}05$), y BSA es mínima (B_{max} : $2,55 \text{ E-}05$). Pero si tomamos en consideración el peso molecular de cada una, entonces por ml de dispersión la BSA NP cuenta con menor número de NPs que una dispersión de BSA. Por lo que la NP, siendo menor cantidad de partículas en la dispersión interactúa con mayor cantidad de droga pero con una afinidad tan fuerte como la de la BSA.

La BSA cuenta con ambos bolsillos, Sudlow I y II. Por lo que el E interactúa primero con el sitio de mayor afinidad, sitio Sudlow I (Sevilla et al., 2007), y una vez que éste se satura, interactúa con el sitio Sudlow II.

Contrario a esto, las BSA NPs, no contarían con la posibilidad de un segundo bolsillo de interacción con la droga ya que los resultados sugieren que la única afinidad observada experimentalmente es aquella dada por el sitio Sudlow I con la droga E. Esto es, tiene un solo bolsillo de interacción principal disponible en cada molécula de BSA que

compone la NP, o sea que es capaz de interaccionar con mayor cantidad de droga y con igual afinidad que lo hace la BSA.

Para estudiar la interacción de la BSA NP con MC540, se siguió el mismo análisis. Se observó como a concentraciones crecientes de la droga, se obtienen curvas de atenuación similares al excitar las muestras con BSA NPs con ambas longitudes de onda de excitación (Figura 19a).

Realizando el ajuste de regresión matemática tanto para la interacción BSAMC540 (datos no mostrados) y BSA NPMC540 (Figura 19b) se obtienen los valores de pendiente de cada curva: $-906,3 \pm 17,85$ y $-949,9 \pm 96,76$ al excitar la muestra BSAMC540 a 280 y 295 nm respectivamente, y $-0,25 \pm 0,018$ y $-0,30 \pm 0,039$ al excitar la muestra BSA NPMC540 a 280 y 295 nm respectivamente. Esto es indicativo de que, mientras el bolsillo conteniendo Tyr se encuentra bloqueado una vez más para su interacción con la MC540 en la BSA NP, la BSA tiene ambos bolsillos disponibles para dicha conjugación. Según Banerjee et al., 2012, la MC540 no interaccionaría con el Trp-134 (Trp más superficial de los dos presentes en la BSA que se encuentra en el Dominio I) por encontrarse en un sitio más hidrofílico y por ende en un ambiente más electronegativo. Cabe destacar que dichos autores sugieren una interacción entre la BSA y MC540 dada por transferencia de carga de la sonda a la proteína, considerando que la MC540 es negativa.

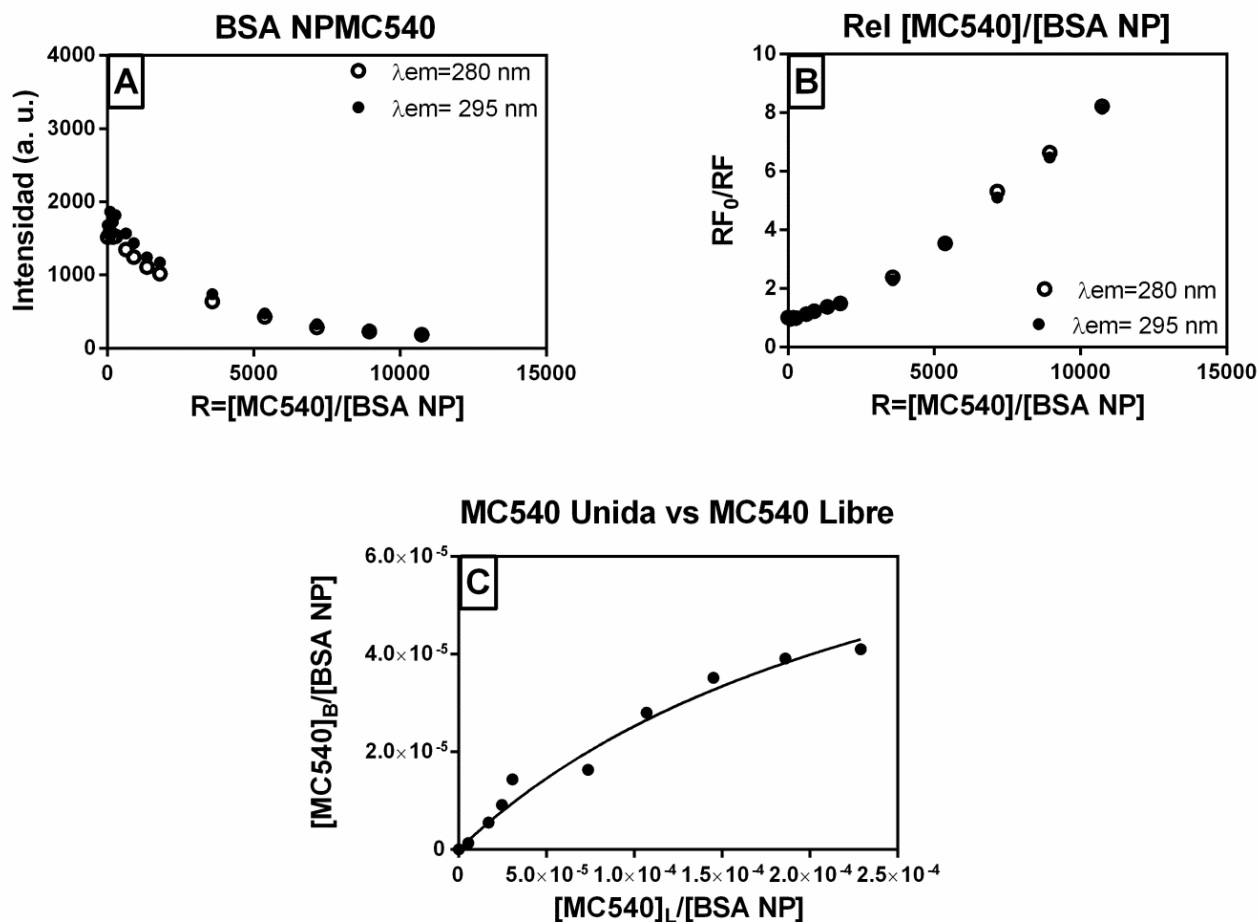


Figura 18 Se representan las curvas de atenuación de fluorescencia de la BSA (a) y (c), y de la BSA NP (b) y (d) al interaccionar con MC540 en concentraciones crecientes (0.0 – 90.0 μM). Las muestras se excitaron a 280 y 295 nm, con emisión a 340 y 338 nm, respectivamente. Los datos corresponden a triplicados de las medidas. Representación de las pendientes resultantes de la interacción de MC540 con (a) BSA y (b) BSA NP al excitar las muestras a 280 y 295 nm. Representación gráfica de ajuste según la ecuación de Scatchard, obtenida a partir de los datos de la Figura 37. En este caso, el ajuste siguió el modelo de ecuación de regresión no lineal con un sitio de unión ("One site binding (hyperbola)" from Non-linear regression fit curve).

Para calcular las constantes de interacción entre la MC540 y el vehículo fue necesario usar un ajuste matemático a los datos de la curva obtenida (Figura 19c). En base a esto se obtuvo la cantidad máxima de droga interaccionando con el vehículo (B_{max}) y la constante de disociación (K_d) (Tabla 16).

Las K_d de la BSA y BSA NP resultaron ser del mismo orden, es decir, aquí también se conserva función y afinidad de la NP por la droga en cuestión (Tabla 16). Sin embargo, contrario a lo que sucede con el E, la BSA NP cuenta con un valor de B_{max} menor que la BSA (0,94E-04 y 2,09E-04 respectivamente, Tabla 10) pero del mismo orden. Debemos considerar que durante el proceso de interacción de la MC540, molécula de gran tamaño, con la NP ésta experimenta un leve cambio hacia una estructura más compacta con un carácter más hidrofóbico del entorno del Trp, en el bolsillo Sudlow I. Por lo que la

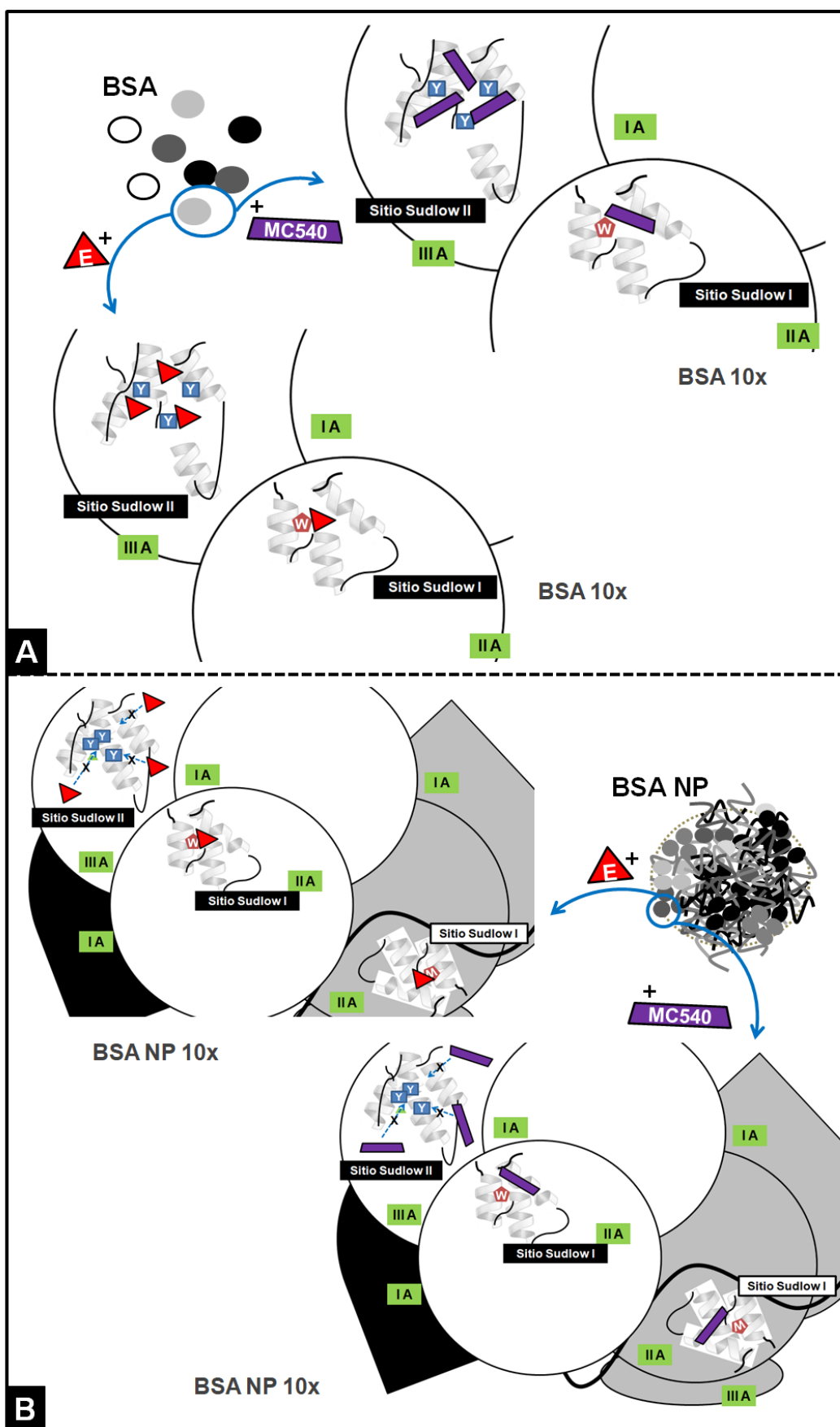
MC540 tendría mayor impedimento para entrar al bolsillo, impedimento no presente para el E ya que este es una molécula de tamaño menor. Además, el mayor carácter hidrofóbico del bolsillo principal de unión a compuestos puede ser una desventaja para la MC540, ya que entre las dos drogas en estudio, ésta es la que es menos atraída por ambientes hidrofóbico.

Tabla 16 Se detallan los valores de B_{max} y K_D que se obtuvieron a partir de la Figura 19 tanto para BSA como para BSA NP conjugado con MC540.

Parametros	BSAMC540	BSA NPMC540
B_{mx}	$2,1 \text{ E-}04 \pm 1,0\text{E-}04$	$0,9\text{E-}04 \pm 0,3\text{E-}04$
K_D	$6,4\text{E-}04 \pm 4,1\text{E-}04$	$2,8\text{E-}04 \pm 1,3\text{E-}04$
R^2	0,97	0.95

Ambos sistemas saturan en una relación droga-NP aproximadamente de 6000 (Figura 18a; Figura 19a). La BSA NP es más afín al E ($2,60\text{E-}06$) que a la MC540 ($2,76\text{E-}04$). El E al ser pequeño puede interaccionar más con una estructura más compacta de la NP, mientras que la MC540 encuentra mayor dificultad para la unión debido a su mayor tamaño (Esquema 19).

Como ambas moléculas presentan una carga negativa en la dispersión (Sevilla et al., 2007; Banerjee et al., 2012), lo que marca la diferencia de afinidad de interacción en este caso es el tamaño de la molécula con la cual la NP interacciona (Esquema 19).



Esquema 20 Representación gráfica de la interacción de la BSA (A) y BSA NP (B) con las diferentes drogas estudiadas en base a los resultados experimentales obtenidos

4.2 Comportamiento estructural de la BSA NP conjugada a drogas por Dicroísmo Circular (C.D.).

Materiales y Métodos

La interacción entre BSA NP y droga fueron medidas por dicroísmo circular utilizando un equipo Jasco 810 espectropolarímetro equipado con una celda de efecto Peltier para control de temperatura. Las muestras fueron medidas a temperatura ambiente (25 °C) en el CD – lejano (180 – 280 nm). La concentración de BSA NP se mantuvo constante en 37,0 nM mientras que la concentración de droga varió de acuerdo a la relación: $R = [DAT]/[BSA\ NP]$, en donde $R = 0,0 - 8100,0$, con un mínimo de droga 0,0 μM y un máximo en 300 μM . Las medidas se realizaron con una redispersión de 0,1 nm, se tomaron 5 espectros consecutivos por medida de muestra y se tomó el promedio de los mismos.

Para obtener las constantes de interacción se procedió de manera similar a como se realizó en los ensayos de fluorescencia. El Trp correspondiente a la NP fue excitado y se recogieron los datos por interacción con cada concentración creciente de droga. Mediante los datos adquiridos en el experimento, se obtuvo la constante de disociación (K_d) y la cantidad máxima de droga unida a la nanopartícula (B_{max}).

La intensidad de fluorescencia del Trp fue representada gráficamente como $[E]/[BSA\ NP]$. Del gráfico se obtuvo una pendiente, de ésta se calculó la cantidad de E libre en cada muestra. Representando E libre vs E unido, se calculó por ajuste matemático aplicando la ecuación Scatchard, la K_d y B_{max} . El ajuste matemático fue al de una hipérbola con un sitio de unión por regresión no lineal (*Hyperbol One site-binding*). El software utilizado fue GraphPad Prism V.5.

Resultados y Discusión

Para estudiar si la interacción BSA NPs: DAT modifica la estructura de las NPs, se realizó un ensayo de C.D. con los complejos. Se hizo hincapié en el C.D. lejano, en aquellas señales correspondientes a la estructura de α hélice (Figura 20). Se observa en primera instancia un decaimiento de la señal de la estructura α hélice con el agregado de mayores concentraciones de E (Figura 20a). A partir de una relación $[E]/[BSA\ NP]$ de 6500, se produce un gran cambio de estructura en la que se invierte el espectro. Dichas alteraciones estructurales, denotan una interacción entre el E y el dominio α -hélice de las NPs.

Las BSA NPs al estar compuestas por albúmina la estructura secundaria de mayor contenido será la α -hélice (Sevilla et al., 2007) si se conservan como tal al formar la estructura estable de una NP. Por ensayos llevados a cabo en el Capítulo 1, se sabe que las BSA que forman parte de las NPs, no experimentan alteraciones conformacionales en la región del sitio de unión detectables con las técnicas usadas. Éste sitio se encuentra entre α -hélices, por lo que cuando interactúa con el E se observa una alteración estructural del sitio de unión de las BSA NPs, y se ve reflejado como una diferencia en la señal dicróica de las diferentes soluciones medidas (Figura 20a).

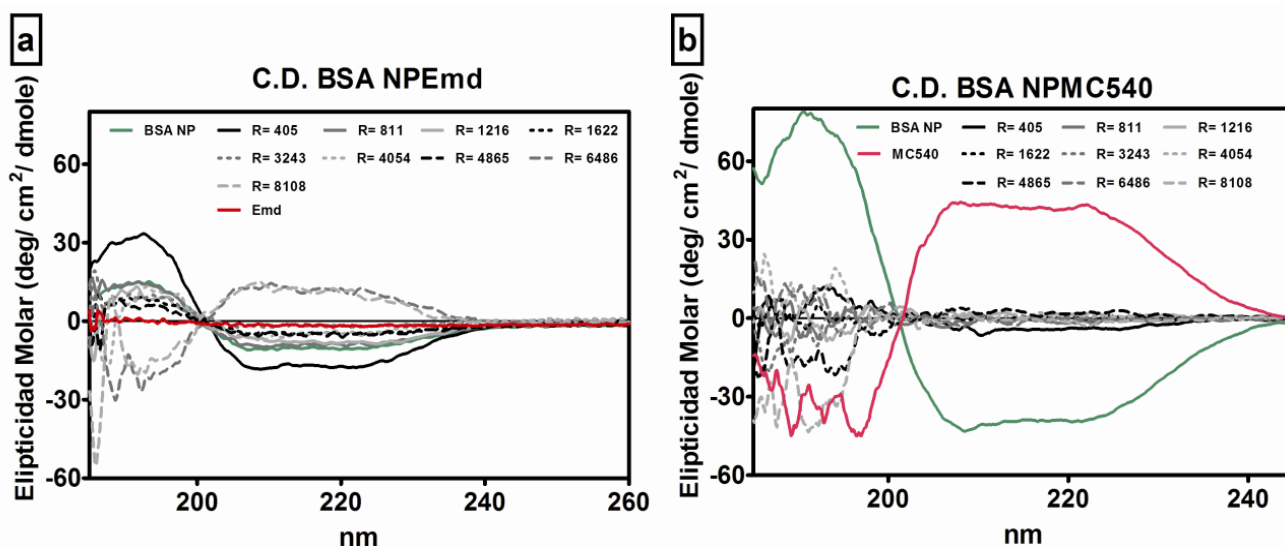


Figura 19 Representación gráfica de la interacción entre BSA NP y E, en la cual se mantiene constante la concentración del nanovehículo y se agregan concentraciones crecientes de droga. Las muestras fueron estudiadas en el C.D.-Lejano desde 190 – 260 nm.

La constante de disociación (K_d) entre la BSA NP y el E, calculada fue de $5,85 \times 10^{-4}$, mientras que su B_{max} fue de $2,67 \times 10^{-2}$ (Tabla 17). Los valores obtenidos muestran gran afinidad de las BSA NPs por la droga, así como también la gran cantidad de ésta

retenida por el nanovehículo. Sin embargo, ambos valores difieren de aquellos obtenidos mediante el estudio de interacción por fluorescencia (Tabla 16): tanto la K_d como la B_{max} en este ensayo resultaron en valores mayores.

Se procedió de la misma manera para estudiar el bionconjugado formado por la BSA NP y la MC540 (BSA NPMC540) (Figura 20b). Sin embargo, no fue posible realizar los cálculos de los parámetros de interacción con los resultados de los espectros de C.D.; porque los espectros de MC540 y BSA NP se restan entre sí. No obstante, al aumentar la concentración de MC540 en las muestras, se observa un decaimiento de señal en ambos espectros: BSA NP y de la MC540. Esto es indicativo de la formación del bioconjugado interacción mediada por la estructura α – hélice de la NP con la MC540.

Tabla 17 Se muestran los valores obtenidos a partir de la Figura 40 luego del manejo de datos aplicando el ajuste matemático *One – Hyperbola Binding Site*.

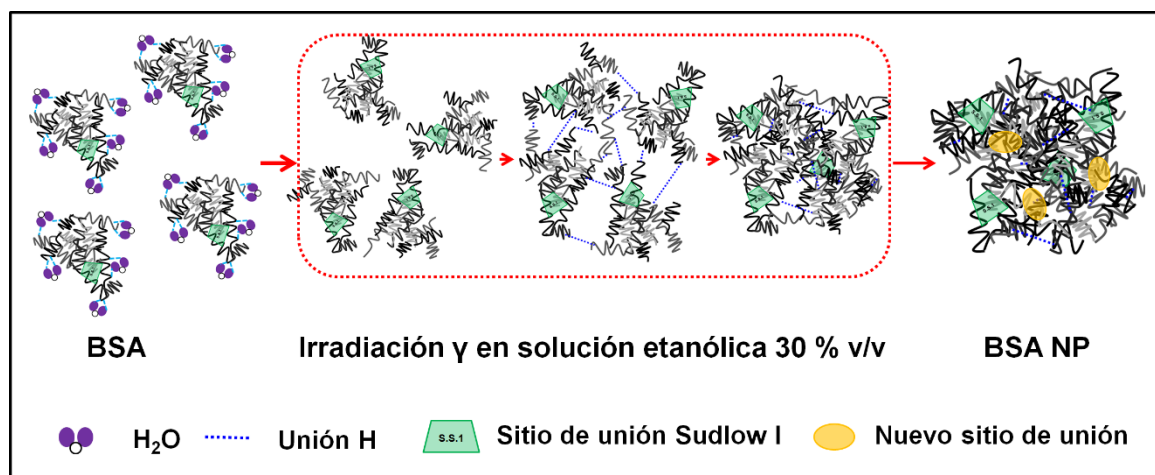
Parámetros	Estudio de Fluorescencia BSA NP/E	Estudio por C.D. BSA NP/E
B_{mx}	3,0 E-05 $\pm$ 1,3 E-06	2,7 E-02 $\pm$ 7,8 E-03
K_d	2,6 E-06 $\pm$ 5,9 E-07	5,8 E-04 $\pm$ 4,6 E-03
R^2	0,97	0,6

La BSA posee un alto contenido de α – hélice (cercano al 67%), que emite señales dicroicas con mínimos a 208 y 222 nm, aproximadamente. Los cambios ocurridos en estas señales a medida que se incrementaba la concentración de ambas DAT, marcando una interacción entre ellas y la BSA NP (Figura 20).

Se observó que la disminución de señal estaba dada exclusivamente por las α – hélice en la NP, de modo que la interacción de ambas drogas modificaban las regiones de la NP en la zona de este dominio secundario; en los sitios de unión en donde se encuentra el Trp (sitio Sudlow I).

Para el caso del E, se comparó las constantes de interacción (K_d y B_{max}) con aquellas calculadas por el ensayo de fluorescencia (Capítulo 4.1). El orden de magnitud del valor de la K_d calculada en esta parte del trabajo es mayor que en el ensayo de fluorescencia. De acuerdo a estos resultados se propone la idea de que la interacción entre E y BSA NP estaría mediada no solamente por el sitio Sudlow I como se observó en el ensayo de fluorescencia, sino también por otros sitios generados durante la formación de las NPs. El hecho que la K_d sea menor significa que dichos huecos hidrofóbicos en donde se posiciona el E, no son específicos de esta droga. Esto podría sugerir una interacción debido al carácter hidrofóbico de ambos: el bolsillo y la droga. Lo mismo podría decirse que sucede para la MC540. El hecho de que se obtengan cambios de la señal en los

espectros de C.D. involucrado a la estructura α -hélice, sugiere que la interacción BSA NP con MC540 no está exclusivamente reservada al bolsillo de unión principal. Si bien en este bolsillo la interacción es más fuerte, como fue observado en el ensayo de fluorescencia (Tabla 16-17), es probable que durante la irradiación se hayan generado bolsillos hidrofóbicos debido a la unión entre moléculas y que resulten propicios para una interacción con el E y la MC540 (Esquema 20).



Esquema 21 Esquema gráfico con la creación de nuevos bolsillos hidrofóbicos durante el proceso de irradiación de la BSA NP. Estos bolsillos son posibles sitios de interacción entre la BSA NP y las DAT.

4.3 Eficiencia de unión (binding) de los bioconjugados

Materiales y Métodos

Se utilizaron soluciones de 450 μM (BSA) y 555 nM (BSA NP) en PBS (30 mM, pH7). Se partió de una dispersiónmadre acuosa de MC540 y E 450 μM , la cual se diluyó hasta una concentración final de 0,45 μM . Para llegar a dicha concentración, en 6 ml de dispersión del vehículo se agregaron, mientras se agitaba, 120 μl de dispersión de droga antitumoral (DAT).

Luego de agregar la DAT se tomaron muestras de 300 μl cada una de la dispersión y se las pasaron a un tubo tipo *eppendorf* con membrana de separación (Vivaspin 500, 3kDA MWCO, GE Healthcare). Se centrifugó cada tubo a 17000 rpm, durante 20 m a una temperatura de 25 °C. Luego de centrifugado se conservó el eluato sobre la membrana (el complejo formado), y se midió en el UV-Vis Nano-Drop la droga asociada al vehículo. Lo eluido también fue medido, pero los valores obtenidos por medio de ésta técnica, fueron muy bajos con respecto a la cantidad inicial.

Para el ensayo en frio, se mantuvo la dispersión agitándose a 0 °C, las condiciones de centrifugación fueron las mismas que en el caso de incubación del bioconjugado, a temperatura ambiente. Para el ensayo a 50 °C, se incubó en agitación constante a la temperatura indicada. Se mantuvieron las mismas condiciones de centrifugación en todos los casos.

El proceso de toma de muestra se repitió en intervalos de tiempo de: 0 m, 15 m, 40 m y 90 m. Basándose en el ensayo de encapsulación se pudo calcular la cantidad de moles de DAT encapsulada por mol de BSA/ BSA NP.

Resultados y Discusión

Luego de corroborar una interacción entre las drogas y la NP, se estudió la eficiencia de interacción, es decir, cuanta droga podría interactuar con las NPs y cuáles eran las condiciones más favorables para la unión. Se comparó cada rendimiento con el alcanzado por la interacción entre la droga y la BSA.

A fin de lograr la mejor interacción de unión a la droga posible, se estudiaron diferentes condiciones experimentales: tiempo de incubación y temperatura. Los resultados muestran una eficiencia superior de la BSA NP cuando interacciona con E comparada con BSA (Tabla 18a-c). En todos los casos propuestos la BSA NP mostró por lo menos un 10 % más de droga unida, siendo una cantidad menor de moléculas de vehículo en solución, pero manteniendo estable la concentración de droga. Asimismo, la mejor condición para la unión más eficiente de BSA NPE es cuando se incuba durante 15 m a temperatura ambiente (c.a. 79,18 %). En estas condiciones, la BSA une aproximadamente un 20 % menos de E (c.a. 61.68 %) (Tabla 18a). Cabe destacar que la eficiencia de unión a droga se da con una concentración nM de BSA NP, mientras que la BSA se encuentra en una concentración μM , considerando el peso molecular de cada partícula.

Si bien al incubar las muestras por 90 m a 50 °C se obtiene una unión de droga alta con la NP; 80,35 %, no hay grandes diferencias con respecto a la incubación durante 15 m a temperatura ambiente (Tabla 18c). Al realizar la incubación en frío (4 °C), la eficiencia de unión disminuye considerablemente (71,00 % de eficiencia), acortándose la brecha de diferencia con la BSA (Tabla 18b). Esto se debe a que en estas últimas condiciones experimentales (4 °C), tanto la proteína en forma molecular como la BSA NP, empiezan a desestabilizarse por lo que no se obtiene un porcentaje eficiente de unión como a otras temperaturas. La incubación durante 15 m a temperatura ambiente se elige como un método eficiente para obtener una interacción de alta eficiencia entre la BSA NP y el E.

Tabla 18 Se muestran los valores obtenidos por el ensayo de eficiencia de encapsulación de la droga con la BSA NP y la BSA realizados a diferentes condiciones experimentales de tiempo de incubación y temperatura, manteniendo en todos los casos el pH 7,0 en PBS 30 mM y agitación constante. (a-c) Encapsulación del E con BSA y BSA NP; temperatura ambiente (a), a 4 °C (b) y a 50 °C (c). (d-f) Encapsulación de MC540 con BSA y BSA NP; temperatura ambiente (a), a 4 °C (b) y a 50 °C (c). Los resultados corresponden a triplicados de las medidas.

(a)	Muestra	Tiempo de incubación (min)	EE (%)	(d)	Muestra	Tiempo de incubación (min)	EE (%)
	BSAEmd	0	63.84 ± 9.77		BSAMC540	0	56.20 ± 12.43
		15	61.68 ± 7.80			15	29.90 ± 12.77
		40	60.11 ± 10.70			40	45.50 ± 12.63
		90	64.24 ± 8.43			90	27.94 ± 8.98
	BSA NPEmd	0	73.87 ± 9.94		BSA NPMC540	0	45.33 ± 3.82
		15	79.18 ± 7.21			15	29.81 ± 6.21
		40	77.80 ± 6.02			40	40.84 ± 7.20
		90	74.26 ± 4.14			90	27.36 ± 10.33
(b)	Muestra	Tiempo de incubación (min)	EE (%)	(e)	Muestra	Tiempo de incubación (min)	EE (%)
	BSAEmd	0	59.52 ± 16.15		BSAMC540	0	16.67 ± 2.43
		15	51.66 ± 4.68			15	20.51 ± 7.44
		40	41.44 ± 52.44			40	22.88 ± 2.46
		90	59.52 ± 7.61			90	21.08 ± 4.25
	BSA NPEmd	0	52.64 ± 2.38		BSA NPMC540	0	15.58 ± 4.79
		15	71.31 ± 6.83			15	17.65 ± 1.49
		40	61.88 ± 10.70			40	15.77 ± 1.5
		90	66.20 ± 2.72			90	16.18 ± 4.17
(c)	Muestra	Tiempo de incubación (min)	EE (%)	(f)	Muestra	Tiempo de incubación (min)	EE (%)
	BSAEmd	0	53.82 ± 9.18		BSAMC540	0	44.12 ± 9.95
		15	55.59 ± 0.90			15	29.74 ± 4.15
		40	51.07 ± 3.68			40	39.22 ± 21.65
		90	59.72 ± 2.79			90	23.20 ± 0.86
	BSA NPEmd	0	58.14 ± 5.31		BSA NPMC540	0	49.18 ± 10.70
		15	65.61 ± 8.59			15	31.70 ± 7.25
		40	71.71 ± 9.49			40	30.64 ± 9.48
		90	80.35 ± 6.52			90	20.91 ± 3.52

Al estudiar la interacción de unión de la MC540 con la BSA NP se observa que la eficiencia con esta droga es considerablemente menor a la alcanzada con E. Los porcentajes más altos alcanzados por la sonda fluorescente responden a un 50 % aproximadamente (Tabla 18d-f). Se observa además que los desvíos de los valores son más altos que los obtenidos para el E. Esto refuerza la hipótesis establecida en la sección anterior (Capítulo 4.1) en donde debido a un impedimento estérico por el tamaño de la MC540 y al carácter de menor hidrofobicidad, la interacción con la BSA NP es menos eficiente en comparación con el E (Tabla 16-17; Esquema 19).

Así, la condición óptima para una interacción de unión eficiente entre la BSA NP y la MC540 es aquella a temperatura ambiente sin un periodo de incubación (c.a. 45,33 %). Bajo estas mismas condiciones experimentales, se logra con la BSA una unión más eficiente (c.a. 50,20 %). Sin embargo, debido a los desvíos, no hay diferencias significativas entre los sistemas (Tabla 18d).

Cabe destacar que la mayor cantidad de E interactuando con la BSA NP que en la BSA, refuerza la propuesta de la formación de nuevos bolsillos hidrofóbicos, no principales en donde el E es capaz de interactuar. Así, se preserva la afinidad con el sitio Sudlow I con la droga, a la vez que en los sitios formados por la unión albúmina – albúmina la droga es también capaz de situarse, aumentando la cantidad de esta unida a la BSA NP.

Al evaluar los valores obtenidos en las otras condiciones experimentales (a 4 y 50 °C), debido a los valores de desvío altos, no presentaban una diferencia entre la BSA NP y la BSA. El porcentaje de MC540 unida alcanzada fue cercano al 50 % (Tabla 18e-f). Es por ello que se elige el protocolo que incluye la condición a temperatura ambiente como la óptima para lograr una encapsulación eficiente.

4.4 Perfiles de liberación cinética de las drogas

Materiales y Métodos

- *Perfiles de la cinética de liberación de las DAT a pH 7,00*

Se utilizaron soluciones de 450 μM (BSA) y 555 nM (BSA NP) en PBS (30 mM, pH 7,0). Se partió de una dispersión madre acuosa de MC540 y E 450 μM , que se diluyeron a una concentración final de 45 μM .

Luego de agregar las DAT a soluciones de BSA y BSA NP se tomaron alícuotas de 250 μl a un tubo Vivaspin 500, 3kDA MWCO, GE Healthcare. Para favorecer el proceso de liberación se agregaron 250 μl de PBS pH 7,0, 30 mM a las muestras en agitación. Se centrifugó cada tubo a 17000 rpm, durante 20 m a una temperatura de 25 °C. Luego de centrifugado se conservó el complejo formado (eluato), y se midió en el espectrofotómetro Nano-Drop para calcular por absorbancia a (500 nm) la droga asociada al vehículo. Se tomaron muestras al inicio del ensayo, a 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 y 8,0 h de iniciado el ensayo.

Todo el experimento se realizó a 37 °C. Luego se repitió el ensayo pero previa incubación a pH 6,5, que es el pH de los tejidos tumorales (PBS pH 6,5, 0,1 M). Todas las medidas se realizaron por triplicado. El análisis de los gráficos se realizó con el software Prism GraphPad 5.0.

- *Perfiles de la cinética de liberación de las DAT a pH 5,5 – 6,5*

Para este ensayo se utilizaron las soluciones en una concentración de 45 μM (BSA y drogas), respetando R=1, y una concentración de 55 nM para la BSA NP

Para determinar el perfil de liberación cinética se usó un método indirecto calculándose primero la cantidad de droga encapsulada y a luego la liberación de la misma a diferentes tiempos. Se realizaron triplicados de las muestras con agitación constante en la cual se sacaba 250 μl de muestra a tiempos determinados (0, 20, 40 y 60 m). Luego se los centrifugó en una centrífuga Eppendorf, Centrifuge 5804R, a 12000 rpm durante 20 m a 4 °C. La centrifugación se realizó en tubos Vivaspin 500, 3kDA MWCO, GE Healthcare, en los cuales sólo la droga libre pasaba la membrana. Luego se midió el espectro de absorbancia UV-Vis en un Nano-drop 1000 de droga libre y de la encapsulada. Los valores de droga libre fueron despreciables por lo que los cálculos se hicieron con los datos de absorbancia de la droga encapsulada.

Para calcular la eficiencia de encapsulación se tomó el valor teórico de la droga como el valor total y en base a ello se calculó el porcentaje de eficiencia de la droga encapsulada.

Para el ensayo de liberación de la droga se midieron triplicados de la muestra, en oscuridad y a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 250 μ l a tiempos determinados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h) y se los centrifugó como se detalla arriba. Para el análisis de droga liberada se tuvieron en cuenta los datos obtenidos de la absorbancia UV-Vis de la droga encapsulada (método indirecto). Se realizó un ajuste Michaelis-Menten sobre los perfiles obtenidos utilizando el software Graph Prism 5.0.

Resultados y Discusión

- *Perfiles de cinética de liberación de las DAT a pH 7,00*

Para estudiar a la BSA NP como sistema transportador de droga, debe hacerse en conjunto con el ensayo de eficiencia de unión a E y MC540, el perfil cinético de liberación de droga de los bioconjugados a lo largo de 24 h. Las concentraciones tanto del vehículo como de la droga se controlaron rigurosamente para correlacionar lo observado en el ensayo de unión con el de liberación cinética. Pensando en una posible variación de pH, los perfiles de liberación se realizaron a un pH neutro y a uno ligeramente más ácido simulando el pH de un ambiente de tejido tumoral.

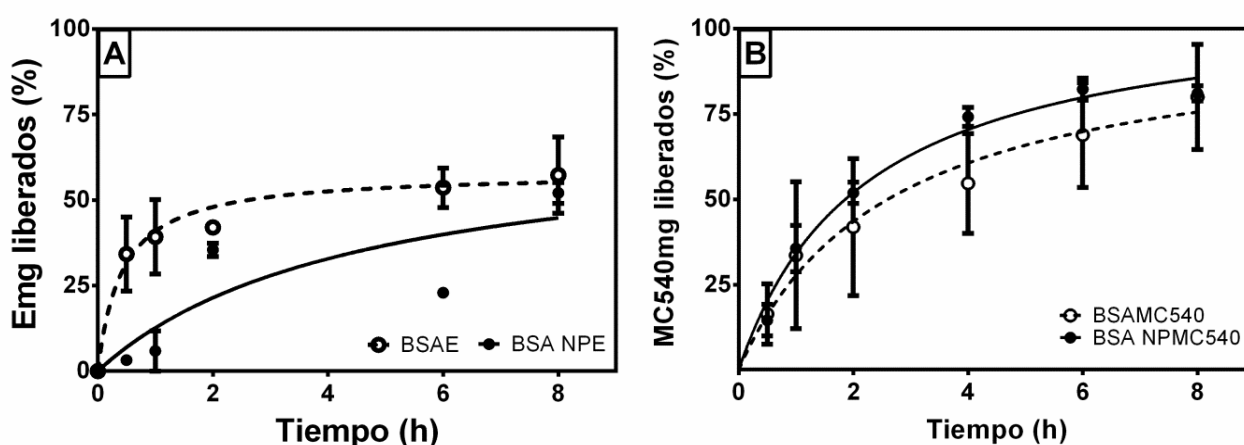


Figura 20 Se presentan los perfiles de cinética de liberación para los nanovehículos con E (a) y MC540 (c) a pH 7,00. Las medidas corresponden a triplicados de un ensayo de 8 h y el ajuste según el modelo matemático de Michaelis- Menten se realizó a los perfiles como los de la Figura.

Se observa que tanto para el E como para la MC540 no se llega a una meseta de equilibrio a las 8 h del ensayo a pH 7,00 (Figura 21). En este caso, los perfiles de liberación de los sistemas de NP obtenidos no presentan diferencias con aquellos de la BSA. Luego de 8 h se liberó aproximadamente 40 % de masa de E unida inicialmente tanto para BSA NP como para BSA (Figura 18a). Para el caso de la MC540, la liberación resultó más eficiente ya que se logra liberar cerca de un 75 % de la masa de MC540 unida inicialmente (Figura 21b).

Al utilizar el modelo matemático Michaelis- Menten en los perfiles cinéticos de liberación se observan diferencias entre los valores (Tabla 19). El valor K_m para estos casos es equivalente al valor que puede dar una constante de disociación (K_d). Para el caso del E, la BSA NP presenta un valor más grande de K_m que la BSA (Tabla 19), esto sugiere una liberación de la droga más rápida, lográndose una cantidad de droga liberada mayor (Figura 21a).

Para el caso de la MC540, los valores de K_m son similares, por lo que se sugiere que la interacción de la droga con el bolsillo de unión principal no se ve afectado luego de la obtención de la NP (Tabla 19, Figura 21b).

Tabla 19 Se describen los valores obtenidos mediante el ajuste Michaelis - Menten a las curvas representadas en la Figura 21.

Parámetros	BSA NPE	BSAE	BSA NPMC540	BSAMC540
V_{mx}	$78,29 \pm 26,68$	$58,10 \pm 5,82$	$109,0 \pm 6,90$	$100,30 \pm 28,05$
K_m	$4,50 \pm 3,80$	$0,42 \pm 0,23$	$2,19 \pm 0,38$	$2,60 \pm 1,89$
R^2	0,76	0,80	0,95	0,58

- *Perfiles de la cinética de liberación de las DAT a pH 5,5 – 6,5*

Al estudiar los perfiles cinéticos de liberación de las distintas drogas en una dispersión de pH simulando el ambiente tumoral (pH 5,5 – 6,5) de los nuevos bioconjugados, se observa que dichos perfiles son similares a los obtenidos anteriormente, pero a lo largo de las 24 h (Figura 22).

Para el E no hay diferencias entre los perfiles cinéticos estudiados (Figura 22a). La liberación de la droga es lenta y si bien no se llega a una meseta definida, la cantidad de droga liberada es la misma en ambos casos; cercanos al 40 %. Esto presenta una ventaja por sobre los perfiles de liberación cinética a pH fisiológico en donde el sistema BSA NPE solo logró liberar un 20 % del E retenido (Figura 22a). Al ajustar la curva obtenida con Michaelis – Menten, se obtienen valores de K_m en donde BSA NP tiene un menor valor que BSA (Tabla 20), por lo que se infiere que el E es más afín a la NP que la BSA en dicho pH.

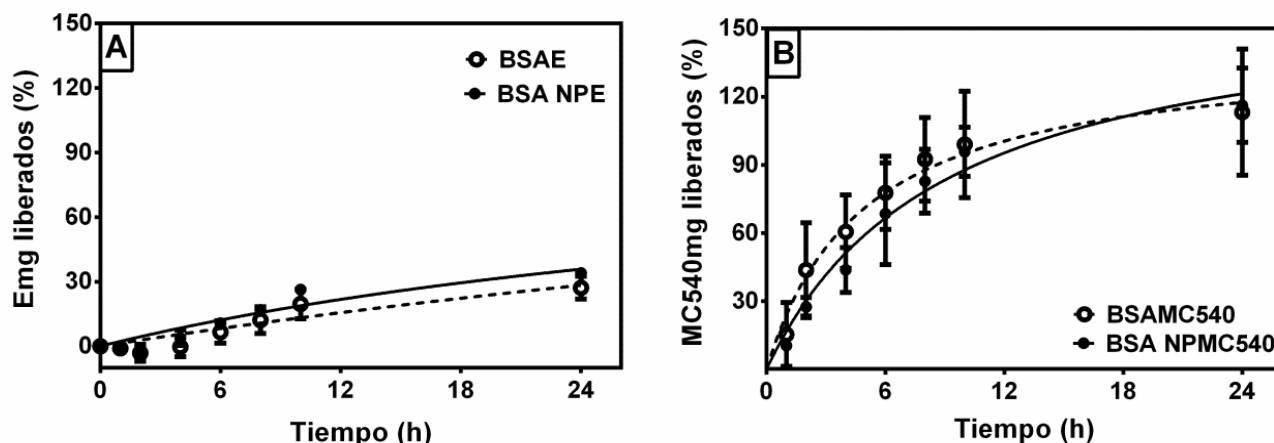


Figura 21 Gráficos que representan los perfiles de liberación de los vehículos al encapsular E (a) y MC540 (b) en una concentración menor de la usada anteriormente. El ajuste aplicado a las curvas obtenidas fue el de Michaelis- Menten. Las medidas corresponden a triplicados de muestras.

Para el caso de la MC540, los perfiles de liberación para ambos sistemas son similares entre sí (Figura 22a). En este caso, se llega a la meseta de equilibrio entre droga en forma libre y retenida cerca de las 5 h de comenzado el ensayo.

Al transcurrir las 24 h el 90 % de MC540 es liberado. Contrariamente a lo observado con el E, la MC540 resultó ser menos afín a la BSA NP, por lo que explicaría el porcentaje final de droga liberada. Al ajustar el perfil con el modelo matemático de Michaelis-Menten, se observa que los valores entre las formulaciones son similares (Tabla 20). Si bien las diferencias encontradas no son significativas se observa un mayor valor de K_m en el conjugado BSA NPMC540 que en el de BSAMC540; se observó que la MC540 es menos afín a la BSA NP que a la BSA.

La menor afinidad de la MC540 por la NP (Tabla 18) explicaría porque el porcentaje de liberación alcanzado fue mayor que para el caso del E.

Tabla 20 Valores obtenidos mediante el ajuste Michaelis- Menten a las curvas representadas en la Figura 22.

Parámetros	BSA NPE	BSAE	BSA NPMC540	BSAMC540
V_{mx}	101.,40 ± 53,18	154,80 ± 328,1	166.90 ± 28,71	141,60 ± 27,11
K_m	43,98 ± 31,44	107,20 ± 265,20	9,02 ± 3,21	4,91 ± 2,47
R^2	0,82	0,60	0,82	0,66

Cuando la BSA NP se encuentra unida a MC540 no se observa diferencias significativas entre los perfiles cinético de liberación de la droga a los pH estudiados (Figura 21b; Figura 22b). Mientras que a pH 7,0 se libera la totalidad de la droga, a pH levemente ácido se alcanza aproximadamente un 90% de la masa liberada. A pH 7,00 no se alcanza equilibrio entre la droga liberada y la encapsulada en la NP al término de las 8 h. Esto no ocurre cuando la liberación se realiza a pH 5,5 – 6,5, que se alcanza el equilibrio aproximadamente a las 5 h.

Sikurová et al., 1997, estipula en su trabajo que dependiendo del valor de pH que tenga la dispersión de MC540. A pH ácido la MC540 puede precipitar y por ello emitir una menor señal. Estos cambios son reversibles, pero a pH alcalinos, se producen cambios irreversibles con cambios de color que dan lugar a bandas nuevas de absorción. Esto es debido a la interacción entre el solvente y el grupo terminal cargado de la molécula (Sikurová et al., 1997). En las condiciones en que fueron realizados los ensayos de este trabajo, no se dan ninguno de los cambios que se discuten en el trabajo anterior. La droga se encuentra únicamente en un equilibrio entre monómero y dímero, desplazándose el equilibrio hacia el monómero al unirse con su transportador (Banerjee et al., 2012). Esto implicaría que lo que produce un cambio en la liberación de la droga dependiendo del pH puede ser el transportador mismo. Llegando a un pH cercano al valor donde se producen distorsiones en su estructura secundaria, α -hélice específicamente (Lin et al., 1976), producirá un cambio hidrofóbico liberando la droga del bolsillo hidrofóbico.

Para el caso del E, la liberación en ambos pH fueron considerablemente menores que para la MC540. Esto puede ser debido a la gran afinidad que presenta esta droga tanto con la BSA como con la BSA NP. La diferencia principal entre los perfiles cinéticos de liberación de la droga en los pH estudiados (Figura 21a; Figura 22a) se puede ver cuando finaliza el ensayo. A pH 7,0 se libera solo un 20 % de la droga incubada, a pH levemente ácido se libera el doble de la masa de la droga. En ninguna de las dos condiciones experimentales se alcanza una situación de equilibrio entre la droga unida y la droga retenida. No obstante, la forma de los perfiles obtenidos corresponde a una liberación lenta, lo cual es beneficioso para nuestro objetivo. El perfil de liberación del E debe ser lento y controlado para así evitar inespecificidad en el tratamiento y la toxicidad de la droga mientras llega al sitio diana en donde actuar. Cabe destacar que a pH levemente ácidos (5,5 – 6,5), se libera mayor cantidad de droga, lo cual es una ventaja sobre la liberación a pH 7,0 ya que el primero simula un ambiente tumoral, lugar diana para este sistema. Una liberación lenta, en un tejido tumoral significa una liberación más controlada.

Pal et al., 1993, sugirieron un equilibrio mono protónico para el E. Entre los valores pH 2,0 y 10, el protón ácido del grupo OH, en la posición 3 sería el responsable de generar una base conjugada. Como la molécula se mantiene en este equilibrio durante todo este rango, no es posible adjudicarle el cambio de comportamiento de su perfil de liberación al bajarle el pH a la dispersión (Ilustración 12).

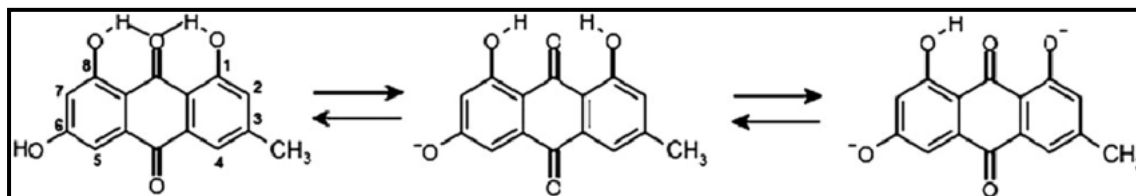


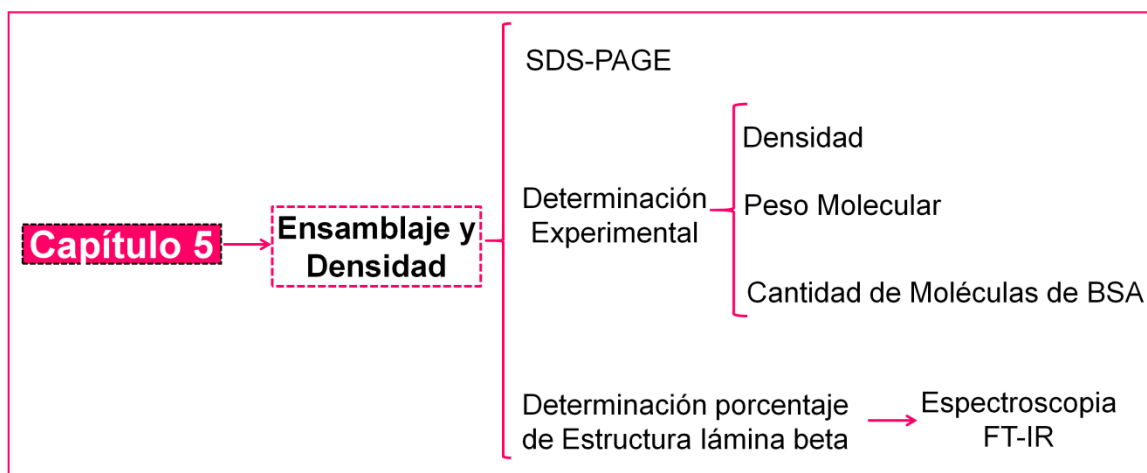
Ilustración 12 Equilibrio del emodin en dispersión variando en sus diferentes especies iónicas de acuerdo al pH en solución. Extraído de Sevilla et al., 2007.

Conclusión

En base a la información obtenida en este capítulo sobre la conjugación de la BSA NP con dos DAT: E y MC540 se concluye:

- El complejo BSA NPE presentó gran afinidad entre los componentes; la interacción con la droga se encuentra favorecido por el incremento del carácter hidrofóbico del bolsillo de unión, generado una retención más eficiente del E a la vez que una liberación más controlada a pH levemente ácido.
- El complejo BSA NPMC540 presentó afinidad intermedia; si bien la MC540 resulta afín a la BSA NP, esta es una afinidad menor que la que se obtiene con el E, y menor retención, o sea una liberación mayor del fármaco al cabo de 24 h alcanzando un equilibrio entre droga retenida y liberada. La menor afinidad se debe al impedimento estérico debido al mayor tamaño de la molécula de MC540 comparada con el E, dificultándose a la interacción con el bolsillo de unión de la BSA NP.
- Las constantes de disociación y cantidad de droga máxima unida resaltaron las diferencias estructurales entre la BSA y la BSA NP. La BSA NP cuenta con un sitio de unión menos que la proteína, o sea la cantidad de sitios Sudlow II que se encuentran habilitados para interaccionar con sustancias en las NPs no son suficientes para detectarse con la emisión fluorescente al excitar las Tyr que lo componen. No obstante, la capacidad de las BSA NPs sigue presente pudiendo cumplir con su función como vehículo transportador de drogas.
- Se propone que la interacción entre E y BSA NP está mediada no sólo por el sitio Sudlow I como se observó en el ensayo de fluorescencia, sino también por sitios hidrofóbicos generados durante la formación de las NPs.
- Se considera a la BSA NP como un sistema de transporte de fármacos más eficiente que la BSA, ya que a menores concentraciones de vehículo tiene un mayor porcentaje de eficiencia de encapsulación, siendo mayor para el E e igual para la MC540 con respecto a la BSA.

Capítulo 5: Estudio del ensamblado y densidad de la nanopartícula de albúmina mediante datos experimentales



Introducción

Saber la organización especial de las moléculas que conforman una NP y como ellas interactúa entre sí, resulta importante. El arreglo espontáneo de moléculas auto-ensambladas tienen como principio el de cumplir con las interacciones y restricciones entrópicas de sus componentes para poder organizarse de determinada manera. La manera más fácil y simple de organización resulta la de la esfera (Gang, 2016). Tan pronto como la forma de una NP se transforma en anisotrópica, la complejidad de su organización aumenta.

Las interacciones interpartículas pueden modular de manera significativa el ensamblado de esta, afectando con los tipos de fuerzas (van der Waals, electrostáticas, dipolares), a la estructura final a adoptar. Esto puede devenir en decidir si la NP será útil o no para el objetivo para el cual se la diseñó. Tener control sobre el autoensamblado, variando parámetros como solvente en el cual se encuentra, calor, pH, etc., es un primer paso para poder llevar la estructura base a una más compleja mejorando la función de la NP (Grubbs, 2007).

En este capítulo se estudia el ensamblado de las BSA NPs para poder entender aún más las interacciones intermoleculares que hacen posible el estabilizar el agregado de proteínas. Para ello se utilizaron diferentes ensayos biofísicos, acercándose así, a un modelo de estructura de la BSA NP apoyado en evidencia experimental.

5.1 Estudio del ensamblado de la BSA NP en diferentes condiciones experimentales mediante un SDS – PAGE

Materiales y Métodos

Se diluyeron las muestras hasta tener una concentración final de proteína de 5µM. Se calentaron las muestras durante 5 min y alícuotas de 18 µl de proteína y control de corrida fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 8 % y gel de stacking 5 %.

Las muestras a correr en el gel fueron: BSA, BSA NP EtOH (A), BSA NP PD-10 (B), BSA NP-Lyo (C), BSA NP-Lyo-T (D) y BSA NP G-200 (E). A modo de control se utilizaron: un marcador de peso molecular (PM) de BSA, ovoalbúmina y lisozima y otros obtenidos en el Laboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas (LEPP) de la Universidad Nacional de Quilmes compuesto de monómeros, dímeros y trímeros de BSA.

Para la corrida se utilizó una unidad Biopack Electrophoresis; el voltaje fue constante de 8 mA. Para la tinción se utilizó Coomassie-Blue. Al finalizar la corrida del gel se realizó una densitometría de las bandas obtenidas con el uso de software ImageJ.

Resultados y Discusión

- *Corrida del gel de las distintas BSA NP*

Se corrieron muestras de los diferentes compuestos seleccionados y las diferentes BSA NP estudiadas en un gel 8 % de poliacrilamida. Luego de corrido el gel se llevó a cabo una densitometría para análisis (Figura 23).

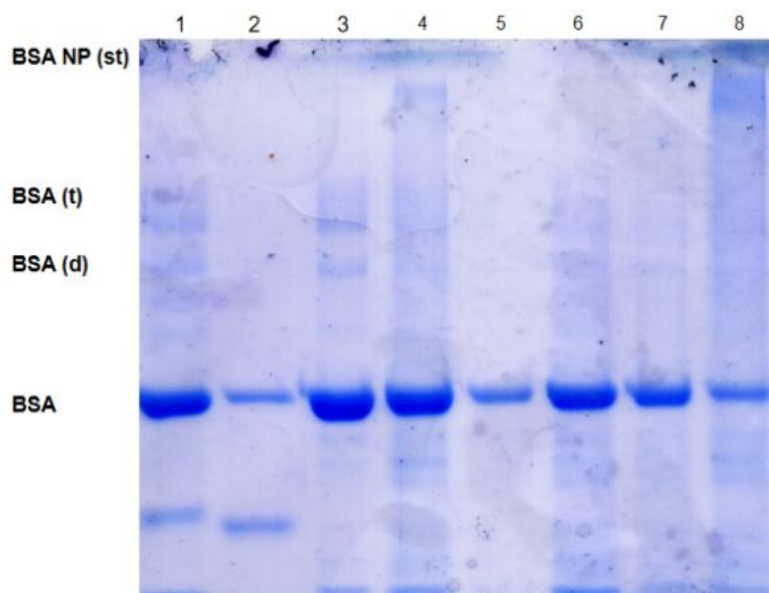


Figura 22 SDS – PAGE de las diferentes variaciones de la nanopartícula de albúmina. 1) Peso molecular correspondiente a trímeros, dímeros y monómeros de BSA. 2) Peso molecular (BSA, ovo- albumina y lisozima). 3) BSA en buffer PBS 30 mM, pH 7,0. 4) BSA NP dispersiónalcohólica 30 % v/v. 5) BSA NP en buffer PBS 30 mM, pH 7,0. 6) BSA NP liofilizada en buffer PBS 30 mM, pH 7,0. 7) BSA NP liofilizada en agua miliQ y en presencia de trehalosa, 8) BSA NP luego de su separación por columna de exclusión molecular G - 200.

Una vez finalizada la corrida, se midió el porcentaje ocupado por cada banda correspondiente a cada calle, tomando como referencia el control de peso molecular conteniendo a los trímeros, dímeros y monómeros de BSA (PM BSA). De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que: todas las muestras de BSA NP sembradas mostraron gran concentración de BSA monomérica (66 kDa); distintas calles correspondientes a BSA NP presentaron bandas en el *stacking* correspondiente a NP (el peso molecular de estas nanopartículas corresponde a uno mayor a 198 kDa, por encima de la banda del trímero presente en el PM BSA) (Figura 23).

La calle con mayor concentración de nanopartícula es la de BSA P G200 con un total del 68 % de esta en el gel (48 % en el *stacking* del gel y 20 % de nanopartículas de un peso molecular alrededor de los 198 – 132 kDa) (Figura 23 – calle 8). Dicha BSA NP resulto ser también, aquella NP con menor concentración de BSA monomérica (31 %). El resto de los valores de presencia de NP en la muestra se encuentran entre un 8 – 30

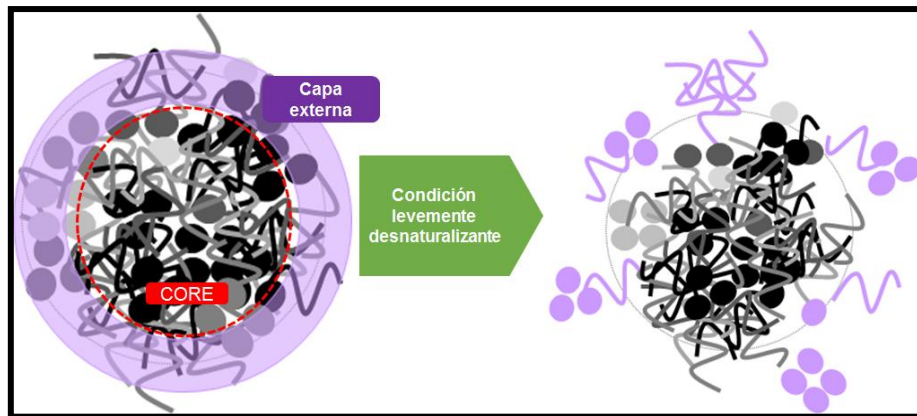
% de ella pasando por diferentes valores, mientras que la presencia de BSA monomérica es considerablemente mayor siendo entre un 70 – 90 % de esta.

La existencia de la NP queda confirmada a partir del gel SDS – PAGE realizado en este trabajo. Se encontró menor concentración de NPs que de BSA monomérica; al tratarse de un gel desnaturizante, las moléculas de BSA que están unidas débilmente a la NP se desprenden en condiciones menos favorables. Al realizar una meticulosa separación de las BSA NPs con la BSA por columna de exclusión molecular G200, se obtiene un 20 % de BSA monomérica sobre el total de la muestra (Capítulo 1). En el gel, la calle correspondiente a la BSA NP G200, corresponde a una muestra conteniendo solamente BSA NP, sin contenido de BSA monomérica. Al analizar los resultados de esta muestra se observa un 31 % de BSA monomérica. Esto es indicativo de que en la formación de la BSA NP participan distintas uniones entre las moléculas de albúmina con diferentes fuerzas involucradas.

Como se ha visto en otras oportunidades, hay puentes disulfuros involucrados en las uniones entre moléculas: estas fuerzas son muy fuertes por lo que resulta difícil separarlas. Sin embargo, se observa una banda de BSA monomérica en la calle correspondiente a la BSA NP libre de BSA. Lo que se infiere es que la BSA NP está conformada por dos capas: una externa y otra interna (Esquema 21). La capa externa está compuesta por moléculas de albúmina unidas débilmente por fuerzas como las de Van der Waals, mientras que la capa más interna (*core*) se compone de moléculas de albúmina unidas fuertemente evitando así la desnaturalización en condiciones desfavorables (Esquema 24).

Al estudiar la calle de las BSA NPs eluidas por columna PD-10, se observa gran concentración de BSA monomérica (60 %); aquí se suma la BSA libre en solución, correspondiente a un 20 % por sobre el total, más un 40 % de degradación de las NPs por la desnaturalización del gel.

Nuestra hipótesis está respaldada por el grupo de Christian et al., 2008, quienes establecen que en general las NPs están compuestas por dos capas con diferentes propiedades: una externa (*shell*) y otra interna más fuerte en su composición (*core*). La capa más externa no necesariamente penetra a la más interna. En nuestro caso, la capa más externa es aquella en donde las moléculas de albúmina son fácilmente separadas por las condiciones desnaturizantes del gel SDS-PAGE. El *core* de la NP es la NP en sí misma, la parte más fuertemente unida (Christian et al., 2008). En lo que difiere la definición de nuestra NP, es que la BSA NP se encuentra compuesta en ambas capas por albúmina. No obstante se puede observar una diferencia del tipo física (fuerzas uniendo las moléculas de albúmina) entre ambas capas, definiéndolas aparte.



Esquema 22 Esquema de cómo se encuentra ensamblada la BSA NP en base a evidencia experimental obtenida mediante una corrida del gel poliacrilamida 8 % SDS – PAGE.

5.2 Estudio del valor experimental del peso molecular y cantidad de moléculas de albúmina en la BSA NP

Materiales y Métodos

- Cálculo experimental de la densidad de la BSA NP

Tubos *ependorf* de 2 ml fueron pesados en una balanza analítica. Se liofilizaron muestras de BSA NP y BSA NP purificada por columna cromatográfica G-200 (308 nM) con una concentración de 100 μ M de trehalosa de acuerdo con lo observado en el Capítulo 2.2.

Una vez liofilizadas las muestras, se pesaron los tubos y luego se disolvió el liofilizado en 1 ml de agua destilada a 24 °C. Se pesó la masa de dispersión de cada tubo.

La densidad (δ) de la BSA NP se calculó experimentalmente de la siguiente manera: se calculó la masa del volumen de agua destilada utilizada, con el valor de su δ a 24 °C y sabiendo el peso de la dispersión con la BSA NP en el tubo *ependorf* se calculó la δ de dicha solución:

$$\delta_{H_2O_d} = \frac{m}{V}$$

$$m = \delta_{H_2O_d} \times V$$

$$P_{TL} - P_T = P_m$$

$$P_m \times 0.8 = P_{mBSA\ NP}$$

$$P_{mBSA\ NP} + P_{H_2O_d} = P_{SN}$$

$$\delta_{BSA\ NP} = \frac{P_{SN}}{V_{SN}}$$

En donde, $\delta_{H_2O_d}$ es la densidad del agua a 24 °C, m es la masa de agua en volumen (V) de un ml. P_{TL} es la masa del tubo del liofilizado de las muestras, P_T es la masa del tubo sin muestra y P_m es la masa del liofilizado. $P_{mBSA\ NP}$ es la masa de la BSA NP, restando la masa de la BSA libre en dispersión y la masa de la trehalosa. $P_{H_2O_d}$ es la masa del agua agregada al liofilizado y P_{SN} es la masa de la dispersión de 1 ml de BSA NP. Con estos datos se calcula la densidad experimental de una dispersión de 1 ml de BSA NP a 24 °C ($\delta_{BSA\ NP}$).

A su vez se calculó la densidad de la BSA NP en base seca (δ_{NP}) a partir de la densidad de esta en solución y la densidad del solvente en la cual se encuentra (Ulbrich et al., 2011). Para ello se utilizó la fórmula:

$$\delta_{NP} = \frac{\delta_{BSANP} \times C_{BSANP}}{\delta_{H2O} + C_{BSANP} - \delta_{BSANP}}$$

En donde para calcular la concentración de NP en la dispersión (C_{BSANP}), se tomó como valor el peso seco del liofilizado como g/cm³ de BSA NP en el tubo ya que la dispersión a liofilizar tenía un volumen final de 1 ml.

- *Cálculo experimental del peso molecular de la BSA NP*

Una vez calculado el valor de δ_{BSANP} , se calculó el peso molecular (PM) de la BSA NP de la siguiente manera.

Al poder encerrar a la NP en una esfera, se estimó con el diámetro hidrodinámico de ésta el volumen de la BSA NP (V_{BSANP}):

$$V_{BSANP} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

Con el uso de la fórmula de la densidad podemos sacar la masa de una NP de un volumen V:

$$m = V_{BSANP} \times \delta_{BSANP}$$

$$PM = m \times 6.24^{23}$$

Para poder calcular el número de BSA componiendo la NP, se dividió a PM por el peso molecular de la BSA (66 kDa). Se compararon los resultados de esta sección con aquellos expresados en la hipótesis (Capítulo 1, págs. 63 - 66).

Las medidas en esta sección corresponden a cuadruplicados de muestras independientes. El software utilizado para el análisis fue Microsoft Excel 2013.

- *Cálculo experimental de la cantidad de albúminas en la BSA NP en base a microscopia*

A partir de una imagen de A.F.M de la BSA NP se estimó la cantidad de moléculas de albúmina que componen a la BSA NP. Utilizando el programa Image J se realizó un análisis del cual se obtuvo el valor del área y la altura (h) de la NP.

Con estos valores y considerando a la BSA NP como una entidad que es posible encerrar en una esfera se calculó el volumen de la esfera (V_e) mediante la ecuación:

$$V_e = \frac{\pi h}{6} (3a^2 + h^2)$$

En donde h equivale al diámetro de la BSA NP y a corresponde a las aristas de las caras. Una vez calculado el V_e , se calcula la masa de la NP haciendo uso de la ecuación de densidad (δ), donde el valor de δ es igual a $0,74 \text{ g/cm}^3$ (valor de densidad media de una proteína). Al dividir este valor por el peso molecular de la albúmina se obtiene la cantidad de moléculas de BSA por NP.

Resultados y Discusión

- *Cálculo experimental de la densidad de la BSA NP*

Los ensayos dieron como resultado una NP menos densa de lo esperado (Tabla 21). Tanto la BSA NP como la NP purificada, resultaron ser menos densa que la BSA en su forma molecular.

Tabla 21 Valores experimentales de la densidad en dispersión (δ_{SN}), y densidad en seco (δ_{NP}) de la BSA NP, BSA NP purificada por columna cromatográfica G-200 y BSA molecular. Se presenta el valor teórico de la densidad de la BSA molecular utilizada en la sección anterior para estimar de manera teórica el PM de la BSA NP. BSA NP-Lyo (0,4 B) hace referencia a la BSA NP liofilizada en dispersión acuosa (H_2O_d) con una concentración 100 μM de trehalosa obtenida para este ensayo.

Muestra	$\delta_{SN} (g/cm^3)$	$\delta_{NP} (g/cm^3)$
BSA NP- Lyo (0.4 B)	$1,11 \pm 0,11$	$1,00 e-02 \pm 1,02 e-03$
BSA NP G-200	$0,81 \pm 0,15$	$6,36 e-03 \pm 1,12 e-03$
BSA	$1,84 \pm 0,17$	$2,00 e-02 \pm 1,51 e-03$
BSA (T)	1,37	-

Se observa una leve diferencia entre las δ_{SN} de dispersiones de las NP estudiadas. Cada dispersión consistía en poblaciones de un tamaño mayoritario de diámetro hidrodinámico (Tabla 21). Estos valores de densidad no tienen diferencia significativa en función del tamaño, por lo que se promedió todos los valores de δ_{SN} obtenidos con el fin de contar con un valor de densidad general de la BSA NP (Tabla 22). Con este valor se estimaron los volúmenes de la NP, peso molecular y cantidad de moléculas de BSA totales de las diferentes BSA NP estudiadas en este trabajo (Tabla 22). La variable en todos los casos fue el tamaño hidrodinámico obtenido por DLS de cada dispersión de NP.

- *Cálculo experimental del peso molecular de la BSA NP*

Tabla 22 Valores experimentales del peso molecular y de la totalidad de moléculas de albúmina que componen cada NP. Otra columna da los pesos moleculares y de la totalidad de moléculas de BSA estimadas en cada NP con valores experimentales de sus diámetros hidrodinámicos obtenidos por DLS. El valor experimental de la densidad de la NP se calculó en base al promedio de los valores de densidad obtenidos en la Tabla 7. BSA NP-Lyo (P) hace referencia a las poblaciones de menor tamaño obtenidas en la solución, mientras que BSA NP-Lyo (G) hace referencia a las poblaciones de menor tamaño obtenidas del liofilizado. BSA NP-Lyo (0.4 A) hace referencia a la BSA NP liofilizada en dispersión acuosa (H₂O_d) con una concentración 100 μ M de trehalosa obtenida al estudiar el proceso de liofilización en PI., C2.2.

Muestra	δ (g/cm ³)	d.nm (nm)	Volumen (nm ³)	PM (MDa)	BSA tot.
BSA NP		70,20 $\pm$ 4,04	1,82E+05 $\pm$ 3,20E+04	112,93 $\pm$ 19,83	1,71E+03 $\pm$ 3,00E+02
BSA NP-Lyo (0.4)		71,53 $\pm$ 6,67	1,95E+05 $\pm$ 5,65E+04	120,79 $\pm$ 35,01	1,83E+03 $\pm$ 5,30E+02
BSA NP-Lyo (0.4)		162,09 $\pm$ 19,42	2,30E+06 $\pm$ 7,93E+05	1,43E+03 $\pm$ 4,91E+02	2,16E+04 $\pm$ 7,44E+03
BSA NP G-200 Lyo		169,88 $\pm$ 30,43	2,27E+06 $\pm$ 3,56E+05	1,71E+03 $\pm$ 9,16E+02	2,59E+04 $\pm$ 1,39E+04
BSA NP-Lyo (P)	0,99 $\pm$ 0,052	39,45 $\pm$ 12,99	4,06E+04 $\pm$ 4,16E+04	25,16 $\pm$ 25,79	381,26 $\pm$ 390,88
BSA NP-Lyo (G)		256,21 $\pm$ 108,19	1,23E+07 $\pm$ 1,16E+07	7,63E+03 $\pm$ 7,17E+03	1,16E+05 $\pm$ 1,09E+05
BSA NP-Lyo MQ		51,26 $\pm$ 8,22	7,42E+04 $\pm$ 3,59E+04	45,97 $\pm$ 22,26	696,65 $\pm$ 337,34
F-BSA NP		39,60 $\pm$ 0,71	3,25E+04 $\pm$ 1,74E+03	60,91 $\pm$ 4,22	60,91 $\pm$ 4,22
FA- BSA NP		332,07 $\pm$ 95,56	2,39E+07 $\pm$ 2,23E+07	1,48E+04 $\pm$ 1,38E+04	696,65 $\pm$ 337,34

- *Cálculo experimental de la cantidad de albúminas en la BSA NP en base a microscopías de fuerza atómica*

En base a los datos obtenidos por la microscopía A.F.M, la BSA NP cuenta con un valor $h = 64$ nm y un área obtenida por la relación pixel/nm igual a 21412,96 nm² (Figura 24). Con un valor de a igual a 82,55, se obtiene un volumen de la esfera igual a 822476,17 nm³.

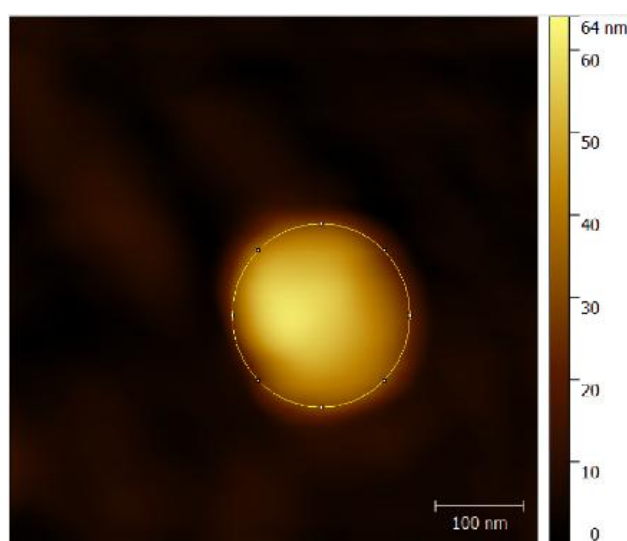
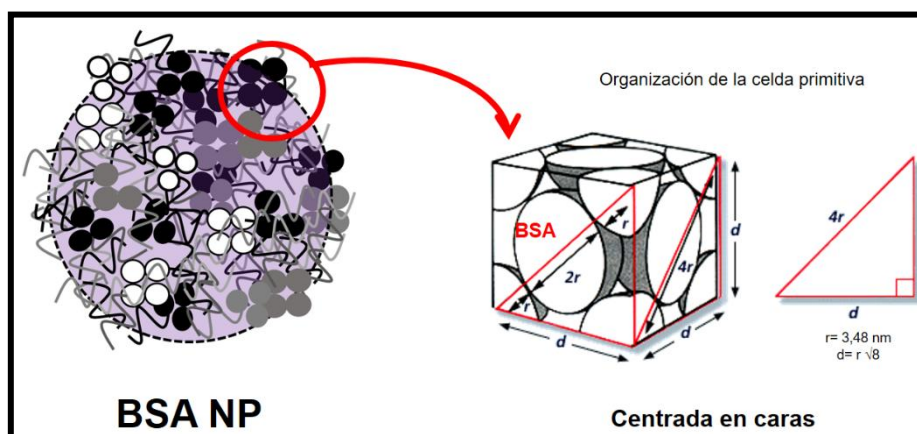


Figura 23 AFM de la BSA NP obtenida por medio de la técnica de AFM en suspensión acuosa

Una vez obtenido el V_e , se calculó la masa de esta BSA NP. Esta fue igual a $6,08 \times 10^{-16}$ g, se obtuvo tomando en cuenta el valor de densidad media mencionada anteriormente. Para estimar la cantidad de moléculas de albúminas en la NP se dividió el valor de la masa de la NP por el peso molecular de la proteína ($PM_{BSA} = 66000$ g/mol). Esto devino en 5553,31 moléculas de BSA por NP (Tabla 22).

Todos los valores hasta aquí obtenidos toman en consideración a la BSA NP como una esfera totalmente ocupada por moléculas de albúmina, sin espacios entre ellas. Es por esto que es necesario realizar una corrección. Realmente, la estructura y disposición espacial de las moléculas de albúmina es comparable con la de una red cristalina. Si este fuere el caso, entonces podría considerarse a la BSA NP como una esfera rígida con una fracción de empaquetamiento (f_c). Este valor representa la distribución de las moléculas en la esfera.

Por Ley de Bravais, se sugiere la distribución de estas moléculas (o puntos infinitos) en la BSA NP en la forma de celda primitiva. Tomando en cuenta que las moléculas de BSA pueden encerrarse en esferas de un diámetro hidrodinámico en dispersión acuosa de 6,96 nm, el empaquetamiento posible para la celda primitiva es la de una celda cúbica centrada en caras (Esquema 22).



Esquema 23 Ilustración de la disposición espacial de las moléculas de albúmina en la NP de acuerdo al modelo de la celda primitiva cúbica centrada en caras.

Así, se obtiene el valor del volumen de la celda primitiva (V_c):

$$V_c = d^3$$

En donde d corresponde al valor de las aristas de las caras del cubo (Esquema 22). Al dividir el volumen de la NP por el V_c , se obtiene el f_c . Para poder dilucidar la cantidad de moléculas de BSA de cada NP analizada en esta sección es necesario dividir a la fracción f_c por la cantidad de moléculas de albúmina contenidas en la celda primitiva

(c.a. 4 por Ley de Bravais). Los resultados obtenidos, si bien difieren de los obtenidos al asumir a la BSA NP como una esfera maciza, se encuentran en el mismo orden de magnitud ($1 \text{ e}03$) (Tabla 23).

Tabla 23 Valores de las distintas BSA NP con el ajuste realizado teniendo en cuenta la fracción f_c de acuerdo a los valores de cada una de ellas. Se presentan los valores obtenidos antes del ajuste para facilitar su comparación.

Muestra	Valores de la esfera compacta			Valores tomando en cuenta el f_c		
	Volumen (nm^3)	PM (MDa)	BSA tot.	Volumen (nm^3)	PM (MDa)	BSA tot.
BSA NP	$1,82\text{E}+05 \pm 3,20\text{E}+04$	$1,12\text{E}+02 \pm 1,98\text{E}+01$	$1,71\text{E}+03 \pm 3,00\text{E}+02$	$9,33\text{E}+05 \pm 7,52\text{E}+04$	$5,78\text{E}+02 \pm 4,66\text{E}+01$	$3,95\text{E}+03 \pm 3,18\text{E}+02$
BSA NP-Lyo (0.4)	$1,95\text{E}+05 \pm 5,65\text{E}+04$	$1,20\text{E}+02 \pm 3,50\text{E}+01$	$1,83\text{E}+03 \pm 5,30\text{E}+02$	$9,60\text{E}+05 \pm 1,28\text{E}+05$	$5,95\text{E}+02 \pm 7,92\text{E}+01$	$4,06\text{E}+03 \pm 5,41\text{E}+02$
BSA NP-Lyo (0.4)	$2,30\text{E}+06 \pm 7,93\text{E}+05$	$1,43\text{E}+03 \pm 4,91\text{E}+02$	$2,16\text{E}+04 \pm 7,44\text{E}+03$	$4,03\text{E}+06 \pm 1,00\text{E}+06$	$2,50\text{E}+03 \pm 6,20\text{E}+02$	$1,71\text{E}+04 \pm 4,23\text{E}+03$
BSA NP G-200 Lyo	$2,27\text{E}+06 \pm 3,56\text{E}+05$	$1,71\text{E}+03 \pm 9,16\text{E}+02$	$2,59\text{E}+04 \pm 1,39\text{E}+04$	$4,57\text{E}+06 \pm 1,80\text{E}+06$	$2,83\text{E}+03 \pm 1,12\text{E}+03$	$1,93\text{E}+04 \pm 7,63\text{E}+03$
BSA NP-Lyo (P)	$4,06\text{E}+04 \pm 4,16\text{E}+04$	$2,51\text{E}+01 \pm 2,57\text{E}+01$	$3,81\text{E}+02 \pm 3,90\text{E}+02$	$4,63\text{E}+05 \pm 1,80\text{E}+05$	$2,87\text{E}+02 \pm 1,12\text{E}+02$	$1,96\text{E}+03 \pm 7,63\text{E}+02$
BSA NP-Lyo (G)	$1,23\text{E}+07 \pm 1,16\text{E}+07$	$7,63\text{E}+03 \pm 7,17\text{E}+03$	$1,16\text{E}+05 \pm 1,09\text{E}+05$	$1,51\text{E}+07 \pm 1,27\text{E}+07$	$9,33\text{E}+03 \pm 7,88\text{E}+03$	$3,37\text{E}+04 \pm 5,38\text{E}+04$
BSA NP-Lyo MQ	$7,42\text{E}+04 \pm 3,59\text{E}+04$	$4,60\text{E}+015 \pm 2,22\text{E}+01$	$6,96\text{E}+02 \pm 3,37\text{E}+02$	$6,23\text{E}+05 \pm 1,24\text{E}+05$	$3,86\text{E}+02 \pm 7,68\text{E}+01$	$2,64\text{E}+03 \pm 5,24\text{E}+02$
F-BSA NP	$3,25\text{E}+04 \pm 1,74\text{E}+03$	$6,10\text{E}+01 \pm 4,22$	$9,23\text{E}+02 \pm 6,40\text{E}+01$	$4,56\text{E}+05 \pm 9,31\text{E}+03$	$2,83\text{E}+02 \pm 5,77$	$1,93\text{E}+03 \pm 3,94\text{E}+01$
FA-BSA NP	$2,39\text{E}+07 \pm 2,23\text{E}+07$	$1,48\text{E}+04 \pm 1,38\text{E}+04$	$696,65 \pm 337,34$	$2,75\text{E}+07 \pm 2,33\text{E}+07$	$1,70\text{E}+04 \pm 1,44\text{E}+04$	$1,16\text{E}+05 \pm 9,84\text{E}+04$
BSA NPAFM	$8,22\text{E}+05$	$3,67\text{E}+02$	$5553,31$	$8,22\text{E}+05$	$490,34$	$3478,56$

5.3 Estudio por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) haciendo hincapié en la estructura lámina- β de la BSA NP

Materiales y Métodos

Se midieron soluciones de BSA, BSA NP, y BSA NP-Lyo. Para las mediciones de las muestras en espectroscopía infrarroja se utilizó un Equinox 55 IR spectrophotometer (Bruker Optics). El equipo cuenta con un diamante único de reflexión (Golden Gate, Specac), el cual se utiliza para obtener las señales de la muestra previamente purgada y secada con nitrógeno. Se midieron aproximadamente 2 μ l, dializadas con anterioridad en agua miliQ durante 45 min para eliminar el exceso salino del PBS.

Se grabaron un total de 168 escaneos de los perfiles de señal IR con una redispersión de 2 cm^{-1} , a temperatura ambiente. Los espectros se llevaron a cabo en los laboratorios del SFMB en Bruselas, Bélgica, con ayuda del Software MatLab.

Resultados y Discusión

Se estudiaron los perfiles de espectroscopia infrarroja de las diferentes NP estudiadas, teniendo como referencia el de la BSA (Figura 25). De los espectros de FT – IR obtenidos de las muestras (Figura 25a), se hizo estudios principalmente en la absorbancia correspondiente a la zona de las Amidas, 1800 – 1400 cm^{-1} (Figura 25b).

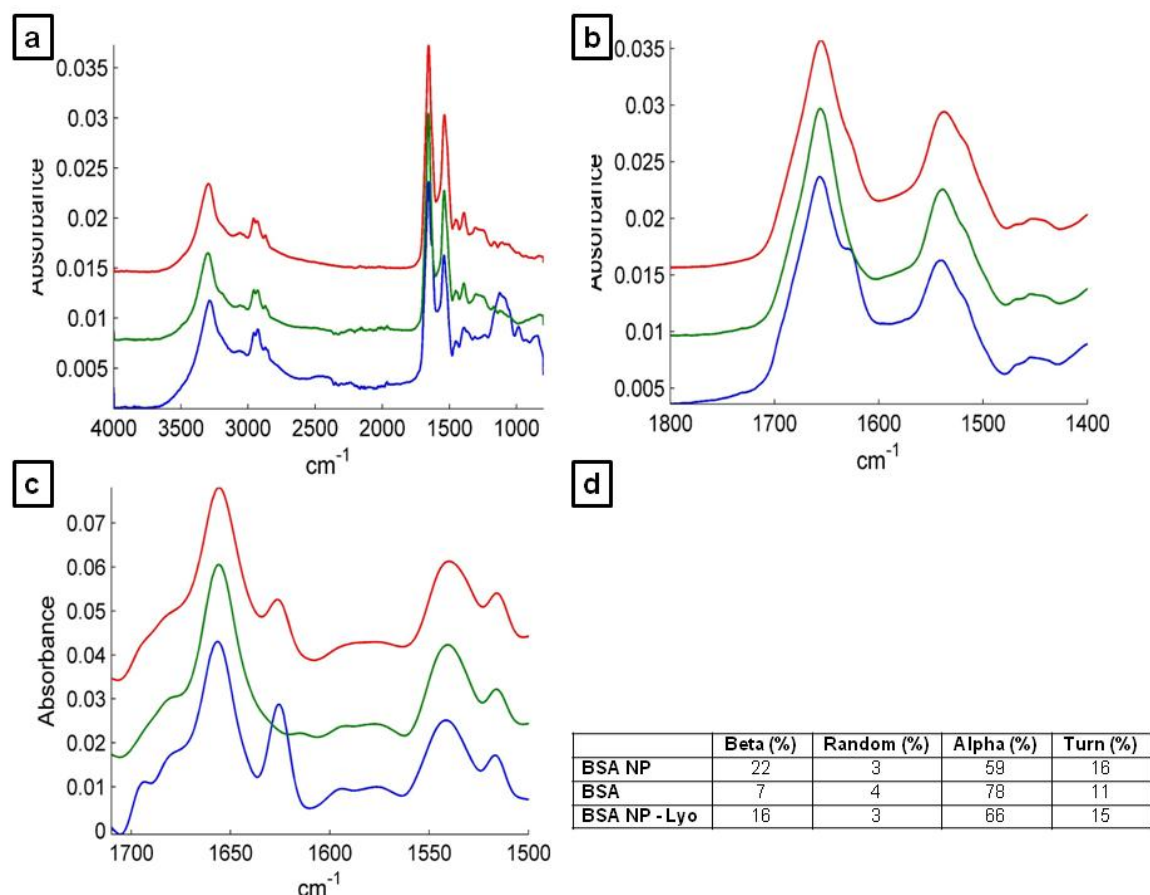


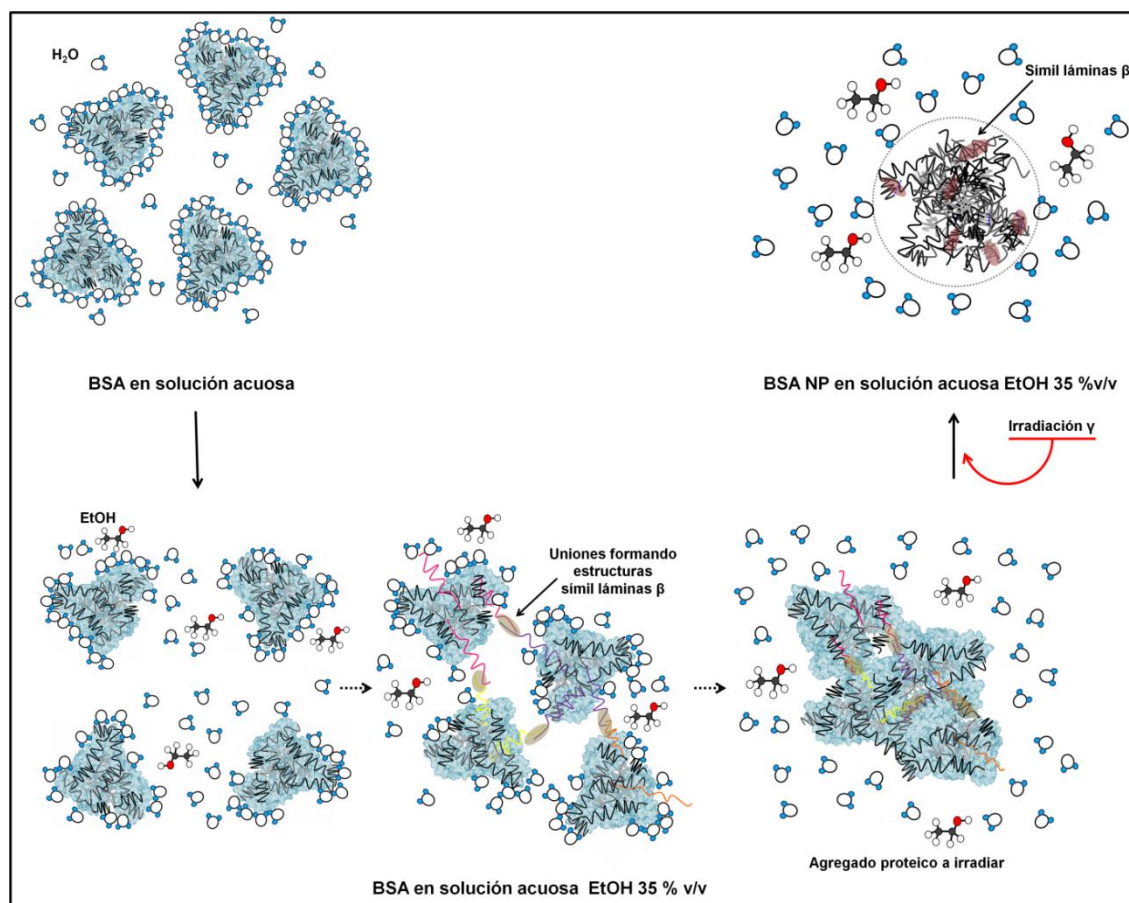
Figura 24(a) Perfiles completos obtenidos por espectroscopia FT – IR de la BSA (verde), BSA NP (azul) y BSA NP- Lyo (rojo) (4000 – 950 cm^{-1}). (b) Perfil de la absorbancia de las amidas de cada muestra (1800 – 1400 cm^{-1}). (c) Deconvolución de los espectros de las Amidas de cada muestra. (d) Tabla con los porcentajes de contenido de las distintas estructuras secundarias en cada muestra, calculada mediante software MatLab, basado en la deconvolución en (c).

Todos los espectros presentan la señal correspondiente al máximo de la estructura α – hélice (1650 cm^{-1}) (Figura 25b). El hecho de que este máximo se conserve en todos los espectros, sugiere una preservación de la estructura global de las proteínas formando las NPs. Cabe recordar que la albúmina bovina está formada por un contenido total de alrededor de 70% de estructura α – hélice; si esta estructura se encuentra gravemente alterada, significaría una pérdida importante de la estructura global de la proteína y, por ello, una posible pérdida de su función.

Tanto en los espectros de la BSA NP como en el de BSA NP – Lyo, presentan un hombro alrededor de 1620 cm^{-1} (Figura 25b). Este hombro corresponde según Sarrouhk

et al., 2013 a estructuras laminas – β . Al deconvolucionar los espectros (Figura 25c), se observa que dicho máximo está acompañado por un máximo de menor intensidad a 1690 cm^{-1} aproximadamente. Esto sugiere estructuras láminas – β posiblemente anti paralelas. El contenido de estructuras de este tipo en la BSA es casi inexistente (7 %), mientras que en las de NPs es de 22 y 16 %, respectivamente (Figura 25d). El incremento del contenido β durante la formación de la NP es significativo, así como también lo es la diferencia entre las distintas NPs.

La evidencia de presencia de estructuras símil lámina β sugiere una unión entre las moléculas en la formación de la BSA NP más detallado (Esquema 23). La presencia de etanol en la dispersión, deshidrata las moléculas de albúmina, rompiendo las uniones con el agua. Este fenómeno alienta la agregación entre BSAs lo que favorece la desnaturalización parcial de ellas. Esta desnaturalización se debe a la necesidad de suplir la falta de las uniones con el agua entre moléculas de albúmina. Si bien las moléculas de albúmina interaccionan entre sí por medio de diferentes uniones, la deshidratación etanólica da lugar a uniones intermoleculares del tipo símil lámina β . Luego durante la irradiación γ , estas uniones se estabilizan, haciendo que el agregado proteico no se disuelva y la BSA NP quede formada (Esquema 23).



Esquema 24 La BSA se encuentra en estado nativo en soluciones acuosas PBS pH 7,0, 30 mM. Al haber presencia de etanol en la suspensión, las moléculas de albúmina comienzan a deshidratarse, rompiéndose las uniones con el agua. Debido a esto las moléculas de albúmina comienzan a agregarse buscando suplir las uniones que tenían con el agua, con otras moléculas de BSA. Esto da lugar a uniones que forman estructuras símiles láminas β . Luego de la irradiación γ , las uniones se estabilizan, haciendo que la NP quede formada como una entidad independiente de sus componentes individuales.

5.4 Reformulación de la hipótesis sobre la estructura de la BSA NP

En esta sección se realizaron diferentes ensayos que permitieron ajustar las condiciones propuestas en la hipótesis sobre la formación de la BSA NP formulada al comienzo de este trabajo. Los resultados permiten discernir la construcción y organización espacial de las moléculas de albúmina durante el proceso de obtención de la NP. Como resultado se sugiere que la BSA NP es una nanoestructura con un diámetro hidrodinámico de 70 nm, de forma esferoide (Esquema 24). Las albúminas están agregadas heterogéneamente, en regiones con mayor y menor concentración. Las posibles uniones intermoleculares son:

- Estructuras símil lámina β : cuya finalidad es la de suplir los puentes de hidrógeno perdidos durante el proceso de desolvatación
- Reorganización y formación de nuevos puentes disulfuros

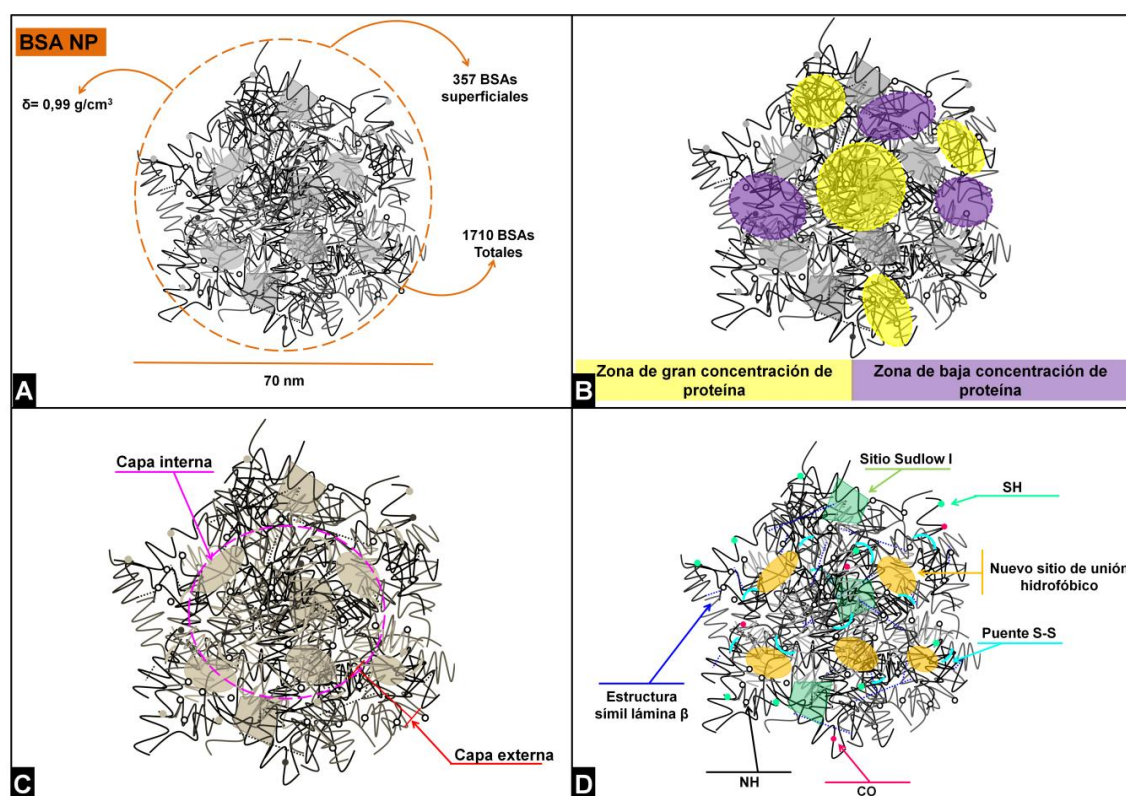
Estas uniones se estabilizan durante el proceso de irradiación γ , proceso en el cual se entrega suficiente energía para romper enlaces y fortalecer y generar otros. No obstante, no todas las interacciones intermoleculares tienen igual fuerza. Las albúminas más superficiales están unidas más débilmente. Esto hace que frente a condiciones levemente adversas, como es un SDS-PAGE, la NP pierde su “capa exterior”. Así, se sugiere la diferenciación de dos capas de la BSA NP: una superficial y otra denominada *core*. Es en esta última donde las interacciones entre BSAs están más reforzadas logrando que no se desprendan fácilmente (Esquema 24).

Las moléculas de albúmina en la NP tienen una disposición espacial organizada. Mediante microscopía se observó la forma esferoide de la NP, por lo que se propone una esfera rígida. La posibilidad que se discute para las BSA NPs es parte de la teoría de la organización de un sólido cristalino en una red en donde sus puntos (moléculas proteicas en este caso) están organizados de una determinada manera. Por estructura de la proteína y siguiendo esta línea de pensamiento, se sugiere que la BSA NP cuenta con una fracción de empaquetamiento, en donde hay espacios “huecos” no ocupados por proteínas (Esquema 24).

Durante el trabajo realizado se encontraron indicios de estos espacios, observados como por ejemplo en la microscopia A.F.M como las zonas claras y oscuras de la superficie. Al estudiar la interacción de la NP con las dos drogas elegidas, especialmente E, se observó que la BSA NP contaba con mayor capacidad de carga de la BSA. Ambos vehículos parten de una concentración igual de proteína inicial. Sin embargo, la NP cuenta con uno de los bolsillos de unión bloqueado a la interacción con

MC540 en principio (Sitio Sudlow II). Recordando que el E es una droga con gran carácter hidrofóbico, es lógico su elección por bolsillos con un ambiente hidrofóbico para unirse. Debido a este razonamiento y los resultados obtenidos, se sugirió la formación de nuevos bolsillos hidrofóbicos durante la irradiación. Estos bolsillos pueden, a su vez, ser interpretados como lugares vacíos entre las moléculas de albúmina formando la NP. Esta explicación se ajusta al modelo de red cristalina compuesto por celdas primitivas centradas en las caras. Dicha celda como se observa en el Esquema 18 presenta espacios vacíos entre las albúminas.

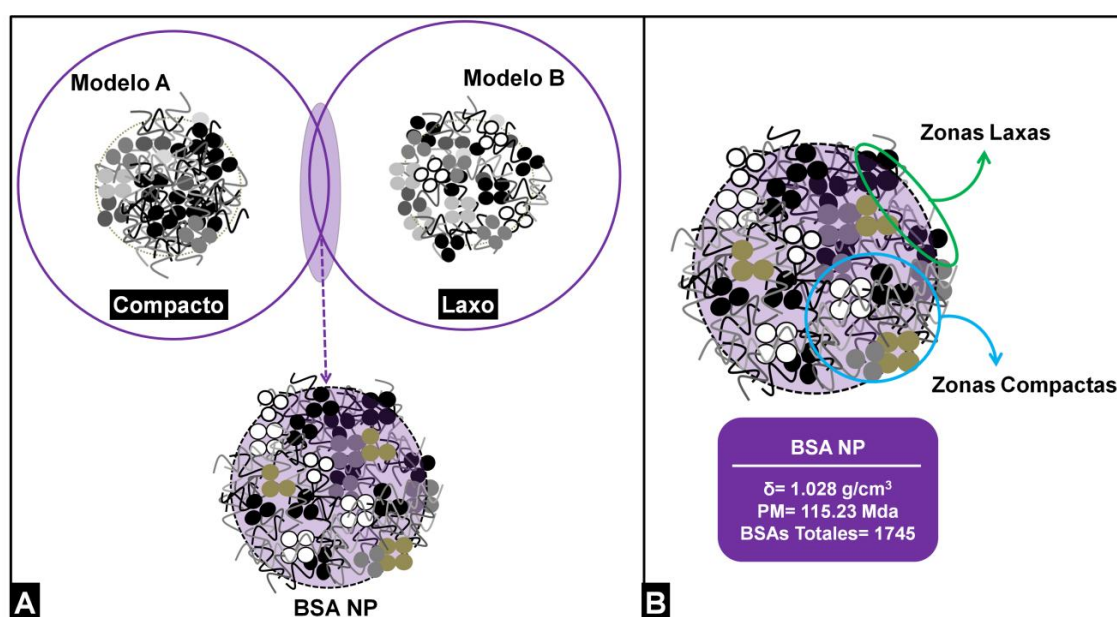
Por ende, en vez de tener una BSA NP maciza y compacta de 148 MDa de peso molecular como se pensaba, se tiene una BSA NP maciza, pero con regiones de mayor concentración de agregado proteico de 115 MDa aproximadamente. La NP está compuesta por una mayor cantidad de moléculas (3950 aproximadamente, contrario a las 2250 calculadas teóricamente) (Esquema 24).



Esquema 25 Radiografía de la BSA NP según los datos experimentales obtenidos durante la caracterización biofísica. (a) Aspectos más globales: densidad, diámetro hidrodinámico, albúminas totales por NP y proteínas superficiales. (b) Posible organización espacial de las proteínas en la BSA NP en zonas de mayor o menor concentración contribuyendo a una superficie heterogénea. (c) División de capas de la BSA NP según las fuerzas entre las moléculas de albúmina. (d) Posible disposición de los bolsillos de unión a droga (Sitio Sudlow I y nuevos sitios generados por el proceso de obtención), grupos funcionales expuestos en la superficie de la NP y distintos enlaces inter e intra moleculares necesarios para la formación de la BSA NP (enlaces generando estructuras símil lámina β y puentes S-S).

La BSA NP al tener un valor de densidad menor de lo esperado (c.a. $0,99 \text{ g/cm}^3$) (Tabla 22), cuenta con un peso molecular menor y volumen mayor a lo estimado anteriormente (115 MDa y $9,33\text{E}+05 \text{ nm}^3$, respectivamente). Debido a esto y la disposición espacial sugerida, el número de moléculas de albúmina totales formando parte de la NP también es mayor. La cantidad de albúminas en superficie no varía debido a que el número de ellas depende exclusivamente del radio de la BSA según el modelo de la cápside icosaédrica viral.

La NP cuenta con una estructura esferoide en donde, si bien se trata de una estructura maciza, en donde las moléculas de BSA se encuentran agregadas, hay zonas en donde la agregación proteica permite espacios más laxos (Esquema 25a). En otras palabras, la esfera cuenta con regiones de gran concentración de agregado proteico, mientras que también presenta regiones en donde hay más espacio entre las moléculas de proteína (Esquema 25b). En base a los datos experimentales obtenidos el modelo más acertado sobre cómo se encuentran organizadas las moléculas de BSA en la NP sería un punto medio entre los modelos A y B anteriormente propuestos.



Esquema 26 Se encuentra representado el modelo de BSA NP, tomando como base los resultados de cálculos de la densidad en forma experimental.

Las BSA superficiales representan sólo un 21 % del total. Es decir, la NP concentra la mayor cantidad de albúmina en su capa interna (core). Esto refuerza la idea de una BSA NP maciza con diferentes regiones de concentración proteica.

El porcentaje de moléculas superficiales que tiene expuesto el grupo SH es solamente un 10 %, mientras que el 57 % de los grupos NH están expuestos. Estos valores sugieren que durante la BSA NP existe la posibilidad de interacción entre sus grupos

aminos con grupos sulfhidrilos. Al tener solo un 2 % de CO superficiales, se considera que el estado “nativo” de oxidación de la NP es despreciable. La ventaja está que es posible su reconocimiento por los agentes de opsonización en los organismos. Dichos agentes reconocen con mayor facilidad aquellas proteínas con elevado nivel de oxidación (indicador de vejez en la molécula).

Conclusión

En base a los resultados obtenidos sobre el ensamblado de las BSA NPs y valores obtenidos de sus características intrínsecas de forma experimental se puede inferir que:

- Las BSA NPs se encuentran conformadas por dos capas de moléculas de albúmina: una externa en donde las moléculas de la proteína están unidas por fuerzas débiles, siendo separadas fácilmente, y otra interna, en donde las moléculas de albúmina están unidas intermolecularmente por fuerzas más fuertes, siendo difícil su separación.
- Las BSA NPs son estructuras esferoides con un diámetro hidrodinámico de 70 nm, rigiéndose por Ley de Bravais como una esfera rígida. Su densidad es de $0,99 \text{ g/cm}^3$ en una dispersión tampón de PBS 30 mM, pH 7,0, con un total de 1710 moléculas de albúmina en su composición. Su peso molecular es de 115,23 MDa.
- Las BSA NPs tienen en su composición 22 % de estructura secundaria lámina – β contra el 7 % de esta misma estructura en la BSA. Las uniones intermoleculares se encuentran en parte en esta estructura.

"Lo que nos lleva al fin... fuera del reino de la servil imitación de la Naturaleza, para entrar en el campo, mucho más interesante, de la invención humana."

[Un mundo feliz, Aldous Huxley. Capítulo I. 1932, Random House. Londres]

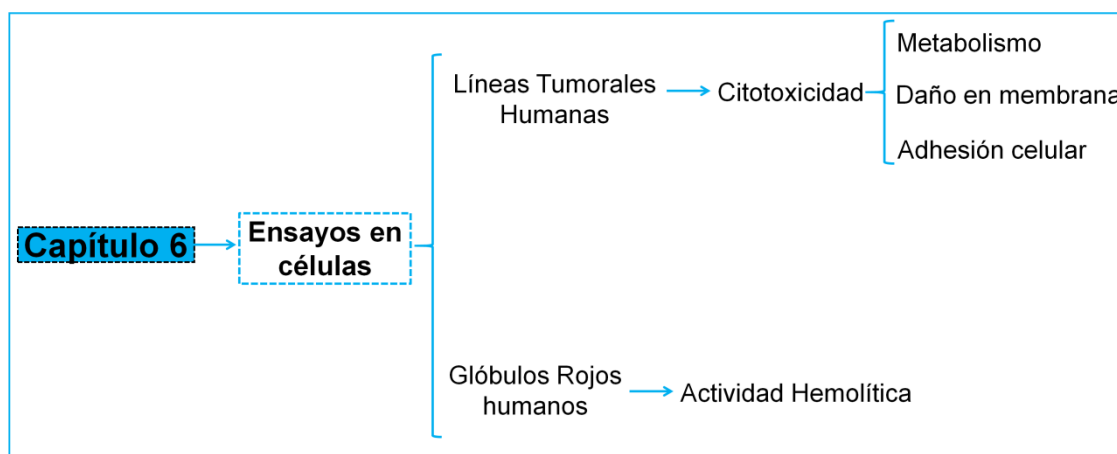
Parte II

Ensayos Toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

PARTE II: Ensayos Toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

<u>Parte II:</u> Ensayos Toxicológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>			
Capítulo 6	Capítulo 7	Capítulo 8	Capítulo 9
Ensayos en líneas tumorales humanas y de la sangre	Ensayos de toxicidad en larvas Zebrafish (<i>D. rerio</i>)	Ensayos de Toxicidad en embriones Zebrafish (<i>D. rerio</i>)	Inmunotoxicidad en líneas celulares murinas y humanas

Capítulo 6: Toxicidad *in vitro* de la nanopartícula de albúmina



Introducción

Esta parte del trabajo discute los datos obtenidos de ensayos de citotoxicidad *in vitro* en líneas tumorales, actividad hemolítica en células sanas del torrente sanguíneo y ensayos *in vivo* en un modelo Zebrafish (*D. rerio*). El objetivo es estudiar el potencial de la BSA NP como nanovehículo en modelos de estudio con mayor semejanza a una situación real para posibles tratamientos médicos.

Diferentes NPs de albúmina han sido utilizadas a lo largo de estos últimos años como vehículo para unir diferentes fármacos en un espectro de tratamientos médicos variados: artritis reumatoide (Byeon et al., 2016), cáncer (Cui et al., 2016; Alam et al., 2015), fibrosis pulmonar (Seo et al., 2016), HIV (Wilson et al., 2015), entre otros.

El Instituto Nacional del Cáncer define al cáncer como una enfermedad multifactorial, en la cual las células del organismo se desorganizan y comienzan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos circundantes. Deviene de una desregulación de la proliferación celular o su inhabilidad para una apoptosis celular (Murawala et al., 2013). En Junio del 2010, las estadísticas mundiales sobre el cáncer (GLOBCAN 2008), revelaron que los diagnósticos más comunes son el de pulmón (12,7 % del total de los casos), mama (10,9 % del total de los casos) y colorectal (9,7 % del total de los casos). Al proponer a la BSA NP como vehículo para combatir esta enfermedad se busca: aumentar la especificidad de la droga a utilizar y, por otro lado, disminuir los efectos adversos que se pudieren generar debido a una liberación no controlada ni específica del fármaco.

Las ventajas presentadas por este tipo de NPs radican en que:

- su tamaño puede controlarse con un mínimo de polidispersidad,

- el tiempo de obtención de la NP es corto
- por tratarse de un sistema con componentes orgánicos, la toxicidad en el organismo disminuye a comparación de la generada por NPs poliméricas.

En esta oportunidad, se estudiará el sistema con E y MC540. La MC540 ya es utilizada sobretodo en tratamientos de terapia fotodinámica, y como purgador de sangre contra la leucemia promielocítica. El E al poseer una toxicidad alta para el sistema aún no se utiliza como tratamiento médico. De acuerdo con el NIH, se están llevando a cabo ensayos clínicos de esta droga. En particular, los ensayos son para combatir enfermedades como el riñón policístico (*Randomized Clinical Trial of Triptolide Woldifii for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*) y el cáncer de mama (*Academia Sinica Investigator Award 2010*). En el primer caso, la droga resultó efectiva. Para el segundo caso, aún no se completó el estudio. En esta Tesis comprobamos si esta droga sirve para combatir la desregulación de sus células inmunes estromales y fibroblastos en cáncer de mama gracias a su propiedad antiinflamatoria. El E es una droga con alta toxicidad, por lo que es posible estudiar efecto protector de las NPs, tanto para el fármaco como para el organismo al cual se le administra el sistema.

Se estudiará entonces el efecto antitumoral de las BSA NPs asociadas a ambas drogas por separado en células de monocapa derivadas de tumores humanos: MCF-7, correspondiente a células de adenocarcinoma mamario y PC-3, correspondientes a células de adenocarcinoma de próstata. De poder observar un descenso en la viabilidad de estas células, se continuará estudiando el sistema en organismos más complejos.

6.1 Citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas MCF-7 y PC-3

Materiales y Métodos

- *Mantenimiento de las líneas tumorales a usar*

La línea tumoral humana mamaria MCF-7 se cultivó con medio MEM completo (1% v/v Antibiótico – Antimicrobiano y 1 % Glutamina), SFB 10 % a 37 °C con inyección de CO₂ 5 %. Se renovó el medio de crecimiento cada tres días, dejando que las células llegaran a una confluencia apropiada antes de repicar.

La línea tumoral de próstata humana PC-3 se cultivó con medio RPMI completo (1% v/v Antibiótico – Antimicrobiano y 1 % Glutamina), SFB 10 % a 37 °C con inyección de CO₂ 5 %. Se renovó el medio de crecimiento cada tres días, dejando que las células llegaran a una confluencia apropiada antes de repicar.

- *Medida de metabolismo celular por MTT*

Luego de crecer las distintas líneas celulares, se sembraron 5000-8000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Se incubaron por grupos (n=14) con diferentes tratamientos; BSA NP, BSA, E, MC540, BSA NPE, BSA NPMC540 y BSAE, BSA MC540, en una concentración de 45 µM (55nM para el caso de la BSA NP). Las incubaciones fueron de 24 y 48 h.

Luego de cada incubación, se realizó el ensayo de MTT (Mosmann, 1983). Brevemente, luego de transcurrido el tiempo de incubación, se invirtió la placa, seguido de un lavado con PBS. En el siguiente paso se incubó la misma placa con una solución de 0,2 mg/ml de MTT durante 30-40 min en oscuridad, en una estufa con inyección de CO₂. Luego se lavó la placa por inversión y se reveló con 200 µl de DMSO, al cabo de 15 min se leyó la placa en un lector para ELISA a 570 nm.

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Se relativizaron los tratamientos al control (células sin tratar) y se observó el cambio en su metabolismo en porcentaje. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v 5.0.

- *Medida indirecta de la ruptura de la membrana mitocondrial por LDH*

Luego de crecer las distintas líneas celulares, se sembraron de 5000-8000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Se incubaron por grupos (n=14) con los diferentes tratamientos; BSA NP, BSA, E, BSA NPE, y BSAE, en una concentración de 45 µM (55 nM para la BSA NP) y se incubaron durante 24 y 48 h.

Luego de cada incubación, se realizó el ensayo de ruptura de membrana mediante señal de LDH (Korezeniewski et al., 1983). Brevemente, 45 m después de finalizar la incubación, se puso en tres blancos solución de lisis. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con PBS de la placa y se trasvasó el sobrenadante a otra placa, al cual se incubó con la mezcla (*mix*) durante 30 m en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se le agregó una solución *stop* y se midió la absorbancia de la placa en un lector ELISA a 490 nm.

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Se relativizaron los tratamientos al control (células sin tratar) y se observó el daño en su membrana en porcentaje. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v 5.0.

- *Medida de vida o muerte celular por Cristal Violeta*

Luego de crecer las distintas líneas celulares, se sembraron de 5000-8000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Se incubaron por grupos (n=14) con los diferentes tratamientos; BSA NP, BSA, E, MC540, BSA NPE, BSA NPMC540 y BSAE, BSA MC540, en una concentración de 45 μ M (55nM para el caso de la BSA NP). Las incubaciones se realizaron durante 24 y 48 h.

Luego de cada incubación, se realizó el ensayo de Cristal Violeta (CV) (Flick et al., 1984). Brevemente, luego del tiempo de incubación, se lavó la placa por inversión y se la incubó durante 15 m en cámara húmeda con 100 μ l por pocillo de cristal violeta. Una vez finalizado ese lapso de tiempo, se lavó la placa con agua destilada y se incubó con ácido acético al 30 %. Al cabo de 30 m se leyó la placa en un lector para ELISA a 590 nm.

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Se relativizaron los tratamientos al control (células sin tratar) y se observó la adhesión celular a la placa en porcentaje. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v 5.0.

Resultados y Discusión

Discutiremos en este apartado cómo cada tratamiento afecta a las líneas tumorales. Se estudió la toxicidad de la BSA NP en las líneas tumorales humanas analizando en conjunto los tres ensayos descritos en el apartado Materiales y Métodos. El ensayo de metabolismo celular (MTT) se tomó como una primera etapa de la respuesta del modelo hacia el tratamiento; la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH) como un indicio de muerte celular por ruptura de membrana; y la adhesión celular (Cristal Violeta) como estudio de la proliferación celular.

- *Ensayos citotóxicos en MCF-7*

Las células tratadas con E y sus respectivos sistemas fueron estudiadas en dos líneas tumorales (Figura 26.1). Para el caso de la línea tumoral MCF-7 el metabolismo de las células varió con cada grupo (Figura 26.1a-b). Con respecto a la actividad metabólica, la BSA no afecta a las células, mientras que la BSA NP aumenta su metabolismo a las 24 y a las 48 h comparado con células sin tratar (indicadas como la línea de puntos en gris en 100 %). Ambos sistemas: BSAE y BSA NPE, a las 24 h logran disminuir la actividad metabólica al igual que la droga en libertad a un 80 % de su actividad normal. A las 48 h, las células tratadas con BSA NPE logran una diferencia significativa con respecto a las células tratadas con E (Figura 26.1a-b), llegando a aumentar el metabolismo celular a un 125 %, mientras que la BSAE no muestra cambios con el tratamiento E.

Tanto a las 24 como a las 48 h, el daño a la membrana celular por los distintos tratamientos muestran gran porcentaje de daño para todos los tratamientos (línea de puntos del 100 %, indica máxima muerte celular). Mientras que las células tratadas con BSA y BSA NP alcanzan un actividad de LDH del 100 %, los tratamientos BSAE, BSA NPE y E no presentan diferencias significativas entre ellos, alcanzando una actividad de LDH cercanas al 50 % (Figura 26.1c-d).

En cuanto a la proliferación celular, se observa que tanto la BSA y la BSA NP generan un aumento de la población celular, cercana al valor de las células sin tratar. Las células tratadas con E y con los sistemas BSAE y BSA NPE, a las 48 h se observa una disminución de las poblaciones celulares con respecto a las células sin tratar del 30 % aproximadamente (Figura 26.1e-f).

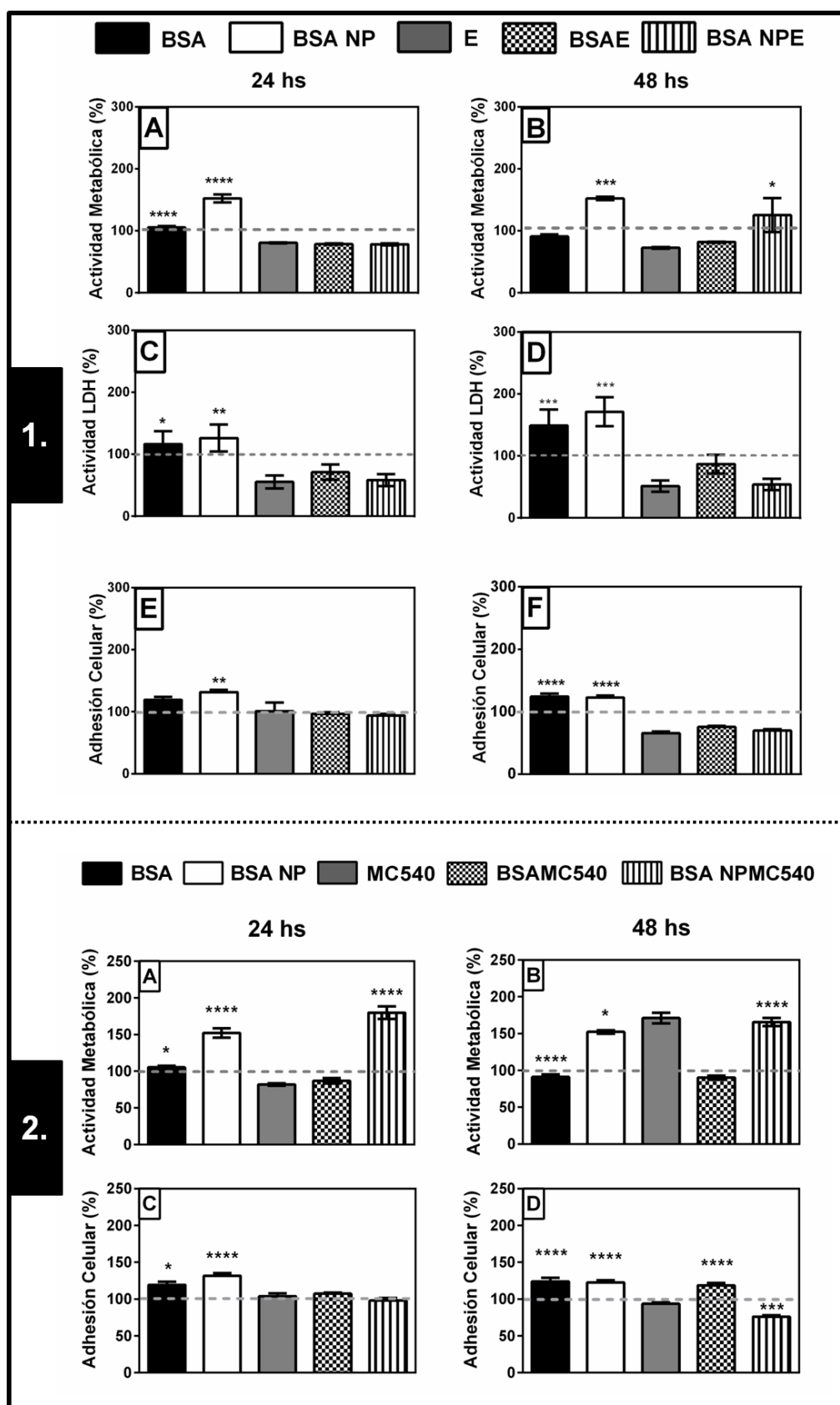


Figura 25 Resultados obtenidos a las 4, 24 y 48 h de tratamiento en los ensayos de (a) MTT; (b) LDH y (c) Cristal Violeta en la línea tumoral MCF-7. Los ensayos se realizaron por triplicado con un n=30.

Con las células tratadas con MC540 y los sistemas con la misma droga, se realizó únicamente ensayos de metabolismo y de proliferación celular (Figura 26.2). Se observó que aquellos tratamientos con BSA NPs, las células activaban su metabolismo llegando a un 200 % con respecto a las células no tratadas (línea de puntos o 100 %) (Figura 26.2a-b). Las células tratadas con BSA y BSAE no muestran cambios en su actividad metabólica a ninguno de los tiempos estudiados con respecto a las células sin tratar. La MC540 por su parte tiene un efecto similar a los tratamientos con BSA NP, llegando a una actividad metabólica de 150 % a las 48 h (Figura 26.2 b).

Por su parte al estudiar la adhesión celular, no se observaron cambios en ninguno de los horarios estudiados entre las células tratadas y sin tratar (Figura 26.2c-d). Si bien a las 48 h se observan diferencias entre los tratamientos comparados con la MC540, la población celular sigue siendo cercana al 100 % de la población control (Figura 26.2d).

- *Ensayos citotóxicos en PC-3*

Al haber observado poco cambio en la fisiología celular al estar tratada con MC540, se estudió la citotoxicidad sólo de los tratamientos que tenían E en la línea tumoral PC-3 (Figura 27). Sobre ellas se realizaron los ensayos de MTT, LDH y Cristal Violeta.

Las células que vieron afectadas su metabolismo tanto a las 24 como a las 48 h fueron aquellas tratadas con BSA (130 – 150 %) (Figura 27a-b). Se observó un leve aumento de su actividad por sobre células sin tratar, marcando una diferencia significativa con el resto de los tratamientos, que no generaron un cambio en el metabolismo de las poblaciones celulares respectivas.

A las 24 h, el daño de membrana celular fue menor al 50 % para todos los tratamientos (Figura 27c). El tratamiento que más daño generó en la población celular fue el E, alcanzando aproximadamente 40 % de actividad de la deshidrogenasa. A las 48 h, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, quienes alcanzaron una actividad de LDH del 50 % aproximadamente (Figura 27d).

De acuerdo con el ensayo de cristal violeta, mientras los vehículos no afectaron la viabilidad de las células, el resto de los tratamientos disminuyeron la adhesión, y por ende la proliferación celular, a un 50 % con respecto de las células control (Figura 27e-f).

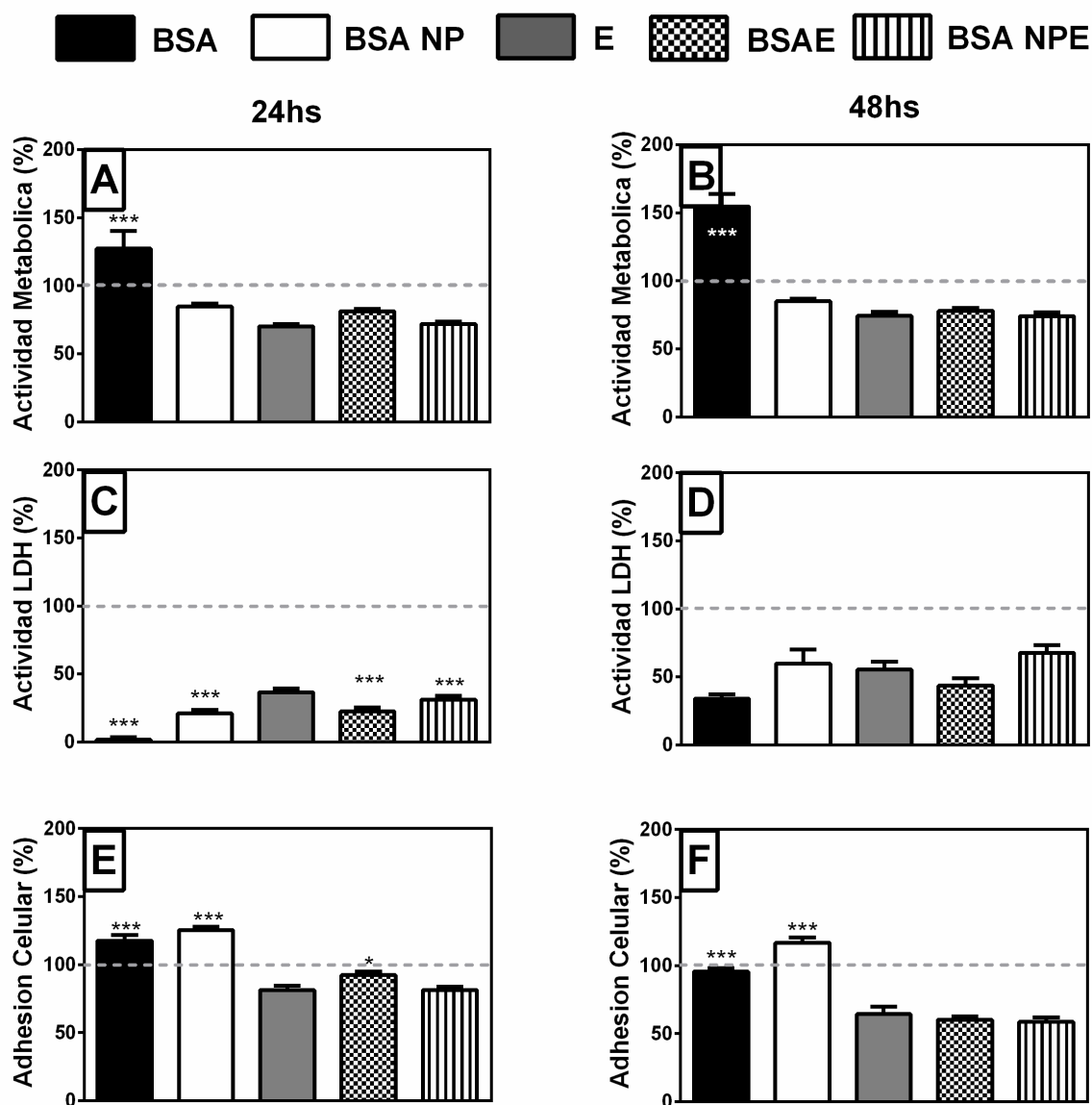


Figura 26 Se muestran los resultados obtenidos a las 4, 24 y 48 h de tratamiento en los ensayos de (a) MTT; (b) LDH y (c) Cristal Violeta en la línea tumoral PC-3. Los ensayos se realizaron por triplicado llegando a un n=30.

Las células MCF-7 tratadas con E mostraron sensibilidad con una mortalidad del 50 % aproximadamente. En la bibliografía consultada se observaron valores similares a los alcanzados en este trabajo. Chun-Guang et al., 2010, propone al E como una droga capaz de distinguir entre tejido sano y tejido tumoral. Tanto este grupo de trabajo como Srinivas et al., 2006 observaron un 50% de viabilidad celular con MTT a las 48 h.

Estos valores son semejantes a los obtenidos con MFC-7, en donde se obtuvo un 50 % de viabilidad celular en aquellas células que fueron tratadas con E ya sea en forma libre como en los bioconjugados (Figura 26.1). El grupo Wang et al., 2012, estudiaron la encapsulación de la droga en partículas sólidas lipídicas (SLN) y en forma libre. Luego de 48 h en células MCF-7 lograron una viabilidad en ambos tratamientos del 30% en

una concentración 30 μ M. Si bien estos valores son más bajos que los obtenidos en nuestro trabajo, es importante destacar que se ha logrado obtener el mismo efecto anti-tumoral con la BSA NPE que con la droga sola. Demostrando así que nuestro sistema es eficiente para tratamientos en tejidos tumorales.

Por su parte, si bien se observó gran daño de la membrana celular de las células tratadas con los vehículos, se observó a su vez un aumento tanto del metabolismo celular como de la proliferación (Figura 26.1). Si bien hay células que mueren, la mayoría está tratando de repararse y duplicarse, por eso el metabolismo está aumentado, alcanzando con éxito a reponer la población perdida a causa del tratamiento, esto se ve reflejado como un porcentaje alto de adhesión celular.

Para las PC-3 se observó una situación similar a la observada para las MCF-7, los tratamientos que tenían E en su formulación generaron una toxicidad en sus poblaciones celulares, alcanzando un 50 % de viabilidad celular al cabo de las 48 h. La misma situación fue descrita para BSA y BSA NP en células MCF-7 (Figura 27).

Para el caso de las células tratadas con MC540, se observó que ninguna formulación afecta al ciclo celular, por lo que esta droga tal como está no fue citotóxica para las células MCF-7 (Figura 26.2). La MC540 como tal no afectó las células, ya que debe fotoactivarse para poder generar algún efecto citotóxico por medio de sus productos (Sieber et al., 1987, O'Brien et al., 1991; Lin et al., 2004, Tsujino et al., 2006).

6.2 Actividad hemolítica de la nanopartícula de albúmina ex vivo en glóbulos rojos humanos.

Materiales y Métodos

- *Actividad Hemolítica*

Se extrajo muestra de sangre de tres donantes voluntarios sanos. Se separó el plasma de los eritrocitos, a los cuales se le agregó el mismo volumen de PBS pH 7,0 30 mM. Luego 100 μ l de sangre se incubaron en una placa de 96 pocillos, con 100 μ l de cada muestra a estudiar, usando PBS como control y SDS 10 % como agente hemolítico (100% hemólisis). Se incubaron por 4, 24 y 48 h, luego las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 3000 rpm en una centrifuga AVANTI J- S6 con un rotor JS-5.3. El sobrenadante fue trasvasado a una placa de 96 pocillos y medido por UV-Vis a una longitud de onda de 414 nm, para medir la hemoglobina liberada (lisis de eritrocitos). Se analizaron los resultados de cada donante por separado y por triplicado. Los tratamientos a los cuales se expusieron las muestras fueron: Emodin (E), BSA, BSA NP, BSAE y BSA NPE. Cada muestra a su vez se estudió en tres concentraciones: 90,0 μ M, 45,0 μ M y 4,5 μ M de proteína inicial. Se calculó el porcentaje de hemólisis de las muestras y se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v 5.0.

Resultados y Discusión

• Actividad Hemolítica

La BSA NP al no ser estable a pH ácido, no es capaz de superar la primer barrera de la administración oral, el pH de la saliva. Por ello se propone como opción la vía de administración intravenosa (IV). Resulta importante entonces, tener conocimiento sobre la actividad hemolítica que el sistema puede causar en el torrente sanguíneo.

Se estudió un amplio rango de concentraciones del sistema en donde la droga se encuentra en dispersión 90, 45 y 4,5 μM en estado libre y encapsulada, con concentraciones de la BSA 90, 45 y 4,5 μM , y de la BSA NP 110, 55 y 5,5 nM .

Se observó que si bien a las 4 h de incubación los porcentajes de eritrocitos lisados fueron altos, la BSA NP presentó menor efecto de lisis en todas las concentraciones en contraste con la BSA (Tabla 24a). El efecto que el E tiene a las 4 h sobre los eritrocitos, se asemeja al de las NPs (Tabla 24b).

Tabla 24 Valores alcanzados por la actividad hemolítica de cada tratamiento incubados en presencia de eritrocitos humanos a las 4, 24 y 48 h. (a) Actividad hemolítica de los nanovehículos para cada concentración; (b) Actividad hemolítica del sistema BSA NPE y del E para cada concentración.

a	Tiempo (h)	Concentración					
		BSA (μM)			BSA NP (nM)		
		90	45	4,5	110	55	5,5
	4	103,70 $\pm$ 13,03	34,54 $\pm$ 13,13	40,01 $\pm$ 7,81	24,24 $\pm$ 5,58	21,86 $\pm$ 11,34	24,04 $\pm$ 3,17
	24	16,53 $\pm$ 9,28	8,29 $\pm$ 7,02	16,42 $\pm$ 8,47	18,09 $\pm$ 2,84	7,82 $\pm$ 5,56	4,39 $\pm$ 1,72
	48	13,50 $\pm$ 1,51	10,19 $\pm$ 10,19	17,92 $\pm$ 17,92	8,81 $\pm$ 8,81	2,58 $\pm$ 2,58	1,52 $\pm$ 1,50

b	Tiempo (h)	Concentración					
		E (μM)			BSA NPE (nM: μM)		
		90	45	4,5	110-90	55-45	5,5-4,5
	4	70,74 $\pm$ 43,89	17,56 $\pm$ 7,70	21,78 $\pm$ 8,76	46,70 $\pm$ 7,13	25,64 $\pm$ 4,24	26,08 $\pm$ 11,45
	24	63,96 $\pm$ 17,68	8,98 $\pm$ 3,68	7,56 $\pm$ 1,39	15,77 $\pm$ 6,26	15,57 $\pm$ 1,79	10,46 $\pm$ 3,07
	48	69,27 $\pm$ 0,47	3,64 $\pm$ 2,67	3,43 $\pm$ 3,43	3,03 $\pm$ 2,89	6,39 $\pm$ 6,39	0,026 $\pm$ 0,026

Todas las formulaciones testeadas a las 4 h tuvieron un efecto de lisis de los eritrocitos entre 20 % - 100 %, siendo la BSA en su mayor concentración (90 μM) la del mayor efecto (103 %) (Tabla 24a). El BSA NPE presentó un efecto hemolítico en el rango 20 % - 40 %, siendo el del mayor efecto el de mayor concentración (46,70%) (Tabla 24b). La concentración más grande de E presentó un valor del 70 % de la actividad hemolítica a las 4 h, mientras que sus diluciones rondaron el 20 % de actividad (Tabla 16b). Las BSA NPs por su parte mantuvieron una actividad hemolítica a las 4 h constante de alrededor

del 20 % en todas las concentraciones estudiadas (Tabla 24a) Este comportamiento es similar al observado en las BSA NPs.

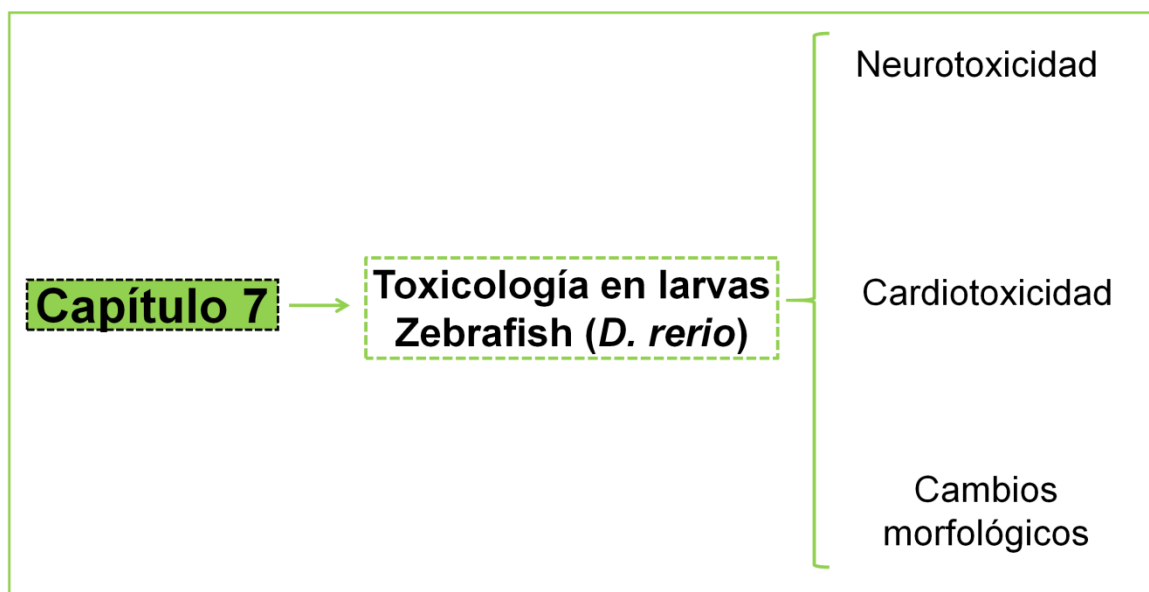
La actividad hemolítica de todos los tratamientos disminuyó a partir de las 24 h, siendo los valores de lisis de eritrocitos menores al 20 %, tanto a las 24 como a las 48 h. Aquí la excepción es el E 90 μ M, cuya actividad hemolítica fue constante a lo largo de todo el ensayo (Tabla 24b).

Conclusión

En base a los resultados obtenidos sobre la citotoxicidad de las BSA NPs y sus complejos con drogas se concluye que:

- Las BSA NPs no son tóxicas para las líneas tumorales estudiadas.
- El bioconjugado BSA NPE genera mayor efecto citotóxico que el bioconjugado BSA NPMC540. El primer complejo logra disminuir la viabilidad celular de tanto las células PC-3 como de las MCF-7 en un 50 % a las 48 h.
- El complejo BSA NP-Emodin en la concentración en la cual se estudió su citotoxicidad (55 nM de la NP y 45 μ M de la droga), no resulta tóxica para la sangre. El complejo BSA NPE (55 nM:45 μ M) propuesto como sistema de transporte de drogas en los ensayos citotóxicos, resulta ser una de las formulaciones que poseen menor actividad hemolítica en todo el ensayo; 26 % para las 4 h, 16 % para las 24 h, y 6 % para las 48 h.

Capítulo 7: Toxicidad *in vivo* de la nanopartícula de albúmina en modelo Zebrafish (*D. rerio*)



Introducción

Zebrafish (*Danio rerio*) es un modelo animal que en la actualidad está creciendo en popularidad como modelo *in vivo* para ensayos con diferentes fines (Ilustración 13). Es el modelo mejor descrito en la biología del desarrollo que presenta ventajas como: bajo costo de obtención y manejo, tamaño pequeño, y fácil mantenimiento (de Esch et al., 2012; Irons et al., 2010). Puede producir una progenie de alrededor de 200 huevos que muestran un rápido desarrollo embrionario. Tanto la embriogénesis como la organogénesis se producen en los primeros días de vida. A los 4 días post fecundación posee órganos y tejidos definidos (de Esch et al., 2012).

En el comienzo, el Zebrafish fue utilizado para poder estudiar el desarrollo vertebral ya que sus embriones son transparentes y cuentan con un desarrollo rápido (Charkaborty et al., 2009). Entre las ventajas de utilizar este modelo animal como método para estudiar efectos toxicológicos de drogas se encuentran las siguientes:

1. El modelo cuenta con una alta homología entre su información genética y el humano (75 %) (Charkaborty et al., 2009). Las similitudes incluyen una misma barrera sanguínea cerebral, células endoteliales y respuestas inmunológicas (Fako et al., 2009).

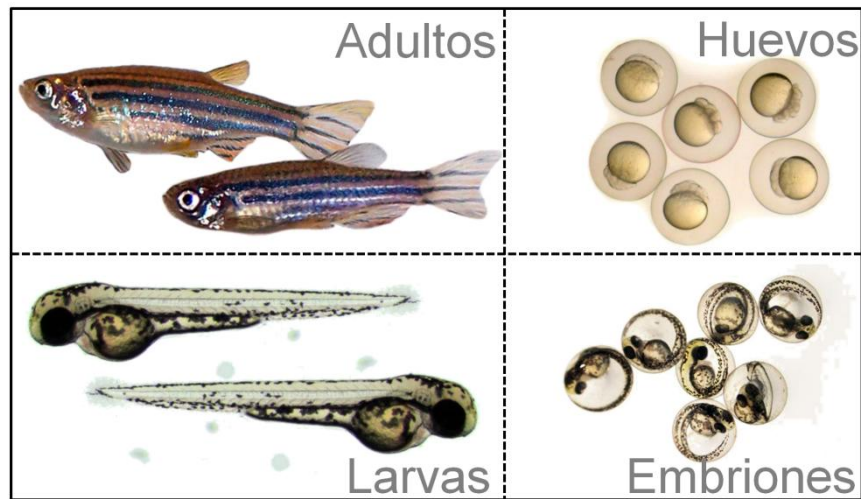


Ilustración 13 Ilustraciones de los distintos estadios en la vida del Zebrafish (*D. rerio*).

2. La biología y la transparencia óptica que posee el modelo, permite estudiar drogas en cualquier etapa del desarrollo embrionario. Se pueden realizar ensayos en tiempo real para estudiar procesos patológicos que incluyan la organogénesis, vasculogénesis y efectos deletéreos durante el desarrollo anatómico (Fako et al., 2009).
3. Al ser la fertilización y el desarrollo externos, permiten una observación y manipulación mediante condiciones controladas (de Esch et al., 2012). Las larvas del Zebrafish aportan gran caudal de información de comportamiento incluso en ambientes pequeños como un pocillo de placa. A los 6 días post fecundación (dpf), la larva posee desarrollado el nado con funciones sensoriales y sistemas motores. Esto permite que sea un sistema de estudio para respuestas locomotoras, de escape, sentido de orientación, entre otros (Irons et al., 2010).
4. Los efectos tóxicos se pueden observar por medio de cambios morfológicos de la larva.

Los ensayos llevados a cabo en este modelo *in vivo* son considerados más sensibles que los ensayos toxicológicos cotidianos para un laboratorio, como son los ensayos de citotoxicidad en células. Los resultados comportamentales que pueden obtenerse son a partir de ensayos de tiempos cortos y bajo consumo de costos (Roex et al., 2002), lo que hacen del zebrafish un modelo excelente para datos de toxicidad.

Materiales y Métodos

- *Mantenimiento de los peces Zebrafish*

Los peces adultos zebrafish (*D. rerio*) se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 14 h luz/10 h oscuridad a 28.0 ± 1.0 °C. Fueron alimentados con alimento seco (TetraMin PRO) tres veces al día y una vez al día con *Artemia nauplius larvae*. El agua del acuario se encuentra en un sistema continuo a pH 7,0 – 8,0. El término larva se utiliza en este caso para describir a animales de 3 ó más dpf.

Los embriones se obtuvieron por apareamientos natural de los *zebrafish* adultos; tanto larvas como embriones fueron expuestos a un ciclo de luz/ oscuridad 14/10 a 28 °C en medio condicionado E3 y 50 ppb de azul de metileno como funguicida.

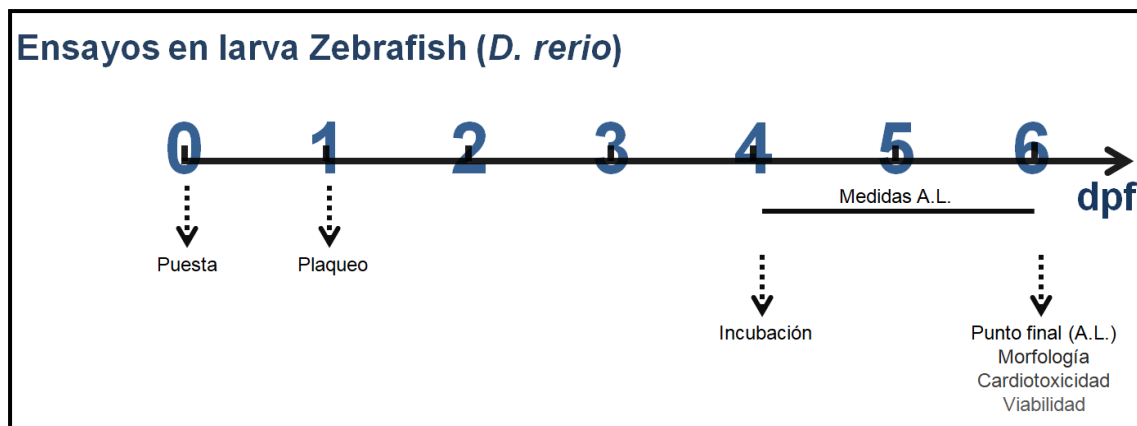
Los protocolos realizados a continuación están en regla con la guía de cuidado y mantenimiento de la organización internacional National Institutes of Health (N.I.H.). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional en el Cuidado de Animales de la Universidad Nacional de Quilmes (CE-UNQ 2/2014) (Buenos Aires, Argentina).

- *Incubación de las muestras*

Se utilizaron soluciones de BSA, BSA NP y Emodin (E). Para el mantenimiento de las larvas se utilizó medio E3. Los ensayos se llevaron a cabo en un WμTracker. Las larvas utilizadas fueron *Zebrafish* wild-type. Se las mantuvo en una incubadora a 28 °C. Los ensayos se llevaron a cabo hasta el 6 dpf por lo que no fue necesario alimentar a las larvas.

Se estudió la toxicidad de diferentes tratamientos: BSA; BSA NP; Emodin sin vehículo y con vehículo (BSAE y BSA NPE). A su vez, cada tratamiento se probó en tres concentraciones proteicas: 45,00; 4,50 y 0,45 μM. Como control se utilizó medio E3.

Para el estudio se utilizaron huevos de peces adultos sanos *Zebrafish*. Una vez hecha la selección de los huevos, se los trasvasó a una placa de 96 pocillos al día 1 dpf. En la placa se colocaron tres huevos por pocillo con medio E3. A los 4 dpf se incubaron grupos de a dos columnas con un tratamiento diferente. Se estudiaron diferentes aspectos de las larvas (Esquema 26).



Esquema 27 Diagrama del diseño experimental del ensayo realizado en larvas zebrafish (*D. rerio*).

- *Medidas de actividad locomotora*

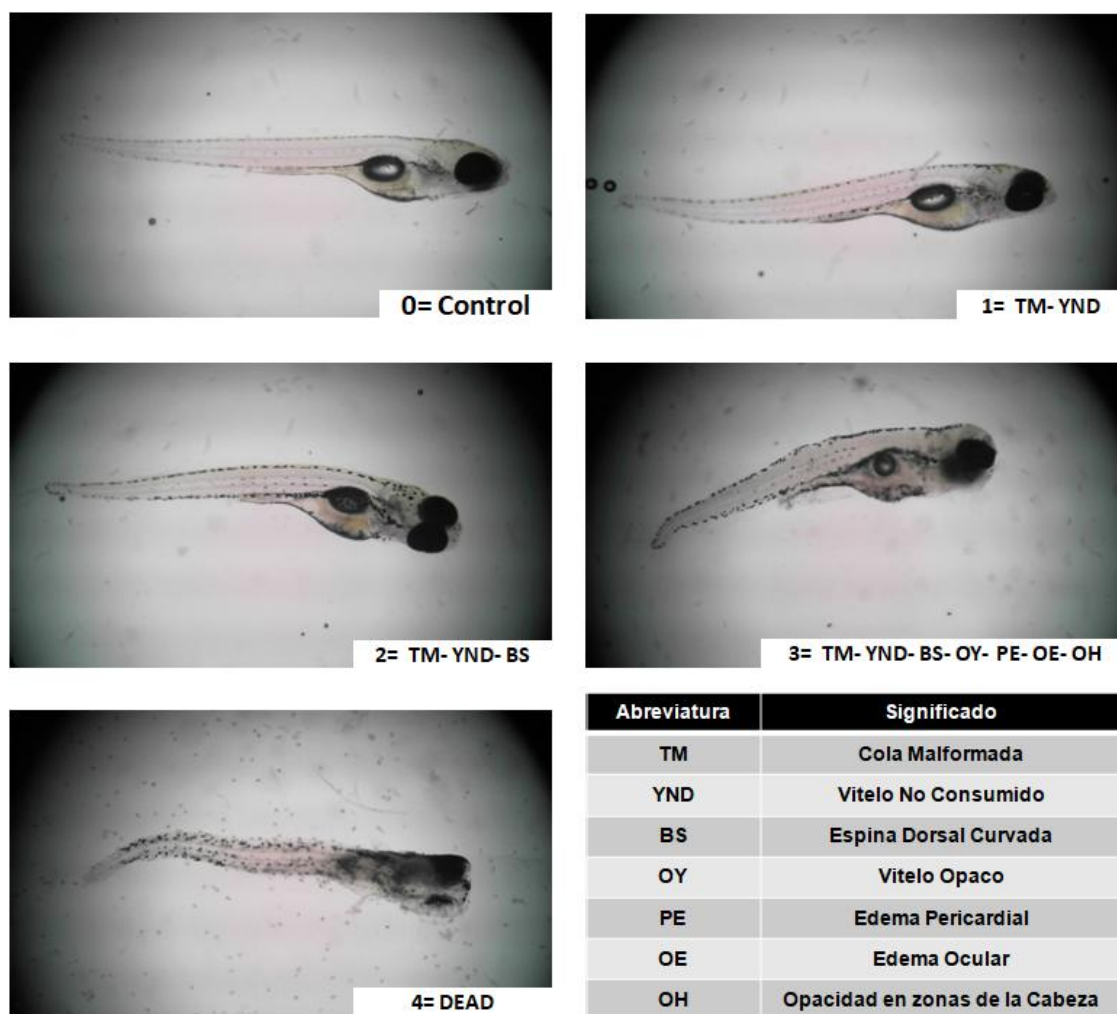
Se tomaron medidas de los movimientos de cada pocillo a las 4 h, 24 h y 48 h post-incubación, mediante un WμTracker durante 15 min. Este procedimiento se llevó a cabo con tres puestas diferentes para aumentar la variabilidad.

- *Estudio sobre la viabilidad*

A los 6 dpf (48 h), luego de medirse la actividad, se observó bajo lupa a la placa contando la cantidad de larvas vivas vs larvas muertas.

- *Estudio sobre la morfología de la larva*

A los 6 dpf (48 h), luego de medirse la actividad, se tomaron fotografías de 5 larvas por tratamiento para poder observar cambios morfológicos. A estos cambios le fueron otorgados un puntaje de acuerdo con el daño ocasionado: se cuenta con una escala en donde se le asigna un valor de 0 al fenotipo normal; 1 para un leve cambio fenotípico, hasta el 4, que se usa para describir la muerte del embrión. Se adjudicó el puntaje según lo descrito por Bar-Ilan et al., 2009 y Fako et al., 2009 (Esquema 27).



Esquema 28 Tabla de valores adjudicados según el daño de cada larva basado en Fako et al., 2009. Se le otorga el valor cero (0) a aquellas larvas que no presentan alteraciones morfológicas, siendo cuatro (4) el valor máximo de alteraciones indicando la muerte de la larva.

- *Estudio sobre la cardiotoxicidad*

A los 6 dpf (48 h), luego de medirse la actividad, se procedió a filmar 5 larvas al azar durante 15 segundos. Se contaron los latidos de cada larva, obteniéndose el latido/minuto.

Si bien cada ensayo tuvo un control con medio E3, para los análisis estadísticos se tomó como control la droga sin vehículo para comparar su efecto con el de los vehículos y la droga vehiculizada a diferentes concentraciones.

Para obtener los gráficos y su análisis estadístico se utilizó GraphPad Prism v. 5.0. El “n” de cada tratamiento fue de 8 con 3 pseudo-réplicas por cada puesta realizada.

Resultados y Discusión

- *Medidas de actividad locomotora*

Se estudiaron los resultados de la actividad locomotora obtenidos con las larvas según los diferentes tratamientos; BSA (primer conjunto de columnas), BSA NP (segundo conjunto de columnas), BSAE (tercer conjunto de columnas), BSA NPE (cuarto conjunto de columnas), y E (quinto conjunto de columnas) (Figura 28a-c).

Se observó que para el E no conjugado, la concentración que generó mayor toxicidad resultó ser la más concentrada (45 μ M) (Figura 28a-c): luego de 4 horas post-incubación (hpi), su actividad se redujo notablemente con respecto a la del grupo control (línea punteada en 100 %), luego de las 24 hpi no se observó actividad de larvas (Figura 28b-c). Ésta concentración presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos que no disminuyen en gran medida la actividad locomotora de las larvas incubadas. La dilución de E 4,5 μ M presentó actividad similares a los vehículos (BSA y BSA NP) y al complejo BSAE a las 4 y 24 hpi (Figura 28a-b). Los movimientos de las larvas no se ven disminuidos en comparación con los del control: la actividad locomotora resulta similar. Entre E y BSA NPE a esta concentración de E se observaron diferencias en la actividad de las larvas: el complejo presentó mayor actividad a las 4 hpi que la droga libre. En cuanto a la concentración más diluida de E (0,45 μ M), no se observaron cambios en la actividad locomotora de dichas larvas con respecto al grupo control o a los demás tratamientos (Figura 28a-c).

Las larvas tratadas con BSA generan una disminución de la actividad locomotora con respecto al control a las 4 hpi. Luego a las 24 hpi, la actividad de las larvas fue similar a las del grupo sin tratar para luego volver a disminuir (Figura 28a-b). Al finalizar el ensayo (48 hpi) presenta una actividad del 70 % con respecto al grupo control (100 %) (Figura 28c). Al estudiar el efecto causado por BSAE en las larvas, se observó que su actividad locomotora, en todas las concentraciones, desciende en las primeras 4 hpi, pero luego resulta similar a la del grupo control (Figura 28a-c). Ambos tratamientos al compararse estadísticamente con el E no presentan diferencias significativas en las concentraciones más diluidas.

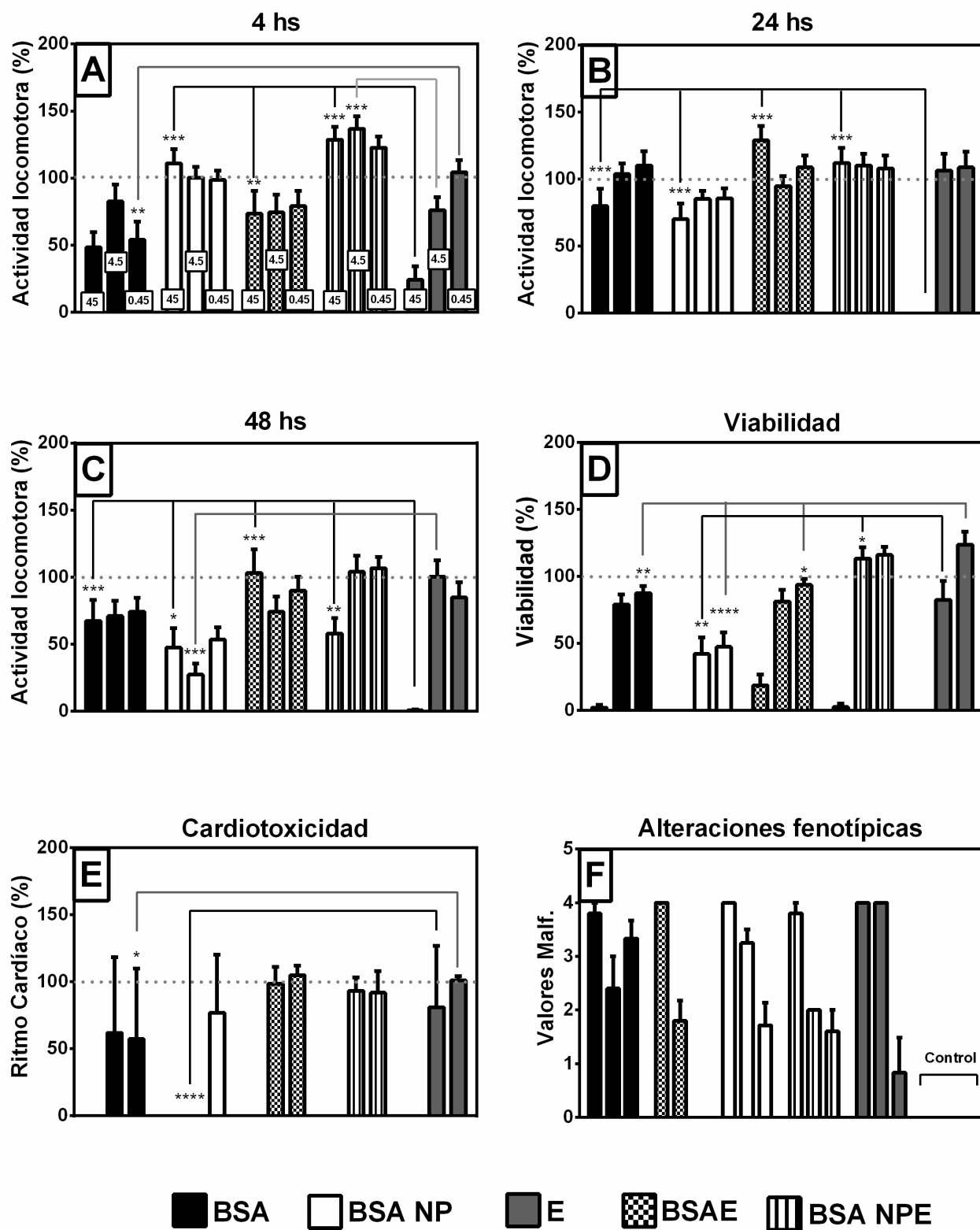


Figura 27 (a-c) Se representa las medidas obtenidas por actividad locomotora de las larvas *Zebrafish* bajo los diferentes tratamientos a concentraciones crecientes a las (a) 4 h; (b) 24 h y (c) 48 h post fecundación (hpi). Los resultados fueron analizados estadísticamente por un ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni con la droga E como control ($P < 0.0001$). Se representa la viabilidad (d); los latidos por minuto a 48 h de las larvas *Zebrafish* según los diferentes tratamientos (e), estos resultados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía con un post-test Dunnett con la droga E como control. ($P < 0.0007$). (f) Valores obtenidos del análisis morfológico de las larvas bajo los distintos tratamientos

comparados con las larvas control. Las concentraciones de los tratamientos están ordenados de forma decreciente de izquierda a derecha: para BSA y E, las concentraciones estudiadas son 45, 4,5 y 0,45 μM ; para la BSA NP las concentraciones utilizadas fueron 55, 5,5 y 0,55 nM.

Aquellas larvas tratadas con BSA NP mostraron un comportamiento similar en todas sus concentraciones (Figura 28a-c). La actividad de estas disminuyó con respecto al control a medida que el ensayo se desarrolló alcanzando una actividad locomotora final del 50 % con respecto al grupo control. Este tratamiento presentó diferencias significativas con la droga sin unir a la BSA NP en las concentraciones mayores (Figura 28a-c): alcanzando una actividad menor a la alcanzada por el E.

El bioconjugado BSA NPE tuvo un comportamiento similar para todas sus concentraciones: si bien a las 4 hpi de las larvas se observó un leve aumento de la actividad locomotora con respecto al control, después de esta medida, no se observaron diferencias entre el grupo control y las larvas tratadas con el complejo (Figura 28a-c). La excepción fue la mayor concentración de BSA NPE estudiada (55 nM: 45 μM); donde se observó una disminución de la actividad locomotora de las larvas a las 48 hpi del 50 % (Figura 28c). Este último grupo no mostró diferencias significativas con respecto a las concentraciones más diluidas del E.

- *Estudio sobre la viabilidad y cardiotoxicidad*

En cuanto a la viabilidad y cardiotoxicidad de las larvas, se observó una baja supervivencia de aquellos animales tratados con la mayor concentración de las formulaciones y una alta cardiotoxicidad al no presentar latidos por minuto (Figura 28d-e). En esta concentración, (45 μM) no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos. Si bien hubo supervivencia entre los tratamientos más diluidos (4,5 y 0,45 μM) y una leve cardiotoxicidad, no se observaron diferencias significativas entre las larvas estudiadas (Figura 28e).

- *Estudio sobre la morfología de la larva*

Para poder estudiar los efectos tóxicos fenotípicos en las larvas bajo los diferentes tratamientos, se tomaron fotos bajo lupa de larvas elegidas al azar de cada tratamiento (Figura 28f; Esquema 27). Una vez tomadas las fotografías, se les adjudicó un puntaje de daño de acuerdo con Bar-Ilan et al., 2009 y Fako et al., 2009; estos grupos de investigación propone una escala de valores de acuerdo a las malformaciones. Se hicieron modificaciones sobre la tabla de valores publicada, para poder adaptarla a nuestro trabajo.

Excepto por el tratamiento BSAE, ningún otro tratamiento no generó malformaciones en las larvas (Figura 28f). Todas las formulaciones estudiadas generaron un daño mayor a 1 en las larvas afectadas. Aquellas formulaciones que generaron mayor daño (nivel 4) en las larvas resultaron ser BSA NP 55 nM; BSA 45 μ M sus complejos y el E en concentraciones de 45 y 4,5 μ M (Figura 28f).

El modelo *in vivo* elegido, *Zebrafish*, resulta sensible a todos los tratamientos expuestos en este trabajo. Mientras la mayor concentración estudiada para cada uno de los ensayos (45 μ M para BSA y E y 55 nM para BSA NP), fue tóxica por no presentar supervivencia, las siguientes diluciones no generaron muerte en las larvas afectadas. Sin embargo, incluso en las concentraciones en las cuales los tratamientos no resultaron letales produjeron algún tipo de malformación en la larva; indicio de toxicidad leve. La mayoría de las larvas estudiadas presentaron un vitelo opaco, síndrome de tejido muerto, zona opaca en la cabeza (signo de toxicidad) y edema ocular; estos signos sugieren toxicidad a nivel organismo en la larva estudiada.

Para comprender la toxicidad generada por la BSA en las larvas, se recurrió a la bibliografía publicada. Maes et al., 2012 estudiaron la toxicidad de 14 compuestos orgánicos en larva *Zebrafish*, incubándolas cuando aún estas se encontraban en estado embrionario. Entre los 14 compuestos estudiados, se encontraba la BSA. En su trabajo, estudió el efecto de la BSA sobre las larvas en diferentes concentraciones entre 75,60 μ M y 378,00 μ M. Las malformaciones encontradas en la larva eran aleatorias e independientes una de otra, independiente de la concentración. Si bien en nuestro trabajo todas las concentraciones estudiadas mostraron distintos grados de toxicidad, siendo letal solamente la mayor concentración de proteína estudiada. La toxicidad generada por la BSA puede ser aleatoria dependiendo del momento de administración e incubación. Maes et al., 2012, observaron que dependiendo del tiempo transcurrido luego de la incubación era la toxicidad generada en el organismo; durante las primeras horas estudiadas, se observó una toxicidad mayor a la observada luego de días de vida de la larva. Noël et al., 2010 establece que el gen que codifica para albúmina, no se encuentra en el genoma de *Zebrafish*. Dicho gen codifica para una familia de proteínas, entre ellas la albúmina. En el trabajo de Noël et al., 2010, solamente se ha encontrado una de las proteínas de esa familia en el *zebrafish*: la proteína grupo específico (Gc). Es posible que al no poder codificar la albúmina, cualquier solución que contenga esta proteína resulte tóxica para las larvas incubadas. En otras palabras, si bien no se explica porque a concentraciones menores de albúmina nuestras larvas mostraron tener

mayor toxicidad que aquellas estudiadas por Maes et al., 2012, es posible que al no reconocerla como propia genera toxicidad en la totalidad del organismo.

Por otro lado, Powers et al., 2011 demostró que la toxicidad en Zebrafish debido a NPs depende de características como tamaño, material y recubrimiento (en caso de tenerlo). Esto fue demostrado con NPs de plata que generaban mayor o menor toxicidad dependiendo de su tamaño. En nuestro trabajo, la BSA NP puede resultar más tóxica en larvas respecto de la BSA debido a su gran tamaño. Powers et al., 2011 incluso han estipulado que NPs de gran tamaño puede hasta generar neurotoxicidad en las larvas; en nuestro trabajo observamos zonas opacas en la cabeza, y no descartamos la posibilidad de que ésta sea la razón en nuestro caso.

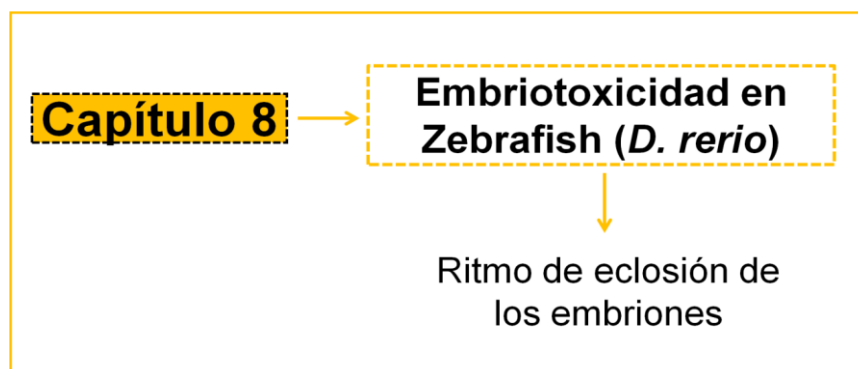
Si bien el E resulta tóxico solamente en la mayor concentración (45 μM), en He et al., 2012 se establece como la concentración para *Zebrafish* tóxica a partir de 0,92 μM . La diferencia entre nuestro estudio y el de He et al., 2012, radica en que la droga fue administrada al día 1 post-fecundación, período en el cual las larvas aún están dentro del corión desarrollándose. Li et al., 2011 establecen que cada etapa del desarrollo del embrión hasta llegar a la larva posee una gran sensibilidad a cualquier tipo de tratamiento. Las larvas son más resistentes que los embriones, por lo que el E en nuestro trabajo en concentraciones 4,5 y 0,45 μM puede generar una toxicidad menor y no ser letal, como si lo es a una concentración de 45 μM .

Conclusión

En base a los resultados obtenidos acerca de los ensayos de toxicidad de las BSA NPs y su complejo en larvas *zebrafish* se concluye:

- La concentración más alta en cada tratamiento resultó ser letalmente tóxica para las larvas *Zebrafish*, debido a que presenta baja supervivencia y alta cardiotoxicidad. Las concentraciones menores si bien resultaron tóxicas, fueron subletales.
- Todos los tratamientos generaron malformaciones en las larvas a los cuales se las expuso. Para poder entender este fenómeno en mayor profundidad, se requiere un análisis más profundo como pueden ser observación de tejido celular en cortes histológicos.

Capítulo 8: Embriotoxicidad *in vivo* de la nanopartícula de albúmina en modelo Zebrafish (*D. rerio*)



Introducción

En el capítulo previo se observó un efecto tóxico de la BSA NP en larvas de *Zebrafish* (*D. rerio*). Por esta razón, se profundizó el estudio sobre este modelo *in vivo*. Una manera simple y eficaz de estudiar el efecto teratogénico de una nueva nanotecnología es estudiar el efecto que ésta tiene en las primeras horas de gestación del embrión *Zebrafish*. Los embriones pueden ser expuestos individualmente en un pocillo diferente en un volumen relativamente pequeño de la dispersión. Esto presenta una ventaja ya que no se requiere gran cantidad del material de estudio.

Los estadios tempranos de desarrollo en un organismo suelen ser los más sensibles al ambiente en el que se encuentra. Esto se debe en parte a los cambios para la diferenciación, proliferación y migración celular requerida para la formación del organismo. Los embriones de *Zebrafish* tienen un desarrollo externo y son ópticamente transparentes. Esto permite la observación de toda la gestación del organismo utilizando métodos simples y no invasivos como la observación microscópica (Zon et al., 2005; Wheeler et al., 2009).

Mediante el estudio de los embriones fecundados en agua, e incubados en soluciones con diferentes nanotecnología, podemos observar el efecto que éstas tendrían en los estudios de teratogeneicidad. Hasta las 120 hpf es posible observar la manifestación de toxicidad a través de malformaciones morfológicas, comportamiento anormal o muerte de los embriones (Truong et al., 2011; Kovriznych et al., 2013). Estos estudios son de gran utilidad especialmente para las NPs ya que las propiedades de la materia prima de muchas de ellas son sensibles al cambio de molécula BSA a BSA NP, pudiendo afectar la reactividad en el organismo (Kovriznych et al., 2013). Se presenta a continuación el estudio de teratogenicidad de la BSA NP realizado en embriones zebrafish.

Materiales y Métodos

- *Mantenimiento de los peces Zebrafish*

Los peces adultos *zebrafish* (*D. rerio*) se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 14 h luz/10 h oscuridad a $28,0 \pm 1,0$ °C. Fueron alimentados con alimento seco (TetraMin PRO) tres veces al día y una vez al día con *Artemia nauplius larvae*. El agua del acuario se encuentra en un sistema continuo a pH 7,0 – 8,0. El término embrión se utiliza en este caso para describir a animales en el estadio previo a la eclosión del córion (0 – 72 h post- fecundación (hpf)).

Los embriones se obtuvieron por apareamientos natural de los *zebrafish* adultos; tanto larvas como embriones fueron expuestos a un ciclo de luz/ oscuridad 14/10 a 28 °C en medio condicionado E3 y 50 ppb de azul de metileno como funguicida.

Los protocolos llevados a continuación están en regla con la guía de cuidado y mantenimiento de la organización internacional National Institutes of Health (N.I.H.). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional en el Cuidado de Animales de la Universidad Nacional de Quilmes (CE-UNQ 2/2014) (Buenos Aires, Argentina).

- *Incubación de los embriones*

Un huevo por pocillo en placa de 96 pocillos fue traspasado a 225 µl de medio E3 a 28 °C. A las 4 hpf se incubaron grupos de 24 pocillos con distintas diluciones de BSA NP llegando a concentraciones finales de 5,5; 0,5; 0,05 nM en cada pocillo. Se utilizan concentraciones subletales seleccionadas en base al estudio realizado en larvas. A modo de control se incubaron huevos con un 10 % del volumen final del pocillo de PBS 30 mM, pH 7,0.

- *Estudio de eclosión y mortalidad*

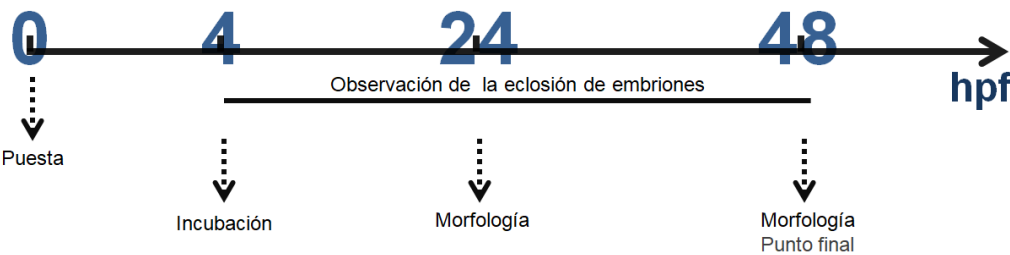
El desarrollo embrionario fue monitoreado desde las 4 a 48 hpf usando una lupa Nikon SMZ800. La eclosión fue observada a diferentes puntos: 36, 38, 39, 40, 41, 42, 45 y 48 hpf. Se determinó a su vez el porcentaje de viabilidad a las 48 hpf. Los puntos finales (Tabla 25) del embrión durante el ensayo fueron detectados a las 7, 24 y 48 hpf tal como se encuentra indicado en Girardi et al., 2017. Tanto a las 24 como 48 hps se estudiaron los cambios morfológicos (Esquema 29). La normalidad de los embriones se describió como la no detección de las malformaciones indicadas, su deceso se marcó al no detectar movimiento u opacidad en los tejidos. El embrión necrótico se removió a fin de no comprometer la integridad del resto del ensayo.

Los datos de eclosión fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías, seguido de un test de múltiples comparaciones (Dunnett's). Se utilizó para tal fin el software Prism GraphPad v. 5.0.

Tabla 25 Características de los embriones que se toman por punto final a causa de la toxicidad en los ensayos. Extraído y adaptado de Girardi et al., 2016

Punto final por Toxicidad	Período Gestacional (hpf)	
	24	48
Letal		
Coagulación	x	x
Desprendimiento de la cola	x	x
Latido cardíaco	x	x
Subletal		
Desarrollo de somitos	x	
Desarrollo de ojos	x	
Movimientos espontáneos	x	x
Circulación de la sangre	x	x
Eclosión		
Ritmo cardíaco		x
Teratogénesis		
Malformaciones	x	x

Ensayos en embrión Zebrafish (*D. rerio*)



Esquema 29 Diagrama del diseño experimental del ensayo realizado en embriones *zebrafish* (*D. rerio*).

Resultados y Discusión

En el ensayo de eclosión de los embriones, no se observaron diferencias entre los embriones incubados con la BSA NP con los embriones control (Figura 29). El perfil de eclosión se mantuvo en las diferentes diluciones; no se presenta adelanto o retraso a comparación con aquellos embriones sin tratar. En todos los casos, se alcanzó un porcentaje de embriones cercano al 80 %.

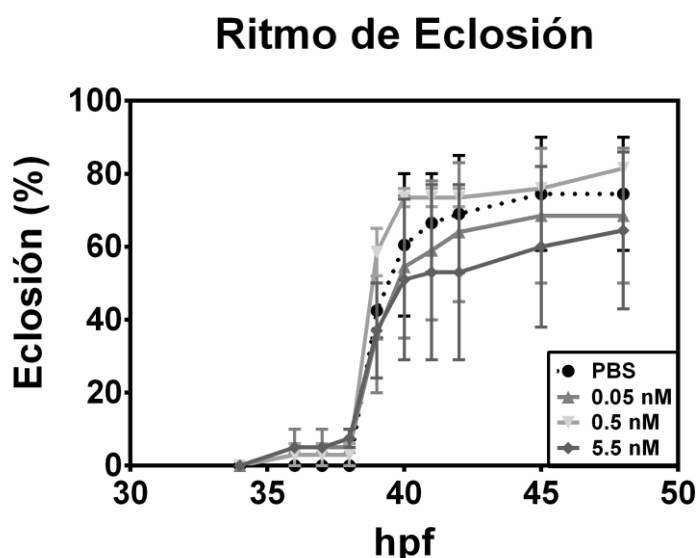


Figura 28 Se detalla el perfil de eclosión de los embriones *Zebrafish* (*D. rerio*) entre las 30 y 50 hpf bajo los distintos tratamientos.

Se observó además un porcentaje de mortalidad similar en los distintos grupos estudiados (Tabla 26). El máximo de mortalidad fue a las 24 hpf, manteniéndose constante a las 48 hpf. Por lo que menos del 15 % los embriones murió en las primeras 24 h del ensayo para todos los tratamientos. No se observaron malformaciones en los embriones tanto eclosionados como no eclosionados.

Tabla 26 Porcentaje de los embriones muertos a las 24 y 48 hpf en base a los tratamientos recibidos

hpf	PBS (%)	0,05 nM (%)	0,5 nM (%)	5,5 nM (%)
24	15,83 ± 1,17	10,66 ± 3,29	11,34 ± 3,75	6,50 ± 9,19
48	15,83 ± 1,17	10,66 ± 3,29	11,34 ± 3,75	6,50 ± 9,19

El ensayo de toxicidad teratogénica es reciente en cuanto al estudio para profundizar la toxicidad de las NPs biodegradables. Solamente se ha enfocado el estudio de la toxicidad en NP de quitosano (Wang et al., 2016; Yuan et al., 2016). En contraste con nuestra BSA NP, dichas NPs generaron un retraso en la eclosión de los embriones

concentración dependiente. También y a diferencia de lo observado en este trabajo, las NPs de quitosano generaron malformaciones en aquellos embriones eclosionados.

Varios estudios concuerdan en que la causa principal de la toxicidad de cualquier NP en este caso se debe al tiempo y la concentración de exposición en el embrión. Por lo tanto, estaría más relacionada con una respuesta inmune debido a la presencia de un cuerpo desconocido que al material del cual está hecha la NP. Todo esto genera un estrés fisiológico en el embrión, causando toxicidad (Wang et al., 2016). El diámetro de los poros del corión del embrión se encuentra en un rango entre los 400 – 700 nm, por lo que la BSA NP es capaz de atravesar dicha barrera durante la incubación y afectar al embrión de manera directa. Sin embargo, no se observa ningún cambio en los embriones tratados con la NP. Debido a esto, se sugieren dos posibilidades por las cuales no se observa embriotoxicidad:

(1) contrario a lo que sucede con las larvas, el embrión no es afectado por la BSA NP.

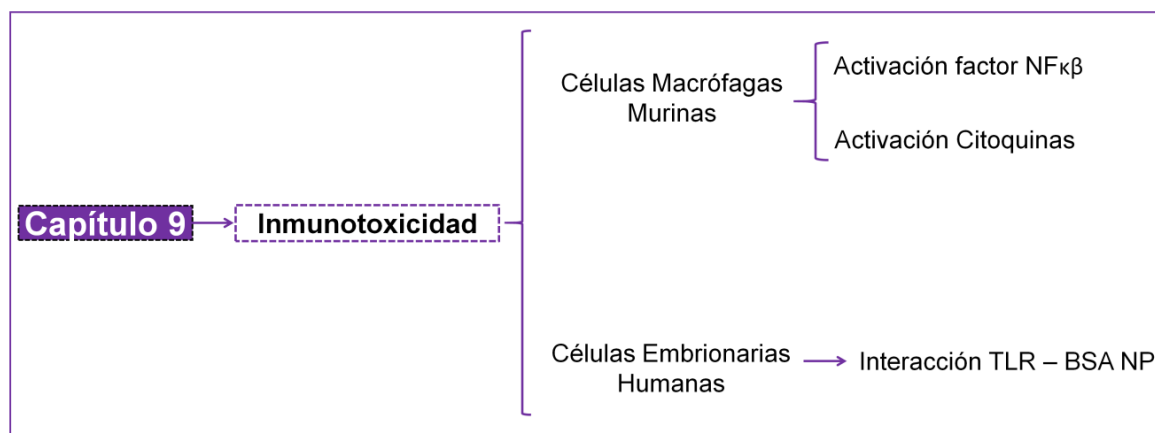
(2) las BSA NP se agregan entre sí en el medio en cual fueron incubadas por lo que no atravesarían el poro del corión, o simplemente no se agregan, pero quedan adheridas a este, no afectando así al embrión.

Conclusión

En base a los resultados obtenidos acerca de los ensayos de embriotoxicidad de las BSA NPs y su complejo en embriones *zebrafish* se concluye:

- La NP no presenta toxicidad alguna para los embriones ya que no se observa ningún indicio de teratogenicidad dentro de los ensayos llevados a cabo.

Capítulo 9: *Inmunotoxicidad de la nanopartícula de albúmina en células.*



Introducción

El estudio y las aplicaciones en el campo de la nanotecnología han crecido enormemente en años recientes. Las ventajas de los sistemas estudiados hacen que su uso, especialmente en medicina, incremente con los años (De Jong et al., 2008). Características como su gran habilidad para adsorber y encapsular sustancias, relación superficie/ masa, entre otras, es lo que las hacen atractivas para la nanomedicina (De Jong et al., 2008). Otras importantes características de estas tecnologías son:

- gran estabilidad,
- buena capacidad para ser transportador de drogas,
- capacidad para poder encapsular tanto drogas hidrofóbicas e hidrofílicas
- compatibilidad con diferentes rutas de aplicación (intravenosa, nasal, oral, etc.).

La gran mayoría de ellas son diseñadas para lograr una liberación de droga controlada en el sitio diana (Fadeel et al., 2010). Además, son útiles para reducir la toxicidad de la droga a incorporar.

La NPs pueden estar compuestas por material biológico como son: lípidos, fosfolípidos, proteínas, ácido láctico, entre otros o pueden manufacturarse con carbono, silica, polímeros y metales (De Jong et al., 2008). Con el desarrollo de nuevas NPs de diferentes materiales, aparecen nuevos potenciales tóxicos. Es por esto que es de gran importancia un estudio en detalle de cada NP desarrollada. Un entendimiento en detalle de cada NP, es necesario para saber qué factores influyen en su biocompatibilidad y toxicidad (Fadeel et al., 2010).

En lo que respecta al transporte de drogas, es tan importante saber cómo llega la NP al sitio diana como saber dónde va una vez que cumplió su función. De Jong et al., 2008, describió que el destino final de las NPs en la célula son lisosomas o endosomas. De su superficie y tamaño es que depende como es que son deshechadas. Por ejemplo, las NPs de oro recubiertas en PEG una vez dentro de la célula, son degradadas por la misma. Hay tres características importantes a estudiar en lo que respecta a la toxicidad de las NPs: dosis, estructura y tamaño.

El tamaño se ve afectado directamente por la relación superficie/masa, por lo que es responsable de la reactividad y característica química de la superficie. El tamaño puede ser decisivo cómo va a reaccionar un organismo frente a una nanopartícula. A modo de ejemplo: se sabe que las NPs de oro del tamaño de 35 nm no son tóxicas en modelo de ratón; y Gatto et al., 2014, sugiere que una medida importante para saber la dosis de la NP es el área superficial de esta.

No obstante, para saber de toxicidad, no es suficiente realizar estudios en tejidos celulares. En particular, los materiales son capaces de generar toxicidad en células de una manera directa o mediante estrés oxidativo o respuesta inflamatoria (Lozano-Fernández et al., 2014). Según el mismo autor, las NPs son incluso capaces de generar interacción y posiblemente toxicidad en el complemento, ocasionando así daño severo en todo el organismo.

El paso siguiente a la ingesta de partículas no es fácil de predecir. Nano y micropartículas pueden ser fagocitadas de diferente manera por células induciendo en ellas una respuesta inflamatoria. Incluso puede incrementar la respuesta inflamatoria e inmune por el sólo hecho de estar compuesto con un biomaterial. Esto último lo hacen mediante un efecto de tipo adyuvante, generando así un perfil inflamatorio (Nicolette et al., 2011). Las NPs son capaces de activar cualquiera de las siguientes vías de activación celular:

- Vía NF- κ B- dependiente: es necesario que la nanopartícula sea reconocida por la proteína de unión LPS, o que entre a la célula mediante el proceso de endocitosis. Esto causa la activación del TLR4, diferenciación en CD14 y MD-2, lo que activa el sistema inmune innato. Esto tendrá como resultado secreciones de citoquinas y quemoquinas (Lonez et al., 2012).
- Vía NF- κ B-independiente: Puede haber o no secreción de TNF- α o activación del factor transcripcional NF- κ B, causando una respuesta inflamatoria. Sin embargo,

puede ocurrir una activación de la cadena MAP- quinasa, lo que generaría una respuesta inmune. (Lonez et al., 2012)

- Vía Apoptótica: esta vía depende exclusivamente del tipo de célula que se trate, el tamaño de la NP y su concentración. Aquí se pueden activar diferentes vías de señalización, llegando hasta la apoptosis celular. Otras vías que tienen este fin son las dependientes de TLR4 o las proinflamatorias con reconocimiento de CD-4 (Lonez et al., 2012)
- Vía de los inflammasomas: se necesita la activación del sistema inmune por parte del reconocimiento de algún TLR para que esta vía se active. Una vez activada se generará la activación de un precursor de la IL-1 β . Luego se activarán las demás vías señalizadoras. (Lonez et al., 2012).

Esta parte del trabajo tiene como objetivo estudiar la respuesta inmune celular generada por la BSA NP. Se realizaron experimentos para estudiar las expresiones de las diferentes citoquinas de las cascadas de señalización. Este trabajo se realizó en colaboración financiada por el programa de becas Bec.AR, en el laboratorio del Dr. Jean – Marie Ruyschaert, SFMB en la Universidad Libre de Bruselas (ULB), Bruselas, Bélgica.

Materiales y Métodos

- *Ensayo en células macrófagas murinas RAW BLUE (RB)*

Las células se mantuvieron en medio DMEM 10 % SFB en estufa a 37 °C, con una inyección de CO₂ al 5%. Se repicaron cada tres días.

En rasgos generales, se sembraron células a una concentración 5 e05 por pocillo en una placa de 48 pocillos, 24 h antes del ensayo. Se realizaron incubaciones de 22 h de las diferentes muestras (BSA NP, BSA NP-Lyo, AF-BSA NP) a concentraciones crecientes en soluciones de 150 µl con medio completo. Al finalizar cada incubación, se removió el sobrenadante preservándolo para futuros ensayos y se realizó un ensayo de actividad metabólica celular (MTT) sobre las células restantes. A modo de control negativo se utilizó medio sin tratamiento y a modo de control positivo se utilizó LPS 100 µg/ml.

- *Ensayo de expresión de NFκB*

En una placa de 96 pocillos se incubaron 20 µl del sobrenadante de cada muestra con 180 µl del reactivo Quanti-Blue. Se incubó la placa durante una hora y luego se leyó en un lector de placa BioTek usando el programa Gen 5 Bio1.8 a 620 nm, normalizando los datos de la medida al control negativo (células sin tratar). Los datos fueron analizados y representados por el Software Excel v. 2015 y GraphPad Prism v 5.0.

- *Ensayo de actividad metabólica celular (MTT)*

Brevemente, luego de transcurrido el tiempo de incubación con el tratamiento, se incubó la misma placa con una dispersión de 0,2 mg/ml de MTT durante 120 m en oscuridad y en una estufa con inyección de CO₂. Pasada dicha incubación, se lava la placa por inversión y se la revela con 150 µl de DMSO, al cabo de 15 m se lee la placa en un lector para ELISA a 570 nm.

El ensayo de MTT en esta parte del trabajo fue utilizado para normalizar los valores obtenidos por el ensayo de expresión de NFκB, a fin de correlacionar la activación del factor de transcripción, de acuerdo a la cantidad de células vivas luego de cada tratamiento.

- *Ensayo de expresión de IL-6 e TNF - α*

En una placa de 96 pocillos para ELISA se llevó a cabo un ensayo de ELISA con 30 µl del sobrenadante de cada muestra. Brevemente, 24 h antes del ensayo se adhirieron el anticuerpo de captura a la placa de revelado de ELISA. Luego esta fue bloqueada con

una dispersión de BSA 1%, incubada por una hora a temperatura ambiente y lavado con cuidado post-incubación. La placa fue entonces incubada con 30 μ l de dispersión estándar y 30 μ l por pocillo del sobrenadante de cada muestra durante 2 h de incubación a temperatura ambiente. Luego de dos lavados consecutivos, 50 μ l del anticuerpo de detección fueron agregados por pocillo, seguido de una incubación de 2 h a temperatura ambiente. Post-incubación fueron agregados en cada pocillo 50 μ l de estreptoavidina – HRP e incubado en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 m. Luego se agregaron 50 μ l de la dispersión sustrato, seguida de una incubación en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 m. Por último, se incubó la placa con 30 μ l de la solución stop para luego medirla con un lector de placa BioTek mediante el programa Gen 5 Bio1.8 a 450 nm. Los datos fueron analizados y representados por el Software Excel v. 2015 y GraphPad Prism v 5.0. A modo de aclaración, para cada citoquina se realizó un ELISA diferente, con 30 μ l del sobrenadante del mismo utilizado en el ensayo de detección de NF κ B. Todos los ensayos fueron realizados como mínimo por duplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v 5.0.

- *Ensayo en células humanas HEK - 293*

Las células se mantuvieron en medio DMEM 10 % SFB en estufa a 37 °C, con una inyección de CO₂ al 5%. Se repicaron cada cuatro días. Cinco días antes de la estimulación de las células con las distintas muestras, se siembra en una placa de 96 pocillos un total de 1.5×10^5 células por pocillo. Este proceso se realiza con medio completo (DMEM + 10% SFB).

Transfección

Las células HEK – 293 ofrecen la ventaja de no contar con receptores Toll Like (TLR) que desencadenen cascadas de señalización inmunológica. Es por ello que se eligieron como blanco de transfección para poder sobreexpresar los receptores TLR – 2 y TLR – 4. Mientras que el primer receptor resulta promiscuo, pudiendo interactuar con todo tipo de moléculas desencadenando una respuesta inflamatoria, el segundo receptor, TLR – 4, interactúa específicamente con endotoxinas tales como LPS. El fin de este ensayo es poder caracterizar la activación de las NPs estudiadas en una línea celular humana, determinando su entrada a la célula.

La transfección de las células se realiza 48 h antes a la estimulación con las muestras: para ello se preparan dos soluciones con medio completo, cada una conteniendo TLR – 2 o TLR – 4 con su coreceptor MD – 2, ambos con la mezcla para transfección. Además,

la mezcla contaba con el gen constitutivo con Renilla (control positivo de la transfección), y el gen que codifica para NFκB con Luciferina (positivo para activación del receptor TL).

Estimulación y medición

Se estudiaron muestras de BSA, BSA NP, BSA NP- Lyo y AF BSA NP en este ensayo. Concentraciones crecientes de cada una de ellas fueron incubadas durante seis horas a 37 °C en una incubadora con inyección de CO₂. A modo de control negativo se utilizaron células incubadas con medio completo; como control positivo para TLR – 2 se utilizó PAM3CSK4, mientras que LPS sirvió de control positivo para TLR – 4.

Luego de la incubación, el sobrenadante fue descartado y las células fueron incubadas durante la noche a -20 °C con *buffer* de lisis. Las mediciones se realizaron en un luminómetro el día posterior en busca de señal tanto de Renilla (transfección exitosa), como de Luciferina (activación del receptor).

Los resultados fueron analizados utilizando el software Excel, en donde los valores de las señales de Luciferina fueron normalizados con aquellos de los obtenidos por Renilla. Estos valores fueron luego normalizados contra los valores pertenecientes al control negativo.

Todos los ensayos fueron realizados como mínimo por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v 5.0.

Resultados y Discusión

No se observaron diferencias en los resultados correspondientes a la expresión del factor de transcripción NFkB entre las muestras estudiadas (Figura 30a-b). No se presentaron diferencias significativas entre las muestras BSA, BSA NP y AF BSA NP (Figura 30a). Todas ellas presentan una respuesta inflamatoria concentración – dependiente entre 80 y 5,5 nM. A la mayor concentración estudiada la respuesta de BSA es el doble de activación de la expresión del factor de transcripción de las células control (células sin tratar).

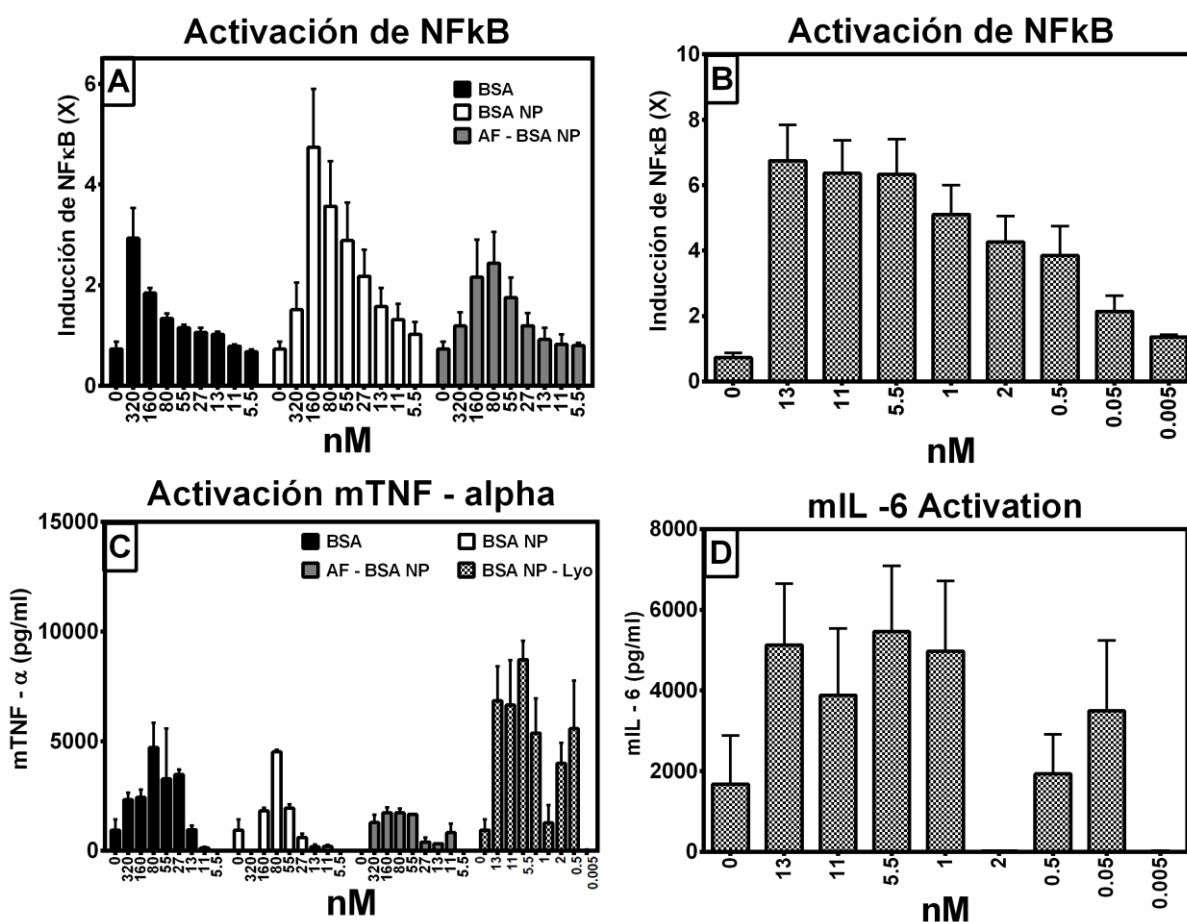


Figura 29 (a-b) Activación del factor de transcripción NFkB de células RAW – BLUE tratadas con (a) BSA, BSA NP y AF – BSA NP en soluciones 320 – 5.5 nM y (b) BSA NP – Lyo en soluciones 13 – 0.005 nM, durante 22 h. (c-d) Expresión de las citoquinas (a) mTNF – α y (b) mIL – 6 de las células RAW – BLUE tratadas con BSA, BSA NP y AF – BSA NP (en soluciones 320 – 5.5 nM) y BSA NP – Lyo en soluciones (13 – 0.005 nM), durante 22 h. La figura es representativa de un triplicado.

En cuanto a las células tratadas con BSA NP Lyo, no se observó una respuesta dosis – dependiente entre las concentraciones 80 – 5,5 nM, por lo que se estudiaron concentraciones más diluidas para poder observar dicha tendencia. Esta se alcanzó entre 13 – 0,005 nM, en donde se observa que la activación de NFkB cuadruplica los valores de las células sin tratar (Figura 30b).

A su vez, se estudió la expresión de diferentes citoquinas partícipes de la respuesta inmune celular: IL – 6 y TNF – α (Figura 30c-d). Dichas citoquinas dan idea sobre la magnitud de la toxicidad de las NPs como de las vías de defensa activadas por las células en respuesta a su interacción con las diferentes partículas a las cuales fueron expuestas.

Todas las células que fueron estudiadas para su expresión de TNF – α , independientemente del tratamiento, mostraron activación de la expresión de dicha citoquina (Figura 30c). Se esperaba una activación de TNF – α , ya que se encuentra en la misma cascada de señalización que NF κ B, la segunda depende de la primera. Contrario a esto, las células tratadas con BSA NP – Lyo son las únicas que presentaron activación de IL – 6 (Figura 30d).

Se estudió la interacción de las muestras con los receptores TLR – 2 y 4 (Figura 31). Mientras que el primero es de interacción específica con endotoxinas como LPS, TLR – 2 es promiscuo, interaccionando con varias moléculas para poder desencadenar las cascadas de señalización en las células. BSA, BSA NP y BSA NP – Lyo, activan ambos receptores, desencadenando la expresión de NF κ B, mientras que AF – BSA NP no activa ningún receptor (Figura 31a-b).

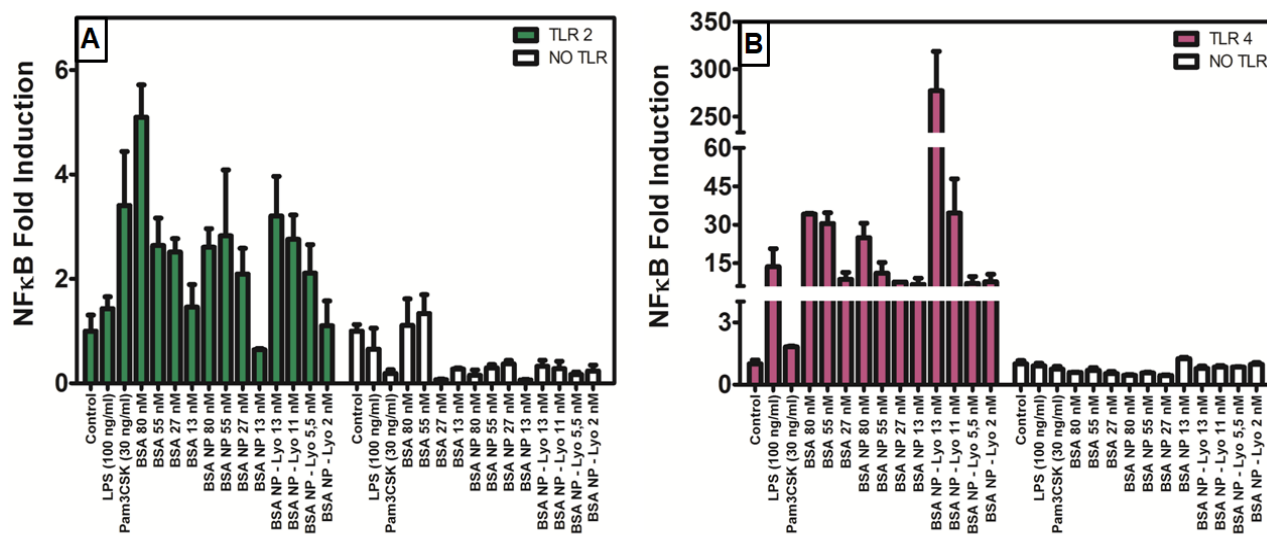


Figura 30 Activación del factor de transcripción NF κ B en células HEK transfectadas con receptores Toll – like 2 y 4. Las células fueron estimuladas con BSA, BSA NP y AF – BSA NP (en soluciones 320 – 5,5 nM) y BSA NP – Lyo (en soluciones 13 – 0,005 nM), durante 6 h. La activación del factor de transcripción representa la interacción de las nanopartículas con el receptor. La figura es representativa de un triplicado.

Las NPs pueden generar dos tipos de respuesta en el sistema inmune: (1) puede estimularlo (adyuvantes), o (2) pueden ser nocivas (Dobrovolskaia et al., 2007). Si bien aún no se entiende a que se debe la toxicidad inmune de la nueva generación de nanotecnología, se cree que tanto el tamaño como las características físico – químicas

de la superficie de micropartículas son los factores más importantes que impactan en sus propiedades inmunológicas.

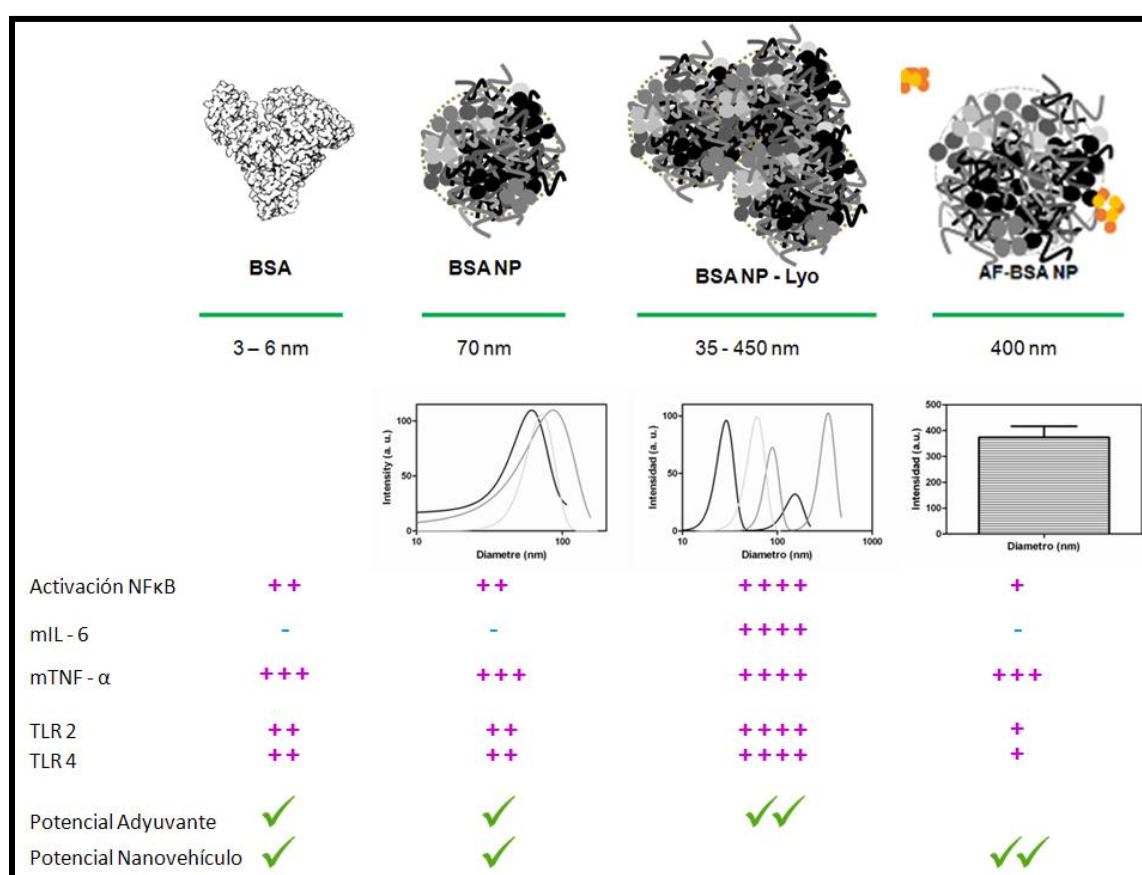
Las NPs pueden estimular o suprimir la respuesta inmune celular. De ello dependen varios factores: las proteínas que se adsorben a la superficie de la NP una vez en el organismo (opsonización) es un primer paso al reconocimiento de esta como foráneo al organismo. La naturaleza de la NP juega aquí un importante rol (Dobrovolskaia et al., 2007). Se espera entonces, que el nivel de respuesta celular en las células estimuladas con la BSA NP sea bajo, ya que su composición es de albúmina – proteína abundante en el plasma sanguíneo-.

Sin embargo, y de acuerdo con Wheeler et al., 2011, tratamientos con albúmina exógena, produce una respuesta pro – inflamatoria, generando expresión del factor de transcripción NFκB como resultado. Al estudiar nosotros la respuesta inmune de las células estimuladas por las diferentes muestras de BSA, monómero y NP, observamos variaciones en los resultados. La albúmina bovina tal como se ha descrito anteriormente (Wheeler et al., 2011), genera una respuesta pro – inflamatoria en forma dosis respuesta. La respuesta es similar a la alcanzada por las células estimuladas con la BSA NP de 70 nm de diámetro. La máxima concentración estudiada en ambos casos llega a generar el doble de respuesta inmune celular respecto de la basal. Sin embargo, lo que llama la atención es que en este caso no se cumple la regla en donde aparentemente, la respuesta inmune depende del tamaño de la partícula que interactúa con la célula (Esquema 30).

Caso contrario sucede con la BSA NP-Lyo, en donde los tamaños de NP varían entre el rango 35 – 400 nm. El tamaño de esta NP influye en la respuesta inmune celular: la BSA NP-Lyo presenta un mayor tamaño que la BSA NP, generando mayor respuesta inmune celular a concentraciones menores. En concentraciones en donde hay una respuesta dosis dependiente para la NP de 70 nm, hay una saturación en la estimulación con BSA NP – Lyo; su curva dosis – respuesta encontrándose entre 13 – 0,005 nM (Esquema 30).

El mecanismo por el cual se despierta la respuesta pro – inflamatoria celular no se entiende en detalle. Sin embargo, como ya se ha dicho anteriormente, la superficie con sus propiedades físico – químicas y el tamaño de las NP a testear son los principales actores a estudiar. El hecho de que no haya una serie de ensayos estipulados para estudiar la toxicidad inmune de los sistemas, hace que se deba alterar una variable por vez para poder tener un mejor entendimiento de lo que verdaderamente está pasando con la NP (Dobrovolskaia et al., 2007). En un primer momento, al alterar el tamaño de la

BSA NP por medio de la liofilización, se observó que la respuesta inmune celular incrementaba al estimular las células con NPs hasta un máximo de 400 nm de diámetro. Al preparar la BSA NP con ácido fólico en su composición, y al incrementar el tamaño de esta a 400 nm, se esperaba que la respuesta pro – inflamatoria fuese similar a aquella obtenida por BSA NP – Lyo. Sin embargo, disminuye la respuesta inmune celular generada, incluso con valores por debajo del basal. Por ello, se cree se debe al ácido fólico expuesto hacia la superficie de la AF-BSA NP; el ácido fólico actúa como ligando de macrófagos (Puligujja et al., 2013), por lo que al reconocer dicha molécula en la NP, esta pasa a ser algo conocido para la célula inmune, sin generar una respuesta pro – inflamatoria (Esquema 30).



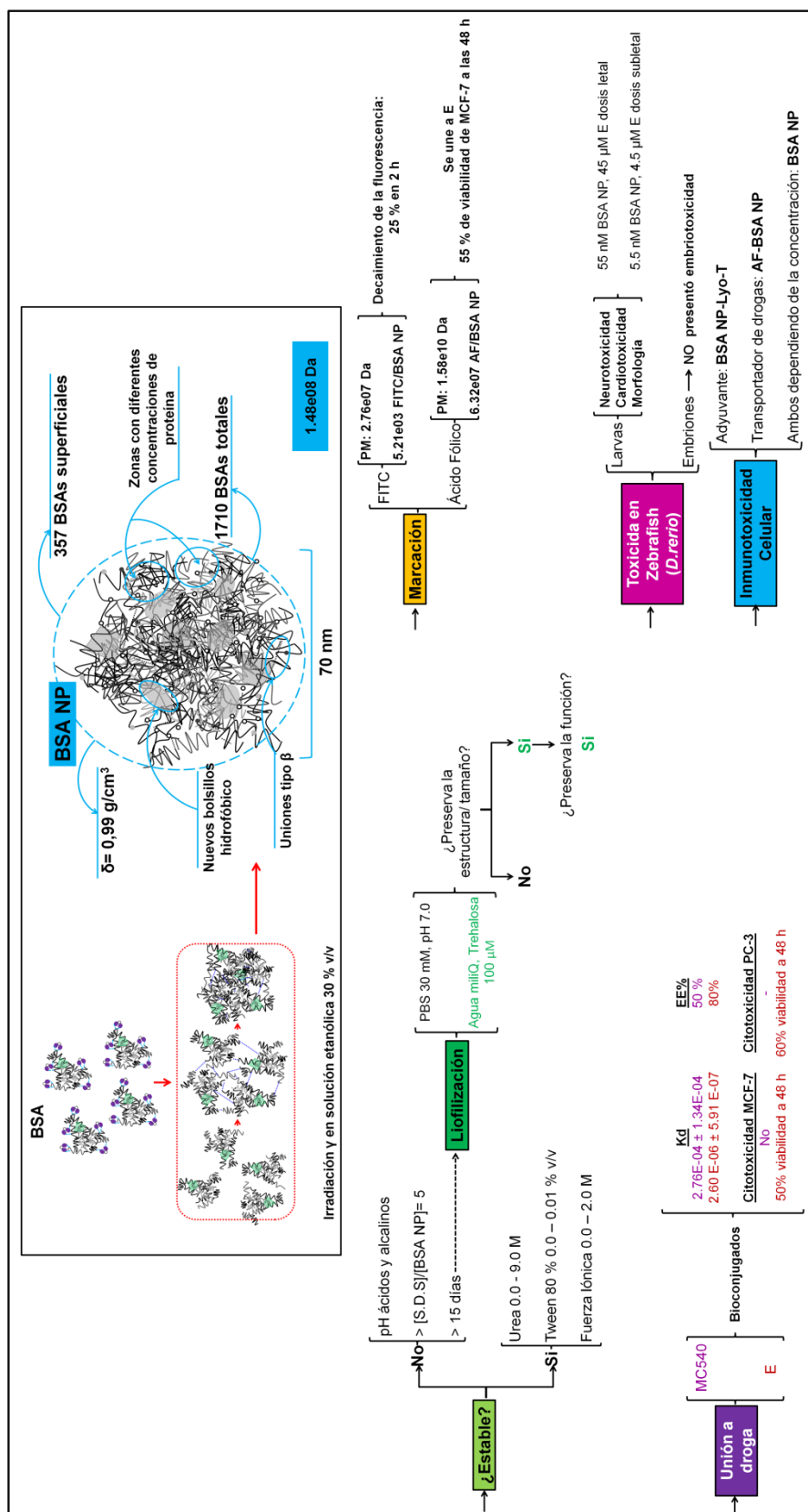
Esquema 30 Resumen gráfico de lo obtenido mediante los ensayos de respuesta celular inmune sobre células macrófagos murinas RAW – BLUE y células de riñón humanas HEK, estimuladas con las diferentes nanopartículas. La figura resume los resultados obtenidos en las figuras 45 – 47.

Conclusión

En base a los resultados obtenidos acerca de los ensayos de inmunotoxicidad celular de las BSA NPs se concluye:

- Dependiendo del tipo de BSA NP estudiada en este trabajo, se sugiere un destino diferente para cada partícula. La BSA NP-Lyo debido a la activación de la respuesta inmune obtenida sería útil como adyuvante. Si lo que se busca es una NP que actúe como vehículo en un sistema de transporte de drogas inocuo y dirigido, entonces la AF – BSA NP sería una buena opción.
- El uso que se le dé a la BSA NP dependerá enteramente de la concentración de la dispersión que se utilice. Grandes concentraciones podrían ayudar a la estimulación del sistema inmune, mientras que concentraciones de la BSA NP por debajo de 27 nM serían útiles a la hora de utilizar la NP como vehículo en un sistema transportador de drogas.

Resumen de Resultados



Característica	Metodología	Resultado
Rendimiento del proceso de obtención	Columna cromatográfica	80%
Forma	Microscopia	Esférica, con bordes definidos y superficie heterogénea
Diámetro y Potencial Z	D.L.S y Potencial Z	70 nm; -25 mV
Densidad en solución / Densidad en base seca	Calculo experimental mediante pesada / Cálculo teórico	0,99 g/cm ³ / 0,01 g/cm ³
Peso Molecular	Calculo experimental, modelo de Bravais	115,23 Mda
Cantidad de albúminas/ NP	Cálculo Teórico	1710
Cantidad de albúminas superficiales	Cálculo Teórico: Modelo en la cápside viral icosaedrica	357
Ensamblado de la NP	SDS-PAGE / FT-IR/ Caracterización de Superficie	La BSA NP esta compuesta por dos capas una externa y otra interna con distintos tipos de fuerza uniendo a las moléculas de albúmina entre sí. Las interacciones intermoleculares albúmina-albúmina están dadas por estructuras tipo lámina β (un 22 % de la estructura de la NP responde a esta estructura) y por puentes disulfuro y reorganización de grupos funcionales (-SH, -NH y -CO)
Estructura de la albúmina en la NP	Caracterización biofísica	La BSA NP cuenta con un porcentaje de albúminas con estructura alterada. Dentro de las principales alteraciones de estructura se encuentran: un ambiente del bolsillo en donde se sitúa el Trp más hidrofóbico, el bolsillo donde se encuentran las Tyr bloqueada. Además la NP presenta nuevos bolsillos hidrofóbicos producto de la formación de la NP, útiles para interactuar con las drogas.
Estabilidad de la NP	pH, agentes caotropos, fuerza iónica, tiempo	La BSA NP es no estable a los cambios de pH, estable en soluciones de Tween 80 % (hasta 0.01 % v/v), urea (hasta 9 M). No es estable en presencia de SDS. Presenta estabilidad en soluciones de gran fuerza iónica (2 M). Presenta un aumento de tamaño debido a la agregación entre NP a partir de los 15 días de almacenamiento en PBS 30 mM, pH 7.00 a 5 °C.
Citotóxicidad	MTT, LDH y Cristal Violeta en células MCF - 7 y PC -3	La BSA NP unida al E presenta una viabilidad celular en ambas líneas celulares entre el 50 % y el 60 % a las 48 h. Por sí misma no presenta efecto citotóxico al igual que unida a la MC540.
Toxicidad <i>in vivo</i>	Larvas zebrafish: neurotoxicidad, cardiotoxicidad, viabilidad, malformaciones	Las concentraciones de BSA NP de 5,5 y 0,55 nM si bien resultaron tóxicas para las larvas, son subletales ya que presentan alteraciones morfológicas mayormente. La concentración de NP 55 nM resultó letalmente tóxica.
Toxicidad <i>in vivo</i>	Embriones zebrafish: Ritmo de eclosión	Las concentraciones de BSA NP estudiadas (5,5 - 0,05 nM) no presentaron efecto teratogénico en los embriones zebrafish.
Inmunotoxicidad	Expresión NF κ B/ Interacción con TLR 2 y 4	La BSA NP presentó la misma inmunotoxicidad en células macrófagos murinas que la albúmina en estado molecular. Sin embargo, al aumentar su tamaño, aumentó considerablemente su efecto inmunotóxico. Al marcarla con AF, no presentó respuesta inmune celular. La BSA NP interactuó tanto con el TLR 2 como el TLR 4 en células HEK-293

Conclusiones Generales

Luego de todos los datos obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación acerca de la BSA NP. Se concluye:

- El proceso de formación de la NP por desolvatación etanólica e irradiación es un proceso aleatorio, en donde las moléculas de BSA se unen creando diferentes agregados esféricos de proteína, que alteran parcialmente la estructura secundaria de algunas de las proteínas que la conforman.
- La BSA NP obtenida es una entidad independiente de la BSA con una estructura esferoide con superficie heterogénea con un diámetro hidrodinámico de 70 nm. La organización de las proteínas está integrada por regiones de mayor y menor agregados de proteína, sugiriendo que si bien se trata de una esfera rígida, la disposición espacial de sus agregados y monómeros varía entre compacto y laxo, respondiendo a una unidad de celda primitiva centrada en las caras. De esta manera, y contando con datos teóricos y experimentales de la densidad de la NP, se estimó la masa molecular de la NP (115,23 MDa) y luego la concentración de las soluciones de NPs utilizadas.
- Al estudiar la estabilidad de la BSA NP se resalta la evidencia experimental obtenida por cinéticas de desnaturalización en presencia de caótropos de donde se infiere una NP con un agregado compacto de albúmina compuesto con un centro de albúmina fuertemente unido y una capa externa en donde las moléculas están débilmente unidas.
- La BSA NP demostró tener potencial como nanovehículo transportador de drogas al tener gran afinidad por el E y MC540. Durante la formación de esta se generaron nuevos bolsillos hidrofóbicos para la interacción con drogas. La BSA NP preserva el perfil de liberación cinética de las drogas de la BSA: no pierde su función como transportador de drogas.
- La BSA NP no es tóxica para las células MCF-7 y PC-3, pero unida al E logra alcanzar un 50 % de viabilidad celular en las líneas tumorales humanas estudiadas.
- Los ensayos en el modelo in vivo *Zebrafish* demostró que a concentraciones inferiores a 4,5 nM de BSA NP las larvas presentan toxicidad en forma de alteraciones morfológicas, mientras que soluciones de 45 nM le son letales. Sin embargo, no se observó un efecto teratogénico por parte de la NP en embriones *Zebrafish* incubados a concentraciones subletales.

- El carácter inmunogénico de la BSA NP es concentración dependiente, con un perfil de comportamiento similar a la BSA.

Perspectivas a futuro

Para poder proponer la aplicación de la BSA NP en un futuro, se recomiendan a continuación distintos pasos a seguir para poder continuar su caracterización.

En primer lugar, se sugiere caracterizar el mecanismo de entrada a la célula de la BSA NP. Lo obtenido en esta fase aportará información útil en el entendimiento del comportamiento del nanovehículo. Ensayos en líneas no tumorales también se aconseja para poder saber experimentalmente el posible efecto de la BSA NP sobre estos tejidos.

En segundo lugar, se sugiere un estudio de mayor profundidad sobre la toxicidad generada por la BSA NP en el modelo *in vivo* Zebrafish. Teniendo conocimiento sobre en qué daña la NP al organismo, se podría mejorar mediante técnicas de la biofísica con el fin de disminuir sus efectos tóxicos. Ensayos sobre cortes histológicos con tinción hematoxilina y eosina permitirían el estudio a nivel celular de los diferentes tejidos en la larva, encontrando así el tejido con mayor daño por la NP. La tinción con los colorantes *alcian blue* y naranja de acridina permitirían una rápida observación en el desarrollo de los cartílagos y muerte celular sobre la larva, respectivamente.

En tercer lugar, se sugiere continuar el estudio de la NP continuar con un ensayo de toxicidad sobre un organismo complejo como son los ratones. Esto permitirá comprobar lo estudiado en los ensayos de respuesta inmune celular y se obtendrá un resultado más cercano a la realidad de la NP una vez en un organismo complejo. De no generar una respuesta inmune elevada, se sugiere un ensayo de biodistribución *in vivo* en modelo murino. La observación del órgano preferido por la NP permitirá realizarle modificaciones a ésta de ser necesario para que así vaya a donde se desea.

Por último, se sugiere un estudio sobre la acción del sistema propuesto *in vivo* en el modelo murino. Es decir, se sugiere un estudio sobre cómo el sistema BSA NP-DAT afectaría al crecimiento de un tumor de tejido mamario o de próstata en un modelo murino. De esta manera se podrá concluir verdaderamente acerca del potencial del sistema como un sistema transportador de drogas farmacéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos que vienen a continuación están escritos de la manera más personal que encontré. Intenté no extenderme para no aburrir. Sin embargo, la *muchosidad* de esta tesis recae pura y exclusivamente en las personas que me ayudaron y acompañaron a lo largo de estos 4 años, por lo que las palabras escritas a continuación son solo una porción de todo lo que tengo para decir.

Antes que nada, quisiera agradecerle al grupo de jurado por tomarse el tiempo en leer la tesis. Espero que haya sido fácil de leer y de su agrado.

Muchas gracias a la Dra. Silvia Alonso por confiar en mí para este proyecto, dándome no sólo un lugar en el Laboratorio, pero también oportunidades para poder crecer profesionalmente.

A todos los que trabajan en el LBM, o el “labo”: investigadores, becarios y seminaristas. Fueron 6 años en los que crecí y me formé como profesional... muchas gracias por formar parte de todo ese recorrido. Nanu y Jime gracias por extenderme una mano cuando se pidió.

A las becarias de la oficina del fondo: Caro, Dani y Dani... muchas gracias especialmente por bancarse los mates, la música (que todos sabemos es fantástica), los descargos y mis cantos. Perdón por los monólogos de libros que hice a lo largo de los años... sigan leyendo, es bueno saber “nada de nada” de vez en cuando, es mucho muy importante.

A los laboratorios chapulines que siempre que sucumbí ante la desesperación científica me han ayudado con mates, consejos, ideas, técnicas, equipos... y música bizarra: LaMaBio, Crono y Onco. Infinitas gracias por todo. En varias ocasiones fueron el Profesor Locovich de mi Pierre.

A mi profesora de inglés Lau. Gracias por enseñarme más sobre el inglés académico y general: el Darcy de los idiomas para mí. *Why, my dear Algy! You can keep my box of cigars!*

A mis amigos facultativos, de la carrera y de la ciencia: Nati Lu, Roma, Hec, Mati, Jose, Charly, Tade, Nico, Fatty, Nuni, Tefo, el Negro, Maju y Ceci. Siempre me dieron una mano y prestaron una oreja independientemente del lugar del mundo en donde cada uno se encontraba. Gracias por ser tan nerds como yo y querer conquistar el mundo siempre. Son el Zooey de mi Franny.

A mis amigas bernalessas: Ani, Flaca, Gabita y Sam. Qué lindo es reírme con ustedes! Gracias por haber sido cuando lo necesité la Mary Poppins de mi Mr. Banks.

Al resu desde sus comienzos hasta el día de hoy, son el grupo de personas más inadaptado socialmente y el puño más lindo... gracias por eso y por ser siempre mi fiesta del no cumpleaños de las 5 de la tarde.

A Micu, Myr y Panchi, la palabra gracias es una palabra de tamaño nano para ustedes, pero igual... gracias. Somos infinito.

A toda mi familia, empezando por mi papá y hermano, hasta los amigos que se convirtieron en hermanos. Fueron mi motor y empuje central. Gracias por no dejarme bajar los brazos. Si los tendrían que identificar con algún personaje de libro serían un híbrido entre Dumbledore y Dobby... les juro que es como un montón!

También quisiera agradecer a todos los libros y a toda la música que me acompañó en esta aventura. Fueron muchos, y fueron los que ayudaron a moldear esta cabecita llena de ciencia, banalidades, delirios y todas las cosas que no ocupan lugar.

“No eres como los demás. Y he visto a muchos, y los conozco. Cuando hablo tú me miras. Anoche, cuando dije algo acerca de la luna, tú miraste hacia la luna. Los demás nunca harían algo así. Los demás me dejarían hablando sola o me amenazarían. Ahora nadie tiene tiempo para nadie”. — {*Fahrenheit 451*, Ray Bradbury. 1951, Simon and Schuster Paperbacks. New York}

Bibliografía General

- ACHILLI, E., CASAJUS, G., SIRI, M., FLORES, C., KADŁUBOWSKI, S., ALONSO, S. D. V., & GRASSELLI, M. (2015). PREPARATION OF PROTEIN NANOPARTICLE BY DYNAMIC AGGREGATION AND IONIZING-INDUCED CROSSLINKING. *COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS*, 486, 161-171.
- ALAM, N., DUBEY, R. D., KUMAR, A., KOUL, M., SHARMA, N., SHARMA, P. R., ... & GUPTA, P. N. (2015). REDUCED TOXICOLOGICAL MANIFESTATIONS OF CISPLATIN FOLLOWING ENCAPSULATION IN FOLATE GRAFTED ALBUMIN NANOPARTICLES. *LIFE SCIENCES*, 142, 76-85.
- ANJOMSHOA, M., & TORKZADEH-MAHANI, M. (2015). IN VITRO DNA AND BSA-BINDING, CELL IMAGING AND ANTICANCER ACTIVITY AGAINST HUMAN CARCINOMA CELL LINES OF MIXED LIGAND COPPER (II) COMPLEXES. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 150, 390-402.
- ARAKAWA, T., & KITA, Y. (2000). PROTECTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN FROM AGGREGATION BY TWEEN 80. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 89(5), 646-651.
- ARAVIND, A., JEYAMOHAN, P., NAIR, R., VEERANARAYANAN, S., NAGAOKA, Y., YOSHIDA, Y., ... & KUMAR, D. S. (2012). AS1411 APTAMER TAGGED PLGA-LECITHIN-PEG NANOPARTICLES FOR TUMOR CELL TARGETING AND DRUG DELIVERY. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 109(11), 2920-2931.
- BANERJEE, M., PAL, U., SUBUDHHI, A., CHAKRABARTI, A., & BASU, S. (2012). INTERACTION OF MEROCYANINE 540 WITH SERUM ALBUMINS: PHOTOPHYSICAL AND BINDING STUDIES. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY*, 108, 23-33.
- BARBOSA, L. R., ORTORE, M. G., SPINOZZI, F., MARIANI, P., BERNSTORFF, S., & ITRI, R. (2010). THE IMPORTANCE OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS ON THE PH-INDUCED CONFORMATIONAL CHANGES OF BOVINE SERUM ALBUMIN: A SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING STUDY. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 98(1), 147-157.
- BAR-ILAN, O., LOUIS, K. M., YANG, S. P., PEDERSEN, J. A., HAMERS, R. J., PETERSON, R. E., & HEIDEMAN, W. (2012). TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES PRODUCE PHOTOTOXICITY IN THE DEVELOPING ZEBRAFISH. *NANOTOXICOLOGY*, 6(6), 670-679.
- BERGHMANS, S., BARROS, T., GOLDER, Z., GARDNER, I., BUTLER, P., HILL, A., ... & ROACH, A. (2008). ZEBRAFISH: THE FUTURE OF IN VIVO SAFETY PHARMACOLOGY SCREENING. *JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS*, 58(2), 177-178.
- BLASER, R. E., KOID, A., & POLINER, R. M. (2010). CONTEXT-DEPENDENT SENSITIZATION TO ETHANOL IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*). *PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR*, 95(3), 278-284.
- BODE, C., TROJAN, L., WEISS, C., KRAENZLIN, B., MICHAELIS, U., TEIFEL, M., ... & MICHEL, M. S. (2009). PACLITAXEL ENCAPSULATED IN CATIONIC LIPOSOMES: A NEW OPTION FOR NEOVASCULAR TARGETING FOR THE TREATMENT OF PROSTATE CANCER. *ONCOLOGY REPORTS*, 22(2), 321-326.

- BOURASSA, P., HASNI, I., & TAJMIR-RIAH, H. A. (2011). FOLIC ACID COMPLEXES WITH HUMAN AND BOVINE SERUM ALBUMINS. *FOOD CHEMISTRY*, 129(3), 1148-1155.
- BUSS, H., CHAN, T. P., SLUIS, K. B., DOMIGAN, N. M., & WINTERBOURN, C. C. (1997). PROTEIN CARBONYL MEASUREMENT BY A SENSITIVE ELISA METHOD. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 23(3), 361-366.
- BYEON, H. J., LEE, C., LEE, S., LEE, E. S., CHOI, H. G., PARK, E. S., & YOUN, Y. S. (2016). PHARMACEUTICAL POTENTIAL OF TACROLIMUS-LOADED ALBUMIN NANOPARTICLES HAVING TARGETABILITY TO RHEUMATOID ARTHRITIS TISSUES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 497(1), 268-276.
- CARTER, D. C., & HO, J. X. (1994). STRUCTURE OF SERUM ALBUMIN. *ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY*, 45, 153-203.
- CASPAR, D. L. D. (1956). STRUCTURE OF BUSHY STUNT VIRUS. *NATURE*, 177, 475-6.
- CASPAR, D. L., & KLUG, A. (1962, JANUARY). PHYSICAL PRINCIPLES IN THE CONSTRUCTION OF REGULAR VIRUSES. IN *COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY* (VOL. 27, PP. 1-24). COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS.
- CHAKRABORTY, C., HU, C. H., WEN, Z. H., LIN, C. S., & AGORAMOORTHY, G. (2009). ZEBRAFISH: A COMPLETE ANIMAL MODEL FOR IN VIVO DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT. *CURRENT DRUG METABOLISM*, 10(2), 116-124.
- CHANG, L. L., SHEPHERD, D., SUN, J., TANG, X. C., & PIKAL, M. J. (2005). EFFECT OF SORBITOL AND RESIDUAL MOISTURE ON THE STABILITY OF LYOPHILIZED ANTIBODIES: IMPLICATIONS FOR THE MECHANISM OF PROTEIN STABILIZATION IN THE SOLID STATE. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 94(7), 1445-1455.
- CHEEMA, S. K., GOBIN, A. S., RHEA, R., LOPEZ-BERESTEIN, G., NEWMAN, R. A., & MATHUR, A. B. (2007). SILK FIBROIN MEDIATED DELIVERY OF LIPOSOMAL EMODIN TO BREAST CANCER CELLS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 341(1), 221-229.
- CHEN, R. F., & EDELHOCH, H. (EDS.). (1975). *BIOCHEMICAL FLUORESCENCE: CONCEPTS* (VOL. 2). M. DEKKER.
- CHEN, S. H., LIN, K. Y., CHANG, C. C., FANG, C. L., & LIN, C. P. (2007). ALOE-EMODIN-INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN GASTRIC CARCINOMA CELLS. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 45(11), 2296-2303.
- CHEN, Y. C., SHEN, S. C., LEE, W. R., HU, F. L., LIN, H. Y., KO, C. H., & TSENG, S. W. (2002). EMODIN INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN PROMYELOLEUKEMIC HL-60 CELLS ACCOMPANIED BY ACTIVATION OF CASPASE 3 CASCADE BUT INDEPENDENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY*, 64(12), 1713-1724.
- CHIB, R., BUTLER, S., RAUT, S., SHAH, S., BOREJDO, J., GRZYCZYNSKI, Z., & GRZYCZYNSKI, I. (2015). EFFECT OF QUENCHER, DENATURANTS, TEMPERATURE AND pH ON THE FLUORESCENT PROPERTIES OF BSA PROTECTED GOLD NANOCCLUSERS. *JOURNAL OF LUMINESCENCE*, 168, 62-68.
- CHO, K., WANG, X. U., NIE, S., & SHIN, D. M. (2008). THERAPEUTIC NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY IN CANCER. *CLINICAL CANCER RESEARCH*, 14(5), 1310-1316.

- CHRISTIAN, P., VON DER KAMMER, F., BAALOUSHA, M., & HOFMANN, T. (2008). NANOPARTICLES: STRUCTURE, PROPERTIES, PREPARATION AND BEHAVIOUR IN ENVIRONMENTAL MEDIA. *ECOTOXICOLOGY*, 17(5), 326-343.
- CHUN-GUANG, W., JUN-QING, Y., BEI-ZHONG, L., DAN-TING, J., CHONG, W., LIANG, Z., ... & YAN, W. (2010). ANTI-TUMOR ACTIVITY OF EMODIN AGAINST HUMAN CHRONIC MYELOCYTIC LEUKEMIA K562 CELL LINES IN VITRO AND IN VIVO. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 627(1), 33-41.
- COLWILL, R. M., & CRETON, R. (2011). LOCOMOTOR BEHAVIORS IN ZEBRAFISH (DANIO RERIO) LARVAE. *BEHAVIOURAL PROCESSES*, 86(2), 222-229.
- COSTANTINO, H. R., FIROUZABADIAN, L., WU, C., CARRASQUILLO, K. G., GRIEBENOW, K., ZALE, S. E., & TRACY, M. A. (2002). PROTEIN SPRAY FREEZE DRYING. 2. EFFECT OF FORMULATION VARIABLES ON PARTICLE SIZE AND STABILITY. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 91(2), 388-395.
- CRICK, F. H. C., & WATSON, J. D. (1957). VIRUS STRUCTURE: GENERAL PRINCIPLES. *THE NATURE OF VIRUSES*, 5.
- CRICK, F. H., & WATSON, J. D. (1956). STRUCTURE OF SMALL VIRUSES. *NATURE*, 177, 473-5.
- CUI, W., WANG, A., ZHAO, J., YANG, X., CAI, P., & LI, J. (2016). LAYER BY LAYER ASSEMBLY OF ALBUMIN NANOPARTICLES WITH SELECTIVE RECOGNITION OF TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND (TRAIL). *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, 465, 11-17.
- DANIELSON, B. G. (2004). STRUCTURE, CHEMISTRY, AND PHARMACOKINETICS OF INTRAVENOUS IRON AGENTS. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY*, 15(SUPPL 2), S93-S98.
- DAUM, N., TSCHEKA, C., NEUMEYER, A., & SCHNEIDER, M. (2012). NOVEL APPROACHES FOR DRUG DELIVERY SYSTEMS IN NANOMEDICINE: EFFECTS OF PARTICLE DESIGN AND SHAPE. *WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS: NANOMEDICINE AND NANOBIO TECHNOLOGY*, 4(1), 52-65.
- DAVIES, K. J. (1987). PROTEIN DAMAGE AND DEGRADATION BY OXYGEN RADICALS. I. GENERAL ASPECTS. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 262(20), 9895-9901.
- DAVIES, K. J., & DELSIGNORE, M. E. (1987). PROTEIN DAMAGE AND DEGRADATION BY OXYGEN RADICALS. III. MODIFICATION OF SECONDARY AND TERTIARY STRUCTURE. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 262(20), 9908-9913.
- DAVIES, K. J., DELSIGNORE, M. E., & LIN, S. W. (1987). PROTEIN DAMAGE AND DEGRADATION BY OXYGEN RADICALS. II. MODIFICATION OF AMINO ACIDS. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 262(20), 9902-9907.
- DAVIES, K. J., LIN, S., & PACIFICI, R. E. (1987). PROTEIN DAMAGE AND DEGRADATION BY OXYGEN RADICALS. IV. DEGRADATION OF DENATURED PROTEIN. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 262(20), 9914-9920.
- DAVIS, S. S. (ED.). (1984). *MICROSPHERES AND DRUG THERAPY: PHARMACEUTICAL, IMMUNOLOGICAL, AND MEDICAL ASPECTS*. ELSEVIER PUBLISHING COMPANY.

- DE ESCH, C., VAN DER LINDE, H., SLIEKER, R., WILLEMSSEN, R., WOLTERBEEK, A., WOUTERSEN, R., & DE GROOT, D. (2012). LOCOMOTOR ACTIVITY ASSAY IN ZEBRAFISH LARVAE: INFLUENCE OF AGE, STRAIN AND ETHANOL. *NEUROTOXICOLOGY AND TERATOLOGY*, 34(4), 425-433.
- DE JONG, W. H., & BORM, P. J. (2008). DRUG DELIVERY AND NANOPARTICLES: APPLICATIONS AND HAZARDS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE*, 3(2), 133.
- DESAI N, TRIEU V, YANG A, *ET AL*. ENHANCED EFFICACY AND SAFETY OF NANOPARTICLE ALBUMIN-BOUND NAB-DOCETAXEL VERSUS TAXOTERE. *CANCER RESEARCH* 2006; 66(8 SUPPLEMENT): 1277-1278.
- DESAI, N. (2007). NANOPARTICLE ALBUMIN BOUND (NAB) TECHNOLOGY: TARGETING TUMORS THROUGH THE ENDOTHELIAL GP60 RECEPTOR AND SPARC. *NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE*, 3(4), 339.
- DOBROVOLSKAIA, M. A., & MCNEIL, S. E. (2007). IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF ENGINEERED NANOMATERIALS. *NATURE NANOTECHNOLOGY*, 2(8), 469-478.
- DU, C., DENG, D., SHAN, L., WAN, S., CAO, J., TIAN, J., ... & GU, Y. (2013). A PH-SENSITIVE DOXORUBICIN PRODRUG BASED ON FOLATE-CONJUGATED BSA FOR TUMOR-TARGETED DRUG DELIVERY. *BIOMATERIALS*, 34(12), 3087-3097.
- EFTINK, M. R. (1991). FLUORESCENCE QUENCHING REACTIONS. IN *BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY* (PP. 1-41). SPRINGER US.
- ELLMAN, G. L. (1959). TISSUE SULFHYDRYL GROUPS. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 82(1), 70-77.
- ELZOGHBY, A. O., SAMY, W. M., & ELGINDY, N. A. (2012). ALBUMIN-BASED NANOPARTICLES AS POTENTIAL CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 157(2), 168-182.
- ERICKSON, H. P. (2009). SIZE AND SHAPE OF PROTEIN MOLECULES AT THE NANOMETER LEVEL DETERMINED BY SEDIMENTATION, GEL FILTRATION, AND ELECTRON MICROSCOPY. *BIOLOGICAL PROCEDURES ONLINE*, 11(1), 32.
- ESPINOZA, S. L. S., SÁNCHEZ, M. L., RISSO, V., SMOLKO, E. E., & GRASSELLI, M. (2012). RADIATION SYNTHESIS OF SEROALBUMIN NANOPARTICLES. *RADIATION PHYSICS AND CHEMISTRY*, 81(9), 1417-1421.
- FADEEL, B., & GARCIA-BENNETT, A. E. (2010). BETTER SAFE THAN SORRY: UNDERSTANDING THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF INORGANIC NANOPARTICLES MANUFACTURED FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 62(3), 362-374.
- FAKO, V. E., & FURGESON, D. Y. (2009). ZEBRAFISH AS A CORRELATIVE AND PREDICTIVE MODEL FOR ASSESSING BIOMATERIAL NANOTOXICITY. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 61(6), 478-486.
- FENG, Y., HUANG, S. L., DOU, W., ZHANG, S., CHEN, J. H., SHEN, Y., ... & LENG, Y. (2010). EMODIN, A NATURAL PRODUCT, SELECTIVELY INHIBITS 11B-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE TYPE 1 AND AMELIORATES METABOLIC DISORDER IN DIET-INDUCED OBESE MICE. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 161(1), 113-126.

- FERREIRA, A. J., CEMLYN-JONES, J., & CORDEIRO, C. R. (2013). NANOPARTICLES, NANOTECHNOLOGY AND PULMONARY NANOTOXICOLOGY. *REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA (ENGLISH EDITION)*, 19(1), 28-37.
- FIELDS, R. (1972). [38] THE RAPID DETERMINATION OF AMINO GROUPS WITH TNBS. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 25, 464-468.
- FIGGE, J., ROSSING, T. H., & FENCL, V. (1991). THE ROLE OF SERUM PROTEINS IN ACID-BASE EQUILIBRIA. *THE JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE*, 117(6), 453-467.
- FLICK, D. A., & GIFFORD, G. E. (1984). COMPARISON OF IN VITRO CELL CYTOTOXIC ASSAYS FOR TUMOR NECROSIS FACTOR. *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, 68(1-2), 167-175.
- GABER, M. H. (2005). EFFECT OF γ -IRRADIATION ON THE MOLECULAR PROPERTIES OF BOVINE SERUM ALBUMIN. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 100(2), 203-206.
- GALISTEO-GONZÁLEZ, F., & MOLINA-BOLÍVAR, J. A. (2014). SYSTEMATIC STUDY ON THE PREPARATION OF BSA NANOPARTICLES. *COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES*, 123, 286-292.
- GALLO, J. M., HUNG, C. T., & PERRIER, D. G. (1984). ANALYSIS OF ALBUMIN MICROSPHERE PREPARATION. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 22(1), 63-74.
- GANG, O. (2016). NANOPARTICLE ASSEMBLY: FROM FUNDAMENTALS TO APPLICATIONS: CONCLUDING REMARKS. *FARADAY DISCUSSIONS*, 186, 529-537.
- GARZÓN, A., BRAVO, I., CARRIÓN-JIMÉNEZ, M. R., RUBIO-MORAGA, Á., & ALBALADEJO, J. (2015). SPECTROSCOPIC STUDY ON BINDING OF GENTISIC ACID TO BOVINE SERUM ALBUMIN. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 150, 26-33.
- GATOO, M. A., NASEEM, S., ARFAT, M. Y., MAHMOOD DAR, A., QASIM, K., & ZUBAIR, S. (2014). PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF NANOMATERIALS: IMPLICATION IN ASSOCIATED TOXIC MANIFESTATIONS. *BIO-MED RESEARCH INTERNATIONAL*, 2014.
- GELAMO, E. L., SILVA, C. H. T. P., IMASATO, H., & TABAK, M. (2002). INTERACTION OF BOVINE (BSA) AND HUMAN (HA) SERUM ALBUMINS WITH IONIC SURFACTANTS: SPECTROSCOPY AND MODELLING. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)-PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY*, 1594(1), 84-99.
- GETZ, E. B., XIAO, M., CHAKRABARTY, T., COOKE, R., & SELVIN, P. R. (1999). A COMPARISON BETWEEN THE SULFHYDRYL REDUCTANTS TRIS (2-CARBOXYETHYL) PHOSPHINE AND DITHIOTHREITOL FOR USE IN PROTEIN BIOCHEMISTRY. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 273(1), 73-80.
- GIRARDI, F. A., BRUCH, G. E., PEIXOTO, C. S., DAL BOSCO, L., SAHOO, S. K., GONÇALVES, C. O., ... & BARROS, D. M. (2017). TOXICITY OF SINGLE-WALL CARBON NANOTUBES FUNCTIONALIZED WITH POLYETHYLENE GLYCOL IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) EMBRYOS. *JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY*, 37(2), 214-221.
- GRDADOLNIK, J. A. (2002). FTIR INVESTIGATION OF PROTEIN CONFORMATION. *BULLETIN OF THE CHEMISTS AND TECHNOLOGISTS OF MACEDONIA*, 21(1), 23-34.

- GRDADOLNIK, J., & MARÉCHAL, Y. (2001). BOVINE SERUM ALBUMIN OBSERVED BY INFRARED SPECTROMETRY. I. METHODOLOGY, STRUCTURAL INVESTIGATION, AND WATER UPTAKE. *BIOPOLYMERS*, 62(1), 40-53.
- GREEN, M. R., MANIKHAS, G. M., ORLOV, S., AFANASYEV, B., MAKHON, A. M., BHAR, P., & HAWKINS, M. J. (2006). ABRAXANE®, A NOVEL CREMOPHOR®-FREE, ALBUMIN-BOUND PARTICLE FORM OF PACLITAXEL FOR THE TREATMENT OF ADVANCED NON-SMALL-CELL LUNG CANCER. *ANNALS OF ONCOLOGY*, 17(8), 1263-1268.
- GRUBBS, R. B. (2007). NANOPARTICLE ASSEMBLY: SOLVENT-TUNED STRUCTURES. *NATURE MATERIALS*, 6(8), 553-555.
- GUTENWIK, J., NILSSON, B., & AXELSSON, A. (2004). DETERMINATION OF PROTEIN DIFFUSION COEFFICIENTS IN AGAROSE GEL WITH A DIFFUSION CELL. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 19(1), 1-7.
- HABEEB, A. S. A. (1966). DETERMINATION OF FREE AMINO GROUPS IN PROTEINS BY TRINITROBENZENESULFONIC ACID. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 14(3), 328-336.
- HABEEB, A. S. A. (1966). DETERMINATION OF FREE AMINO GROUPS IN PROTEINS BY TRINITROBENZENESULFONIC ACID. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 14(3), 328-336.
- HARIS, P. I., & SEVERCAN, F. (1999). FTIR SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF PROTEIN STRUCTURE IN AQUEOUS AND NON-AQUEOUS MEDIA. *JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC*, 7(1), 207-221.
- HAYAKAWA, I., KAJIHARA, J., MORIKAWA, K., ODA, M., & FUJIO, Y. (1992). DENATURATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) AND OVALBUMIN BY HIGH PRESSURE, HEAT AND CHEMICALS. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 57(2), 288-292.
- HE, Q., LIU, K., WANG, S., HOU, H., YUAN, Y., & WANG, X. (2012). TOXICITY INDUCED BY EMODIN ON ZEBRAFISH EMBRYOS. *DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 35(2), 149-154.
- HORNE, R. W., & WATERSON, A. P. (1960). A HELICAL STRUCTURE IN MUMPS, NEWCASTLE DISEASE AND SENDAI VIRUSES. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, 2(1), 75IN14-77IN19.
- HORNE, R. W., & WILDY, P. (1961). SYMMETRY IN VIRUS ARCHITECTURE. *VIROLOGY*, 15(3), 348-373.
- HUANG, B. X., KIM, H. Y., & DASS, C. (2004). PROBING THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF BOVINE SERUM ALBUMIN BY CHEMICAL CROSS-LINKING AND MASS SPECTROMETRY. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY*, 15(8), 1237-1247.
- HUNGERFORD, G., BENESCH, J., MANO, J. F., & REIS, R. L. (2007). EFFECT OF THE LABELLING RATIO ON THE PHOTOPHYSICS OF FLUORESCIEIN ISOTHIOCYANATE (FITC) CONJUGATED TO BOVINE SERUM ALBUMIN. *PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES*, 6(2), 152-158.
- HUNTER, R. J. (2013). ZETA POTENTIAL IN COLLOID SCIENCE: PRINCIPLES AND APPLICATIONS (VOL. 2). ACADEMIC PRESS.
- IRONS, T. D., MACPHAIL, R. C., HUNTER, D. L., & PADILLA, S. (2010). ACUTE NEUROACTIVE DRUG EXPOSURES ALTER LOCOMOTOR ACTIVITY IN LARVAL ZEBRAFISH. *NEUROTOXICOLOGY AND TERATOLOGY*, 32(1), 84-90.

- ITRI, R., CAETANO, W., BARBOSA, L. R., & BAPTISTA, M. S. (2004). EFFECT OF UREA ON BOVINE SERUM ALBUMIN IN AQUEOUS AND REVERSE MICELLE ENVIRONMENTS INVESTIGATED BY SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING, FLUORESCENCE AND CIRCULAR DICHROISM. *BRAZILIAN JOURNAL OF PHYSICS*, 34(1), 58-63.
- JACHIMSKA, B., & PAJOR, A. (2012). PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN IN SOLUTION AND AS DEPOSITED ON SURFACES. *BIOELECTROCHEMISTRY*, 87, 138-146.
- JAIN, N. K., & ROY, I. (2009). EFFECT OF TREHALOSE ON PROTEIN STRUCTURE. *PROTEIN SCIENCE*, 18(1), 24-36.
- JIN, C., BAI, L., WU, H., LIU, J., GUO, G., & CHEN, J. (2008). PACLITAXEL-LOADED POLY (D, L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) NANOPARTICLES FOR RADIOTHERAPY IN HYPOXIC HUMAN TUMOR CELLS IN VITRO. *CANCER BIOLOGY & THERAPY*, 7(6), 911-916.
- JING, Y., YANG, J., WANG, Y., LI, H., CHEN, Y., HU, Q., ... & YI, J. (2006). ALTERATION OF SUBCELLULAR REDOX EQUILIBRIUM AND THE CONSEQUENT OXIDATIVE MODIFICATION OF NUCLEAR FACTOR KB ARE CRITICAL FOR ANTICANCER CYTOTOXICITY BY EMODIN, A REACTIVE OXYGEN SPECIES-PRODUCING AGENT. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 40(12), 2183-2197.
- JUN, J. Y., NGUYEN, H. H., CHUN, H. S., KANG, B. C., & KO, S. (2011). PREPARATION OF SIZE-CONTROLLED BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) NANOPARTICLES BY A MODIFIED DESOLVATION METHOD. *FOOD CHEMISTRY*, 127(4), 1892-1898.
- KLUG, A., & CASPAR, D. L. (1961). THE STRUCTURE OF SMALL VIRUSES. *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*, 7, 225-325.
- KLUG, A., FINCH, J. T., & FRANKLIN, R. E. (1957). THE STRUCTURE OF TURNIP YELLOW MOSAIC VIRUS: X-RAY DIFFRACTION STUDIES. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 25, 242-252.
- KONG, J., & YU, S. (2007). FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURES. *ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA*, 39(8), 549-559.
- KORZENIEWSKI, C., & CALLEWAERT, D. M. (1983). AN ENZYME-RELEASE ASSAY FOR NATURAL CYTOTOXICITY. *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, 64(3), 313-320.
- KOVŘIŽNYCH, J. A., SOTNÍKOVÁ, R., ZELJENKOVÁ, D., ROLLEROVÁ, E., SZABOVÁ, E., & WIMMEROVÁ, S. (2013). ACUTE TOXICITY OF 31 DIFFERENT NANOPARTICLES TO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) TESTED IN ADULTHOOD AND IN EARLY LIFE STAGES—COMPARATIVE STUDY. *INTERDISCIPLINARY TOXICOLOGY*, 6(2), 67-73.
- KRATZ, F. (2008). ALBUMIN AS A DRUG CARRIER: DESIGN OF PRODRUGS, DRUG CONJUGATES AND NANOPARTICLES. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 132(3), 171-183.
- KREYLING, W. G., SEMMLER-BEHNKE, M., & CHAUDHRY, Q. (2010). A COMPLEMENTARY DEFINITION OF NANOMATERIAL. *NANO TODAY*, 5(3), 165-168.
- KRISHNAMURTHY, S., VAIYAPURI, R., ZHANG, L., & CHAN, J. M. (2015). LIPID-COATED POLYMERIC NANOPARTICLES FOR CANCER DRUG DELIVERY. *BIOMATERIALS SCIENCE*, 3(7), 923-936.

- KUMARI, A., YADAV, S. K., & YADAV, S. C. (2010). BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLES BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES*, 75(1), 1-18.
- LANGER, K., BALTHASAR, S., VOGEL, V., DINAUER, N., VON BRIESEN, H., & SCHUBERT, D. (2003). OPTIMIZATION OF THE PREPARATION PROCESS FOR HUMAN SERUM ALBUMIN (HA) NANOPARTICLES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 257(1), 169-180.
- LANGER, K., BALTHASAR, S., VOGEL, V., DINAUER, N., VON BRIESEN, H., & SCHUBERT, D. (2003). OPTIMIZATION OF THE PREPARATION PROCESS FOR HUMAN SERUM ALBUMIN (HA) NANOPARTICLES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 257(1), 169-180.
- LEE, S., LEE, S., & SONG, K. B. (2003). EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF PORCINE AND BOVINE BLOOD PLASMA PROTEINS. *FOOD CHEMISTRY*, 82(4), 521-526.
- LELKES, P. I., & MILLER, I. R. (1980). PERTURBATIONS OF MEMBRANE STRUCTURE BY OPTICAL PROBES: I. LOCATION AND STRUCTURAL SENSITIVITY OF MEROCYANINE 540 BOUND TO PHOSPHOLIPID MEMBRANES. *JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY*, 52(1), 1-15.
- LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. P., & SHACTER, E. (1994). [37] CARBONYL ASSAYS FOR DETERMINATION OF OXIDATIVELY MODIFIED PROTEINS. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 233, 346-357.
- LI, C., LI, Y., GAO, Y., WEI, N., ZHAO, X., WANG, C., ... & CUI, J. (2014). DIRECT COMPARISON OF TWO ALBUMIN-BASED PACLITAXEL-LOADED NANOPARTICLE FORMULATIONS: IS THE CROSSLINKED VERSION MORE ADVANTAGEOUS?. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 468(1), 15-25.
- LI, G., CHEN, J., XIE, P., JIANG, Y., WU, L., & ZHANG, X. (2011). PROTEIN EXPRESSION PROFILING IN THE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) EMBRYOS EXPOSED TO THE MICROCYSTIN-LR. *PROTEOMICS*, 11(10), 2003-2018.
- LI, R., WU, Z., WANG, Y., DING, L., & WANG, Y. (2016). ROLE OF PH-INDUCED STRUCTURAL CHANGE IN PROTEIN AGGREGATION IN FOAM FRACTIONATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN. *BIOTECHNOLOGY REPORTS*, 9, 46-52.
- LI, Y., HUANG, W., HUANG, S., DU, J., & HUANG, C. (2012). SCREENING OF ANTI-CANCER AGENT USING ZEBRAFISH: COMPARISON WITH THE MTT ASSAY. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 422(1), 85-90.
- LIN, H. Y., CHEN, C. T., & HUANG, C. T. (2004). USE OF MEROCYANINE 540 FOR PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PLANKTONIC AND BIOFILM CELLS. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 70(11), 6453-6458.
- LIN, V. J. C., & KOENIG, J. L. (1976). RAMAN STUDIES OF BOVINE SERUM ALBUMIN. *BIOPOLYMERS*, 15(1), 203-218.
- LINS, R. D., PEREIRA, C. S., & HÜNENBERGER, P. H. (2004). TREHALOSE-PROTEIN INTERACTION IN AQUEOUS SOLUTION. *PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION, AND BIOINFORMATICS*, 55(1), 177-186.

- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., & DARNELL, J. (2000). INTRACELLULAR ION ENVIRONMENT AND MEMBRANE ELECTRIC POTENTIAL.
- LONEZ, C., BESSODES, M., SCHERMAN, D., VANDENBRANDEN, M., ESCRIOU, V., & RUYSSCHAERT, J. M. (2014). CATIONIC LIPID NANOCARRIERS ACTIVATE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND NLRP3 INFLAMMASOME PATHWAYS. NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, 10(4), 775-782.
- LONEZ, C., VANDENBRANDEN, M., & RUYSSCHAERT, J. M. (2012). CATIONIC LIPIDS ACTIVATE INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 64(15), 1749-1758.
- LONEZ, C., VANDENBRANDEN, M., ELOUAHABI, A., & RUYSSCHAERT, J. M. (2008). CATIONIC LIPID/DNA COMPLEXES INDUCE TNF- α SECRETION IN SPLENIC MACROPHAGES. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, 69(3), 817-823.
- LOZANO-FERNÁNDEZ, T., BALLESTER-ANTXORDOKI, L., PÉREZ-TEMPRANO, N., ROJAS, E., SANZ, D., IGLESIAS-GASPAR, M., ... & REY, M. (2014). POTENTIAL IMPACT OF METAL OXIDE NANOPARTICLES ON THE IMMUNE SYSTEM: THE ROLE OF INTEGRINS, L-SELECTIN AND THE CHEMOKINE RECEPTOR CXCR4. NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, 10(6), 1301-1310.
- MA, Y. S., WENG, S. W., LIN, M. W., LU, C. C., CHIANG, J. H., YANG, J. S., ... & CHUNG, J. G. (2012). ANTITUMOR EFFECTS OF EMODIN ON LS1034 HUMAN COLON CANCER CELLS IN VITRO AND IN VIVO: ROLES OF APOPTOTIC CELL DEATH AND LS1034 TUMOR XENOGRAFTS MODEL. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, 50(5), 1271-1278.
- MAES, J., VERLOOY, L., BUENAFE, O. E., DE WITTE, P. A., ESGUERRA, C. V., & CRAWFORD, A. D. (2012). EVALUATION OF 14 ORGANIC SOLVENTS AND CARRIERS FOR SCREENING APPLICATIONS IN ZEBRAFISH EMBRYOS AND LARVAE. PLOS ONE, 7(10), e43850.
- MEZIANI, M. J., & SUN, Y. P. (2003). PROTEIN-CONJUGATED NANOPARTICLES FROM RAPID EXPANSION OF SUPERCRITICAL FLUID SOLUTION INTO AQUEOUS SOLUTION. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 125(26), 8015-8018.
- MICHNIK, A., MICHALIK, K., & DRZAZGA, Z. (2005). STABILITY OF BOVINE SERUM ALBUMIN AT DIFFERENT PH. JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY, 80(2), 399-406.
- MOHANRAJ, V. J., & CHEN, Y. (2006). NANOPARTICLES-A REVIEW. TROPICAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH, 5(1), 561-573.
- MORCILLO, J. (1981). TEMAS BÁSICOS DE QUÍMICA (NO. 540 M67 1981).
- MOROSE, G. (2010). THE 5 PRINCIPLES OF "DESIGN FOR SAFER NANOTECHNOLOGY". JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION, 18(3), 285-289.
- MORRIS, J. B. (1999). LEGUME GENETIC RESOURCES WITH NOVEL "VALUE ADDED" INDUSTRIAL AND PHARMACEUTICAL USE. PERSPECTIVES ON NEW CROPS AND NEW USES, 196-201.
- MOSMANN, T. (1983). RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS. JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, 65(1-2), 55-63.

- MÜLLER, B. G., LEUENBERGER, H., & KISSEL, T. (1996). ALBUMIN NANOSPHERES AS CARRIERS FOR PASSIVE DRUG TARGETING: AN OPTIMIZED MANUFACTURING TECHNIQUE. *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, 13(1), 32-37.
- MURAWALA, P., TIRMALE, A., SHIRAS, A., & PRASAD, B. L. V. (2014). IN SITU SYNTHESIZED BSA CAPPED GOLD NANOPARTICLES: EFFECTIVE CARRIER OF ANTICANCER DRUG METHOTREXATE TO MCF-7 BREAST CANCER CELLS. *MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C*, 34, 158-167.
- NAIK KARDILE, A. (1975). FUNDAMENTOS DEL MICROSCOPIA ELECTRÓNICO Y SU APLICACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN TEXTIL.
- NĘDZAREK, A., DROST, A., HARASIMIUK, F. B., & TÓRZ, A. (2015). THE INFLUENCE OF PH AND BSA ON THE RETENTION OF SELECTED HEAVY METALS IN THE NANOFILTRATION PROCESS USING CERAMIC MEMBRANE. *DESALINATION*, 369, 62-67.
- NEUBERGER, T., SCHÖPF, B., HOFMANN, H., HOFMANN, M., & VON RECHENBERG, B. (2005). SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS: POSSIBILITIES AND LIMITATIONS OF A NEW DRUG DELIVERY SYSTEM. *JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS*, 293(1), 483-496.
- NGUYEN, S. C., HANSEN, B. K. V., HOFFMANN, S. V., & SPANGET-LARSEN, J. (2008). ELECTRONIC STATES OF EMODIN AND ITS CONJUGATE BASE. SYNCHROTRON LINEAR DICHROISM SPECTROSCOPY AND QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS. *CHEMICAL PHYSICS*, 352(1), 167-174.
- NICOLETE, R., DOS SANTOS, D. F., & FACCIOLO, L. H. (2011). THE UPTAKE OF PLGA MICRO OR NANOPARTICLES BY MACROPHAGES PROVOKES DISTINCT IN VITRO INFLAMMATORY RESPONSE. *INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY*, 11(10), 1557-1563.
- NITECKI, D. E., STOLTENBERG, I. M., & GOODMAN, J. W. (1967). QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF MIXTURES OF AMINO ACIDS USING 2, 4, 6-TRINITROBENZENESULFONIC ACID. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 19(2), 344-350.
- NOBLE, J. E., & BAILEY, M. J. (2009). QUANTITATION OF PROTEIN. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 463, 73-95.
- NOËL, E. S., DOS REIS, M., ARAIN, Z., & OBER, E. A. (2010). ANALYSIS OF THE ALBUMIN/A-FETOPROTEIN/AFAMIN/GROUP SPECIFIC COMPONENT GENE FAMILY IN THE CONTEXT OF ZEBRAFISH LIVER DIFFERENTIATION. *GENE EXPRESSION PATTERNS*, 10(6), 237-243.
- O'BRIEN, J. M., SINGH, R. J., FEIX, J. B., KALYANARAMAN, B., & SIEBER, F. (1991). ACTION SPECTRA OF THE ANTILEUKEMIC AND ANTIVIRAL ACTIVITIES OF MEROCYANINE 540. *PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY*, 54(5), 851-854.
- ONG, S. L., GRAVANTE, G., METCALFE, M. S., & DENNISON, A. R. (2013). HISTORY, ETHICS, ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF EXPERIMENTAL MODELS FOR HEPATIC ABLATION. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY: WJG*, 19(2), 147.
- PAL, T., & JANA, N. R. (1993). EMODIN (1, 3, 8-TRIHYDROXY-6-METHYLANTHRAQUINONE): A SPECTROPHOTOMETRIC REAGENT FOR THE DETERMINATION OF BERYLLIUM (II), MAGNESIUM (II) AND CALCIUM (II). *ANALYST*, 118(10), 1337-1342.

- PARANJPE, M., & MÜLLER-GOYMAN, C. C. (2014). NANOPARTICLE-MEDIATED PULMONARY DRUG DELIVERY: A REVIEW. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 15(4), 5852-5873.
- PARK, J., WRZESINSKI, S. H., STERN, E., LOOK, M., CRISCIONE, J., RAGHEB, R., ... & FERRANDINO, A. F. (2012). COMBINATION DELIVERY OF TGF- β INHIBITOR AND IL-2 BY NANOSCALE LIPOSOMAL POLYMERIC GELS ENHANCES TUMOUR IMMUNOTHERAPY. *NATURE MATERIALS*, 11(10), 895-905.
- PATIL, G. V. (2003). BIOPOLYMER ALBUMIN FOR DIAGNOSIS AND IN DRUG DELIVERY. *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH*, 58(3), 219-247.
- PATRA, H. K., & DASGUPTA, A. K. (2012). CANCER CELL RESPONSE TO NANOPARTICLES: CRITICALITY AND OPTIMALITY. *NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE*, 8(6), 842-852.
- PAVLIN, M., & BREGAR, V. B. (2012). STABILITY OF NANOPARTICLE SUSPENSIONS IN DIFFERENT BIOLOGICALLY RELEVANT MEDIA. *DIGEST JOURNAL OF NANOMATERIALS & BIOSTRUCTURES (DJNB)*, 7(4).
- PECORA, R. (2000). DYNAMIC LIGHT SCATTERING MEASUREMENT OF NANOMETER PARTICLES IN LIQUIDS. *JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH*, 2(2), 123-131.
- PETERS JR, T. (1995). ALL ABOUT ALBUMIN: BIOCHEMISTRY, GENETICS, AND MEDICAL APPLICATIONS. ACADEMIC PRESS.
- PETERS JR, T., & STEWART, A. J. (2013). ALBUMIN RESEARCH IN THE 21ST CENTURY. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 1830(12), 5351.
- PETERS, ANFINSEN. ALL ABOUT ALBUMIN: BIOCHEMISTRY, GENETICS, AND MEDICAL APPLICATIONS (1977) AP EDITORIAL.
- POWERS, C. M., SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., BADIREDDY, A. R., & PADILLA, S. (2011). SILVER NANOPARTICLES ALTER ZEBRAFISH DEVELOPMENT AND LARVAL BEHAVIOR: DISTINCT ROLES FOR PARTICLE SIZE, COATING AND COMPOSITION. *NEUROTOXICOLOGY AND TERATOLOGY*, 33(6), 708-714.
- PRASAD, P., SHUHENDLER, A., CAI, P., RAUTH, A. M., & WU, X. Y. (2013). DOXORUBICIN AND MITOMYCIN C CO-LOADED POLYMER-LIPID HYBRID NANOPARTICLES INHIBIT GROWTH OF SENSITIVE AND MULTIDRUG RESISTANT HUMAN MAMMARY TUMOR XENOGRAFTS. *CANCER LETTERS*, 334(2), 263-273.
- PULIGUJJA, P., MCMILLAN, J., KENDRICK, L., LI, T., BALKUNDI, S., SMITH, N., ... & GENDELMAN, H. E. (2013). MACROPHAGE FOLATE RECEPTOR-TARGETED ANTIRETROVIRAL THERAPY FACILITATES DRUG ENTRY, RETENTION, ANTIRETROVIRAL ACTIVITIES AND BIODISTRIBUTION FOR REDUCTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTIONS. *NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE*, 9(8), 1263-1273.
- QUINLAN, G. J., MARTIN, G. S., & EVANS, T. W. (2005). ALBUMIN: BIOCHEMICAL PROPERTIES AND THERAPEUTIC POTENTIAL. *HEPATOLOGY*, 41(6), 1211-1219.
- RAHIMNEJAD, M., NAJAFPOUR, G., & BAKERI, G. (2012). INVESTIGATION AND MODELING EFFECTIVE PARAMETERS INFLUENCING THE SIZE OF BSA PROTEIN NANOPARTICLES AS

- COLLOIDAL CARRIER. COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, 412, 96-100.
- REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO, A. J., & VEIGA, F. (2006). NANOENCAPSULATION I. METHODS FOR PREPARATION OF DRUG-LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES. NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, 2(1), 8-21.
 - REJMAN, J., OBERLE, V., ZUHORN, I. S., & HOEKSTRA, D. (2004). SIZE-DEPENDENT INTERNALIZATION OF PARTICLES VIA THE PATHWAYS OF CLATHRIN-AND CAVEOLAE-MEDIATED ENDOCYTOSIS. BIOCHEMICAL JOURNAL, 377(1), 159-169.
 - RENAUP-PIQUERAS, J., & FAURA, M. (1994). PRINCIPIOS BÁSICOS DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.
 - ROEX, E. W., DE VRIES, E., & VAN GESTEL, C. A. (2002). SENSITIVITY OF THE ZEBRAFISH (DANIO RERIO) EARLY LIFE STAGE TEST FOR COMPOUNDS WITH DIFFERENT MODES OF ACTION. ENVIRONMENTAL POLLUTION, 120(2), 355-362.
 - ROHIWAL, S. S., SATVEKAR, R. K., TIWARI, A. P., RAUT, A. V., KUMBHAR, S. G., & PAWAR, S. H. (2015). INVESTIGATING THE INFLUENCE OF EFFECTIVE PARAMETERS ON MOLECULAR CHARACTERISTICS OF BOVINE SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES. APPLIED SURFACE SCIENCE, 334, 157-164.
 - RONGVAUX, A., WILLINGER, T., MARTINEK, J., STROWIG, T., GEARTY, S. V., TEICHMANN, L. L., ... & MANZ, M. G. (2014). DEVELOPMENT AND FUNCTION OF HUMAN INNATE IMMUNE CELLS IN A HUMANIZED MOUSE MODEL. NATURE BIOTECHNOLOGY, 32(4), 364-372.
 - S. SENGUPTA, D. EAVARONE, I. CAPILA ET AL. NATURE, 2005;436,: 568–572.
 - SALATA, O. V. (2004). APPLICATIONS OF NANOPARTICLES IN BIOLOGY AND MEDICINE. JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY, 2(1), 3.
 - SALIS, A., BOSTRÖM, M., MEDDA, L., CUGIA, F., BARSE, B., PARSONS, D. F., ... & MONDUZZI, M. (2011). MEASUREMENTS AND THEORETICAL INTERPRETATION OF POINTS OF ZERO CHARGE/POTENTIAL OF BSA PROTEIN. LANGMUIR, 27(18), 11597-11604.
 - SARROUKH, R., GOORMAGHTIGH, E., RUYSSCHAERT, J. M., & RAUSSENS, V. (2013). ATR-FTIR: A “REJUVENATED” TOOL TO INVESTIGATE AMYLOID PROTEINS. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)-BIOMEMBRANES, 1828(10), 2328-2338.
 - SCHMID, F. X. (2001). BIOLOGICAL MACROMOLECULES: UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY. ELS.
 - SEO, J., LEE, C., HWANG, H. S., KIM, B., LEE, E. S., OH, K. T., ... & YOUN, Y. S. (2016). THERAPEUTIC ADVANTAGE OF INHALED TACROLIMUS-BOUND ALBUMIN NANOPARTICLES IN A BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS MOUSE MODEL. PULMONARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, 36, 53-61.
 - SEVILLA, P., RIVAS, J. M., GARCÍA-BLANCO, F., GARCÍA-RAMOS, J. V., & SÁNCHEZ-CORTÉS, S. (2007). IDENTIFICATION OF THE ANTITUMORAL DRUG EMODIN BINDING SITES IN BOVINE SERUM ALBUMIN BY SPECTROSCOPIC METHODS. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)-PROTEINS AND PROTEOMICS, 1774(11), 1359-1369.

- SHAH, N., CHAUDHARI, K., DANTULURI, P., MURTHY, R. S. R., & DAS, S. (2009). PACLITAXEL-LOADED PLGA NANOPARTICLES SURFACE MODIFIED WITH TRANSFERRIN AND PLURONIC® P85, AN IN VITRO CELL LINE AND IN VIVO BIODISTRIBUTION STUDIES ON RAT MODEL. *JOURNAL OF DRUG TARGETING*, 17(7), 533-542.
- SHAMSIPUR, M., FARZIN, L., TABRIZI, M. A., & MOLAABASI, F. (2015). HIGHLY SENSITIVE LABEL FREE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF VEGF 165 TUMOR MARKER BASED ON “SIGNAL OFF” AND “SIGNAL ON” STRATEGIES USING AN ANTI-VEGF 165 APTAMER IMMOBILIZED BSA-GOLD NANOCLUSTERS/IONIC LIQUID/GLASSY CARBON ELECTRODE. *BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS*, 74, 369-375.
- SHANKAR, K. R., AMETA, R. K., & SINGH, M. (2016). PREPARATION OF BSA NANOPARTICLES USING AQUEOUS UREA AT T= 308.15, 313.15 AND 318.15 K AS A FUNCTION OF TEMPERATURE. *JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS*, 216, 808-813.
- SHEN, X., SONG, C., WANG, J., SHI, D., WANG, Z., LIU, N., & DING, B. (2011). ROLLING UP GOLD NANOPARTICLE-DRESSED DNA ORIGAMI INTO THREE-DIMENSIONAL PLASMONIC CHIRAL NANOSTRUCTURES. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 134(1), 146-149.
- SHI, J., KANTOFF, P. W., WOOSTER, R., & FAROKHZAD, O. C. (2016). CANCER NANOMEDICINE: PROGRESS, CHALLENGES AND OPPORTUNITIES. *NATURE REVIEWS CANCER*.
- SIEBER, F., O'BRIEN, J. M., KRUEGER GI, S. S., & BURNS, W. H. (1987). SHARKIS SJ, SENSENBRENNER LL: ANTIVIRAL ACTIVITY OF MEROCYANINE 540. *PHOTOCHEM PHOTOBIO*, 46, 707.
- ŠIKUROVÁ, L., & ČUNDERLÍKOVÁ, B. (1997). PH DEPENDENCE OF MEROCYANINE 540 ABSORPTION AND FLUORESCENCE SPECTRA. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 53(2), 293-297.
- SIMONELLI, G., & ARANCIBIA, E. L. (2015). EFFECTS OF SIZE AND SURFACE FUNCTIONALIZATION OF ZINC OXIDE (ZNO) PARTICLES ON INTERACTIONS WITH BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA). *JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS*, 211, 742-746.
- SIRI, M., ACHILLI, E., GRASSELLI, M., & DEL V, A. S. (2017). ALBUMIN NANOCARRIERS, γ -IRRADIATED CROSSLINKED, COMBINED WITH THERAPEUTIC DRUGS FOR CANCER THERAPY. *CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN*.
- SIRI, M., GRASSELLI, M., & ALONSO, S. D. V. (2016). ALBUMIN-BASED NANOPARTICLE TREHALOSE LYOPHILISATION STRESS-DOWN TO PRESERVE STRUCTURE/FUNCTION AND ENHANCED BINDING. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, 126, 66-74.
- SRINIVAS, G., ANTO, R. J., SRINIVAS, P., VIDHYALAKSHMI, S., SENAN, V. P., & KARUNAGARAN, D. (2003). EMODIN INDUCES APOPTOSIS OF HUMAN CERVICAL CANCER CELLS THROUGH POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE CLEAVAGE AND ACTIVATION OF CASPASE-9. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 473(2), 117-125.
- SRINIVAS, G., BABYKUTTY, S., SATHIADEVAN, P. P., & SRINIVAS, P. (2007). MOLECULAR MECHANISM OF EMODIN ACTION: TRANSITION FROM LAXATIVE INGREDIENT TO AN ANTITUMOR AGENT. *MEDICINAL RESEARCH REVIEWS*, 27(5), 591-608.

- SUNDAR, S., KUNDU, J., & KUNDU, S. C. (2010). BIOPOLYMERIC NANOPARTICLES. *SCIENCE AND TECHNOLOGY OF ADVANCED MATERIALS*, 11(1), 014104.
- TAN, J. L., & ZON, L. I. (2011). CHEMICAL SCREENING IN ZEBRAFISH FOR NOVEL BIOLOGICAL AND THERAPEUTIC DISCOVERY. *METHODS IN CELL BIOLOGY*, 105, 493-516.
- TRIEU, V., DAMASCELLI, B., SOON-SHIONG, P., & DESAI, N. (2006). SPARC EXPRESSION IN HEAD AND NECK CANCER CORRELATES WITH TUMOR RESPONSE TO NANOPARTICLE ALBUMIN-BOUND PACLITAXEL (NAB-PACLITAXEL, ABI-007, ABRAXANE).
- TRUONG, L., HARPER, S. L., & TANGUAY, R. L. (2011). EVALUATION OF EMBRYOTOXICITY USING THE ZEBRAFISH MODEL. *DRUG SAFETY EVALUATION: METHODS AND PROTOCOLS*, 271-279.
- TSUJINO, I., MIYAGI, K., SAMPSON, R. W., & SIEBER, F. (2006). POTENTIATION OF THE ANTITUMOR EFFECT OF MEROCYANINE 540-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY BY AMIFOSTINE AND AMPHOTERICIN B. *PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY*, 82(2), 458-465.
- TWAROCK, R. (2006). MATHEMATICAL VIROLOGY: A NOVEL APPROACH TO THE STRUCTURE AND ASSEMBLY OF VIRUSES. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON A: MATHEMATICAL, PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES*, 364(1849), 3357-3373.
- ULBRICH, K., MICHAELIS, M., ROTHWEILER, F., KNOBLOCH, T., SITHISARN, P., CINATL, J., & KREUTER, J. (2011). INTERACTION OF FOLATE-CONJUGATED HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA) NANOPARTICLES WITH TUMOUR CELLS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 406(1), 128-134.
- US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. [HOMEPAGE ON THE INTERNET] 2016
CLINICALTRIALS.GOV [AVAILABLE FROM
[HTTPS://CLINICALTRIALS.GOV/CT2/SHOW/NCT02494570?TERM](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02494570?term)]
- VAN WICKERN, B., MÜLLER, B., SIMAT, T., & STEINHART, H. (1997). DETERMINATION OF γ -RADIATION INDUCED PRODUCTS IN AQUEOUS SOLUTIONS OF TRYPTOPHAN AND SYNTHESIS OF 4-, 6-AND 7-HYDROXYTRYPTOPHAN. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, 786(1), 57-65.
- VENKATESH, S., BYRNE, M. E., PEPPAS, N. A., & HILT, J. Z. (2005). APPLICATIONS OF BIOMIMETIC SYSTEMS IN DRUG DELIVERY. *EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY*, 2(6), 1085-1096.
- W. I. GOLDBURG (1999) DYNAMIC LIGHT SCATTERING. *AM. J. PHYS.* 67 (12)
- WALDMANN, T. A. (1977). ALBUMIN CATABOLISM. ALBUMIN STRUCTURE, FUNCTION AND USES, 255-273.
- WANG, SHENGPENG, ET AL. "EMODIN LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND ANTITUMOR ACTIVITY STUDIES." *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS* 430.1 (2012): 238-246.
- WANG, Y., ZHOU, J., LIU, L., HUANG, C., ZHOU, D., & FU, L. (2016). CHARACTERIZATION AND TOXICOLOGY EVALUATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH, *DANIO RERIO*. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 141, 204-210.
- WANG, Y., ZHU, L., DONG, Z., XIE, S., CHEN, X., LU, M., ... & ZHOU, W. (2012). PREPARATION AND STABILITY STUDY OF NORFLOXACIN-LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLE SUSPENSIONS. *COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES*, 98, 105-111.

- WARTLICK, H., SPÄNKUCH-SCHMITT, B., STREBHARDT, K., KREUTER, J., & LANGER, K. (2004). TUMOUR CELL DELIVERY OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES BY HUMAN SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 96(3), 483-495.
- WHEELER, D. S., GIULIANO, J. S., LAHNI, P. M., DENENBERG, A., WONG, H. R., & ZINGARELLI, B. (2011). THE IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF ALBUMIN IN VITRO AND IN VIVO. *ADVANCES IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES*, 2011.
- WHEELER, G. N., & BRÄNDLI, A. W. (2009). SIMPLE VERTEBRATE MODELS FOR CHEMICAL GENETICS AND DRUG DISCOVERY SCREENS: LESSONS FROM ZEBRAFISH AND XENOPUS. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 238(6), 1287-1308.
- WILDY, P., & HORNE, R. W. (1960). THE STRUCTURE OF HERPES SIMPLEX VIRUS AND ITS RELATION TO OTHER VIRUSES. IN *PROC. EUR. REG. CONF. ON ELECTRON MICROSCOPY, DELFT* (VOL. 2, PP. 955-963).
- WILHELM, S., TAVARES, A. J., DAL, Q., OHTA, S., AUDET, J., DVORAK, H. F., & CHAN, W. C. (2016). ANALYSIS OF NANOPARTICLE DELIVERY TO TUMOURS. *NATURE REVIEWS MATERIALS*, 1, 16014.
- WILSON, B., PALADUGU, L., PRIYADARSHINI, S. B., & JENITA, J. J. L. (2015). DEVELOPMENT OF ALBUMIN-BASED NANOPARTICLES FOR THE DELIVERY OF ABACAVIR. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 81, 763-767.
- WINTHER, J. R., & THORPE, C. (2014). QUANTIFICATION OF THIOLS AND DISULFIDES. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)-GENERAL SUBJECTS*, 1840(2), 838-846.
- WISCHKE, C., & BORCHERT, H. H. (2006). FLUORESCCEIN ISOTHIOCYANATE LABELLED BOVINE SERUM ALBUMIN (FITC-BSA) AS A MODEL PROTEIN DRUG: OPPORTUNITIES AND DRAWBACKS. *DIE PHARMAZIE-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 61(9), 770-774.
- WONG, H. L., RAUTH, A. M., BENDAYAN, R., & WU, X. Y. (2007). IN VIVO EVALUATION OF A NEW POLYMER-LIPID HYBRID NANOPARTICLE (PLN) FORMULATION OF DOXORUBICIN IN A MURINE SOLID TUMOR MODEL. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS*, 65(3), 300-308.
- XIA, W., & LOW, P. S. (2010). FOLATE-TARGETED THERAPIES FOR CANCER. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 53(19), 6811-6824.
- XIE, L., TONG, W., YU, D., XU, J., LI, J., & GAO, C. (2012). BOVINE SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES MODIFIED WITH MULTILAYERS AND APTAMERS FOR PH-RESPONSIVE AND TARGETED ANTI-CANCER DRUG DELIVERY. *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY*, 22(13), 6053-6060.
- YANG, X. Y., LI, Y. X., LI, M., ZHANG, L., FENG, L. X., & ZHANG, N. (2013). HYALURONIC ACID-COATED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR TARGETING PACLITAXEL TO CANCER. *CANCER LETTERS*, 334(2), 338-345.
- YEDOMON, B., FESSI, H., & CHARCOSSET, C. (2013). PREPARATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) NANOPARTICLES BY DESOLVATION USING A MEMBRANE CONTACTOR: A NEW

TOOL FOR LARGE SCALE PRODUCTION. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, 85(3), 398-405.

- YU, S., HU, J., PAN, X., YAO, P., & JIANG, M. (2006). STABLE AND PH-SENSITIVE NANOGELS PREPARED BY SELF-ASSEMBLY OF CHITOSAN AND OVALBUMIN. LANGMUIR, 22(6), 2754-2759.
- YUAN, Z., LI, Y., HU, Y., YOU, J., HIGASHISAKA, K., NAGANO, K., ... & GAO, J. (2016). CHITOSAN NANOPARTICLES AND THEIR TWEEN 80 MODIFIED COUNTERPARTS DISRUPT THE DEVELOPMENTAL PROFILE OF ZEBRAFISH EMBRYOS. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, 515(1), 644-656.
- ZHANG, H., WU, P., WANG, Y., & CAO, J. (2016). AFFINITY OF MIRIPLATIN TO HUMAN SERUM ALBUMIN AND ITS EFFECT ON PROTEIN STRUCTURE AND STABILITY. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 92, 593-599.
- ZHANG, L., GU, F. X., CHAN, J. M., WANG, A. Z., LANGER, R. S., & FAROKHZAD, O. C. (2008). NANOPARTICLES IN MEDICINE: THERAPEUTIC APPLICATIONS AND DEVELOPMENTS. CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, 83(5), 761-769.
- ZHANG, Y., & GÖRNER, H. (2012). PHOTOPROCESSES OF MEROCYANINE 540 BOUND TO SERUM ALBUMIN AND LYSOZYME. JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE, 1011, 94-98.
- ZHAO, D., ZHAO, X., ZU, Y., LI, J., ZHANG, Y., JIANG, R., & ZHANG, Z. (2010). PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND IN VITRO TARGETED DELIVERY OF FOLATE-DECORATED PACLITAXEL-LOADED BOVINE SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES. INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, 5, 669.
- ZON, L. I., & PETERSON, R. T. (2005). IN VIVO DRUG DISCOVERY IN THE ZEBRAFISH. NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 4(1), 35-44.

FINANCIAMIENTO

