TESIS DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA Opción: Biología Celular y Molecular

Formulación nanotecnológica de un coctel polifenólico optimizado de Vitis vinífera L. Cv. Tannat y evaluación in vitro de sus propiedades antitumorales

Lic. Mariel Flores Orientador: Dr. Juan. C. Benech

Laboratorio de Ejecución:

Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Centro NanoMat-Polo Tecnológico de Pando.

Montevideo, noviembre de 2015

Índice.

Resumer	esumen				
1. Ir	ntroducción	7			
1.1.	Vitis vinífera en Uruguay	7			
1.2.	Los polifenoles	8			
1.3.	Biología Tumoral	9			
1.4.	Propiedades de los polifenoles	10			
1.5.	La Nanotecnología en la Terapia	13			
2. 0	bjetivo	16			
2.1.	Objetivos específicos	16			
3. N	lateriales y Métodos	17			
3.1.	Preparación de la muestra	17			
3.1.1	Extracción	17			
3.1.2	Cuantificación	17			
3.1.3	Preparación de liposomas y encapsulamiento del extracto	18			
3.1.4	Caracterización	19			
3.1.5	Modificación del extracto mediante extracción de los taninos	20			
3.1.6	Síntesis y caracterización de liposomas con extracto sin taninos	20			
3.2 E ^v	valuación de la actividad biológica <i>in vitro</i>	21			
3.2.1	Material biológico	21			
3.2.2	Ensayo de reducción de sal del bromuro de (3-[4,5-dimeil tiazol-2-y1]-2,5				
	difeniltratazolio (MTT)	21			
3.2.3	Ensayo de viabilidad celular- tinción con Azul de Tripán	22			

3.2.4 Tinción con 4, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 22				
3.3 Tinción con Anexina V 23				
3.4 Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo				
3.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) 24				
3.6 Ensayo de migración 25				
4 Resultados				
4.1.1 Extracción y cuantificación				
4.1.2 Síntesis de liposomas, encapsulamiento del extracto y caracterización				
4.1.3 Modificación del extracto mediante extracción de los taninos				
4.1.4 Síntesis de liposomas, encapsulamiento del extracto y caracterización				
4.2.1.Ensayo de reducción de sal del bromuro de (3-[4,5-dimeil tiazol-2-y1]-2,5				
difeniltratazolio(MTT)				
4.2.2 Viabilidad y conteo celular con Azul de Tripán 32				
4.3.1 Tinción DAPI				
4.3.2.Tinción con AnexinaV				
4.4.1.Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo				
4.5.1.Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)				
4.5.2.Ensayo de migración celular 40				
5 Discusión				
5.1 Síntesis y caracterización del nanosistema 42				
5.2 Análisis de la actividad antitumoral diferencial 43				
5.3 Estudios por Microscopía para determinar tipo de muerte celular 46				
5.4 Análisis del ciclo celular 46				
5.5 Estudio de la elasticidad de la membrana celular y poder migratorio				

6	Conclusión	48
7	Perspectivas	49
8	Referencias	50

Resumen

La variedad Tannat de la planta Vitis vinífera es extensamente cultivada en Uruguay, y en el proceso de elaboración se genera el orujo de la uva, fracción que no se utiliza para la producción de vinos, siendo parte de los desechos generados. Los polifenoles son metabolitos secundarios generados por las plantas, y que presentan diversas propiedades de impacto en la salud, como antiinflamatoria y antitumoral. Algunos de estos metabolitos son insolubles e inestables, por lo que el desarrollo de un producto nanotecnológico con aplicación biomédica podría evitar dichas características, además de brindar una mejor biodistribución y una entrega controlada. Muchos tratamientos oncológicos actuales tienen como falla la generación de resistencias a las drogas y/o toxicidad por la incorporación de los fármacos en los tejidos normales. Por lo tanto, el éxito del tratamiento depende de elegir una droga o combinación de drogas adecuada y un sistema de entrega que permita hacer llegar la droga a sitios específicos. En este trabajo se desarrolló un producto nanotecnológico de origen natural, con potencial aplicación terapéutica mediante la optimización y encapsulado de un extracto de Vitis vinífera en nano-liposomas. La síntesis fue puesta a punto y se caracterizó el nanosistema. Se evidenció a través de ensayos in vitro sus posibles efectos diferenciales anti-tumorales del mismo, evaluando diferentes parámetros de actividad biológica en una línea celular tumoral (MCF-7) y una línea celular no tumoral (BJ). Se evidenció en las células tumoral muerte celular apoptótica, disminución de la proliferación, y disminución del poder de migración de las mismas. Para los diferentes análisis se utilizaron las Microscopía de Fuerza Atómica (datos de elasticidad celular), Microscopía de Láser Confocal (fragmentación nuclear), y Microscopía Óptica (morfología celular). El nanosistema creado es un primer paso para proseguir futuros estudios de evaluación de tratamientos oncológicos, basados en tratamientos combinados y personalizados.

1. Introducción

1.1. Vitis viníferaen Uruguay.

La planta de Vitis vinífera es originaria de Europa central, de Portugal, del norte Alemán, Asia menor, e Irán. A su vez, es cultivada en todos los continentes, excepto la Antártica (Lim, 2013). En América del Sur, Uruguay es el país que presenta las condiciones climáticas ideales para su producción, ya que cuenta con un clima templado, temperatura media anual de 18°C, precipitación de 1000mm³, y cuatro estaciones bien diferenciadas. Los veranos cálidos con días soleados y noches frescas definen el ambiente donde maduran sus uvas (Frutos, 2004). De hecho, actualmente nuestro país cuenta con un área de viñedos de 8000 hectáreas, con plantaciones de alta calidad (Vidart et al., 2013). La preparación de los vinos (Bodegas Carrau) en Uruguay se elabora, en bodegas diseñadas por enólogos, por gravedad en cuatro niveles, en un proceso sin utilización de bombas de mosto. La uva es depositada en tanques y se realiza una maceración por hundimiento de los orujos; las barricas se alimentan por gravedad separando así la fase líquida (dirigida a la crianza y posterior embotellado) de la sólida (desecho) (www.bodegascarrau.com). La variedad Tannat, muy cultivada en el territorio nacional, se caracteriza por la abundante presencia de los taninos, los cuales se caracterizan por: a) ser insolubles en agua, b) tener un rango de masas moleculares muy amplio, c) poseer numerosos anillos aromáticos y grupos fenólicos, d) tener la capacidad de formar complejos intermoleculares, y precipitar en alcaloides, gelatinas y otras proteínas(Zalacain Aramburu, 2001). Como efecto biológico, los taninos presentan una fuerte respuesta anti-bacterial, mediante la inhibición de enzimas extracelulares microbianas, la formación de complejos metal-iones, o mediante la interacción complejo-taninos con las membranas celulares impidiendo así la entrada de la bacteria a las células (Olchowik-Grabarek et al., 2014).



Figura 1. Formación de complejos entre taninos. Procianidina (77), proantocianidina A1 (78), proantocianidina A2 (79), proantocianidina C1 (80).

1.2. Los polifenoles.

Los polifenoles son compuestos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y son clasificados de forma general en: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos(Iswaldi et al., 2011). En su mayoría, estos compuestos son solubles en solventes orgánicos, algunos son solubles en hidróxido de sodio y carbonato de sodio, y otros (los que presentan pocos grupos hidroxilo) son solubles en éter, cloroformo y etanol. Los términos fenoles y polifenoles se refieren a metabolitos naturales secundarios producidos por las plantas. Las mismas necesitan estos metabolitos, por ejemplo, su pigmentación, resistencia a patógenos, reproducción y protección de la radiación UV y de la oxidación(Lattanzio, et al., 2006).

La capacidad de derivados de plantas de reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas se asocia a la ocurrencia de dichos metabolitos secundarios. Los mismos tienen baja bioactividad si los comparamos con drogas farmacéuticas, pero el hecho de, por ejemplo, ser ingeridas de forma regular y como parte de la dieta podrían generar un impacto fisiológico a largo plazo (Espín, et al., 2007). Las propiedades beneficiosas de la planta de la uva y sus productos se le atribuyen a los compuestos ya nombrados, y que están presentes en ella. Se ha visto que estos metabolitos presentan propiedades cardioprotectoras, anti-inflamatorias, neuro-protectoras, anti-microbiana y anti-cáncer(Castillo-Pichardo, et al., 2013). Se ha identificado un gran número de componentes fenólicos presentes en la uva así como también en su producto, el vino (Xia, et al., 2010). La cáscara de la uva es rica en antocianinas, ácido hidroxicinamico y flavonoles; la pulpa de la fruta presenta alto contenido de quercetina, catequinas y resveratrol; mientras que las semillas tienen principalmente flavonoles(Lim, 2013). Específicamente, el vino tinto es una de las bebidas con mayor índice de polifenoles, con valores medios de 2 g/l, de los cuales 65-70% son polifenoles neutros (ej.: catequinas y epicatequinas) y 15%, aproximadamente, corresponde a quercetina y mircetina. La variedad de uva cv Tannat es una de las que contiene aun mayor concentración de polifenoles (Bracesco et al., 2007).

Cabe destacar que en el trabajo de caracterización de orujos realizado previamente en el Polo tecnológico de Pando, se obtuvieron los perfiles fenólicos mediante estudios de HPLC de la variedad Tannat- cosecha 2010, logrando la identificación de la mayoría de sus compuestos (Miranda, 2014).

1.3. Biología tumoral.

Las células tumorales se caracterizan por tener un crecimiento alterado, una des-regulación del ciclo celular, activación de proto-oncogenes, des-activación de genes supresores de tumores, y ganancia de poder metastásico(http://discovery.ucl.ac.uk/146186/, 2007).El fenotipo tumoral se genera a partir de una des-regulación de más de 500 genes que participan en múltiples pasos en las vías de señalización celular. (Gupta, et al., 2010). Actualmente es aceptado que cada tipo de cáncer está dirigido por un grupo específico de mecanismos moleculares selectos. De hecho, el mismo mecanismo a nivel molecular actúa

de forma diferente y en distinto grado de afectación en distintos tipos de cáncer(Schulz et al., 2011).Además, el microambiente tumoral se caracteriza por ser heterogéneo, conteniendo fibroblastos estromales, células hematopoyéticas infiltradas, y elementos vasculares (Yefenof, 2008).El desarrollo del cáncer no es solamente el resultado de una alteración genética en el tumor, sino que también está asociado a cambios complejos en el estroma, en el endotelio y en las células involucradas en los procesos inflamatorios (Yefenof, 2008).

Actualmente, las quimioterapias aplicadas no siempre generan una remisión total del tumor. Se ha logrado en algunos casos, aumentar la media de sobrevida, disminuir los efectos secundarios relacionados con la enfermedad o el tratamiento, y el porcentaje de pacientes que logran curarse. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las quimioterapias citotóxicas están limitadas por los efectos adversos que puedan generar, y por la tolerancia de cada paciente(Alaoui - Jamali, 2010). El gran desafío hoy en día es generar un tratamiento que erradique el tumor sin generar células resistentes y disminuir al máximo la toxicidad sobre las células no tumorales (Jacquemin, et al., 2010).Un campo muy explorado para el tratamiento del cáncer es la inmunoterapia, llegándose a ensayos clínicos. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre las respuestas inmuno-específicas y las respuestas clínicas, faltando así resultados sólidos al respecto (Yefenof, 2008).

Recientemente, se ha comenzado a investigar el uso de agentes terapéuticos con dosis mantenidas en el tiempo y a largo plazo (en bajas dosis, o agentes moleculares dirigidos como Avastin, Herceptin), seguido de una alta dosis de quimioterapia convencional (Alaoui - Jamali, 2010).

El proceso tumoral entonces es complejo e involucra muchos aspectos que luego van a intervenir en los cambios genéticos y fenotípicos. Por lo tanto, es poco probable que la inhibición de un único producto génico prevenga o trate el cáncer.

1.4. Propiedades de los polifenoles.

La prevención y el tratamiento del cáncer se podrían dar mediante la administración de uno o más compuestos naturales, los cuales tienen como ventaja: a) la poca o nula toxicidad, b) alta eficacia en múltiples sitios, c) capacidad de la administración vía oral, d) el bajo costo, y e) tienen buena aceptación por parte de la población en general (Mustafa et al., 2007). Las frutas y los vegetales contienen cientos de flavonoides que tienen diversos grados de actividad anti-oxidante así como también de actividad pro-oxidante. Existen evidencias *in vitro* que sugieren que los fitoquímicos podrían tener efectos diferenciales dependiendo del tipo celular y de la concentración, logrando ser anti-oxidantes o pro-oxidantes. Esta última propiedad sería la responsable de los efectos citotóxicos y pro-apoptóticos sobre células tumorales (Choueiri, et al., 2012).Por ejemplo, las bayas son utilizadas como alimento medicinal, en aplicaciones quimio-preventivas, anti-inflamatorias, y agente anti-cáncer; y estas aplicaciones se han llevado a ensayos clínicos. Ya es aceptado que la inflamación es un componente crítico en la progresión de un tumor, por lo que los agentes que presenten una capacidad anti-inflamatoria podrían jugar un rol importante en los procesos anti-tumorales (Folmer, et al., 2013). Otro estudio del año 2013 demostró que el extracto del espino tiene efectos anti-cáncer *in vitro* en células MCF-7, alterando el ciclo celular de las mismas y provocando apoptosis (Li et al., 2013). El extracto de la planta de romero presenta efectos anti-tumorales *in vitro* sobre células de cáncer de colon afectando múltiples vías de señalización (Valdés et al., 2013).

Los efectos anti-cáncer de los polifenoles en combinación con quimioterapias o radioterapias se han demostrados en modelos pre-clínicos. De alguna manera, estos compuestos naturales logran sensibilizar a las células tumorales, afectando vías de señalización intrínsecas y extrínsecas, aunque se dificulta saber a qué acción o vía molecular afecta cada polifenol (Jacquemin et al., 2010).

En el caso de las uvas, se ha logrado demostrar en diferentes modelos tumorales, una actividad anti-tumoral (Tabla 1), y muchos estudios indicaron que los polifenoles de la cáscara de la uva presentan efectos anti-tumorales en carcinoma mamario. Específicamente, el trabajo de Sun et al. logró demostrar una actividad anti-tumoral y anti-metastásica en un modelo murino (BALB-C inyectados con células tumorales mamarias 4T1), sin detectar una toxicidad sistémica aparente (Sun, et al., 2012).

El grupo de investigación deCarly C. Barron demostró que el vino tinto (viñedo de Ontario) presenta actividad anti-tumoral en células de cáncer de pulmón, inhibiendo la fosforilación de Akt y de Erk, y aumentando la fosforilación de p53. A su vez, en dicho trabajo se realizó una comparación entre los efectos anti-tumorales de rampamicina y metformina y los efectos del vino tinto en células en cultivo (cáncer de pulmón). Se observó una similar

inhibición de la proliferación celular en todos los casos, indicando que el vino tinto tiene efectos terapéuticos a la altura de las drogas comerciales (Barron, et al., 2014).

Estudios realizados con un extracto de un vino tinto francés (Corbires AOC), apoyan estos resultados, y se observó un efecto citotóxico diferencial. Los ensayos llevados a cabo con este extracto demostraron propiedades antitumorales sobre la línea celular P19 (teratocarcinoma murino), generando apoptosis y detención del ciclo celular en fase G1; y sin demostrar efectos citotóxicos sobre la línea celular normal NIH/3T3 (Sharif et al., 2011). Las propiedades anti-cancerígenas del extracto de uva involucra la regulación de genes relacionados con el ciclo celular, NF-kB, fosfolipasa C, vías de señalización de calcio, respuestas inflamatorias, así como la promoción de la actividad pro-oxidante, aumentando el daño en el ADN (Xia et al., 2010). Numerosas evidencias sugieren que la eficacia en cuanto a actividad biológica de los polifenoles es mayor cuando se encuentran combinados, que cuando se encuentran de forma individual (Berdowska et al., 2013; W. Li, et al., 2010; Sun et al., 2012).

Por otra parte, existen buenas evidencias experimentales de que las propiedades nanomecánicas de las células malignas están modificadas cuando son comparadas con células normales del mismo tipo. Estos cambios parecen permitir que las células tengan un mayor poder metastásico. Se ha detectado que existe una correlación entre grado de rigidez celular con el poder de invasión. Cuanto más rígida se presenta una células, menos será su poder de invasión (Lekka et al., 2012; Omidvar, et al., 2014). Los polifenoles logran interactuar con fosfolípidos de la membrana celular a través de sus grupos hidroxilos y anillos fenólicos, pudiendo modular procesos y proteínas dependientes de la membrana. Además, estos compuestos tienen la capacidad de modular vías relacionadas con la inflamación crónica y el metabolismo energético (Barrajón-catalán et al., 2014).

Si bien todo indica un que los extractos derivados de plantas podrían generar efectos positivos sobre ciertas enfermedades, y en particular sobre el cáncer, existen todavía algunas incertidumbres ya que hay un pobre control de calidad, problemas de contaminación, posible toxicidad sobre algún órgano específico, e interacción polifenoldroga que se desconozca (Joven et al., 2013).

12

Compuesto fenólico	Modelo de estudio	Efecto
Proantocianidinas	Línea celular de	Inhibición de
	carcinoma mamario	metástasis
	murino	
Antocianinas	Línea celular de cáncer	Fragmentación de
	de colon (HT-29 y	ADN
	Caco-2)	
Catequinas	Línea de tumor	Disminución de la
	mamario humano	proliferación celular
		con 30 y 60 µg/ml
Flavonas	Línea celular de cáncer	Disminución de la
	de colon HT-29	proliferación celular e
		inducción de apoptosis
Flavonoides	Línea celular de cáncer	Inducción de apoptosis
	de colon HT-29	
Resveratrol	Líneas celulares de	Disminución de la
	próstata	proliferación celular e
		inducción de apoptosis

Tabla 1. Efectos de compuestos fenólicos derivados de extractos de uva (Xia et al., 2010).

1.5. La Nanotecnología en la terapia.

La Nanomedicina se define como el diseño y desarrollo de agentes terapéuticos y/o diagnósticos a una escala nanométrica. La aplicación de la nanotecnología es una oportunidad para generar tratamientos novedosos y más efectivos mejorando la biodistribución, vida media de la droga y la solubilidad(Sanna, et al., 2014). El endotelio a nivel tumoral es más permeable que en su estado normal, y el drenaje linfático es menor. Esto permite a las nanopartículas a entrar al espacio intersticial tumoral y quedar retenidos allí, mientras que pequeñas macromoléculas (por ejemplo drogas quimioterápicas) no quedan retenidas en el tumor, y además por su tamaño menor a los 5nm también logran entrar a tejidos normales(Torchilin, 2011). El efecto EPR (*enhancedpermeability and retention*), es un fenómeno que permite ser usado como estrategia al momento de mejorar la entrega de agentes quimio-terapéuticos al tumor (Lammers, Kiessling, Hennink, & Storm, 2012). Según la NNI (*NationalNanotechnologyInitiative*) las estructuras nanométricas deben tener, en al menos una dimensión, entre 1-100 nanómetros. Pero para aplicaciones

médicas, las nanopartículas deben de comprender un tamaño de entre 5-200 nanómetros, para evitar el riesgo de embolismo (Santos, et al., 2012).

Los sistemas basados en lípidos (microemulsiones, liposomas, nanosomas) son aceptados como sistemas de entrega de agentes, por su estabilidad a largo plazo, por su solubilidad y su preparación sencilla(Shutava, et al. 2012). Su estructura consiste en una bicapa lipídica que forma una esfera con una cavidad acuosa en su interior (Fig. 2), dándole así la habilidad de lograr encapsular compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Gülseren, et al., 2012).Los liposomas son biodegradables, biocompatibles, y ya se han utilizado en diversas vías de administración (oral ocular, intravenosa) (Santos et al., 2012).



Figura 2. Esquema de un liposomas

Son un sistema de entrega que protege a los agentes bioactivos de la digestión en el estómago, y muestran altos niveles de absorción a nivel del tracto gastrointestinal, llevando así a una mayor bioactividad y biodisponibilidad de los compuestos encapsulados (Hasan et al., 2014). Los liposomas cargados positivamente tienen como inconveniente las interacciones indeseables con proteínas del suero con carga negativa, así como una posible respuesta inflamatoria. El hecho de agregar colesterol (y/o lípidos neutros como por ejemplo la fosfatidilcolina) a la formulación de los liposomas ayuda a superar el inconveniente antes mencionado (Müller et al., 2015). El tamaño de los liposomas puede ser controlado durante la síntesis, y es una propiedad fundamental cuando se trata de una nanomedicina. Algunos trabajos con liposomas han demostrado que partículas con un tamaño mayor a 8nm de diámetro se dirigen preferentemente hacia tejidos tumorales versus tejidos sanos(Chow, et al. 2013). Por otra parte, liposomas muy grandes son fácilmente reconocidos y eliminados del organismo por el hígado y células fagocíticas. La rápida eliminación se puede alivianar mediante la adición de polímeros a la superficie del liposoma, como el poli-etilen-glycol (PEG). Los liposomas-PEG que alcanzan tamaños de 200nm son eliminados más rápidamente que los liposomas-PEG con tamaños cercanos a los 100nm. Por lo tanto, el tamaño óptimo de los liposomas para ser utilizados como sistema de

entrega se encuentra entre 8-100nm cuando se tiene en cuenta el efecto EPR (Chow, et al. 2013). Algunos ejemplo de nanomedicinas comerciales que utilizan liposomas como vehículo son la Doxorubicina (Doxil), Daunorubicina (DaunoXome), Citarabina (DepoCyt), Sulfato de Vincristina (Marquibo), y Mifamurtida (Mepact) (Marchal, et al. 2015).

La efectividad de la actividad biológica de los polifenoles depende de mantener la estabilidad, bioactividad, solubilidad y biodisponibilidad. La encapsulación es una estrategia para aumentar la efectividad de transporte y entrega (Gülseren et al., 2012). Diversos estudios ya han utilizado la encapsulación de polifenoles (aislados o extractos) para aplicaciones anti-tumorales (Gülseren et al., 2012; Hasan et al., 2014; Isailović et al., 2013; Liu et al., 2013; Santos et al., 2012).

2. Objetivo.

Formular un producto de origen natural con potencial aplicación terapéutica, y evidenciar a través de ensayos *in vitro* efectos diferenciales anti-tumorales del mismo.

2.1. Objetivos específicos.

- 1) Obtener y caracterizar un extracto de *Vitis vinífera* de la variedad Tannat.
- 2) Sintetizar y caracterizar un nanosistema liposoma-extracto.
- 3) Detectar un efecto diferencial entre células tumorales y no tumorales del nano-sistema.
- 4) Evaluar el efecto del nanosistema sobre el tipo de muerte celular en una línea celular tumoral.
- 5) Evaluar el efecto del nanosistema sobre la capacidad migratoria de una línea celular tumoral.

3. Materiales y Métodos.

3.1 Preparación de la muestra.

3.1.1 Extracción.

El orujo de uva, utilizado para generar el extracto de uva en este estudio, se obtuvo del viñedo Las Violetas (Canelones) de las Bodegas Carrau. Dicho orujo corresponde a la especie *Vitis*, del género *vinífera* y específicamente a la variedad Tannat de la cosecha del año 2010, y su composición fenólica fue previamente analizada en el Polo Tecnológico de Pando (Miranda, 2014). Se realizó una extracción a partir del orujo de *Vitis vinífera* en solución alcohol: agua en una relación 80:20, sometido a 80°C durante 2 horas en columna de reflujo. Para esto, se pesó 1 gramo del orujo, para preparar 25mL de solución. Luego de las 2 horas, la solución se filtró (con papel filtro) para separar la fracción sólida de la líquida. Se conservó la solución a 4°C y protegida de la luz.

3.1.2 Cuantificación.

La determinación se realizó con la técnica de Folin-Ciocalteu(Rover & Brown, 2013), utilizando para ello una curva de calibración de ácido gálico. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, compuestos que reaccionan con diferentes tipos de agentes reductores de la muestra (polifenoles, azúcares, ácido ascórbico, iones, etc.). Así, el valor informado fue la máxima concentración o el máximo contenido de polifenoles. Se preparó una solución de Na₂CO₃anhidro al 20 % m/V, pesando 4 g y disolviendo en 20mL de agua destilada a ebullición con agitación. En tubos Eppendorf se pipetearon luego 10µL de muestra y se agregaron 790µL de agua destilada y 50µL del reactivo deFolin-Ciocalteu. Se agitó en vórtex y a los 30 segundos se agregaron 150µL de Na₂CO₃. Se calentó luego en baño de agua a 40°C por media hora en la oscuridad y se midió la absorbancia a 765nm contra un blanco de agua destilada.

3.1.3 Preparación de liposomas y encapsulamiento del extracto.

Para la preparación de los liposomas se utilizaron los siguientes componentes: 0,12 gramos de colesterol, 0,6 gramos de fosfatidilcolina y 0,115 gramos de Tween 80. Los mismos se disolvieron en 20mL de cloroformo y 10mL de metanol, teniendo como referencia lo descrito por Schneider (Schneider, et al., 1995). La preparación se sometió a agitación magnética durante unos minutos para lograr una solución homogénea. La misma se colocó en un balón con 10mL del extracto obtenido anteriormente, y se la sometió a una rota-evaporación a 40 °C y con una velocidad de giro= 5.Se comenzó con una presión de 300 mbar y se bajó de a 50 mbar cada vez que se detuvo la condensación. A medida que se evaporaban los solventes, se aumentó la velocidad de giro hasta llegar a un valor de 7 u 8,casi llegando a una presión de 0 mbar, hasta lograr la formación de un film lipídico y total evaporación de los solventes (entre dos y tres horas). El film lipídico se disolvió en un Buffer

salino (1,20 g/L de NaH₂PO₄, 2,23 g/Lde Na₂HPO₄ • 12H² O)pH 6,6 y se agregaron esferillas de vidrio para desprenderlo del balón. Se dejó decantar durante 24 horas, a 4°C y protegido de la luz.

En este punto, el extracto se encuentra encapsulado en liposomas con tamaños micrométricos y con una distribución de tamaños heterogénea. Para lograr una población de liposomas nanométricos y con una distribución homogénea se realizaron dos metodologías diferentes:

<u>Metodología 1.</u>Los liposomas fueron sometidos a altas presiones en homogeneizador C5 Emulsiflex (Avestin, Canadá) en cinco ciclos a 500bar.

<u>Metodología 2.</u> Los liposomas fueron sometidos a sonicado, en sonicador Cole-Parmer UltrasonicHomogenizer 4710 Series, con posterior ultracentrifugación. Para esto, se colocaron 25mL de la muestra (extracto en liposomas) en un tubo falcon de 50mL, el cual fue mantenido en hielo durante todo el proceso, y se realizaron diez pulsos de 10 segundos a 180 W de amplitud. Entre cada pulso se esperaron 30 segundos para no sobrecalentar la muestra. Inmediatamente después se sometió a la muestra a una ultracentrifugación. Las muestras fueron centrifugadas en ultracentrífuga Beckman-Coulter, modelo Optima L-100K en rotor 90 Ti con 76,5mmde radio máximo, durante treinta minutos a 4°C, y a una velocidad de 100000 g.

18

En ambos casos, una vez finalizado el proceso de obtención de liposomas nanométricos, la muestra fue filtrada con filtros estériles 0,22µm en cámara de cultivo, para obtener una muestra estéril y apta para ser utilizada en cultivos celulares.

3.1.4 Caracterización.

El tamaño y la distribución de los liposomas fueron medidos por dispersión dinámica de la luz DLS ("Dynamic Light Scattering")(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK).Los tamaños se expresaron como un promedio ponderado según la intensidad de los picos y el volumen ocupado por las vesículas. Las medidas se realizaron por triplicado, y las mismas se realizaron el día de finalización de la síntesis, y periódicamente a lo largo del tiempo. También fue medido el potencial zeta (mV), el cual indica la estabilidad de una partícula y el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante a la partícula para desestabilizarla. Esta medida muestra el comportamiento del coloide ya que señala cambios en el potencial de superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides (Yoval & Palacios, 2004).

El porcentaje de encapsulamiento para este sistema liposomal se calculó siguiendo el método desarrollado previamente en el Polo tecnológico de Pando(Miranda, 2014). Brevemente, el método se basa en la formación de complejos cloroalumínicos en medio ácido con flavonoides carbonílicos con un grupo OH ubicado en posición 3 o 5. Dicho reconocimiento específico es posible ya que el quelato catecólico es inestable a pH ácido. Se construyó una curva de calibración utilizando crisina como estándar. Se prepararon 5mL de

solución al 2 % m/V de AlCl₃en etanol 95 %. Para ello 0,1809 g de AlCl₃ • 6H² O se disolvieron en 4,92mL de etanol 95 %. Paralelamente se prepararon 20mL de una solución de metanol (1mL) al 5 % V/V en ácido acético glacial (19mL). El metanol se agrega para que actúe como reactivo de corrimiento sobre los flavonoides. En un matraz aforado de 10mL se colocaron las muestras, y 100_{μ} L de solución etanólica de AlCl₃ (en ese orden de agregado). Se esperó entonces que transcurriese 1 minuto para luego enrasar con la mezcla ácido acético/metanol. Se dejó 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 425nm. Para que las medidas del sobrenadante entregaran una absorbancia apreciable, se analizó 1mL del mismo. En el caso de los extractos, el blanco fue la mezcla ácido acético/metanol. Para el sobrenadante, el blanco fue el volumen de sobrenadante a analizar + la mezcla de ácido acético y metanol. Tanto este blanco como la muestra de liposomas, se centrifugaron a 8000 rpm por 10 minutos antes de medir su absorbancia.

3.1.5. Modificación del extracto mediante extracción de los taninos.

Para remover los taninos de la muestra, la misma se filtró por una columna de afinidad Sephadex LH-20(Healthcare, 2006). Para empaquetarla columna se preparó un medio que consistió en 75% de una solución alcohol:agua (en una relación 80:20), y 25% de alcohol 95%. Se pesó 2, 56 gramos de Sephadex LH-20 para 10mL de medio para hinchar, y se dejó hinchar durante cinco horas. Pasado este período de tiempo, el Sephadex se empaquetó en una jeringa de 10mL, la cual contenía en su base fibra de vidrio para mantener retenida la columna. La misma se conservó a 4°C y con medio para hinchar para evitar que se reseque. Al momento de la separación de los taninos se lavó la columna con la solución alcohólica (80:20), y luego se pasó el extracto del orujo de uva. Se fue recolectando la fracción de extracto sin los taninos a medida que se iba agregando la solución alcohólica (80:20), y se dejó de recolectar cuando la solución perdió su color. Los taninos se pueden observar como una banda de color intenso en la columna. Los mismos se desprenden de la columna con acetona, por lo que se realizaron lavados con acetona hasta que no se observara más la banda de color en la columna. Su monitoreo a través de la absorbancia se hace dificultoso debido a la fuerte absorbancia que tiene la acetona (Hagerman, 2002).

3.1.6 Síntesis y caracterización de liposomas con extracto sin taninos

La cuantificación del extracto, síntesis de los liposomas (metodología 1 y 2) y caracterización de los mismos se realizó siguiendo los mismos pasos descriptos en los puntos 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, y 3.1.5.

3.2 Evaluación de la actividad biológica in vitro

3.2.1 Material biológico.

Las líneas celulares que se utilizaron para las evaluaciones *in vitro* fueron, MCF-7 (ATCC) de tumor mamario humano, y BJ (ATCC) fibroblastos de epitelio humano. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en estufa a 37°C con 5% de CO₂, y los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con 100 U/L Penicilina y 100 g/L estreptomicina. En el caso de las MCF-7 el medio utilizado fue DMEM de alta glucosa (4,5 g/L), y en el caso de las BJ el medio utilizado fue DMEM de baja glucosa (1 g/L).

3.2.2 Ensayo de reducción de sal del bromuro de (3-[4,5-dimeil tiazol-2-y1]-2,5 difeniltratazolio (MTT).

Se sembraron entre 10x10⁴ células en placas de 96 pocillos en un volumen de 100µl por pocillos. Se incubó la placa durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% CO₂ para que las células se adhieran al sustrato. Se descartó el medio de cultivo y se agregó medio fresco y se adicionó el extracto. Previamente se realizó un diseño de la placa, determinando los blancos y los valores de las dosis de cada pocillo. El volumen final fue de 100 µl. Se incubó la placa en estufa a 37°C y 5% CO2 durante el tiempo que se desea analizar los efectos de la droga (48 y 72 horas). Transcurrido el período de tratamiento, se descartó el medio de cultivo y se agregó medio fresco con el reactivo MTT. La concentración final fue de 5mg/ml. El MTT se preparó previamente en una solución madre, disolviéndolo el PBS con agitación, y se filtró con filtros 0,2µm para descartar partículas insolubles. Se incubó la placa en estufa a 37°C durante 45-60 minutos, o hasta que se observaron cristales violetas en los pocillos control. Se descartó el medio con el MTT y se agregó 100µl de DMSO (o isopropanol) para disolver los cristales. La lectura de la absorbancia se determinó en un lector de placas (Varioskan) midiendo a 570nm. La absorbancia de los pocillos control se tomó como el 100% de actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa, y se calcularon los porcentajes de actividad de la enzima en las células tratadas según la siguiente fórmula: Abs*100/Abs C, donde Abs es la absorbancia de los tratamientos, y Abs C es la absorbancia del control. Se

realizó un gráfico de % de actividad enzimática en función de la dosis del extracto. Los datos utilizados son el promedio ± desviación estándar (n=3).

3.2.3 Ensayo de viabilidad celular- tinción con Azul de Tripán.

La evaluación de la actividad biológica, del nano-sistema creado, se realizó en células MCF-7 y células BJ mediante tinción con azul de tripán y conteo celular en cámara de Neubauer. Se sembraron 5 x 10⁴ células en placas de seis pocillos y se incubaron durante 24 horas en estufa a 37°C para permitir la adherencia al sustrato de las células. Pasado este tiempo, a todos los pocillos se les realizó cambio de medio (2 mL de volumen final en cada pocillo), y en el caso de los que recibieron tratamientos con el nanosistema, se sembraron dos concentraciones del mismo, 40 µg equivalentes de ácido gálico/mL y 80 µg equivalentes de ácido gálico/mL. Se evaluó el efecto del nano-sistema en las células durante dos períodos de tiempo diferentes, 48 y 72 horas. Al cabo de dichos tiempos, las células fueron decoladas con Tripsina-EDTA termostatizada a 37°C, y resuspendidas en medio de cultivo. Las suspensiones fueron transferidas a tubos de centrífuga y fueron centrifugadas a 800 rpm durante cinco minutos. Se retiró el sobrenadante y se disoció el pellet con 500 µl de medio eliminando acúmulos celulares. Se adicionó 50 µl de Azul de Tripán, y se procedió al conteo celular en cámara de Neubauer. Los datos utilizados son el promedio ± desviación estándar (n=3), y los análisis estadísticos se realizaron empleando el t-test (Past software). En todos los casos, fueron considerados como significativos valores de p< 0.05.

3.2.4. Tinción con 4, 6-diamino-2-fenilindol(DAPI).

Para observar la morfología del núcleo de las células MCF-7 y BJ tratadas con el nanosistema, se procedió a realizar preparados con células fijadas y teñidas con DAPI (Sigma-Aldrich Co.). Para esto, se sembraron 5 x 10³ células de cada línea celular en cubreobjetos dispuestos en placas de seis pocillos y se incubaron durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% de CO2. Transcurrido este tiempo, todos los pocillos recibieron cambio de medio, y los pocillos correspondientes a los tratamientos con el nanosistema recibieron las mismas dosis que en el ensayo anterior (40 y 80 µg equivalentes de ácido gálico/mL). Los tiempos de incubación con el nano-sistema fueron de 48 y 72 horas. Al término de estos tiempos, se retiró el medio de los pocillos y se lavaron las células tres veces con PBS 1X (Buffer fosfato salino), y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3% durante 15 minutos a 4°C. Se volvieron a lavar las células tres veces con PBS 1X y se procedió a la incubación con DAPI 1µg/mL durante diez minutos y protegido de la luz. Se montaron las células sobre porta-objetos colocando una gota de medio de montaje (ProLong Antifade Kit (P7481) de Molecular Probes-Invitrogen). Las muestras fueron visualizadas en el Microscopio Laser Confocal utilizando el láser 405nm, ya que este marcador fluorescente tiene su máximo de absorción a una longitud de onda de 358nm, y su máximo de emisión a461nm.

3.3 Tinción con Anexina V

Una de las características que se pueden detectar en la apoptosis temprana es el cambio de un fosfolípido de a nivel de la membrana citoplasmática. La fosfatidilserina es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, y esta orientación cambia hacia el exterior de la célula cuando la misma entra en proceso de muerte apoptótica. La Anexina V es una molécula con alta afinidad por la fosfatidilserina. Por lo tanto, las células marcadas positivamente con Anexina V son células en procesos de apoptosis (Moreno, Cuéllar, & González, 2000). Para su análisis en microscopio de láser confocal (MLC), se sembraron 10x10⁵ células en placas p35 y se las incubaron en estufa de cultivo durante 24 horas para su adherencia al sustrato. Luego de las 24 horas, se agregó un tratamiento con el extracto (80 µg/ml), y las células fueron incubadas durante 24 horas en estufa a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados, uno con PBS 1X frío, y otro con "binding buffer" frío. El "binding buffer" se lo preparó previamente en una solución 10X con 0.1M Hepes, 1.4M NaCl, and 25 mM CaCl₂ (pH 7.4). A cada muestra se le agregó 10µl de Anexina V en 500µl de binding buffer) y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Las muestras fueron analizadas en MLC utilizando el láser de 488nm, con una longitud de onda de excitación de 495nm y una longitud de onda de emisión de 519nm.

3.4 Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo.

Con el objetivo de detectar alteraciones a nivel del ciclo celular en células tumorales (MCF-7) tratadas con el nano-sistema, se hicieron estudios analizando por citometría de flujo distintos tiempos de tratamiento. Para esto, se sembraron 1 X 10⁵ células en placas p35 y fueron incubadas durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas las 24 horas, se realizaron cambios de medio a las placas con células control (sin tratamiento) y a las placas con tratamientos. A las últimas se les adicionó los tratamientos correspondientes (40 y 80 µg equivalentes de ácido gálico/mL). Las células se mantuvieron en estufa durante 24 y 72 horas. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento correspondiente, las células fueron tratadas con Tripsina/EDTA, neutralizadas con medio de cultivo y en tubos de centrifuga fueron centrifugadas a 800 rpm durante cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X con posterior centrifugación a 800 rpm durante cinco minutos. Una vez más se descartó el sobrenadante y se fijaron las células adicionando al pellet etanol 70% a -20°C. Este procedimiento se realizó mediante goteo y en vórtex para eliminar acúmulos celulares. Los tubos se conservaron a -20°C durante treinta minutos, o hasta el momento del análisis en el citómetro de flujo. Previo al análisis, los tubos fueron nuevamente centrifugados a 1200 rpm durante cinco minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó PBS 1X para eliminar restos de etanol 70%. Se resuspendió activamente el pellet y se centrifugaron los tubos a 1200 rpm durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 500µl de PBS 1X resuspendiendo el pellet para eliminar acúmulos celulares. Esta suspensión celular fue filtrada por malla de 50µm y trasladadas a tubos de citómetro. Las células fueron tratadas con ARNasa (Sigma-Aldrich Co.) (50µg/mL) e loduro de Propidio (Sigma-Aldrich Co.) durante 15 minutos en oscuridad. El citómetro fue ajustado para medición de ADN y se realizó exclusión de dobletes empleando gráficos de FL2-A versus FL2-W. Se midieron por muestra un total de 5000 eventos y se visualizaron las poblaciones en el histograma de FL2-A (cantidad de ADN).Los datos utilizados son el promedio ± desviación estándar (n=2) realizado por duplicado, y los análisis estadísticos se realizaron empleando el t-test (Past software). En todos los casos, fueron considerados como significativos valores de p< 0.05.

3.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Para analizar las propiedades visco-elásticas (rigidez) de las células MCF-7 (tratadas y no tratadas con el nano-sistema) se utilizó el Microscopio de Fuerza Atómica Modelo

Catalystde la compañía Bruker del IIBCE. Las células fueron sembradas en placas de cultivo p35 y permanecieron en estufa a 37°C y 5% de CO2 durante 24 horas. Luego fueron realizados cambios de medio a todas las placas, y en el caso de las placas con tratamientos, se añadió 80 µg equivalentes de ácido gálico/mL del nano-sistema. Los tiempos de tratamiento fueron 24 y 72 horas, para el posterior análisis del módulo elástico aparente mediante curvas de fuerza. Dichas curvas se realizaron en tres puntos diferentes de una célula y se analizaron tres células por preparado (duplicados). Se utilizó un método denominado nano-hendiduras que ya hemos utilizado previamente (Benech et al., 2014). Brevemente, las placas fueron introducidas en el microscopio invertido Nikon que se encuentra acoplado al AFM. Se utilizó una punta de 20-60nm de radio unida a un cantiléver triangular de 200 µm de longitud y una constante de elasticidad de 0,06 N/m (punta de Bruker modelo DNP-10). Para posicionar el cantiliever sobre la superficie celular se utilizaron las magnificaciones 20 X y 40 X (en ese orden), y se realizó una imagen de baja resolución de 200 a 500 nm. La aplicación del software "point and shoot" se utilizó para elegir una serie de puntos sobre la imagen obtenida previamente. En cada uno de estos puntos, se obtuvieron 20 curvas de fuerza con un rango de 6µm/s de indentacióny retracción, totalizando 1000 curvas de fuerza por célula. La fuerza de indentación se calculó utilizando la Ley de Hooke, F= $\kappa\delta$, donde κ es la constante de elasticidad de cantiléver, y δ es medida de deflexión del cantiléver. La constante elástica fue calibrada utilizando la aplicación del software del AFM "termal tune" y fue de 0.067 N/m. La profundidad de indentación h, fue calculada de la diferencia entre los movimientos z del piezoeléctrico.

$F = 2E * h^2 \sqrt{\frac{tg17.5(tg15 + tg25)}{\pi}}$

El módulo elástico aparente (E) fue obtenido de la ecuación que relaciona la fuerza con la indentación para una punta piramidal como descripto por Sirghi L. et al., en donde F= fuerza de indentación, h es la profundidad de indentación de la punta y tg la tangente de los diferentes ángulos presentes en la punta piramidal utilizada (punta de Bruker DNP-10). Se construyó un histograma normalizado del módulo elástico aparente (E). Los análisis estadísticos se realizaron empleando el t-test. En todos los casos, fueron considerados como significativos valores de p< 0.05.

25

3.6 Ensayo de migración.

Con el objetivo de estudiar la migración celular, se realizó el ensayo de migración, el cual consiste en observar el comportamiento de una monocapa confluente de células a la que se le realizó una brecha o "herida". Se sembraron 1 X 10⁵ células (MCF-7) en placas de seis pocillos y se las mantuvo en estufa durante 24 horas. Luego de las 24 horas, se les realizó cambio de medio, y se agregó 40 µg equivalentes de ácido gálico/mL a los pocillos que correspondían a las células tratadas. Se dejaron las placas durante 48 horas en estufa a 37°C y 5% de CO_{2.} Transcurrido el período de incubación se procedió a realizar la "herida" con una punta estéril amarilla (Pipeta 200µl). Posteriormente, se realizaron cambios de medio para eliminar las células no adheridas. El día en que se realizó la herida correspondió al tiempo "cero", y se procedió a observar las placas a tiempos sucesivos (24, 48, y 72 horas). El análisis del comportamiento celular consistió en, visualizar mediante microscopía óptica el desplazamiento de las células en la "herida" a los distintos tiempos. Se tomaron imágenes a través de la cámara de fotos (Micrometrics LE software Informer 1.0.3) y mediante el uso del software se realizaron medidas de distancias (en mm²) entre las células separadas por la "herida". Se consideraron tres campos por cada "herida", y dos "heridas" por pocillo. Los datos utilizados son el promedio ± desviación estándar (n=3), y los análisis estadísticos se realizaron empleando el t-test (Past software). En todos los casos, fueron considerados como significativos valores de p< 0.05.

4 Resultados.

4.1.1. Extracción y cuantificación.

Se obtuvieron 25mL de un extracto de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat en solución alcohólica. La cuantificación a través del método de Folin-Ciocalteu dio como resultado 2,22 \pm 0,27 g equivalentes de ácido gálico/ L (siempre que se refiera a la concentración del extracto se determinará como g/L o µg/mL, siendo los gramos referidos a los equivalentes de ácido gálico).

4.1.2. Síntesis de liposomas, encapsulamiento del extracto y caracterización.

En este punto, lo liposomas fueron preparados siguiendo la metodología 1, dispuesta en la sección de materiales y métodos, punto 3.1.3. El porcentaje de encapsulamiento, siguiendo el punto 3.1.4. fue de 47,54 ± 3,32 %. Se realizaron medidas de DLS para obtener perfiles de distribución de tamaños (Figura 1). Las medidas fueron realizadas por triplicado en cada síntesis.



Figura 1. Distribución de tamaños (eje x) por intensidad de absorbancia (eje Y). Se muestran los tamaños liposomales en nm, y su perfil de distribución. Los tamaños se expresaron como un promedio ponderado según la intensidad de los picos y el volumen ocupado por las vesículas Distribución representativa correspondiente al día de la síntesis.

Se obtuvieron valores de tamaños y se realizó un seguimiento en el tiempo del comportamiento poblacional. El día de la síntesis, los liposomas se vieron distribuidos en dos poblaciones, y al cabo de once días los liposomas llegaron a tener una distribución de tres poblaciones (Figura 2). Los valores de PDI (índice de poli-dispersión-indica que tan dispersa es la población con respecto a los tamaños) también fueron seguidos en el tiempo, y los mismos fueron en aumento llegando en promedio a 0,487 ± 0,02 al cabo de once días (Figura 3). Una población de nanopartículas con un buen índice de poli-dispersión debe de tener valores PDI<0,3.



Figura 2. Seguimiento de tamaños (nm) en el tiempo.



Figura 3. Seguimiento del PDI (índice de poli-dispersión) de la población liposomal en el tiempo.

4.1.3. Modificación del extracto mediante extracción de los taninos.

Se realizó una cromatografía por afinidad, a partir del extracto obtenido anteriormente, una extracción de la fracción tanina utilizando una columna de sefarosa Sephadex LH20. La misma se une específicamente a los taninos, y no a otros componentes del extracto. Al nuevo extracto se lo cuantificó utilizando los mismos procedimientos que anteriormente, y dio como resultado un valor de 0,395 \pm 0,035 g/L.

4.1.4. Síntesis de liposomas, encapsulamiento del extracto y caracterización.

En este punto, lo liposomas fueron preparados siguiendo tanto la metodología 1 como la 2, dispuesta en la sección de materiales y métodos, punto 3.1.3. El porcentaje de encapsulamiento, siguiendo el punto 3.1.4. fue de 72,73 +- 6,32 %. Se realizaron medidas de DLS para obtener perfiles de distribución de tamaños (Figura 4). Las medidas fueron realizadas por triplicado en cada síntesis y se realizó un seguimiento de las medidas de tamaño, PDI y potencial z a lo largo de tres meses(Figuras 5-6-7).



Figura 4. . Distribución de tamaños (eje x) por intensidad de absorbancia (eje Y). Se muestran los tamaños liposomales en nm, y su perfil de distribución. Los tamaños se expresaron como un promedio ponderado según la intensidad de los picos y el volumen ocupado por las vesículas Distribución representativa correspondiente al día de la síntesis.



Figura 5. Seguimiento de los tamaños de los liposomas en el tiempo.



Figura 6. Seguimiento PDI



Figura 7. Seguimiento del potencial zeta liposomas en el tiempo.

4.2.1Ensayo de reducción de sal del bromuro de (3-[4,5-dimeil tiazol-2-y1]-2,5 difeniltratazolio (MTT).

Se realizó el ensayo de viabilidad celular por evaluación de la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en dos líneas celulares, una línea no tumoral de fibroblasto humano (BJ) (Fig. 8), y una línea tumoral de tumor mamario humano (MCF-7) (Fig. 9). En ambos casos se evaluaron los efectos del extracto encapsulado a las 48 y 72 horas de tratamiento.



Figura 8. Gráfico del nivel de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa por reducción de MTT en la línea celular BJ. Se muestran los resultados a las 48 y 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. La absorbancia del control se la tomo como el 100%. Las diferencia significativas (p<0,05, t-test) fueron establecidas entre tratamientos correspondientes al mismo tiempo analizado. *diferencia con respecto a la dosis de 10µg/ml, ** diferencia con respecto a la dosis 40µg/ml.



Figura 9. Gráfico del nivel de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa por reducción de MTT en la línea celular MCF-7. Se muestran los resultados a las 48 y 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. La absorbancia del control se la tomo como el 100%. Las diferencia significativas (p<0,05, t-test) fueron establecidas entre tratamientos correspondientes al mismo tiempo analizado. *diferencia con respecto a la dosis de 10µg/ml, ** diferencia con respecto a la dosis 40µg/ml.

4.2.2 Viabilidad y conteo celular con Azul de Tripán.

Se realizó el ensayo de viabilidad y número celular por conteo celular en cámara de Neubauer tiñendo las células con azul de Tripán. Se evaluaron la línea celular no tumoral de fibroblasto humano (BJ) (Fig. 10-11), y la línea tumoral de tumor mamario humano (MCF-7) (Fig. 12-13). En ambos casos se evaluaron los efectos del extracto encapsulado a las 48 y 72 horas de tratamiento. Se tomaron imágenes de microscopía óptica, en microscopio invertido, de ambas líneas celulares, tratadas y no tratadas (Fig. 14).



Figura 10. Gráfico de viabilidad de la línea celular BJ mediante conteo celular en cámara de Neubauer. No se observaron diferencias significativas en los tiempos y dosis analizadas (diferencia significativa p<0,05).



Figura 11. Gráfico de número celular en porcentaje con respecto al control en la linea BJ. * diferenciasignificativa con respecto al control, ** diferencia significativa con respecto a la dosis $40\mu g/ml$, p<0,05.



Figura 12. Gráfico de viabilidad de la línea celular MCF-7 mediante conteo celular en cámara de Neubauer. No se observaron diferencias significativas en los tiempos y dosis analizadas (diferencia significativa p<0,05).



Figura 13. Gráfico de número celular en porcentaje con respecto al control en la linea celular MCF-7. * diferenciasignificativa con respecto al control, ** diferencia significativa con respecto a la dosis 40μ g/ml, p<0,05.



Figura 14. Imágenes de microscopía óptica (10X). **A-B** son imágenes de la línea celular tumoral MCF-7, **C-D** son imágenes de la línea celular BJ. **A y C** son células controles (sin tratamiento), **B y D** son células tratadas durante 48 horas con el extracto encapsulado (40 µg/ml). Las células MCF-7 experimentaron cambios en la morfología de membrana y pérdida de contactos entre células, mientras que en las células BJ no se detectan dichos cambios.

4.3.1. Tinción DAPI

Se realizaron tinciones con el marcador fluorescente DAPI en las líneas celulares BJ (Fig. 15-16) y MCF-7 (Fig. 17-18). Se evaluaron las dosis 40 y 80 µg/ml del extracto encapsulado a los tiempos 48 y 72 horas. Se tomaron imágenes con microscopía láser confocal a una longitud de onda de 488nm. Los núcleos de las células BJ tratadas con el extracto liposomalno presentaron cambios morfológicos en comparación con las células sin tratar. En el caso de las células MCF-7 se detectaron condensaciones a nivel de la cromatina y fragmentación nuclear, en las células tratadas en comparación con las células control (sin tratar).



Figura 15. Imágenes de microscopía laser confocal magnificación 40X. Se realizó una tinción con DAPI en la línea celular BJ a las48 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. A células control (sin tratamiento), B células tratadas con 40µg/ml de extracto encapsulado. En la figura C se realizó un zoom digital. No se observaron cambios morfológicos a nivel nuclear de las células tratadas en comparación con las células control.



Figura 16. Imágenes de microscopía laser confocal magnificación 40X. Se realizó una tinción con DAPI en la línea celular BJ a las 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. **A** células control (sin tratamiento), **B** células tratadas con 40µg/ml de extracto encapsulado, y **C** células tratadas con 80µg/ml de extracto encapsulado. No se observaron cambios morfológicos a nivel nuclear de las células tratadas en comparación con las células control.



Figura 17. Imágenes de microscopía laser confocal magnificación 40X. Se realizó una tinción con DAPI en la línea celularMCF-7 a las 48 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. A células control (sin tratamiento), **B** células tratadas con 40µg/ml de extracto encapsulado, y **C** células tratadas con 80µg/ml de extracto encapsulado. Se detectaron fragmentaciones nucleares (indicadas con las flechas).



Figura 18. Imágenes de microscopía laser confocal magnificación 40X. Se realizó una tinción con DAPI en la línea celularMCF-7 a las 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. A células control (sin tratamiento), **B** células tratadas con 40µg/ml de extracto encapsulado, y **C** células tratadas con 80µg/ml de extracto encapsulado (magnificación 100x). Se visualizaron condensaciones cromatínicasperinucleares (B) y fragmentación nuclear (C).

4.3.2. Tinción con Anexina V

Para analizar el tipo de muerte celular provocada por el tratamiento con el extracto encapsulado, se utilizó el marcador de apoptosis Anexina V, que se une al fosfolípido de membrana fosfatidilserina. Se tomaron imágenes con microscopía láser confocal utilizando el filtro de fluorescencia verde, a las 24 horas de tratamiento con el extracto encapsulado (80µg/ml). Tanto en las células control como las tratadas se detectó marca fluorescente (Fig. 20), aunque con un patrón diferente.



Figura 20. Imágenes de microscopía láser confocal magnificación 40X. Se realizó una tinción con Anexina V en la línea celularMCF-7 a las 24 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. **A** células control (sin tratamiento), **B** células tratadas con 80μg/ml de extracto encapsulado. La señal fue positiva para ambos casos.

4.4.1 Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo.

Se analizaron los perfiles de ciclo celular en las células MCF-7 tratadas (extracto encapsulado) y no tratadas mediante análisis en citómetro de flujo (Fig. 21). El análisis se realizó a las 72 horas de tratamiento, y se analizaron cada una de las fases del ciclo celular (SubG1, G1, S, G2M) comparando los niveles en porcentajes celulares en cada una de ellas (Fig. 22). Se detectó un aumento en el pico SubG1 de las células tratadas con el extracto. Este fase del ciclo corresponde a restos celulares y cuerpos apoptóticos.



Figura 21. Histogramas del perfil del ciclo celular en la línea celular MCF-7 a las 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. A células control (sin tratamiento), B células tratadas con 40µg/ml de extracto encapsulado, y C células tratadas con 80µg/ml de extracto encapsulado. M5 corresponde a la fase SubG1, M1 a la fase G1, M2 a las fases SG2M, M3 a la fase S y M4 a la fase G2M.



Figura 22. Gráfico del porcentaje celular en cada una de las fases del ciclo celular en la línea celular MCF-7 a las 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. Las células tratadas con 40 µg/ml, todas las fases del ciclo presentaron diferencia significativa con respecto a las células control. Las células tratadas con 80µg/ml, las fases G1 y S presentaron una diferencia significativa con respecto al control. Diferencia significativa p<0,05.

4.5.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Se realizaron análisis de elasticidad celular en células tumorales MCF-7, tratadas y no tratadas con el extracto encapsulado (Fig. 23). Los tiempos analizados fueron a las 24 y 72 horas de tratamiento, y la dosis utilizada fue de 80 µg/ml.No se encontraron diferencias significativas al analizar los valores de los módulos elásticos celulares (tabla 2).

Tabla 2. Valores de los módulos elásticos en kilo Pascales (kPa) de las células tratadas y no tratadas con el extracto encapsulado, a los dos tiempos analizados.

24 horas	Control	Tratadas (80µg/ml)
	16.5 +- 6.6 kPa	19.7+-6.8 kPa
72 horas	20.6+-7.6 kPa	15.2+-6.5 kPa



Figura 23. Histograma de la frecuencia relativa en función del módulo elástico aparente (E) en la línea celular MCF-7 determinado por Microscopía de Fuerza Atómica. **A** células con 24 horas de tratamiento, **B** células con 72 horas de tratamiento con el extracto encapsulado. Las células fueron tratadas con 80μ g/ml de extracto encapsulado. No se determinaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. Diferencia significativa p<0,05.

4.5.2 Ensayo de migración celular.

El ensayo de migración celular, o "ensayo de la herida" se realizó sobre células, de la línea celular tumoral MCF-7, tratadas y no tratadas (controles). El tratamiento fue de 24 horas y las dosis analizadas fueron de 40 y 80 µg/ml. Fueron tomadas imágenes de microscopía óptica invertida durante cuatro tiempos (0- 6- 24- 30 horas) siguiendo la progresión de la migración de las células (Fig. 24). Se midieron las áreas que separaban a las dos poblaciones celulares generadas en la herida hecha en la placa a los diferentes tiempos y dosis estudiadas (Fig. 25).





Figura 25. Gráfico del área en porcentajes de la migración celular en células MCF-7 tratadas y no tratadas con el extracto encapsulado. Las células tratadas con 40 µg/ml del extracto encapsulado no presentaron diferencias significativas con respecto al control. Las células tratadas con 80 µg/ml del extracto encapsulado presentaron diferencias significativas a las 24 y 30 horas con respecto al control. Diferencia significativa p<0,1.

5 Discusión

5.1. Síntesis y caracterización del nanosistema.

Los liposomas son un sistema ampliamente utilizado como vehículos nanotecnológicos para transportar drogas o agentes terapéuticos, tanto en el área de la investigación así como también en productos que ya se encuentran en uso clínico para tratar el cáncer. En este sentido encontramos comercialmente distintas drogas antitumorales encapsuladas en liposomas, entre ellas se encuentran laDoxorubicina (Doxil), Daunorubicina (DaunoXome), Citarabina (DepoCyt), Sulfato de Vincristina (Marquibo), y Mifamurtida (Mepact)(Marchal et al., 2015). Los liposomas se puede utilizar para encapsular tanto drogas hidrofóbicas, atrapadas en la bicapa lipídica, como también drogas hidrofílicas en su cavidad acuosa(Ehmann et al., 2013). Por esta razón elegimos este sistema de entrega ya que partimos de un extracto con componentes tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, y porque además es una formulación ya muy estudiada y utilizada con fines terapéuticos por su biocompatibilidad y bioseguridad.En las primeras síntesis de los liposomas con el extracto encapsulado, obtuvimos liposomas inestables y sin una distribución poblacional adecuada, es decir que presentaban poblaciones de tamaños dispersas y variables en el tiempo (Figura 1). Como hipótesis nos planteamos que el problema era algún componente del extracto que no permitía que los liposomas fueran estables. En particular, los taninos son compuestos que tienden a asociarse entre sí y formar grandes complejos taninos-taninos (Olchowik-Grabarek et al., 2014). Este comportamiento podría estar dándose de tal forma que desestabiliza a los liposomas, haciendo que los mismos cambien su estructura de membrana (ya que los taninos podrían estar asociados a los lípidos de la membrana) o hasta se asocien entre sí debido a las interacciones de los taninos de un liposoma con los taninos de otro. Por esta razón decidimos extraerlos del extracto y trabajar con un extracto libre de taninos, ya que además su propiedad principal es anti-bacterial y no tanto anti-tumoral. Se logró mediante una cromatografía por afinidad dicho objetivo, y los nuevos liposomas presentaron un comportamiento diferente. Se obtuvo una población homogénea y con un buen valor de dispersión (PDI<0,3), y con un valor de potencial zeta cercano a los -10mV. Se le realizó un seguimiento en el tiempo de la muestra de liposomas con el extracto sin taninos, y durante tres meses se logró una muestra estable, la cual no presentó cambios en su comportamiento poblacional. Sin embargo, se vio que con el tiempo el valor del potencial zeta fue en disminución, volviéndose cada vez más negativo. Esto podría deberse a que los compuestos que se asocian a la membrana lipídica del liposoma, si bien son compuestos hidrofóbicos, pueden presentar una región con carga (en este caso negativa), dándose así un "flip-flop" donde el compuesto expone hacia el exterior su región cargada. Así como también se podría considerar la posibilidad de que compuestos que no lograron ser encapsulados, y por lo tanto se presentan en solución, logren asociarse a la superficie del liposoma. De esta manera la carga externa del propio liposoma podría sufrir modificaciones con el tiempo.

5.2. Análisis de la actividad antitumoral diferencial.

Una vez obtenido el sistema de entrega estable y con el extracto encapsulado, se procedieron a los ensayos biológicos *in vitro*. Se comenzó con una primer etapa en la cual se trabajó con dos líneas celulares, una línea tumoral humana MCF-7 (carcinoma mamario), y

una línea no tumoral humana BJ (fibroblasto) como línea celular control. Para evaluar cómo se veía afectada la viabilidad celular en las dos líneas celulares tratadas con diferentes dosis del extracto encapsulado, se eligió como metodología el ensayo de reducción de sales de tetrazolio MTT. En el caso de la línea celular BJ, todas las dosis analizadas dieron como resultado una mayor reducción de las sales (figura 8), en relación con las células control en los dos tiempos analizados (48 y 72 horas de tratamiento). Por otro lado, resultados similares se obtuvieron con la línea celular MCF-7, incluso llegando a tener en las células tratadas valores de actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa muy por encima de los valores de las células control (el control equivale al 100%, tratamientos llegaron a valores superiores al 140%), también en ambos tiempos analizados (figura 9). En primera instancia esto se puede interpretar como un aumento o estímulo en la proliferación por parte del tratamiento en las células tumorales.

Se procedió con un segundo ensayo para evaluar la viabilidad de las líneas celulares al recibir tratamientos con el extracto encapsulado. El mismo fue a través de conteo celular en cámara de Neubauer y tinción con azul de Tripán. En este caso seevaluaron, en los tiempos 48 y 72 horas, dos parámetros distintos: la viabilidad mediante la fórmula (número de células vivas/número de células totales)*100, y por otro lado el número celular total en cada condición siguiendo la fórmula (n° celular*10000/n°cuadrantes*dilución). En el caso de las células BJ, la viabilidad celular no tuvo diferencias significativas a los tiempos y dosis analizadas (figura 10). En el caso del análisis del conteo celular, el número de células no se vio afectada a las 48 horas de tratamiento, pero a las 72 horas si se registró un descenso significativo del número celular con la dosis de 80µg/ml (figura 11). En el caso de las células MCF-7, la viabilidad celular tampoco presentó diferencias significativas en las dosis y tiempos analizados (figura 12). Sin embargo, los resultados de número celular fueron diferentes, donde a las 48 horas ya se registró una diferencia significativa en ambas dosis. Lo mismo se vio a las 72 horas, con una diferencia aún más marcada donde las células tratadas con 80µg/ml contaban con valores inferiores al 50% en cuanto a número celular (figura 13). Si consideramos que las células MCF-7 control proliferaron (y por lo tanto aumentaron su número celular), las células tratadas si bien cuentan con altos porcentajes de viabilidad, no proliferaron al ritmo de las células control. Consideremos que el azul de Tripán es un colorante que solo entra a las células cuando las mismas presentan su membrana celular dañada.

Por lo tanto las células tumorales presentaron una membrana celular íntegra pero no proliferaron normalmente, mientras que las células no tumorales presentaron la membrana celular íntegra y una proliferación normal (en relación al control) excepto con la dosis más alta a 72 horas.

Las células MCF-7 a las 48 y 72 horas de tratamiento presentaban un significativo aumento de la actividad mitocondrial. Es bien sabido que la muerte celular por apoptosis es un proceso en el cual la integridad de la membrana se mantiene aunque cambia su simetría y las células tienden a perder las interacciones intercelulares (Moreno et al., 2000). Estás características se hicieron evidentes en la figura **14** de microscopía óptica en la línea celular MCF-7, donde las células no formaron una monocapa con interacciones célula-célula definidas y la forma celular es ligeramente diferente.

Para seguir buscando evidencias del efecto del extracto sobre las células tumorales y determinar tipo de muerte celular, se procedió a analizar los núcleos mediante tinción DAPI. En esta instancia se buscó evidenciar que las células tumorales estaban pasando por algún tipo de proceso que las células BJ no lo sufrían. El resultado fue que en los tiempos analizados (48 y 72 horas) y con las dosis utilizadas (40 y 80µg/ml) las células MCF-7 presentaban condensaciones en la cromatina, y se logró visualizar fragmentaciones a nivel nuclear. Estos fenómenos no fueron evidenciados en las células BJ. Si tomamos en cuenta estos resultados con los resultados de los ensayos anteriores (MTT/Azul de Tripán), se puede concluir en primera instancia que se produjo un efecto diferencial por parte del extracto encapsulado, en el cual las células BJ no cambiaron su morfología celular ni nuclear, y su estado proliferativo fue alterado únicamente a las 72 horas recibiendo un tratamiento con dosis elevada. Por contraparte, las células tumorales si cambiaron su morfología celular y nuclear al recibir los tratamientos, y su estado proliferativo se vio afectado, aunque los resultados del ensayo con MTT fueron contradictorios. En este sentido podemos plantear dos posibilidades: 1) que el ensayo de MTT dio falsos positivos por una reacción inespecífica del reactivo, o 2) que la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en estas células sí se vio aumentada pero sin corresponder a un aumento en la proliferación celular. Teniendo en cuenta la segunda posibilidad, está reportado que las células en procesos apoptóticos despliegan rutas que incrementan activamente procesos mitocondriales y energéticos (Escobar et al., 2010). Se puede decir entonces que el ensayo de MTT no se adecuó en este estudio para la detección de muerte celular por apoptosis en estadios tempranos, donde la membrana celular no ha perdido su integridad, y se detecta alta actividad de las deshidrogenasas mitocondriales.

5.3. Estudios por Microscopía para determinar tipo de muerte celular.

Como segunda etapa en la experimentación *in vitro* se procedió a utilizar una tinción con el fluoróforo Anexina V-Fluor 488 para detectar la muerte celular por apoptosis en las células tumorales. Sin embargo en la marcación con Anexina V los resultados fueron llamativos, ya que si bien en las células tratadas se vio marcación positiva para la Anexina V (y esto indica un estadio temprano de la apoptosis), en las células no tratadas también se vio dicha marcación (Fig. 20). Si analizamos las imágenes, se puede ver una diferencia en el patrón de marcación, donde las células tratadas se marcan de forma más intensa y granular comparadas con las células control. Existen reportes que indican que las técnicas con Anexina V pueden dar resultados inconclusos, ya que podrían existir líneas celulares "sensibles" o "resistentes" a la marca de Anexina V (Dicker et al., 2005), siendo posible que la línea celular MCF-7 presente una marcación inespecífica.

5.4. Análisis del ciclo celular.

Con el objetivo de detectar alteraciones a nivel del ciclo celular, se realizaron estudios mediante citometría de flujo. Se observaron cambios en el perfil del ciclo celular representando diferencias significativas en las células tratadas con el extracto encapsulado. La fase G1 (fase de síntesis proteica o crecimiento celular) sufrió una disminución, mientras que la fase subG1, la cual representa restos celulares y cuerpos apoptóticos, se vio aumentada. Si bien los resultados obtenidos de las células tratadas demuestran un cambio significativo en porcentajes celulares correspondientes a la fase G1 en comparado con las células control, no se vio una detención del ciclo celular. Esto se debe a que la disminución vista en la fase G1 de las células tratadas corresponde al aumento de la fase subG1, indicando la presencia de cuerpos apoptóticos o restos celulares. Por lo tanto, el ciclo celular en sí no se altera debido al tratamiento, sino que disminuye el número de células que se presentan transitando el ciclo celular normal. Si comparamos estas evidencias con los estudios anteriores se correlacionan ya que las células tratadas no aumentan su

proliferación (ensayo azul de tripán) y se detectó muerte celular por apoptosis también por microscopía (DAPI).

5.5. Estudio de la elasticidad celular y poder migratorio.

Como última etapa se quiso observar cómo se veía afectada la elasticidad celular y la migración celular, y si existía una relación entre ambas características. Para determinar una alteración en la elasticidad de la membrana se utilizó la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los valores de elasticidad en las células tratadas en comparación con las células control en ninguno de los tiempos analizados. Sin embargo en el ensayo de migración celular sí se vieron diferencias significativas. Las células tratadas una la dosis de $80\mu g/ml$ migraron menos que las células control de manera significativa. Las células tratadas con $40\mu g/ml$ también migraron menos pero no de manera significativa (p<0,1). En conjunto, el tratamiento logró afectar la capacidad de "movimiento" de las células ya en las primeras horas de recibir la dosis, aunque la elasticidad de la membrana no se vio afectada.

6 Conclusión

En este proyecto se logró generar un producto nanotecnológico estable con fines terapéuticos, utilizando nanopartículas biocompatibles como son los liposomas y agentes terapéuticos de origen natural. Evaluando sobre dos líneas celulares, una tumoral (MCF-7) y una no tumoral (BJ), se evidenció en primera instancia un efecto diferencial a nivel *in vitro*. Las células tumorales alteran su comportamiento y morfología, mientras que las células no tumorales no se vieron afectadas a los tiempos y dosis analizadas. El tipo de muerte celular en las células MCF-7 podría ser por apoptosis, detectándose condensación de la cromatina y fragmentación nuclear mediante técnicas de microscopía confocal. Esto además se evidenció también mediante la detección del aumento del pico SubG1 en los perfiles de ciclo celular. Si bien las células tumorales tratadas no presentaron cambios a nivel de la elasticidad de membrana celular, la migración de las mismas sí se vio alterada al recibir dosis altas del tratamiento. Por lo tanto, el producto generado en este trabajo demostró una posible actividad anti-tumoral en la línea celular MCF-7 de carcinoma mamario humano, posiblemente induciendo vías apoptóticas como tipo de muerte celular. Esto es importante ya que es una forma controlada de muerte celular y no toxica para el organismo.

7 Perspectivas

Este proyecto está en sus etapas iniciales, donde se buscó probar un compuesto de origen natural de una planta que se presente en abundancia en el territorio nacional. Se utilizó la nanotecnología para mejorar su estabilidad y sistema de entrega. En primera instancia, se llegaron a cumplir los objetivos planteados. Como perspectiva planteamos seguir los estudios ampliando los datos ya obtenidos en otras líneas celulares, tanto tumorales como no tumorales para poder reafirmar los efectos diferenciales, ya que, si bien se detectó un efecto anti-tumoral, se utilizó una única línea celular lo cual es escaso. Por otro lado, los estudios a nivel molecular, por ejemplo sobre-expresión de proto-oncogenes, también son necesarios para conocer mejor los mecanismos de acción de los compuestos. Plantearse blancos moleculares y vías de señalización que puedan estar siendo afectadas y estudiarlas. Y como próxima instancia, diseñar experimentos *in vivo*, y para lo cual los liposomas deben de ser funcionalizados, por ejemplo con poli-etilenglicol (PEG). Si bien se esperan seguir observando efectos anti-tumorales en futuros estudios, este sistema podría ser utilizado en tratamientos combinados, y no de forma exclusiva, en el momento de realizar estudios in vivo. Evaluar los efectos sinérgicos con otras drogas quimioterapéuticas, o bien efectos de "sensibilización" donde se aplicaría el tratamiento con el extracto encapsulado previo a un tratamiento convencional.

8 Referencias.

Alaoui - Jamali, M. (2010). Alternative and complementary therapies for cancer.

- Barrajón-catalán, E., Herranz-lópez, M., Joven, J., Segura-carretero, A., Alonso-, C., Menéndez, J. A., & Micol, V. (2014). Molecular Promiscuity of Plant Polyphenols in the Management of Age-Related Diseases
 Atlear Beyond their an *Exp Med Biol*. doi:10.1007/978-3-319-07320-0
- Barron, C. C., Moore, J., Tsakiridis, T., Pickering, G., & Tsiani, E. (2014). Inhibition of human lung cancer cell proliferation and survival by wine. *Cancer Cell International*, 1–13.
- Benech, J. C., Benech, N., Zambrana, A. I., Rauschert, I., Bervejillo, V., Oddone, N., & Damián, J. P. (2014). Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 910–919. doi:10.1152/ajpcell.00192.2013
- Berdowska, I., Zieliński, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., & Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chemistry*, 141(2), 1313–21. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.090
- Bracesco, N., Salvo, V. A., Rocha, S., Dell, M., Carrau, F., & Nunes, E. (2007). Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (Vitis vinifera L. Cv. Tannat) en Saccharomyces cerevisiae. *Revista Argentina de Microbiología*, 4–10.
- Castillo-Pichardo, L., Cubano, L. a, & Dharmawardhane, S. (2013). Dietary grape polyphenol resveratrol increases mammary tumor growth and metastasis in immunocompromised mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(1), 6. doi:10.1186/1472-6882-13-6
- Choueiri, L., Sanda, V., Calokerinos, A., & Kefalas, P. (2012). Antioxidant / pro-oxidant properties of model phenolic compounds . Part II at different molar ratios by chemiluminescence and LC – MS. *Food Chemistry*, *133*(3), 1039–1044. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.057
- Chow, E. K.-H., & Ho, D. (2013). Cancer nanomedicine: from drug delivery to imaging. Science Translational Medicine, 5(216), 216rv4. doi:10.1126/scitranslmed.3005872
- Dicker, D. T., Kim, S. H., Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Heterogeneity in non-invasive detection of apoptosis among human tumor cell lines using annexin-V tagged with EGFP or Qdot-705. *Cancer Biology and Therapy*, 4(9), 1014–1017. doi:10.4161/cbt.4.9.2150
- Ehmann, F., Sakai-Kato, K., Duncan, R., Hernán Pérez de la Ossa, D., Pita, R., Vidal, J.-M.,Amati, M. P. (2013). Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulatorsinitiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine*

(London, England), 8(5), 849-56. doi:10.2217/nnm.13.68

- Escobar M, L., & Aristizábal G, F. a. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, *17*(2), 173–180.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. a. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, *68*(22-24), 2986–3008. doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.014
- Folmer, F., Basavaraju, U., & Á, A. Á. A. Á. B. (2013). Anticancer effects of bioactive berry compounds. doi:10.1007/s11101-013-9319-z

Frutos, E. De. (2004). Uruguay, país del tannat. ACE, Revista de Enología.

- Gülseren, İ., Guri, A., & Corredig, M. (2012). Encapsulation of Tea Polyphenols in Nanoliposomes Prepared with Milk Phospholipids and Their Effect on the Viability of HT-29 Human Carcinoma Cells. *Food Digestion*, 3(1-3), 36–45. doi:10.1007/s13228-012-0019-8
- Gupta, Subash C., Ji Hye Kim, Sahdeo Prasad, B. B. A. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflamatory pathways by nutraceuticals. *NIH-PA Uthor Manuscript*, *29*(3), 405–434. doi:10.1007/s10555-010-9235-2.Regulation

Hagerman, A. E. (2002). Separation of Tannin from Non - tannin Phenolics.

 Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., ... Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1-2), 519–528. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.12.007

Healthcare, G. E. (2006). Sephadex LH-20. GE Healthcare.

- Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. a., & Bugarski, B. M. (2013). Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *19*, 181–189. doi:10.1016/j.ifset.2013.03.006
- Iswaldi, I., Arráez-Román, D., Rodríguez-Medina, I., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (Aspalathus linearis) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400(10), 3643–54. doi:10.1007/s00216-011-4998-z
- Jacquemin, G., Shirley, S., & Micheau, O. (2010). Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 267(108); 3115–30. doi:10.1007/s00018-010-0407-6

- Joven, J., Rull, a, Rodriguez-Gallego, E., Camps, J., Riera-Borrull, M., Hernández-Aguilera, a, ... Menéndez, J. a. (2013). Multifunctional targets of dietary polyphenols in disease: a case for the chemokine network and energy metabolism. *Food and Chemical Toxicology Research Association*, 51, 267–79. doi:10.1016/j.fct.2012.10.004
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release D: Official Journal of the Controlled Release Society*, *161*(2), 175–87. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.063
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., & Amendola, V. (2006). *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects* (Vol. 661).
- Lekka, M., Pogoda, K., Gostek, J., Klymenko, O., Prauzner-Bechcicki, S., Wiltowska-Zuber, J., ... Stachura, Z. (2012). Cancer cell recognition - Mechanical phenotype. *Micron*, 43(12), 1259–1266. doi:10.1016/j.micron.2012.01.019
- Li, T., Zhu, J., Guo, L., Shi, X., Liu, Y., & Yang, X. (2013). Differential effects of polyphenolsenriched extracts from hawthorn fruit peels and fleshes on cell cycle and apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Food Chemistry*, 141(2), 1008–18. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.050
- Li, W., Wu, J., & Tu, Y. (2010). Synergistic effects of tea polyphenols and ascorbic acid on human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 11(6), 458–64. doi:10.1631/jzus.B0900355
- Lim, T. K. (2013). Vitis vinifera. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (Vol. 6, pp. 450–489). doi:10.1007/978-94-007-5628-1
- Liu, L., Sun, L., Wu, Q., Guo, W., Li, L., Chen, Y., ... Wei, Y. (2013). Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 443(1-2), 175–182. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.12.032
- Marchal, S., Hor, A. El, Millard, M., Gillon, V., & Bezdetnaya, L. (2015). Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics. *Drugs*. doi:10.1007/s40265-015-0453-3
- Miranda, P. (2014). *Desarrollo y caracterización de un producto antiinflamatorio en base a liposomas de orujo de uvas*. Centro NanoMat del Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República. Tesis.
- Moreno, E. A., Cuéllar, C. G., & González, A. D. (2000). Métodos de detección de apoptosis: Aplicaciones Y Limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)*, *46*(4), 275–280.

- Müller, L. K., & Landfester, K. (2015). Natural liposomes and synthetic polymeric structures for biomedical applications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.088
- Mustafa, V., & Hasan, A. Æ. (2007). Anti-Oxidants from Green Tea and Pomegranate for Chemoprevention of Prostate Cancer. *Mol. Biotechnol*, 52–57. doi:10.1007/s12033-007-0047-8
- Olchowik-Grabarek, E., Swiecicka, I., Andreeva-Kovaleskaya, Z., Solonin, A., Bonarska-Kujawa, D., Kleszczyńska, H., ... Zamaraeva, M. (2014). Role of Structural Changes Induced in Biological Membranes by Hydrolysable Tannins from Sumac Leaves (Rhus typhina L.) in their Antihemolytic and Antibacterial Effects. *The Journal of Membrane Biology, 247*, 533–540. doi:10.1007/s00232-014-9664-x
- Omidvar, R., Tafazzoli-shadpour, M., & Ali, M. (2014). Atomic force microscope-based single cell force spectroscopy of breast cancer cell lines
 invasion. *Journal of Biomechanics*, 47(13), 3373–3379.
 doi:10.1016/j.jbiomech.2014.08.002
- Rover, M. R., & Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *104*, 366–371.
 doi:10.1016/j.jaap.2013.06.011
- Sanna, V., Pala, N., & Sechi, M. (2014). Targeted therapy using nanotechnology: Focus on cancer. *International Journal of Nanomedicine*, *9*(1), 467–483. doi:10.2147/IJN.S36654
- Santos, I. S., Ponte, B. M., Boonme, P., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2012). Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. *Biotechnology Advances*, 31(5), 514–23. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.08.005
- Schneider, T., Sachse, a., Rößling, G., & Brandl, M. (1995). Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, 117, 1–12. doi:10.1016/0378-5173(94)00245-Z
- Schulz, W. a, & Ribarska, T. (2011). Insights into cancer mechanisms from genomic research on urological cancers. *Genome Medicine*, *3*, 20. doi:10.1186/gm234
- Sharif, T., Auger, C., Bronner, C., Alhosin, M., Klein, T., Etienne-Selloum, N., ... Fuhrmann, G. (2011). Selective proapoptotic activity of polyphenols from red wine on teratocarcinoma cell, a model of cancer stem-like cell. *Investigational New Drugs*, 29(2), 239–47. doi:10.1007/s10637-009-9352-3
- Shutava, T. G., & Lvov, Y. M. (2012). Natural compounds as inducers of cell death. In M. Diederich & K. Noworyta (Eds.), *Natural Compounds as Inducers of Cell death* (Vol. 1, pp. 215–235). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-4575-9

- Sun, T., Chen, Q. Y., Wu, L. J., Yao, X. M., & Sun, X. J. (2012). Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food and Chemical Toxicology*, *50*, 3462–3467. doi:10.1016/j.fct.2012.07.037
- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*(3), 131–135. doi:10.1016/j.addr.2010.03.011
- Valdés, A., García-Cañas, V., Rocamora-Reverte, L., Gómez-Martínez, A., Ferragut, J. A., & Cifuentes, A. (2013). Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: transcriptomic profiling and functional enrichment analysis. *Genes & Nutrition*, 8(1), 43–60. doi:10.1007/s12263-012-0311-9
- Vidart, M. V., Mujica, M. V., Bao, L., Duarte, F., Bentancourt, C. M., Franco, J., & Scatoni, I. B. (2013). Life history and assessment of grapevine phylloxera leaf galling incidence on Vitis species in Uruguay. *Springer Open Journal*, 1–9.
- Weber, G. F. (2007). *Molecular mechanisms of cancer*. Retrieved from http://discovery.ucl.ac.uk/146186/
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., & Li, H.-B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622–46. doi:10.3390/ijms11020622
- Yefenof, E. (2008). *Innate and Adaptive Immunity in the Tumor Microenvironment*. (E. Yefenof, Ed.). Springer. doi:10.1007/978-1-4020-6750-1
- Yoval, L., & Palacios, L. (2004). Potencial Zeta como una Herramienta para Determinar la Aglomeración de las Partículas en la Reducción del Volumen del Lodo a Disponer. Instituto Mexicano de Tecnología de Agua. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract\nhttp://elaguap otable.com/POTENCIAL ZETA COMO UNA HERRAMIENTA PARA DETERMINAR LA.pdf
- Zalacain Aramburu, A. (2001). *Estudio de extractos tánicos obtenidos a partir de hoja de Zumaque (Rus coriaria L.)*. Universidad Castilla-La Manch.