Tesis de Doctorado en Química

"FORMULACIÓN, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS DE ENTREGA DE DROGAS ANTICANCERÍGENAS FUNCIONALIZADOS CON ANTICUERPOANTI-ANTÍGENO TN"

Lic. Bioq. Analía Castro

Directores
Dra. Helena Pardo
Dr. Eduardo Osinaga
Dr. Álvaro W. Mombrú

- 13 de Agosto 2024 -

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutores Helena Pardo, Eduardo Osinaga y Álvaro W. Mombrú, por la confianza depositada en mi persona, así como también por el apoyo y la orientación brindada a lo largo de todo este camino de aprendizajes, tanto a nivel académico como personal.

A mis compañeros del Laboratorio de Nanotecnología, Pablo Miranda, Patricia Zimet, Juan Pablo Villanueva y Luciana Pereira por su apoyo y colaboración en todo el proceso.

A mis compañeros de la cátedra de Física, Ricardo Faccio, Mariano Romero, Dominique Mombrú, Martín Esteves, Benjamín Montenegro, Luciana Fernández, Fernando Pignanelli.

Al laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral del Institut Pasteur de Montevideo, en particular a Nora Berois, Álvaro Pittini, Viviana Cardozo, Eugenia Fernández, Edgardo Berriel y Luis Ubillos por su ayuda y colaboración en los cultivos celulares y ensayos *in vivo*.

Al laboratorio de Biotecnología, en especial a Iris Miraballes por las medidas en el Zetasizer. Al laboratorio de BioTeFa, en especial a Antonio Malanga, María Luisa Rodríguez y Federico Rossano por su colaboración en la determinación por HPLC. Al Laboratorio de Química Fina, a Juan Carlos Ramos y a Mauricio Silvera. Al Laboratorio de Energías Renovables, a Carmina Reyes. Al Laboratorio de Alimentos, en especial a Caterina Ruffo, Giannina Brugnini, Jesica Rodríguez y Soledad Rodríguez, por su apoyo y buena disposición para utilizar sus equipos.

A Horacio Pezaroglo por su ayuda en los análisis de H-NMR.

A Gabriela Casanova (Unidad de Microscopía Electrónica –Fcien) y a Álvaro Olivera (CURE, Rocha) por su apoyo en los estudios de TEM.

A PEDECIBA, ANII (POS_NAC_2015_1_109551) y CAP por su apoyo financiero.

A mi familia, en especial a mis padres, Washington y Carmen, a mis hermanos y a mi compañero de vida, Juan Pablo, por el apoyo incondicional y la motivación contante para seguir adelante.

A mis amigos de toda la vida por estar siempre, y a todos los que contribuyeron en esta tesis doctoral.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS 2

ÍNDICE DE TABLAS 8

ÍNDICE DE FIGURAS 9

LISTA DE ABREVIATURAS 12

RESUMEN 14

1. ANTECEDENTES 17

1.1 Cáncer 18

1.1.1 Cáncer de pulmón 19

1.1.2 Tratamiento 21

1.1.3 Docetaxel 22

1.2 Nanotecnología 24

1.3 Quitosano (CS) 28

1.3.1 Propiedades del CS 30

1.3.2 Nanopartículas de CS 32

1.4 PLGA 34

1.4.1 Propiedades del PLGA 35

1.4.2 Nanopartículas de PLGA 38

1.4.2.1 Nanoesferas de PLGA 38

1.4.2.2 Nanopartículas híbridas lípido/polímero 39

1.5 Barreras biológicas 41

1.6 Propiedades físico-química de las nanopartículas que influyen en su performance biológico. 44

1.7 Efecto de permeabilidad y retención aumentada 50

1.8 Antígeno Tn 51

1.9 Anticuerpo Chi-Tn 53

2. OBJETIVOS 54

2.1. Objetivo general 55
2.2. Objetivos específicos.....55
2.3 Justificación.....56
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....58
3.1. Materiales.....59
3.2 Cultivos celulares 59
3.3 Modelo animal 60
3.4 Técnicas experimentales.....60
3.4.1 Dispersión de luz dinámica 60
3.4.2 Dispersión de luz electroforética 61
3.4.3 Microscopía electrónica de transmisión 62
3.4.4 Microscopía de fuerza atómica 62
3.4.5 Espectroscopia Raman..... 63
3.4.6 ELISA..... 64
3.4.7 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protones 64
3.4.8 Espectroscopia infrarroja 65
3.4.9 HPLC 66
3.4.10 Citometría de flujo..... 66
3.4.11 Microscopía confocal 67
3.4.12 Método del ácido bicinconínico 68
3.4.13 Ensayo MTT..... 68
3.4.14 Ensayo CCK8 68
3.5 Procedimiento Experimental.....69
3.5.1 Nanopartículas de CS..... 69
3.5.1.1 PEGilación del CS 69
3.5.1.2 Preparación de las nanocápsulas de CS..... 69
3.5.2 Nanopartículas de PLGA 70

3.5.2.1 Pegilación del PLGA 70
3.5.2.2 Preparación de las nanoesferas de PLGA 70
3.5.3 Preparación de nanopartículas híbridas lípido-polímero 71
3.5.4 Funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado 72
3.6 Caracterización físico-química 73
3.6.1 Resonancia Magnética Nuclear de Protones (H-RMN) 73
3.6.2 Espectroscopia IR 74
3.6.3 Tamaño y potencial Z 74
3.6.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) 74
3.6.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM) 75
3.6.6 Espectroscopia Raman 75
3.6.7 Eficiencia de encapsulación (EE) 75
3.6.8 Estudio de liberación 76
3.6.9 Estudio de estabilidad en el tiempo 76
3.7 Caracterización biológica 76
3.7.1 Ensayo de viabilidad celular MTT 76
3.7.2 Ensayo de viabilidad celular CCK8 77
3.7.3 Test de hemólisis 77
3.7.4 Ensayo de internalización celular por microscopía confocal 78
3.7.5 Ensayo de internalización celular por citometría de flujo 79
3.7.6 Ensayos *in vivo* preliminares 79
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 81
4.1. Resultados nanocápsulas de CS: 82
4.1.1. PEGilación del CS 82
4.1.2. Preparación de las nanocápsulas de CS 85
4.1.3. Tamaño, potencial Z y EE 86

4.1.4. Morfología de las nanopartículas de CS 88
4.1.5 Estudio de liberación Nc CS 89
4.1.6 Estabilidad de almacenamiento 90
4.1.7 Test de hemólisis 91
4.1.8 Estudio de internalización celular 92
4.1.9 Estudio de viabilidad celular 93
4.1.10 Estudios *in vivo* preliminares 95
4.2. Resultados nanoesferas de PLGA: 98
4.2.1. PEGilación del PLGA 98
4.2.2. Formación de las nanoesferas de PLGA 99
4.2.3. Tamaño, potencial Z y EE 100
4.2.4. Morfología Np PLGA 101
4.2.5 Estudios de viabilidad celular Np PLGA 102
4.3 Resultados LPHNp 104
4.3.1 Formación de las LPHNp 104
4.3.2 Tamaño, potencial Z y EE 106
4.3.3 Morfología de las LPHNp 107
4.3.4 Estudio de liberación de DCX desde las LPHNp 108
4.3.5 Estabilidad de almacenamiento 109
4.3.6 Test de hemólisis 110
4.3.7 Ensayo de internalización celular 110
4.3.8 Estudio de viabilidad celular 112
4.3.9 Estudios *in vivo* 113
5. CONCLUSIÓNES 117
6. PERSPECTIVAS FUTURAS 120
7. BIBLIOGRAFÍA 121
ANEXOS 148

Anexo 1: Caracterización de CS 149

Anexo 2: Caracterización del anticuerpo Chi-Tn 153

Anexo 3. Validación del método de determinación de DCX por HPLC.....159

Anexo 4. Modelos matemáticos de liberación de DCX.....161

Anexo 5. Presentaciones y ponencias en eventos científicos 164

Anexo 6. Artículos científicos nacionales e internacionales, publicados o en revisión, que resultan del trabajo de tesis doctoral.....165

Anexo 7. Publicación y solicitud de patente asociada al trabajo de tesis doctoral166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características distintivas de las células tumorales descritas por Hanahan y Weinberg.....18

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los tratamientos convencionales contra el cáncer.....22

Tabla 3. Breve descripción de las vías endocíticas (168). 47

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de CS.....86

Tabla 5. Valores obtenidos de hemólisis de diferentes formulaciones con o sin glicerol en dos concentraciones, expresadas en relación con el número de veces que los tratamientos aumentan la hemólisis en comparación con PBS. (media ± desviación estándar; n = 3) 91

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de PLGA 101

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de las LPHNp.....107

Tabla 8. Lista de los valores obtenidos de hemólisis de las formulaciones obtenidas a dos concentraciones, expresados en relación con el número de veces que los tratamientos aumentan la hemólisis en comparación con PBS (media ± desviación estándar; n = 3). 110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráficas de incidencia (**A**) y mortalidad (**B**) del cáncer a nivel mundial en 2022 (OMS). 21

Figura 2. Estructura química del docetaxel, paclitaxel y carbazitaxel. 23

Figura 3. Estructura química del CS y la quitina. 29

Figura 4. Esquema representativo del método de desplazamiento de solvente y formación de las nanocápsulas de CS conteniendo DCX. 34

Figura 5. Estructura química del PLGA y sus monómeros constituyentes; ácido láctico (LA) y ácido glicólico (GA). 35

Figura 6. Esquema representativo del método de nanoprecipitación y formación de las nanoesferas de PLGA conteniendo DCX. 39

Figura 7. Representación esquemática de una nueva generación de LPHNp a partir de la combinación de liposomas y nanopartículas poliméricas. 40

Figura 8. Ilustración esquemática de las principales barreras biológicas a las que se enfrentan los nanosistemas de administración intravenosa. Adaptación de la figura del artículo (139). 42

Figura 9. Representación esquemática de las principales vías endocíticas por las que pueden ingresar los nanosistemas a las células. Traducción de la figura del artículo (150) 44

Figura 10. Principales propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas que influyen en la interacción con los sistemas biológicos. Traducción de la figura tomada de la referencia (149). 45

Figura 11. Principales estrategias de escape endosomal (151). 49

Figura 12. Ilustración de los mecanismos de vectorización pasiva mediada por el EPR y vectorización activa por funcionalización con ligandos específicos en un tumor sólido. Traducción de la figura del artículo (184). Las nanopartículas pueden (i) liberar su contenido en el microambiente tumoral, cerca de las células cancerígenas; (ii) adherirse a la membrana celular y actuar como un depósito de liberación extracelular de fármacos; o (iii) internalizarse en la célula por algunos de los mecanismos descritos en el apartado anterior 51

Figura 13. Biosíntesis del antígeno Tn en células cancerígenas, traducción de la figura tomada del artículo (189).....52

Figura 14 Espectros ^{1}H-RMN de CS (A) y CS-PEG (B). 83

Figura 15 Espectros FTIR de CS (a), CS-PEG (b) y PEG (c).....84

Figura 16. Espectros Raman de CS (a), Nc CS (b) y lecitina de soja (c).....86

Figura 17. Imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas de CS (A) y CS-PEG-DCX-ChiTn (B).....88

Figura 18. Estudio de liberación de DCX desde las Nc CS-PEG-DCX-Chi-Tn en PBS pH 7.4 y buffer acetato pH 5 a 37 °C.....90

Figura 19. Distribución de tamaños de las formulaciones de Nc CS durante 24 días almacenados a 4 °C. 91

Figura 20. Imágenes de microscopía confocal de células A549 expuestas a las nanopartículas de CS-Coumarin-PEG luego de 1 hr (A) y 24 hr (B) de incubación, y CS-Coumarin-PEG-Chi-Tn luego de 1 hr (C) y 24 hr (D) de incubación.....93

Figura 21. Ensayo de viabilidad celular CCK8 en la línea de cáncer de pulmón humano A549 a 24, 48 y 72 hr de incubación con Nc CS-PEG, Nc CS-PEG-DCX, Nc CS-PEG-DCX-Chi-Tn y DCX libre. Los datos se expresan como el promedio ± SD (n = 3). La significancia estadística se indica con * (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).....94

Figura 22. Ratones *nude* que desarrollaron tumores luego de ser inoculados con células A549.....96

Figura 23. Curvas de crecimiento tumoral de acuerdo con el tratamiento recibido.97

Figura 24. Espectros ^{1}H-RMN de PLGA (A) y PLGA-PEG (B). 99

Figura 25. Espectros Raman de las nanoesferas de PLGA (a) y PLGA puro (b).100

Figura 26. Imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas de PLGA sin (A) y con (B) PEG 102

Figura 27. Ensayo de viabilidad celular MTT en la línea de cáncer de pulmón humano A549 a 72 hrs de incubación con Np PLGA, Np PLGA-PEG-DCX y DCX libre.....103

Figura 28. Espectro Raman de las LPHNPs (a), DSPE-PEG-Biotina (b), DSPE-PEG (c), PLGA (d), Crodamol (e) y DOTAP (f). 106

Figura 29. Estudio morfológico de las LPHNp-DCX-Chi-Tn por HR-TEM (A y B) y AFM (C y D) 108

Figura 30. Ensayo de liberación de DCX desde las LPHNp-DCX-Chi-Tn en buffer pH 7.4 y 5 a 37 °C. 109

Figura 31. Distribución de tamaños de las LPHNp, LPHNp-DCX y LPHNp-DCX-Chi-Tn durante 27 días almacenados a 4 °C.....110

Figura 32. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de las células A549 sin tratar (A y D), tratadas con LPHNp-coumarin (B y E) y tratadas con LPHNp-coumarin-Chi-Tn (C y F) incubadas a 4 °C (A-C) o 37 °C (D-F). El coumarin se observa de color verde y el núcleo de la célula se ve de color azul. 111

Figura 33. Resultados de internalización celular por citometría de flujo de las células A549 sin tratar (1), tratadas con LPHNp-coumarin (2) y LPHNp-coumarin-Chi-Tn (3) incubadas a 4 y 37 °C, expresados como porcentaje de células coumarin positivas (A) e intensidad de fluorescencia de coumarin (B). Las muestras se analizaron por triplicado y se aplicaron los test estadísticos one-way ANOVA y Tukey para analizar los datos (*** p < 0.0001; **p < 0.001; *p<0.01)..112

Figura 34. Ensayo de viabilidad CCK8 en células A549 a 24, 48 y 72 hr de incubación con DCX y distintas formulaciones de las LPHNp. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=3). La significancia estadística se indica con * (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). 113

Figura 35. Variación del volumen tumoral de los distintos grupos en función de los días post-tratamiento. La significancia estadística del volumen tumoral se indica como ****, (P < 0.0001). 115

Figura 36. Porcentaje de sobrevida de los ratones en función de los días post-tratamiento calculado con el método de Kaplan-Meier. Se aplicó la prueba de log-rank (Mantel-Cox) para evaluar significancia estadística entre grupos (*, P < 0.05; **, P < 0.01). 115

Figura 37. Gráfico del peso corporal de los animales en función del tiempo. 116

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	microscopía de fuerza atómica
BCA	ácido bicinconínico
CCK-8	kit-8 para conteo de células
CEUA	Comisión de Ética en el uso de animales
CLSM	microscopio de barrido láser confocal
CP	corona proteica
CS	quitosano
DAPI	4′,6-diamidino-2-fenilindol
DCX	docetaxel
DLS	dispersión dinámica de luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOTAP	Cloruro de 1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamonio-propano
DSPE	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
EDC	clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil-N′-etilcarbodiimida
EE	eficiencia de encapsulación
EGFR	factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	Agencia Europea de medicamentos
EPR	efecto de permeabilidad y retención aumentada
FA	fase acuosa
FDA	Administración de drogas y alimentos en EE.UU.
FO	fase orgánica
FT-IR	espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GA	ácido glicólico
GD	grado de desacetilación
GMB	membrana basal glomerular
H-NMR	Resonancia Magnética Nuclear de protones
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HR-TEM	microscopía electrónica de alta resolución
IP	índice de polidispersidad
LA	ácido láctico

LPHNp	nanopartículas híbridas lípido-polímero
MSP	sistema fagocítico mononuclear
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mv	peso molecular viscosimétrico
Nc	nanocápsulas
NHS	N-hidroxisuccinimida
Np	nanopartículas
NSCLC	cáncer de pulmón de células no pequeñas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	fosfato buffer salino
PEG	poli-etilenglicol
PGA	ácido poli-glicólico
PLA	ácido poli-láctico
PLGA	ácido poliláctico co-glicólico
PTX	paclitaxel
RES	sistema reticuloendotelial
SCLC	cáncer de pulmón de células pequeñas
SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
TEM	microscopía electrónica de transmisión
Tg	temperatura de transición vítrea
UATE	Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
WST-8	2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonato-fenil)-2H-tetrazolio

RESUMEN

El cáncer puede definirse como un crecimiento anormal de células que conducen a la pérdida de homeostasis celular y son capaces de migrar e invadir tejidos distantes en un proceso conocido como metástasis. Debido a su incidencia y mortalidad reviste una importancia central en investigación biomédica. Más específicamente, el cáncer de pulmón encabeza la lista de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Dentro de los tratamientos convencionales contra el cáncer de pulmón, la quimioterapia con taxanos, tales como el docetaxel y paclitaxel, es una de las más utilizadas. Sin embargo, la acción sistémica de estos compuestos puede afectar células sanas con alta tasa de proliferación, lo que puede causar efectos secundarios potencialmente mortales. Asimismo, debido a su baja especificidad, se administran en altas dosis, lo que aumenta el riesgo de toxicidad y reduce la calidad de vida de los pacientes. Además, la baja solubilidad en agua de estos compuestos requiere el uso de excipientes, que pueden causar reacciones adversas y otras complicaciones. Por ello, la encapsulación de estos compuestos en nanosistemas de liberación controlada podría representar una alternativa prometedora para superar estas limitaciones. Los sistemas nanométricos empleados en Nanomedicina suelen ser biomateriales con organización a escala nanométrica, que actúan como reservorios para el transporte, la liberación controlada y la protección de los principios activos que contienen. Es importante destacar que las propiedades físico-químicas de los nanosistemas, tales como el tamaño, la forma, la carga superficial y la composición, influyen en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. Los nanosistemas esféricos con un tamaño que oscila entre 70 y 300 nm se consideran óptimos para administraciones intravenosas. En cuanto a la composición, los biopolímeros se presentan como una alternativa especialmente interesante para la preparación de estos sistemas debido a que en general son biodegradables, biocompatibles y pueden ser modificados químicamente, lo que les otorga una gran versatilidad. En especial, la funcionalización de los nanosistemas con PEG suele ser una excelente estrategia de doble propósito. Por un lado, funciona como un escudo protector para evadir el sistema inmune y prolongar el tiempo de circulación en sangre. Por otro lado, sirve como puente conector para la funcionalización con ligandos específicos de direccionamiento,

tales como anticuerpos. En este contexto, el anticuerpo quimérico ratón/humano anti-antígeno Tn, conocido como Chi-Tn, podría ser un vehículo efectivo para dirigir nanopartículas cargadas con drogas citotóxicas hacia células tumorales que expresan el antígeno Tn. Dado que el antígeno Tn es un biomarcador temprano del cáncer, con alta especificidad de expresión en células cancerosas en contraste con las células normales, este enfoque podría mejorar la precisión del tratamiento y reducir los efectos secundarios en los pacientes.

El objetivo del presente trabajo consistió en preparar y caracterizar dos tipos de nanosistemas poliméricos cargados con docetaxel y funcionalizados con el anticuerpo Chi-Tn. Uno de ellos basado en quitosano (CS) para el desarrollo de nanocápsulas poliméricas. El otro sistema está basado en el ácido poliláctico-coglicólico (PLGA), inicialmente con el fin de obtener nanoesferas poliméricas de PLGA, sin embargo, debido a la baja eficiencia de encapsulación del fármaco, evolucionó hacia la formación de nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPHNp).

Los nanosistemas obtenidos exhibieron una forma esférica con un tamaño de partícula dentro del rango óptimo establecido para mejorar el tiempo de circulación en sangre y la internalización celular. Además, se logró incorporar PEG en la superficie de las nanopartículas y funcionalizarlas con el anticuerpo Chi-Tn, mediante una estrategia de incubación en dos pasos para formar una especie de sándwich biotina-avidina-biotina.

En el caso de las nanocápsulas de CS y las LPHNp, la presencia de una fase lipídica posibilitó una alta eficiencia de encapsulación de docetaxel, cercana al 100%, logrando una concentración final de 4 mg/mL. Ambos nanosistemas demostraron tener una liberación controlada en el tiempo y, en el caso de las nanocápsulas de CS, ser sensibles a cambios de pH. Asimismo, los ensayos *in vitro* revelaron que no generan hemólisis en muestras de sangre humana, y que las inmuno-nanopartículas son capaces de internalizar en las células de cáncer de pulmón humano A549 y disminuir significativamente su viabilidad celular en comparación con la droga libre.

Por otra parte, los estudios *in vivo* demostraron una marcada disminución del volumen tumoral y un aumento en la sobrevida de los ratones tratados con

nanopartículas cargadas con docetaxel y funcionalizadas con el anticuerpo Chi-Tn en comparación con la droga libre.

En resumen, se logró desarrollar dos nanosistemas poliméricos de liberación controlada de docetaxel funcionalizados con el anticuerpo Chi-Tn para el direccionamiento especifico a células tumorales mediante vectorización activa. Ambos nanosistemas desarrollados mostraron resultados *in vitro* e *in vivo* promisorios como posibles alternativas terapéuticas contra el cáncer de pulmón.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

El cáncer puede definirse como un crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión génica que conducen a la pérdida de homeostasis celular y, en última instancia, evolucionar hacia una población de células que pueden invadir los tejidos y generar metástasis a sitios distantes (1,2).

Actualmente existen más de 100 tipos de cáncer según informa el Instituto Nacional de Cáncer de EEUU (3), los cuales se clasifican de acuerdo al sitio donde se origina y/o el tipo de célula afectada. Uno de los más predominantes son los denominados carcinomas, que tienen lugar en las células epiteliales y constituyen aproximadamente el 85 % de los tumores. Puede desarrollarse en la mayoría de los órganos como, por ejemplo, los pulmones, colon, mama, próstata y piel. Por otra parte, los sarcomas son un tipo menos común de cáncer que se originan en los tejidos conectivos, como los huesos, músculos, cartílagos o tejidos blandos. Las leucemias y los linfomas son un tipo de cáncer procedente de las células sanguíneas. Además de estos tipos principales, existen muchos otros subtipos de cáncer, como el cáncer de tiroides, de riñón, de hígado, de páncreas, de ovario, entre otros.

Pese a la gran diversidad, comparten ciertas características que constituyen lo que se conoce como la huella digital del cáncer. Hanahan y Weinberg describieron 10 características esenciales para el desarrollo y propagación del cáncer que se detallan en la tabla 1 (4–6).

Tabla 1. Principales características distintivas de las células tumorales descritas por Hanahan y Weinberg.

CARACTERISTICAS	DESCRIPCIÓN
Señales de proliferación sostenida	Las células cancerígenas pueden generar la mayoría de las señales de crecimiento por sí mismas, reduciendo o eliminando su dependencia de estímulos externos
Evadir inhibidores del crecimiento	Las células cancerígenas pueden ignorar las señales que normalmente inhiben su crecimiento y división.
Evadir muerte celular	Las células cancerígenas pueden evitar la apoptosis, que es el mecanismo normal del cuerpo para eliminar células dañadas o innecesarias.

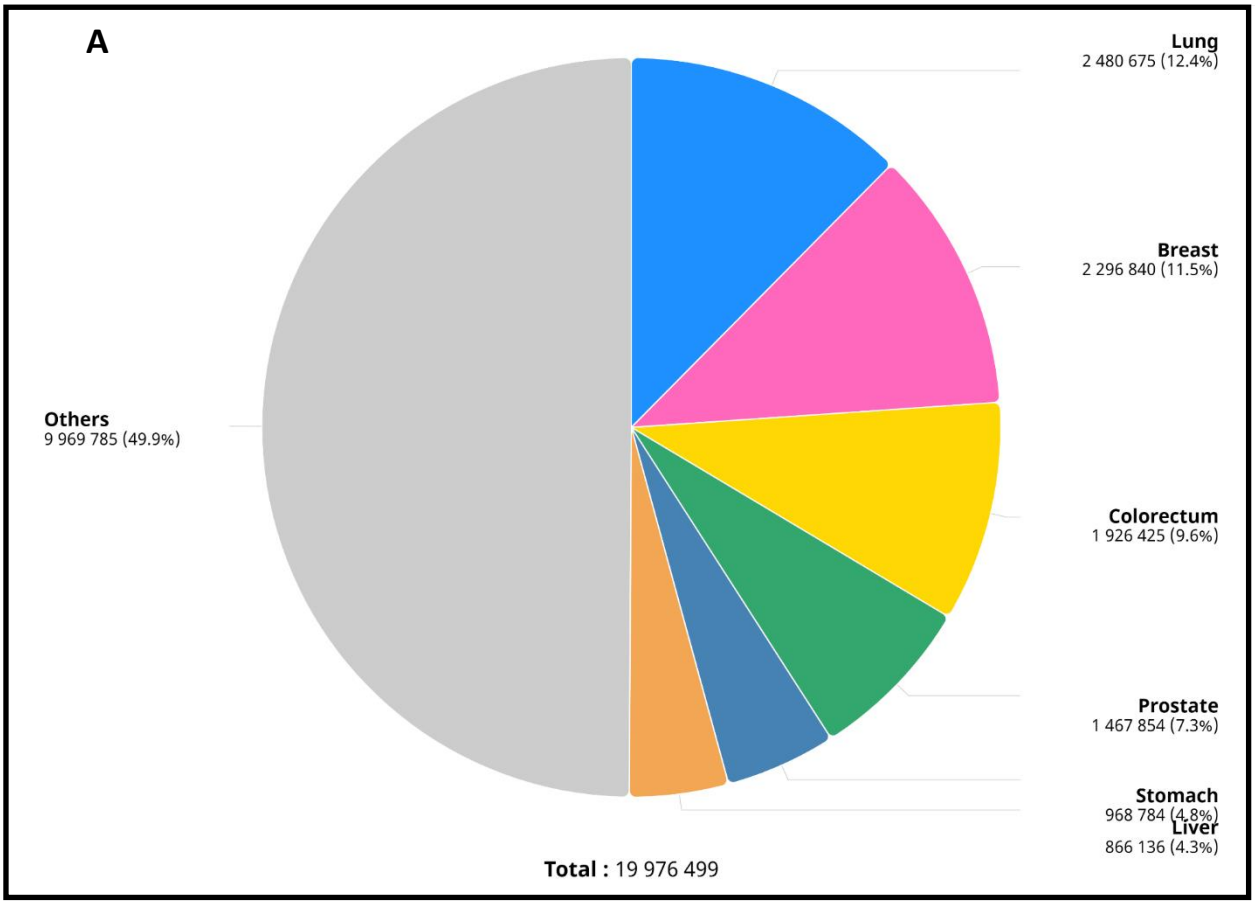
Inmortalidad replicativa	Las células cancerígenas pueden eludir la senescencia, un estado de envejecimiento celular programado, lo que les permite seguir dividiéndose y replicándose indefinidamente.
Angiogénesis	Las células cancerígenas pueden promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para asegurar un suministro constante de nutrientes y oxígeno para su propio crecimiento y supervivencia.
Invasión celular y metástasis	Las células cancerígenas pueden invadir tejidos vecinos y diseminarse a través del cuerpo para formar metástasis en sitios distantes.
Reprogramación del metabolismo energético	Las células cancerígenas pueden alterar su metabolismo para obtener energía y nutrientes de manera diferente a las células normales. Esto incluye un cambio hacia una mayor dependencia de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno (lo que se conoce como efecto Warburg), así como la utilización de vías metabólicas alternativas para la síntesis de componentes celulares necesarios para la proliferación.
Evasión de la destrucción inmunológica	El cáncer desarrolla mecanismos para evadir el sistema inmunológico, que normalmente actúa como una barrera para la tumorigénesis.
Inestabilidad genómica y mutación	Las células cancerígenas a menudo presentan una mayor inestabilidad genómica y una tasa de mutación más alta en comparación con las células normales. Esto puede deberse a errores en los mecanismos de reparación del ADN, exposición a factores mutagénicos o alteraciones en los procesos celulares que regulan la integridad del ADN.
Inflamación promovida por el tumor	Los tumores pueden desencadenar y promover una respuesta inflamatoria en su microambiente tumoral. Proporcionando un ambiente propicio para la proliferación de las células cancerosas, la angiogénesis y la invasión tisular. Además, la inflamación puede suprimir la respuesta inmunológica antitumoral.

Estas características distintivas son fundamentales para comprender la naturaleza compleja del cáncer y guiar el desarrollo de estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento más efectivas.

1.1.1 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se puede clasificar en 2 tipos principales; cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por su sigla en inglés) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por su sigla en inglés). Este último tipo representa el 85% de los casos y se pueden distinguir 3 subtipos: adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y carcinoma de células grandes (7).

El cáncer de pulmón es una enfermedad muy agresiva y de alta prevalencia a nivel mundial, con 2.5 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes en 2022, según informa la Organización Mundial de la Salud (OMS) (8), véase Figura 1. Es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, cuya incidencia varía según el género y el desarrollo socioeconómico del país en el que se encuentre. La exposición al tabaco representa uno de los principales factores de riesgo, sin embargo, la exposición a diferentes contaminantes ambientales también contribuye sustancialmente en su incidencia y mortalidad (9).



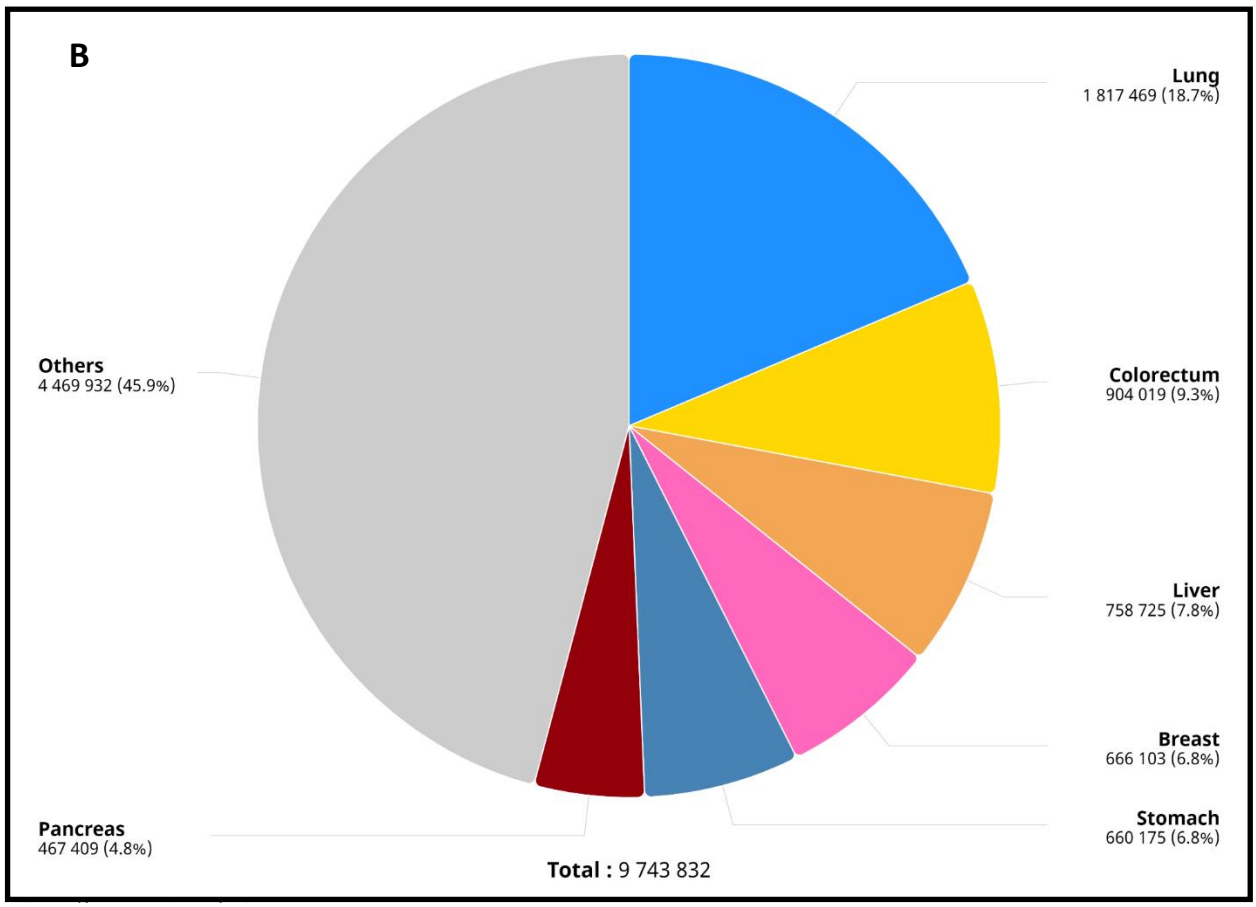


Figura 1. Gráficas de incidencia (**A**) y mortalidad (**B**) del cáncer a nivel mundial en 2022 (OMS).

La tasa de sobrevida promedio ronda los 5 años en el 23% de los casos y encabeza la lista de peor pronóstico (10). Es por tal motivo que resulta necesario e indispensable abordar esta temática para buscar alternativas de diagnóstico y tratamiento que puedan mejorar y prolongar la vida de los pacientes.

1.1.2 Tratamiento

El diagnóstico y tratamiento del cáncer dependen del tipo y la etapa de la enfermedad. El tratamiento convencional puede incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida o una combinación entre varias de ellas (11,12). En la Tabla 2 se definen las ventajas y desventajas de cada uno de los tratamientos.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los tratamientos convencionales contra el cáncer.

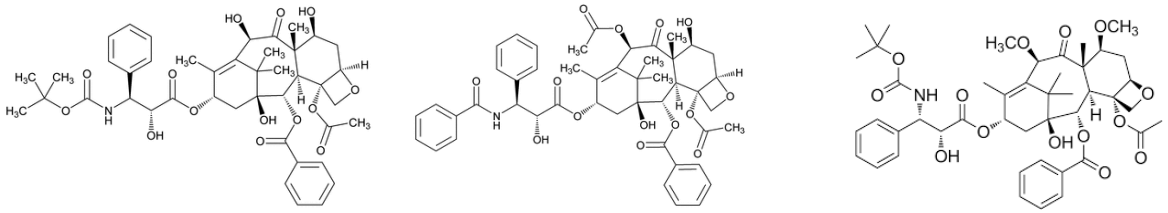
TRATAMIENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cirugía	Puede ser curativa si se elimina todo el tumor o reducir el tamaño del tumor antes de otros tratamientos.	Es invasiva y puede dejar secuelas. No siempre es posible en todos los casos, especialmente si el cáncer se ha diseminado.
Radioterapia	Utiliza radiación para destruir células cancerígenas. Puede ser efectiva en el control local del cáncer.	Utiliza radiación ionizante, por lo que puede afectar células sanas y causar efectos secundarios significativos.
Quimioterapia	Puede eliminar células cancerígenas en todo el cuerpo. Es útil para tratar cánceres que se han diseminado.	Puede afectar células sanas y causar efectos secundarios significativos, como náuseas, pérdida de cabello y fatiga. También puede generar resistencia al medicamento.
Inmunoterapia	Estimula el sistema inmunológico para atacar las células tumorales. Puede ser eficaz en algunos tipos de cáncer.	No es efectiva para todos los pacientes. Puede causar reacciones autoinmunes y otros efectos secundarios.
Terapia dirigida	Atacan específicamente a las células cancerígenas al dirigirse a receptores moleculares específicos. Por lo que generalmente presentan menos efectos secundarios que la quimioterapia convencional.	No es eficaz para todos los tipos de cáncer. Es costosa y puede desarrollar resistencia con el tiempo.

Cabe mencionar, que los avances en la investigación médica han mejorado significativamente las tasas de sobrevida y la calidad de vida de los pacientes con cáncer en las últimas décadas (13). Sin embargo, en la mayoría de los casos se diagnostica en etapas avanzadas y la quimioterapia es, por lejos, uno de los tratamientos clínicos convencionales más utilizados. La quimioterapia hace referencia a la utilización de agentes quimioterapéuticos o citotóxicos para tratar y controlar el crecimiento de células tumorales.

1.1.3 Docetaxel

Dentro de los agentes quimioterapéuticos más utilizados en terapias anticancerígenas se encuentran los taxanos; una familia de compuestos

estructuralmente relacionada que comparten una estructura de anillo central llamada baccatina III, que incluye al paclitaxel, docetaxel y carbazitaxel (14,15), véase Figura 2.



Docetaxel Paclitaxel Carbazitaxel

Figura 2. Estructura química del docetaxel, paclitaxel y carbazitaxel.

Los taxanos son producidos por plantas del género Taxus de donde deriva su nombre. Paclitaxel se obtuvo por primera vez a partir del tejo del Pacífico, *Taxusbrevifolia*, sin embargo, existen fuentes alternativas para su producción que utilizan un precursor fácilmente disponible, el 10-deacetil-baccatina III, que proviene de especies de tejo más abundantes como por ejemplo el tejo europeo *Taxusbaccata.* El Docetaxel se obtiene semi-sintéticamente del 10-deacetil-baccatina III (15). Paclitaxel (PTX) y Docetaxel (DCX) son los dos taxanos más utilizados en tratamientos anticancerígenos, ambos fármacos se unen a la subunidad β-tubulina que resulta en la estabilización y no funcionalización de los microtúbulos provocando la interrupción de la mitosis a nivel del pasaje de las fases G2/M para PTX o a nivel de fase S para DCX (15).

Estos compuestos son efectivos en varios tipos de cáncer dentro de los que se incluyen el cáncer de ovario, pulmón, próstata y mama. Sin embargo, debido a su acción sistémica, también actúan sobre células de tejido sano con alta tasa de proliferación tales como las células que se encuentran en los folículos capilares, la médula ósea o el tracto gastrointestinal (16). Esto puede causar efectos secundarios incómodos o potencialmente mortales, por lo que a menudo deben abordarse con medicación adicional (17). Asimismo, debido a la baja especificidad, requieren ser administrados en altas dosis para asegurar una

cantidad suficiente en el ambiente tumoral (18). Esto constituye uno de los problemas asociado a este tipo de compuestos, ya que el aumento en la dosis aumenta el riesgo de toxicidad y reduce la calidad de vida de los pacientes (19). Otro factor importante, que deriva del aspecto farmacéutico, es su escasa solubilidad en agua y la necesidad de utilizar excipientes para la administración intravascular (20), por ej. PTX se solubiliza con cremophor en su formulación comercial *Taxol* y DTX se solubiliza con tween 80 en la formulación comercial *Taxotere*, lo cual puede causar reacciones de hipersensibilidad y poner en riesgo la vida del paciente. Asimismo, puede ocasionar una liberación rápida del fármaco en circulación sanguínea por disociación con el surfactante y la subsecuente interacción con las proteínas del plasma (21), o también puede verse favorecida su eliminación vía renal debido al pequeño tamaño del fármaco (22,23).

Es por tal motivo que ha sido de gran interés desarrollar formulaciones de taxanos libres de excipientes, de liberación controlada y de acción más local, capaces de disminuir los efectos secundarios y mejorar la eficacia terapéutica. La encapsulación de estas drogas insolubles dentro de nanosistemas de entrega constituye una excelente solución a los problemas anteriormente mencionados.

1.2 Nanotecnología

La Nanotecnología es una rama de la Ciencia dedicada al control y manipulación de la materia a escala nanométrica en un rango entre 1 y 100 nanómetros (24). Una de las áreas más importantes de la Nanotecnología es la que generalmente se denomina Nanomedicina, dentro de la que se encuentra a los nanosistemas de liberación controlada de fármacos. Estos nanosistemas son utilizados como reservorios para el transporte, la liberación controlada y la protección de los principios activos que contienen, asegurando el transporte de medicamentos sólo a las células o zonas afectadas proporcionando un tratamiento más efectivo y con menos efectos secundarios (25).

En el caso de los taxanos existen varios argumentos que respaldan el uso de la nanomedicina para mejorar su eficacia terapéutica. En primer lugar, la

encapsulación física o la conjugación química de los taxanos en nanopartículas anfifílicas puede mejorar significativamente la solubilidad del fármaco y, el material pared, puede servir como un escudo protector contra la degradación química y bioquímica (26,27). En segundo lugar, los compuestos hidrofóbicos, solubilizados con surfactantes convencionales, pueden ser susceptibles a disociarse del surfactante y/o a difundir rápidamente fuera de la fase dispersa, lo cual puede resultar en su entrada prematura en el torrente sanguíneo. Este problema puede prevenirse mediante la conjugación química o la formación de interacciones no covalentes fuertes entre el fármaco y la nanopartícula (28–30). En tercer lugar, la rápida eliminación renal de estos fármacos anticancerígenos de pequeño tamaño puede evitarse al ser encapsulados en nanopartículas con un tamaño mayor a 5 nm, ya que no pasan fácilmente por el filtro renal (31,32). Esto puede prolongar significativamente la vida media del fármaco. De hecho, numerosos estudios *in vivo* reportan diferencias en los perfiles farmacocinéticos de principios activos encapsulados dentro de las nanopartículas en comparación con la droga libre (33–36). Cuarto, se sabe que las nanopartículas se distribuyen pasivamente por todo el cuerpo de manera heterogénea. Los nanomateriales tienden a acumularse en tejidos altamente vascularizados y de carácter poroso (37,38). Este fenómeno puede ser explotado para proporcionar una entrega más selectiva de fármacos en tumores, ya sea en combinación o no con estrategias adicionales de vectorización activa. La vectorización pasiva y activa se discutirá con más detalle en la sección 1.7. Quinto, los nanotransportadores pueden diseñarse y/o modificarse químicamente para desencadenar una respuesta a estímulos internos o externos específicos (por ejemplo, cambios en pH, enzimas, redox, ultrasonido, luz). Estas propiedades bio-estimulantes pueden mejorar aún más la selectividad y el control en la entrega de agentes anticancerígenos y, por lo tanto, aumentar su eficacia terapéutica (39,40). Finalmente, las nanopartículas pueden alterar significativamente la vía de internalización celular de los fármacos y, por lo tanto, limitar la resistencia a los mismos. Los fármacos hidrofóbicos típicamente ingresan a las células tumorales por difusión pasiva. Mientras que las nanopartículas son predominantemente internalizadas por endocitosis, un mecanismo que puede ser potenciado aún más por estrategias de vectorización activa (41). La difusión pasiva del fármaco libre resulta en una concentración intracelular moderada, mientras que la endocitosis de los nanosistemas permite la

entrega de una gran cantidad de fármaco en un período de tiempo relativamente corto (42). Las altas concentraciones intracelulares de fármaco resultantes pueden saturar el flujo de salida mediado por proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MDR por su sigla en inglés) como las glicoproteínas P (P-gp) (43). Esto puede ser especialmente útil para mejorar la eficacia de agentes quimioterapéuticos a los que se ha informado resistencia a medicamentos.

Los esfuerzos dedicados en el campo de la nanomedicina en los últimos años dieron como resultado el desarrollo y la aprobación para uso médico de varios tipos de nanoformulaciones para el tratamiento del cáncer. Así como también existen numerosos trabajos en etapas de ensayos clínicos y preclínicos en progreso.

Doxil® fue la primera formulación liposomal en recibir la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en Estados Unidos en el año 1995 para el tratamiento del cáncer de ovario y el sarcoma de Kaposi asociado al virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Después de un año, NeXstar Pharmaceuticals desarrolló nanopartículas cargadas con daunorubicina (DaunoXome®) para tratar el sarcoma de Kaposi asociado con el VIH. En el año 2000, Myocet® obtuvo la aprobación de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento del cáncer metastásico, se trata de una formulación que contiene doxorrubicina y ciclofosfamida. Más tarde, Marqibo® obtuvo la aprobación de la FDA para el tratamiento del linfoma no Hodgkin y la leucemia. En 2013, Lipusu tuvo lugar al incorporar paclitaxel en liposomas para el tratamiento de cánceres gástrico, de ovario y de pulmón (44). Luego, en 2017, Vyxeos obtuvo la aprobación de la FDA. Es una formulación liposomal de daunorrubicina y citarabina (45). El liposoma PEGilado cargado con irinotecán (Onivyde) y el liposoma cargado con citarabina (DepoCyt) también obtuvieron aprobación para el tratamiento del adenocarcinoma pancreático y la meningitis linfomatosa, respectivamente.

Si bien las preparaciones liposomales aprobadas son mayoritarias en comparación con otros tipos de nanosistemas, existen también otros tipos de nanoformulaciones aprobadas para uso clínico. Eligard® es un nanopartícula polimérica cargada con acetato de leuprorelina que obtuvo la aprobación de la

FDA en 2002 para el cáncer de próstata. Otra formulación es Nanoxel®, compuesta de monómeros de N-isopropilacrilamida y vinilpirrolidona cargada con docetaxel. Obtuvo aprobación en India para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, cáncer de ovario, NSCLC y sarcoma de Kaposi asociado con el VIH. Apealea es otro medicamento que obtuvo aprobación de la EMA para tratar el cáncer epitelial de ovario, cáncer peritoneal primario y cáncer de trompas de Falopio. Es una formulación micelar polimérica que contiene paclitaxel. Ferucarbotran (recubierto con carboxidextrano) y Ferumoxide (recubierto con dextrano) fueron dos nanopartículas de óxido de hierro que obtuvieron aprobación para el etiquetado celular, especialmente en los Estados Unidos. NanoTherm es un medicamento aprobado por la EMA para tratar el glioblastoma, el cáncer de próstata y el cáncer de páncreas. Es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético recubierta con aminosilano. Si bien se identificaron algunos efectos adversos moderados con NanoTherm, ha resultado ser beneficiosa para aumentar el tiempo de circulación en sangre y la captación tumoral (46).

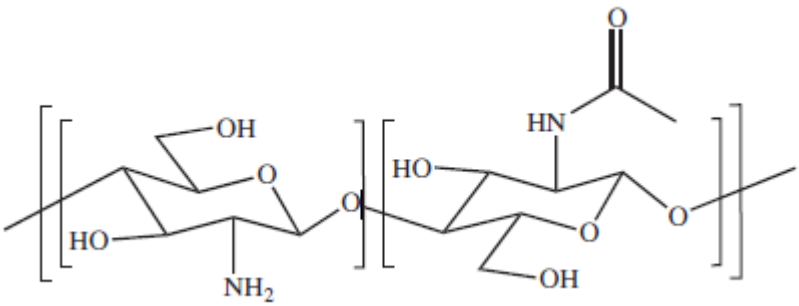
Asimismo, dentro de la vasta cantidad de publicaciones bibliográficas reportadas en el área de la nanomedicina, existen varios tipos de nanosistemas que han sido utilizados como transportadores de taxanos en terapias anticancerígenas dentro de los que se incluyen a las nanopartículas poliméricas de quitosano (CS) (46–48) o del copolímero de ácido glicólico y láctico (PLGA) (49–51), liposomas (52,53), nanopartículas lipídicas sólidas (54,55) y nanopartículas hibridas lípido-polímero (LPHNp) (56–59).

Los nanosistemas poliméricos pueden presentar características excepcionales que los hacen buenos candidatos para aplicaciones biomédicas, ya que además de ser biocompatibles y biodegradables, los polímeros pueden ser modificados químicamente otorgándoles una gran versatilidad a la hora de diseñar dichos sistemas (60). Las nanopartículas poliméricas pueden clasificarse en nanocápsulas o en nanoesferas. Las nanoesferas son sistemas matriciales, en donde el fármaco está dispuesto en una matriz polimérica, mientras que las nanocápsulas están constituidas por un envoltorio polimérico dispuesto alrededor de un núcleo oleoso (61).

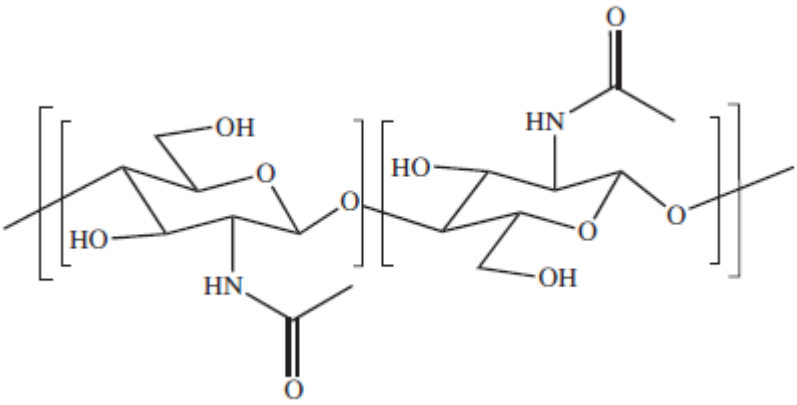
Para el marco de este proyecto se plantean dos tipos de nanosistemas poliméricos. Uno de ellos basado en CS para el desarrollo de nanocápsulas poliméricas. El otro sistema está basado en PLGA, inicialmente con el fin de obtener nanoesferas poliméricas, sin embargo, en una segunda etapa evolucionó hacia la formación de LPHNp.

1.3 Quitosano (CS)

Uno de los polímeros más utilizados para la preparación de nanosistemas es el CS (véase Figura.3), un polisacárido lineal semi-cristalino compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidos mediante enlaces glucosídicos β (1-4), cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{24}N_2O_9$ (62). El CS resulta de la desacetilación parcial de la quitina (véase Figura 3), el segundo biopolímero más abundante luego de la celulosa, que se encuentra comúnmente formando parte del exoesqueleto de artrópodos o de las paredes celulares de hongos y levaduras (63). A escala industrial, las dos principales fuentes de CS son los crustáceos y los micelios de hongos (64,65).



Quitosano



Quitina

Figura 3. Estructura química del CS y la quitina.

La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis química bajo condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática, donde entran en acción enzimas tales como la quitina desacetilasa (66,67). Cuando el grado de desacetilación (DD) de la quitina supera el 60% se convierte en CS (68). El método elegido determina el peso molecular (PM) y DD del polímero, los cuales a su vez afectan de forma directa las propiedades químicas y biológicas del mismo (68).

El DD de CS es un indicativo del número de grupos amino a lo largo de las cadenas, y se calcula como la relación entre la D–glucosamina y la suma de D-glucosamina y N- acetil D-glucosamina (64). De hecho, la presencia de grupos amino, revela que el pH altera la carga y las propiedades del CS (69).

El CS es poco soluble, excepto en soluciones acuosas ácidas, donde los grupos amino de los residuos de D-glucosamina pueden ser protonados otorgándole solubilidad (70). Estos grupos amino protonados, cuyo pKa tiene un valor de 6.3, convierten al CS en un policatión capaz de formar complejos iónicos con una amplia variedad de compuestos aniónicos naturales o sintéticos (71), tales como lípidos, proteínas, ADN y algunos polímeros sintéticos cargados negativamente.

El CS es insoluble en agua debido a su gran PM y a los fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que limita un poco sus aplicaciones biológicas. Sin embargo, hay dos formas de mejorar la solubilidad del CS en agua: (i) su

degradación para formar oligosacáridos de cadena más pequeña o (ii) convertir una sal de CS (72). En la actualidad hay disponibilidad en el mercado de CS y sales de CS de diferentes PM, o incluso derivados con grupos sustitutos para mejorar algunas de sus propiedades.

1.3.1 Propiedades del CS

La mayoría de las propiedades que hacen del CS un candidato excelente para aplicaciones biomédicas, surgen de la presencia de aminas primarias a lo largo de su cadena. Éste polisacárido además de ser biocompatible y biodegradable (73–76), exhibe actividad antibacteriana y antifúngica (77–79), mucoadhesiva (80,81), analgésica (82) y hemostáticas (83,84).

La mucoadhesión de CS, por ejemplo, se puede explicar por la presencia de residuos cargados negativamente (ácido siálico) en la mucina, la glicoproteína que compone el moco, que pueden interactuar con los grupos aminos del CS cargados positivamente. Esta mucoadhesión está directamente relacionada con el DD del CS puesto que si se incrementa el DD, el número de cargas positivas también aumenta, lo que conduce a mejores propiedades mucoadhesivas (85).

La actividad hemostática de CS también puede ser relacionada con la presencia de cargas positivas en la columna vertebral de dicho polímero. De hecho, las membranas de los glóbulos rojos están cargados negativamente, y por lo tanto puede interactuar con las cargas positivas del CS (86,87).

El CS también puede interactuar con la porción negativa de las membranas celulares, provocando la reorganización y apertura de las proteínas de unión estrecha, esto explica las propiedades de alta permeabilidad de este polisacárido. Por lo que si el DD del CS aumenta, la capacidad de permeación también aumenta (88).

En cuanto a su actividad antimicrobiana y antifúngica; se ha informado de dos mecanismos principales en la literatura para explicarlas. En el primer mecanismo propuesto, el CS cargado positivamente puede interactuar con grupos

cargados negativamente en la superficie de las células, y, como consecuencia, modificar su permeabilidad. Esto evitaría el ingreso de material esencial en las células y/o conducir a la filtración de solutos fundamentales fuera de la misma. El segundo mecanismo implica la unión de CS con el ADN de la célula, lo cual conduce a la inhibición de la síntesis de ARN microbiano. Por lo tanto, las propiedades antimicrobianas del CS podría ser el resultado de una combinación de ambos mecanismos (89,90).

La naturaleza policatiónica del CS también permite explicar sus efectos analgésicos. Debido a que los grupos amino de los residuos de D- glucosamina pueden protonarse en presencia de iones con carga positiva que se liberan en el área inflamatoria, lo cual resulta en un efecto analgésico (91).

Para explicar la biodegradabilidad del CS, es importante recordar que es un polisacárido que contiene enlaces glucosídicos rompibles, y en consecuencia, puede ser degradado *in vivo* por varias proteasas, principalmente la lisozima (92). La biodegradación del CS conduce a la formación de oligosacáridos no tóxicos de longitud variada que pueden ser incorporados en las vías metabólicas o de excreción (93). La tasa de degradación de CS está relacionada con su DD, la distribución de residuos de N-acetil-D-glucosamina y la masa molecular del mismo (94–96).

Para explicar la relación entre biodegradación y DD cabe destacar que el CS es un polímero semi-cristalino; de hecho, la cristalinidad es máxima para un DD igual a 0 o 100% (quitina o CS totalmente desacetilado, respectivamente), y disminuye para valores intermedios. Sin embargo, como la cristalinidad del polímero se relaciona de forma inversa con la cinética de biodegradación, cuando el DD del CS disminuye (cerca del 60 %), su cristalinidad también disminuye, lo que resulta en un aumento de la velocidad de biodegradación. Además, la distribución de residuos acetilo a lo largo de CS también afectará su cristalinidad, y por lo tanto la velocidad de biodegradación. Por último, se puede suponer razonablemente que cadenas pequeñas de CS se degradarán más rápidamente en oligosacáridos que cadenas de CS con mayor masa molecular (64).

El CS ha demostrado ser biocompatible. Sin embargo, la compatibilidad con el medio fisiológico depende del método de preparación (proteínas residuales podrían causar reacciones alérgicas) y del DD (cuanto mayor es el DD mayor la biocompatibilidad). De hecho, el CS es más citocompatible *in vitro* que la quitina, puesto que a medida que el número de cargas positivas aumenta, la interacción entre las células y el CS aumenta por lo que tiende a mejorar la biocompatibilidad (97).

Teniendo en cuenta todas las propiedades mencionadas anteriormente, no es sorprendente que el CS fue, es y será puesto a prueba en muchas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas principalmente para su uso en ingeniería tisular (98–101), como excipiente para la administración de fármacos (102,103), formación de micropartículas (104–106) y nanopartículas (107–109).

1.3.2 Nanopartículas de CS

En éste trabajo se hará énfasis en las peculiaridades de los sistemas nanométricos de CS, y tal como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas poliméricas han sido ampliamente investigadas como vehículos para la administración de fármacos, de hecho en este sentido las nanopartículas presentan ciertas ventajas frente a otros sistemas de entrega, como por ejemplo los liposomas, ya que a diferencia de éstos, las nanopartículas presentan mayor vida útil y tienen la capacidad de encapsular más droga (110).

Además, varios estudios han destacado la importancia del tamaño en éstos sistemas revelando las ventajas de las nanopartículas sobre las microesferas (111,112). Su fácil accesibilidad dentro del cuerpo permite que las nanopartículas puedan ser transportadas a través de la circulación a diferentes destinos. Por lo tanto, éstos sistemas no sólo podrían controlar la velocidad de administración del fármaco; lo cual prolonga la duración del efecto terapéutico, sino también entregar la droga a un sitio específico.

Normalmente, las nanopartículas de CS se obtienen mediante el método de gelificación iónica (113), a través del extenso entrecruzamiento intermolecular

entre los grupos amino con carga positiva del CS con las cargas negativas de una amplia variedad de compuestos aniónicos. Éstos últimos pueden ser pequeños iónes tales como el tripolifosfato de sodio (114), o grandes macromoléculas polianiónicas como ser proteínas, ADN u otros polisacáridos (115).

El método de gelificación iónica presenta las ventajas de ser un proceso no tóxico, libre de disolvente orgánico, fácil y controlable (116). Sin embargo, uno de los inconvenientes de este método es la baja carga de fármaco durante la formación de las partículas, en especial cuando se trata de compuestos hidrofóbicos como el DCX. Además, las nanopartículas formadas son sensibles a los cambios de pH y concentración iónica, lo que podría causar una alta liberación del fármaco antes de llegar al sitio diana (117).

Uno de los métodos de preparación de nanopartículas de CS más utilizados para la encapsulación de drogas hidrofóbicas es la técnica de desplazamiento de solvente (118), donde se lleva a cabo la preparación de una nanoemulsión espontánea y posterior evaporación del solvente, véase Figura 4. La nanoemulsión se prepara añadiendo una fase orgánica, que contiene la droga hidrofóbica, a una fase acuosa que contiene al polisacárido. Generalmente en la fase orgánica también está presente alguna molécula de carácter anfifílico, como los fosfolípidos (ejemplo: lecitina de soja). Es decir que, al entrar en contacto con la fase acuosa, se disponen en forma de gotícula donde la porción polar queda expuesta en la superficie, en contacto con el medio acuoso, y su parte apolar quede dispuesta hacia adentro de la vesícula formando lo que se conoce como una emulsión aceite en agua. Las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del CS y las cargas negativas de la lecitina de soja dan lugar a la formación de nanocápsulas de cubierta polimérica y núcleo oleoso, que permiten una alta eficiencia de encapsulación de compuestos hidrofóbicos tales como el DCX (119).

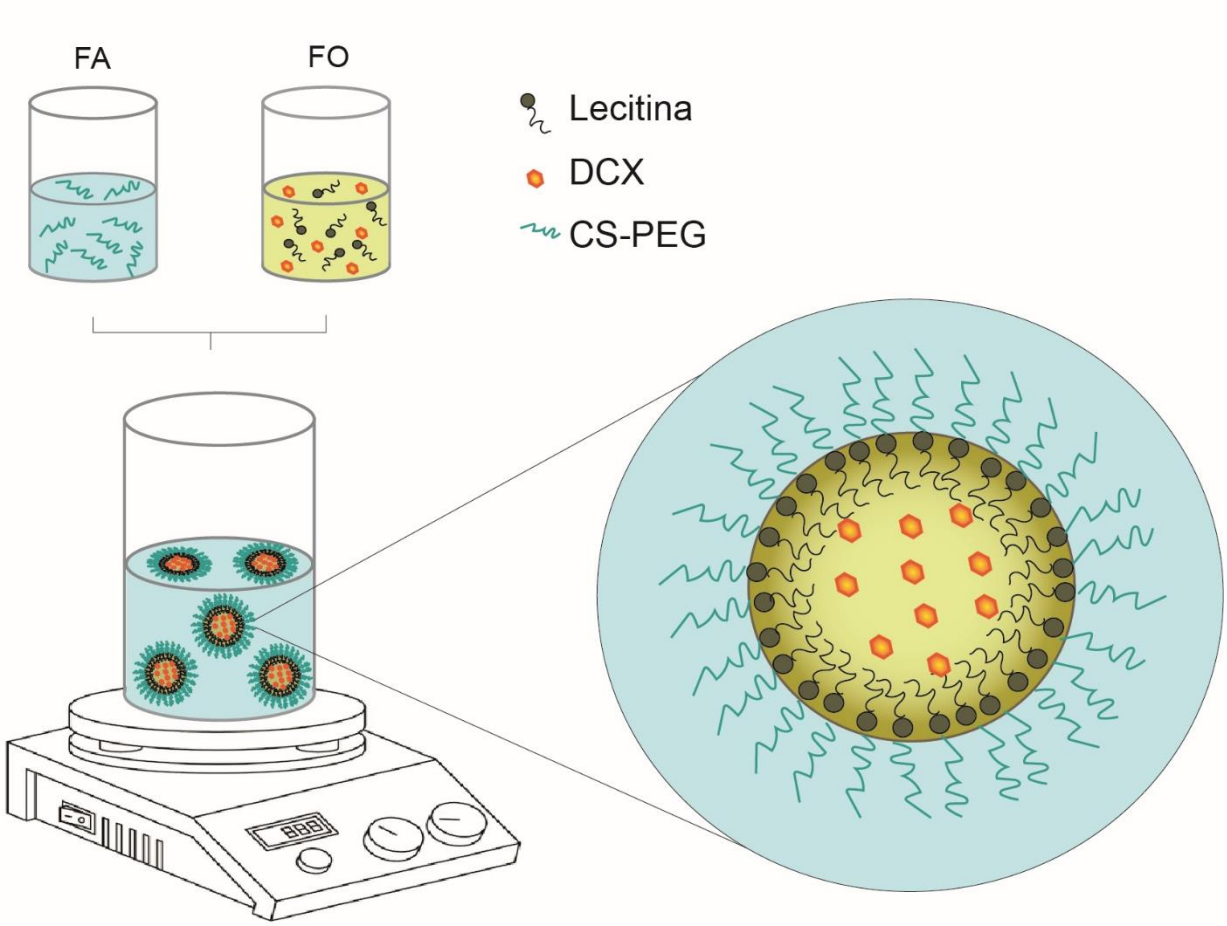


Figura 4. Esquema representativo del método de desplazamiento de solvente y formación de las nanocápsulas de CS conteniendo DCX.

1.4 PLGA

El PLGA es un co-polímero sintético biodegradable y biocompatible, ampliamente utilizado para la formación de nanosistemas debido a que su hidrólisis genera monómeros de ácido glicólico y ácido láctico, los cuales pueden ser fácilmente metabolizados por el organismo vía ciclo de Krebs (120). Ha sido aprobado por la FDA y por la EMA en varios sistemas de entrega utilizados en humanos por vía venosa, oral y cutánea. El PLGA está compuesto por unidades de ácido poli-láctico (PLA) y ácido poli-glicólico (PGA) mediante enlaces éster, resultando en la formación de un poliéster alifático lineal, tal como se observa en la Figura 5. Dependiendo de la proporción de lactida y glicolida se pueden obtener diferentes formas de PLGA: estas suelen identificarse en función de la relación de los monómeros utilizados (es decir, PLGA 75:25 identifica un copolímero

compuesto por 75% de ácido láctico y 25% de ácido glicólico). Se sintetiza típicamente mediante la polimerización por apertura de anillo (ROP, del inglés ring opening polymerization) de lactida con glicolida utilizando catalizadores metálicos a altas temperaturas (130–220 °C), incluyendo 2-etilhexanoato de estaño (II), alcóxidos de estaño (II) o isopropóxido de aluminio. Entre estos catalizadores, el octoato de estaño (SnOct2) es un catalizador comercial altamente eficiente y un aditivo alimentario permitido en numerosos países. Más recientemente, se ha descrito una técnica de polimerización enzimática que aparece como una alternativa para obtener poliésteres alifáticos no contaminados con posibles residuos metálicos tóxicos, lo cual es una prerrogativa esencial para un material con fines biomédicos.

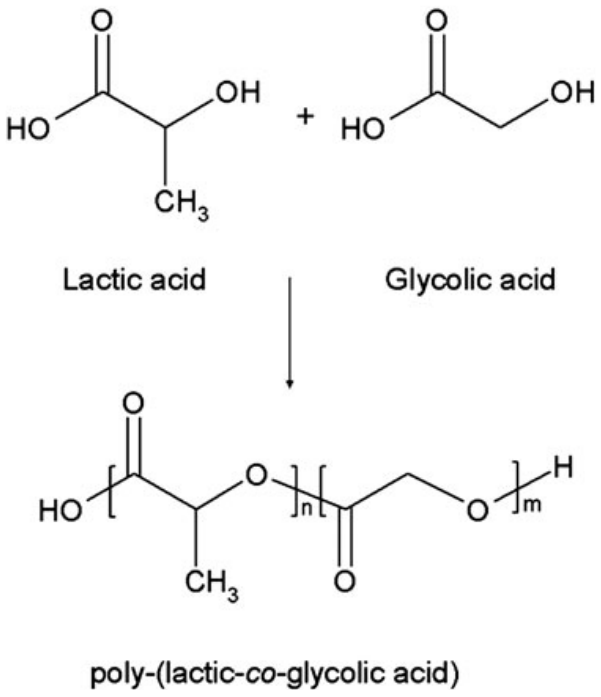


Figura 5. Estructura química del PLGA y sus monómeros constituyentes; ácido láctico (LA) y ácido glicólico (GA).

1.4.1 Propiedades del PLGA

Para diseñar de forma eficiente los nanosistemas de liberación controlada de fármacos, es fundamental comprender las propiedades físicas, químicas y biológicas del PLGA. Estas propiedades dependen de diferentes factores,

incluyendo el peso molecular de sus monómeros constituyentes, la relación LA:GA, el tiempo de exposición al agua y la temperatura de almacenamiento [29].

El PLA presenta un grupo metilo en el carbono alfa que le confiere 2 formas enantioméricas conocidas como ácido poli-L-láctico (PLLA) y ácido poli-D-láctico (PDLA). En general, el polímero PLA puede obtenerse en forma altamente cristalina (PLLA) o completamente amorfa (PDLA). Por otra parte, el PGA carece de grupos metilo por lo que muestra una estructura altamente cristalina. El PLGA es un polímero amorfo, soluble en solventes clorados, tetrahidrofurano, acetona o acetato de etilo (121–123).

El PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster, a través de la erosión a granel o heterogénea, en entornos acuosos. La presencia de grupos laterales metilo en el PLA lo hace más hidrofóbico que el PGA y, por lo tanto, los copolímeros de PLGA ricos en lactida son menos hidrofílicos, absorben menos agua y se degradan más lentamente. Se pueden distinguir cuatro pasos durante su degradación: (1) hidratación: el agua penetra en la región amorfa y rompe las fuerzas de van der Waals y los enlaces de hidrógeno, causando una disminución en la temperatura de transición vítrea (Tg, por su sigla en inglés); (2) degradación inicial: escisión de enlaces covalentes, con una disminución en el peso molecular; (3) degradación constante: los grupos terminales carboxílicos autocatalizan el proceso de degradación, y la pérdida de masa comienza por la escisión masiva de los enlaces covalentes del esqueleto, lo que resulta en la pérdida de integridad; (4) solubilización: los fragmentos se cortan aún más en moléculas que son solubles en el entorno acuoso (124).

Una vez degradados, los componentes monoméricos de cada polímero son eliminados por vías naturales. El PGA se convierte en metabolitos o se elimina mediante otros mecanismos, y el PLA puede eliminarse a través del ciclo de Krebs (125). Las tasas de degradación pueden ser influenciadas por diferentes parámetros (126,127):

- Peso molecular: Al aumentar el peso molecular de los PLGAs de 10 a 100 kDa, se ha observado que las tasas de degradación varían entre varias semanas y varios meses.

- Relación de GA a LA: Los PLGA con un mayor contenido de LA son menos hidrofílicos, absorben menos agua y, por lo tanto, se degradan más lentamente. Esto se debe a la presencia de grupos laterales metilo en el PLA, lo que lo hace más hidrofóbico que el PGA. Una excepción a esta regla es el copolímero 50:50, que muestra una degradación más rápida.
- Estereoquímica: Las mezclas de monómeros de ácido láctico D y L son las más comúnmente utilizadas para la fabricación de PLGA, ya que la velocidad de penetración del agua es mayor en las regiones amorfas de D,L, lo que conduce a una degradación acelerada de PLGA.
- Funcionalización de los grupos terminales: Los polímeros que están terminados con ésteres (en lugar del ácido carboxílico libre) muestran tazas de degradación más prolongadas.

El cambio en las propiedades del PLGA durante la biodegradación del polímero influye en las tasas de liberación y degradación de las moléculas de fármaco incorporadas. De hecho, la duración y el nivel de liberación de la droga desde la nanopartícula pueden ser modulados cambiando algunos parámetros tales como la relación droga/polímero o el peso molecular del polímero y su composición (128).

Asimismo, la resistencia mecánica, el comportamiento de hinchamiento, la capacidad para sufrir hidrólisis y posteriormente la velocidad de biodegradación del polímero están directamente influenciados por el grado de cristalinidad del PLGA, que depende además del tipo y la proporción molar de los componentes monoméricos individuales en la cadena de copolímero. El PGA cristalino, cuando se copolimeriza con PLA, reduce el grado de cristalinidad del PLGA y, como resultado, aumenta la velocidad de hidratación e hidrólisis. Como regla general, un mayor contenido de PGA conduce a tasas de degradación más rápidas, con la excepción de la relación 50:50 de PLA/PGA, que muestra la degradación más rápida. El grado de cristalinidad y el punto de fusión de los polímeros están directamente relacionados con el peso molecular del polímero. La Tg del PLGA está por encima de la temperatura fisiológica de 37 °C y, por lo tanto, tienen un comportamiento vítreo en la naturaleza, lo que muestra una estructura de cadena bastante rígida. Además, se ha informado que la Tg disminuye con una

disminución del contenido de lactida en la composición del copolímero y con una disminución en el peso molecular (129,130).

1.4.2 Nanopartículas de PLGA

1.4.2.1 Nanoesferas de PLGA

Una de las técnicas más comúnmente utilizada para la preparación de las nanopartículas de PLGA es la nanoprecipitación, descrita por primera vez en 1989 por Fessi et al. (131). Se trata de un método rápido, reproducible y sencillo que permite encapsular tanto compuestos hidrofóbicos como hidrofílicos.

En primer lugar, el polímero y la droga se disuelven en un solvente orgánico miscible con el agua (como, por ejemplo, etanol o acetona). Esta fase orgánica (FO) se añade gota a gota a un recipiente conteniendo la fase acuosa (FA, agua) bajo agitación vigorosa (132). Posteriormente, el solvente orgánico se evapora y se realizan varios lavados por centrifugación. Esta técnica se basa en 4 etapas principales: sobresaturación, nucleación, crecimiento y coagulación (133). Inicialmente, la FO tiende a difundir en la mezcla, resultando en un efecto de sobresaturación ya que disminuye la potencia del solvente para disolver el soluto. Esto, a su vez, desencadena la precipitación del soluto que se ve fomentado, aún más, por la evaporación del solvente. La sobresaturación induce la nucleación con el fin de ganar estabilidad termodinámica. El núcleo comienza a crecer mediante la asociación de moléculas de soluto hasta llegar a un tamaño lo suficientemente estable contra la disolución. Luego, los núcleos crecen mediante condensación o coagulación. Cuando la concentración de soluto no adsorbido se reduce por debajo de la concentración de saturación de equilibrio, la condensación se detiene. Por otro lado, la coagulación es la adhesión de partículas entre sí. Ocurre cuando las interacciones atractivas (interacciones de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc.) son más fuertes que las interacciones repulsivas. Con esta técnica se obtienen nanoesferas de PLGA, es decir, un sistema matricial donde el polímero se dispone formando una red polimérica en la que queda contenido el principio activo, como se observa en la Figura 6.

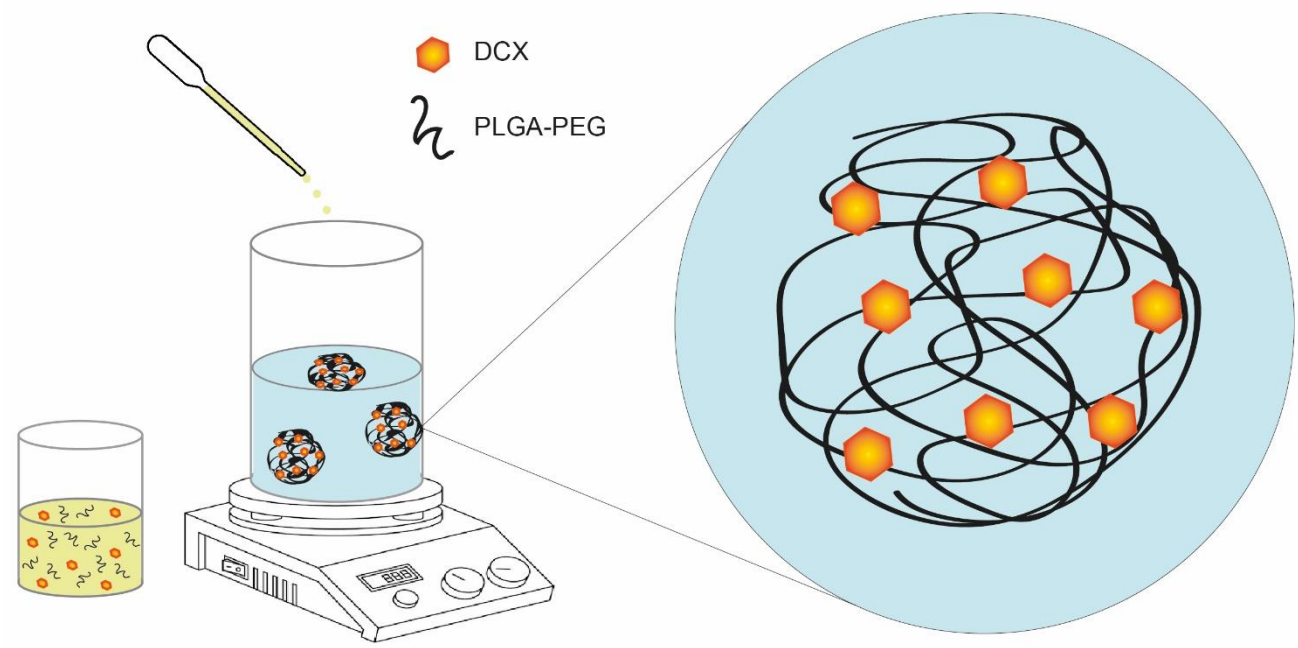


Figura 6. Esquema representativo del método de nanoprecipitación y formación de las nanoesferas de PLGA conteniendo DCX.

1.4.2.2 Nanopartículas híbridas lípido/polímero

Tal como se mencionó anteriormente, la FDA ha aprobado varios nanosistemas para uso clínico, siendo las nanopartículas poliméricas y los liposomas las variedades más prometedoras debido a sus propiedades biocompatibles y biodegradables (134). En general, las formulaciones liposomales disponibles comercialmente presentan la ventaja de aumentar la solubilidad del compuesto activo y protegerlo de factores extrínsecos dañinos, poseen alta biocompatibilidad debido a la similitud con las membranas biológicas, así como una liberación prolongada del fármaco y pueden ser fácilmente modificados en su superficie. Sin embargo, algunas desventajas, como la baja estabilidad de almacenamiento, limitan su uso más amplio (135). Las nanopartículas poliméricas son más fáciles de preparar y exhiben una alta integridad estructural, mayor estabilidad y capacidad de liberación controlada.

Para superar las limitaciones de las nanopartículas poliméricas y los liposomas mientras se combinan los atributos favorables de ambos nanosistemas, se ha desarrollado una nueva generación de LPHNp (véase Figura 7). Estos nanosistemas consisten en un núcleo polimérico rodeado por una cubierta

lipídica. El componente polimérico proporciona soporte a la estructura híbrida y también es capaz de encapsular tanto medicamentos hidrofílicos como hidrofóbicos. La cubierta lipídica ayuda a evitar la rápida eliminación de las nanopartículas por el sistema retículoendotelial (RES), puede ser modificada químicamente para permitir la entrega dirigida de medicamentos, actúa como barrera para mitigar la fuga del principio activo encapsulado y protege el núcleo de la degradación al evitar la difusión de agua hacia el interior (136,137).

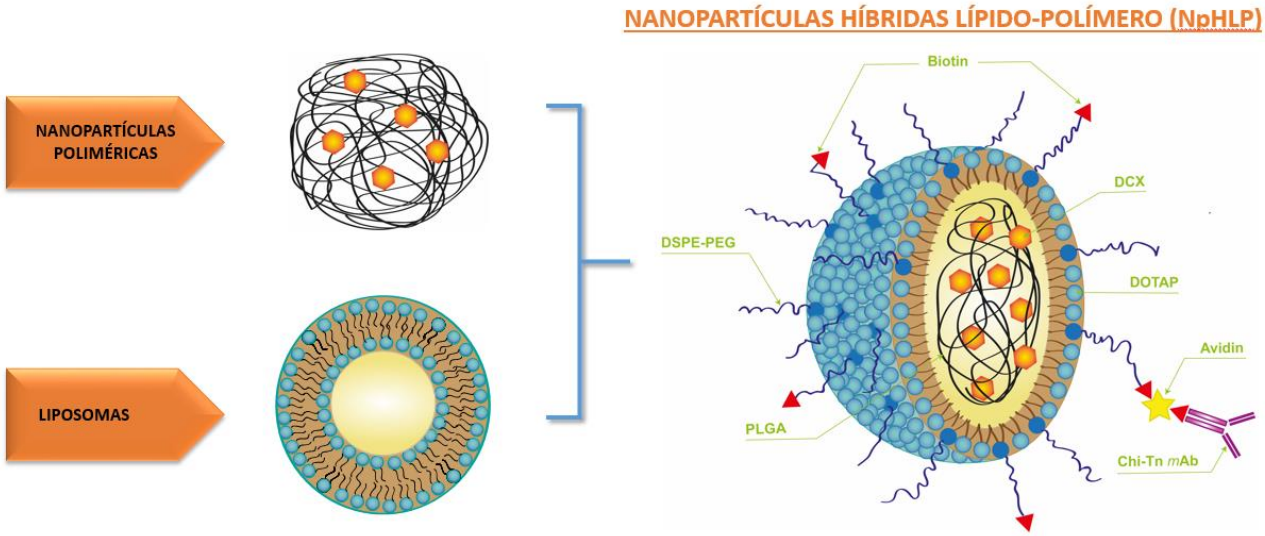


Figura 7. Representación esquemática de una nueva generación de LPHNp a partir de la combinación de liposomas y nanopartículas poliméricas.

Estas nanopartículas, con capas lipídicas alrededor de un núcleo polimérico, pueden prepararse rápidamente utilizando un método de nanoprecipitación y autoensamblado en un solo paso para lograr una alta eficiencia de encapsulación de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (138). En nuestro caso particular, están compuestas por 1) PLGA como núcleo hidrofóbico para encapsular principios activos hidrofóbicos, como el DCX. 2) DOTAP como una capa lipídica catiónica que rodea el núcleo polimérico; 3) DSPE-PEG y DSPE-PEG-Biotina son lípidos PEGilados, uno de ellos con terminación biotina, que sirven como una capa externa de polietilenglicol (PEG) que se incorpora en la porción lipídica, extendiendo su tiempo de circulación en sangre y ofreciendo grupos de funcionalización para conjugar ligandos específicos con el fin de direccionar las nanopartículas al sitio de interés.

1.5 Barreras biológicas

Estos nanosistemas, al igual que los medicamentos convencionales, deben superar numerosas barreras biológicas para finalmente llegar al sitio de acción y cumplir su función. Dependiendo de la vía de administración, deberán atravesar barreras a nivel “sistemas”, a nivel “órgano” o a nivel “celular”, e incluso, una vez dentro de las células de interés, deben ser capaces de escapar de los endosomas, antes de que maduren a lisosomas, o quizás deban ingresar al núcleo celular para ejercer su acción biológica. En este apartado nos centraremos en las barreras biológicas a las que podrían enfrentarse las nanopartículas en una vía de administración intravenosa y, posteriormente, veremos las estrategias de diseño que existen en la nanotecnología para sortearlas.

La primera barrera a la que se enfrentan las nanopartículas que son administradas vía intravenosa es la sangre, un líquido complejo compuesto principalmente por proteínas, aminoácidos, sales, azucares y células, tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas (139). Dentro de las principales proteínas que componen la sangre se encuentran la albumina, fibronectina, laminina, inmunoglobulina, apolipoproteína, proteínas del complemento, entre otras (140,141). Cuando las nanopartículas ingresan al torrente sanguíneo (véase Figura 8) las proteínas plasmáticas rápidamente comenzarán a adsorberse en su superficie dando lugar lo que se conoce como corona proteica (CP), mediada principalmente por interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals o interacciones hidrofóbicas (142). La formación de esta CP compromete en gran medida el desempeño de las nanopartículas, ya que podrían bloquear el ligando direccionador o incluso modificar el perfil de liberación del fármaco encapsulado, así como también, dependiendo de la naturaleza de la proteína unida, podrían desencadenar mecanismos de eliminación y destrucción de las nanopartículas. En este último escenario, si se tratase de inmunoglobulinas o proteínas del complemento, también llamadas opsoninas, es de amplio conocimiento que tienen una estrecha relación con el sistema fagocítico mononuclear (MPS, por su sigla en inglés). Esto se debe a la presencia de receptores específicos contra opsoninas en las membranas plasmáticas de los monocitos (143). Por lo que las nanopartículas rodeadas de opsoninas serán reconocidas como cuerpos extraños

y rápidamente eliminadas por el sistema fagocítico mononuclear, principalmente las células de Kupffer presentes en el hígado y los macrófagos del bazo o pulmón (144).

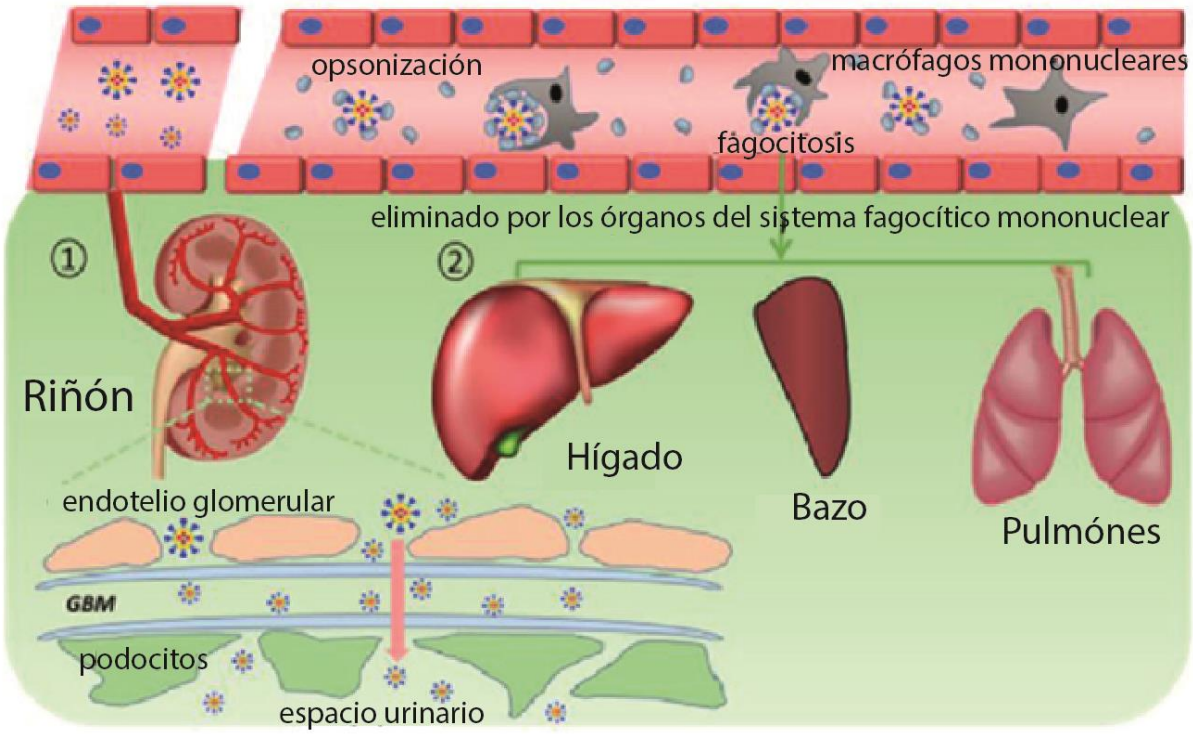


Figura 8. Ilustración esquemática de las principales barreras biológicas a las que se enfrentan los nanosistemas de administración intravenosa. Adaptación de la figura del artículo (139).

Una barrera muy importante a nivel órgano es el riñón, cuya función principal es filtrar el plasma sanguíneo, eliminando así los desechos metabólicos y las sustancias extrañas de la circulación sanguínea (145). Representa uno de los mecanismos de autoprotección del cuerpo humano, sin embargo, para los nanovehículos, constituye un verdadero obstáculo para alcanzar el sitio de interés. El proceso de filtración renal es seguido por la filtración glomerular, la secreción tubular renal y, finalmente, la excreción a través de la orina (146). Antes de ingresar al espacio urinario, el flujo plasmático debe pasar por tres capas de filtración glomerular; 1) las fenestraciones endoteliales glomerulares, seguidas de 2) la membrana basal glomerular (GBM, por su sigla en inglés) y 3) las hendiduras de filtración de los podocitos, en ese orden (147). Basado en el análisis de las tres capas, se acepta ampliamente que el tamaño de poro fisiológico de la pared

capilar glomerular es de aproximadamente 6 nm (148), lo que significa que los nanovehículos más pequeños que 6 nm serán eliminados rápidamente de la circulación sanguínea a través de la excreción renal.

Gran parte de los nanosistemas administrados con fines terapéuticos requieren atravesar las membranas celulares para cumplir su objetivo. La membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica semipermeable que contiene numerosas biomoléculas como proteínas, glúcidos y colesterol en una estructura de mosaico fluido. Su principal función es proteger la célula y mantener el ambiente fisiológico normal, por lo tanto, constituye una barrera a nivel celular para los nanosistemas. Sin embargo, existen varios mecanismos por los cuales las nanopartículas pueden internalizar al espacio citosólico, incluyendo la endocitosis mediada por caveolas, la endocitosis mediada por clatrina, la endocitosis independiente de clatrina/caveolas y la macropinocitosis (149), tal como se muestra en la Figura 9. El tipo de endocitosis está determinada por varios factores, entre ellos se encuentran el tipo de célula y algunas propiedades físico-químicas de las nanopartículas, como ser el tamaño, la forma y la carga superficial (150). La endocitosis es un proceso de transporte activo en el que la membrana plasmática se invagina formando vesículas llamadas endosomas tempranos. Estos endosomas comienzan a migrar hacia distintos orgánulos dentro de la célula, generalmente se dirigen al aparato de Golgi o al retículo endoplasmático, y sufren un proceso de maduración endosomal. Durante la maduración endosomal, el endosoma temprano se convierte en endosoma tardío multivesicular, y posteriormente, tras fusión con lisosomas, se forma temporalmente una especie híbrida conocida como endolisosoma que termina por convertirse en lisosoma (151). Durante este proceso de maduración ocurren numerosos cambios dentro de las vesículas en migración, entre ellos se encuentran la acidificación del pH intravesicular y la activación de enzimas proteolíticas en lisosomas, cuya finalidad es degradar su contenido (151). Esto podría afectar la integridad de las nanopartículas, y más importante aún, el principio activo encapsulado podría perder su efecto terapéutico. Por lo que es de vital importancia que las nanopartículas logren escapar de los endosomas tempranos antes de convertirse en lisosomas para evitar la degradación del principio activo.

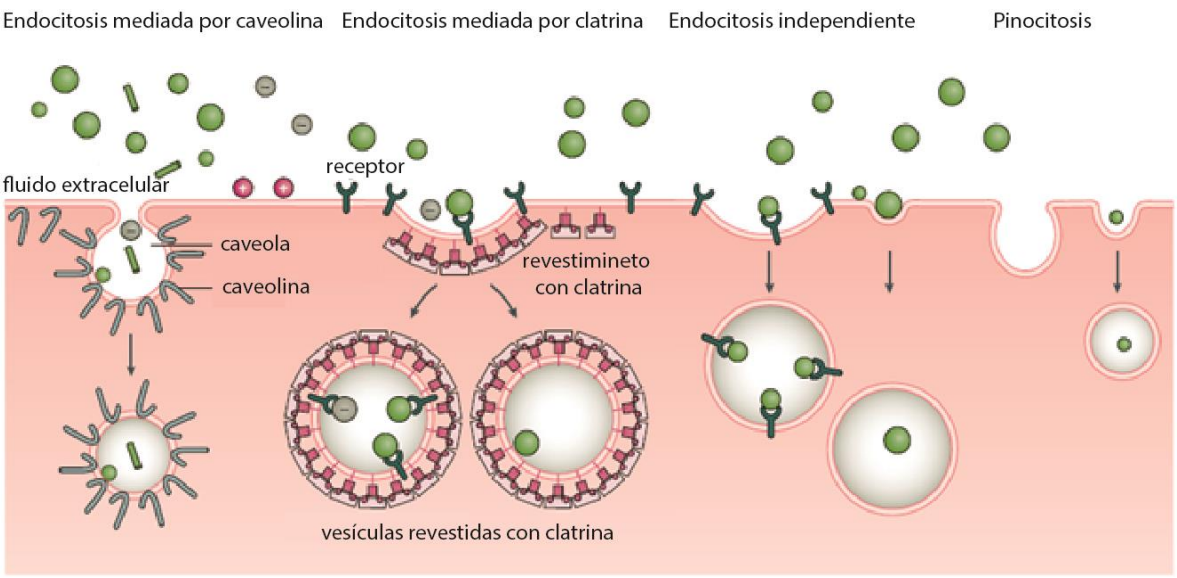


Figura 9. Representación esquemática de las principales vías endocíticas por las que pueden ingresar los nanosistemas a las células. Traducción de la figura del artículo (150).

En resumen, es fundamental tener presente las barreras biológicas a las que se van a enfrentar los nanosistemas durante su trayecto al tumor para así poder diseñar y modular las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas que nos permitan prolongar su tiempo de circulación en sangre, evitando su eliminación renal o evadiendo al sistema inmune y que, al mismo tiempo, facilite su internalización celular y escape endosomal.

1.6 Propiedades físico-química de las nanopartículas que influyen en su performance biológico.

Las propiedades físico-químicas de las nanopartículas que nos permiten superar las barreras biológicas y/o mejorar aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos son principalmente el tamaño, la forma, la composición y la carga superficial, tal como se representa en la Figura 10 (149).

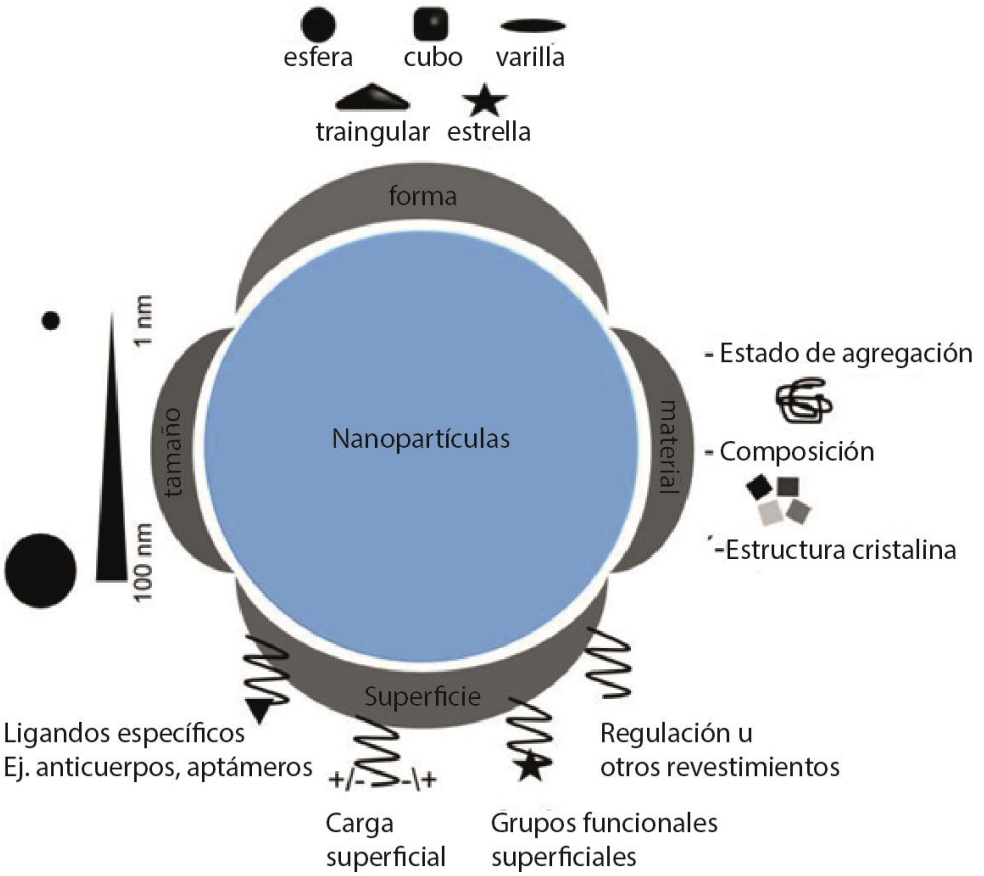


Figura 10. Principales propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas que influyen en la interacción con los sistemas biológicos. Traducción de la figura tomada de la referencia (149).

En particular, el tamaño y el recubrimiento de las nanopartículas determinan el tiempo de circulación en sangre. Partículas con un tamaño menor a 5 nm son generalmente eliminadas por vía renal mientras que las partículas con tamaños superiores a los 300 nm son eliminadas por opsonización, fagocitos y macrófagos circulantes o pueden ser filtradas por el hígado o bazo (152,153). El rango de tamaño de nanopartículas para un tiempo de circulación óptimo se encuentra entre los 70 - 300 nm y puede mejorar aún más si se recubre la superficie de las mismas con polietilenglicol (PEG) (154,155). El PEG forma una capa hidrofílica protectora alrededor de las nanopartículas que repele la interacción con proteínas plasmáticas tales como opsonina y lipoproteínas, mejora la biocompatibilidad y por lo tanto aumenta su tiempo de circulación en los fluidos biológicos (156,157). Es un polímero sintético aprobado por la FDA, ampliamente

utilizado en la industria farmacéutica, de hecho, la primera formulación de nanosistemas que salió al mercado, Doxil, consta de liposomas PEGilados conteniendo doxorrubicina. Sin embargo, al mismo tiempo que el recubrimiento con PEG evade la interacción con opsoninas, parece ser que también existen algunas limitaciones asociadas al proceso de internalización celular que podrían obstaculizar la entrega efectiva del fármaco al sitio de interés. Afortunadamente, se han propuesto una serie de estrategias de dePEGilación que básicamente consisten en deshacerse de la cubierta de PEG una vez que las nanopartículas llegan al lugar objetivo. Esto es posible gracias a la formación de enlaces (entre el PEG y las nanopartículas) sensibles a estímulos tales como cambios de pH o presencia de enzimas específicas en el sitio de interés (158–160). Asimismo, también es posible superar este dilema regulando la densidad y el largo de la cadena de PEG en la superficie de las nanopartículas (161).

Por otra parte, el tamaño, la forma y la carga superficial de las nanopartículas influye de manera significativa sobre la interacción e internalización celular. La interacción entre las nanopartículas y la membrana celular depende principalmente de la carga superficial de la partícula. Las nanopartículas con carga superficial positiva pueden establecen interacciones electrostáticas con las cargas negativas presentes en la superficie celular y penetrar las membranas plasmáticas, mientras que las nanopartículas con carga superficial negativa o neutra presentan bajos niveles de interacción e internalización celular (162,163). Una propiedad fisicoquímica muy importante, íntimamente relacionada con la carga superficial de las nanopartículas, que determina la estabilidad de la suspensión coloidal es el potencial Z. Este se define como la diferencia de potencial entre el seno de la solución y la partícula a la altura del límite de la capa difusa (o slipping plane). Cabe recordar que la estabilidad de las dispersiones coloidales, de acuerdo con la teoría electrostática DLVO, es un balance entre las fuerzas de atracción de van der Waals y repulsiones electrostáticas debidas a la carga superficial neta. Un potencial zeta alto típicamente mayor a 30 mV, en valor absoluto, indica un coloide estable (164).

En cuanto a la forma, se ha reportado que influye en la toxicidad de los materiales (165). Las nanopartículas tienen diferentes formas y estructuras, se presentan en forma de nanotubos, nanofibras, nanoesferas o tienen formas irregulares. Por lo tanto, también puede influir en su proceso de endocitosis, internalización, biodistribución y eliminación. Por ejemplo, se ha encontrado que las nanopartículas esféricas de tamaño similar son más fáciles y rápidas de internalizar que las nanopartículas con forma de varilla (166). Esto se explica por el tiempo adicional que la membrana requiere para envolver las partículas alargadas. Además, las partículas esféricas son relativamente menos tóxicas (167). El tamaño de las nanopartículas también determina la vía de internalización por la cual ingresarán a las células (168), en la Tabla 3 se detallan las distintas vías de endocitosis en relación al tamaño de partícula.

Tabla 3. Breve descripción de las vías endocíticas (168).

TIPO DE ENDOCITOSIS	BREVE DESCRIPCIÓN	TAMAÑO DE VESÍCULA
Fagocitosis	Internalización de partículas sólidas como bacterias y levaduras por células especializadas	Depende de la partícula a ser engullida
Macropinocitosis	Formación de grandes extensiones de membrana plasmática que conduce a la internalización de fluido o partículas dentro de vesículas	>1 µm
Endocitosis mediada por clatrina	La proteína clatrina se ensambla en la membrana celular en zonas llamadas fosas recubiertas que contienen altas concentraciones de receptores transmembrana específicos para la molécula objetivo	~120 nm
Endocitosis mediada por caveola	Invaginación de la membrana plasmática desencadenada por la unión de moléculas extracelulares en receptores específicos	~50-60 nm

Este es un factor importante a tener en cuenta, ya que el tipo de endocitosis determina la ruta y el destino final del endosoma. Por ejemplo, las nanopartículas internalizadas a través de una endocitosis mediada por clatrina están destinadas a un compartimento lisosomal, mientras que la endocitosis mediada por caveola evade este orgánulo (166). Los ligandos conjugados a la superficie de las nanopartículas también pueden influir en el modo de internalización celular. Se ha demostrado que ligandos como el ácido fólico, la

albúmina y el colesterol facilitan la captación a través de la endocitosis mediada por caveola, mientras que los ligandos para los glico-receptores promueven la endocitosis mediada por clatrina (29). En un caso concreto de endocitosis mediada por clatrina, el escape endosomal debe ocurrir antes de la fusión con un lisosoma para prevenir la degradación del compuesto. De igual modo, el escape endosomal suele ser necesario para permitir el acceso del principio activo al compartimento subcelular deseado, ya sea el citosol, las mitocondrias o el núcleo.

En este sentido, haremos énfasis en dos mecanismos de escape endosomal bien descritos en la bibliografía; la desestabilización de la membrana para nanosistemas lipídicos o la esponja de protones (también conocida como ruptura osmótica) para nanosistemas poliméricos (169–173), véase Figura 11. En ambos casos, se trata de lípidos o polímeros catiónicos capaces de establecer interacciones con la membrana endosomal o que contengan grupos funcionales ionizables y sensibles a los cambios de pH. La primera estrategia, conocida como desestabilización de la membrana, tiene lugar debido a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de los lípidos catiónicos con la membrana endosomal aniónica. Esto conduce a la reorganización de los lípidos que forman una fase hexagonal inversa provocando la desestabilización de la membrana endosomal y su consiguiente liberación al espacio citosólico (174,175). Uno de los resultados que apoya esta idea son los reportados por Yu et al (176), quienes han demostrado mejorar significativamente la eficiencia de transfección de ADN en nanopartículas de PLGA tras la incorporación del lípido catiónico DOTAP. Este lípido contiene un grupo amino cuaternario que le confiere una carga positiva permanente, la cual le permite interaccionar con la membrana del endosoma y facilita su escape al citosol. Dado que las LPHNp que se proponen en este trabajo de tesis doctoral contienen una cubierta lipídica, compuesta mayoritariamente del lípido catiónico DOTAP, es de esperar que puedan liberarse del endosoma, antes de su conversión a lisosoma, por medio de esta vía de escape. Por otra parte, los nanosistemas poliméricos, principalmente aquellos que contienen grupos sensibles a cambios de pH, tales como las aminas, contribuyen al fenómeno conocido como ruptura osmótica. El ambiente ácido de los endosomas constituye un medio propicio para la protonación de las aminas, resultando en un mayor ingreso de protones e iones de carga opuesta. Esto provoca un aumento en la

concentración iónica de los endosomas y atrae agua hacia el interior por gradiente osmótico, lo que conduce a un hinchamiento y, finalmente, ruptura del endosoma (151,177,178). En otra interpretación de esta hipótesis, llamada hinchamiento polimérico o efecto paraguas, la repulsión electrostática entre los grupos amino protonados dentro del polímero lo obligan a adquirir una conformación desplegada o extendida que termina por romper la membrana endosomal (151,179). Esta estrategia podría ser la ruta de escape endosomal que acontece en las nanocápsulas de CS que se proponen en el presente trabajo de tesis doctoral, debido a la presencia de aminas primarias en el CS que son sensibles a los cambios de pH que transcurren durante la maduración endosomal.

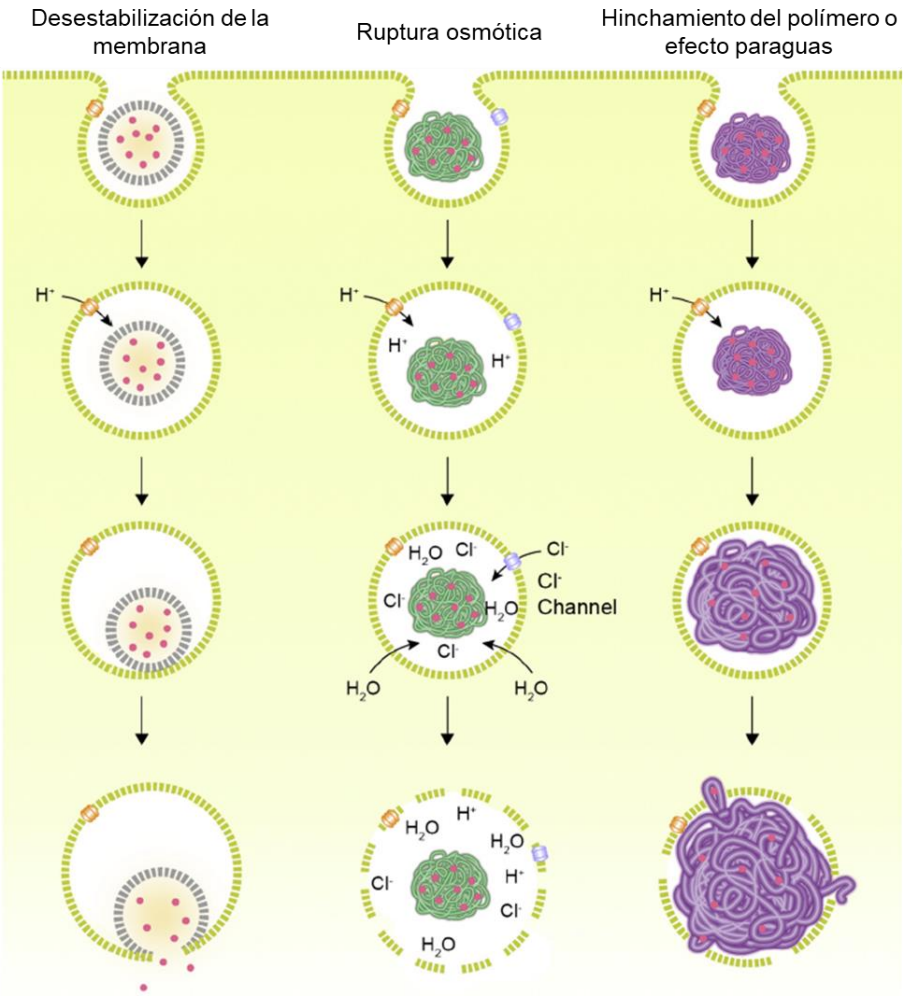


Figura 11. Principales estrategias de escape endosomal (151).

1.7 Efecto de permeabilidad y retención aumentada

La vectorización de estos nanosistemas hacia tumores sólidos puede ser de forma pasiva o activa. La vectorización pasiva tiene lugar gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, del inglés: enhanced permeation and retention) que es una característica intrínseca de los tumores, Figura 12. La cual comienza con la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento. Esta neovasculatura presenta una arquitectura defectuosa, con vasos sanguíneos dilatados y con presencia de poros que permiten la extravasación en el intersticio tumoral. Por otra parte, el drenaje linfático deficiente hace que las macromoléculas sean retenidas dentro del tumor. Este fenómeno EPR es la base del transporte selectivo de fármacos al tumor (180,181). La vectorización activa se realiza mediante la conjugación de sondas moleculares o ligandos sobre la superficie de los nanosistemas proporcionando un sistema de administración de droga capaz de reconocer y penetrar las células malignas que sobreexpresan los receptores correspondientes, y luego el agente terapéutico encapsulado se libera en el interior celular de manera controlada y sostenida en el tiempo. Existen diversos ligandos que pueden ser utilizado para direccionar las nanopartículas dentro de los que se incluyen pequeñas moléculas, péptidos, anticuerpos, aptámeros, entre otros (182,183).

Los nanosistemas generados en este trabajo doctoral serán funcionalizados con el anticuerpo Chi-Tn con el fin de ser direccionados a las células tumorales que expresen el antígeno Tn.

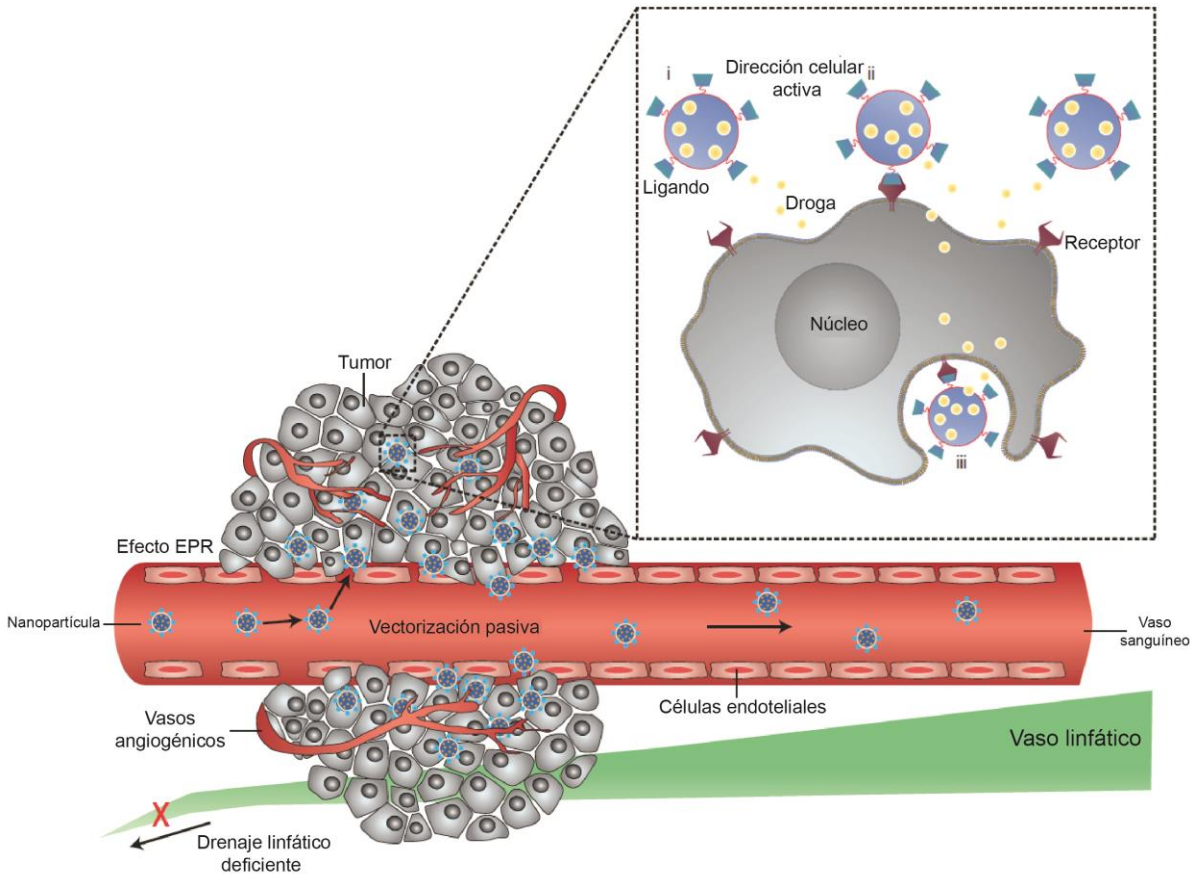


Figura 12. Ilustración de los mecanismos de vectorización pasiva mediada por el EPR y vectorización activa por funcionalización con ligandos específicos en un tumor sólido. Traducción de la figura del artículo (184). Las nanopartículas pueden (i) liberar su contenido en el microambiente tumoral, cerca de las células cancerígenas; (ii) adherirse a la membrana celular y actuar como un depósito de liberación extracelular de fármacos; o (iii) internalizarse en la célula por algunos de los mecanismos descritos en el apartado anterior.

1.8 Antígeno Tn

Muchos de los marcadores de células malignas y pre-malignas corresponden a los carbohidratos y péptidos presentes en mucinas (185). La glicosilación es una modificación post-transduccional presente en más del 50% de las proteínas y es una forma de regulación de los procesos eucarióticos (186).

La O-glicosilación, que ocurre principalmente en las mucinas, es un proceso paso por paso que tiene lugar en el aparato de Golgi, que comienza con

la adición de N-acetil-galactosamina a un residuo de serina o treonina (187). Esto resulta en el núcleo GalNAc-O-Ser/Thr, también conocido como antígeno Tn, véase Figura 13. Este primer paso está catalizado por la UDP-GalNac:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (GalNac-1). GalNAc-O-Ser/Thr es luego elongado por otras glicosil-transferasas para generar un O-glicano completo. En tejidos normales, la subsecuente adición de residuos azúcar oculta el determinante Tn, mientras que en tumores malignos la O-glicosilación incompleta resulta en la exposición de dicho núcleo antigénico (188).

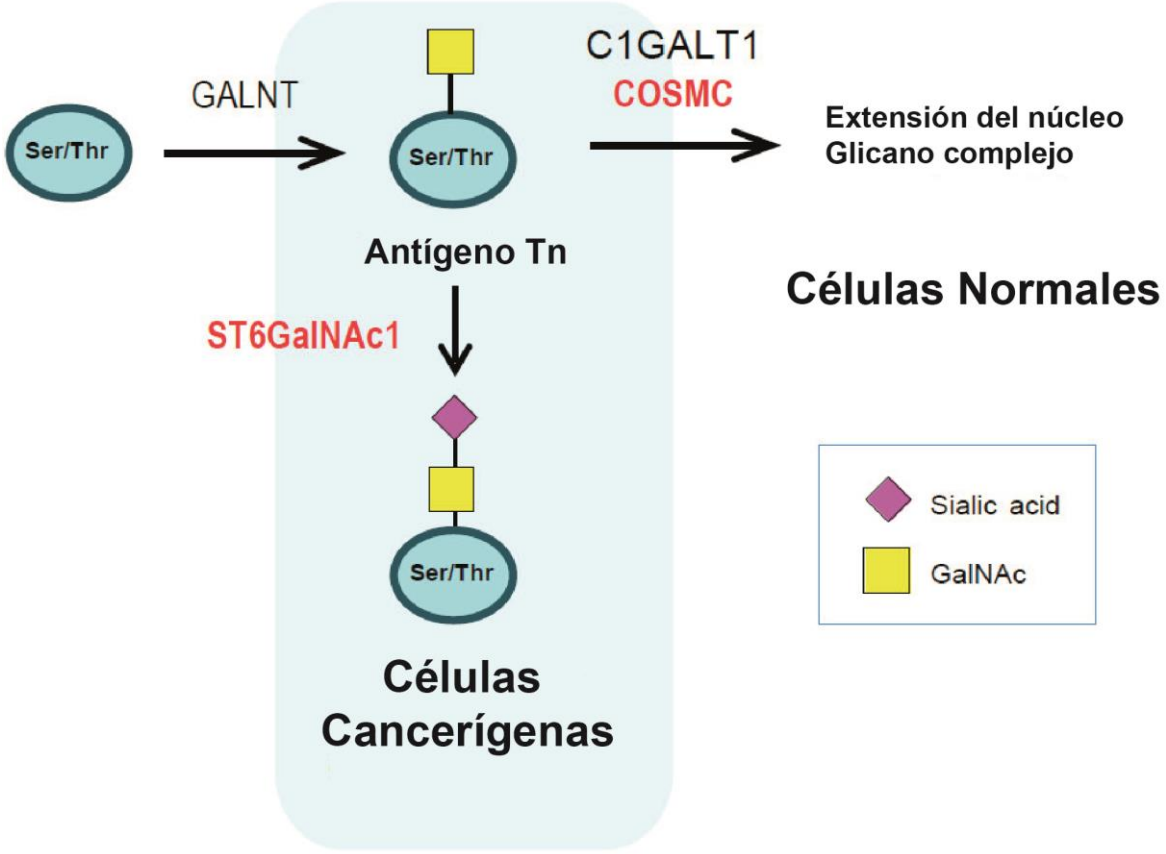


Figura 13. Biosíntesis del antígeno Tn en células cancerígenas, traducción de la figura tomada del artículo (189).

En los últimos años el antígeno Tn ha sido de gran interés en la biología del cáncer y en oncología por varias razones. En primer lugar, puede ser útil como marcador de diagnóstico puesto que rara vez se encuentra en tejidos normales, mientras que es altamente expresado en una variedad de carcinomas. Segundo, se ha reportado que Tn podría ser un biomarcador temprano del cáncer tanto en modelos humanos como animales. Tercero, Tn ha estado implicado en la

metástasis de células tumorales. Cuarto, inmunógenos sintéticos conteniendo antígeno Tn pueden inducir fuertes respuestas anti-tumorales (190).

1.9 Anticuerpo Chi-Tn

Con el objetivo de evaluar la potencial utilidad de anticuerpos anti-Tn en inmunoterapia del cáncer en seres humanos, se desarrolló un anticuerpo quimérico ratón/humano, conteniendo la parte variable del anticuerpo murino 83D4, específico para el antígeno Tn (191) y la parte constante de IgG_1 humana (192). Este anticuerpo quimérico (denominado Chi-Tn) mostró un perfil funcional similar en el reconocimiento de Tn comparado con el anticuerpo 83D4 original. De los resultados obtenidos en la evaluación pre-clínica del anticuerpo Chi-Tn en inmunoterapia del cáncer, se destaca la importante actividad anti-tumoral *in vivo* observada sobre diferentes tipos de tumores, induciendo remisiones tumorales completas en el 90% de los animales previamente inoculados con células de cáncer de mama (193). La alta especificidad de expresión del antígeno Tn en células cancerosas y las características funcionales *in vivo* del anticuerpo Chi-Tn, sugieren que este anticuerpo puede ser un excelente vehículo para direccionar nanopartículas conteniendo drogas citotóxicas hacía tumores, con pocos efectos colaterales en tejidos normales.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

La presente propuesta de trabajo plantea como objetivo formular, sintetizar y evaluar las características físico-químicas y performance biológica de dos nanosistemas de entrega de DCX a través del mecanismo de vectorización activa mediante funcionalización con el anticuerpo quimérico Chi-Tn en un modelo de cáncer de pulmón.

Para ello, se propusieron dos nanosistemas poliméricos. Uno de ellos se basó en CS, un polímero natural catiónico, para producir nanocápsulas de CS. Mientras que el segundo nanosistema se basó en PLGA, un polímero sintético aprobado por la FDA con carga superficial negativa debido a la presencia de grupos carboxílicos, lo que dio lugar a la formación de nanoesferas de PLGA. Sin embargo, en una segunda etapa, se avanzó hacia la formación de LPHNp, no solo para mejorar la eficacia de las nanoesferas de PLGA, sino también para aportar elementos novedosos al trabajo. Si bien la nanoencapsulación de DCX dentro de nanopartículas poliméricas de CS y PLGA han sido ampliamente estudiadas, la preparación de LPHNp y la funcionalización con el anticuerpo Chi-Tn representa un diferencial innovador ya que, hasta donde se tiene conocimiento, no existen reportes bibliográficos previos sobre este enfoque.

2.2. Objetivos específicos

a) Formulación, preparación, caracterización y evaluación de nanocápsulas de CS conteniendo DCX

- PEGilación de CS y caracterización del co-polímero obtenido
- Desarrollo de formulación y preparación de nanocápsulas de CS conteniendo DCX
- Funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo Chi-Tn y su caracterización
- Caracterización físico-química de las nanocápsulas de CS obtenidas
- Caracterización *in vitro* de las nanopartículas

- Estudio de la actividad anti-tumoral *in vivo* de las inmuno-nanopartículas

b) Formulación, preparación, caracterización y evaluación de nanoesferas de PLGA conteniendo DCX

- PEGilación de PLGA y caracterización del co-polímero obtenido
- Desarrollo de formulación y preparación de nanoesferas de PLGA conteniendo DCX
- Funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo Chi-Tn y su caracterización
- Caracterización físico-química de las nanoesferas de PLGA obtenidas
- Caracterización *in vitro* de las nanopartículas

c) Formulación, preparación, caracterización y evaluación de LPHNp conteniendo DCX

- Desarrollo de formulación y preparación de LPHNp conteniendo DCX
- Funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo Chi-Tn y su caracterización
- Caracterización físico-química de las LPHNp obtenidas
- Caracterización *in vitro* de las nanopartículas
- Estudio de la actividad anti-tumoral *in vivo* de las inmuno-nanopartículas

2.3 Justificación

El cáncer es una de las temáticas que por su incidencia e implicancia reviste una importancia central dentro de la nanomedicina. Por lo que la presente propuesta de trabajo apunta a la generación de conocimiento en esta área innovadora que se presenta

como una excelente alternativa para la mejora de los tratamientos oncológicos convencionales.

Si bien el empleo de nanosistemas de entrega utilizados para la encapsulación de drogas anticancerígenas insolubles ha sido ampliamente estudiado, la funcionalización con el anticuerpo Chi-Tn, capaz de direccionar estos nanosistemas de forma específica hacia células tumorales, es una propuesta verdaderamente incipiente.

Asimismo, el trabajo propuesto tendrá un carácter altamente interdisciplinario a partir del establecimiento de sinergias entre el grupo del Laboratorio de Glicobiología e Inmunología tumoral, IP Montevideo y el Laboratorio de Nanotecnología del Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química. Esta estrategia de trabajo sin lugar a dudas potenciará en gran medida el desarrollo científico y tecnológico en el Uruguay.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Protasan UP CL 113 (clorhidrato de CS ultrapuro) fue comprado en FMC BioPolymer AS/Novamatrix (Sandvika, Noruega), cuyo peso molecular viscosimétrico es de 33 KDa y DD de 85.3 % (según lo determinado en ***Anexo 1***). El ácido poli-láctico-co-glicólico 50:50 (PLGA) Resomer RG 502H con terminación ácida (PM: 7-17 KDa) proviene de Evonik (Essen, Alemania). Biotin-PEG-COOH (PM: 3 KDa); MeO-PEG-COOH (PM: 5 KDa); NH2-PEG-Biotin (PM: 3 KDa) obtenidos de Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemania). El cloruro de 1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamonio-propano en diclorometano (DOTAP-Cl) fue adquirido de Lipoid (Steinhausen, Suiza), mientras que el 1,2-Distearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-Polietilenglicol (DSPE-PEG; PM: 2 KDa) y DSPE-PEG-Biotina (PM: 2KDa) fueron comprados en Broadpharma (California, EEUU). Phospholipon® 90 NG, fosfatidilcolina purificada de lecitina de soja, fue suministrada por Phospholipid GmbH (Colonia, Alemania). Crodamol GTCC, una mezcla de ácidos grasos cáprico y caprílico, fue obtenido de Croda (Buenos Aires, Argentina). El DCX con un 99% de pureza fue comprado en Alfa Aesar (Massachusetts, Estados Unidos). El poloxamer 188, la N-hidroxisuccinimida (NHS), el clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil-N′-etilcarbodiimida (EDC) y la avidina derivada de huevo (≥10 unidades/mg proteína) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Misuri, EEUU). El resto de los reactivos y solventes que fueron utilizados son de grado analítico.

3.2 Cultivos celulares

Para realizar los cultivos celulares se empleó la línea celular A549 derivadas de cáncer de pulmón humano. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 1% (v/v) de Glutamina. Se mantuvieron en estufa a 37 °C con 5 % de CO_2.

3.3 Modelo animal

Con el fin de evaluar la actividad antitumoral de los nanosistemas obtenidos se realizaron estudios *in vivo* preliminares en ratones *nude* de la cepa Balb/c (carentes de linfocitos T), ya que son capaces de aceptar trasplantes de células humanas. Los ratones fueron criados en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Todos los protocolos para la experimentación con animales fueron revisados y aprobados por la Comisión de Ética en el uso de animales (CEUA) del Instituto Pasteur de Montevideo, cuyo número de registro de proyecto es 00.3-22.

3.4 Técnicas experimentales

3.4.1 Dispersión de luz dinámica

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés *dynamic light scattering*), es ampliamente utilizada para analizar el tamaño hidrodinámico y la distribución de partículas en el rango submicrométrico. Se trata de una técnica espectroscópica donde un haz de luz monocromático intercepta la suspensión coloidal, y cuyas partículas, que se encuentran en movimiento Browniano, generan fluctuaciones en la intensidad de luz proporcionales al tamaño de la partícula. Estas fluctuaciones se van registrando durante intervalos de tiempos cortos y con un determinado ángulo de dispersión para dar lugar a una función de auto-correlación que permitirá determinar el coeficiente de difusión de las partículas. Luego se utiliza la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 1) para calcular su diámetro hidrodinámico:

$$d\,(H) = \frac{KT}{3\pi\,\eta D_p} \qquad (1)$$

Donde d(H) es el diámetro hidrodinámico, D_p es el coeficiente de difusión de la partícula, K la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad (194).

3.4.2 Dispersión de luz electroforética

La dispersión electroforética es una técnica utilizada para analizar la movilidad electroforética de partículas cargadas en suspensión. Para ello se aplica un campo eléctrico en la muestra y se determina la velocidad con la que se mueven las partículas cargadas hacia el electrodo de carga opuesta usando un velocímetro de laser Doppler. Una vez determinada la movilidad electroforética, se aplica la ecuación de Henry para obtener el valor de potencial Z. El potencial Z es una medida del potencial eléctrico en la interfaz entre una partícula coloidal y el líquido que la rodea. Es una propiedad importante en la dispersión coloidal, ya que es un indicativo de su estabilidad, y está relacionada con la carga superficial de la partícula. Cuando una partícula coloidal tiene una carga neta en su superficie, atrae iones de carga opuesta del medio circundante. Estos iones forman una doble capa eléctrica alrededor de la partícula. La doble capa eléctrica presenta dos zonas bien definidas, una primera capa en la cual los iones se encuentran firmemente ligados a la superficie de la partícula (capa rígida), rodeada a su vez por una segunda capa de mayor extensión (capa difusa) en la que los iones se encuentran unidos de forma más laxa. Dentro de la capa difusa existe una zona conocida como plano de deslizamiento en la que los iones dentro de esa zona se desplazan junto con la partícula en movimiento mientras que los iones más allá de ese límite quedan donde se encontraban originalmente. El potencial eléctrico en el plano de deslizamiento se denomina potencial Z y es la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica y el plano de la partícula (195).

La teoría DLVO, desarrollada por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek en 1940, relaciona la estabilidad de los sistemas coloidales al balance entre las fuerzas de repulsión de la doble capa eléctrica y las fuerzas de atracción de van der Waals. Si las fuerzas de repulsión predominan, las partículas se mantienen separadas evitando la agregación y floculación. Es así que el potencial zeta,

determinado a partir de mediciones de movilidad electroforética, da una indicación sobre la estabilidad coloidal de las partículas en suspensión. Generalmente, las partículas con potencial zeta| (valor absoluto) mayor a 30 mV son consideradas estables (196).

3.4.3 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es una técnica avanzada de microscopía que utiliza haces de electrones en lugar de luz visible para estudiar estructuras a nivel submicroscópico. La resolución de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica es superior a las obtenidas por microscopía óptica debido a que la longitud de onda de los electrones es considerablemente menor que la longitud de onda de la luz visible.

El funcionamiento básico de TEM consiste en irradiar una delgada capa de muestra con un haz de electrones en condiciones de vacío. Los electrones interaccionan con los átomos de la muestra mediante dispersión elástica e inelástica observándose en la imagen como una estructura oscura (electrón-densa) (197). En la técnica de microscopía electrónica de alta resolución (HREM, por sus siglas en inglés), se utiliza una apertura del objetivo mucho mayor (o, en ocasiones, ninguna). Así, el haz incidente puede interferir con uno o más haces difractados y el contraste de la imagen dependerá de las fases relativas de los diversos haces. Por lo tanto, este modo de formación de imágenes es denominado imagen de contraste de fase (198).

Cabe señalar que las muestras a ser analizadas deben ser cuidadosamente preparadas, con espesores lo suficientemente finos como para permitir la transmisión de los electrones a través de la misma, o incluso puede ser necesario secar y teñir la muestra previa a su visualización.

3.4.4 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), es una técnica de microscopía de barrido de sonda que utiliza una punta extremadamente fina para explorar las características topográficas y propiedades mecánicas de las

muestras a escala nanométrica. Permite la visualización de casi cualquier tipo de superficie, incluyendo polímeros, cerámicas, compuestos, vidrio y muestras biológicas.

La AFM consta de una punta afilada que tiene aproximadamente 10 a 20 nm de diámetro, la cual está unida a un soporte. Las puntas y el soporte del AFM son fabricados a partir de Si o Si_3N_4. La punta se mueve en respuesta a las interacciones punta-superficie, y este movimiento se mide enfocando un haz láser con un fotodiodo.

Presenta dos modos básicos de operación: contacto y tapping (o golpeteo). En el modo de contacto, la punta de AFM está en contacto continuo con la superficie. Por el contrario, en el modo tapping, el soporte de AFM vibra sobre la superficie de la muestra de manera que la punta mantiene un contacto intermitente con la superficie. Este proceso ayuda a reducir las fuerzas de cizallamiento asociadas con el movimiento de la punta.

A diferencia del microscopio electrónico, que proporciona imágenes en 2D de una muestra, la AFM permite obtener imágenes topográficas en 3D. Además, las muestras no requieren tratamientos especiales que puedan cambiar o dañarla de forma irreversible (199).

3.4.5 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica de espectroscopia vibracional que proporciona información química y estructural de casi cualquier compuesto orgánico o inorgánico permitiendo así su identificación. Cuando el haz de luz monocromático incide sobre la muestra, esta se dispersa mayoritariamente de manera elástica en un fenómeno conocido como dispersión de Rayleigh. Sin embargo, existe una pequeña cantidad de luz que se dispersa de manera inelástica (dispersión Raman), y por lo tanto presenta un cambio en su frecuencia. Estos ligeros cambios en la frecuencia son característicos de la naturaleza química y del estado físico del compuesto. Se trata de una técnica no destructiva, ya que el análisis se realiza directamente sobre la muestra sin necesidad de preparación previa. Asimismo, es posible caracterizar muestras hidratadas debido a que el efecto raman no se ve afectado por la presencia de moléculas de agua.

En particular, mediante la espectroscopia Raman confocal (microscopio confocal

acoplado al espectrómetro Raman) es posible obtener espectros Raman puntuales o realizar un barrido tomando varios espectros sobre la superficie de la muestra. Se obtienen imágenes ópticas con los espectros Raman permitiendo estudiar la composición química y su distribución a lo largo de la superficie de la muestra (200).

3.4.6 ELISA

Las técnicas de ELISA (por sus siglas en inglés; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,) son un conjunto de métodos bioquímicos que utilizan enzimas y anticuerpos para detectar la presencia de sustancias específicas, como antígenos o anticuerpos, en muestras biológicas. Estas técnicas son ampliamente utilizadas en laboratorios para diagnóstico clínico, investigación biomédica y aplicaciones en biotecnología. Existen numerosas variantes de esta técnica, sin embargo, nos centraremos en el ELISA de captura indirecta, que fue la que se llevó a cabo en este trabajo de tesis doctoral.

En este caso, se sensibiliza la placa con el antígeno de interés (el antígeno Tn), el cual es reconocido por el anticuerpo primario (Chi-Tn), en caso de encontrarse en la muestra a testear. La presencia del anticuerpo Chi-Tn se detecta mediante un cambio colorimétrico tras la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a una enzima y al sustrato cromogénico (201).

3.4.7 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protones

La Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por su sigla en inglés) es una técnica analítica que se utiliza para estudiar la estructura y composición de las moléculas. El principio fundamental de la NMR se basa en el comportamiento de ciertos núcleos atómicos que tienen un momento magnético intrínseco y un espín nuclear, lo que les permite interactuar con un campo magnético externo y responder a la radiación electromagnética aplicada. Algunos de los núcleos más comúnmente utilizados son; el protón (^{1}H), el carbono (^{13}C) y el nitrógeno (^{15}N). En el caso particular de la NMR de protones (^{1}H-NMR), es una de las más utilizadas debido a su alta sensibilidad y a la abundancia de H en las moléculas

orgánicas e inorgánicas de interés. Los átomos de H tienen un espín nuclear de 1/2, lo que significa que tiene un momento magnético intrínseco (2.7927 μ_N) que les permite tener dos orientaciones posibles cuando se encuentra en un campo magnético externo: paralelo o antiparalelo al campo aplicado. Si además se aplica una cierta cantidad de energía, en forma de energía electromagnética, a los núcleos en el campo magnético externo, se pueden inducir transiciones entre los estados de espín, es decir, entre los estados paralelo y antiparalelo. Esta energía de resonancia necesaria para inducir la transición depende de la fuerza del campo magnético y de las propiedades específicas del núcleo. Cuando los núcleos realizan estas transiciones entre los estados de espín, absorben o emiten energía en forma de radiación electromagnética de radiofrecuencia. La frecuencia de esta radiación está directamente relacionada con la energía de resonancia necesaria para inducir la transición. Al registrar la absorción o emisión de energía de los núcleos en función de la frecuencia de la radiación electromagnética aplicada, se obtiene un espectro de NMR. Este espectro proporciona información sobre la composición química, la estructura molecular y el entorno químico de los núcleos estudiados (202,203).

3.4.8 Espectroscopia infrarroja

La Espectroscopia Infrarroja (IR, por su sigla en inglés) es una técnica analítica que se utiliza para estudiar las vibraciones moleculares de los enlaces químicos, proporcionando información sobre la composición química, la identificación de grupos funcionales y la estructura molecular de una muestra. La región de IR se divide comúnmente en tres zonas: IR cercano (400-10 cm^{-1}), IR medio (4000-400 cm^{-1}) e IR lejano (14,000-4000 cm^{-1}). El procedimiento de medida consta en hacer pasar un haz de luz IR a través de una muestra, cuyas moléculas constituyentes absorben parte de esa energía a ciertas longitudes de onda y frecuencias de forma específica dependiendo de las vibraciones de los enlaces químicos. El remanente de energía transmitida es luego examinado por el equipo y el espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular. Esto permite crear una huella molecular de la muestra, puesto que no hay dos estructuras moleculares que produzcan el mismo espectro IR. Generalmente, para "descifrar" las frecuencias individuales se utiliza una técnica matemática bien conocida llamada

transformación de Fourier (FT). La transformación la realiza una computadora, que luego presenta al usuario la información espectral deseada para su análisis. Es una técnica fácil, rápida y no destructiva, que permite medir muestras líquidas, solidas o gaseosas (204).

3.4.9 HPLC

HPLC son las siglas en inglés de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High-Performance Liquid Chromatography). Es una técnica analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar componentes individuales de una muestra líquida. Consta en hacer pasar una fase móvil, en la que está contenida la muestra, a alta presión a través de una columna empaquetada con la fase estacionaria. La separación se logra en base a las interacciones de los componentes de la muestra por la fase estacionaria o la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto para ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa y característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.
Dentro de las distintas variantes de HPLC, la de fase reversa es una de las más utilizadas. Consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Aquí, el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, así como también se incrementa con la adición de disolventes polares a la fase móvil (205).

3.4.10 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica analítica utilizada para medir y analizar múltiples características físicas y químicas de partículas individuales, como células, en suspensión. El principio subyacente de la citometría de flujo está relacionado con la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia, que ocurren cuando la luz de la fuente de excitación (comúnmente un haz láser) golpea las partículas en movimiento. Los datos obtenidos podrían proporcionar información valiosa sobre aspectos bioquímicos, biofísicos y moleculares de las partículas. La dispersión de la luz está directamente relacionada con las propiedades

estructurales y morfológicas de la célula (por ejemplo, tamaño y granularidad), mientras que la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de sonda fluorescente unida a la célula o componente celular. Estos pueden derivar de sondas fluorescentes o anticuerpos monoclonales dirigidos ya sea a moléculas extracelulares ubicadas en la superficie o a moléculas intracelulares dentro de la célula.

La citometría de flujo posibilita la detección de antígenos tanto de membrana como citoplasmáticos y nucleares. Además, permite investigar células enteras y diversos componentes celulares como orgánulos, núcleo, ADN, ARN, cromosomas, citoquinas, hormonas y contenido proteico. Asimismo, mediante la citometría de flujo, se pueden evaluar procesos de internalización celular, distribución, proliferación, apoptosis y ciclo celular, entre otros (206).

3.4.11 Microscopía confocal

La microscopía confocal es una técnica avanzada que mejora la resolución y la capacidad para obtener imágenes tridimensionales de muestras biológicas. A diferencia de la microscopía convencional, la microscopía confocal utiliza un "pinhole" espacial que elimina la luz dispersa fuera del plano focal de observación. Este pinhole es un pequeño orificio ubicado delante del detector, que solo permite el paso de la luz proveniente del plano focal de la muestra, eliminando así la luz fuera de foco y mejorando la resolución axial. La luz que atraviesa el pinhole se dirige hacia el fotomultiplicador, que detecta y amplifica la señal de luz para generar una imagen confocal de alta calidad (207).

En cuanto a la preparación de la muestra, esta varía dependiendo del tipo de análisis que se va a realizar y del tipo de muestra específica. Sin embargo, generalmente implica pasos de tinción o marcado con sondas fluorescentes que permiten la visualización o identificación de compartimentos celulares, orgánulos o procesos biológicos de interés.

3.4.12 Método del ácido bicinconínico

El método del ácido bicinconínico (BCA) es ampliamente utilizado para cuantificar la concentración de proteínas. Se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} llevada a cabo por los grupos peptídicos de las proteínas presentes en la muestra bajo condiciones alcalinas. La cantidad de Cu^{2+} reducida es proporcional al contenido de proteína. Luego, el BCA forma un complejo con el Cu^{+} de color purpura intenso que absorbe luz a 562 nm.

Una de las ventajas del BCA es su alta estabilidad frente a condiciones alcalinas, lo que permite que el método se realice en un solo paso. En comparación con otros métodos, es menos susceptible a la acción de detergentes o agentes desnaturalizantes, es más sensible que el ensayo de Lowry y presenta una variabilidad menor que la del método de Bradford (208,209).

3.4.13 Ensayo MTT

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un ensayo colorimétrico simple para evaluar viabilidad y proliferación celular. Se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (de color amarillo) a un compuesto insoluble conocido como formazán (de color violeta), por acción de la enzima deshidrogenasa mitocondrial presente en células vivas. Tras la solubilización del formazán con DMSO o isopropanol acidificado, se mide absorbancia a 570 nm. Solo las células vivas con un metabolismo activo tienen la capacidad de convertir el MTT en un compuesto coloreado, por lo tanto, la absorbancia del formazán es directamente proporcional al número de células viables dentro del cultivo (210).

3.4.14 Ensayo CCK8

El CCK-8 es un ensayo colorimétrico, similar al MTT, para evaluar viabilidad celular, que utiliza una sal de tetrazolio altamente soluble conocida como WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonato-fenil)-2H-tetrazolio), de color amarillo. A diferencia del MTT, la reducción de este compuesto por células

viables, da como resultado un formazán soluble de color anaranjado que absorbe luz a 460 nm.
Dado que el compuesto generado es soluble, no requiere de pasos adicionales de disolución. Además, es más sensible que otros ensayos de viabilidad celular basados en sales de tetrazolio como el MTT, MTS, XTT o WST-1(211).

3.5 Procedimiento Experimental

3.5.1 Nanopartículas de CS

3.5.1.1 PEGilación del CS

Para llevar a cabo la conjugación entre CS y PEG se procedió de la siguiente manera; 100 mg de CS, 27.6 mg de MeO-PEG-COOH, 2.4 mg de Biotina-PEG-COOH y 3.4 mg de NHS se disuelven en 14.3 mL de agua. Luego, 69.1 mg de EDC se añaden en 4 porciones iguales (17.275 mg) cada 30 minutos. La solución resultante se agita por 24 hrs a temperatura ambiente y luego se filtra (con tubos Amicon 10 KDa), se realizan 3 lavados con agua y se liofiliza (Christ Gamma 1–16 LSC Liofilizador, Osterode am Harz, Alemania) hasta obtener un sólido de color blanquecino.

3.5.1.2 Preparación de las nanocápsulas de CS

Las nanocápsulas de CS (Nc CS) fueron preparadas de acuerdo con el procedimiento reportado por Torrecilla et al. (119) basado en el método de desplazamiento de solvente, con algunas modificaciones. Donde 40 mg de fosfatidilcolina de soja se disuelven en 0.5 mL de etanol. Luego se añaden 125 µL de crodamol y 9.5 mL de acetona. Esta fase orgánica se vierte sobre 20 mL de una fase acuosa que contiene 10 mg de CS (o CS-PEG) y 50 mg de poloxamer 188. La mezcla resultante da lugar a una nano-emulsión espontánea aceite en agua. Finalmente, se rotaevapora hasta un volumen final de 10 mL (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Para asegurar una formulación isotónica final, se añadió 2.6 % m/v de glicerol.

Las Nc CS cargadas con DCX (CS-PEG-DCX) se preparan de la misma forma que se describe arriba, añadiendo 1 mL de una solución etanólica de docetaxel (40 mg/mL) a la fase orgánica. De esta forma se obtendrá una suspensión de nanopartículas con concentración final de 4 mg de DCX/mL. Las nanopartículas fluorescentes se preparan de igual manera que las cargadas con DCX, reemplazando el DCX por la sonda fluorescente Coumarin-6 (añadiendo 1 mL de una solución etanólica de coumarin de concentración 0.2 mg/mL).

3.5.2 Nanopartículas de PLGA

3.5.2.1 Pegilación del PLGA

La unión de PLGA a NH_2-PEG-Biotina se llevó a cabo según el siguiente protocolo: 2.5 g de PLGA-COOH se disuelven en 10 mL de diclorometano. Luego se añaden 2 mL que contienen 67.5 mg de NHS y 115 mg de EDC en diclorometano para convertirlo en PLGA-NHS, el cual es precipitado con 10 mL de etileter/metanol (50:50) y luego se centrifuga a 4000 xg por 20 minutos. Los lavados y centrifugaciones se repiten 2 veces. El pellet se seca a vacío por 30 minutos para eliminar el éter y el metanol residuales. Luego 1 g de PLGA-NHS se disuelve en 4 ml de diclorometano seguida de la adición de 250 mg de NH_2-PEG-COOH esta reacción se deja por 9 horas a temperatura ambiente. El co-polímero resultante PLGA-PEG se precipita con éter/metanol y se lava con el mismo solvente. Luego se seca a vacío.

3.5.2.2 Preparación de las nanoesferas de PLGA

Las nanoesferas de PLGA (NpPLGA) fueron preparadas mediante el método de nanoprecipitación según lo reportado por Le et al. (212), Gu et al. (213) y Liu et al. (182), donde 40 mg de PLGA y 10 mg de PLGA-PEG se disuelven en 5 mL de acetona. Esta solución se añade gota a gota a 25 mL de agua ultra-pura bajo agitación magnética vigorosa por 2 horas. Luego la mezcla se rotaevapora para eliminar la acetona, se centrifuga a 8000 rpm por 15 minutos y se realizan 2 lavados con agua. Finalmente, el pellet se resuspende en agua.

Para las Np-PLGA cargadas con DCX (NpPLGA-PEG-DCX) se realiza el mismo procedimiento que arriba, pero se añaden 1.25 mL de una solución etanólica de 2 mg de DCX/mL a la fase orgánica para obtener una suspensión de nanopartículas con una concentración final de DCX de 0.1 mg/mL.

3.5.3 Preparación de nanopartículas híbridas lípido-polímero

Tal como se mencionó en la Introducción, las LPHNp combinan las ventajas tanto de liposomas como de nanopartículas poliméricas otorgando buena estabilidad y altas eficiencias de encapsulación a los nanosistemas. Su preparación se llevó a cabo por autoensamblado de los componentes lipídicos y poliméricos mediante el método de nanoprecipitación resultante de la modificación y combinación de protocolos reportados por Bose et al. (214), Dai et al. (215) y Klippstein et al. (216). En concreto, 100 mg de PLGA se disuelven en 5.375 mL de acetona, que luego se mezclan con 0.5 mL de etanol conteniendo 7.5 mg de DOTAP, 5 mg de DSPE-PEG, 2.5 mg de DSPE-PEG-Biotina y 125 µL de crodamol. Esta fase orgánica se divide en dos porciones iguales. A una de las partes se le añaden 500 µL de una solución stock de DCX (40 mg/mL en acetona) que dará lugar a las nanopartículas cargadas con la droga (LPHNp-DCX), mientras que a la otra mitad se le añaden 500 µL de acetona para posteriormente obtener nanopartículas vacías (LPHNp)

Por otro lado, se disuelven 50 mg de poloxamer 188 en 10 mL de agua. Esta fase acuosa también se divide en porciones iguales. Ambas se colocan en planchas calefactoras hasta alcanzar una temperatura final de 50 °C. Posteriormente, se vierte la fase orgánica gota a gota sobre su respectiva fase acuosa en agitación vigorosa. La suspensión resultante se mantiene en agitación por al menos 2 horas para permitir el autoensamblado y asegurar la eliminación de los solventes orgánicos. Finalmente, en caso de ser necesario, se ajusta el volumen a 5 mL. De esta forma se obtendrán nanopartículas con concentración final de 4 mg de DCX/mL.

Las nanopartículas fluorescentes se preparan de igual manera que las cargadas con docetaxel, reemplazando el DCX por la sonda fluorescente Coumarin-6

(añadiendo 1 mL de una solución etanólica de coumarin de concentración 0.2 mg/mL).

3.5.4 Funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado

Este tipo de conjugación se basa en la interacción cuasi covalente entre biotina y avidina que presenta una constante de disociación en el orden de 10^{-15} M^{-1}. Es una de las interacciones no covalentes más fuertes conocidas hasta el momento. El PEG expuesto en la superficie de las nanopartículas contiene una molécula de biotina en su extremo libre que interacciona con una molécula de avidina. Esta mezcla resultante se incuba con el anticuerpo biotinilado (véase ***Anexo 2***), formándose una interacción en forma de sándwich biotina-avidina-biotina. La ventaja de esta estrategia es que permite controlar la localización y la densidad de los anticuerpos en la periferia de los nanosistemas asegurando una interacción receptor-ligando efectiva. Se siguen 2 pasos de funcionalización:

<u>Para las Nc CS</u>

- Primero, 40 µL de solución de avidina (2 mg/mL) se añaden a 5mL de Nc CS-PEG-(DCX). Esta mezcla se deja agitando a oscuras por 1 hora a temperatura ambiente.
- Luego, 70 µL de la solución con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado (0.25 mg/mL) se añaden a la mezcla y se continúa agitando durante toda la noche. Como resultado se obtienen Nc CS, con o sin DCX, funcionalizadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn (CS-PEG-(DCX)-Chi-Tn mAb)

<u>Para las LPHNp</u>

- Primero, 10.8 µL de solución de avidina (2 mg/mL) se añaden a 2mL de LPHNp-(DCX). Esta mezcla se deja agitando a oscuras por 1 hora a temperatura ambiente.
- Luego, 48 µL de la solución con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado (1 mg/mL) se añaden a la mezcla y se continúa agitando durante toda la noche. Como

resultado se obtienen Nc CS, con o sin DCX, funcionalizadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn (CS-PEG-(DCX)-Chi-Tn mAb)

La unión del anticuerpo a las nanopartículas fue verificada mediante un ELISA de captura indirecta combinado con fluorescencia. Inicialmente se incubaron las Nanopartículas cargadas con Coumarin-6 y funcionalizadas con el anticuerpo Chi-Tn en una placa de Elisa sensibilizada con el antígeno Tn. Luego de varios lavados, se realizó una incubación con el anticuerpo secundario, SIGMA α-mouse unido a HRP (peroxidasa), y se añade la solución sustrato que contiene peróxido de hidrógeno. La medida de absorbancia a 405 nm determina la funcionalidad del anticuerpo Chi-Tn unido a las nanopartículas y la medida de intensidad de fluorescencia a λ_{ex} 444 nm revela la presencia de las nanopartículas fluorescentes en la muestra. Se realizaron controles de Np fluorescentes sin el anticuerpo Chi-Tn, así como también, controles de Np funcionalizadas con el anticuerpo sin sonda fluorescente (véase ***Anexo 2***).

3.6 Caracterización físico-química

3.6.1 Resonancia Magnética Nuclear de Protones (H-RMN)

Para confirmar la unión de PEG a ambos polímeros se realizó un estudio por resonancia magnética nuclear de protones (H-RMN) mediante la utilización de un espectrómetro de NMR Bruker Avance Neo a 400 MHz de frecuencia. A continuación, se detallan los procedimientos utilizados para cada polímero:

-Muestra CS-PEG: 5 mg de CS-PEG (o CS como control) se disuelven en 0.5 mL de una solución al 2% de DCl en D_2O y se calienta a 70°C por 1hr (217).

-Muestra PLGA-PEG: 5 mg de PLGA-PEG (o PLGA como control) se disuelven en 1 mL de una solución de $CDCl_3$ (213).

3.6.2 Espectroscopia IR

Con el fin de evaluar la formación del co-polímero CS-PEG, se realizaron medidas de IR mediante la utilizando un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Shimadzu Prestige-21 FT-IR. Las muestras (CS, PEG y CS-PEG) fueron finamente trituradas y mezcladas con bromuro de potasio, KBr. Luego, la mezcla fue comprimida en forma de pellet y el análisis espectral de FTIR se llevó a cabo en el rango de 400–4000 cm^{-1}

3.6.3 Tamaño y potencial Z

El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas fueron obtenidos mediante la utilización de un Nano Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). La distribución de tamaños de las nanopartículas se reporta como índice de polidispersidad (IP). Las muestras fueron analizadas por triplicado y los resultados de tamaño y potencial z se expresan como la media ± la desviación estándar (SD).

3.6.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las características morfológicas de las Nc CS y las Np PLGA fueron examinadas a través del microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japan). Las muestras fueron teñidas con una solución al 2% (m/v) de ácido fosfotúngstico y colocadas sobre una grilla con film de carbón de 200 mesh.

Las LPHNp fue examinadas utilizando un microscopio HR-STEM JEOL 2100 (Jeol Ltd., Japón) de alta resolución. Las muestras fueron teñidas con una solución de acetato de uranilo al 2% (m/v), colocadas en una rejilla de cobre recubierta con película de carbono (300 mesh) y secadas al aire durante 24 horas antes de su observación.

3.6.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para el caso de las LPHNp, también fueron examinadas mediante AFM en modo tapping utilizando un Microscopio AFM WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania). Los datos de AFM fueron adquiridos depositando una gota de la suspensión de nanopartículas sobre un sustrato de silicio, y la muestra fue posteriormente secada bajo un flujo de nitrógeno.

3.6.6 Espectroscopia Raman

Con el fin de evaluar la composición química de la muestra y/o los posibles grupos funcionales involucrados en la formación de la nanopartícula se llevaron a cabo estudios por espectroscopia Raman utilizando un Microscopio Raman-Confocal, WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Germany). Para este propósito, las muestras fueron depositadas sobre una oblea de silicio y secadas al aire libre durante 24 horas.

3.6.7 Eficiencia de Encapsulación (EE)

La eficiencia de encapsulación (EE) de las nanopartículas cargadas con DCX fue determinada indirectamente por diferencia entre la cantidad total de DCX en la formulación y la cantidad de DCX libre en el sobrenadante. La cantidad de DCX libre en el sobrenadante se determina mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) luego de la separación con las nanoestructuras mediante centrifugación con tubos Amicon de 10 KDa a 4000 xg por 20 minutos. Para el método de cuantificación de DCX por HPLC (Thermo Scientific Ultimate 3000) se utilizó un detector UV de 232 nm y una columna de fase reversa Agilent ZORBAX Extend 300 C18 (de dimensiones 4.6 x 150 mm, y tamaño de poro: 3.5 µm). La fase móvil consiste en una mezcla 50:50 acetonitrilo: agua. La velocidad de flujo fue de 1.2 mL/min y el volumen de inyección de 10µL.

Para determinar la cantidad de principio activo libre se realizó una curva de calibración de DCX. La curva estándar obtenida fue lineal ($r^2 > 0.999$) en el rango de concentraciones de 0.1 – 1.4 µg/mL, véase ***Anexo 3.***

3.6.8 Estudio de liberación

El perfil de liberación *in vitro* de DCX de las nanopartículas se determinó utilizando un método de diálisis dinámica. Para ello, 0.5 mL de la suspensión de nanopartículas se colocó en una bolsa de diálisis (corte de 2 KDa) y se dializó contra PBS (pH 7.4) o buffer acetato (pH 5), ambos conteniendo 0.5% de Tween-80. Esta configuración simuló condiciones fisiológicas y comportamiento de liberación intracelular. La bolsa de diálisis se mantuvo en agitación a 120 rpm y a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se realizaron tomas de 2 mL de dializado en intervalos de tiempo predeterminados, seguido de un reemplazo inmediato con medio fresco para mantener el volumen constante. La concentración de DCX liberado se determinó mediante HPLC.

3.6.9 Estudio de estabilidad en el tiempo

La estabilidad es un factor crucial que afecta el rendimiento y la funcionalidad de las nanopartículas por lo que es de gran importancia evaluarla. Para las pruebas de estabilidad, se almacenaron tres lotes de cada grupo de nanopartículas; vacías (CS-PEG o LPHNp), cargadas con DCX (CS-PEG-DCX o LPHNp-DCX) y cargadas con DCX y funcionalizadas con el anticuerpo Chi-Tn (CS-PEG-DCX-Chi-Tn o LPHNp-DCX-Chi-Tn) a 4 °C. Luego, se determinaron los tamaños de partícula de cada grupo mediante la técnica de DLS en intervalos de tiempo predeterminados.

3.7 Caracterización Biológica

3.7.1 Ensayo de viabilidad celular MTT

Para evaluar la citotoxicidad de las nanoesferas de PLGA obtenidas se realizaron ensayos colorimétricos (MTT) a 72 hr en la línea celular A549. El protocolo que se siguió es el que se detalla a continuación. En una placa de 96

pocillos se siembran 100 µL de células A549 a una concentración de $5X10^3$ células/pocillo, y se incuban en estufa por 24 hrs con 5 % de CO_2 a 37 °C. Luego de transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se reemplaza por los siguientes tratamientos: DCX libre, Np PLGA cargadas con DCX y un blanco de Np PLGA vacías como control en varias concentraciones (12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 y 0 µg de DCX/mL) por triplicado. A las 72 hrs se remueve el medio y se agrega una solución de medio de cultivo conteniendo MTT (a una concentración final de 0,5 mg/mL) a cada pocillo. Se incuba 3 hrs en estufa de cultivo y luego se descarta la solución y se agrega isopropanol acidificado para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se mide la absorbancia de cada pocillo a 570 nm en un lector de placas. Se determina el promedio de los triplicados y se calcula el porcentaje de células viables empleando los pocillos controles como 100%.

3.7.2 Ensayo de viabilidad celular CCK8

Las células A549 fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo, se incubaron en estufa de cultivo por 24 hrs hasta confluencia. Luego, se agregaron 10 µL de los siguientes tratamientos: DCX, nanopartículas vacías (CS-PEG o LPHNp), nanopartículas cargadas con DCX (CS-PEG-DCX o LPHNp-DCX) y nanopartículas cargadas con DCX y funcionalizadas al anticuerpo Chi-Tn (CS-PEG-DCX-Chi-Tn o LPHNp-DCX-Chi-Tn). Después de 24, 48 y 72 horas de incubación, se añadieron 10 µL de solución de CCK-8 a cada pocillo, seguido de una incubación por 1 hora a 37 °C. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de placas. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje en función del control de células sin tratar.

3.7.3 Test de hemólisis

Para evaluar la compatibilidad sanguínea de las formulaciones de CS y LPHNps conteniendo 4 mg de DCX/mL se realizó un test de hemólisis según el método reportado por Zanotto-Filho et al. (218) con algunas modificaciones.

Para las Nc CS

Se quiso evaluar la compatibilidad sanguínea de las formulaciones con o sin glicerol, como agente isotónico. En resumen, 6.0 mL de glóbulos rojos, obtenidos de donantes humanos sanos, se resuspendieron en 12.0 mL de buffer fosfato (PBS, pH 7.4). Las Nc CS con o sin glicerol, a concentraciones del 2 y 8% (v/v), se incubaron a 37 °C con 200 µL de glóbulos rojos y 300 µL de PBS durante 2 horas a 37 °C. También se evaluó una solución de glicerol que contenía la misma concentración presente en las Nc CS (2.6%, m/v). Los tubos se centrifugaron (3000 rpm, 10 min), y el sobrenadante se midió a 570 nm.

Para las LPHNps

Se resuspendieron 4 mL de glóbulos rojos en 8 mL de PBS, pH 7.4. Las nanopartículas con o sin DCX, a concentraciones de 2 y 8% (v/v), se incubaron con 200 µL de glóbulos rojos y 300 µL de PBS durante 2 horas a 37 °C. Los tubos se centrifugaron (760xg, 10 min), y el sobrenadante se midió a 570 nm.

En ambos casos, se realizó un blanco de las formulaciones de nanopartículas en PBS sin glóbulos rojos. El dodecilsulfato de sodio (SDS 0.2%, m/v) se utilizó como control positivo, y el PBS se utilizó como control negativo. Los valores de absorbancia se expresaron en relación con el número de veces que los tratamientos aumentan la hemólisis en comparación con el control negativo. Las muestras de sangre se obtuvieron del Departamento de Hemoterapia del Hospital Universitario (Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay), todos los donantes sanos dieron su consentimiento firmado de acuerdo con la Regulación Técnica de Transfusión de Medicina del Mercosur (Decreto Número 385/000).

3.7.4 Ensayo de internalización celular por microscopía confocal

Las células A549 fueron cultivadas en portaobjetos en una placa de 12 o 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo durante 24 horas, luego el medio de cultivo fue cambiado por los tratamientos:

Tratamiento para las Nc CS; Nc CS-Coumarin-PEG y Nc CS-Coumarin-PEG-Chi-Tn mAb durante 1 y 24 hrs de incubación a 37 °C.

Tratamiento para las LPHNps: LPHN-Coumarin y LPHN-Coumarin-Chi-Tn mAb, con una incubación de 30 minutos a 4 y 37 °C.

Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3%. Los núcleos se tiñeron con 5 µL de DAPI (4′,6-diamidino-2-fenilindol; 1 µg/mL) durante 1–2 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron. Finalmente, las células se montaron para su observación mediante un microscopio de barrido láser confocal (CLSM, LSM 800, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.7.5 Ensayo de internalización celular por citometría de flujo

En el caso de las LPHNps, también se evaluó la internalización por citometría de flujo. Se siguió el mismo protocolo descripto en el apartado anterior, a excepción de que, en lugar de fijar y teñir las células, estas se recolectaron por centrifugación a 300 xg durante 10 minutos y se resuspendieron en PBS (pH 7.4). Las medidas de intensidad de fluorescencia se adquirieron utilizando un citómetro de flujo BD Accuri C6.

3.7.6 Ensayos *in vivo* preliminares.

Con el fin de evaluar la actividad antitumoral de los nanosistemas obtenidos se realizaron estudios *in vivo* preliminares en ratones *nude* de la cepa Balb/c (carentes de linfocitos T), los que son capaces de aceptar trasplantes de células humanas. Los tumores fueron inducidos inoculando ratones con 1 x 10^6 células de la línea A549 de cáncer de pulmón humano. Para monitorear la progresión del tumor en crecimiento, se realizaron varias medidas a la semana del volumen tumoral, el cual se calculó utilizando la fórmula $V = (A.B^2)/2$, donde A y B representan los diámetros más corto y más largo del tumor, respectivamente. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm^3, los ratones se dividieron en cinco grupos de tratamiento.

Para el caso de las Nc CS, se disponía de 12 ratones para el ensayo. Los cuales se dividieron en 5 grupos tratamiento, recibiendo la inoculación intra-tumoral de: 1) Solución salina (PBS), como control positivo del desarrollo tumoral (n = 2); 2) DCX , como control positivo de un fármaco activo contra el cáncer de pulmón (n = 2); 3) Nc CS vacías (n = 2); 4) Nc CS conteniendo DCX (n = 3) y 5) Nc CS-DCX conjugadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn (n = 3). Los animales recibieron 2 dosis de 6.5 mg de DCX/Kg con una diferencia de 4 días.

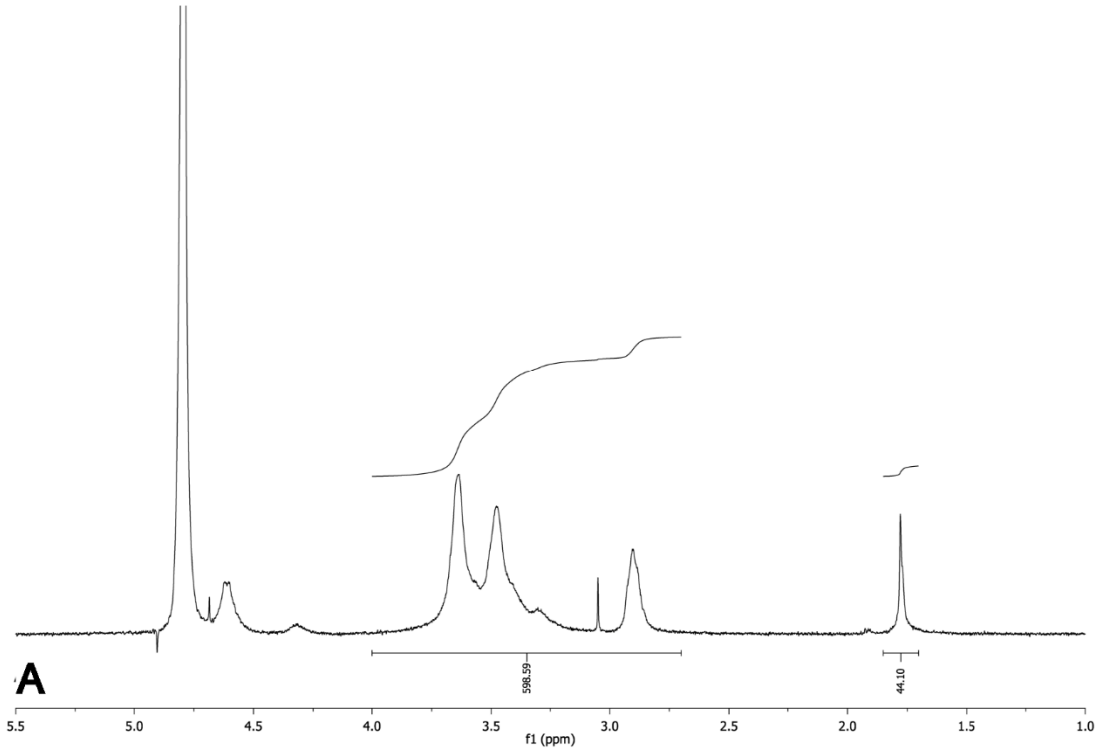
Para el caso de las LPHNp, se disponía de 30 animales que fueron divididos en 5 grupos de evaluación. Recibiendo una administración intraperitoneal con el fin de evaluar tanto la eficacia de la nanoencapsulación como la capacidad de direccionamiento del anticuerpo. Los grupos de tratamientos fueron los siguientes: 1) Solución salina (PBS), como control positivo del desarrollo tumoral (n = 5); 2) Taxotere, formulación comercial de DCX, como control de un fármaco activo contra el cáncer de pulmón (n = 5); 3) LPHNp-ChiTn vacías (n = 5); 4) LPHNp conteniendo DCX (n = 5) y 5) LPHNp-DCX conjugadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn (n = 5). Los animales recibieron 3 dosis de 10 mg DCX/mL cada 4 días, completando un tratamiento total de 30 mg de DCX/kg. La tasa de supervivencia de los animales se calculó durante un período de 87 días en todos los grupos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados nanocápsulas de CS:

4.1.1. PEGilación del CS

La PEGilación del CS tuvo lugar gracias a la unión covalente entre el grupo amino del CS y el grupo carboxilo del PEG mediante una reacción con carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Con el fin de evaluar la formación del co-polímero se llevó a cabo un estudio por ^{1}H-RMN y FTIR. En la Figura 14 se observan los espectros por ^{1}H-RMN del CS (A) y del CS-PEG (B), cuya comparación pone de manifiesto la efectiva unión del polisacárido al PEG. La presencia de una fuerte señal en 3.4 ppm en el espectro de CS-PEG, procedente de los protones de las unidades de etileno del PEG, indica la unión entre CS y PEG (219,220). El grado de PEGilación obtenido fue de 1,81 % (***Anexo 1***).



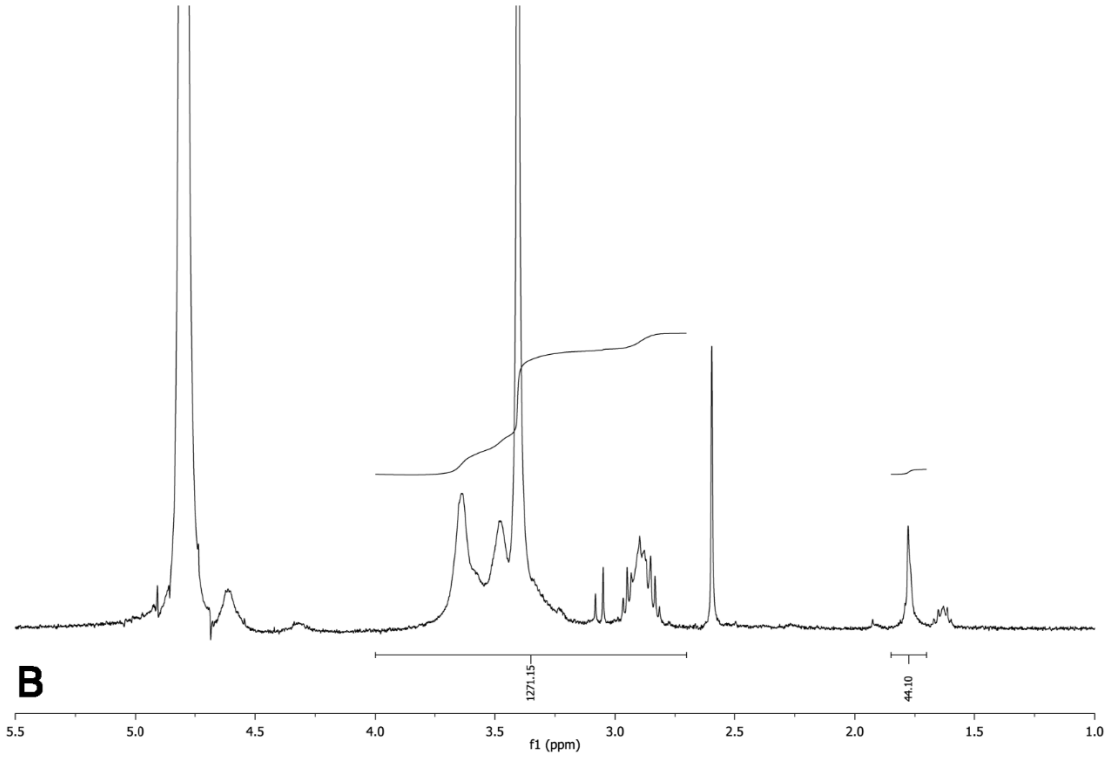


Figura 14 Espectros ^{1}H-RMN de CS (A) y CS-PEG (B).

H-NMR (D_2O–DCl), 400 MHz) **CS** (217)**: δ 4.5** (corresponde al hidrógeno unido al carbono anomérico 1), **3.5–3.8** (corresponde a los protones unidos a los átomos de carbono 3, 4, 5 y 6 del anillo de glucopiranosa), **3.2** (corresponde al hidrógeno unido al carbono 2 del anillo de glucopiranosa), **1.55** (corresponde a los hidrógenos de los grupos metilo pertenecientes al grupo acetamida). **PEG: δ 3.4** (CH_2CH_2O).

La conjugación entre CS y PEG también fue analizada por FTIR. Como se muestra en la Figura 15, los picos característicos de PEG (espectro c), correspondientes a la vibración de flexión de –CH aparecen a 1461 y 955 cm^{-1}, mientras que el pico correspondiente a $–CH_2$ se observa a 845 cm^{-1}. Los picos a 2887 y 1110 cm^{-1} se atribuyeron al estiramiento de C−H y C−O. Las bandas amidas típicas de CS (espectro a) fueron claramente observadas a 1633 cm^{-1} (amida I), 1521 cm^{-1} (amida II) y 1379 cm^{-1} (amida III). El CS PEGilado (espectro b) exhibió la mayoría de las bandas de absorción características de ambos, predominantemente del CS, con algunos cambios en la intensidad y número de onda. El pico a 1521 cm^{-1} correspondiente a la vibración de flexión de $–NH_2$ desapareció, indicando que el grupo amino del CS reaccionó con el PEG.

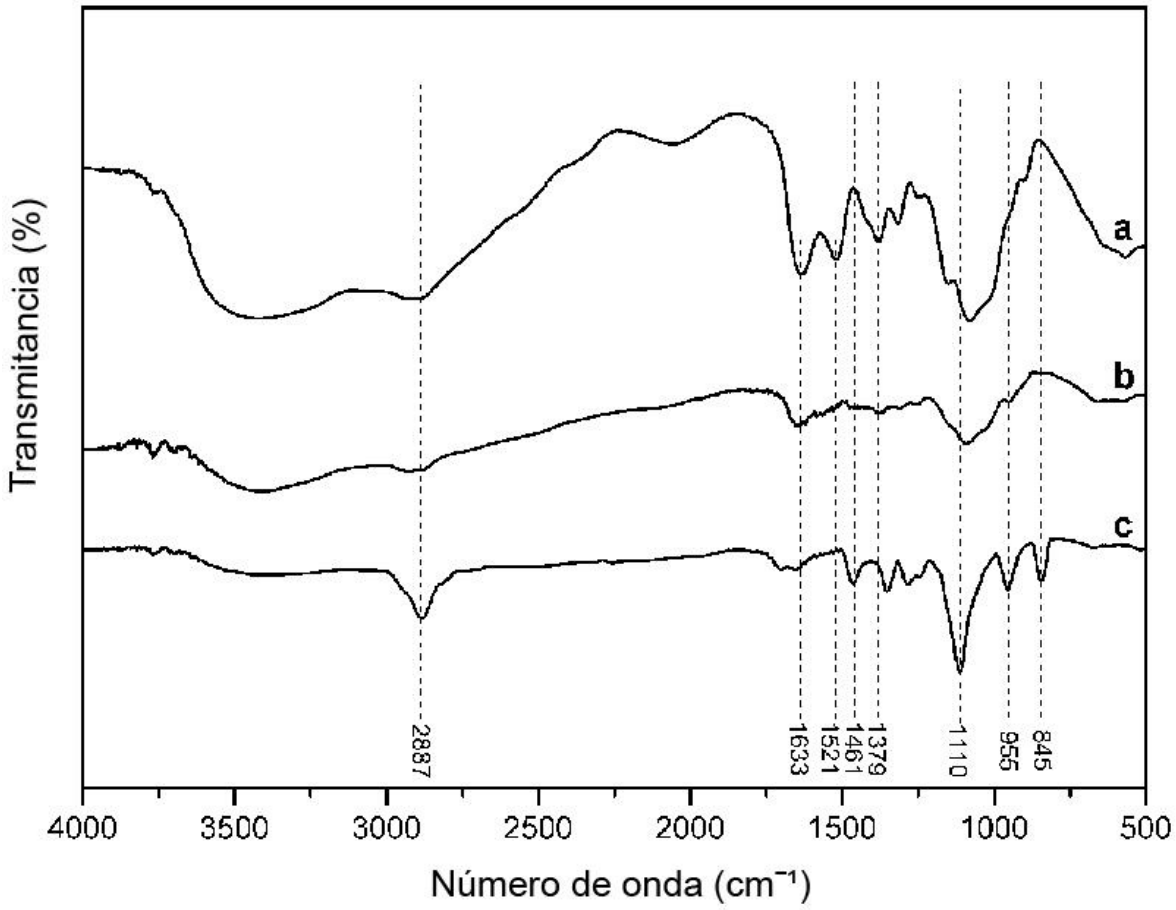


Figura 15 Espectros FTIR de CS (a), CS-PEG (b) y PEG (c).

La incorporación de PEG en la superficie de las nanopartículas es una de las estrategias más utilizadas para evitar el reconocimiento por el sistema reticuloendotelial y prolongar el tiempo de circulación en la sangre (161,221,222). Sin embargo, la densidad superficial y la longitud de cadena de PEG pueden afectar algunas propiedades de las nanopartículas y las funciones de entrega de medicamentos (223). Reportes anteriores (224,225) han demostrado que un peso molecular más alto y un grado de sustitución más bajo de PEG resultan en la formación de nanopartículas más pequeñas con una carga superficial relativamente mayor. De hecho, los resultados obtenidos por Yang et al. (225) revelaron que las Nc CS, con grados de pegilación, tamaño de nanopartículas y valores de potencial zeta similares a los nuestros, son capaces de evadir la fagocitosis por macrófagos y las interacciones inespecíficas con glóbulos rojos. Esto podría sugerir que las Ncs de CS-PEG desarrolladas en el presente trabajo podrían ser capaces de superar los

obstáculos que acontecen tras la formación de la corona proteica durante la circulación sanguínea.

4.1.2. Preparación de las nanocápsulas de CS

Las nanocápsulas fueron preparadas mediante la técnica de desplazamiento de solvente. Las interacciones iónicas entre las cargas negativas de la lecitina y las cargas positivas del CS dan lugar a la formación espontánea de las nanopartículas, con una cubierta polimérica de CS envolviendo el núcleo oleoso. Con el fin de evaluar las interacciones intermoleculares implicadas en la formación de las Nc CS, se llevó a cabo un análisis por espectroscopia Raman. En la Figura 16 se muestran los espectros Raman del CS (a), la lecitina de soja (c) y las Nc CS ya formadas (b). El modo de estiramiento vibracional N-H del grupo amino del CS se encuentra aproximadamente en la región 3329 cm^{-1} (226,227), mientras que las bandas características de los modos vibracionales del fosfato se encuentran en la región de 1263 y 1086 cm^{-1} para el estiramiento antisimétrico y simétrico del PO^{2-}, respectivamente (228,229). Por lo tanto, el espectro Raman de las nanopartículas de CS nos permite inferir que los grupos fosfatos de la lecitina de soja y el grupo amino del CS podrían ser los grupos funcionales involucrados en su formación. Pues claramente se observan diferencias en los picos previamente mencionados de los espectros de lecitina y CS en comparación con el espectro Raman de las nanopartículas.

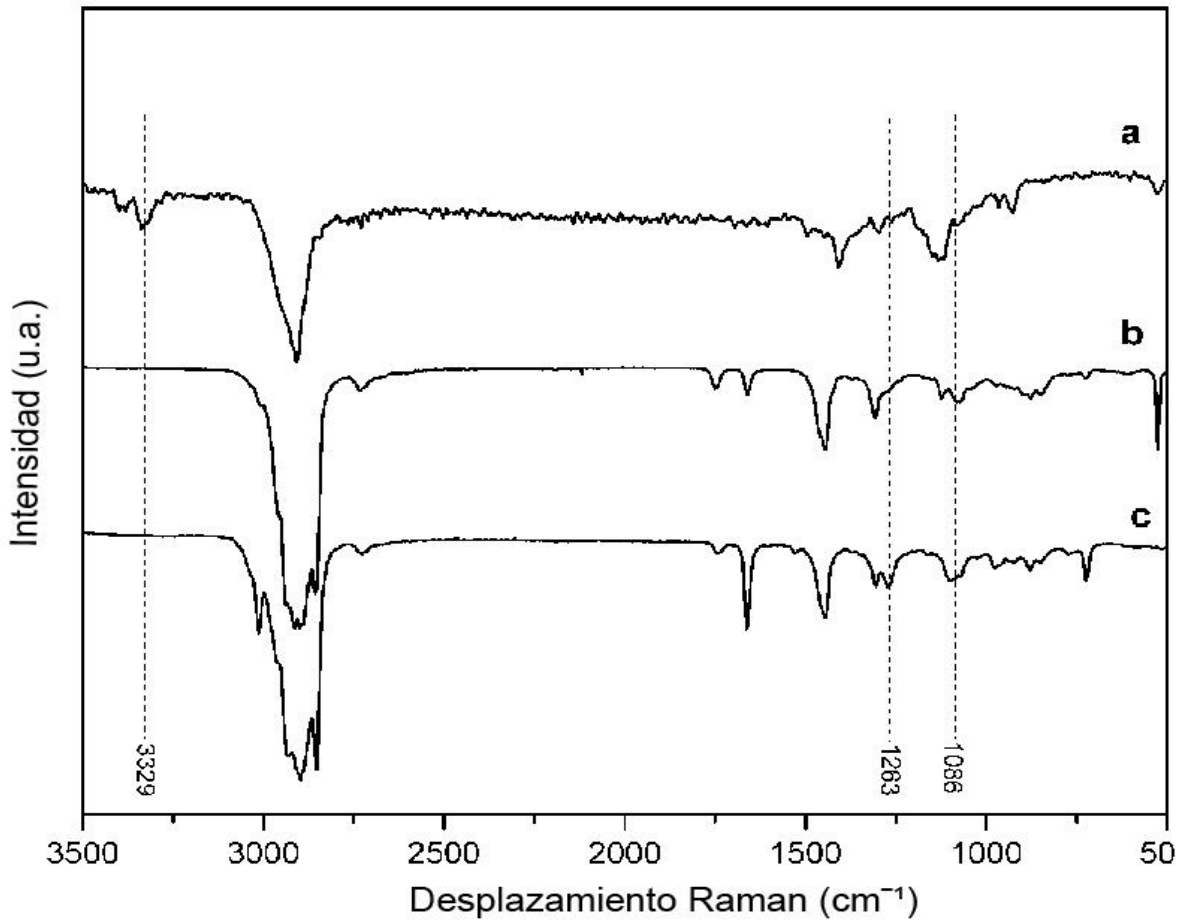


Figura 16. Espectros Raman de CS (a), Nc CS (b) y lecitina de soja (c).

4.1.3. Tamaño, potencial Z y EE

El tamaño promedio, el índice de polidispersidad (IP) y el potencial Z de las nanopartículas de CS, CS-PEG, CS-PEG-DCX y CS-PEG-DCX-Chi-Tn se detallan en la Tabla 4, así como también la eficiencia de encapsulación (EE) de la formulación que contiene DCX.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de CS

Formulación	Tamaño ± SD (nm)	IP ± SD	Potencial Z ± SD (mV)	EE ± SD (%)
Nc CS	174.6 ± 3.1	0.2 ± 0.1	32.9 ± 4.7	-
Nc CS-PEG	163.5 ± 2.7	0.2 ± 0.1	30.5 ± 0.7	-
Nc CS-PEG-DCX	189.7 ± 4.9	0.2 ± 0.1	31.4 ± 4.0	99.98 ± 0.01
Nc CS-PEG-DCX-ChiTn	222.8 ± 26.7	0.3 ± 0.1	26.6 ± 3.5	99.98 ± 0.01

Tal como puede observarse en la Tabla 4, las nanopartículas presentan una distribución de tamaños homogénea en el entorno de los 200 nm, por lo que se encuentra dentro del rango de tamaños óptimos para mejorar su tiempo de circulación en los fluidos biológicos, así como también para su internalización celular. Además, presentan una alta carga superficial positiva, mayor a 27 mV, por lo que nos es posible decir que las soluciones coloidales obtenidas son estables. Por otra parte, la formación de las nanocápsulas, con un núcleo oleoso de Crodamol y lecitina de soja recubierto por un material pared hidrofílico como el CS, permite la encapsulación de altas concentraciones de drogas hidrofóbicas en su interior (como lo es el DCX), lo cual explica la alta eficiencia de encapsulación obtenida en este tipo de nanosistema. Esta estructura de reservorio permitió una eficiencia de encapsulación del 99.9% para el DCX con una carga final de 4 mg de DCX/mL, lo cual es considerablemente mayor en comparación con los trabajos análogos informados por otros grupos (119,230). Por ejemplo, el grupo de investigación de Torrecilla et al. (119) obtuvieron nanocápsulas de CS con una carga final de 0.1 mg de DCX/mL para experimentos *in vitro*, posteriormente realizaron pasos de concentración mediante ultracentrifugación para alcanzar una carga final de 4 mg de DCX/mL con el fin de lograr la dosificación efectiva *in vivo* de DCX. Sin embargo, este tipo de procedimiento podría dañar la integridad de las nanopartículas y podrían surgir dificultades en la resuspensión del pellet y problemas de agregación.

Para obtener nanocápsulas CS-PEG funcionalizadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn, nos centramos en una de las interacciones no covalente más potente asociada con avidina-biotina, donde las Nc CS-PEG, que exponen un motivo de biotina en la superficie, fueron incubadas primero con avidina, una proteína tetramérica, y luego con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado. Se llevó a cabo un ensayo colorimétrico HABA-avidina para determinar la cantidad de moléculas de biotina conjugadas a las nanocápsulas y al anticuerpo Chi-Tn mAb. Según estos experimentos, el 0.09% de CS fue biotinilado y se obtuvieron 5 marcaciones de biotina por anticuerpo (***Anexo 2***). Las ventajas de esta estrategia, previamente reportadas (219,231,232), incluyen el control de la ubicación y densidad del ligando en la superficie de la nanopartícula para garantizar una interacción

ligando-receptor más eficaz. Como era de esperar, la encapsulación de DCX y la funcionalización del anticuerpo Chi-Tn apenas modificaron el tamaño y la carga de las nanopartículas.

4.1.4. Morfología de las nanopartículas de CS

En la Figura 17 se observan las imágenes de TEM de las Nc CS (A) y CS-PEG-DCX-Chi-Tn (B), en las que se puede apreciar una forma esférica y distribución de tamaño homogénea. Los tamaños obtenidos por TEM son levemente más pequeños que los obtenidos por Nano Zetasizer. Esta pequeña diferencia en la medida de tamaño surge porque en solución los iones de carga opuesta serán atraídos a la superficie de las nanopartículas generando capas iónicas que se mueven junto con ella, y el Nano Zetasizer mide el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en solución, mientras que el TEM informa el diámetro real de las nanopartículas sin la capa iónica (114).

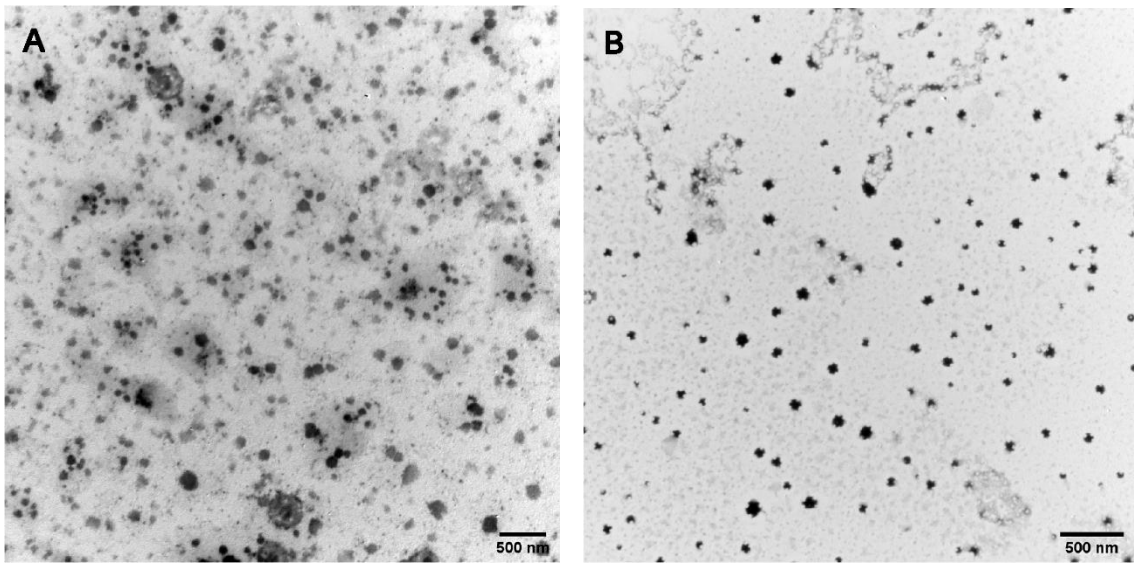


Figura 17. Imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas de CS (A) y CS-PEG-DCX-ChiTn (B).

4.1.5 Estudio de liberación Nc CS

El perfil de liberación del DCX de las nanocápsulas de CS en diferentes condiciones de pH; pH 5 (simulando el pH endosomal y el microambiente tumoral) y pH 7.4 (correspondiente a un ambiente fisiológico), se ilustra en la Figura 18. Se observa una tasa de liberación de DCX más lenta a pH 7.4 en comparación con pH 5. Este comportamiento de liberación sensible al pH puede atribuirse a la protonación de los grupos amino en el CS a valores de pH más ácidos, por debajo de su pKa = 6.3, generando un efecto de repulsión electrostática entre los grupos funcionales que facilita la difusión de DCX desde las nanopartículas. Esto puede resultar beneficioso en el caso de tratamientos oncológicos ya que el microambiente tumoral posee un pH más bajo. Además, el perfil de liberación de DCX muestra un patrón bifásico que consiste en una liberación rápida inicial del 9.9% para las nanopartículas a pH 5 y del 6.2% para las nanopartículas a pH 7.4 en las primeras 24 horas, seguido por una liberación más lenta y sostenida. La liberación inicial rápida puede atribuirse a la disolución y difusión de las moléculas del fármaco adsorbidas o ubicadas cerca de la superficie de la nanocápsula, seguido por la segunda fase que muestra una liberación sostenida debido a la liberación del fármaco desde la matriz y a la degradación del polímero. La liberación *in vitro* fue analizada cinéticamente mediante diferentes modelos matemáticos (modelo de orden cero, de primer orden, Hixsone Crowell, modelo de Higuchi y modelo de Korsmeyer-Peppas) (114), véase ***Anexo 4***. Los perfiles de liberación de DCX fueron evaluados en función de los valores del coeficiente de correlación lineal (r^2), que indiquen el mejor ajuste de los datos de liberación del fármaco. Los valores más altos de r^2 se obtuvieron con el modelo de Higuchi para las nanocápsulas a pH 5 y el modelo cinético de Korsmeyer-Peppas en ambas condiciones de pH. Los valores de la pendiente (n) calculados a partir de la ecuación de Korsmeyer-Peppas estuvieron en el rango de 0.45 a 0.89, lo que indica un transporte no Fickiano, por lo que la liberación de DCX de las nanocápsulas de CS puede deberse a una combinación tanto de difusión del fármaco a través del polímero y/o a la disolución del polímero (233,234). Estos resultados sugieren que las nanopartículas obtenidas podrían ser utilizados como sistemas de liberación controlada de DCX capaces de mejorar la eficacia antitumoral y reducir toxicidad adversa.

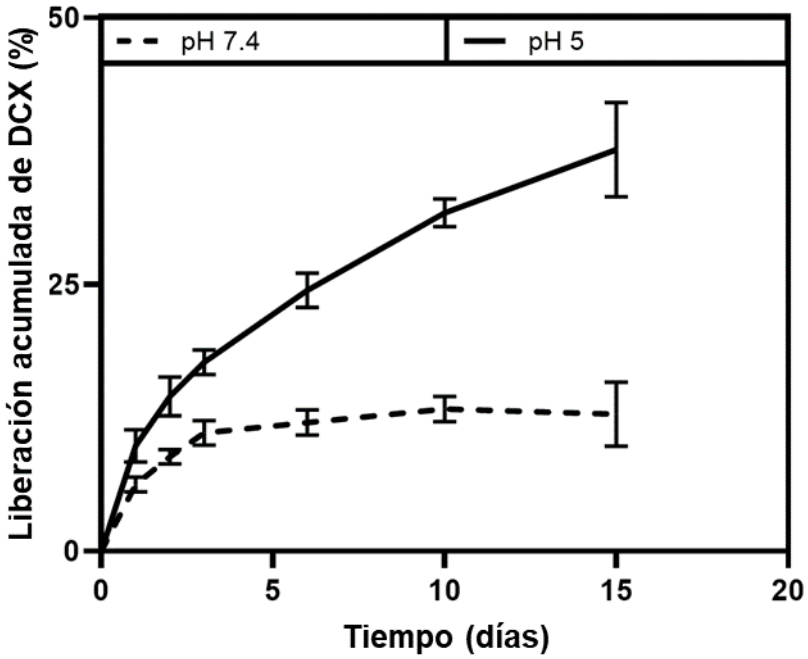


Figura 18. Estudio de liberación de DCX desde las Nc CS-PEG-DCX-Chi-Tn en PBS pH 7.4 y buffer acetato pH 5 a 37 °C.

4.1.6 Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de las nanopartículas es un factor clave que afecta el rendimiento y la funcionalidad en aplicaciones biomédicas a largo plazo. Para evaluar la vida útil de las formulaciones, se almacenaron tres lotes de cada grupo de nanocápsulas CS-PEG, CS-PEG-DCX y CS-PEG-DCX-Chi-Tn mAb a 4 °C. Los diámetros promedio ponderados por intensidad (z-promedio) se utilizaron para estudiar la estabilidad de las nanocápsulas de CS mediante mediciones de DLS en diferentes intervalos de tiempo. Como se muestra en la Figura 19, todas las muestras almacenadas a 4 °C permanecieron estables por al menos 24 días, mostrando una apariencia homogénea sin signos visibles de inestabilidad, como sedimentación o agregación.

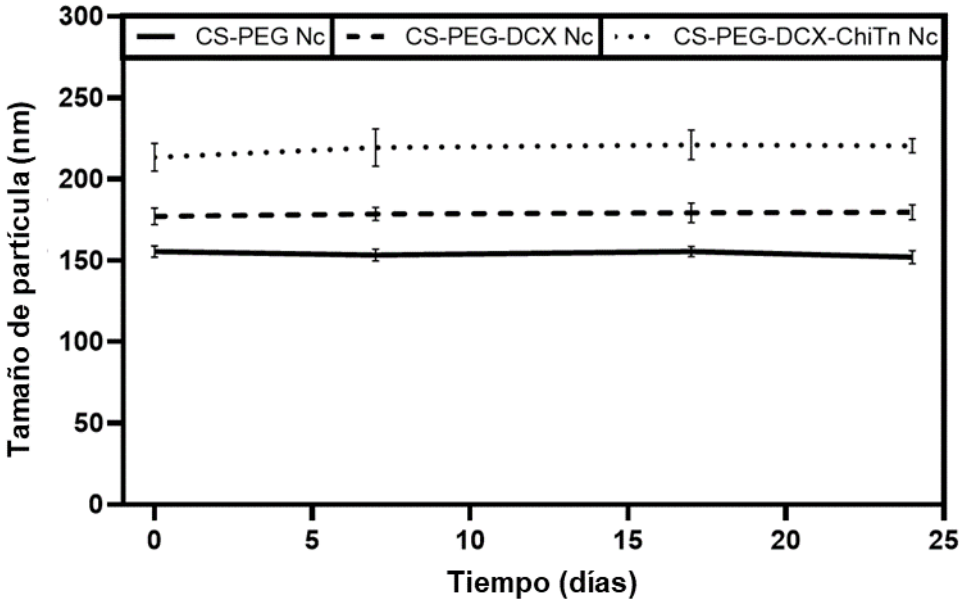


Figura 19. Distribución de tamaños de las formulaciones de Nc CS durante 24 días almacenados a 4 °C.

4.1.7 Test de hemólisis

Dado que las Nc CS generadas en el presente estudio se administrarán parenteralmente, se requieren formulaciones no tóxicas e isotónicas. Por lo tanto, se evaluó el potencial hemolítico de las Nc CS obtenidas, con o sin la adición de glicerol (2.6% m/v) como agente isotónico. Como se muestra en la Tabla 5, el control positivo exhibió una hemólisis extensa de 38.07 ± 3.11 veces mayor que el control negativo en la concentración máxima expuesta. La formulación de nanocápsulas sin glicerol presentó un bajo grado de hemólisis entre 0.8 (2%, v/v) y 2.36 (8%, v/v) veces mayores que el control negativo, y la adición de glicerol no aumentó la hemólisis, manteniéndose entre 0.34 (2% v/v) y 2.00 (8%, v/v). La hemólisis en la solución de glicerol de la misma concentración que las formulaciones no difirió del control negativo, resultando en 1.13 ± 0.10 (2%, v/v) y 1.07 ± 0.07 (8%, v/v). En resumen, las formulaciones de Nc CS con o sin glicerol no presentaron signos de hemólisis en ninguna concentración probada, siendo similares al control negativo (PBS).

Tabla 5. Valores obtenidos de hemólisis de diferentes formulaciones con o sin glicerol en dos concentraciones, expresadas en relación con el número de veces

que los tratamientos aumentan la hemólisis en comparación con PBS. (media ± desviación estándar; n = 3)

Concentración (% v/v)	Control positivo (SDS)	Nc CS-PEG-Chi-Tn	Nc CS-PEG-Chi-Tn con Glicerol	Nc CS-PEG-DCX-ChiTn	Nc CS-PEG-DCX-Chi-Tn con Glicerol
2	7.26 ± 1.19	0.93 ± 0.43	1.32 ± 0.45	0.80 ± 0.24	0.34 ± 0.22
8	38.07 ± 3.11	2.36 ± 0.62	2.00 ± 0.26	1.34 ± 0.10	1.99 ± 1.41

4.1.8 Estudio de internalización celular

Con el fin de evaluar la internalización de las Nc CS-PEG en la línea celular A549 de cáncer de pulmón humano, se encapsuló una sonda fluorescente y se detectó su internalización mediante microscopía confocal. Tal como se ilustra en la Figura 20, se observó una intensidad de fluorescencia intracelular más pronunciada en las células tratadas con Nc CS-PEG-Coumarin-Chi-Tn en comparación con las nanopartículas no funcionalizadas con el anticuerpo. Asimismo, la internalización celular parece incrementar al transcurrir el tiempo, ya que se observa mayor intensidad de fluorescencia a las 24 horas que a la hora de incubación, en ambas formulaciones. Estos resultados confirman el hecho de que el anticuerpo Chi-Tn puede estar influenciando de forma positiva la internalización celular de las nanopartículas. Por otra parte, se puede visualizar la sonda fluorescente dentro del citoplasma de casi todas las células después de la incubación, deduciendo que la internalización probablemente ocurre antes de que se libere una cantidad significativa de DCX, considerando el lento perfil de liberación del fármaco. Asimismo, la sonda parece encontrarse en vesículas, sugiriendo que las nanopartículas fluorescentes podrían haber ingresado a la célula a través de alguna vía endocítica, como también han informado previamente otros autores (235,236). En este sentido, es razonable suponer que las nanopartículas de CS podrían ser capaces de escapar de los endosomas a través de los mecanismos de ruptura osmótica, gracias a la presencia de grupos amino protonables en su superficie.

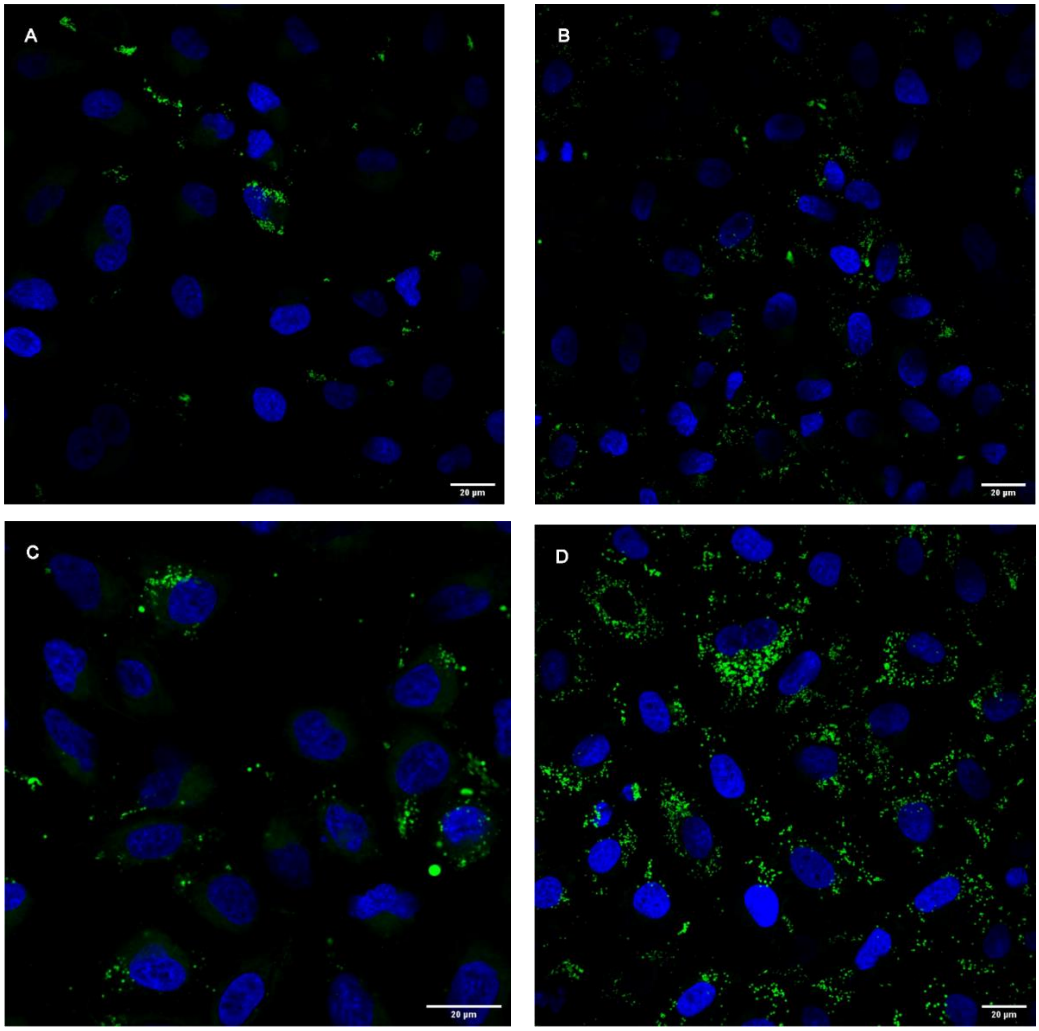


Figura 20. Imágenes de microscopía confocal de células A549 expuestas a las nanopartículas de CS-Coumarin-PEG luego de 1 hr (A) y 24 hr (B) de incubación, y CS-Coumarin-PEG-Chi-Tn luego de 1 hr (C) y 24 hr (D) de incubación.

4.1.9 Estudio de viabilidad celular

Para evaluar la citotoxicidad de las formulaciones de nanopartículas de CS y el DCX libre a diferentes concentraciones, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular CCK-8 colorimétrico con la línea celular A549 después de 24, 48 y 72 horas de incubación. Los resultados, mostrados en la Figura 21, indican que las Nc CS cargadas con DCX reducen notablemente la viabilidad celular de las células A549 en comparación con el DCX libre, con diferencias más marcadas durante las primeras 24 y 48 horas. Esto puede deberse a la rápida y eficiente internalización de las Nc CS cargadas con DCX, seguida de una liberación

sostenida del fármaco dentro de las células. Además, la adición del anticuerpo Chi-Tn a las nanopartículas mostró una diferencia significativa en comparación tanto con las Nc CS-PEG-DCX como con el DCX libre, sugiriendo que el anticuerpo podría mejorar la captación celular de los nanosistemas. Estos resultados están en línea con los estudios de internalización celular y concuerdan con reportes previos de nuestro grupo, donde se demostró que el anticuerpo Chi-Tn es rápidamente internalizado por diferentes líneas celulares de cáncer y se detecta en endosomas tempranos y de reciclaje (237). Por otro lado, las nanopartículas vacías no tuvieron efectos significativos en el crecimiento celular.

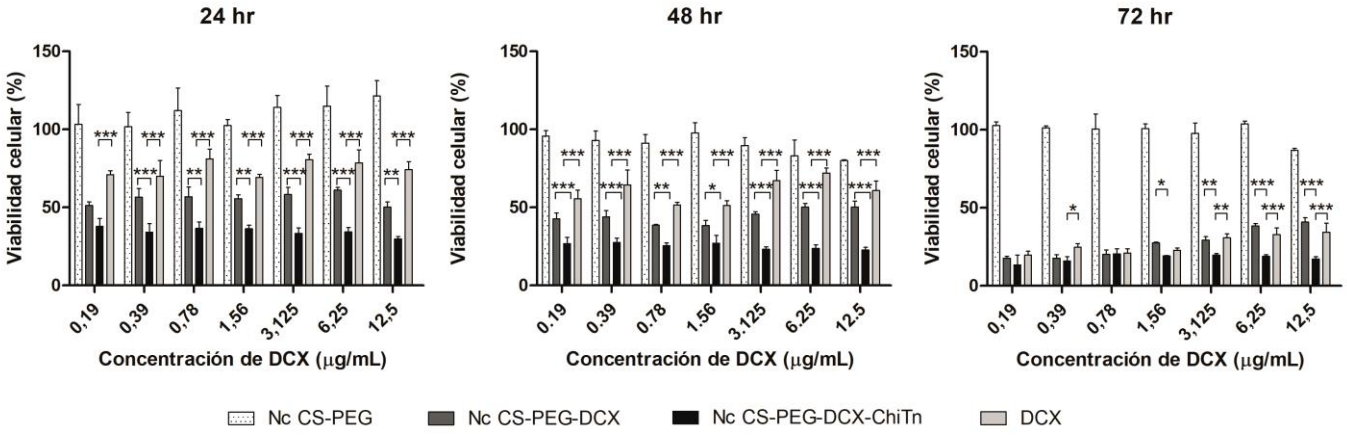


Figura 21. Ensayo de viabilidad celular CCK8 en la línea de cáncer de pulmón humano A549 a 24, 48 y 72 hr de incubación con Nc CS-PEG, Nc CS-PEG-DCX, Nc CS-PEG-DCX-Chi-Tn y DCX libre. Los datos se expresan como el promedio ± SD (n = 3). La significancia estadística se indica con * (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Cabe destacar que el concepto de la administración de fármacos mediante el empleo de inmuno-nanopartículas se presenta como una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer, mejorando la eficacia antitumoral y reduciendo los efectos secundarios (238). Para el tratamiento del cáncer de pulmón, los nanosistemas más evaluados han sido las nanopartículas dirigidas con el anticuerpo cetuximab, que reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cargado con diferentes fármacos como la camptotecina (239), docetaxel (240) y la gemcitabina (241). Todos estos estudios demostraron

una mayor actividad citotóxica *in vitro* en líneas celulares de cáncer de pulmón humano de las nanopartículas vectorizadas con el anticuerpo cetuximab en comparación con las que no lo tenían. Sin embargo, estas nanopartículas no se han evaluado en ensayos clínicos. Podríamos especular que estos compuestos podrían exhibir efectos secundarios mediados por anticuerpos anti-EGFR, afectando principalmente a epitelios proliferativos y mostrando signos de toxicidades dermatológicas o gastrointestinales, así como reacciones alérgicas, que podrían obligar a la discontinuación del tratamiento (242). Nuestra hipótesis es que un anticuerpo específico contra células cancerígenas, como el anticuerpo quimérico ratón/humano Chi-Tn, podría ser una mejor opción para el direccionamiento de nanocápsulas, considerando que el antígeno Tn se expresa en la mayoría de los carcinomas. En el cáncer de pulmón, se expresa con mayor frecuencia en adenocarcinomas que en carcinomas de células escamosas (243). Al mismo tiempo, permanece negativo en tejidos sanos (193).

4.1.10 Estudios *in vivo* preliminares

Para evaluar la actividad antitumoral de las nanopartículas de CS obtenidas se realizaron estudios *in vivo* preliminares en ratones *nude* de la cepa Balb/c. Los tumores fueron inducidos inoculando a los ratones con 1 x 10^6 células de la línea A549 de cáncer de pulmón humano. Para monitorear la progresión del tumor en crecimiento, se realizaron varias medidas a la semana del volumen tumoral, el cual se calculó utilizando la fórmula $V = (A.B^2)/2$, donde A y B representan los diámetros más corto y más largo del tumor, respectivamente. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm^3 (Figura 22), los 12 ratones disponibles para el ensayo se dividieron en cinco grupos de tratamiento:

1) Solución salina (PBS), como control positivo del desarrollo tumoral (n = 2)

2) DCX, como control positivo de un fármaco activo contra el cáncer de pulmón (n = 2)

3) Nc CS vacías (n = 2)

4) Nc CS conteniendo DCX (n = 3)

5) Nc CS-DCX conjugadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn (n = 3)

Los animales recibieron la inoculación intra-tumoral de 2 dosis de 6.5 mg de DCX/Kg con una diferencia de 4 días.



Figura 22. Ratones *nude* que desarrollaron tumores luego de ser inoculados con células A549.

En la Figura 23 se muestran los valores promedios del volumen tumoral correspondientes a cada uno del grupo de tratamiento en función del tiempo.

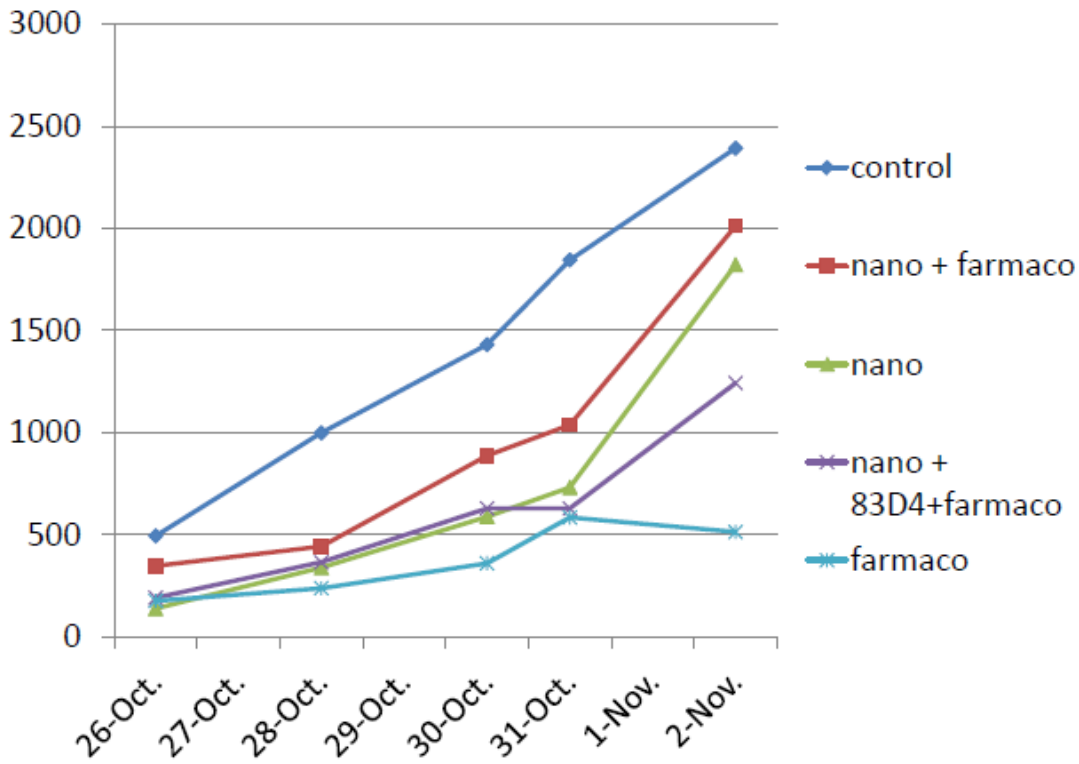


Figura 23. Curvas de crecimiento tumoral de acuerdo con el tratamiento recibido.

El mayor crecimiento tumoral lo presentan los animales que sólo recibieron la solución salina PBS (grupo Control), mientras que el menor crecimiento se constató en los ratones cuyos tumores fueron inoculados con DCX. En relación con los tres tipos de nanopartículas administradas se observa que la principal actividad antitumoral fue desarrollada por las nanopartículas conteniendo DCX conjugadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn. El hecho que la actividad anti-tumoral haya sido superior con respecto a las nanopartículas conteniendo DCX sin anticuerpo, sugiere que el anticuerpo Chi-Tn favorece el reconocimiento y muerte de las células de cáncer de pulmón en un tumor *in vivo*. Esto sigue en línea con los resultados de internalización y viabilidad celular obtenidos en las nanopartículas funcionalizadas.

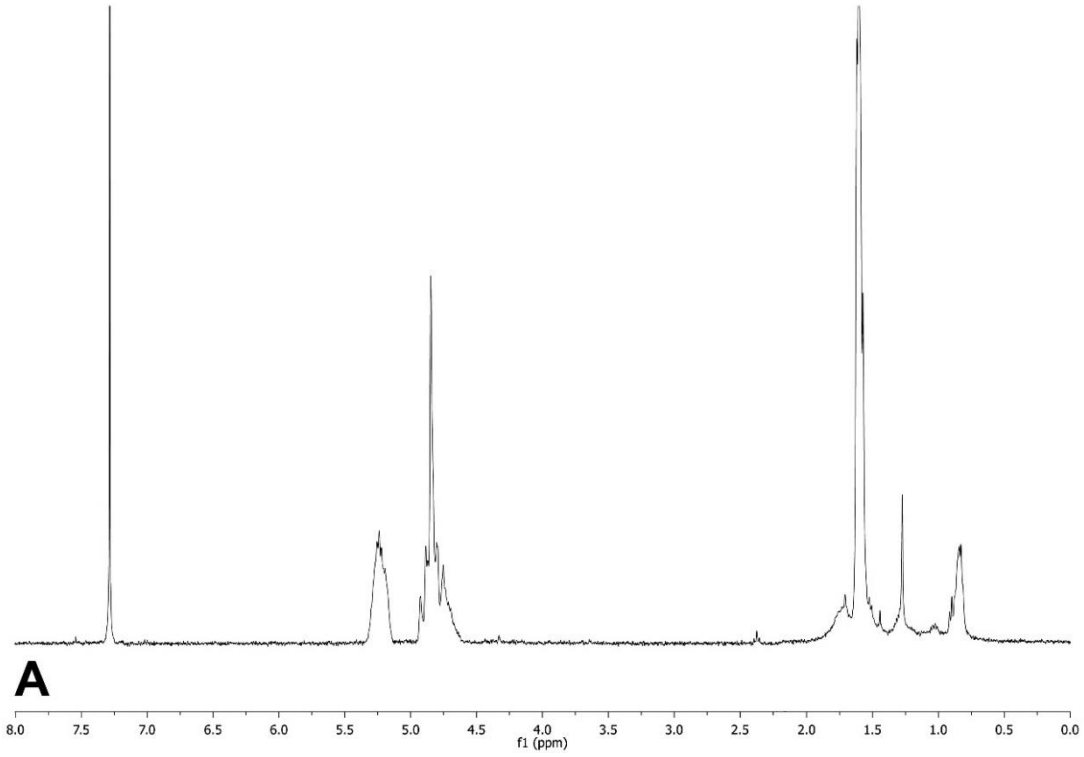
El menor crecimiento tumoral observado en el ensayo se corresponde con el tratamiento de DCX libre. Lo cual es de esperarse, ya que al tratarse de una administración intratumoral, el fármaco se encuentra disponible de forma inmediata a una dosis elevada en el microambiente tumoral.

Los resultados preliminares obtenidos en este ensayo *in vivo*, sobre tumores ya desarrollados, apoyan la hipótesis de que las inmuno-nanopartículas que hemos generado pueden tener potencial utilidad en el tratamiento de cáncer de pulmón. Sin embargo, será necesario aumentar el número de animales estudiados y, especialmente, efectuar la evaluación mediante administración intra-venosa. En este escenario. la inmuno-nanopartícula conteniendo DCX debería tener actividad anti-tumoral con menor efecto tóxico sobre los tejidos normales, en comparación con el DCX libre.

4.2. Resultados Nanoesferas de PLGA:

4.2.1. PEGilación del PLGA

Para corroborar la formación del co-polímero PLGA-PEG se llevó a cabo un estudio por ^{1}H-RMN. En la Figura 24 se observan los espectros del PLGA (A) y del PLGA-PEG (B), cuya comparación pone de manifiesto la efectiva unión del polímero al PEG. La señal característica de las unidades de etileno del PEG observadas a 3.7 ppm en el espectro del PLGA-PEG, corrobora la formación del co-polímero (212,213).



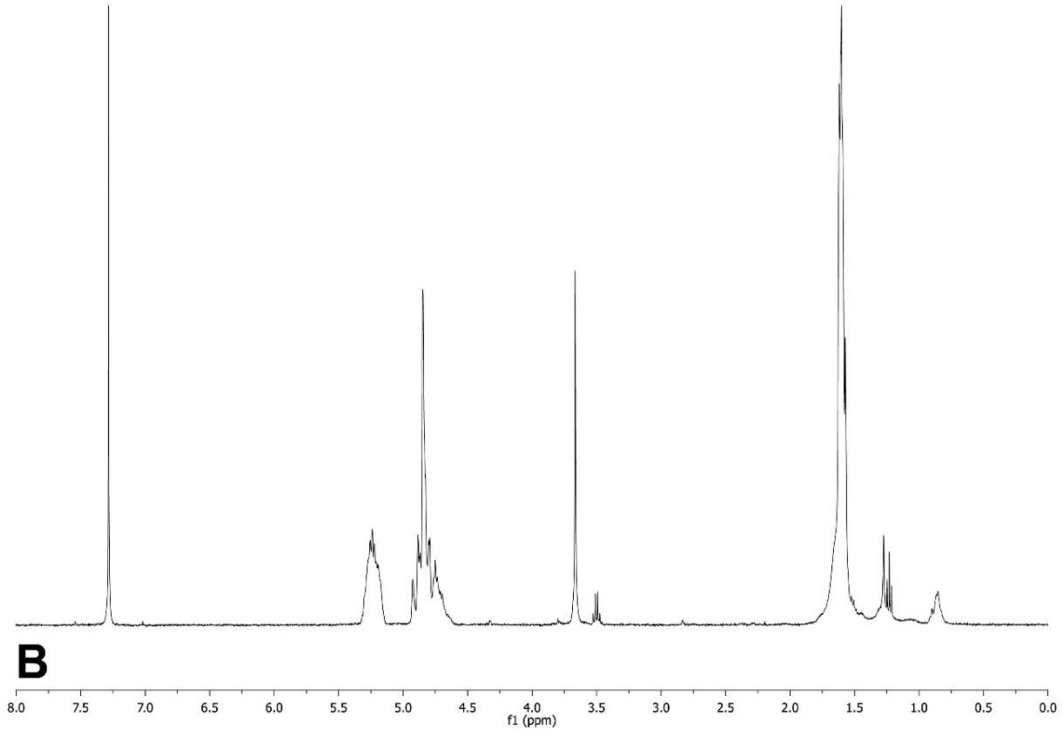


Figura 24. Espectros ^{1}H-RMN de PLGA (A) y PLGA-PEG (B).
H-NMR ($CDCl_3$), 400 MHz) **PLGA: δ 5.2** (CH); **δ 4.8** (CH2); **δ 1.6** (CH3). **PEG: δ 3.7** (CH2CH2O).

4.2.2. Formación de las nanoesferas de PLGA

A diferencia de las nanopartículas de CS, el estudio por espectroscopia Raman de las Np PLGA nos permitió corroborar la composición química y no los posibles grupos funcionales involucrados en su formación, ya que la mezcla de síntesis de este tipo de nanosistema solamente contiene PLGA. En la Figura 25 se muestran los espectros Raman de las nanopartículas de PLGA y PLGA puro, cuyos picos característicos coinciden en ambos espectros. Esto se debe a que los nanosistemas están formados por una matriz polimérica de PLGA dando lugar a las nanoesferas. Los picos observados entre 3000 y 2970 cm^{-1} se atribuyen a los modos de estiramiento de CH_3, mientras que los modos de estiramiento de CH_2 aparecieron a 2883 cm^{-1}. El pico cercano a 1770 cm^{-1} corresponde al estiramiento C=O, característico de los grupos carbonilo presentes en las unidades de ácido glicólico y láctico, mientras que los picos que aparecen en el rango de 1300-1470

cm^{-1} están asociados con los enlaces C-C y C-H en la estructura del polímero. El pico a 1455 cm^{-1} se corresponde con la deformación de los grupos metilo (CH_3), y los picos presentes en el rango de 1000–1200 cm^{-1} pueden atribuirse a modos de vibración de los enlaces carbono-oxígeno (C-O) presentes en los grupos éster del polímero (244,245).

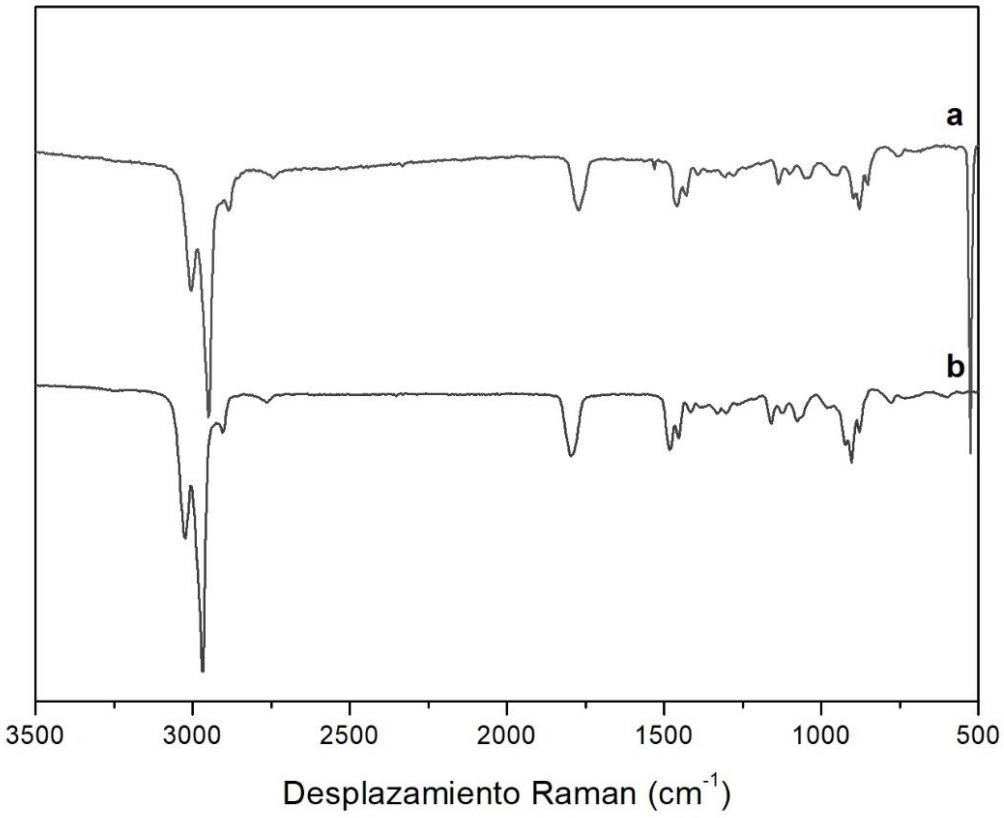


Figura 25. Espectros Raman de las nanoesferas de PLGA (a) y PLGA puro (b).

4.2.3. Tamaño, potencial Z y EE

El tamaño promedio, el IP y el potencial Z de las nanopartículas de PLGA, PLGA-PEG y PLGA-PEG-DCX se detallan en la Tabla 4, así como también la eficiencia de encapsulación de la formulación que contiene DCX.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de PLGA

Formulación	Tamaño (nm)	IP	Potencial Z (mV)	EE (%)
NpPLGA	161.6 ± 3.1	0.1	-23.4 ± 0.7	-
NpPLGA-PEG	127.9 ± 0.3	0.1	-26.6 ± 0.4	-
NpPLGA-PEG-DCX	116.9 ± 0.9	0.05	-29.0 ± 0.5	27.3 ± 2.8

Tal como puede observarse en la Tabla 6, el tamaño de las nanopartículas de PLGA se encuentra dentro del rango de tamaños óptimos para mejorar su tiempo de circulación en los fluidos biológicos, así como también para su internalización celular. Si bien el potencial zeta obtenido en todas las formulaciones fue menor al valor óptimo establecido (-30 mV), es válido decir que un potencial zeta superior a 20 mV (en valor absoluto) provee buena estabilidad a las suspensiones coloidales (182,246). Por otra parte, la formación de las nanoesferas, carentes de núcleo oleoso explica la baja eficiencia de encapsulación de DCX, ya que, en este caso el fármaco no se disuelve en ningún componente de la nanopartícula sino que queda retenido durante la formación de la matriz polimérica.

4.2.4. Morfología Np PLGA

En la Figura 26 se observan las micrografías obtenidas por TEM de las nanopartículas de PLGA con y sin PEG, en las que se puede apreciar una forma esférica y una distribución de tamaños homogénea. Al igual que las nanopartículas de CS, hay una diferencia en las medidas de tamaño obtenidas por Nano Zetasizer y TEM.

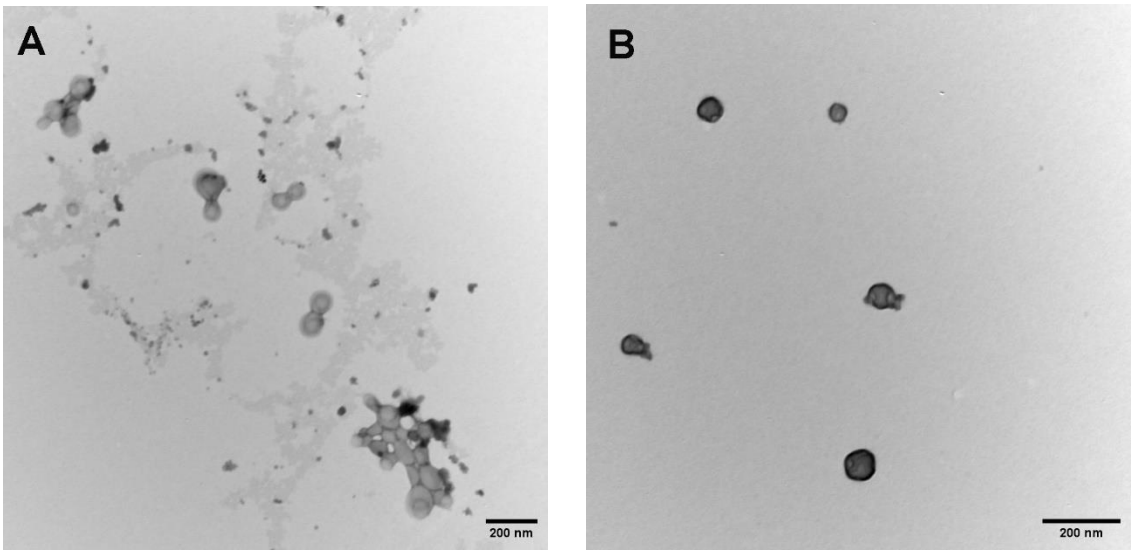


Figura 26. Imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas de PLGA sin (A) y con (B) PEG

4.2.5 Estudios de viabilidad celular Np PLGA

Con el fin de evaluar la viabilidad celular de las nanoesferas de PLGA obtenidas se llevó a cabo un estudio MTT en la línea celular A549 a 72 hrs de incubación con los tratamientos: Np PLGA, Np PLGA-PEG-DCX y DCX.

Los resultados obtenidos se presentan gráficamente en la Figura 27 en dónde se muestran los porcentajes de viabilidad celular para distintas concentraciones de los tratamientos.

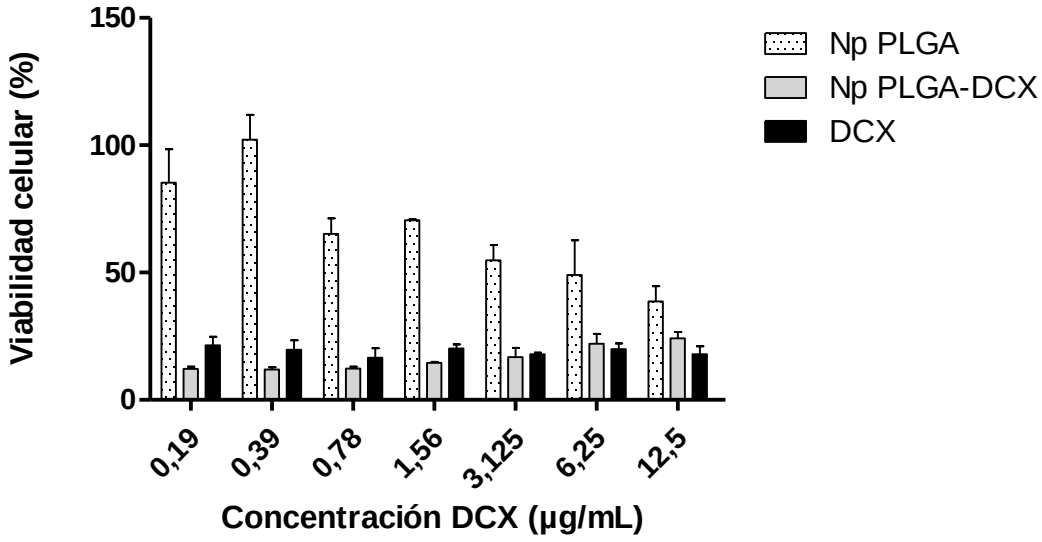


Figura 27. Ensayo de viabilidad celular MTT en la línea de cáncer de pulmón humano A549 a 72 hrs de incubación con Np PLGA, Np PLGA-PEG-DCX y DCX libre.

A partir de este estudio se puede observar que el porcentaje de viabilidad celular obtenido tanto para las Np PLGA-PEG-DCX y DCX libre fue menor al 30% en todas las concentraciones evaluadas, mientras que el control de Np PLGA vacías mostró un perfil de citotoxicidad menor al 50 % únicamente en la concentración más alta. Esto puede deberse a la baja EE de DCX que presenta este tipo de nanosistema, ya que, para llegar a las dosis más altas de tratamiento estipulada para el estudio, se reemplazó el medio de cultivo con un volumen más grande de la suspensión de nanopartículas. En otras palabras, se diluye el medio de cultivo y, como consecuencia, hay menos nutrientes disponibles para las células, lo que conlleva a una disminución de la viabilidad celular per se. Por lo que existen dos alternativas para evitar sobreestimar las medidas de citotoxicidad, trabajar dentro del rango de concentraciones de tratamiento más bajas (0.19 y 0.39 µg/mL de DCX) o mejorar la cantidad de DCX en las nanopartículas. Las nanoesferas de PLGA obtenidas en este trabajo presentan una EE del 27.3 % del compuesto, en una formulación que contiene una concentración final de 0.1 mg DCX/mL. Por lo que las caracterizaciones biológicas *in vivo*, en las que el volumen de administración es una limitante, requieren de formulaciones con concentraciones de activo más altas. Para ello fue necesario buscar una alternativa más eficiente que permitiese mejorar la capacidad de carga del DCX. Siguiendo el mismo concepto que las Nc CS, cuyo núcleo oleoso permite encapsular grandes cantidades de DCX, en conjunto con el creciente interés a nivel mundial por las nanopartículas hibridas lípido-polímero, estas últimas surgen como alternativa para solucionar el problema anteriormente mencionado.

4.3 Resultados LPHNp

Para la preparación de estos nanosistemas de encapsulación de DCX, se empleó al PLGA como un polímero hidrofóbico representativo para formar el núcleo polimérico de las nanopartículas. Además, se incorporó PEG unido con 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) como una estrategia de doble propósito: en primer lugar, para prolongar el tiempo de circulación de las nanopartículas en el torrente sanguíneo y, en segundo lugar, para actuar como ligando de unión con el anticuerpo. Por último, utilizamos DOTAP para facilitar la formación de una monocapa lipídica en la interfaz entre el núcleo de PLGA y la cubierta de PEG. Dado que la FDA ha aprobado el uso médico del PLGA y del DSPE-PEG, y que DOTAP es un lípido sintético ampliamente utilizado en investigaciones científicas y preclínicas, se espera que las LPHNp obtenidas sean biocompatibles, biodegradables y potencialmente seguras como portadoras de fármacos para futuros usos clínicos.

Las LPHNps fueron preparadas mediante la combinación y modificación de varios protocolos del método de nanoprecipitación de un solo paso previamente reportado por Bose et al. (214), Dai et al. (215) y Klippstein et al. (216). Más específicamente, la fase orgánica que contenía todos los constituyentes, incluyendo lípidos, polímeros y fármacos, se introdujo gradualmente en una fase acuosa que contenía un surfactante hidrofílico. La mezcla de las fases acuosa y orgánica dio lugar a la formación de una emulsión espontánea, y las partículas de núcleo polimérico se formaron como consecuencia de la precipitación del PLGA. Al mismo tiempo, los conjugados de DOTAP y DSPE-PEG se autoensamblaron alrededor del núcleo de PLGA para formar una monocapa lipídica cubierta por una capa de PEG más externa.

4.3.1 Formación de las LPHNp

Para examinar las interacciones intermoleculares inherentes en la formación de los nanocomplejos, se obtuvieron espectros Raman de soluciones que contenían componentes individuales y combinados. En la Figura 28, se muestran los espectros Raman de DSPE-PEG (a), DSPE-PEG-Biotin (b), PLGA (c), LPHNp (d),

DOTAP-Cl (e) y Crodamol (f). Las características más distintivas de los lípidos en la espectroscopia Raman dependen de las colas alquílicas. Específicamente, el modo de estiramiento vibracional de =CH se observa claramente a 3008 cm^{-1}, mientras que las bandas de resonancia Fermi de CH_2 y los modos de estiramiento simétrico aparecen en el rango de 2848-2880 cm^{-1}. Los modos de estiramiento de los enlaces C=O, C=C y C–C exhiben bandas a aproximadamente 1737 cm^{-1}, 1657 cm^{-1} y 1090 cm^{-1}, respectivamente. El tijereteo y torsión de CH_2 y la deformación en el plano de =C–H están situados en el rango de 1200-1450 cm^{-1} (247,248). En el caso de DOTAP, aparecen bandas adicionales alrededor de 3030, 970 y 761 cm^{-1}, correspondientes al grupo trimetilamonio (249). En el caso de PLGA, basándonos en trabajos previos, los picos detectados se atribuyen a modos vibratorios de unidades de ácido láctico y/o glicólico. Se observan picos característicos para los enlaces CH_2 (2884 cm^{-1}), CH_3 (2949 cm^{-1}) y carbonilo (C=O, 1771 cm^{-1}) (250).

Las discrepancias en los picos característicos previamente definidos para el PLGA y los lípidos fueron discernibles en el espectro Raman de las LPHNp. Estos resultados corroboran la formación de un complejo PLGA-lípidos, que tiene lugar debido a la presencia de interacciones hidrofóbicas de las colas alquílicas y/o los grupos éster de los componentes hidrofóbicos, así como también, a las interacciones iónicas entre los grupos carboxílicos de PLGA y el grupo trimetilamonio del DOTAP.

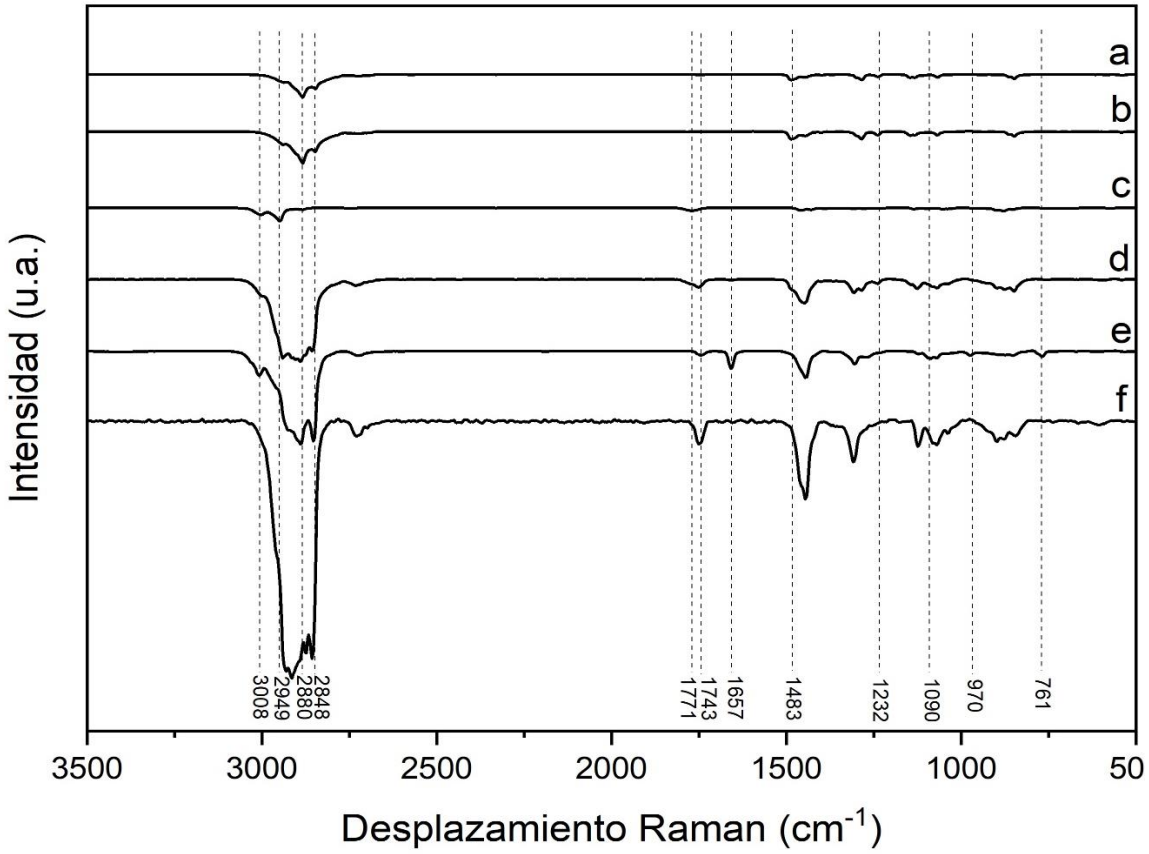


Figura 28. Espectro Raman de DSPE-PEG (a), DSPE-PEG-Biotin (b), PLGA (c), LPHNp (d), DOTAP-Cl (e) y Crodamol (f).

4.3.2 Tamaño, potencial Z y EE

Las LPHNp obtenidas presentan una población homogénea con un tamaño de partícula promedio de 250 nm y una alta carga superficial positiva (Tabla 7). La carga positiva se debe a la monocapa lipídica catiónica que rodea el núcleo polimérico hidrofóbico formado por PLGA y Crodamol. El DCX, un compuesto altamente insoluble en agua, presenta una fuerte afinidad por el núcleo hidrofóbico de estas LPHNps. Esta característica permite una excelente eficiencia de encapsulación del 99.92% para el DCX, lo que resulta en una carga final de 4 mg de DCX/mL. Al igual que las nanocápsulas de CS, para obtener las LPHNps funcionalizadas con el Chi-Tn mAb, se llevó a cabo una estrategia de unión avidina-biotina. En este proceso, las LPHNps, que presentan un motivo de biotina en su superficie, se incubaron inicialmente con avidina tetramérica, seguido de una incubación con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado.

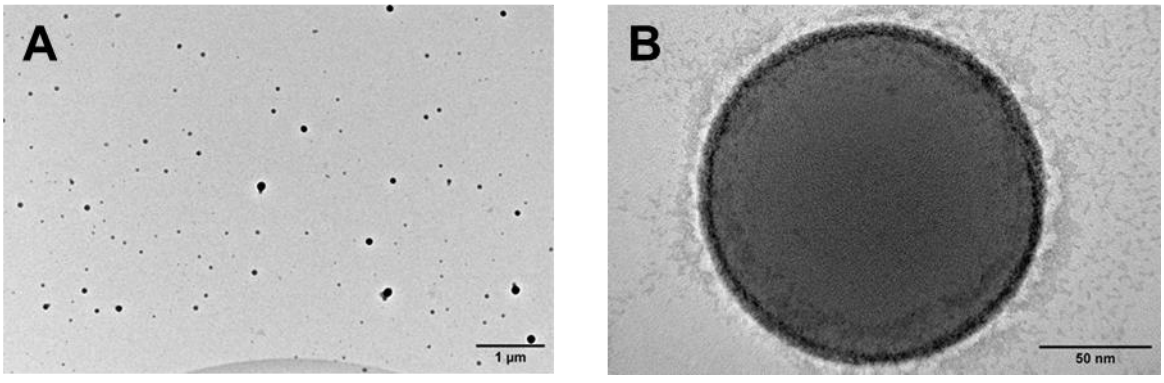
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de las LPHNp.

Formulación	Tamaño ± SD (nm)	IP ± SD	Potencial Z ± SD (mV)	EE ± SD (%)
LPHNp	201.9 ± 2.3	0.1 ± 0.01	32.1 ± 1.2	-
LPHNp-Chi-Tn mAb	205.5 ± 1.5	0.2 ± 0.01	36.6 ± 1.6	-
LPHNp-DCX	222.5 ± 1.3	0.1 ± 0.02	36.0 ± 0.9	99.92 ± 0.01
LPHNp-DCX-Chi-Tn mAb	232.3 ± 2.4	0.2 ± 0.02	37.6 ± 0.8	99.92 ± 0.01

Como se anticipaba, la encapsulación de DCX y la funcionalización del anticuerpo Chi-Tn tuvieron un impacto mínimo en el tamaño y la carga de los nanosistemas.

4.3.3 Morfología de las LPHNp

La apariencia morfológica de los sistemas se observó mediante TEM de alta resolución luego de teñirse con una solución de acetato de uranilo al 2%, que tiñe las estructuras lipídicas para mejorar su densidad electrónica. Las imágenes de TEM de LPHNps-DCX-Chi-Tn se muestran en la Figura 29 A y B. Las LPHNp tienen una forma redonda y un tamaño cercano a 200 nm, un resultado que se corresponde con lo obtenido por DLS. El grosor de la cubierta lipídica que rodea el núcleo de PLGA es inferior a 5 nm, lo que podría corresponder a una monocapa lipídica más una cubierta de PEG.



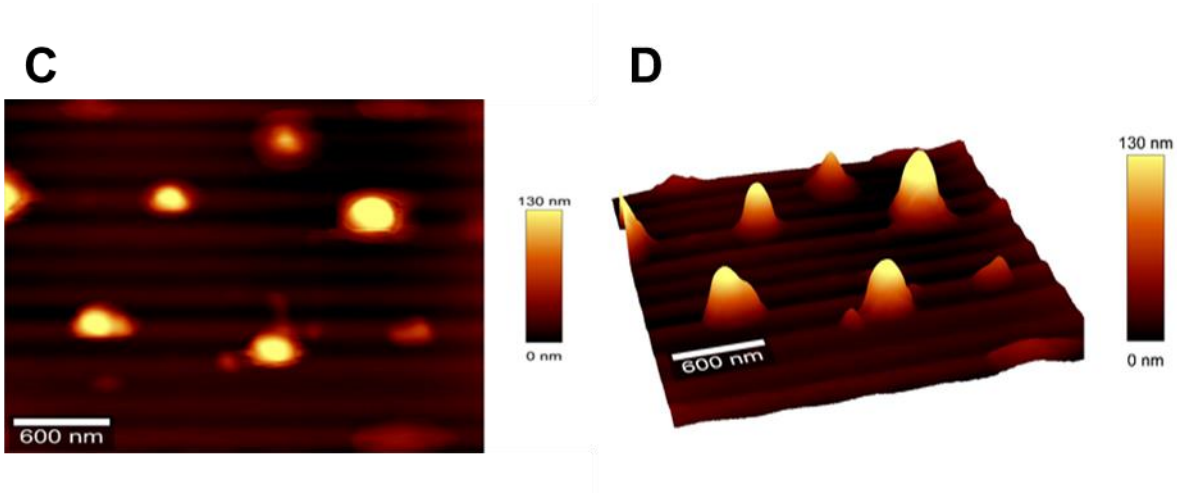


Figura 29. Estudio morfológico de las LPHNp-DCX-Chi-Tn por HR-TEM (A y B) y AFM (C y D)

Las LPHNps también fueron examinadas por AFM para proporcionar más información sobre la morfología superficial y el tamaño de las partículas. En la Figura 29 C y D, tanto las imágenes por AFM en 2D como en 3D muestran alteraciones en la topografía superficial, indicando la presencia de nanopartículas con forma esférica. La evaluación preliminar de los picos en la imagen topográfica de AFM reveló que las nanopartículas mostraban un tamaño cercano a los 250 nm, lo cual está en línea con los datos obtenidos de TEM y DLS.

4.3.4 Estudio de liberación de DCX desde las LPHNp

El perfil de liberación *in vitro* de DCX de las LPHNp en diferentes condiciones, pH 5 (simulando el pH endosomal y/o el microambiente tumoral) y pH 7.4 (correspondiente al entorno sanguíneo), se ilustra en la Figura 30. La presencia de tween 80 en la solución puede facilitar la liberación de DCX de la matriz polimérica, como se ha informado anteriormente (222,251,252). Las nanopartículas mostraron un comportamiento de liberación del fármaco sostenido hasta 48 horas, con un patrón casi idéntico en ambos medios de liberación, pero mayor a pH 5 en comparación con pH 7.4. La cinética de liberación siguió un modelo de orden cero con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9915 para pH 7.4 y 0.9877 para pH 5.

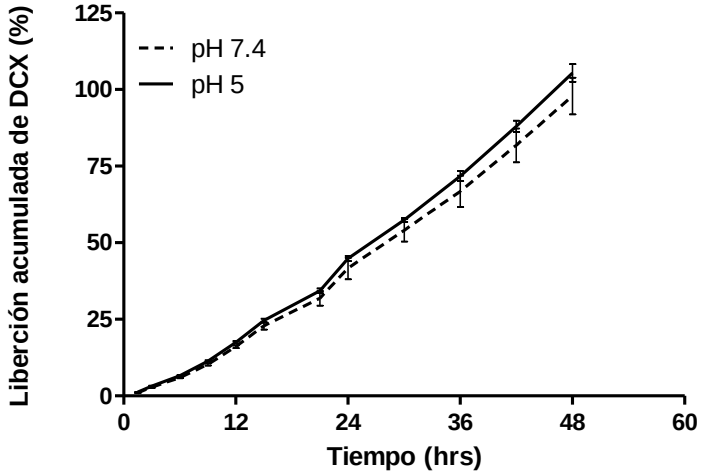


Figura 30. Ensayo de liberación de DCX desde las LPHNp-DCX-Chi-Tn en buffer pH 7.4 y 5 a 37 °C.

4.3.5 Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de las nanopartículas es un factor importante para su almacenamiento y funcionalidad en aplicaciones biomédicas a largo plazo. Para evaluar la vida útil de las formulaciones, se almacenaron tres lotes de cada grupo —LPHNp, LPHNp-DCX y LPHNp-DCX-Chi-Tn mAb— a 4 °C. Para evaluar la estabilidad de los nanosistemas, se determinó el tamaño promedio ponderado por intensidad, en la técnica de DLS, durante varios intervalos de tiempo. Como se muestra en la Figura 31, todas las muestras almacenadas a 4 °C permanecieron estables durante 27 días, presentando una apariencia uniforme sin signos visibles de inestabilidad, como sedimentación o agregación.

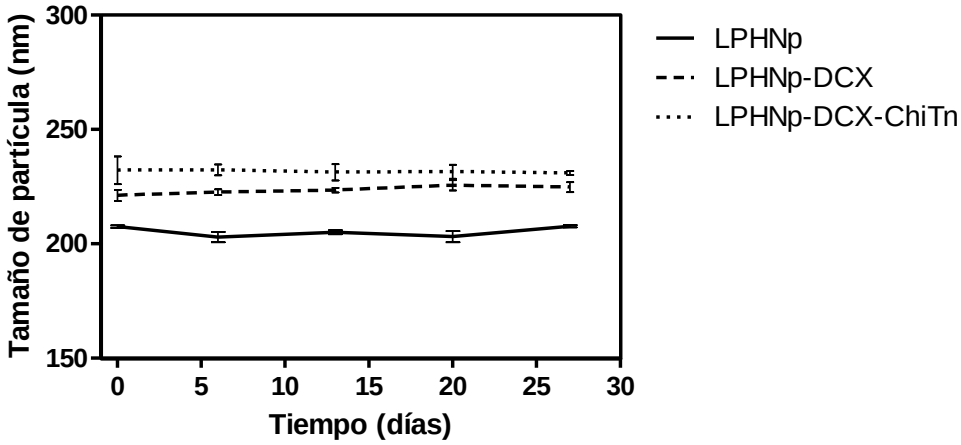


Figura 31. Distribución de tamaños de las LPHNp, LPHNp-DCX y LPHNp-DCX-Chi-Tn durante 27 días almacenados a 4 °C.

4.3.6 Test de hemólisis

Para evaluar la interacción de las LPHNp preparadas con los componentes sanguíneos, se realizó una prueba de hemólisis. Tal como es de esperar, el control positivo (SDS) mostró una hemólisis extensiva, 62.2 ± 3.9 veces mayor que el control negativo (PBS). Mientras que las LPHNps mostraron un bajo grado de hemólisis (véase Tabla 8), oscilando entre 1.34 (2%, v/v) y 1.84 (8%, v/v) veces más que el control negativo. La encapsulación de DCX no aumentó la hemólisis, manteniéndose entre 1.32 (2% v/v) y 2.09 (8%, v/v). En resumen, los tubos que contenían las formulaciones de LPHN no mostraron signos de hemólisis en ninguna concentración probada, similar al control negativo.

Tabla 8. Lista de los valores obtenidos de hemólisis de las formulaciones obtenidas a dos concentraciones, expresados en relación con el número de veces que los tratamientos aumentan la hemólisis en comparación con PBS (media ± desviación estándar; n = 3).

Concentración (% v/v)	LPHNp-Chi-Tn mAb	LPHNp- DCX-Chi-Tn mAb
2	1.34 ± 0.10	1.32 ± 0.09
8	1.84 ± 0.10	2.09 ± 0.64

4.3.7 Ensayo de internalización celular

Para evaluar la captación de LPHNp en la línea celular de cáncer A549, se encapsuló una sonda fluorescente y se detectó su internalización mediante microscopía confocal. Para este propósito, se incubaron las LPHNp cargadas con coumarin-6, con o sin el anticuerpo monoclonal Chi-Tn, a 37 °C o 4 °C (como control negativo para la endocitosis). Como se muestra en la Figura 32, las imágenes de microscopía confocal revelaron que a 4 °C, las Np se localizaban principalmente fuera de la célula o asociadas en la superficie celular. En contraste, a 37 °C, las LPHNps fueron completamente internalizadas por A549,

apareciendo dentro de vesículas, lo que sugiere que los nanosistemas podrían haber ingresado a la célula a través de una vía endocítica.

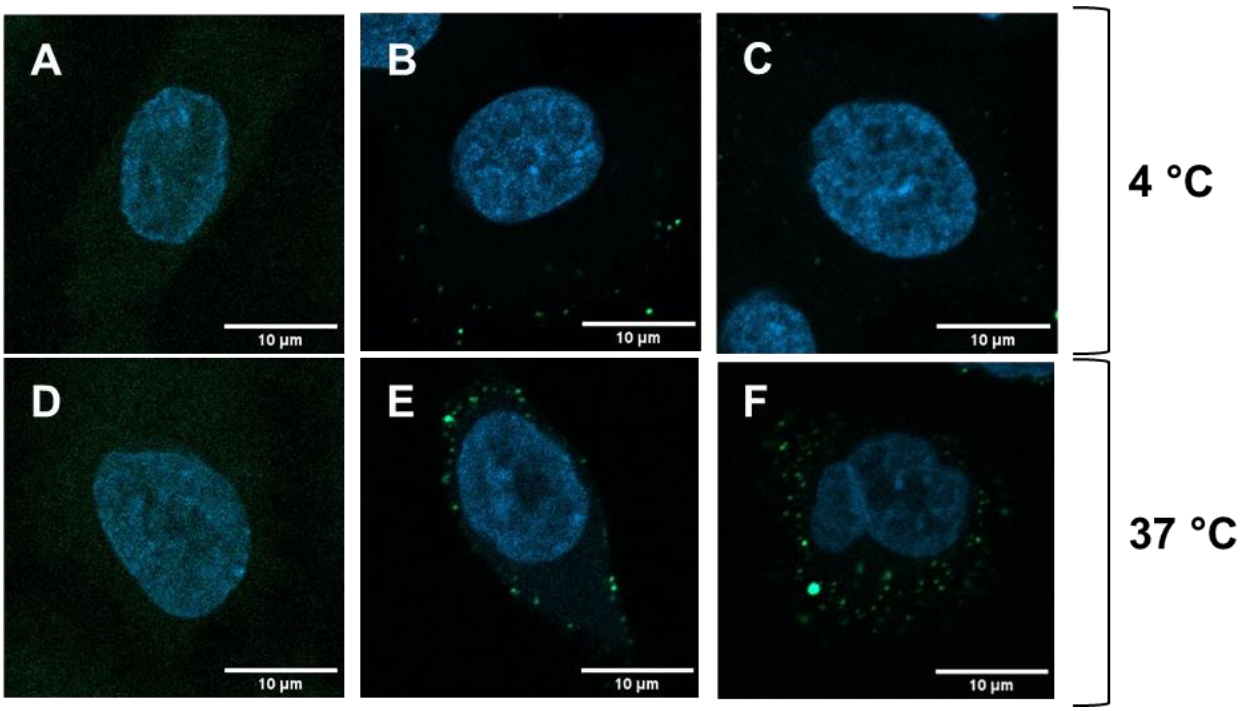


Figura 32. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de las células A549 sin tratar (A y D), tratadas con LPHNp-coumarin (B y E) y tratadas con LPHNp-coumarin-Chi-Tn (C y F) incubadas a 4 °C (A-C) o 37 °C (D-F). El coumarin se observa de color verde y el núcleo de la célula se ve de color azul.

La citometría de flujo respaldó los hallazgos cualitativos de los estudios de microscopía confocal. Los resultados, presentados en la Figura 33, demuestran que las LPHNps internalizan de forma eficiente en la línea A549, observándose un aumento en el porcentaje de células coumarin positivas y en la intensidad de fluorescencia de coumarin, en comparación con las células no tratadas y las células incubadas a 4 °C. Estas últimas sirvieron como control para minimizar o inactivar la maquinaria de internalización celular. Asimismo, se observa que el anticuerpo Chi-Tn mejora la captación celular de forma significativa, lo que concuerda con resultados previos, donde el anticuerpo Chi-Tn fue rápidamente internalizado por varias líneas celulares de cáncer y detectado en endosomas tempranos y de reciclaje (237).

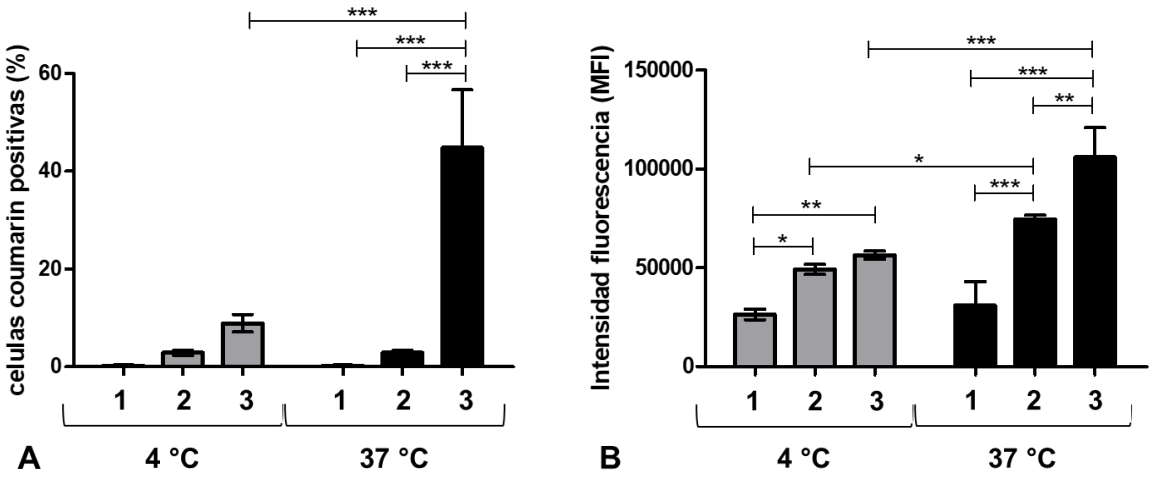


Figura 33. Resultados de internalización celular por citometría de flujo de las células A549 sin tratar (1), tratadas con LPHNp-coumarin (2) y LPHNp-coumarin-Chi-Tn (3) incubadas a 4 y 37 °C, expresados como porcentaje de células coumarin positivas (A) e intensidad de fluorescencia de coumarin (B). Las muestras se analizaron por triplicado y se aplicaron los test estadísticos one-way ANOVA y Tukey para analizar los datos (*** $p < 0.0001$; **$p < 0.001$; *$p<0.01$).

4.3.8 Estudio de viabilidad celular

Para evaluar la citotoxicidad de las LPHNp obtenidas y del DCX libre, se realizó un ensayo de viabilidad celular colorimétrico CCK-8 en la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. Las células se incubaron con LPHNp-DCX, LPHNp-DCX-Chi-Tn, DCX y LPHNp vacías durante 24, 48 y 72 horas a concentraciones que varían de 0.19 a 12.5 µg/mL. Los resultados, representados en la Figura 34, señalan que las LPHNps cargadas con DCX durante las 24 y 48 horas de incubación reducen notablemente la viabilidad celular de A549 en comparación con la droga libre. Sin embargo, esta diferencia se vuelve menos pronunciada a las 72 horas. Esto puede deberse a la captación acelerada del DCX encapsulado en los nanosistemas durante las primeras horas de incubación y a la consiguiente liberación del fármaco en el espacio citosólico. Asimismo, los LPHNp funcionalizados con el anticuerpo Chi-Tn mejoran aún más esta respuesta antiproliferativa en las células A549, mostrando una diferencia significativa en comparación con LPHNp-DCX y DCX libre. Esto sugiere que el anticuerpo mejora la internalización de los nanosistemas, una observación respaldada por los

estudios de internalización celular. Por otro lado, las LPHNp vacías no mostraron impacto en el crecimiento celular.

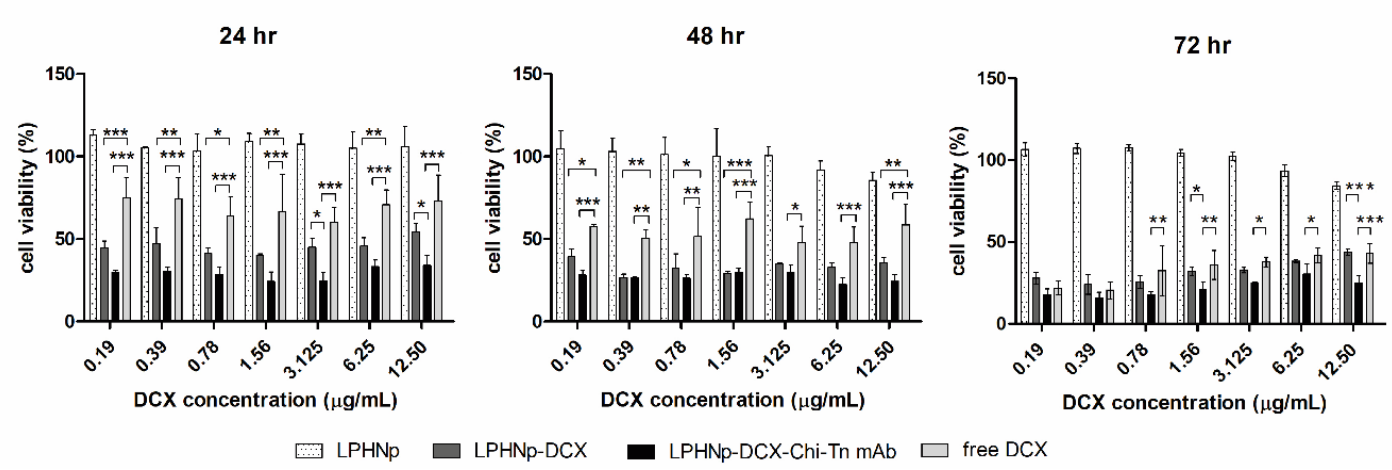


Figura 34. Ensayo de viabilidad CCK8 en células A549 a 24, 48 y 72 hr de incubación con DCX y distintas formulaciones de las LPHNp. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=3). La significancia estadística se indica con * (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

4.3.9 Estudios *in vivo*

Con el fin de evaluar la actividad antitumoral de las LPHNp obtenidas se realizaron estudios *in vivo* preliminares en ratones *nude*. Los tumores fueron inducidos inoculando a los ratones con 1 x 10^6 células de la línea A549 de cáncer de pulmón humano. Para monitorear la progresión del tumor en crecimiento, se realizaron varias medidas a la semana del volumen tumoral, el cual se calculó utilizando la fórmula $V = (A.B^2)/2$, donde A y B representan los diámetros más corto y más largo del tumor, respectivamente. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente de 100 mm^3, los 30 ratones disponibles para el ensayo fueron divididos en 5 grupos de evaluación:

1) Solución salina (PBS), como control positivo del desarrollo tumoral (n = 5)

2) Taxotere, formulación comercial de DCX, como control de un fármaco activo contra el cáncer de pulmón (n = 5)

3) LPHNp-Chi-Tn vacías (n = 5)

4) LPHNp conteniendo DCX (n = 5)

5) LPHNp-DCX conjugadas con el anticuerpo monoclonal Chi-Tn (n = 5)

Los animales recibieron 3 administraciones intraperitoneales de 10 mg DCX/mL cada 4 días, completando un tratamiento total de 30 mg de DCX/kg.

En la Figura 35 se observa la evolución del crecimiento tumoral en los distintos grupos de estudio. La tasa de supervivencia y el peso corporal de los animales post tratamiento se muestra en la Figura 36 y 37 respectivamente.

Como era de esperar, los animales que recibieron el tratamiento con PBS (control positivo) exhibieron el mayor crecimiento tumoral y la menor tasa de supervivencia. Por el contrario, aquellos tratados con LPHNp-DCX-Chi-Tn mostraron el menor crecimiento tumoral y la mayor tasa de supervivencia. Tanto las LPHNp-DCX como las LPHNp-Chi-Tn también lograron reducir el crecimiento tumoral de igual manera que las LPHNp-DCX-Chi-Tn, de hecho, no se constataron diferencias significativas entre estos grupos de tratamiento. Además, las formulaciones de nanopartículas demostraron una actividad antitumoral más efectiva en comparación con la formulación comercial Taxotere (DCX libre), con una mayor tasa de supervivencia. Estos hallazgos sugieren que las LPHNps podrían ser excelentes vehículos para la entrega y liberación de fármacos en el sitio de interés, ya sea a través de un mecanismo de vectorización pasiva, aprovechando el efecto EPR, o mediante vectorización activa por la conjugación con el anticuerpo Chi-Tn, que reconoce de manera específica el antígeno Tn presente en las células A549 de cáncer de pulmón humano.

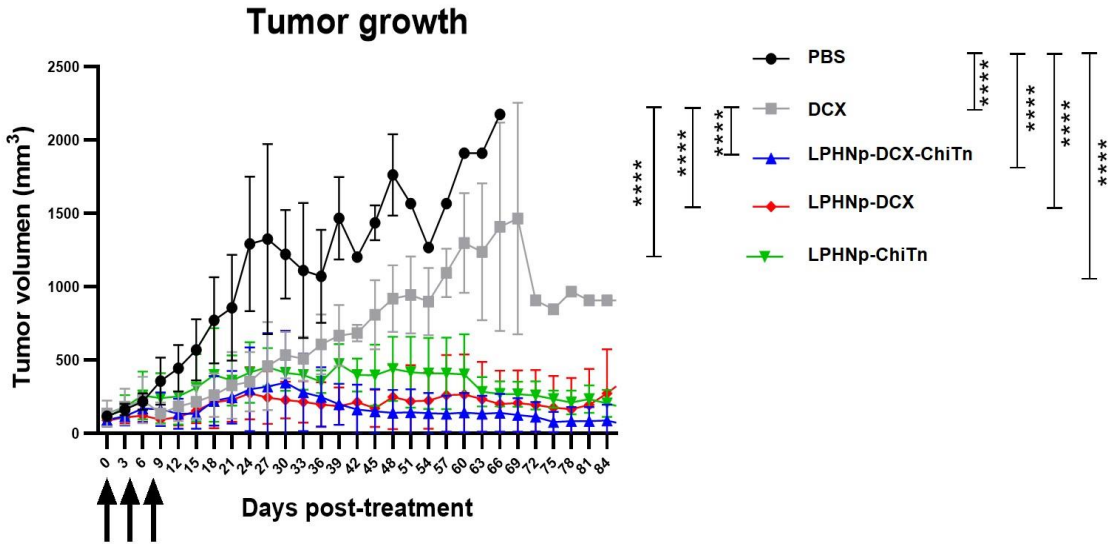


Figura 35. Variación del volumen tumoral de los distintos grupos en función de los días post-tratamiento. La significancia estadística del volumen tumoral se indica como ****, (P < 0.0001).

Además, se ha observado un efecto antitumoral en las LPHNp-ChiTn. Aunque no se dispone de datos de un blanco de LPHNp vacías *in vivo*, resulta lógico atribuir la actividad antitumoral observada al anticuerpo Chi-Tn. Investigaciones previas han demostrado que este desencadena una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) (253). Esto implica que el anticuerpo Chi-Tn no ejerce efectos citotóxicos directos sobre las células tumorales *in vitro* o *in vivo*, sino que su acción se basa en activar el sistema inmunológico para atacar las células tumorales. Al reconocer el antígeno Tn presente en las células tumorales, este anticuerpo las señala para su destrucción por parte de células inmunes efectoras que poseen receptores Fc (FcγR), tales como macrófagos, neutrófilos y células NK. Cabe destacar que los ratones empleados como modelo animal en este estudio son inmunodeprimidos debido a mutaciones genéticas que afectan la funcionalidad del timo, lo que resulta en la carencia de células T maduras. No obstante, conservan otros componentes del sistema inmunitario, principalmente macrófagos y células NK, que pueden contribuir a la respuesta antitumoral observada (254).

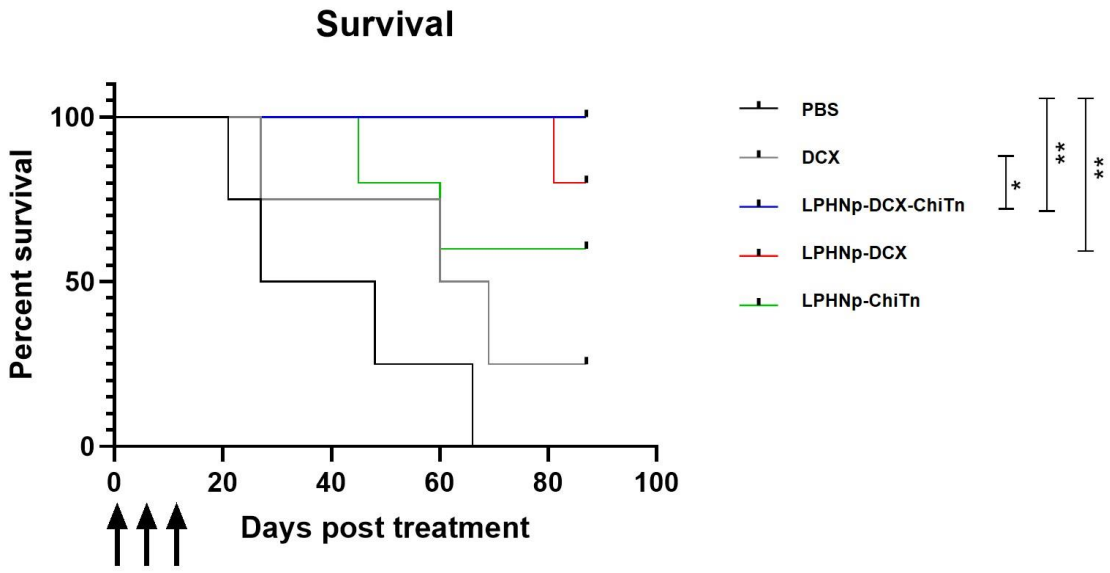


Figura 36. Porcentaje de sobrevida de los ratones en función de los días post-

tratamiento calculado con el método de Kaplan-Meier. Se aplicó la prueba de log-rank (Mantel-Cox) para evaluar significancia estadística entre grupos (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

Finalmente, durante todo el experimento, no se observaron variaciones significativas en el peso corporal de los animales en ninguno de los grupos de tratamiento. Este hallazgo indica un buen estado de salud de los animales y sugiere que los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento tumoral y la supervivencia no se vieron afectados por fluctuaciones en el peso corporal de los sujetos experimentales.

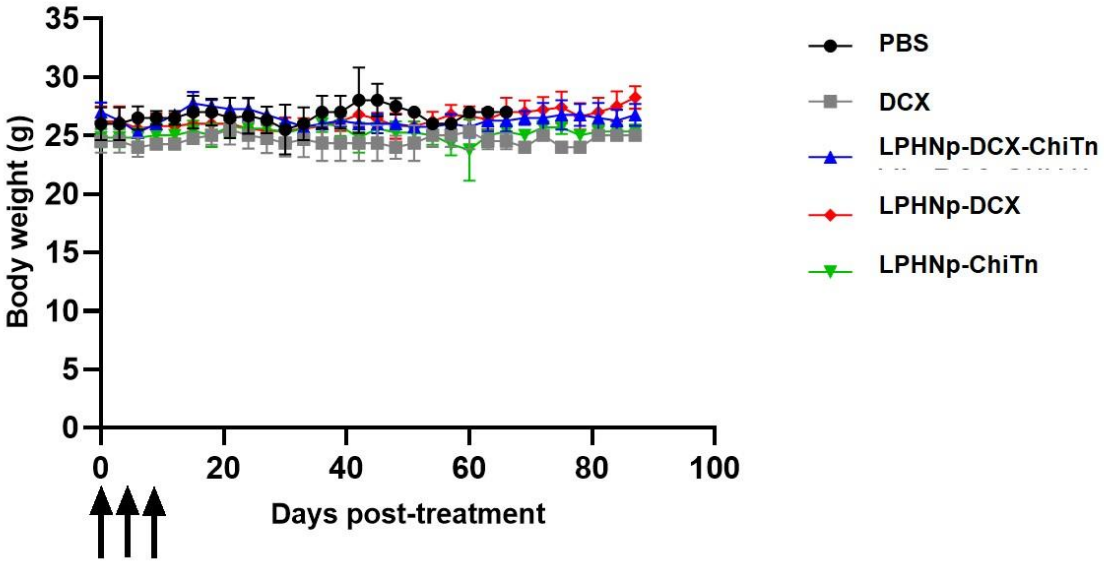


Figura 37. Gráfico del peso corporal de los animales en función del tiempo.

5. CONCLUSIONES

Los protocolos de síntesis formulados para ambos nanosistemas de encapsulación de DCX permiten obtener nanopartículas esféricas y monodispersas de tamaño y potencial Z dentro de los rangos óptimos para una administración parenteral.

Para el caso de las nanocápsulas de CS, fue posible identificar que los grupos fosfatos de la lecitina interactúan con los grupos amino del CS, dando lugar a la formación de una nanocápsula de envoltura polimérica y núcleo oleoso, en el que queda contenido más del 99 % del DCX. Mientras que las nanoesferas de PLGA poseen una eficiencia de encapsulación menor debida a la ausencia de fase oleosa en ellas. Sin embargo, el desarrollo de nanopartículas híbridas de PLGA/DOTAP permitieron una mayor carga de DCX alcanzando una EE del 99 % con una concentración final de 4 mg de DCX/mL.

Además, la incorporación de PEG en la cubierta de las nanopartículas, ya sea mediante la formación de co-polímeros o la adición de lípidos PEGilados, resulta fundamental, no solo para evadir al sistema inmune y prolongar el tiempo de circulación en sangre, sino también para la conjugación de las nanopartículas con el anticuerpo. Dicha conjugación se basa en la interacción cuasi covalente entre biotina y avidina de forma tal que se genera una especie de puente biotina-avidina-biotina que conecta las nanopartículas con el anticuerpo. La ventaja de esta estrategia es que permite controlar la localización y la densidad de los anticuerpos en la periferia de los nanosistemas asegurando una interacción receptor-ligando más efectiva.

En cuanto a las caracterizaciones biológicas *in vitro* realizadas en las Nc CS y las LPHNp, revelaron que ambas formulaciones son hemo-compatibles y capaces de penetrar en las células A549 de cáncer de pulmón humano de forma diferencial cuando están unidas al anticuerpo ChiTn. Según las imágenes obtenidas por microscopía confocal, pareciera ser que las nanopartículas ingresan por algún mecanismo de endocitosis. En este sentido, es lógico suponer que, al tratarse de dos nanosistemas catiónicos, posiblemente logren escapar de los endosomas ya sea por medio de la ruptura osmótica en las Nc Cs o por medio de la desestabilización de la membrana para el caso de las LPHNps. Asimismo, presentan una liberación sostenida de DCX y dependiente del pH del medio, lo cual puede ser beneficioso en un ambiente tumoral acidificado. Ambos

nanosistemas generan una disminución de más del 50 % de viabilidad celular en la línea A549 con los tratamientos conteniendo DCX, con especial énfasis en las funcionalizadas con el anticuerpo Chi-Tn, sugiriendo que el anticuerpo podría estar potenciando la internalización de las nanopartículas mediante algún mecanismo de endocitosis mediado por receptor. Finalmente, los estudios *in vivo* llevados a cabo en ratones *nude* mostraron una actividad antitumoral efectiva en ambos nanosistemas cargados con la droga y funcionalizados con el anticuerpo Chi-Tn. Para el caso de las LPHNp que fueron administradas vía intraperitoneal, demostraron una marcada disminución en el crecimiento tumoral y un mayor aumento en la sobrevida de los ratones en comparación con la formulación comercial Taxotere. Esto sugiere que las LPHNps podrían ser excelentes vehículos para la entrega y liberación de fármacos en el sitio de interés, ya sea a través de un mecanismo de vectorización pasiva, aprovechando el efecto EPR, o mediante vectorización activa por la conjugación con el anticuerpo Chi-Tn. Asimismo, se vió un efecto anti-tumoral mediado por el reconocimiento del anticuerpo Chi-Tn sin DCX sobre las células A549, que muy posiblemente se explique por la función efectora de células del sistema inmune de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, apoyan la hipótesis de que las inmuno-nanopartículas obtenidas pueden tener potencial utilidad en el tratamiento de cáncer de pulmón.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos hasta el momento son muy prometedores y sugieren que tanto las nanocápsulas de CS como las LPHNps pueden tener potencial utilidad para el mejoramiento de los tratamientos oncológicos convencionales. Sin embargo, es necesario profundizar en algunas de las caracterizaciones biológicas, tales como estudios farmacocinéticos y de biodistribución *in vivo*. Además, resulta interesante evaluar citotoxicidad e internalización celular en otras líneas celulares Tn positivas y Tn negativas para verificar reconocimiento específico del anticuerpo Chi-Tn y performance de las nanopartículas.

Asimismo, el conocimiento desarrollado en este trabajo ha contribuido a fortalecer y ampliar el abanico de posibilidades terapéuticas que ofrece el grupo de trabajo al que pertenece la autora de esta investigación, con el objetivo futuro de posicionarnos como centro de referencia en materia de nanoencapsulación y direccionamiento para el transporte y liberación controlada de distintos principios activos, con especial énfasis en el mejoramiento de tratamientos oncológicos.

En este sentido, los nanosistemas generados podrían ser empleados como una plataforma común para encapsular otros tipos de compuestos en diversas aplicaciones de la ciencia. Un ejemplo de “plataforma común” es la utilización de las nanocápsulas de CS generadas en esta tesis doctoral para encapsular otro compuesto, el BayK 8644, un antagonista de los canales de calcio, con el fin de potenciar una respuesta inmune anti-tumoral en el marco de una colaboración con el laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación del Instituto Pasteur de Montevideo, cuyos resultados promisorios derivaron en dos publicaciones científicas y una solicitud de patente (***Anexo 7***).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ruddon RW. Characteristics of human cancer. Cancer biology. 2007. 3–15 p.
2. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discov Today [Internet]. 2010;15(19–20):842–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006
3. NIH. No Title. p. https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/q.
4. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000;100:57–70.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 2022;12(1):31–46.
7. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP. The global burden of lung cancer: current status and future trends. Nat Rev Clin Oncol. 2023;20(9):624–39.
8. Organización Mundial de la Salud. Cancer Today. 2022.
9. Organización Mundial de la Salud. Lung cancer. 2023.
10. Wolf AMD, Oeffinger KC, Shih TY, Walter LC, Church TR, Fontham ETH, et al. Screening for lung cancer: 2023 guideline update from the American Cancer Society. CA Cancer J Clin. 2024;74(1):50–81.
11. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. Cancers (Basel). 2011;3(3):3279–330.
12. Debela DT, Muzazu SGY, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. SAGE Open Med. 2021;9.
13. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et

al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(5):363–85.

14. Wang EC, Sinnott R, Werner ME, Sethi M, Whitehurst AW, Wang AZ. Differential cell responses to nanoparticle docetaxel and small molecule docetaxel at a sub-therapeutic dose range. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]. 2014;10(2):321–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.07.012

15. Vaishampayan U, Parchment RE, Jasti BR, Hussain M. Taxanes: An overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. Urology. 1999;54(6 SUPPL. 1):22–9.

16. Koudelka Š, Turánek J. Liposomal paclitaxel formulations. J Control Release. 2012;163(3):322–34.

17. Engels FK, Sparreboom A, Mathot RAA, Verweij J. Potential for improvement of docetaxel-based chemotherapy: A pharmacological review. Br J Cancer. 2005;93(2):173–7.

18. Johnson DH, Paul DM, Hande KR, Shyr Y, Blanke C, Murphy B, et al. Paclitaxel plus carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase II trial. J Clin Oncol. 1996;14(7):2054–60.

19. Egusquiaguirre SP, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: Advances in clinical and preclinical research. Clin Transl Oncol. 2012;14(2):83–93.

20. Louage B, Wever O De, Hennink WE, De BG. Abstract. J Control Release [Internet]. 2017;(2016). Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.027

21. Feng L, Mumper RJ. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. Cancer Lett [Internet]. 2013;334(2):157–75. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.006

22. Larson N, Ghandehari H. Polymeric conjugates for drug delivery. Chem Mater. 2012;24(5):840–53.

23. Bertrand N, Leroux JC. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. J Control Release [Internet].

2012;161(2):152–63. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098

24. Aguiar JD, Valdés RA, Alba D. Propuesta del sitio Web para la Gestión de Contenidos sobre Nanociencias y Nanotecnologías del Centro de Estudios Avanzados de Cuba. Ciencias la Inf [Internet]. 2011;42(2):61–70. Available from: http://www.redalyc.org/pdf/1814/181422294010.pdf

25. Mejias Sánchez Y, Cabrera Cruz N, Toledo Fernández AM, Duany Machado OJ. La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. Rev Cuba Salud Pública. 2009;35(3):0–0.

26. Wang R, Billone PS, Mullett WM. An overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. J Coast Life Med [Internet]. 2015;3(6). Available from: http://www.jclmm.com/qk/20156/1.pdf

27. Beck-Broichsitter M, Nicolas J, Couvreur P. Solvent selection causes remarkable shifts of the “ouzo region” for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Nanoscale [Internet]. 2015;7(20):9215–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/c5nr01695a

28. Shi Y, Van Der Meel R, Theek B, Oude Blenke E, Pieters EHE, Fens MHAM, et al. Complete regression of xenograft tumors upon targeted delivery of paclitaxel via ∏ - ∏ stacking stabilized polymeric micelles. ACS Nano. 2015;9(4):3740–52.

29. Zhou et al. 基因的改变NIH Public Access. Bone [Internet]. 2012;23(1):1–7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf

30. Shi Y, Van Steenbergen MJ, Teunissen EA, Novo L, Gradmann S, Baldus M, et al. Π-Π Stacking increases the stability and loading capacity of thermosensitive polymeric micelles for chemotherapeutic drugs. Biomacromolecules. 2013;14(6):1826–37.

31. Yang S, Li N, Xiao H, Wu GL, Liu F, Qi P, et al. Clearance pathways of near-infrared-II contrast agents. Theranostics. 2022;12(18):7853–83.

32. Wiwanitkit V. Glomerular pore size corresponding to albumin molecular size,

an explanation for underlying structural pathology leading to albuminuria at nanolevel. Ren Fail. 2006;28(1):101.

33. Dolatabadi S, Karimi M, Nasirizadeh S, Hatamipour M, Golmohammadzadeh S, Jaafari MR. Preparation, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation of curcuminoids-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs). J Drug Deliv Sci Technol [Internet]. 2021;62(December 2020):102352. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102352

34. Jeong SH, Jang JH, Lee YB. Oral delivery of topotecan in polymeric nanoparticles: Lymphatic distribution and pharmacokinetics. J Control Release [Internet]. 2021;335(May):86–102. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.017

35. Vikas, Viswanadh MK, Mehata AK, Sharma V, Priya V, Varshney N, et al. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Dual targeting and pharmacokinetic aspects for advanced lung cancer treatment. Carbohydr Polym [Internet]. 2021;274(August):118617. Available from: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118617

36. Bagheri M, Van Nostrum CF, Kok RJ, Storm G, Hennink WE, Heger M. Utility of Intravenous Curcumin Nanodelivery Systems for Improving In Vivo Pharmacokinetics and Anticancer Pharmacodynamics. Mol Pharm. 2022;19(9):3057–74.

37. Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2013;65(1):71–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002

38. Kang H, Rho S, Stiles WR, Hu S, Baek Y, Hwang DW, et al. Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting. Adv Healthc Mater. 2020;9(1):8–15.

39. Abdo GG, Zagho MM, Khalil A. Recent advances in stimuli-responsive drug release and targeting concepts using mesoporous silica nanoparticles. Emergent Mater. 2020;3(3):407–25.

40. Linton SS, Sherwood SG, Drews KC, Kester M. Targeting cancer cells in the tumor microenvironment: Opportunities and challenges in combinatorial nanomedicine. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology. 2016;8(2):208–22.

41. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2718–39.

42. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. Cell Mol Life Sci. 2009;66(17):2873–96.

43. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer. 2002;2(1):48–58.

44. Beltrán-Gracia E, López-Camacho A, Higuera-Ciapara I, Velázquez-Fernández JB, Vallejo-Cardona AA. Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications. Vol. 10, Cancer Nanotechnology. Springer Vienna; 2019. 1–40 p.

45. Krauss AC, Gao X, Li L, Manning ML, Patel P, Fu W, et al. FDA approval summary: (daunorubicin and cytarabine) liposome for injection for the treatment of adults with high-risk acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res. 2019;25(9):2685–90.

46. Nirmala MJ, Kizhuveetil U, Johnson A, Balaji G, Nagarajan R, Muthuvijayan V. RSC Advances therapeutics and challenges ahead. 2023;8606–29.

47. Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Mohamadi N, Zarrabi A, Abasi S, Dehghannoudeh G, et al. Chitosan-based advanced materials for docetaxel and paclitaxel delivery: Recent advances and future directions in cancer theranostics. Int J Biol Macromol. 2020;145:282–300.

48. Zhu X, Yu Z, Feng L, Deng L, Fang Z, Liu Z, et al. Chitosan-based nanoparticle co-delivery of docetaxel and curcumin ameliorates anti-tumor chemoimmunotherapy in lung cancer. Carbohydr Polym [Internet]. 2021;268(November 2020):118237. Available from: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118237

49. Sakhi M, Khan A, Khan I, Ahmad Khan S, Irum Khan S, Ali Khattak M, et al. Effect of polymeric stabilizers on the size and stability of PLGA paclitaxel

nanoparticles. Saudi Pharm J [Internet]. 2023;31(9):101697. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101697

50. Dinakar YH, Rajana N, Kumari NU, Jain V, Mehra NK. Recent Advances of Multifunctional PLGA Nanocarriers in the Management of Triple-Negative Breast Cancer. AAPS PharmSciTech [Internet]. 2023;24(8):1–20. Available from: https://doi.org/10.1208/s12249-023-02712-7

51. Emami F, Duwa R, Banstola A, Woo SM, Kwon TK, Yook S. Dual receptor specific nanoparticles targeting EGFR and PD-L1 for enhanced delivery of docetaxel in cancer therapy. Biomed Pharmacother [Internet]. 2023;165(April):115023. Available from: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115023

52. Jiménez-López J, Bravo-Caparrós I, Cabeza L, Nieto FR, Ortiz R, Perazzoli G, et al. Paclitaxel antitumor effect improvement in lung cancer and prevention of the painful neuropathy using large pegylated cationic liposomes. Biomed Pharmacother. 2021;133(November 2020).

53. Eloy JO, Ruiz A, de Lima FT, Petrilli R, Raspantini G, Nogueira KAB, et al. EGFR-targeted immunoliposomes efficiently deliver docetaxel to prostate cancer cells. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2020;194.

54. Da Rocha MCO, Da Silva PB, Radicchi MA, Andrade BYG, De Oliveira JV, Venus T, et al. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles prevent tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells. J Nanobiotechnology. 2020;18(1):1–20.

55. Korake S, Bothiraja C, Pawar A. Design, development, and in-vitro/in-vivo evaluation of docetaxel-loaded PEGylated solid lipid nanoparticles in prostate cancer therapy. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2023;189(May):15–27. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.05.020

56. Wu R, Zhang Z, Wang B, Chen G, Zhang Y, Deng H, et al. Combination chemotherapy of lung cancer – co-delivery of docetaxel prodrug and cisplatin using aptamer-decorated lipid–polymer hybrid nanoparticles. Drug Des Devel Ther. 2020;14:2249–61.

57. Wang J. Combination treatment of cervical cancer using folate-decorated, ph-sensitive, carboplatin and paclitaxel co-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. Drug Des Devel Ther. 2020;14:823–32.

58. Godara S, Lather V, Kirthanashri S V., Awasthi R, Pandita D. Lipid-PLGA hybrid nanoparticles of paclitaxel: Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation. Mater Sci Eng C [Internet]. 2020;109(December 2019):110576. Available from: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110576

59. Salel S, Iyisan B. Polymer–lipid hybrid nanoparticles as potential lipophilic anticancer drug carriers. Discov Nano. 2023;18(1).

60. Tundisi LL, Ataide JA, Costa JSR, Coêlho D de F, Liszbinski RB, Lopes AM, et al. Nanotechnology as a tool to overcome macromolecules delivery issues. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2023;222(July 2022).

61. Lima AL, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. Methods [Internet]. 2022;199(July 2021):54–66. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.07.009

62. Kaloti M, Bohidar HB. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan-sodium tripolyphosphate solutions. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2010;81(1):165–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.006

63. Kou S (Gabriel), Peters LM, Mucalo MR. Chitosan: A review of sources and preparation methods. Vol. 169, International Journal of Biological Macromolecules. 2021. 85–94 p.

64. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. Eur Polym J [Internet]. 2013;49(4):780–92. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009

65. Abo Elsoud MM, El Kady EM. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. Bull Natl Res Cent. 2019;43(1).

66. Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair S V., Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review. Carbohydr Polym [Internet]. 2010;82(2):227–32. Available from:

http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074

67. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. Mar Drugs. 2010;8(8):2252–66.

68. Riva R, Ragelle H, Des Rieux A, Duhem N, Jérôme C, Préat V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. Adv Polym Sci. 2011;244(1):19–44.

69. Yi H, Wu LQ, Bentley WE, Ghodssi R, Rubloff GW, Culver JN, et al. Biofabrication with chitosan. Biomacromolecules. 2005;6(6):2881–94.

70. Jang K Il, Hyeon GL. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. J Agric Food Chem. 2008;56(6):1936–41.

71. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Prog Polym Sci. 2009;34(7):641–78.

72. Cong N, Nguyen VH, Schwarz S, Stevens WF, Si T. International Journal of Biological Macromolecules Preparation of water soluble hydrochloric chitosan from low molecular weight chitosan in the solid state. Int J Biol Macromol [Internet]. 2019;121:718–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.130

73. Islam N, Dmour I, Taha MO. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. Heliyon [Internet]. 2019;5(5):e01684. Available from: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684

74. Bagheri-Khoulenjani S, Taghizadeh SM, Mirzadeh H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. Carbohydr Polym [Internet]. 2009;78(4):773–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.020

75. Sashiwa H, Aiba SI. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. Prog Polym Sci. 2004;29(9):887–908.

76. Lizardi-mendoza J, Monal WMA, Valencia FMG. 2016-Chemical Characteristics and.pdf [Internet]. Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. Elsevier Inc.; 2016. 3–31 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6/00001-X

77. Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. Eur Polym J [Internet]. 2020;138(July):109984. Available from: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984

78. Meng D, Garba B, Ren Y, Yao M, Xia X, Li M, et al. Antifungal activity of chitosan against Aspergillus ochraceus and its possible mechanisms of action. Int J Biol Macromol [Internet]. 2020;158:1063–70. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.213

79. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. Curr Chem Biol. 2012;3(2):203–30.

80. Hejjaji EMA, Smith AM, Morris GA. Karin mucoadhesion test. 44(0):1–25.

81. Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. Int J Pharm. 1992;78(1–3):43–8.

82. Huang S, Han B, Shao K, Yu M, Liu W. Analgesis and wound healing effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on scalded rats. J Ocean Univ China. 2014;13(5):837–41.

83. Hu Z, Lu S, Cheng Y, Kong S, Li S, Li C, et al. Investigation of the effects of molecular parameters on the hemostatic properties of chitosan. Molecules. 2018;23(12):1–14.

84. Yang J, Tian F, Wang Z, Wang Q, Zeng YJ, Chen SQ. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2008;84(1):131–7.

85. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. Int J Pharm. 1998;166(1):75–88.

86. Park PJ, Je JY, Jung WK, Ahn CB, Kim SK. Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. Eur Food Res Technol. 2004;219(5):529–33.

87. Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, Bertolami CN. The effect of chitosan (poly-n-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. J

Oral Maxillofac Surg. 1999;57(1):49–52.

88. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. Pharm Res. 2004;21(1):43–9.

89. Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. Bioresour Technol. 2008;99(8):2806–14.

90. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial Action of Chitosan. Food Biotechnol. 1992;6(3):257–72.

91. Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S. Analgesic effects of chitin and chitosan. Carbohydr Polym. 2002;49(3):249–52.

92. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Prog Polym Sci [Internet]. 2011;36(8):981–1014. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001

93. Pangburn SH, Trescony P V, Heller J. Lysozyme degradation of paWIly deacetylated chitin, its films and hydrogels EXPERIMENTAL PROCEDURES Partial deacetylation of chitin. Biomaterials. 1982;3:105–8.

94. Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. Biomaterials. 2001;22(12):1653–8.

95. Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. Biomaterials. 1997;18(7):567–75.

96. Aiba S ichi. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. Int J Biol Macromol. 1992;14(4):225–8.

97. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials. 2001;22(3):261–8.

98. Kim Y, Zharkinbekov Z, Raziyeva K, Tabyldiyeva L, Berikova K, Zhumagul D, et al. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. 2023;

99. Silvestro I, Francolini I, Lisio V Di, Martinelli A, Pietrelli L, Scotto A, et al. Preparation and Characterization of TPP-Chitosan Crosslinked Sca ff olds

for Tissue Engineering. 2020;

100. Yadav LR, Chandran SV, Lavanya K, Selvamurugan N. Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. Int J Biol Macromol [Internet]. 2021;183(May):1925–38. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.215

101. Jiang Z, Zhang K, Du L, Cheng Z, Zhang T, Ding J, et al. Construction of chitosan scaffolds with controllable microchannel for tissue engineering and regenerative medicine. Mater Sci Eng C [Internet]. 2021;126(December 2020):112178. Available from: https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112178

102. Patil S, Pandit A, Godbole A, Dandekar P, Jain R. Chitosan based co-processed excipient for improved tableting. Carbohydr Polym Technol Appl [Internet]. 2021;2(April):100071. Available from: https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100071

103. Sip S, Paczkowska-Walendowska M, Rosiak N, Miklaszewski A, Grabańska-Martyńska K, Samarzewska K, et al. Chitosan as valuable excipient for oral and topical carvedilol delivery systems. Pharmaceuticals. 2021;14(8):1–20.

104. Jurić S, Jurić M, Jambrak AR, Vinceković M. Tailoring alginate/chitosan microparticles loaded with chemical and biological agents for agricultural application and production of value-added foods. Appl Sci. 2021;11(9).

105. Fathalla Z, Fatease A Al. Hybrid Alginate – Chitosan Microparticles for Ocular Delivery of Ketorolac Tromethamine. 2023;

106. Lacerda L, Parize AL, Fávere V, Laranjeira MCM, Stulzer HK. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. Mater Sci Eng C [Internet]. 2014;39(1):161–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.054

107. Jalal RR, Ways TMM, Abu Elella MH, Hassan DA, Khutoryanskiy V V. Preparation of mucoadhesive methacrylated chitosan nanoparticles for delivery of ciprofloxacin. Int J Biol Macromol [Internet]. 2023;242(P4):124980. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124980

108. Roy S, Min SJ, Biswas D, Rhim JW. Pullulan/chitosan-based functional film incorporated with curcumin-integrated chitosan nanoparticles. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp [Internet]. 2023;660(November 2022):130898. Available from: https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130898

109. Valverde-Fraga L, Haddad R, Alrabadi N, Sánchez S, Remuñán-López C, Csaba N. Design and in vitro assessment of chitosan nanocapsules for the pulmonary delivery of rifabutin. Eur J Pharm Sci. 2023;187(May).

110. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. Int J Pharm. 2005;295(1–2):235–45.

111. Othman AS, Shamekh IM, Abdalla M, Eltayb WA, Ahmed NA. Molecular modeling study of micro and nanocurcumin with in vitro and in vivo antibacterial validation. Sci Rep [Internet]. 2023;13(1):1–17. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-023-38652-2

112. Otto DP, Otto A, De Villiers MM. Differences in physicochemical properties to consider in the design, evaluation and choice between microparticles and nanoparticles for drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2015;12(5):763–77.

113. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J Appl Polym Sci. 1997;63(1):125–32.

114. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2012;90(1):21–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042

115. Yeh MK, Cheng KM, Hu CS, Huang YC, Young JJ. Novel protein-loaded chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. Acta Biomater [Internet]. 2011;7(10):3804–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.026

116. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. J Control Release.

2004;100(1):5–28.

117. Hansson A, Di Francesco T, Falson F, Rousselle P, Jordan O, Borchard G. Preparation and evaluation of nanoparticles for directed tissue engineering. Int J Pharm. 2012;439(1–2):73–80.

118. Bashir SM, Ahmed Rather G, Patrício A, Haq Z, Sheikh AA, Shah MZ ul H, et al. Chitosan Nanoparticles: A Versatile Platform for Biomedical Applications. Materials (Basel). 2022;15(19):1–28.

119. Torrecilla D, Lozano M V., Lallana E, Neissa JI, Novoa-Carballal R, Vidal A, et al. Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly(ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2013;83(3):330–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.017

120. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2010;75(1):1–18.

121. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. 1999;3181–98.

122. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. 2007;32:762–98.

123. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. 1997;28:5–24.

124. Engineer C, Parikh J, Raval A. Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system. Trends Biomater Artif Organs. 2011;25(2):79–85.

125. Alsaab HO, Alharbi FD, Alhibs AS, Alanazi NB, Alshehri BY. PLGA-Based Nanomedicine : History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases. 2022;1–30.

126. Wu XS, Wang N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(1):21–34.

127. Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, A. Tamada J, et al. In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. Biomaterials. 2000;21(15):1595–605.

128. Vasir JK, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(8):718–28.

129. Passerini N, Craig DQM. An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. J Control Release. 2001;73(1):111–5.

130. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. Int J Mol Sci. 2014;15(3):3640–59.

131. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int J Pharm. 1989;55(1):1–4.

132. Barreras-Urbina CG, Ramírez-Wong B, López-Ahumada GA, Burruel-Ibarra SE, Martínez-Cruz O, Tapia-Hernández JA, et al. Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. Int J Food Prop [Internet]. 2016;19(9):1912–23. Available from: https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279

133. Janeth C, Rivas M, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-gerges H, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. Int J Pharm [Internet]. 2017; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064

134. Zhang C, Yan L, Wang X, Zhu S, Chen C, Gu Z, et al. Progress, challenges, and future of nanomedicine. Nano Today [Internet]. 2020;35:101008. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101008

135. Olusanya TOB, Ahmad RRH, Ibegbu DM, Smith JR, Elkordy AA. Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. Molecules. 2018;23(4):1–17.

136. Mohanty A, Uthaman S, Park IK. Utilization of polymer-lipid hybrid nanoparticles for targeted anti-cancer therapy. Molecules. 2020;25(19).

137. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM.

Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a nextgeneration drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. Int J Nanomedicine. 2019;14:1937–52.

138. Krishnamurthy S, Vaiyapuri R, Zhang L, Chan JM. Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. Biomater Sci. 2015;3(7):923–36.

139. Liu J, Li M, Luo Z, Dai L, Guo X, Cai K. Design of nanocarriers based on complex biological barriers in vivo for tumor therapy. Nano Today [Internet]. 2017;15:56–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2017.06.010

140. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nat Nanotechnol. 2013;8(10):772–81.

141. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(38):14265–70.

142. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. Int J Pharm. 2006;307(1):93–102.

143. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov A V. Endocytosis of nanomedicines. J Control Release [Internet]. 2010;145(3):182–95. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036

144. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles : Theory to Practice. 2001;53(2):283–318.

145. OSHIMA K. Kidney function. Sogo Rinsho. 1963;12:880–5.

146. Wang J, Nation RL, Evans AM, Cox S. Renal excretion mechanisms of the antiviral nucleoside analogue AM 188 in the rat isolated perfused kidney. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004;31(1–2):29–34.

147. Longmire M, Choyke PL. C835B99424409B80Acbbd3C6D1C678D2.Pdf. 2008;3:703–17.

148. Kobayashi H, Brechbiel MW. Nano-sized MRI contrast agents with

dendrimer cores. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(15):2271–86.

149. Auría-Soro C, Nesma T, Juanes-Velasco P, Landeira-Viñuela A, Fidalgo-Gomez H, Acebes-Fernandez V, et al. Interactions of nanoparticles and biosystems: Microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine. Nanomaterials. 2019;9(10).

150. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2021;20(2):101–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8

151. Patel S, Kim J, Herrera M, Mukherjee A, Kabanov A V., Sahay G. Brief update on endocytosis of nanomedicines. Adv Drug Deliv Rev. 2019;144(August):90–111.

152. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Control Release. 2008;125(3):193–209.

153. Moghimi SM, Hunter AC, Andresen TL. Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52(1):481–503.

154. Hansen CB, Kao GY, Moase EH, Zalipsky S, Allen TM. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. BBA - Biomembr. 1995;1239(2):133–44.

155. Da Silva CG, Rueda F, Löwik CW, Ossendorp F, Cruz LJ. Combinatorial prospects of nano-targeted chemoimmunotherapy. Biomaterials. 2016;83:308–20.

156. Brigger I, Morizet J, Aubert G, Chacun H, Terrier-lacombe M, Couvreur P, et al. Received May 30, 2002; accepted August 9, 2002. J Pharmacol Exp Ther. 2002;303(3):928–36.

157. Khalid MN, Simard P, Hoarau D, Dragomir A, Leroux JC. Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid

tumors. Pharm Res. 2006;23(4):752–8.

158. Kong L, Campbell F, Kros A. DePEGylation strategies to increase cancer nanomedicine efficacy. Nanoscale Horizons. 2019;4(2):378–87.

159. Gordon MR, Zhao B, Anson F, Fernandez A, Singh K, Homyak C, et al. Matrix Metalloproteinase-9-Responsive Nanogels for Proximal Surface Conversion and Activated Cellular Uptake. Biomacromolecules. 2018;19(3):860–71.

160. Brazzale C, Mastrotto F, Moody P, Watson PD, Balasso A, Malfanti A, et al. Control of targeting ligand display by pH-responsive polymers on gold nanoparticles mediates selective entry into cancer cells. Nanoscale. 2017;9(31):11137–47.

161. Bachir ZA, Huang YK, He MY, Huang L, Hou XY, Chen RJ, et al. Effects of PEG surface density and chain length on the pharmacokinetics and biodistribution of methotrexate-loaded chitosan nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2018;13:5657–71.

162. Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. Int J Pharm. 2005;298(2):315–22.

163. Vasir JK, Labhasetwar V. Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. Biomaterials. 2008;29(31):4244–52.

164. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). Trop J Pharm Res. 2013;12(2):265–73.

165. Lee YJ, Ahn EY, Park Y. Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. Nanoscale Res Lett. 2019;14:1–14.

166. Petros RA, Desimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2010;9(8):615–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrd2591

167. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(13):4930–4.

168. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. Small. 2010;6(1):12–21.

169. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. Angew Chemie - Int Ed. 2012;51(34):8529–33.

170. Wrobel I, Collins D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. BBA - Biomembr. 1995;1235(2):296–304.

171. Selby LI, Cortez-Jugo CM, Such GK, Johnston APR. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology. 2017;9(5).

172. Cupic KI, Rennick JJ, Johnston APR, Such GK. Controlling endosomal escape using nanoparticle composition: Current progress and future perspectives. Nanomedicine. 2019;14(2):215–23.

173. Sabnis S, Kumarasinghe ES, Salerno T, Mihai C, Ketova T, Senn JJ, et al. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. Mol Ther [Internet]. 2018;26(6):1509–19. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.010

174. Kim H, Leal C. Cuboplexes: Topologically Active siRNA Delivery. ACS Nano. 2015;9(10):10214–26.

175. Sun D, Lu ZR. Structure and Function of Cationic and Ionizable Lipids for Nucleic Acid Delivery. Pharm Res [Internet]. 2023;40(1):27–46. Available from: https://doi.org/10.1007/s11095-022-03460-2

176. Yu M, Wang K, Wang K, Zhang H, Liu Q, Wang J, et al. DOTAP-incorporated PEG-PLGA nanoparticles for efficient in vitro and in vivo gene delivery. J Biomed Nanotechnol. 2018;14(2):281–93.

177. Vermeulen LMP, De Smedt SC, Remaut K, Braeckmans K. The proton sponge hypothesis: Fable or fact? Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2018;129:184–90. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034

178. Barua S, Yoo JW, Kolhar P, Wakankar A, Gokarn YR, Mitragotri S. Particle

shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(9):3270–5.

179. Nguyen J, Szoka FC. Nucleic acid delivery: The missing pieces of the puzzle? Acc Chem Res. 2012;45(7):1153–62.

180. Wu J. The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. J Pers Med. 2021;11(8).

181. Martínez-Soler GI, Pérez-Artacho B, Sáez-Fernández E, Gallardo V, Arias JL. Estrategias para el transporte de fármacos basadas en el efecto de permeación y retención aumentada. Ars Pharm. 2010;51(SUPPL. 3):273–6.

182. Liu Y, Li K, Liu B, Feng SS. A strategy for precision engineering of nanoparticles of biodegradable copolymers for quantitative control of targeted drug delivery. Biomaterials [Internet]. 2010;31(35):9145–55. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.053

183. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2014;66:2–25. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009

184. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. 84 Nat nanotech 2007 R Langer Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.pdf. Nat Nanotechnol. 2007;2:751–60.

185. Gautam SK, Khan P, Natarajan G, Atri P, Aithal A, Ganti AK, et al. Mucins as Potential Biomarkers for Early Detection of Cancer. Cancers (Basel). 2023;15(6):1–37.

186. Shang Y, Zeng Y. Focused Glycomic Profiling With an Integrated Microfluidic Lectin Barcode System [Internet]. 1st ed. Vol. 598, Methods in Enzymology. Elsevier Inc.; 2018. 169–196 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.013

187. Hanisch FG. O-glycosylation of the mucin type. Biol Chem. 2001;382(2):143–9.

188. Ghosh S. Sialic acids and sialoglycoconjugates in cancer. Sialic Acids and

Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease. 2020. 211–245 p.

189. Munkley J. The role of sialyl-Tn in cancer. Int J Mol Sci. 2016;17(3).

190. Mazal D, Lo-Man R, Bay S, Pritsch O, Dériaud E, Ganneau C, et al. Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective immuno-targeting of cancer. Cancer Immunol Immunother. 2013;62(6):1107–22.

191. Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, et al. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. FEBS Lett. 2000;469(1):24–8.

192. Oppezzo P, Osinaga E, Tello D, Bay S, Cantacuzene D, Irigoin F, et al. Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen. Hybridoma. 2000;19(3):229–39.

193. Hubert P, Heitzmann A, Viel S, Nicolas A, Sastre-Garau X, Oppezzo P, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. Cancer Res. 2011;71(15):5134–43.

194. Babick F. Dynamic light scattering (DLS) [Internet]. Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles. Elsevier Inc.; 2019. 137–172 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9

195. Delgado A V., González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. J Colloid Interface Sci. 2007;309(2):194–224.

196. Uskoković V. Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations. J Dispers Sci Technol. 2012;33(12):1762–86.

197. Tang CY, Yang Z. Transmission Electron Microscopy (TEM) [Internet]. Membrane Characterization. Elsevier B.V.; 2017. 145–159 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5

198. Mast J, Verleysen E, Hodoroaba VD, Kaegi R. Characterization of nanomaterials by transmission electron microscopy: Measurement procedures [Internet]. Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles. Elsevier Inc.; 2019. 29–48 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00004-3

199. Sinha Ray S. Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites. Environ Friendly Polym Nanocomposites. 2013;74–88.

200. Saletnik A, Saletnik B, Puchalski C. Overview of popular techniques of raman spectroscopy and their potential in the study of plant tissues. Molecules. 2021;26(6).

201. Hnasko R. ELISA: Methods and Protocols. ELISA Methods Protoc. 2015;1318:1–216.

202. GEROTHANASSIS IP, TROGANIS A, EXARCHOU V, BARBAROSSOU K. Nuclear Magnetic Resonance (Nmr) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and Their Applications To Chemistry, Biology and Medicine. Chem Educ Res Pr. 2002;3(2):229–52.

203. Diehl B. Principles in NMR Spectroscopy. NMR Spectrosc Pharm Anal. 2008;1,3-1,41.

204. Qu S, Wu G, Fang J, Zang D, Xing H, Wang L, et al. Dielectric and Magnetic Loss Behavior of Nanooxides. Vol. 2, Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization. 2017. 301–319 p.

205. Bélanger JMR, Jocelyn Paré JR, Sigouin M. Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. Tech Instrum Anal Chem. 1997;18(C):37–59.

206. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(2):163–76.

207. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Rox Anderson R, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to confocal microscopy. J Invest Dermatol [Internet]. 2012;132(12):1–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.429

208. Colyer J, Walker JM. Protein Handbook Edited by. 1996.

209. Shen C-H. Quantification and Analysis of Proteins. Diagnostic Mol Biol. 2019;187–214.

210. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. Food Front. 2020;1(3):332–49.

211. Sigma-Aldrich. Cell Counting Kit WST- 8. Prod Inf sheet [Internet]. 2018;8:7. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf

212. Thuy Le DT. Anti-Tumor Activity of Docetaxel PLGA-PEG Nanoparticles with a Novel Anti-HER2 scFv. J Nanomed Nanotechnol. 2015;06(02).

213. Gu F, Langer R FO. Formulation/preparation of functionalized nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. Methods Mol Biol. 2009;544:589–98.

214. Bose RJC, Lee SH, Park H. Lipid-based surface engineering of PLGA nanoparticles for drug and gene delivery applications. Biomater Res [Internet]. 2016;20(1):1–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s40824-016-0081-3

215. Dai Y, Xing H, Song F, Yang Y, Qiu Z, Lu X, et al. Biotin-Conjugated Multilayer Poly [D,L-lactide-co-glycolide]-Lecithin-Polyethylene Glycol Nanoparticles for Targeted Delivery of Doxorubicin. J Pharm Sci [Internet]. 2016;105(9):2949–58. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.038

216. Klippstein R, Wang JTW, El-Gogary RI, Bai J, Mustafa F, Rubio N, et al. Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy in Vivo. Small. 2015;11(36):4704–22.

217. Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Riguera R. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by 1H-NMR. Carbohydr Polym. 2005;61(2):155–61.

218. Zanotto-Filho A, Coradini K, Braganhol E, Schröder R, De Oliveira CM, Simões-Pires A, et al. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2013;83(2):156–67. Available

from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.019

219. Aktaş Y, Yemisci M, Andrieux K, Gürsoy RN, Alonso MJ, Fernandez-Megia E, et al. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles fnnctionalized with the monoclonal antibody OX26. Bioconjug Chem. 2005;16(6):1503–11.

220. Yoncheva K, Doytchinova I, Irache JM. Different approaches for determination of the attachment degree of polyethylene glycols to poly(anhydride) nanoparticles. Drug Dev Ind Pharm. 2010;36(6):676–80.

221. Borrajo E, Abellan-Pose R, Soto A, Garcia-Fuentes M, Csaba N, Alonso MJ, et al. Docetaxel-loaded polyglutamic acid-PEG nanocapsules for the treatment of metastatic cancer. J Control Release [Internet]. 2016;238:263–71. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.048

222. Li L, Xiang D, Shigdar S, Yang W, Li Q, Lin J, et al. Epithelial cell adhesion molecule aptamer functionalized PLGA-lecithin-curcumin-PEG nanoparticles for targeted drug delivery to human colorectal adenocarcinoma cells. Int J Nanomedicine. 2014;9(1):1083–96.

223. Moraru C, Mincea M, Menghiu G, Ostafe V. Understanding the factors influencing chitosan-based nanoparticles-protein corona interaction and drug delivery applications. Molecules. 2020;25(20):1–37.

224. Chen Y, Wu D, Zhong W, Kuang S, Luo Q, Song L, et al. Evaluation of the PEG density in the PEGylated chitosan nanoparticles as a drug carrier for curcumin and mitoxantrone. Nanomaterials. 2018;8(7).

225. Yang C, Gao S, Dagnæs-Hansen F, Jakobsen M, Kjems J. Impact of PEG Chain Length on the Physical Properties and Bioactivity of PEGylated Chitosan/siRNA Nanoparticles in Vitro and in Vivo. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;9(14):12203–16.

226. Ren X, Liu Q, Feng H, Yin X. The Characterization of Chitosan Nanoparticles by Raman Spectroscopy. 2014;665:367–70.

227. Hanuza J, Wandas M, Dymin L. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. 2015;134:114–20.

228. Mode CS, Of R. EFFECT OF WATER ON THE MOLECULAR STRUCTURE OF A PHOSPHATIDYLCHOLINE The Raman spectra of 1 , 2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) dihydrate crystals were examined in (a) the 1250 and 1080 cm -! PO 2- antisymmetric and symmetric stretching mode reg. 1982;686:153–9.

229. De Gussem K, Vandenabeele P, Verbeken A, Moens L. Raman spectroscopic study of Lactarius spores (Russulales, Fungi). Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. 2005;61(13–14):2896–908.

230. Lozano M V., Torrecilla D, Torres D, Vidal A, Domínguez F, Alonso MJ. Highly efficient system to deliver taxanes into tumor cells: Docetaxel-loaded chitosan oligomer colloidal carriers. Biomacromolecules. 2008;9(8):2186–93.

231. Gref R, Couvreur P, Barratt G, Mysiakine E. Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. 2003;24:4529–37.

232. Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Langer K. Highly Specific HER2-mediated Cellular Uptake of Antibody-modified Nanoparticles in Tumour Cells. 2004;12(August):461–71.

233. Sotelo-Boyás M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Gómez y Gómez Y. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. Int J Biol Macromol. 2017;103(May):409–14.

234. Ho BK, Chin SF, Pang SC. pH-responsive carboxylic cellulose acetate nanoparticles for controlled release of penicillin G. J Sci Adv Mater Devices. 2020;5:224–32.

235. Huang M, Ma Z, Khor E, Lim LY. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. Pharm Res. 2002;19(10):1488–94.

236. Salatin S, Yari Khosroushahi A. Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. J Cell Mol Med. 2017;21(9):1668–86.

237. Sedlik C, Heitzmann A, Viel S, Ait Sarkouh R, Batisse C, Schmidt F, et al. Effective antitumor therapy based on a novel antibody-drug conjugate targeting the Tn carbohydrate antigen. Oncoimmunology [Internet].

2016;5(7). Available from: http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1171434

238. Silvestre ALP, Oshiro-Júnior JA, Garcia C, Turco BO, da Silva Leite JM, de Lima Damasceno BPG, et al. Monoclonal antibodies carried in drug delivery nanosystems as a strategy for cancer treatment. Curr Med Chem. 2020 Jan;

239. Deepagan VG, Sarmento B, Menon D, Nascimento A, Jayasree A, Sreeranganathan M, et al. In vitro targeted imaging and delivery of camptothecin using cetuximab-conjugated multifunctional PLGA-ZnS nanoparticles. Nanomedicine (Lond). 2012 Apr;7(4):507–19.

240. Maya S, Sarmento B, Lakshmanan VK, Menon D, Seabra V, Jayakumar R. Chitosan cross-linked docetaxel loaded EGF receptor targeted nanoparticles for lung cancer cells. Int J Biol Macromol [Internet]. 2014;69:532–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.009

241. Wang X-B, Zhou H-Y. Molecularly targeted gemcitabine-loaded nanoparticulate system towards the treatment of EGFR overexpressing lung cancer. Biomed Pharmacother. 2015 Mar;70:123–8.

242. Petrelli F, Ardito R, Ghidini A, Zaniboni A, Ghidini M, Barni S, et al. Different Toxicity of Cetuximab and Panitumumab in Metastatic Colorectal Cancer Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. Oncology. 2018;94(4):191–9.

243. López-Ferrer A, Barranco C, de Bolós C. Differences in the O-glycosylation patterns between lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Am J Clin Pathol. 2002 Nov;118(5):749–55.

244. Geze A, Chourpa I, Boury F, Benoit JP, Dubois P. Direct qualitative and quantitative characterization of a radiosensitizer, 5-iodo-2'-deoxyuridine within biodegradable polymeric microspheres by FT-Raman spectroscopy. Analyst. 1999;124(1):37–42.

245. Yan H, Hou YF, Niu PF, Zhang K, Shoji T, Tsuboi Y, et al. Biodegradable PLGA nanoparticles loaded with hydrophobic drugs: Confocal Raman microspectroscopic characterization. J Mater Chem B [Internet].

2015;3(18):3677–80. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C5TB00434A

246. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). Trop J Pharm Res. 2013;12(2):255–64.

247. Taylor RW, Benz F, Sigle DO, Bowman RW, Bao P, Roth JS, et al. Watching individual molecules flex within lipid membranes using SERS. Sci Rep. 2014;4(August).

248. Salerno M, Shayganpour A, Salis B, Dante S. Surface-enhanced Raman scattering of self-assembled thiol monolayers and supported lipid membranes on thin anodic porous alumina. Beilstein J Nanotechnol. 2017;8(1):74–81.

249. Pigorsch E. Spectroscopic characterisation of cationic quaternary ammonium starches. Starch/Staerke. 2009;61(3–4):129–38.

250. Vanden-Hehir S, Tipping WJ, Lee M, Brunton VG, Williams A, Hulme AN. Raman imaging of nanocarriers for drug delivery. Nanomaterials. 2019;9(3):1–19.

251. Bao Y, Deng Q, Li Y, Zhou S. Engineering docetaxel-loaded micelles for non-small cell lung cancer: A comparative study of microfluidic and bulk nanoparticle preparation. RSC Adv. 2018;8(56):31950–66.

252. Zhang X, Liu J, Li X, Li F, Lee RJ, Sun F, et al. Trastuzumab-Coated Nanoparticles Loaded With Docetaxel for Breast Cancer Therapy. Dose-Response. 2019;17(3):1–12.

253. Hubert P, Heitzmann A, Viel S, Nicolas A, Sastre-Garau X, Oppezzo P, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. Cancer Res. 2011;71(15):5134–43.

254. Panaampon J, Sasamoto K, Kariya R, Okada S. Establishment of Nude Mice Lacking NK Cells and Their Application for Human Tumor Xenografts. Asian Pacific J Cancer Prev. 2021;22(4):1069–74.

255. Rinaudo M, Milas M, Dung P Le. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. Int J Biol Macromol. 1993;15(5):281–5.

256. Bukzem AL, Signini R, dos Santos DM, Lião LM, Ascheri DPR. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016;85:615–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.017

257. Novoa-Carballal R, Riguera R, Fernandez-Megia E. Disclosing an NMR-invisible fraction in chitosan and PEGylated copolymers and its role on the determination of degrees of substitution. Mol Pharm. 2013;10(8):3225–31.

ANEXOS

Anexo 1: Caracterización de CS

1.1 Determinación del peso molecular de CS

Se determinó la masa molecular promedio viscosimétrica (M_v) mediante la determinación de la viscosidad intrínseca [η] de soluciones de CS en ácido acético 0.3 M/acetato de sodio 0.2 M a 25 °C. Los valores de tiempo de caída (t) se obtuvieron utilizando un viscosímetro de tipo Ubbelohde y se obtuvo el promedio de cinco medidas de tiempo. La viscosidad relativa (η_{rel}) y la viscosidad especifica (η_{esp}) se calcularon según:

$\eta_{rel} = t/t_0$

$\eta_{esp} = 1 - \eta_{rel}$

El valor de [η] corresponde a la ordenada en el origen de la regresión lineal de la curva de η_{esp} en función de la concentración (c). Para calcular M_v se utilizó la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS):

$[\eta] = K\,(M_v)^a$

Donde K=0.0745 ml/g y a= 0.76 (255).

Como se observa en la Figura A1, se obtuvo un valor de [η] de 205.63 (ml/g) y el valor resultante de M_v para el CS analizado, calculado a partir de la ecuación de MHS, fue de 33.69 kDa.

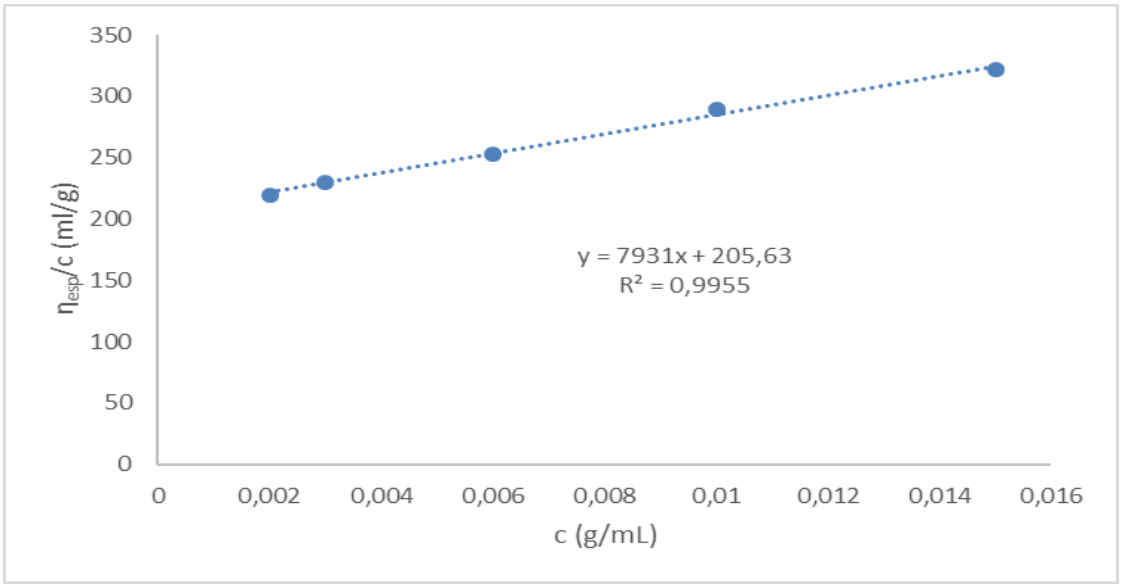
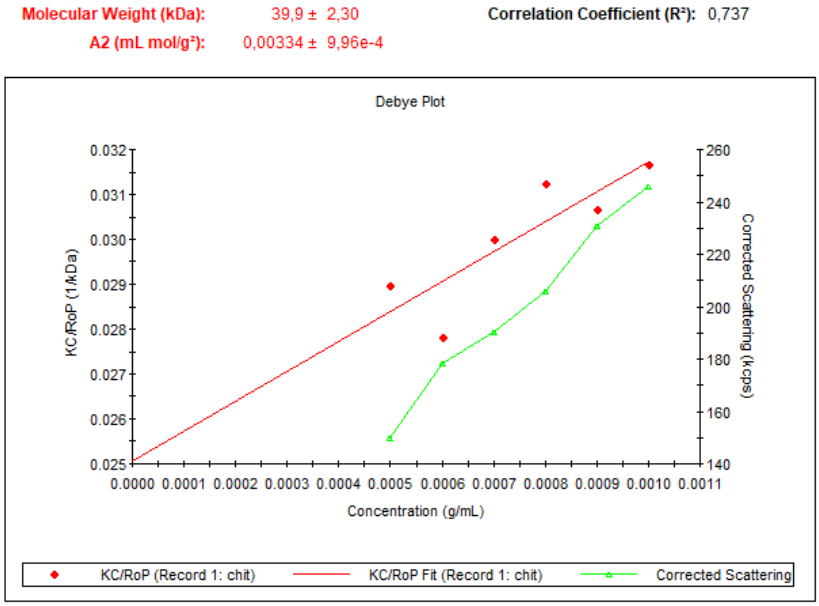


Figura A1. Regresión lineal de η_{esp} en función de la concentración (c) para soluciones de CS en ácido acético 0.3 M/acetato de sodio 0.2 M a 25 °C.

Asimismo, se determinó el peso molecular por la técnica de dispersión de luz estática (SLS, por su sigla en inglés) en un equipo Nano Zetasizer de Malvern Intrument. Para ello se prepararon una serie de soluciones de CS en buffer acetato pH 4.5 en el rango de concentraciones de 0.5-1 g/L. Las medidas se realizaron con un incremento en el índice de refracción dn/dC de 0.188.

El peso molecular resultante fue de 40 KDa, lo cual se aproxima con el obtenido mediante determinación de viscosidad intrínseca. El coeficiente de correlación lineal (r^2) fue de 0.737 en la curva de KC/RoP en función de la concentración del CS, siendo KC la constante de refracción de polímero y RoP es el coeficiente de extinción molar, véase Figura A2.



Conc. g/mL	Corrected Scattering kcps	KC/RoP 1/kDa
5,00e-4	149,7	0,0290
6,00e-4	178,6	0,0278
7,00e-4	190,6	0,0300
8,00e-4	205,9	0,0312
9,00e-4	231,1	0,0307
0,00100	246,2	0,0317

Figura A2. Regresión lineal de KC/RoP en función de la concentración de CS.

1.2 Espectroscopia H-NMR

Los análisis de H-NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance Neo a

25 °C. Para ellos se disolvieron 5 mg de CS o CS-PEG en 1 ml de DCl/D_2O 1% (v/v) y se calentó a 70 °C por 1 hr.

El grado de desacetilación (DD) del CS y el grado de sustitución de PEG en el CS-PEG fueron calculados según la ecuación 1 y 2, respectivamente (256,257):

$$DD(\%) = \left(1 - \frac{\frac{I_{CH3}}{3}}{\frac{I_{H2-H6}}{6}}\right) \times 100 \qquad DS_{PEG} = \frac{I_{H2-H6,HPEG} - \frac{6I_{CH3}}{DA\times 3}}{HPEG\,\frac{I_{CH3}}{DA\times 3}} \times 100 \times 100$$

donde I_{CH3} es la integral de la señal de los hidrógenos de las unidades de GlcNAc (~ 1.8 ppm), $I_{H2–H6}$ es la integral correspondiente a los hidrógenos H2–H6 de las unidades GlcNy al hidrogeno unido al C2 de la unidad GlcNAc (~ 2.7–4.0 ppm), y $I_{H2\text{-}H6,\ HPEG}$ es la integral correspondiente al PEG y a los hidrógenos H2-H6 del CS-PEG (~4–2.7 ppm). DA es el grado de acetilación (=100-DD) y HPEG es el número de H en la cadena de PEG. Para determinar HPEG se utilizó el promedio de los pesos moleculares de PEG-MeO y PEG-Biotin con el fin de estimar la cantidad de monómeros, los cuales al multiplicar por 4 da un total de 368 H.

Los espectros para las muestras de CS y CS-PEG en DCl/D_2O 1% se muestran en la Figura A 2 (A y B, respectivamente), el valor obtenido de DD para el CS fue de 85.3% y el grado de sustitución de PEG fue de 1.81%.

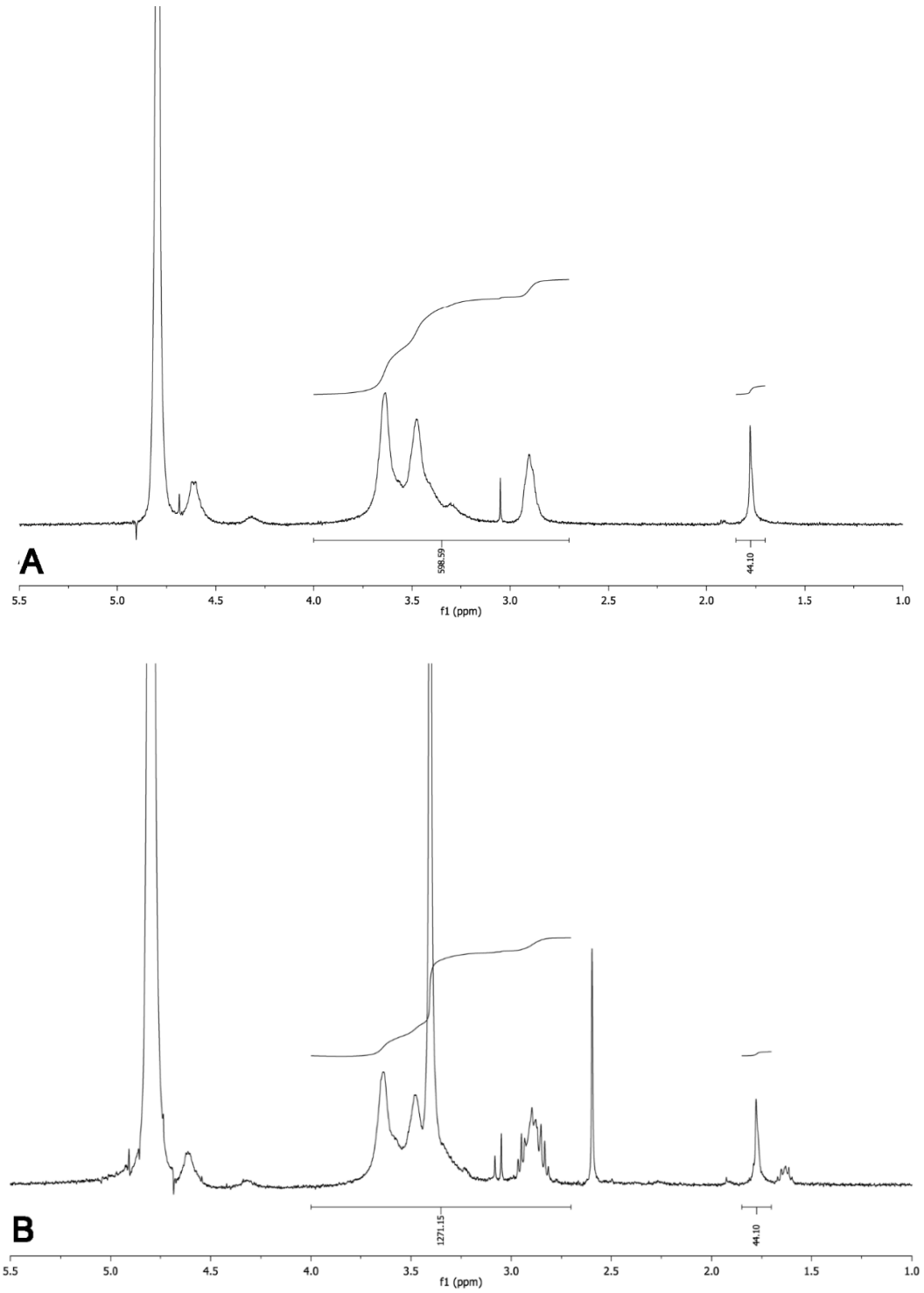


Figura A 2. Espectro H-NMR de CS (A) y CS-PEG (B) en DCl/D_2O 1% (v/v)

Anexo 2: Caracterización del anticuerpo ChiTn

2.1 Procedimiento experimental

2.1.1 Biotinilación del anticuerpo Chi-Tn

En primer lugar, se procede a realizar una precipitación con sulfato de amonio para concentrar la solución de anticuerpo, puesto que partimos de una concentración de 0.32 mg/mL para llegar a una concentración de 4 mg/mL.
Para ello se añaden 0.72g de sulfato de amonio a 2.4mL de solución de anticuerpo. Luego de 24 hrs, se centrifuga la solución resultante y se resuspende el pellet en buffer fosfato salino (PBS) hasta la concentración deseada. En segundo lugar, se prepara una solución de 22 mg/mL de biotina en DMSO. Se toma una alícuota igual al 10% del volumen de solución de anticuerpo y se añade a la solución de anticuerpo en agitación vigorosa, se incuba a temperatura ambiente durante 4 horas. Por último, se llevó a cabo una diálisis por 24 hrs con PBS (pH 7.4) para remover la biotina que no se conjugó al anticuerpo.

2.1.2 Verificación de la conjugación de biotina al anticuerpo

Con el fin de verificar la unión de las moléculas de biotina al anticuerpo se realizó un ELISA. En primer lugar, se incuba por 2 hrs a 37 ºC el anticuerpo a verificar y un anticuerpo control biotinilado (Goat IgG). Se realizan 3 lavados con PBS-tween para remover los anticuerpos que no se unieron a la placa y se efectúa un bloqueo con gelatina 1% en PBS por 1 hr a 37ºC. Luego de 3 lavados se añade el reactivo de detección (streptavidin-HRP), el cual se trata de una enzima peroxidasa. Se lava nuevamente y se incorpora la solución reveladora que contiene al sustrato (peróxido de hidrogeno). Cuando se añade el sustrato a la solución, éste es transformado por la enzima a un producto de color azul, proporcional a la cantidad de biotina presente en la solución. Luego se detiene la reacción con ácido sulfúrico al 5% y se mide la absorbancia a 450 nm.

Para cuantificar la cantidad de biotina unida al anticuerpo se realizó un ensayo colorimétrico HABA-avidina, se trata de un kit reactivo pronto para usar de Sigma Aldrich (# Cat. H2153), que consta en medir absorbancia a 500 nm del reactivo

HABA-avidina antes y después de añadir la muestra con biotina. Debido a la alta afinidad por la avidina, la biotina presente en la muestra desplaza el HABA y por lo tanto la absorbancia decrece de forma proporcional a la cantidad de biotina en la muestra.

2.1.3 Ensayo de funcionalidad del anticuerpo Chi-Tn biotinilado

Debido a que la unión de biotina al anticuerpo puede afectar la función de reconocimiento del anticuerpo al antígeno es necesario realizar un ensayo de funcionalidad del mismo. Para ello se llevó a cabo un ELISA indirecto, donde en primer lugar se incuban 100 µL/pocillo de una solución que contiene al antígeno Tn en buffer carbonato, pH 9.6, durante 24 hrs a temperatura ambiente para sensibilizar la placa. Luego se realizan 3 lavados con PBS-tween, se efectúa un bloqueo con gelatina 1% en PBS. Posteriormente se procede a incubar el anticuerpo Chi-Tn biotinilado y el anticuerpo Chi-Tn original (sin biotinilar) como control. Se deja en estufa durante 1 hora y luego se realizan 5 lavados. Inmediatamente se siembra el anticuerpo secundario SIGMA α-mouse unido a HRP (peroxidasa) por 30 minutos en estufa. Finalmente, luego de 5 lavados, se añade la solución sustrato (que contiene ABTS, peróxido de hidrógeno y buffer citrato-fosfato) durante 30 minutos y se lee absorbancia a 405nm.

2.1.4 Ensayo de dosificación del anticuerpo biotinilado por el método del ácido bicinconínico (BCA)

Con el fin de dosificar la cantidad de anticuerpo biotinilado presente en la solución se llevó a cabo un ensayo de dosificación de proteína a través del método del ácido bicinconínico. En primer lugar, se realiza una curva estándar de BSA (albúmina de suero bovino) en PBS (1-0.5-.0.25-0.15-0 mg/ml), luego se añaden 10 µL de muestra en cada pocillo junto a 200µL de una solución de BCA:CuSO4 (50:1). Se incuba por 30 minutos en estufa y se mide absorbancia a 570nm en lector de placa.

2.1.5 Verificación de la unión del anticuerpo a las nanopartículas

La unión del anticuerpo a las nanopartículas fue verificada mediante un ELISA de captura indirecta combinado con fluorescencia. Inicialmente se incubaron las Nanopartículas cargadas con Coumarin-6 funcionalizadas con el anticuerpo Chi-Tn en una placa de Elisa sensibilizada con el antígeno Tn. Luego de varios lavados, se realizó una incubación con el anticuerpo secundario, SIGMA α-mouse unido a HRP (peroxidasa), y se añade la solución sustrato que contiene peróxido de hidrógeno. La medida de absorbancia a 405 nm determina la funcionalidad de anticuerpo ChiTn unido a las nanopartículas y la medida de intensidad de fluorescencia a λ_{ex} 444 nm revela la presencia de las nanopartículas fluorescentes en la muestra. Se realizaron controles de Np fluorescentes sin el anticuerpo ChiTn, así como también, controles de Np funcionalizadas con el anticuerpo sin sonda fluorescente.

2.2 Resultados

2.2.1 Verificación de la biotinilación del anticuerpo Chi-Tn

Con el fin de verificar la unión de moléculas de biotina al anticuerpo Chi-Tn se realizó un ELISA, empleando un anticuerpo biotinilado conocido como control (Goat IgG). Donde la aparición de color en los pocillos es un indicativo de la presencia de biotina en la solución. Si bien no se puede informar cuántas biotinas se unieron al anticuerpo, fue posible observar desarrollo de color en los pocillos que contenían al anticuerpo problema, comparable con la obtenida en el control. Por lo que nos es posible afirmar la presencia de moléculas de biotina unidas al anticuerpo Chi-Tn. En la Tabla A 2.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla A2.1. Resultados del ELISA de verificación de biotinilación del anticuerpo Chi-Tn

	Anticuerpo Problema	Anticuerpo Control
Abs 450 nm	2.81 ± 0.30	2.97 ± 0.05

El ensayo HABA-avidina dió como resultado un promedio de 5 marcaciones de biotina por anticuerpo.

2.2.2 Ensayo de funcionalidad del anticuerpo Chi-Tn biotinilado

Debido a que la unión de biotina al anticuerpo puede afectar la función de reconocimiento del anticuerpo al antígeno es necesario realizar un ensayo de funcionalidad del mismo. Para ello se llevó a cabo un ELISA indirecto, donde en primer lugar se sensibiliza la placa con el antígeno Tn, seguido de una incubación con el anticuerpo Chi-Tn biotinilado y el anticuerpo Chi-Tn original (sin biotinilar) como control. Luego de varios lavados, se siembra el anticuerpo secundario SIGMA α-mouse unido a HRP (peroxidasa), y se añade la solución sustrato que contiene peróxido de hidrógeno. Finalmente se lee absorbancia a 405nm. Los resultados se muestran en la Tabla A 2.2.

Tabla A 2.2. Resultado del ELISA de verificación de funcionalidad del anticuerpo Chi-Tn biotinilado

Concentración	Abs 405nm Chi-Tn biotinilado	Abs 405nm Chi-Tn control
1/8000	0.42	0.43
1/4000	0.64	0.70

Tal como puede observarse en la Tabla A2.2, el anticuerpo Chi-Tn biotinilado y el Chi-Tn control reconocen al antígeno Tn y permanecen unidos a éste luego de los lavados. El anticuerpo secundario, un anti-IgG humano conjugado a HRP, reconoce al Chi-Tn. Posteriormente, cuando se añade el sustrato a la solución, es transformado por la enzima a un producto de color azul-verdoso, proporcional a la cantidad de anticuerpo Chi-Tn unido al antígeno Tn. Debido a que la medida de absorbancia de ambos anticuerpos Chi-Tn (con y sin biotina), para una misma concentración se asemejan, es posible afirmar que la función de reconocimiento del anticuerpo no se vio afectada por el proceso de biotinilación.

2.2.3 Ensayo de dosificación del anticuerpo biotinilado por el método del ácido bicinconínico (BCA)

Con el fin de cuantificar la cantidad de anticuerpo biotinilado obtenido se llevó a cabo el método de dosificación del ácido bicinconínico. El ácido bicinconínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio básico (reacción de Biuret). La cantidad de Cu^{2+}reducido es una función de la concentración de proteínas y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura, el cual absorbe a 570 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y puede ser estimada por comparación con un estándar de proteína conocido, tal como la albúmina sérica bovina (BSA). En este caso, la concentración de anticuerpo biotinilado obtenida fue de 4 mg/mL que posteriormente se diluyeron con PBS hasta llegar a una concentración final de 1mg/mL. La curva estándar de BSA obtenida se muestra en la ***Fig. A2.1***.

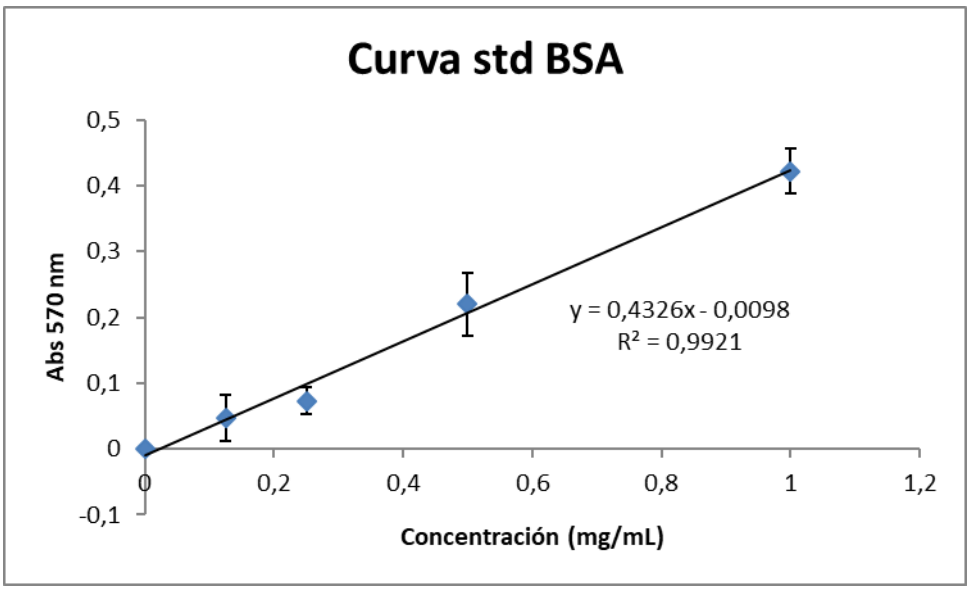


Fig. A2.1 Curva estándar de BSA

2.2.4 Verificación de la unión del anticuerpo a las nanopartículas

Tal como se observa en la Tabla A 2.3 y A 2.4, la intensidad de fluorescencia es marcadamente mayor en los pocillos que contienen las nanopartículas fluorescentes y unidas al anticuerpo Chi-Tn en comparación con las que no están funcionalizadas. Por otra parte, el ELISA de captura indirecta para verificar la presencia del anticuerpo Chi-Tn mostró resultados comparables de absorbancia entre el control de anticuerpo Chi-Tn y las nanopartículas que contenían anticuerpo con y sin la sonda fluorescente. Estos resultados sugieren una efectiva unión entre el anticuerpo y las nanopartículas.

Tabla A 2.3. Resultado de las medidas de intensidad de fluorescencia y el ELISA en las nanocápsulas de CS.

Muestra	Intensidad de fluorescencia	Verificación de anticuerpo
Nc CS-PEG-Coum-ChiTn	3.060	1.606
Nc CS-PEG-ChiTn	0.391	1.290
Nc CS-PEG-Coum	0.727	0.233
Control ChiTn	0.427	1.680
control PBS	0.451	0.100

Tabla A 2.4. Resultado de las medidas de intensidad de fluorescencia y el ELISA en las LPHNp.

Muestra	Intensidad de fluorescencia	Verificación de anticuerpo
LPHNp-Coum-ChiTn	2.612	1.628
LPHNp-ChiTn	0.619	1.743
LPHNp-Coum	0.637	0.566
Control ChiTn	0.552	1.671
control PBS	0.622	0.476

Anexo 3. Validación del método de determinación de DCX por HPLC

La validación del método se realizó según la guía Q2b de la ICH (por su sigla en inglés; International Council for Harmonisation).

Inicialmente se preparó una solución stock de 40 mg de DCX/mL en etanol. Luego, se disolvieron 2.5 µL de la solución stock con la fase móvil (acetonitrilo/agua 50/50) hasta un volumen final de 10 mL. La solución resultante, de concentración 10 ppm de DCX, fue utilizada para la validación del método. Para evaluar linealidad se realizó una curva de calibración de DCX en el rango de 0.10 – 1.40 ppm. Los límites de cuantificación (LOQ, de su sigla en inglés Limit of Quantification) y detección (LOD, de su sigla en inglés Limit of Detection) fueron determinados utilizando la relación señal/ruido, tomando como referencia la relación 10:1 para LOQ y 3:1 para LOD. La exactitud del método fue estimada a partir de los porcentajes de recuperación a 3 niveles, correspondientes a los extremos y al medio de la curva de calibración (0.1, 0.6 y 1.4 ppm). La precisión fue calculada a partir del error estándar relativo (RSD) como 100-RSD. Todas las medidas fueron realizadas por quintuplicado.

Tal como se observa en la Figura A 3.1, la curva de calibración obtenida fue lineal en el rango de concentración evaluado, con un $r^2 > 0.9999$. El límite de detección resultante fue de 0.0076 ppm y el de cuantificación fue de 0.025 ppm. Los porcentajes de recuperación fueron de 103.92, 99.45 y 100.24% para los niveles bajo, medio y alto, respectivamente. Mientras que la precisión fue mayor al 98 % intra-día. Por lo que podemos decir que es un método sensible que permite cuantificar DCX en el rango seleccionado de forma exacta y precisa.

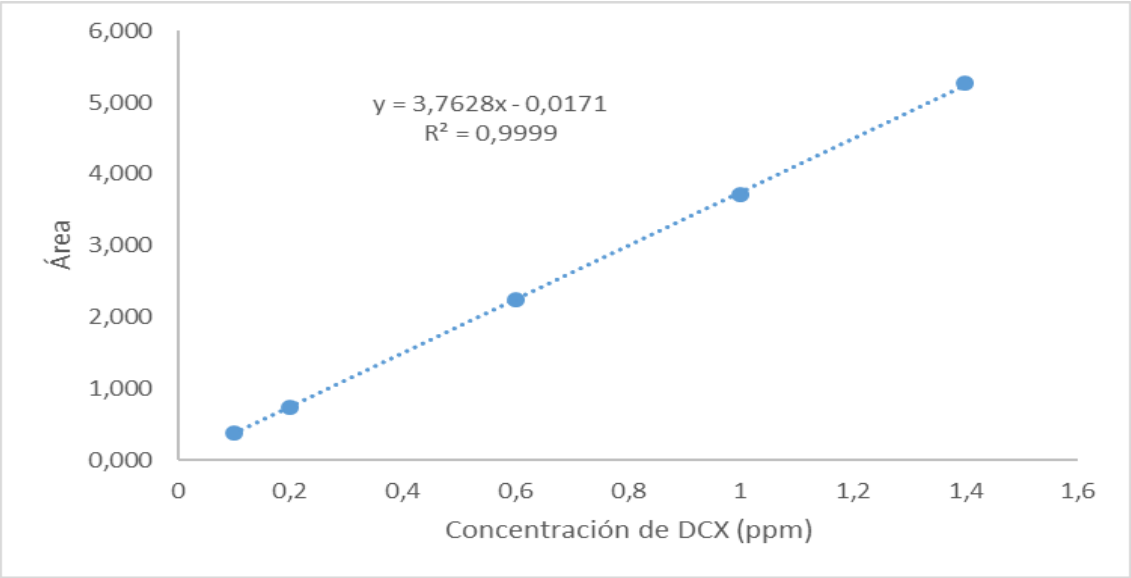


Figura A 3.1. Curva de calibración de DCX

Anexo 4. Modelos matemáticos de liberación de DCX

A continuación, en la Tabla A4. 1 se presentan los resultados de los modelos matemáticos aplicados en el estudio de liberación de DCX de las nanocápsulas de CS. Así como también se muestran los gráficos de cada modelo empleado, véase Figura A 4.1-5.

Tabla A4 1. Valores obtenidos de r^2, pendiente e intercepción con el eje *y* de los distintos modelos matemáticos aplicados en la liberación de las nanopartículas de CS a pH 5 y 7.4.

Modelo	pH 5			pH 7,4		
	r^2	pendiente	intercepción	r^2	pendiente	intercepción
Orden cero	0.8981	0.0934	7.5629	0.5436	0.0267	5.8125
Primer orden	0.9377	0.0005	1.9677	0.5578	0.0001	1.9736
Higuchi	0,999	1.9994	0.3395	0.8134	0.6625	2.878
Korsmeyer-Peppas	0.988	0.6187	0.0622	0.94	0.453	0.0942
de Hixson-Crowell	0.9256	0.0017	0.1162	0.5531	0.0004	0.0926

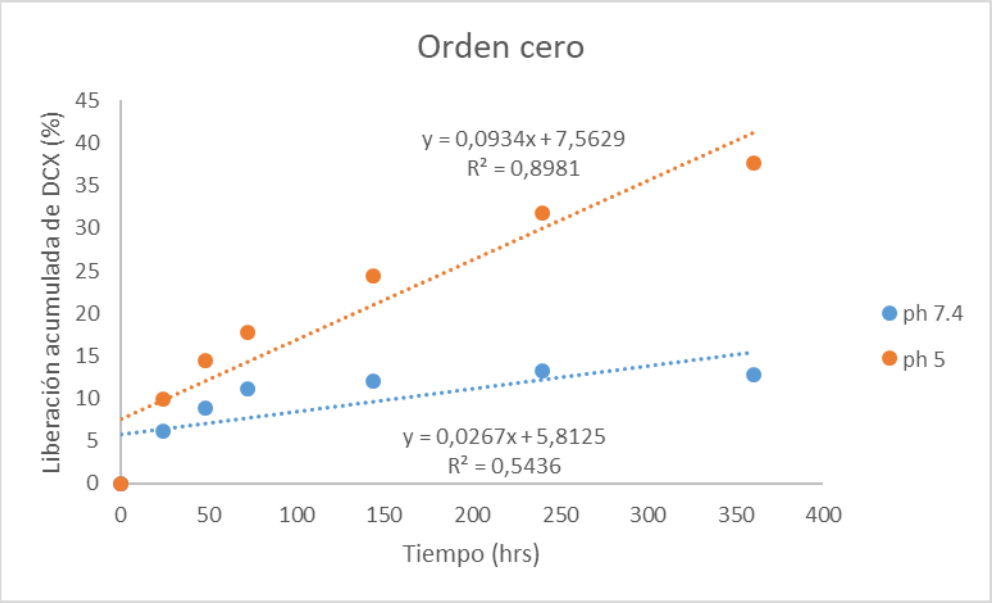


Figura A 4.1 Gráfico de orden cero

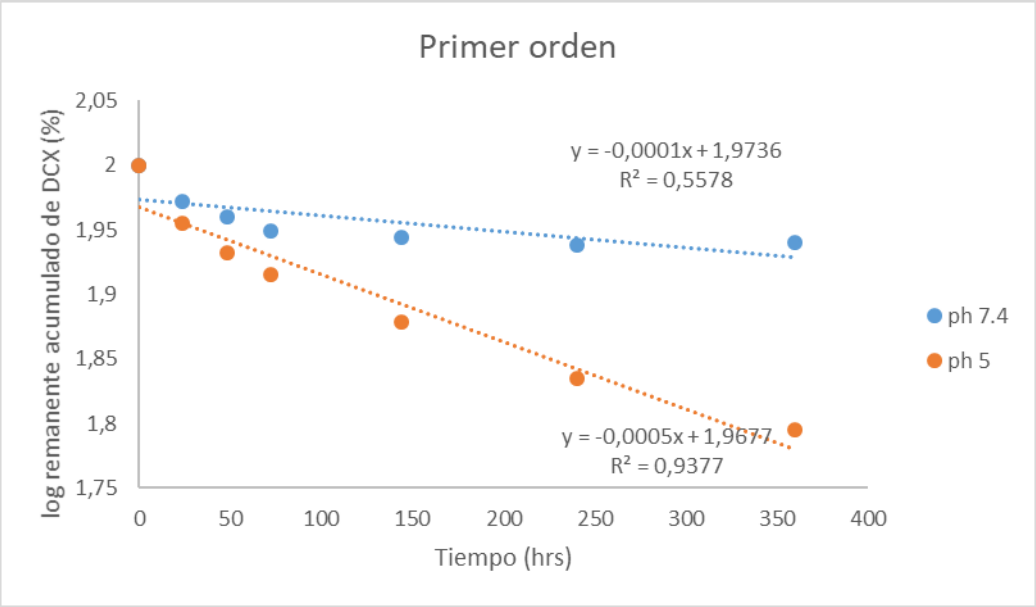


Figura A 4.2 Gráfico de primer orden

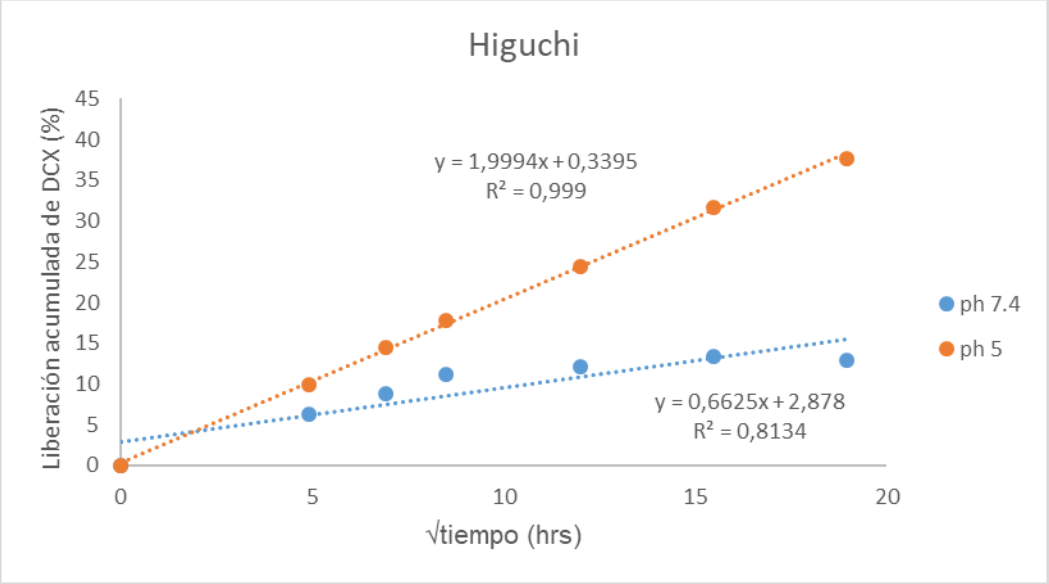


Figura A 4.3 Modelo de Higuchi

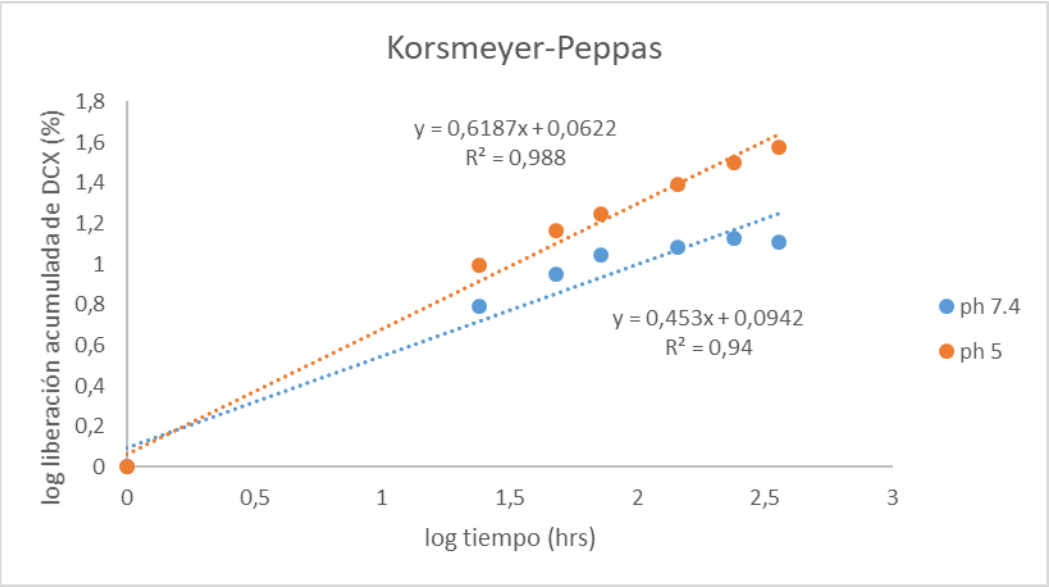


Figura A 4.4 Modelo de Korsmeyer-Peppas

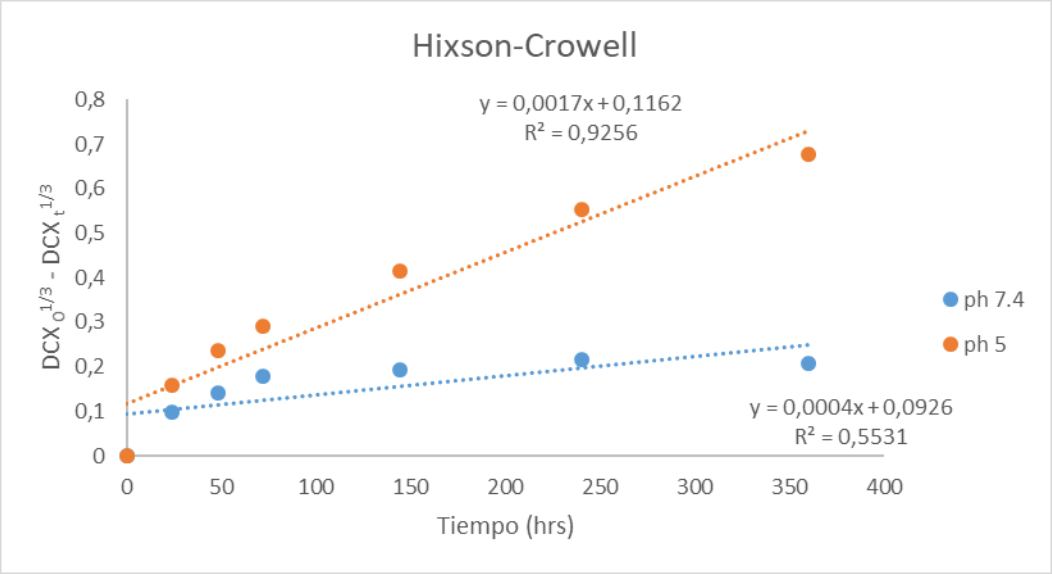


Figura A 4.5 Modelo de Hixson-Crowell

Anexo 5. Presentaciones y ponencias en eventos científicos

- Presentación de poster: “Preparación y caracterización de inmuno-nanopartículas híbridas lípido/polímero con potencial utilidad para tratamientos oncológicos”. Analía Castro, Ricardo Faccio, Patricia Zimet, Pablo Miranda, Iris Miraballes, Álvaro Pittini, Nora Berois, Eduardo Osinaga, Álvaro W. Mombrú, Helena Pardo. Octavo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENAQUI), octubre de 2023.
- Presentación oral: “Preparación y caracterización de inmuno-nanopartículas con potencial utilidad para tratamientos oncológicos”. Segundo encuentro del Grupo interdisciplinario para el descubrimiento de nuevas terapias en el contexto de una salud, julio 2023.
- Presentación oral: “Formulación, síntesis y caracterización de nanosistemas de entrega de drogas anticancerígenas”. II Encuentro Mujer en la Nanotecnología, marzo 2023.
- Presentación de poster: “Caracterización de inmuno-nanopartículas con potencial utilidad para tratamientos oncológicos”. Analía Castro, Álvaro W. Mombrú, Nora Berois, Patricia Zimet, Pablo Miranda, Juan Pablo Villanueva, Luciana Pereira, Iris Miraballes, Antonio Malanga, Eduardo Osinaga y Helena Pardo. Sexto Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENAQUI), octubre de 2019.
- Presentación oral. “Formulación, síntesis y caracterización de nanosistemas de entrega de drogas anticancerígenas funcionalizados con anticuerpos anti-antígeno Tn”. V Congreso de Ciencias Farmacéuticas, agosto 2018.
- Presentación de poster: “Formulación, síntesis y caracterización de dos nanosistemas de entrega de docetaxel para el mejoramiento de tratamientos oncológicos”. Analía Castro, Álvaro W. Mombrú, Nora Berois, Patricia Zimet, Pablo Miranda, Juan Pablo Villanueva, Luciana Pereira, Iris Miraballes, Antonio Malanga, Eduardo Osinaga y Helena Pardo. Quinto Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENAQUI), octubre de 2017.
- Presentación oral: “Inmuno-nanopartículas como vectores en el tratamiento del cáncer”. Primera jornada de inmunología y cáncer, abril 2017.

Anexo 6. Artículos científicos nacionales e internacionales, publicados o en revisión, que resultan del trabajo de tesis doctoral.

- Artículo en proceso de evaluación en el Journal of Nanobiotechnology; “Development, characterization and evaluation of Chi-Tn mAb functionalized DOTAP-PLGA hybrid nanoparticles loaded with docetaxel for lung cancer therapy”. Analía Castro*, Álvaro Pittini*, Nora Berois, Ricardo Faccio, Pablo Miranda, Álvaro W. Mombrú, Eduardo Osinaga, Helena Pardo, 2024. (* igual contribución).
  ID ad15df48-f0b0-44ff-9a56-263901517e42.

- Artículo publicado en International Journal of Biological Macromolecules (Elsevier): “Docetaxel in chitosan-based nanocapsules conjugated with an anti-Tn antigen mouse/human chimeric antibody as a promising targeting strategy of lung tumors”, Analía Castro, Nora Berois, Antonio Malanga, Claudia Ortega, Pablo Oppezzo, Otto Pristch, Álvaro W. Mombrú, Eduardo Osinaga, Helena Pardo, 2021.
  DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.054

- Artículo publicado en revista nacional de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay: Formulación, síntesis y caracterización de nanosistemas de entrega de drogas anticancerígenas funcionalizados con anticuerpos anti-antígeno Tn, 2018.

Anexo 7. Publicación y solicitud de patente asociada al trabajo de tesis doctoral

Las nanocápsulas de CS desarrolladas en esta tesis doctoral fueron utilizadas como plataforma para encapsular otro compuesto, el BayK844, en colaboración con Marcelo Hill y Mercedes Segovia del laboratorio de Inmunoregulación e inflamación del Instituto Pasteur de Montevideo, en el marco de la tesis doctoral de Sabina Victoria. De esta colaboración se desprenden dos publicaciones bibliográficas:

- Artículo en revisión en el nternational Journal of Biological Macromolecules: "Formulating a TMEM176B Blocker in Nanoparticles Uncouples Its Paradoxical Roles in Innate and Adaptive Antitumoral Immunity". Sabina Victoria*, Analía Castro*, Alvaro Pittini, Daniela Olivera, Sofía Russo, Ignacio Cebrian, Álvaro W. Mombrú, Eduardo Osinaga, Helena Pardo, Mercedes Segovia, Marcelo Hill, 2024. (* igual contribución).
  ID: IJBIOMAC-D-23-10830
  DOI: https://doi.org/10.1101/2022.09.02.506404

- Artículo publicado en el Journal of Chromatographic Science: "Reverse Phase HPLC Methodology for the Determination of Bay K8644". Pablo Miranda*, Analía Castro*, Luisina Rodríguez Grassi, Danilo Davyt, Marcelo Hill, Mercedes Segovia, Álvaro W. Mombrú, Helena Pardo, 2024. (* igual contribución).
  DOI: 10.1093/chromsci/bmae011

Y una solicitud de una patente:

- MEANS AND METHODS FOR IMPROVING ANTI-TUMORAL EFFICACY OF TRANSMEMBRANE CHANNEL PROTEIN BLOCKERS (2021). MARCELO HILL, SEGOVIA, PARDO, H. , Mombrú A , VICTORIA S , Castro A , MARÍA VARELA.