

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería**

**Campus Tijuana**



**“Elaboración de nanopartículas de PLGA (poli (ácido láctico-  
co- glicólico) para posible uso en vectorización de anti*m*ibia-  
nos etiquetando con Ac. monoespecíficos contra**

***E. Histolytica*”**

Tesis para obtener el grado de

**Químico Farmacobiólogo.**

Presenta:

**Nabor Oswaldo Martínez Gracida**

Director de tesis.

**Dr. José Manuel Cornejo Bravo**

Co-Directora de tesis.

**Dra. Aracely Serrano Medina**

Tijuana Baja California, México a 25 de agosto del 2016



**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

FOLIO No. 004

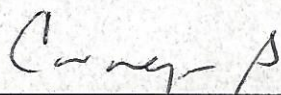
Tijuana, B. C., a 27 de septiembre de 2016

**C.Nabor Oswaldo Martínez Gracida**  
**Pasante de Químico Farmacobiólogo**  
**Presente**

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción     Tesis    

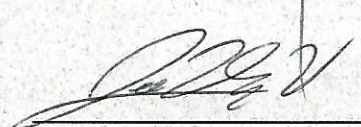
Es propuesto, por el Dr. José Manuel Cornejo Bravo y la Dra. Aracely Serrano Medina, quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema “Elaboración de nanopartículas de PLGA (poli (ácido láctico-co-glicólico) para posible uso en vectorización de antiamicibianos etiquetando con Ac. mono-específicos contra E. Histolytica” el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- TEORÍA GENERAL
- III.- METODOLOGÍA
- IV.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS
- V.- CONCLUSIÓN
- VI.- BIBLIOGRAFÍA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Manuel Cornejo Bravo  
**Director de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Aracely Serrano Medina  
**Co-Directora de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
**Director**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Luis González Vázquez  
**Subdirector**

## **INDICE**

Índice de imágenes y figuras..... I

Índice de tablas.....II

Índice de graficas e histogramas.....III

Índice de abreviaturas.....VI

Agradecimiento.....V

**RESUMEN.....VI**

## INDICE GENERAL.

<b>CAPITULO 1. INTRODUCCION</b>	<b>Paginas.</b>
Justificación	1
Antecedentes	2
Objetivo general	4
Objetivo específico	4
<b>CAPITULO 2. TEORIA GENERAL</b>	
<b>1. Vectorización de fármacos</b>	<b>5</b>
<b>2. Funcionalización de NPS</b>	<b>7</b>
2.1 Nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos	11
2.2 Nanopartículas funcionalizadas con péptidos	19
2.3 Nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico	26
<b>3. Preparación de anticuerpos monoclonales.</b>	<b>32</b>
3.1 Producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas.	34
3.2 Producción de anticuerpos monoclonales a partir de fagos.	36
<b>4. Amibiasis</b>	<b>38</b>
4.1 Definición de amibiasis.	41
4.2 Epidemiología	41
4.3 Etiología	43
4.4 Cuadro clínico	43
4.5 Farmacoterapia actual	43
4.6 Factores de virulencia de <i>E. Histolytica</i> .	45

<b>CAPITULO 3. METODOLOGIA.</b>	<b>Pagina.</b>
<b>Materiales Equipos</b>	<b>48</b>
<b>Reactivos</b>	<b>49</b>
<b>1. Preparación de NPs- PLGA 50:50</b>	<b>50</b>
1.1 Obtención de fase orgánica y acuosa	50
1.2 Preparación de polivinilalcohol al 5%p/v (PVA5%p/v)	50
1.3 Fase orgánica y la emulsión para la elaboración de las NPs.	51
1.4 Eliminación del solvente.	52
1.5 Purificación por centrifugado.	53
1.6 Adición de manitol como crioprotector y el proceso de liofilización.	54
<b>2. Unión covalente de isotiocianato de TMRMNA con PLGA.</b>	<b>55</b>
2.1 Metodología de unión.	55
2.2 Purificación/recuperado de NPs por método de disolución/precipitación.	55
<b>3. Preparación de NPs PLGA-(TMRMNA-PLGA) 80/20</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO 4. DISCUSION DE RESULTADOS.</b>	
<b>1. Eficacia e inconveniente en la metodología de elaboración.</b>	<b>59</b>
<b>2. Evaluación de resultados de caracterización</b>	<b>65</b>
<b>3. Porcentaje de rendimiento de la metodología de elaboración.</b>	<b>77</b>
<b>4. Estabilidad de las Nps.</b>	<b>79</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>84</b>



## ÍNDICE DE IMÁGENES Y FIGURAS

**Imagen 1.** Esquema de funcionalización de NPs

**Imagen 2:** Representación esquemática de unión química entre el grupo amino terminal de poli etilenglicol (PEG) al grupo hidroxilo terminal del ácido glicólico

**Imagen 3:** Conjugación de curcumina y PLGA a través de enlace éster

**Imagen 4** Poli-L-lisina (PLL) se conjuga con PLGA.

**Imagen 5:** Ilustración esquemática de formulación de micelas poliméricas de NPs cargadas con docetaxel (DTX).

**Imagen 6.** Estructura básica de los anticuerpos.

**Imagen 7.** Clasificación por subgrupo de los aminoácidos en base a las características y propiedades químicas que presentan sus cadenas laterales.

**Imagen 8.** Esquema de funcionalización de NPs de PLGA con un anticuerpo.

**Imagen 9.** Complejo inmunosensor de diagnóstico.

**Imagen 10.** Secuencias de aminoácido de una B-casomorfina

**Imagen 11.** Presentación esquemática de la reacción química que se lleva a cabo para la funcionalización de los NPs de Oro.

**Imagen 12:** Estructura molecular del ácido tióctico.

**Imagen 13.** Esquema representativo del reconocimiento de los anticuerpos específicos a sus antígenos.

**Imagen 14:** Separación de componentes extraídos del bazo de un animal inmunizado para obtener líneas linfocíticas en el sobrenadante empleando la solución de Ficoll

**Imagen 15.** Fusión de célula tumoral con un linfocito B (productor de anticuerpos) para formar un hibridoma.

**Imagen 16:** Esquema general de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales (AcM)

**Imagen 17:** Producción de AcM por medio del empleo de Bacteriófagos o fagos.

**Imagen 18.** Ciclo biológico e infectante de la *E. histolytica*.

**Imagen 19.** Formación de pseudópodos en una ameba.

**Imagen 20.** Clasificación de la amibiasis

**Imagen 21** *Proteínas expresadas/secretadas por el trofozoíto de E. histolytica consideradas factores de virulencia.*

**Imagen 22.** Representación gráfica de dos vasos de precipitado de mismo volumen, pero distinta forma física.

**Figura 1.** Resultado de crecimiento relativo y citotoxicidad *in vitro* de las 4 diferentes líneas celulares cancerosas

**Figura 2.** Resultados de la distribución tisular agentes quimioterapéuticos.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Tipos de puentes de hidrogenos que pueden llegar a presentarse en algunas estructuras de macromoleculas

**Tabla 2.** Péptidos biológicamente activos derivados de proteínas

**Tabla 3.** Tabla complementaria para las abreviaturas que se usan en referencia a las secuencias de péptidos bioactivos que se mencionan en la **Tabla 1.** Leu-Ala-Trp-Lys-Arg-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys,

**Tabla 4.** Población mundial reportada en 2014, en una publicación de la ONU.

**Tabla 5.** Relación de los fármacos de elección para las diferentes clasificaciones de la amibiasis.

**Tabla 6.** Promedios de las lecturas que se realizaron para cada reacción y un promedio final para todas las Rxns. CM: Con Manitol. SM: Sin Manitol

**Tabla 7.** Relación del cambio en tamaño y PDI de NPs-PLGA con respecto a los valores obtenidos de los purificados y los liofilizados sin crioprotector.

**Tabla 8.** Resultados de lecturas realizado a NPs etiquetadas con TMRMNA al 20% en relación al polímero PLGA con el Z-sizer

**Tabla 9.** Cambio que sufrieron NPs etiquetadas con TMRMNA cuando fueron liofilizadas en presencia y ausencia de manitol.

**Tabla 10.** Promedio de medidas registradas en NPs-PLGA y NPs-PLGA etiquetadas con TMRMNA.

**Tabla 11.** Medida (Nm) de NPs que no precipitaron en la etapa de purificación a diferentes cambios de rpm y tiempo de centrifugación.

**Tabla 12.** Resultados de 5 en tamaño de NPs que no se precipitaron en la primera y segunda centrifugación. A la izquierda los que se precipitaron y a la derecha de cada columna las NPs de cada sobrenadante.

**Tabla 13.** Concentración de resultados de rendimiento que se obtuvo en cada muestra que fueron liofilizadas.

**Tabla A**

**Tabla B**

**Tabla C**

**Tabla D**

**Tabla E**

## ÍNDICE DE GRAFICAS E HISTOGRAMAS.

**Gráfica 1.** Comparación de tamaño de nanopartículas en presencia de acetato de etilo como solvente, sin la presencia de este y cuando han sido purificadas.

**Gráfica 2.** Relación de cambios de tamaño, PDI y desviación estándar cuando las NPs se encontraban en diferentes fases de producción y tras haber sido liofilizadas con presencia de manitol.

**Gráfica 3.** Relación del cambio en tamaño, PDI y desviación estándar que sufrieron las NPs al término de su purificación y posterior de haber sido liofilizadas en presencia y ausencia de manitol.

**Gráfica 4.** Comparación de tamaño, PDI y desviación estándar de NPs-PLGA las etiquetadas con TMRMNA.

**HISTOGRAMA 1**

**HISTOGRAMA 2**

**HISTOGRAMA 3**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- NP/NPs: Nanopartícula/Nanopartículas
- PLGA: Poli Acido (Láctico -co- Glicólico)
- PLL: Poli L-Lisina.
- Ac/AcM: Anticuerpo/Anticuerpo Monoclonal.
- ONU: Organización de las Naciones Unidas.
- Rxn/Rxns: Reacción/Reacciones.
- TMRMNA: Isotiocianato de Tetrametilrodamina.
- PDI: Polidispersidad.
- Nm: Nanómetro.
- PVA: Poli vinil Alcohol.
- PH: Potencial de Hidrogeno.
- PEG: Poli etilenglicol.
- DCM: Diclorometano.
- DCC: N, N diclorohexilcarbodiimida.
- DMAP: Dimetilaminopiridina.
- NHS: N, hidroxisuccimida.
- KDa: Kilo Dalton.
- FDA: Food and Drug Administration.
- AA/AAs: Aminoacido/Aminoacidos

- ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina.
- FTH4: Tetrahidrofolato.
- CDDP: Cis-diaminocloroplatino.
- Mw: Masa Molecular total.
- DMF: N, N Dimetilformimida.
- Rmp: Revolución por minuto.
- C: Grados centígrados Celsius.
- CM/SM: Con manitol/Sin manitol.
- PLA: Poli ácido láctico.
- PLG: Poli ácido glicólico

## **AGRADECIMIENTO.**

Poder terminar el presente trabajo no fue fácil, antes de tener esta oportunidad, recorrí un largo camino desde la primaria hasta la etapa universitaria, camino donde muchos seres querido estuvieron invariablemente con su apoyo incondicional. Gracias a mi padre, **Martimiano Martinez** y a mi madre **Aurelia Gracida** por ser quienes estuvieron siempre al pendiente de mis pasos y alentarme cada que podían con un *"tu puedes hijo mío, tu puedes"*. Estas palabras fueron los motores que me forjaron a dar cada paso, algo que agradezco infinitamente, porque sin este apoyo moral, las ganas de seguir y avanzar un paso más, muy probablemente se habrían detenido desde mucho tiempo atrás. Por ello, este trabajo se los dedico enteramente a ellos con toda mi alma y agradecimiento.

Agradezco también a mis hermanos, a quienes recurría cuando un problema se me presentaba y siempre recibí una respuesta positiva, en especial a mi hermana **Judith Martinez**, con quien a la par di cada paso para escalar cada nivel de la formación académica y a la par culminamos un estudio universitario, cada quien, en su campo, pero gracias a esto, con ella tuve mayor laso y fue a quien más recurrí, recibiendo siempre un *" Si hermano, aquí estoy para ayudarte"*.

Un agradecimiento muy especial al **Dr. José Manuel Cornejo Bravo**, quien me dio su confianza y la oportunidad para poder trabajar en su equipo de trabajo. Pero no fue solo la oportunidad y la confianza, si no, más allá de abrirme su puerta, durante la realización del trabajo recibí en todo momento una disponibilidad para asesorías y apoyo, sentí siempre que estaba en casa, algo que agradezco profundamente. Gracias Dr.

Agradezco también a la **Dra. Aracely Serrano Medina**, quien me extendió su mano desde el día que tuve la oportunidad de conocerla, quien incondicionalmente ofreció su apoyo en todo momento como

maestra y amiga, amiga que indudablemente nadie más puede sustituir. Gracias a su historia personal y trayectoria académica, a su perseverancia, positivismo y entrega total a sus alumnos, por ser quien es, porque gracias a todo esto en gran parte me motivó a culminar el presente y a no quedarme solo hasta aquí, si no continuar avanzando en mi formación académica. Mi más sincero agradecimiento.

Agradecimiento muy especial a mis compañeros de laboratorio, a quienes tuve la oportunidad de conocer, tratar y trabajar junto a ellos de manera directa o indirectamente. A **Paola Cervantes**, quien a pesar de haber estado en su momento a finales de su grado de maestría, me regalo parte de su valioso tiempo en darme apoyo, asesoría y corregirme, quien desde el primer día me dio un "sí" cuando le pedí apoyo para este proyecto. También no podría pasar la oportunidad de agradecer a la profesora **Kenia Palominos**, quien tuvo la dicha de tener como maestra de la clase de Biofarmacia, después ser parte de su proyecto doctoral en el servicio social profesional, gracias a sus consejos, su siempre disponibilidad de apoyar, su vocación y paciencia para enseñar, porque en todo momento nunca me dijo *no puedo*. También agradezco a **Rafael Castro** y **Héctor Magaña**, porque tampoco me negaron su apoyo cuando les recurrí.

Gracias todos y a cada uno de los mencionados, por haber formado parte de este proyecto que hoy en día tengo la dicha de presentar, sin el aporte de cada uno de ellos, no hubiera sido posible llegar a esta etapa. GRACIAS A TODOS.

## RESUMEN

PLGA es un polímero biodegradable y que ha sido aprobado por la FDA, por no presentar toxicidad en el organismo humano y es ampliamente usado en los últimos años para la producción de NPs en el campo de investigación e innovación, principalmente en el campo farmacéutico con el fin de desarrollar sistemas inteligentes de liberación de fármacos controladas. En el presente trabajo se elaboraron NPs a base del polímero de PLGA (poli ácido láctico-co- glicólico) con el fin de obtener sistemas NPS que tengan las características tanto física como química para ser candidatos a emplear como vectores para el metro-nidazol, un antibiótico que presenta eficacia contra *E. histolytica*, pero con poca especificidad a las células dianas. Se utilizó PLGA con PM de 24,000 a 38,00 de terminación con el grupo carboxilo (Sigma-Aldrich Chemistry), empleando el método de emulsión y eliminación de solvente. Se utilizó acetato de etilo (EM Sciencie FW:88.11) saturado con agua MiliQ como fase orgánica y agua MiliQ saturado con el solvente como la fase acuosa, con esta última, se preparó poli vinil alcohol (PVA; Aldrich Chemistry MW =/- 31,000) al 5%, que fue utilizado como tensioactivo. En cada preparación se emplearon 50mg de PLGA, disolviéndose en fase orgánica. Al tener ambas fases preparadas, se llevó a cabo la emulsión con el homogeneizador (Poltrón PT 1600 E) a 11,000rpm. La purificación fue por medio de una centrifugación (Moledo: VWR Clinical 50) a 10,000 rpm por 15 minutos. Finalmente, las NPs-PLGA, se liofilizaron. Los resultados obtenidos, fueron NPs que van desde los 210nm a los 270nm, con polidispersidad (PDI) no mayor a los 0.200 y con una desviación estándar que va de 50 a 80 nm. Además, se elaboraron NPs etiquetadas con isotiocianato de tetrametilrodamina (TMRMNA), para la elaboración de estas NPs, previamente se etiquetó al polímero con TRMRMNA y la proporción requerido para la preparación de NPs fue 20% del polímero etiquetado y 80% del polímero puro. Los resultados en tamaño, PDI y desviación estándar logrados, fueron de muy similar a casi iguales a los obtenidos con las NPs-PLGA. Se observó que las NPS-PLGA liofilizadas con manitol, conservaron su tamaño, mientras que las liofilizadas sin este presentaron un tamaño casi al doble del inicial. De igual manera

las NPs etiquetadas con manitol y sin este, fueron evaluadas en el proceso de liofilización, en el que se observó que este tipo de NPs pierden estabilidad de ambas maneras. Por último, se evaluó estabilidad en medio acuosa tanto a temperatura ambiente y a refrigeración, donde hubo una estabilidad mayor o igual a los 16, en ambas condiciones, siempre y cuando haya un almacenamiento libre de contaminantes.

**Palabras claves;** Poli ácido láctico-co- glicólico (PLGA); Polidispersidad (PDI), Poli Vinil Alcohol (PVA); Isotiocianato de Tetrametilrodamina (TMRMNA); Nanopartículas (NPs).



## **CAPITULO I**

## INTRODUCCION

### Justificación

La amibiasis es un problema de salud social tanto en México como en el mundo, y es considerado como la tercera causa de mortalidad por enfermedades parasitarias en el mundo, causada por la *E.histolytica*. Causando una tasa de mortalidad anual entre 50,000 a 100,000 muertes. Las mayores tasas se registran en aquellos países en vías de desarrollo, como es el caso de nuestro país. Los tratamientos que existen actualmente están basados en antiamebianos con un sistema de administración y liberación convencional, con eficacia moderada contra amibiasis a nivel intestinal y extraintestinal, pero estos medicamentos no logran ser dirigidos específicamente contra el parásito y por ello numerosas ocasiones, el tratamiento no funciona, culminando con la muerte del paciente. **(Chacín-Bonilla, 2013)** Es importante mencionar que *E. Histolytica* tiene factores de virulencia, que complican más la eficacia de los antiamebianos, por ello existe la necesidad de atacar de una manera mucho más específica a uno de los factores de virulencia más importantes del parásito, sus proteínas de superficie de adhesión fuertemente contra el epitelio y esto es posible contrarrestarlo con el uso de sistemas funcionalizados con anticuerpos monoespecíficos contra estas proteínas de virulencia. **(Cuevas Flores , 2012)** Debido a estas razones es por la cual existe la necesidad de formular sistemas que sean capaces de biodirigir un antiamebiano y anticuerpos monoespecíficos de una manera más específica contra el parásito, con la idea de bloquear sus estadios de virulencia y poder erradicarlos.

Las NPs-PLGA están elaboradas a base de un polímero formado por dos monómeros que cuando ingresan al organismo, son hidrolizadas de manera no enzimática y sus productos finales son los mismos monómeros, los cuales no son tóxicos para el organismo y este con la capacidad de eliminarlos adecuadamente. Por esta razón, PLGA, es el polímero más empleado para la elaboración de NPs biodegradables.. **( Rosas & Pedraz, 2007**

### Antecedentes

Las NPs son sistemas con un tamaño menor a una micra ( $\mu\text{m}$ ), sistemas que en los últimos años han adquirido mucha importancia en el auge de la ciencia nanotecnológica, y este con una mayor fuerza en el campo de la medicina, particularmente en farmacia, buscando con ello desarrollar nuevos vehículos inteligentes en el transporte y entrega de una amplia gama de principios activos. Las NPs pueden estar elaboradas a partir de polímeros tanto sintéticos como naturales.

A finales de los años 70 debido a los problemas que presentaban los liposomas, sistemas que inicialmente tenían grandes promesas como nuevos vectores, pero conforme a los estudios *in vitro* realizados, estos presentaban baja estabilidad y eficiencia en la incorporación de fármacos, teniendo con ello la necesidad de nuevas alternativas, las nanopartículas. (Vila Jato, 2011)

Las nanopartículas biodegradables que son elaboradas a partir de poliéster han venido ganando importancia en el campo del desarrollo farmacéutico como vectores. Hoy en día existen variedades de polímeros con los que se puede elaborar los sistemas nanométricos, pero los más empleado, aprobados por la FDA y EMA (Agencia Europea de Medicina) para su uso en la industria farmacéutica con el poli ácido glicólico (PLG), polo ácido láctico (PLA) y su copolímero poli acido (láctico-co-glicólico; PLGA). Al ser estos polímeros biodegradables, biocompatibles, no tóxicos, fácil elaboración y fácil de modificar sus superficies, entre otras características, es la razón por la cual estos polímeros son los de mayor importancia hoy en día. **(Rubio Muñoz, 2013)**

Encapsular fármacos permite un mayor control en el transporte, entrega y captación del mismo a las células dianas, demostrando una concentración mucho más elevada al sitio deseado en comparación cuando se es administrado de forma libre. En teoría cuando se logra una mayor captación del fármaco, se puede disminuir la cantidad administrada de forma libre y por tanto, disminuir los

efectos secundarios comunes. Cuando un fármaco libre viaja a través del cuerpo, causa toxicidad en todo el organismo, resultando en efectos secundarios graves en muchas ocasiones o corto o a largo plazo.

Por las características y propiedades brevemente descritas, también el PLGA está siendo empleado en otras líneas de investigación para la formulación de implantes y ha sido evaluado como implante para la liberación subconjuntival de 5-fluorouracilo (5-FU) dando buenos resultados de forma *in vitro* e *in vivo* en conejos. **(Iñaki Rodríguez, 2012)**

**Objetivo general**

Lograr elaborar nanopartículas de PLGA mediante el empleo de la técnica de emulsión y eliminación de solventes, y que los cuales tenga un tamaño y estabilidad adecuada para poder ser empleadas como vector para el metronidazol y un sistema funcionalizable para anticuerpos monoespecíficos.

**Objetivos específicos**

- I.** Dominar el método de emulsión y eliminación de solvente para elaborar NPs-PLGA y que el método pueda ser replicable.
- II.** Elaborar NPs-PLGA con un diámetro dentro de los 150 a 300nm durante la elaboración y hasta después del proceso de liofilización.
- III.** Lograr unas NPs que su límite de polidispersidad (PDI) no sean mayor a los 0.250
- IV.** Las NPs elaboradas, sean estables en medio acuoso tanto en medio ambiente, refrigeración y congelación.
- V.** Lograr enlazar covalentemente moléculas de isotiocianato de tetrametilrodamina a cadenas poliméricas del PLGA para poder elaborar NPs que puedan emitir fluorescencia.

## **CAPITULO 2**

## **TEORIA GENERAL**

### **1. Vectorización de fármacos.**

Los vectores de fármacos, se refieren a sistemas inteligentes capaces de ser empleados como vehículo y transportadores de fármacos y/o sustancias bioactivas para biodirigirlo hacia un sitio o célula diana específica de una manera mucho más eficaz en comparación con una administración convencional de los fármacos.

El objetivo de usar un transportador de fármacos es aumentar la eficacia de entrega de los principios al sitio activo, evitar una degradación antes de tiempo, además de disminuir sus efectos adversos por la administración convencional, por tanto, lograr disminuir las dosis requeridas, pero manteniendo el mismo o un mejor efecto terapéutico, por último, lograr un biofase más específico. En otras palabras, es poder controlar y aumentar la biodisponibilidad, estabilidad y selectividad los principios activos.

Toda clase de fármacos y sustancias bioactivas pueden ser incorporados a un vector, desde un analgésico, antibiótico, anticancerígenos etc., hasta proteínas como son los anticuerpos (en este caso cuando se trate de macromoléculas biofuncionales, se habla ya de NPs funcionalizadas) pero todo depende en las características fisicoquímicas y molecular de la molécula a funcionalizar puedan adaptarse al vector o el vector adaptarse a ellos para funcionalizarse o ser encapsulados por el vector.

Para formar matrices de los vectores, como los de micropartículas o nanopartículas se puede emplear diferentes sustancias como proteínas (albumina, gelatina, colágeno, caseína), polisacáridos (almidón, celulosa y derivados, alginatos,

pectina, carragenanos, quitosanos), poliésteres (ácido poli láctico, ácido poli glicólico, ácido poli láctico-co-glicólico, poli-E-caprolactona, poli-B-hidroxibutirato), derivados de poli vinílicos (alcohol poli vinílico, acetato de vinilo), poli acrilatos (acrilatos, metacrilatos, copolímero de acrílico y metacrílicos) y otros varios (glicéridos, ceras, esteres solidos etc.). Y elección de uno u otro viene dado en que se pretende emplear y las características fisicoquímicas del fármaco al que se le desea adicionar. **(Hernandez Herrero, Moreno Gonzales , Zaragoza Garcia , & Porras Chavarrino, 2011)**

Actualmente en los laboratorios y trabajos de investigación científica se centran en varios vectores que han demostrado ser potencialmente buenos; tales como liposomas, nanopartículas, macropartículas, virus inactivados, entre otros.

Todos los vectores tienen una finalidad en común, el cual ya se ha mencionado, pero cada uno se diferencian en mecanismos propios o en común que requieren para lograr el objetivo; por ejemplo algunos como las micropartículas o nanopartículas con centro metálico (ejemplo, un hierro, plata, oro, sílice entre otros) con ayuda de efectos magnéticos aplicados exógenamente para poder finalmente ser atraídos, acumularse al sitio deseado y por último ser sometidas a cambios físicos de igual manera, externos, que las lleven a modificar sus estructuras para finalmente descargar moléculas bioactivas que llevan consigo. Y otros sistemas que tienen matrices poliméricas biodegradables o no, como el ácido láctico (PLA), ácido glicólico (PGA) o su co- polímero, el ácido láctico y glicólico (PLGA) que son los más empleados, que logran llegar al sitio diana sin necesidad de efectos físicos externos. **(Hernandez Herrero, Moreno Gonzales , Zaragoza Garcia , & Porras Chavarrino, 2011)**

Otro ejemplo serían las mismas nanopartículas los cuales al ser sensibles a cambios físicos, son capaces de liberar los fármacos por efecto del cambio de pH o de temperatura de su sitio diana. Estas propiedades son aprovechadas primordialmente para crear sistemas capaces de modificar sus estructuras cuando se

encuentren en sitios con una varianza en los valores de pH y temperatura, en comparación con el resto del organismo, y ejemplo de estos sitios son las células cancerígenas o células que cursen con algún proceso inflamatorio, que naturalmente estos presenta un pH y temperatura más elevado, el cual es lo que hace las nanopartículas sensibles logren modificar sus estructuras y poder liberar el fármaco. **(Hernandez Herrero, Moreno Gonzales , Zaragoza Garcia , & Porras Chavarrino, 2011)**

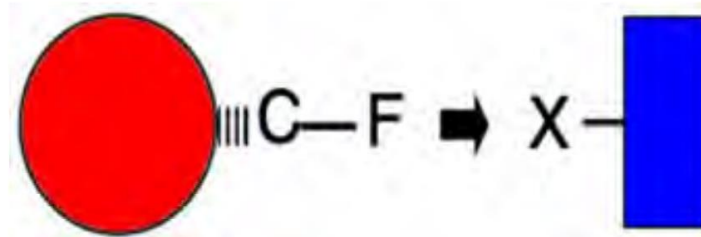
Hay muchos otros métodos más por las cuales un fármaco es vectorizado, pero con una única finalidad, hacer llegar la mayor concentración de principios activo a un sitio diana específico y para esto el método puede ser directo, como por ejemplo depositar directamente el fármaco en la zona deseada, como en el caso de las administraciones interarticulares, intratecales o directa/semidirectas como los ejemplos que ya se mencionaron en los párrafos anteriores.

## **2 Funcionalización de NPs**

Las nanopartículas funcionalizadas hacen referencia a aquellas nanopartículas que, a través de su matriz, se le incorpora alguna molécula o macromoléculas biofuncionales, es decir algún tipo de biomarcadores de naturaleza fosforescentes como las rodaminas; biomoléculas como los anticuerpos monoespecíficos, algún fármaco o alguna otra molécula de naturaleza distintas a las mencionadas.

Para lograr las funcionalizaciones, existen varios métodos tanto químicos y físicos que podrían ser efectivas, y si se pudiera ver físicamente como es que finalmente las nanopartículas quedan funcionalizadas, podríamos ver distintas maneras, como por ejemplo, aquellas que su matriz ha quedado recubierta de moléculas funcionales y esto pudiendo estar simplemente unidas por fuerzas iónicas o por enlaces covalentes, mientras que otras NPs pudieran quedar en el interior la matriz, en vez de quedar como el primer ejemplo.

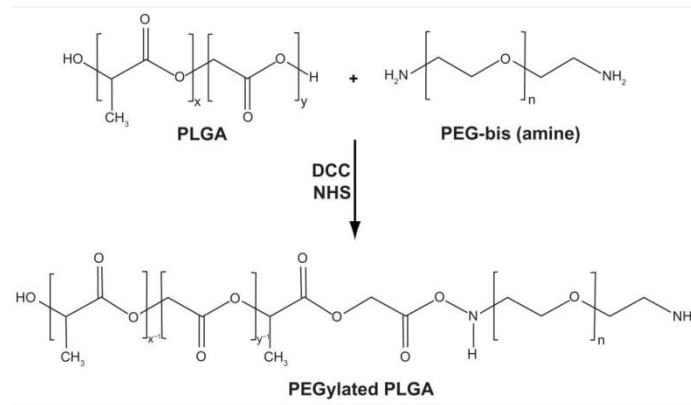
La unión covalente o iónica entre NPs. y moléculas funcionales, depende en gran medida de las características fisicoquímicas de los dos, estas características son las que definen química y gráficamente como es que finalmente las nanopartículas quedan funcionales y que métodos químicos o físicos fueron las adecuadas para cada reacción de acoplamiento. En la **Imagen 1**. Se muestra de manera gráfica como es que teóricamente se espera la unión entre las nanopartículas el grupo funcional.



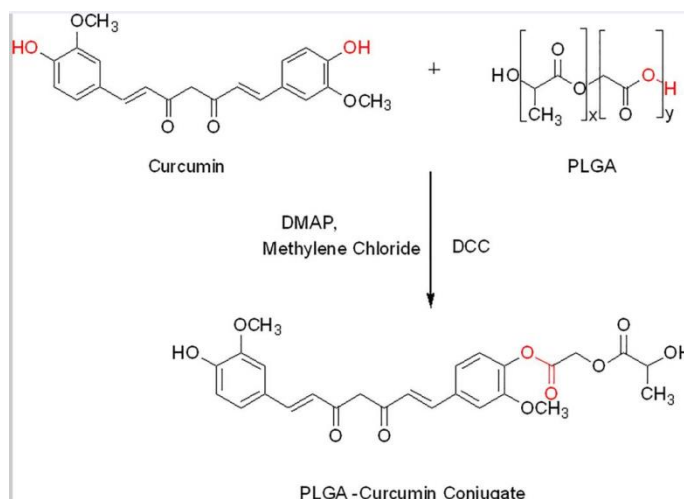
**Imagen 1.** El círculo rojo vendría representando a una nanopartícula, C su ligando de unión a superficie, F el grupo con que se funcionalizó y X la unión del grupo funcional con el sitio específico del blanco propuesto. **(Ávila, 2011. Tesis maestría)**

A continuación, se detallarán de manera más específica cómo es que se ha logrado que algunas moléculas bioactivas como anticuerpos, péptidos y ácido fólico puedan acoplarse a nanopartículas para finalmente obtener NPs funcionalizadas potenciales a aplicación en el campo clínico. Además de detallar algunas características generales sobre el en las investigaciones científicas relacionados con cada una de ellas.

A continuación se muestran algunas imágenes de cómo es comúnmente los enlaces que se forman a partir de las terminaciones en grupo funcional de PLGA al ser conjugado con alguna molécula y por tanto funcionalizarse.

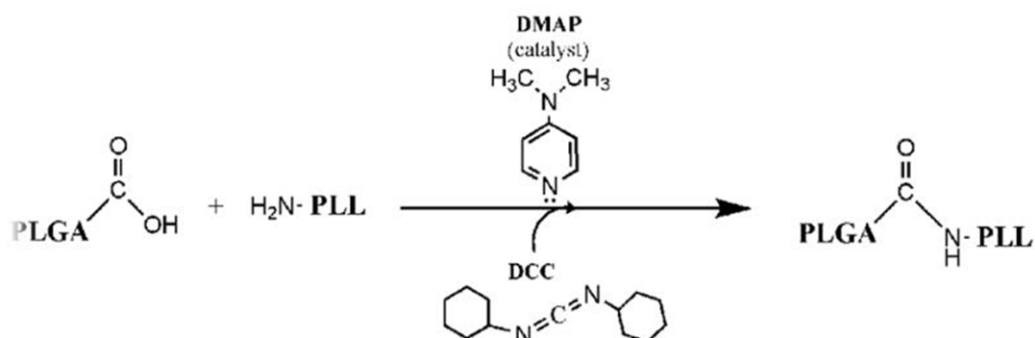


**Imagen 2:** Representación esquemática cuando la unión química entre el grupo amina terminal del poli etilenglicol (PEG) al grupo hidroxilo terminal del ácido glicólico cuando este se encuentra como copolímero con el ácido láctico; (PLGA) (Jafarzadeh Kashi, y otros, 2012)



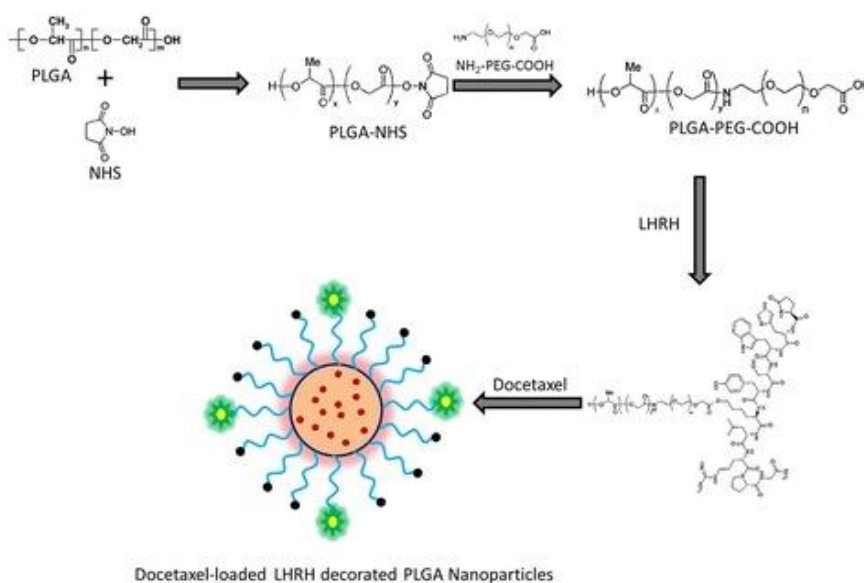
**Imagen 3:** La curcumina y PLGA se conjugan a través de enlace éster. PLGA fue activado por N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4- (Dimetilamino piridina) (DMAP) en diclorometano (DCM) (Bhargav N. Waghela, 2015)

## PLGA-PLL CONJUGATION



**Imagen 4** Poli-L-lisina (PLL) se conjuga con PLGA. En la síntesis, se utiliza diciclohexilcarbodiimida (DCC) como un agente de acoplamiento, que activa el grupo terminal de ácido carboxílico en el PLGA para la conjugación con la amina libre en PLL.

(Saltzman, 2008)



**Imagen 5:** Ilustración esquemática de formulación de micelas poliméricas de NPs cargadas con docetaxel (DTX). PLGA-PEG se conjuga con un resto Hormona Liberadora de la Hormona lutenizante (LHRH) a través de carbodiimida (DCC) mediada por N, Hidroxisuccinimida (NHS). El PLGA-PEG-LHRH y DTX se autoensamblan para formar nanopartículas. (Cao & Zhao, *Nanoscale Research Letters*)

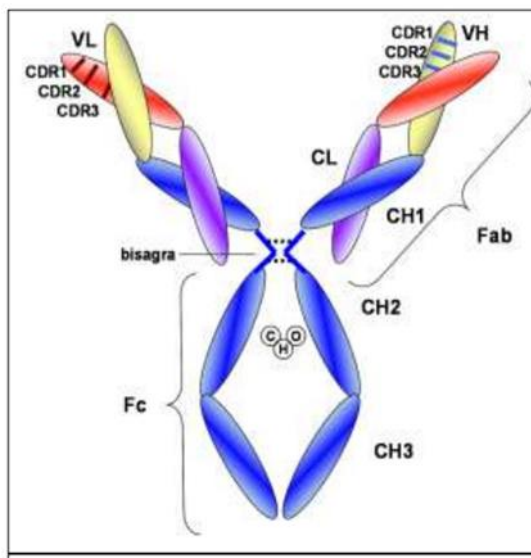
Como se observó en los ejemplos de anteriores de conjugaciones del PLGA con diferentes moléculas, la unión química es generalmente a partir del hidroxilo libre terminal del ácido glicólico que compone al complejo polimérico de la NP.

### **2.1 Nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos.**

Los anticuerpos o también llamados inmunoglobulinas (Igs) son macromoléculas de tipo glicoproteínas, formados por largas cadenas polipeptídicos. Los anticuerpos son unos complejos proteicos que tienen la capacidad de unirse específicamente a un receptor, el cual sería su antígeno. Los anticuerpos son sintetizados por la línea celular linfocítica, el cual se logra por un equilibrio de colaboración entre los subtipos de linfocito, los linfocitos B y los llamados linfocitos T cooperadores en respuesta a la presencia de antígenos. Las cadenas polipeptídicas que conforman al anticuerpo, son sintetizados por los ribosomas para posteriormente presentarse como hemimoléculas y finalmente ser ensamblados dentro del aparato de Golgi y ser presentado con la estructura de doble cadenas, pudiendo ser excretados como Igs solubles o quedarse expresados en las membranas del linfocito.

## Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos están conformados por dos cadenas diferenciadas por su dimensión y peso, los cuales son llamados cadenas pesadas (HC, *heavy chain*), cadena ligera (LC, *light chain*), en donde existen dos cadenas idénticas de cada una, pesando 50KDa y 25 KDa respectivamente. En la **imagen 6** se muestra la estructura básica de los anticuerpos.



**Imagen 6.** "Estructura básica de los anticuerpos. Representación esquemática de un anticuerpo. Consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos livianas (L). Las cadenas pesadas y livianas se unen entre sí por puentes bisulfuro y algunas otras interacciones covalentes. La estructura flexible que une a las cadenas pesadas es denominada "bisagra" (línea punteada). La unión en la parte amino terminal de las cadenas pesadas y livianas da como resultado la formación de dos sitios idénticos de unión al antígeno (Fab). Las barras en las regiones variables representan las regiones de los determinantes de complementariedad (CDR 1-3), tres para la cadena ligera (VL) y tres para la cadena pesada (VH). La fracción cristalizable (Fc) está formada por los dominios CH2 y CH3, en la región CH2 se asocia un componente glucosídico". ( **Sanabria Ayala & Landa Piedra, 2007**)

Se ha venido estudiando los Acs. desde décadas atrás, pero no fue hasta en 1975 cuando biólogo Köhler y el químico Milstein, que desarrollaron un método eficaz para la producción y obtención de Acs monoclonales puros y gracias a este gran avance, fue que a partir de esa fecha las investigaciones referentes a los Acs se intensificaron.

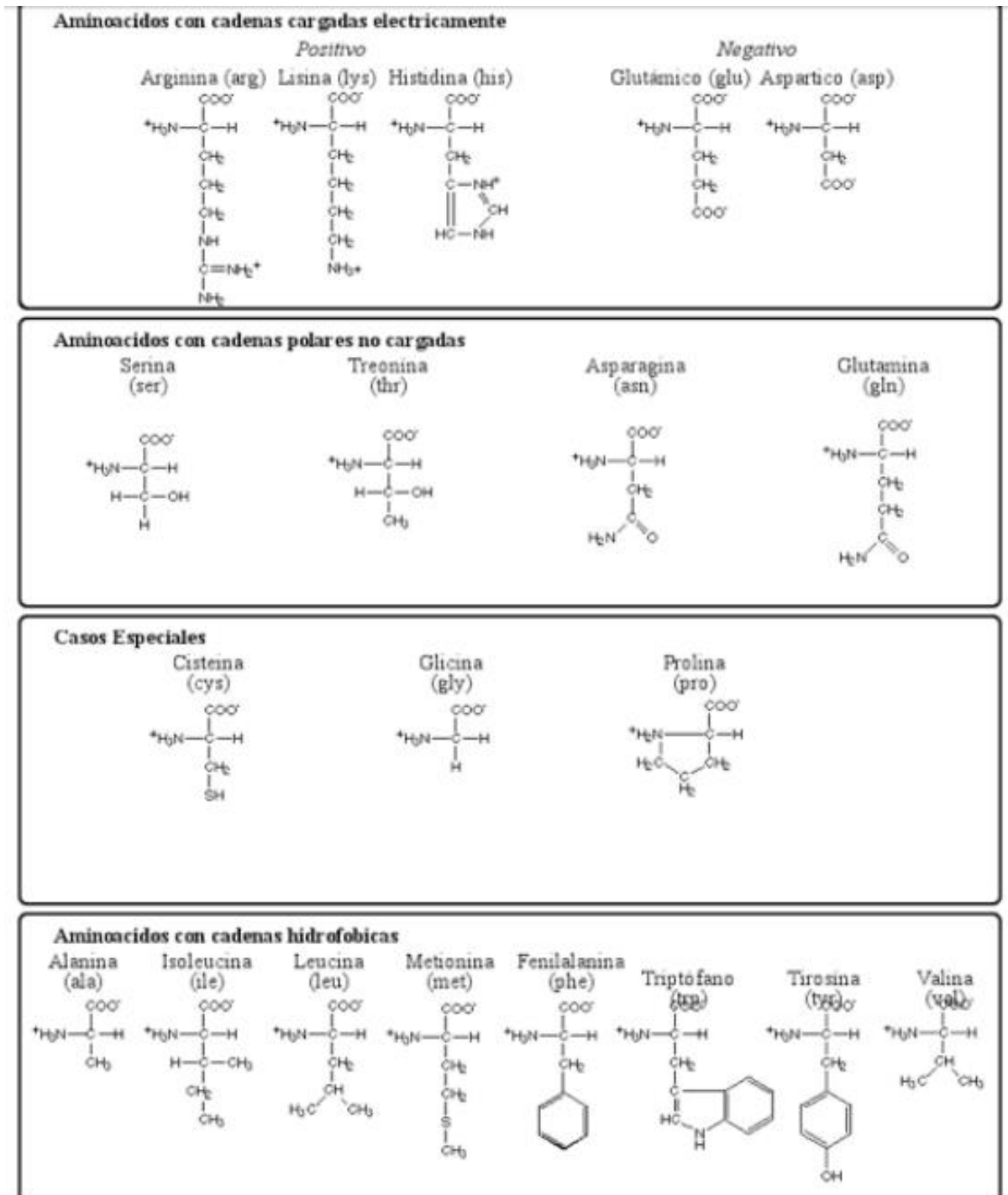
Posterior a las investigaciones y el desarrollo de anticuerpos, en 1997 por primera vez la *Food and Drug Administration*, (FDA) aprobó un anticuerpo para el tratamiento antineoplásico. El nombre que recibió este primer anticuerpo fue Rituximab (Mabthera®, Rituxan®, La Roche, Basilea, Suiza) **(Estrada, y otros, 2010)** el cual está dirigido contra CD-20 de las células cancerosas, para el tratamiento de linfomas no Hodking. Para esta aplicación es única y exclusivamente la propiedad nata que tienen los anticuerpos de unión específica, pero posteriormente las aplicaciones en el campo de la medicina se diversificarían aún más, entre el funcionalizarlos con otros tipos de moléculas para conseguir otros fines, tales cuando son conjugados con algunas moléculas de tipo cromóforos para el reconocimiento y diagnóstico de una enfermedad por medio de sus antígenos como el caso de la prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) o enlazarlos a algún sistema de nanopartículas para dirigirlos hacia un antígeno blanco específico. **(Hernández Baltazar E., 2011)**

### **Propiedades del anticuerpo para poder llevar uniones químicas.**

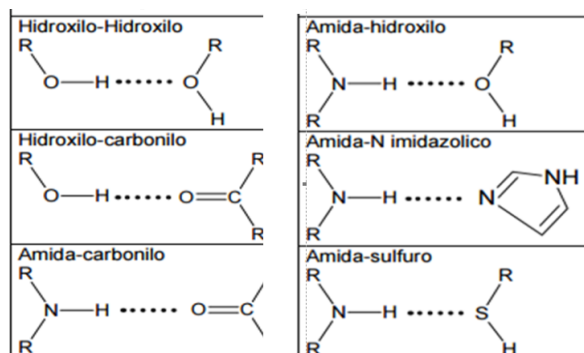
¿Pero, como es que los anticuerpos pueden tener la capacidad de unirse covalentemente o de forma iónica con alguna otra molécula? Se debe a las unidades que componen a las proteínas en general, y dentro de estos complejos, se encuentran los anticuerpos o también llamados inmunoglobulinas. Las unidades que componen a las proteínas son los aminoácidos que se unen entre para formar cortas, medianas y largas cadenas polipeptídicos y aunque todos los aminoácidos comparten unas características iguales como el que cada una tiene un carbono alfa o quinal además de un grupo amino y carboxilo, lo que las

diferencia los uno a los otros, son sus cadenas laterales con características y propiedades únicas.

Gracias a que todas las AA., s tienen un carbono tetraédrico, lo que le un libre movimiento y direccionalidad de sus 4 grupos, es a partir de estos por el cual las cadenas polipeptídicos podrán adquirir su forma tridimensional final. La principal unión química que le da forma y estabilidad a las proteínas es el azufre (S) que se encuentra al final de la cadena lateral de la Cisteína, quienes formaran puentes de bisulfuros muy estables, dando finalmente la forma tridimensional de la proteína. Pero también otras cadenas laterales son capaces de participar en los enlaces como para formar algún tipo de puentes de hidrógenos como nos los muestra la **Tabla 1** e **Imagen 7**, vemos la relación de los 20 AA., s y las diferentes cadenas laterales que presentan, para posteriormente poder deducir los tipos de enlaces que pudieran llegar a presentar.

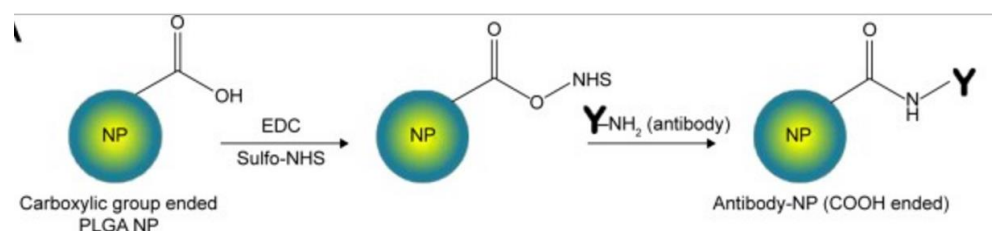


**Imagen 7.** Clasificación por subgrupo de los aminoácidos en base a las características y propiedades químicas que presentan sus cadenas laterales. (Navarrete, 2007)



**Tabla 1.** Diferentes tipos de puentes de hidrogenos que pueden llegar a presentarse en algunas estructuras de macromoleculas. (Quimica-Fisica, s.f)

Al analizar un poco la Tabla 1 e Imagen 2, podemos predecir algunos enlaces posibles que pueden llegar a presetar los AA,s que conforman a una proteina, los enlaces disulfuros son presentandos por dos cisteinas, quienes en su cadena lateral terminal tienen atomo de azufre. O aquellos aminoacidos que en su cadena terminal tengan algun grupo carbonilo e hidroxilo, podrian presentar puentes de hidrogeno de tipo hidroxilo-carbonilo como por ejemplo Aspargina, Glutamina que presentan un grupo carbonilo en union con alguna Tirosina con hidroxilo. Es posible enlaces ionicos entre aquellos peptidos que tiene cargas negativas y positivas como en el caso de Histidina, Arginina, Lisina, Acido Aspartico y Gluctamico en donde los primeros tres presentan una carga positiva y los ultimos con carga negativa. En la **Imagen 8**, se puede apreciar un esquema de metodo quimico que se usó para funcionalizar NPs de PLGA con un anticuerpo mediante un ligando.



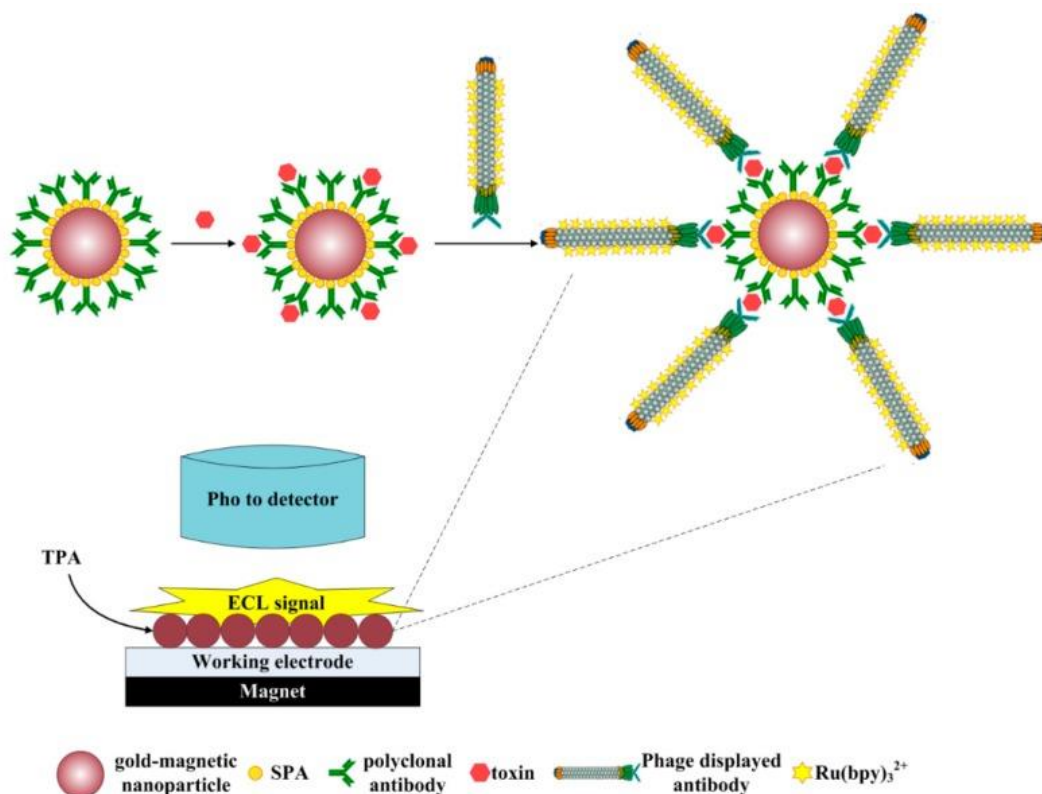
**Imagen 8.** Esquema de funcionalización de NPs de PLGA con un anticuerpo. (Tasnim Jahan & Haddadi, 2015)

Se hace énfasis en las características de los aminoácidos porque es gracias a estas características por la cual una proteína es capaz de unirse a partir de alguno de sus aminoácidos a algún sistema formado por otras moléculas que tienen disponibles algún grupo funcional compatible con los grupos funcionales de los aminoácidos. Es precisamente lo que se espera que pase cuando se intenta funcionalizar algunas nanopartículas poliméricas, como en el caso de las de PLGA, que pueden presentar un carboxilo o amino terminal y que gracias a este, una proteína se le podrá conjugar.

Antes de hablar de un ejemplo de NPs funcionalizadas con Acs, es importante mencionar que el PEG es un agente muy empleado en la industria farmacéutica y que muchos de las formas farmacéuticas que se comercializan en el mercado, contienen en sus formulaciones este agente, al ser exógeno y estar constantemente en contacto con el organismo, este empieza a formar anticuerpos anti-PEG, que finalmente serán los responsables de contrarrestar la concentración y biodisponibilidad final de aquellos sistemas en donde el PEG le sirve como agente de estabilidad, como sería el caso de las nanopartículas ligadas al PEG.

Mencionado lo anterior, vemos el primero de los ejemplos. Christine E. Henry y sus colaboradores en su trabajo titulado *Anti-PEG antibodies alter the mobility and biodistribution of densely PEGylated nanoparticles in mucus* adicionaron en la mucosa cervical de un ratón anticuerpos anti-PEG IgG e IgM, estos anticuerpos se unieron selectivamente a los PEG ligados a las nanopartículas, reduciendo la movilidad del 95% de las NPs-PEG a tan solo el 34% cuando se trató de anti-PEG IgG y 7% cuando fue con anti-PEG IgM. Imposibilitando así la penetración de las NPs a las mucosas y llegar a circulación sistémica. Aunque este trabajo su objetivo fue demostrar de manera negativa la unión de un anticuerpo a NPs ligadas a un PEG. **(Henry CE, 2016)**

Las NPs pueden ser elaboradas de diferentes materiales y muy variados entre sus características fisicoquímicas, que pueden ser a partir de cadenas poliméricas o a partir de materiales inorgánicos como el caso de un hierro u oro, entre otros muchos más materiales que ya fueron mencionados en el apartado de vectorización. Por ello del siguiente ejemplo del que vamos a hablar en donde fue funcionalizado las NPs con un anticuerpo, es precisamente unas nanopartículas superparamagnéticas de Oro. Estas NPs fueron recubiertas por proteínas llamadas *proteína A* (SPA) de *Staphylococcus sp* y posteriormente ligadas a anticuerpos policlonales que serán capaces de unirse específicamente a las toxinas de *Staphylococcus* y finalmente un segundo anticuerpo, un fago recubierto de Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, se une a la misma toxina, formando así un complejo *Sandwich*, este complejo formado emite quimioluminiscencia como lo muestra en la **Imagen 8** y finalmente será mucho más sensible que el método tradicional ELISA como método de diagnóstico, 2500 veces más sensible. (Xihui Mu, 2016)



**Imagen 9.** Complejo inmunosensor de diagnóstico.

Con los dos ejemplos que se vio, se puede estimar que es totalmente viable poder funcionalizar cualquier tipo de NPs con cualquier tipo de anticuerpos, si hay necesidad, posiblemente se puede emplear un ligando como el PEG.

## **2.2 Nanopartículas funcionalizadas con péptidos**

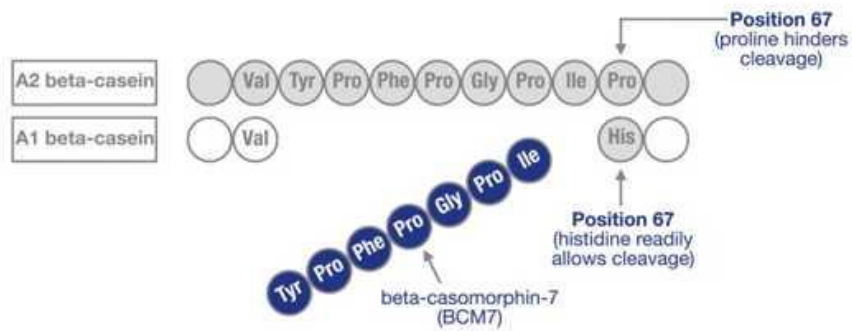
Como se explicó en el apartado de funcionalización de NPs con anticuerpos, se detalló que los anticuerpos son complejos proteicos formados a partir de largas cadenas de polipéptidos que adquieren sus formas tridimensionales gracias a los enlaces que forman las cadenas laterales de cada aminoácido de la cadena. Por ello, cuando hablamos de funcionalizar NPs con péptidos, estamos refiriéndonos a estas mismas unidades que forman una proteína compleja, pero en este caso serán cadenas de péptidos mucho más cortas, y para ser considerados como péptidos, no deberían de sobrepasar los números de aminoácidos que empiezan a tener proteínas, pequeñas pero complejas como es el caso de la insulina, que es una proteína bioactiva de 51 unidades de aminoácidos. Por ello, generalmente las secuencias de cadenas de 3 a 20 AAs (**Mulero Cánovas, y otros, 2011**)

Los péptidos funcionales o bioactivos no son otra cosa más que un fragmento de secuencias de aminoácidos inactivos de una proteína precursora que pueden ser de origen vegetal (soya, trigo, maíz, arroz, cebada y girasol) o de animal (leche y sus derivados, ovoalbúmina de huevo, en la carne, en musculo de pescados como la sardina y atún, además, en la jalea real de la abeja) y que una vez que este se somete a hidrolisis químicos o por acciones enzimáticas, liberaran secuencias cortas de péptidos que presentaran algún tipo de efectos biológicos, ya sea positivo o negativo según a partir de efectos que se espera o se busque con ellas. (**Mulero Cánovas, y otros, 2011**)

Al ser cadenas cortas y pequeñas, los peptidos pueden atravesar el epitelio y lograr ingresar a la circulación sistémica y por tanto poder llegar a ejercer funciones específicas a nivel local en el tracto gastrointestinal cuando aun no han llegado a circulación y ya estando en circulación, podrían participar en el metabolismo celular, actuar como factores de crecimiento, inducir liberación o inhibición de hormonas, actuar sobre neurotransmisores y otras muchas más acciones biológicas.

Un ejemplo de péptido funcional, son aquellos que se le atribuye actividad antimicrobiana e inmunomoduladores, que se relaciona a su carga positiva neta al organizarse estructuralmente y al llegar a estar en contacto con las membranas de los microorganismos, tienden a formar canales iónicos, alterando la permeabilidad del organismo y culminando con la muerte de estos.

Ejemplo más específico es el péptido que se deriva de la lactoferrina, una proteína de origen lácteo, al ser desfragmentada para su absorción, libera el fragmento Lys-Arg-Asp-Ser que tiene la capacidad de inhibir de manera dosis dependiente la agregación plaquetaria. Éste fragmento finalmente podría clasificarse como un anti-trombótico. Otro ejemplo más, es el fragmento formado por 7 aminoácidos, llamado B-casomorfina-7 (beta-CM-7, **Imagen 9**), es un péptido que se deriva del hidrolisis de la caseína del grupo A1, precisamente otro de origen lácteo. A este fragmento se le ha atribuido una participación en varias funciones biológicas, pero aún no se ha confirmado a cierta, si en realidad es así. Hay una teoría que sostiene que el fragmento participa en la producción de mucosidades en mucosas de las vías respiratorias (**Bartley J, 2010**). Otras casomorfina pueden tener funciones inhibitorias en los receptores opiáceos y por tanto considerarse como antagonistas de la familia de las morfina. En contrastes, las exorfina, que son también derivados de la caseína, se les relaciona con una actividad contraria, es decir se le atribuye a que tienen afinidad a los receptores opiáceos y por tanto tener provocar efectos muy similares a las que provocan las morfina.



**Imagen 10.** Secuencias de aminoácido de una B-casomorfina-7 (beta-CM-7)

En **Tabla 2** se muestran los diferentes tipos de péptidos funcionales, sus diferentes funciones biológicas al que se le atribuye y a las proteínas origen de cada una

, además del nombre que reciben.

<i>Efecto</i>	<i>Origen</i>	<i>Nombre/secuencia</i>
Inhibidores de ECA/hipotensores	Soja	NWGPLV
	Pescado	LKP, IKP, LRP (derivados de sardina, bonito, atún, calamar)
	Carne	IKW, LK
	Leche	Lactoquininas (WLAHK, LRP, LKP)
	Huevo	Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP) KVREGTTY Ovokinina (FRADHPPL) Ovokinina (2-7) (KVREGTTY)
Inmunomoduladores	Trigo	IAP
	Broccoli	YPK
	Arroz	GYPMYPLR
	Leche	Inmunopéptidos (ej. s1inmunocasoquinina) (TTMPLW)
Citomoduladores	Leche	$\alpha$ -Casomorfina [HIQKED(V)], $\beta$ -casomorfina-7 (YFPFGPI)
Opioides agonistas	Trigo	Exorfinas A4, A5 (GYYPY), B4, B5 Y C (YPISL)
	Leche	$\alpha$ -Lactorfinas; $\beta$ -Lactorfinas Casomorfinas
Opioides antagonistas	Leche	Lactoferroxina Casoxinas
Antimicrobianos	Huevo	Otap-92 (f 109-200)
	Leche	Lactoferricina
Antitrombóticos	Leche	$\kappa$ -CN(f106-116), casoplatelinas
Quelantes de metales, anticariogénicos	Leche	Caseinofosfopéptidos
Hipocolesterolémicos	Soja	LPYPR
	Leche	IHAEK
Antioxidantes	Pescado	MY
	Leche	MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI

**Tabla 2.** Péptidos biológicamente activos derivados de proteínas (F. Herrera Chalé, 2014)

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1letra)
Ac. Aspártico	Asp	D
Ac. Glutámico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N
Histidina	His	H
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Alanina	Ala	A
Glicina	Gly	G
Valina	Val	V
Prolina	Pro	P
Leucina	Leu	L
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Triptofano	Trp	W
Cisteína	Cys	C

**Tabla 3.** Tabla complementaria para las abreviaturas que se usan en referencia a las secuencias de péptidos bioactivos de la **Tabla 1**. Leu-Ala-Trp-Lys-Arg-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys,

Otro ejemplo de péptidos bioactivos son los dos tripéptidos: uno formado por los aminoácidos valina-prolina-prolina (VPP) y otro por isoleucina-prolina-prolina (IPP) son capaces de inhibir la enzima Convertidora de angiotensina (ECA) y dar efectos antihipertensivos, como lo hacen los Inhibidores sintéticos de la ECA como el captopril, enalapril, lisinopril y ramipril. Así como estos ejemplos anteriores, podemos seguir mencionando muchos más, donde no podríamos terminar, ya que son muchísimos los mecanismos donde se presume que los diferentes péptidos con diferentes proteínas precursoras tienen algún efecto bioactivo deseable, muchas de estas presunciones son apenas hipótesis, otras son más estudiadas. Pero al hacer una relación de todos los procesos bioquímicos que se presentan en todo el organismo como tal, es algo imposible de poder concentrar. **(Herrera Chalé, 2014)**

Lo más importante de saber acerca de los péptidos bioactivos es, precisamente lo que ya se comentó en párrafos anteriores; que son secuencias de aminoácidos que se desprenden de proteínas complejas y dependiendo del número de aminoácidos y el orden que tengan estos pequeños fragmentos de secuencia, serán los factores directos para dar funciones bioactivas.

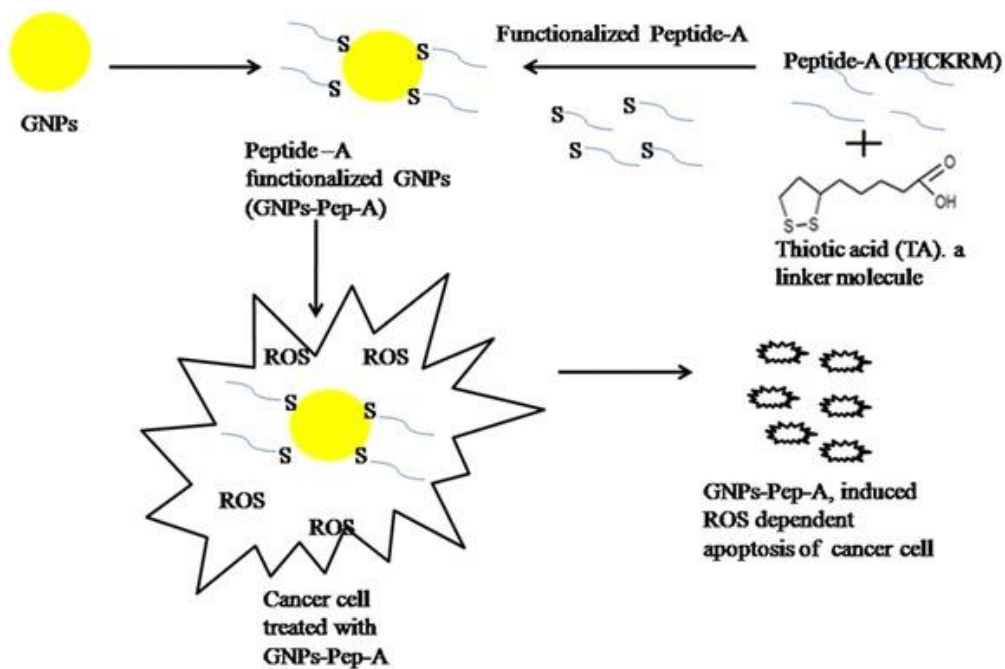
Como se planteó en el apartado de funcionalización de nanopartículas con anticuerpos, lo que se pretende en este apartado es precisamente poder explicar que los péptidos también son capaces unirse a las moléculas que conforman a las NPs y esto es posible debido a que un péptido tiene un amino y carboxilo terminal, características químicas necesarias para formar diferentes enlaces químicos, además, cada aminoácido tiene una cadena lateral que le confieren otras características químicas que de igual manera son capaces de participar en los enlaces químicos a las NPs, de esta manera obtener NPs funcionalizadas con péptidos.

Se sintetizaron NPs de oro, a los cuales se les funcionalizaron con un péptido de 10 aminoácidos (Leu-Ala-Trp-Lys-Arg-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys; LA-WKRAKLAK) que tienen la capacidad de inducir la apoptosis intrínseca a las células cancerosas, pero como al estar como péptidos libres, no logran internalizarse en grandes cantidades a las células cancerosas y por tanto su eficacia se ve disminuida, se espera que al vectorizarse con NPs, la internalización incremente y por tanto su eficacia. **(Akrami M, 2016).**

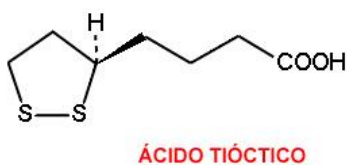
Otro ejemplo de funcionalización de NPs es uno parecido al mencionado, en donde las NPs empleadas son de Oro, pero a diferencia del anterior en este trabajo se intentó funcionalizarlas con unas secuencias de aminoácidos (Pep-A: *Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met* (PHCKRM) que tienen propiedades antioxidantes y tienen la capacidad de provocar apoptosis en aquellas células cancerosas que son reactivas al oxígeno. Pero para poder ligarse a las NPs de oro, fue necesario una

molécula enlazadora entre el péptido con la NP, en este caso el ácido tióctico, un antioxidante natural muy potente (**imagen 11**) fue el seleccionado.

El resumen de este proceso de funcionalización, nos lo muestra la **Imagen 10**. (Kalmodia S, 2016)



**Imagen 11.** Síntesis de los NPs -Pep-A (PHCKRM) y su efecto antioxidante. Presentación esquemática de la reacción química llevada a cabo para la funcionalización de NPs de Oro empleando el Acido tióctico como enlazante en la funcionalización y los efectos antioxidantes en células cancerosas de manera *in vitro*. (Kalmodia S, 2016)



**Imagen 12:** Estructura molecular del ácido tióctico.

En resumen, los péptidos pueden tener la capacidad de llevar funciones biológicas específicas o múltiples, donde unos son más estudiados que otros, pero que finalmente cualquier péptido podría ser funcionalizados con cualquier sistema de NPs como sucede con los Acs.

### **2.3 Nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico.**

Existen diferentes tipos de padecimientos oncológicos, en donde el lugar de aparición en el cuerpo humano, las células cancerígenas son imprescindible y tan variado. Pero se ha demostrado que independientemente de la zona afectada, todas las células cancerosas tienden a compartir características fisicoquímicas similares entre sí. Por ejemplo, se ha demostrado que estas células generan un ambiente más ácido en zonas donde se encuentran y al mismo tiempo una mayor temperatura, además expresan en sus superficies algunos receptores propios que en muchas ocasiones sirven para su identificación, diferenciación y diagnóstico al resto de las otras células similares.

Estamos haciendo énfasis y centrando esta investigación en relación a los temas oncológicos del campo de la medicina, porque es donde mayormente las investigaciones actuales con nanopartículas se centran prioritariamente. Gracias a las características muy peculiares y propias de las células cancerígenas, donde muchas de las investigaciones parten para lograr encontrar un tratamiento eficaz.

El ácido fólico o folato (llamada también así en su forma aniónica) es una vitamina hidrosoluble de la familia de los complejos B que naturalmente tiene muchas funciones entre ellas y la más importante su participación en la síntesis de purinas, que forman parte de los nucleótidos y a su vez son las unidades básicas de la cadena de ADN, por tanto podemos decir que el ácido fólico en su forma reducida como tetrahidrofolato (FTH4) es esencial para la síntesis del ADN y por ende, en la replicación celular. **(Pita Rodriguez, 1998)**

Así mismo el ácido fólico está siendo aprovechando alternamente a sus funciones naturales. Un ejemplo de esto es el trabajo de Bárbara Stella y colaboradores en su publicación, donde presentan un trabajo en el cual, aprovechan la información que se tiene acerca de células cancerosas en especial las ováricas que se ha demostrado que expresan en grandes cantidades receptores del ácido fólico; **(Ni, y otros, 2016)** por ello, proponen el uso de nanopartículas recubiertas por moléculas del poli etilenglicol (PEG), las cuales son empleadas para realizar unión química con moléculas de ácido fólico (unión entre la terminación amina del PEG y el ácido carboxílico del folato ) y finalmente formar complejos únicos y con éste sistema es posible llegar a las células cancerosas y las moléculas de folato se unan con sus receptores expresados en las membranas celulares para posteriormente desencadenar la liberación del fármaco anticancerígenos contenidos en las NPs. **(Stella , y otros, 2000)**

Un trabajo más que se relaciona con el empleo del ácido fólico, son NPs a base de las de óxido de hierro superparamagneticas que se une covalentemente con moléculas de etilenglicol y posteriormente éste se es conjugado con moléculas de ácido fólico, con la finalidad de poder biodirigirlos hacia sus receptores sobrepresados en células cancerígenas del carcinoma humano. Éste tipo de nanoconjugados están reportando resultados muy prometedores, como los resultados que reportan los experimentos del investigador Conroy Sun y sus colaboradores en su trabajo ; *Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI* donde reportan una captación por parte de las células cancerígenas del carcinoma humano de nanoconjugados con ácido fólico que fueron 12 veces mayor a los captados por las NPs que solo están unida en su matriz por PEG o dextrano. **( Sun, Sze, & Zhang, 2006)**

También se reportan trabajos muy similares al anterior, con la diferencia que las nanopartículas adicionalmente se conjugan con un cromóforo, en este caso el

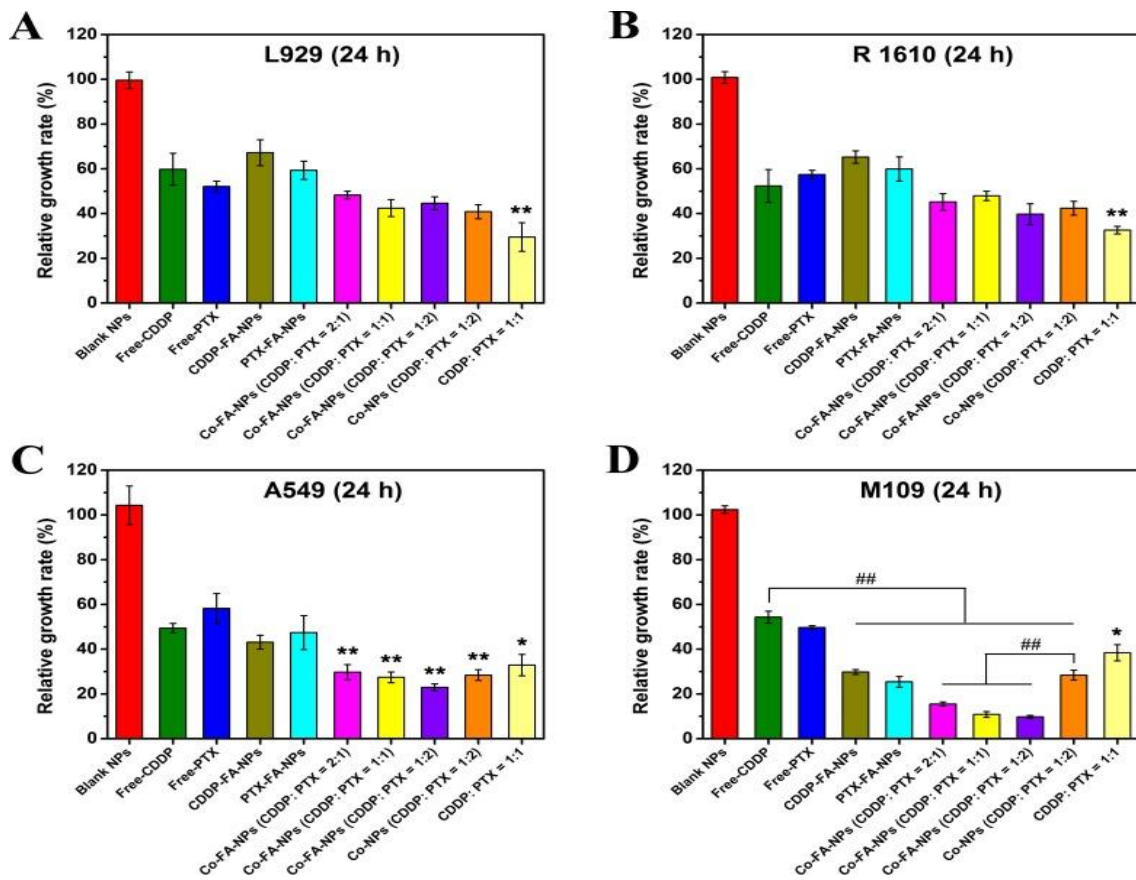
isotiocianato de fluoresceína. **(Mohapatra, Mallick, Maiti, Ghosh, & Pramanik, 2007)**

Por último, un ejemplo más de lleno relacionado directamente con el presente trabajo es el trabajo realizado por el investigador Zelai He y sus colaboradores en la universidad de Shanghái, China. Donde sintetizaron NPs de PLGA recubiertas en su matriz por moléculas de PEG unido de manera covalente a las terminaciones carboxílicas de las moléculas de PLGA, a su vez ligada a una tercera molécula, un ácido fólico, con la finalidad de que este último pueda unirse a su receptor sobrepresados en gran medida sobre las membranas de las células cancerosas.

Lo anterior tiene como objetivo lograr que las NPs lleguen de manera específica hacia las células cancerosas, pero en realidad la finalidad de un vector funcionalizado, es lograr llevar en su interior o sobre su matriz uno o más fármacos, buscando un efecto terapéutico. Por ello, en esta investigación se probaron experimentalmente el cargado y vectorización de cisplatino (cis-diaminodicloroplatino, CDDP) y paclitaxel (PTX), dos agentes quimioterapéuticos ampliamente usados como primera línea en varios cánceres (CAs) de etapa avanzada. Como moléculas libres de manera separadas. Efectivamente, los dos agentes han mostrado un alto grado de eficacia, en gran medida por el sinergismo que genera su co-administración. Mas, sin embargo, a mayor eficacia, mayor sinergismo y se ha demostrado que mayor son los efectos tóxicos, en especial la nefrotoxicidad relacionado directamente con el CDDP. Es importante también recalcar, cuando no se trata de una co-administración, los efectos nefrotóxicos del CDDP, significativamente es mucho menor. **(He Z, 2015)**

Lo que se explica en el párrafo anterior es la razón por el cual Zelai He y sus colaboradores deciden evaluar los efectos neurotóxicos de estos dos agentes, en especial el CDDP, en 3 líneas paralelas, una cuando son administrados por separados de manera libre, otra cuando son co-administrados de manera libre y

por ultimo cuando son vectorizados de manera conjunta en la matriz de las NPs PLGA-PEG. Reportando los resultados que muestran en la **Figura 1**.

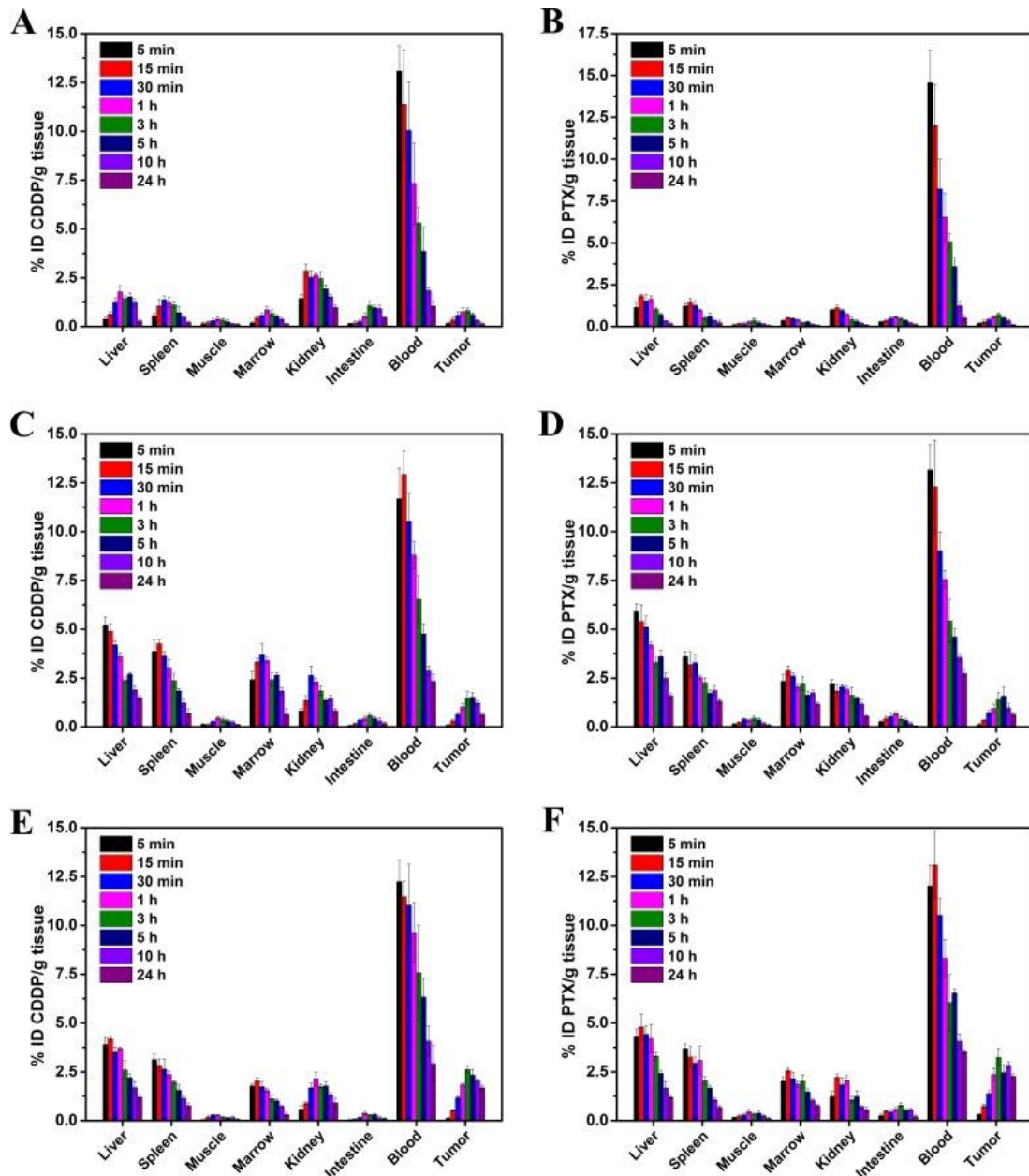


**Figura 1.** Resultado del crecimiento relativo y citotoxicidad *in vitro* de las 4 diferentes líneas celulares cancerosas **L929** (fibroblastos de rata), **R 1610** (células de pulmón de hámster), **M109** con receptor de ácido fólico (FR) positivo (células de carcinoma de pulmón de ratones *Murino*) y **FR-A549** negativa (células cancerosas de pulmón humano) posterior a estar expuesto. (He Z, 2015)

Como se puede apreciar, se emplearon combinaciones diferentes en la manera de administrar CDDP y PTX, donde las subgráficas A y C, presentan un grado de viabilidad de células significativamente mayor en comparación a las últimas dos subgráficas, esto se atribuye a que en las primeras 2 subgráficas, representan el resultado dos grupos de células sanas y por tanto tienen un tiempo de replicación menor en comparación con las últimas dos, que efectivamente se

tratan de células cancerosas. En relación a estos dos últimos resultados evidentemente el último da mejor resultados y esto se relaciona directamente en que estas células expresan receptores de folato positivamente y se correlaciona con las NPs funcionalizadas con moléculas de ácido fólico o folato. **(He Z, 2015)**

En la **figura 2** de los resultados de este mismo trabajo podemos apreciar la concentración *in vivo* alcanzadas con las diferentes maneras de administrar y co-administrar CDDP y PTX, ya sea de forma libre o vectorizados y los resultados evidentemente, cuando son vectorizados, el resultado es prácticamente casi el doble de eficacia en comparación a la administración libre.



**Figura 2.** Resultados de la distribución tisular cuando la administración es; **A)** CDDP libre, **B)** PTX libre. **C)** CDDP-NPs **D)** PTX-NPs, **E)** CDDP-FA-NPs Y **F)** PTX-FA-NPs en relación a diferentes tiempos de medición a su post-administración. (He Z, 2015)

Finalmente, de este trabajo, podemos decir que efectivamente las NPs de PLGA funcionalizados con moléculas de ácido fólico registran resultados muy prometedores hacia el tratamiento de células cancerosas que expresen positivamente receptores de folato.

### 3 PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECIFICOS.

En este apartado vamos a describir brevemente las técnicas generales para producir un anticuerpo monoclonal. Pero antes de empezar, primeramente, vamos a definir unos conceptos básicos.

#### *Anticuerpo monoclonal.*

Un anticuerpo monoclonal (AcM), es un anticuerpo proveniente de una célula única de linfocito, estos anticuerpos son idénticos entre si y lo más importante, que tienen la capacidad única de unirse específicamente a un solo tipo de antígeno. Y por ingeniería genética, su producción sin límite se logra a partir de un hibridomas.

#### *Hibridoma.*

Es una célula híbrida resulta de la fusión de dos células diferentes, una es un tipo de células linfocíticas que se ha demostrado previamente que producen un único anticuerpo y la segunda célula, es una tumoral del mieloma, que tienen la capacidad de replicarse rápida e indefinidamente, por eso la célula resultante es capaz de producir sin límite los llamados anticuerpos monoclonales.

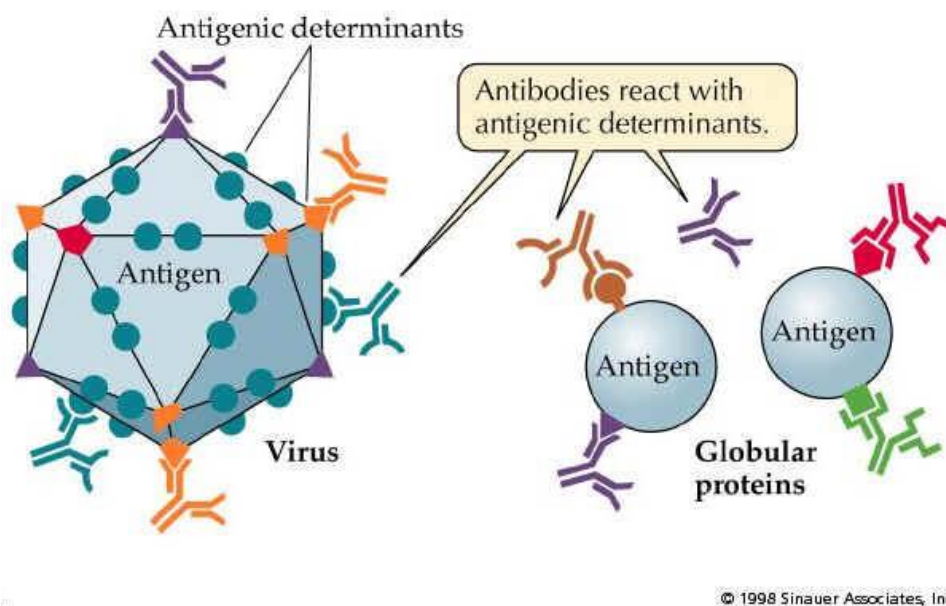
#### *Antígeno.*

Es un microorganismo, fragmento del organismo o una molécula/macromolécula que al ingresar al organismo es capaz de activar células T y por tanto inducir a Linfocitos B a iniciar con las síntesis de anticuerpos específicos contra el antígeno. **(Smedley, 1986)**

### Complejo antigénico.

Cuando un microorganismo ingresa al organismo, actuará como antígeno, pero como los microorganismos, como una bacteria pueden expresar en sus superficie cientos, hasta miles de proteínas únicas, a los que llamados determinantes antigénicos, inducirán a que se formen un anticuerpo específico para cada una de ella, es decir un Anticuerpo monoespecíficos (AcM). **(Smedley, 1986)**

En la **Imagen 13** se muestra teóricamente como es el reconocimiento de un anticuerpo específico a su antígeno.



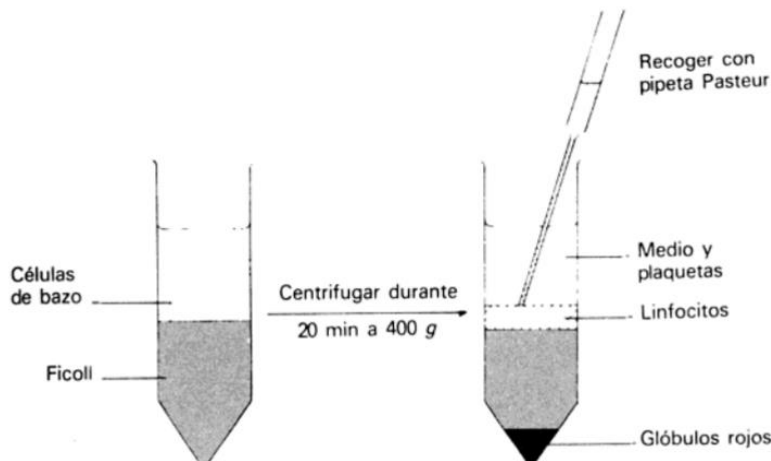
**Imagen 13.** Imagen representativa del reconocimiento de los anticuerpos específicos a sus antígenos.

Con los conceptos anteriores poco más claro, veamos de manera muy resumida como es el proceso de las técnicas conocidas para la producción sin límite de anticuerpos monoclonales, empezando con el más común.

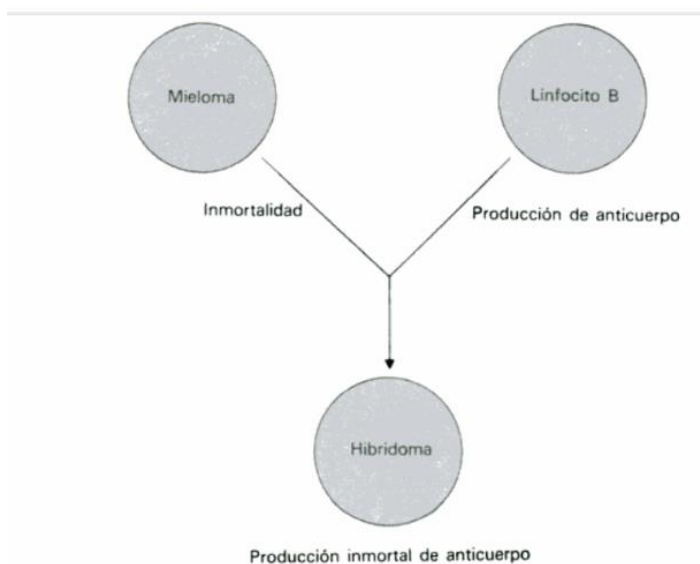
### **3.1 Producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas.**

Para poder fabricar grandes cantidades y sin límites de anticuerpos monoclonales, lo primero que se lleva a cabo es la incorporación de un antígeno exógeno en pequeña cantidad organismo del animal, para que cuando este entre en contacto con el sistema inmune, los linfocitos T se activen y presenten al antígeno antes los linfocitos B que finalmente serán quienes se encargarán de reconocer al antígeno y empezar a sintetizar un anticuerpo específico contra este. Para esto, es necesaria estimular al sistema inmune con varias dosis en diferentes tiempos para finalmente poder obtener gran número de células productoras del anticuerpo y se puedan aislar, en consecuencia poder continuar con el siguiente paso. **(Smedley, 1986)**

El siguiente paso consiste en extraer del bazo, los linfocitos B productoras de anticuerpos, con ayuda de la solución Ficoll, se separa las demás células de los linfocitos, en este caso los eritrocitos que no son de utilidad. **(Imagen 14)**. Por técnicas de ELIISA, se reconoce aquellos linfocitos productores de los anticuerpos deseados. Una vez que estas células han sido identificadas, se prepara una solución de poli etilenglicol 4000 - 6000 (PEG 4000-6000) al 50% (p/v) el cual será el agente químico que ocasionará la fusión con células inmortales, es decir con células tumorales del mieloma humano para formar ahora si, a lo que se llama un hibridoma. **Imagen 15**, después se emplea el medio HAT para discernir de aquellas hibridomas no viables y solo quedarse con las que viables, que serán solo las que sobrevivan en este medio. **(OteroGonz-lez., 1995)**

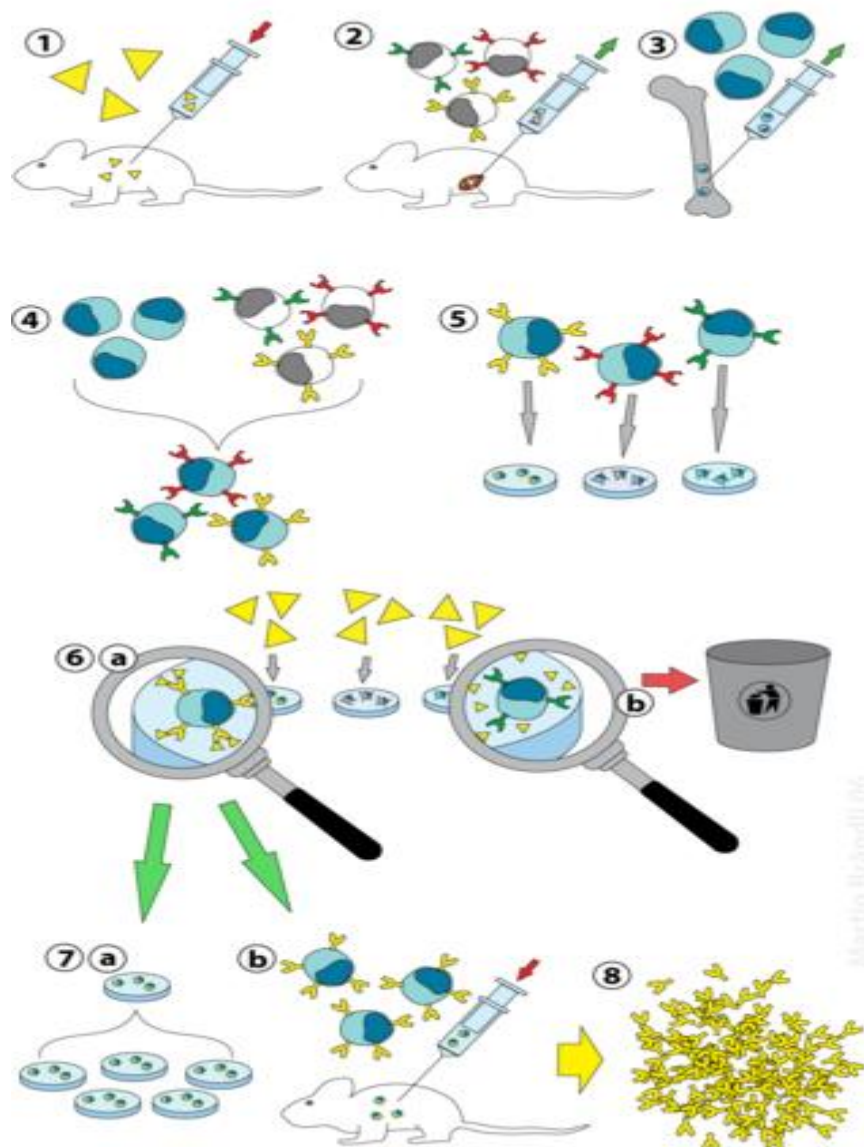


**Imagen 14:** Separación de los componentes extraídos del bazo del animal inmunizado para obtener solo las líneas linfocíticas en el sobrenadante empleando la solución de Ficoll.



**Imagen 15.** Fusión de una célula tumoral con un linfocito B (productor de anticuerpos) para formar un hibridoma. (Smedley, 1986)

El hibridoma obtenido después de selección por el medio HAT, inicialmente son en pocas cantidades, por ello es necesario que se cultiven en medios adecuados para iniciar con la clonación en masa y posteriormente, discernir entre todas estas nuevas clonas, las que realmente producen el anticuerpo deseado. Todo lo anterior, desde la inyección del antígeno, se resume en la **Imagen 16.**

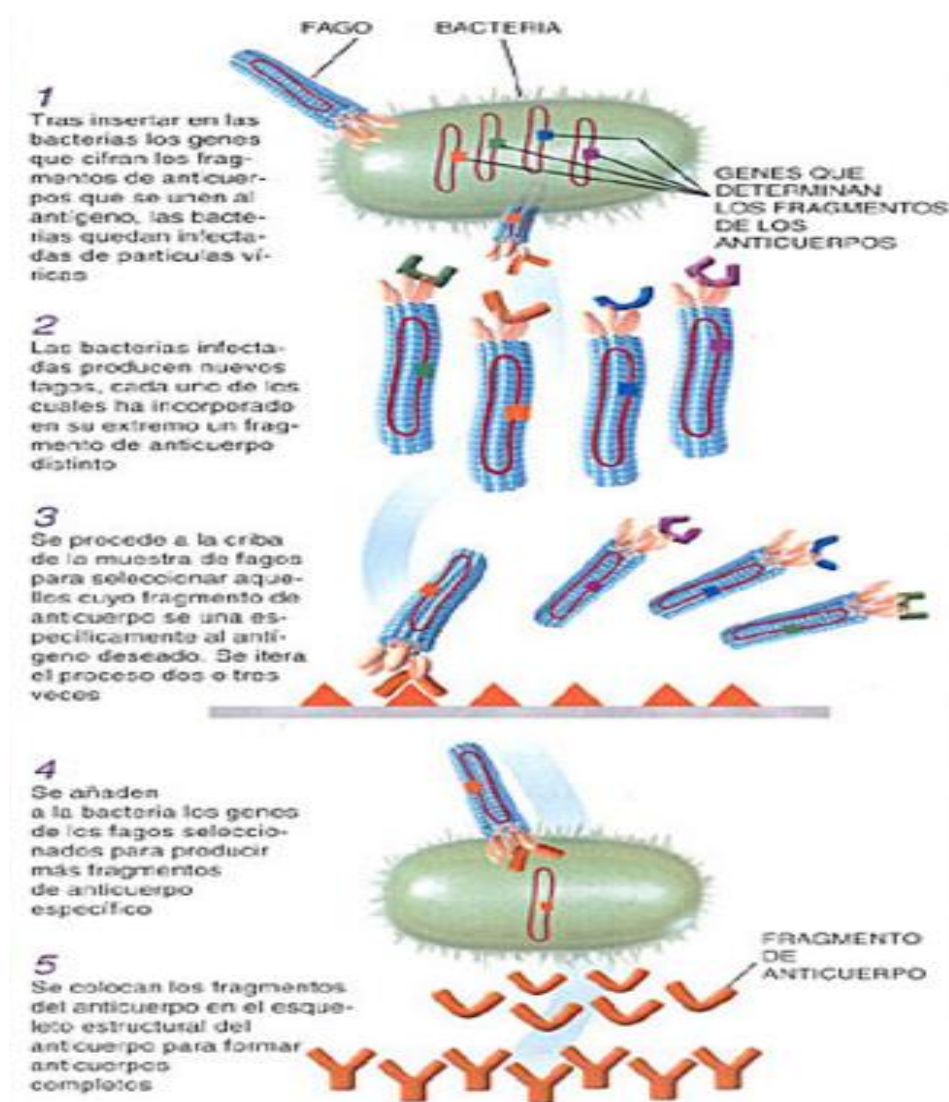


**Imagen 16:** Esquema general de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales (AcM) (Latinoamericana, 2001)

### 3.2 Producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas.

Otra de las técnicas más empleado para producir AcM es por medio de fagos o bacteriófagos (virus que infectan exclusivamente a bacterias). En resumidas palabras quiere decir que se infecta a una bacteria con un fragmento de ADN que codifica para el anticuerpo de interés, que previamente es incorporado al virus, posteriormente este sirve como vector para finalmente será quien incorpore el

fragmento de ADN a la bacteria que codifica para la proteína de interés en la cadena de ADN de la bacteria. Por tanto este, será capaz de expresarlo y de esta manera producir parte de un anticuerpo que posteriormente será unido a la base estructural de un anticuerpo. Como se ilustra en la **Imagen 17**.



**Imagen 17:** Producción de AcM por medio de bacteriófagos o fagos. (Latinoamericana, 2001)

## 4 AMIBIASIS

Para poder hablar de lo que es amibiasis, como en los demás apartados, es importante primero comprender algunos conceptos y definiciones antes de entrar de lleno en el tema.

- Protozoo.

Los protozoos son células eucariotas simples (organismos cuyas células tienen membrana nuclear) son móviles y heterótrofos. El término viene dado por la etimología *proto*: primero y *zoo*: animal, avalando la hipótesis de que son los seres vivos más antiguos, fueron las primeras células existentes. **(Berenguer, 2006)**

- Pseudópodos

Palabra compuesta por 2 palabras de origen griega, en donde la primera; *Pseido* que significa "falso" y *podos* que significa "pies". Es decir, una palabra compuesta que significaría pies falsos. Y este término se emplea para referirse a microorganismos capaces de extender y contraer el contorno de su citoplasma para poder moverse, es decir, crean pies falsos. **(Berenguer, 2006)**

- Trofozoíto, Quiste.

El Trofozoíto es la forma madura de las amebas, el cual es el que realmente causa la infección, el que tiene la capacidad de formar pseudópodos que usa para su movilidad, además de usarlo para fagocitar sus alimentos; y el quiste es la forma inmóvil encapsulado con 4 núcleos que puede sobrevivir a condiciones ambientales y es el estadio infectante de las entamoebas, el primero se destruye al instante en el medio ambiente. En la

Imagen 18 se muestran el ciclo biológico de las *E. histolytica*. (Berenguer, 2006)

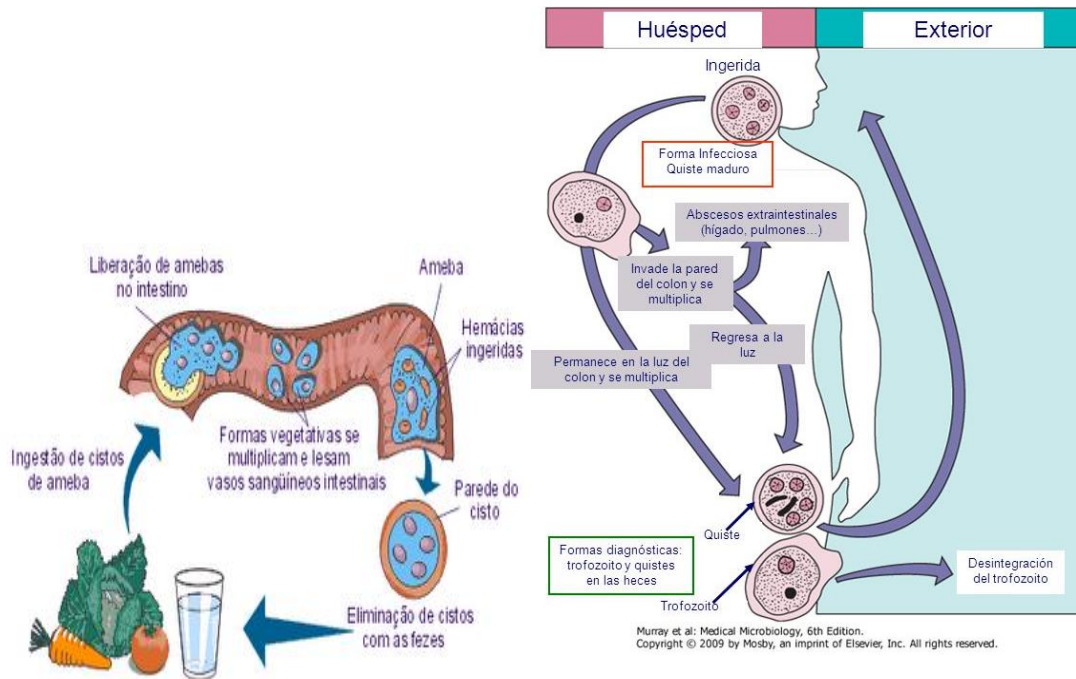


Imagen 18. Ciclo biológico e infectante de la *E. Histolytica*.

- Disentería.

Término médico que se emplea para referirse a trastornos digestivos que cursan con rasgos de sangre y/o moco en las heces, pujo, cólicos y deseos de evacuar sin lograrlo por completo. ( Osuna Torres, 2005)

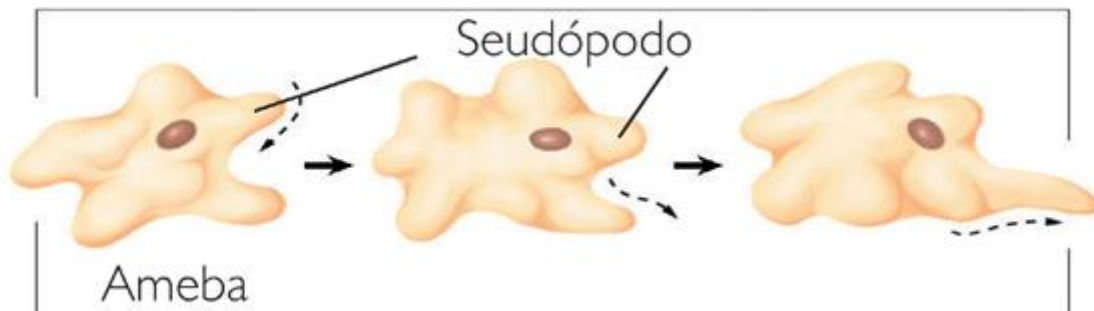
- Parásito.

Hablando de microorganismos, se refiere a aquellos seres que se alimentan a costa de otros seres, es decir, no tienen la capacidad de producir sus propios alimentos y por tanto tienen que colonizar e infectar a otros organismos vivos para sobrevivir. (Osuna Torres, 2005)

- Citoplasma, Endoplasma, Ectoplasma.

El citoplasma es la parte interna del microorganismo, constituida por pequeños gránulos y filamentos suspendidos, en un medio con características de un coloide. En los protozoos el citoplasma tiene dos subdivisiones muy notorio, una interna que se le llama endoplasma, el cual contiene el núcleo y la mayoría de los organelos citoplasmáticos y está la parte externa que se llama ectoplasma, un tipo estado gel y diferenciada con el endoplasma por su aspecto hialino más o menos refrigero. Esta última capa es la responsable para un que un protozoo pueda formar lo que se llama pseudópodo y con ello poder tener movilidad y desplazamiento.

**Imagen 19. (Berenguer, 2006)**



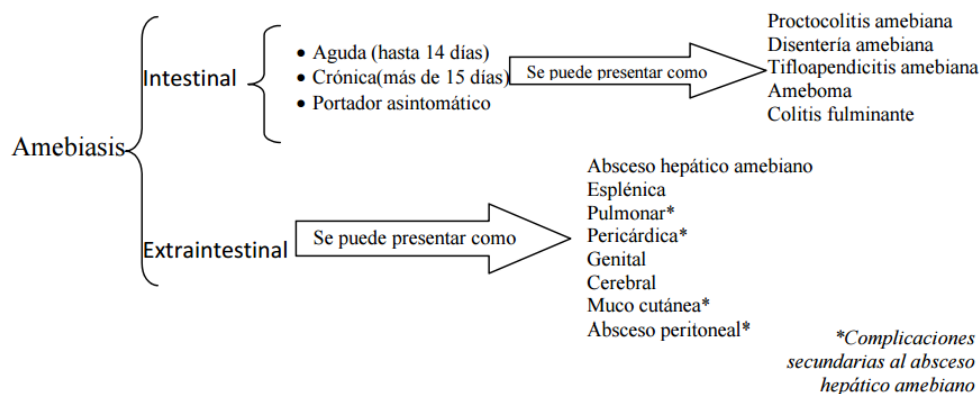
**Imagen 19.** Formación de pseudópodos en una ameba.

Posterior a estas haber explicado términos estrechamente ligadas con la amibiasis, a continuación explicaremos la definición de la enfermedad en sí, su agente etiológico, epidemiología, trastornos que causa, tratamiento más actualizado y por último, hablar de algunas proteínas que expresan que pueden ser de relevancia para el objetivo del presente trabajo.

#### 4.1 Definición de amibiasis:

La amibiasis es un trastorno principalmente intestinal o extraintestinal causado por el parásito *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) o en coexistencia con otro parásito con el mismo mecanismo de virulencia. Y la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la amibiasis como "infección provocada por *E. histolytica*". (Cuevas, 2012)

#### Clasificación de las amibiasis (imagen 20)



**Imagen 20.** Clasificación de la amibiasis. (Cuevas, 2012)

#### 4.2 Epidemiología

La amibiasis es la tercera causa de mortalidad por parásitos en el mundo, tan solo después de la malaria (causadas por uno o más de los parásitos del género *Plasmodium*) y el esquistosomiasis (trematodos del género *Schistosoma*)

En diferentes literaturas revisadas, todos coinciden que entre 10 a 20% de la población mundial está infectado por el parásito de *E. Histolytica*, pero que alrededor del 90 % permanecen con una infección latente, mientras que alrededor de los 10% desarrollan la enfermedad. De este porcentaje, en las diferentes bibliografías, se reportan cercas de 50 millones de la población mundial desarrolla

la enfermedad, y de este número, superan las 100.000 muertes anuales. Pero tomando en cuenta el porcentaje estimado de personas infectadas y el número actual de población mundial, esta cifra se dobletea. En la **Tabla 2**, se muestran datos demográficos más reciente de la población mundial en una de las publicaciones de la ONU, *Populación and Vital Statistics Report Statistical Papers Series A Vol. LXVIII* de la. Analizando la tabla, podremos darnos cuentas que en realidad, sería más elevado el número de muertes que están reportando otras fuentes bibliográficas. **(Cuevas, 2012, Santiago Mauricio, 2010 Y Chacín-Bonilla, 2013)**

**1. Estimated mid-year population by major area and region, 2013 and 2014**

	Population (in thousands)	
	2013	2014
WORLD	7 181 715	7 265 786
AFRICA	1 127 576	1 156 649
Eastern Africa	373 081	383 675
Middle Africa	143 093	147 469
Northern Africa	215 589	219 736
Southern Africa	61 273	61 970
Western Africa	334 540	343 799
ASIA	4 305 102	4 349 561
Eastern Asia	1 598 170	1 605 408
South-central Asia	1 840 377	1 865 389
South-eastern Asia	618 724	626 181
Western Asia	247 831	252 583
EUROPE	737 561	738 016
Eastern Europe	293 658	293 333
Northern Europe	101 330	101 832
Southern Europe	152 976	152 629
Western Europe	189 598	190 222
LATIN AMERICA AND THE CARIBBEAN	620 799	627 641
Caribbean	42 584	42 897
Central America	168 172	170 461
South America	410 044	414 282
NORTHERN AMERICA	352 492	355 161
OCEANIA	38 185	38 759
Australia/New Zealand	27 736	28 118
Melanesia	9 260	9 441
Micronesia	515	521
Polynesia	674	679

Source: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). *World Population Prospects: The 2015 Revision, DVD Edition*

**Tabla 4.** Población mundial reportada en 2014, en una publicación de la ONU. **(O.N.U, 2016)**

### 4.3 Etiología

La forma quística del parásito, es quien tiene la capacidad de infectar, porque es resistente a las condiciones ambientales. Se mantendrá como quiste en el ambiente y su transmisión hacia el ser humano será por medio del consumo de alimentos que han sido contaminados con heces fecales. Los síntomas aparecen posteriores a las 48 horas post a ingesta del quiste. **(Cuevas Flores , 2012)**

### 4.4 Cuadro clínico.

El cuadro clínico va de leves a moderadas que pudieran ser náuseas, diarrea, pérdida, fatiga, dolor abdominal, colitis, molestias al evacuar y pudiendo presentar hasta grave. Si la infección se torna grave, puede presentar ulceraciones en la luz del colon causando disentería, y las formas más graves de la infección vienen dadas cuando hay diseminación a otros órganos y tejidos como pulmones, hígados, cerebro y otros. Estas afecciones se clasifican como se vio en la **Imagen 20. (Cuevas Flores , 2012)**

### 4.5 Farmacoterapia actual.

En los últimos años a la actualidad las drogas antiamebianas de elección se pueden clasificar en dos grupos principalmente, aquellos que actúan a nivel tisular y atacan a la fase trofozoítica invasiva del parásito que ha invadido a los tejidos mientras que el otro grupo tienen acción luminal (paramomicina, furoato de dilo-xanida y el teclozan (dicloroacetamida, siendo este el más usado) que destruyen a los trofozoíto que aún no son invasivos por contacto. Algunas otras drogas, como los grupos nitroimidazoles (Metronizol, tinidazol, ornidazol y secnidazol) actúan tanto en trofozoítos invasivos como no invasivos. Pero la acción de este

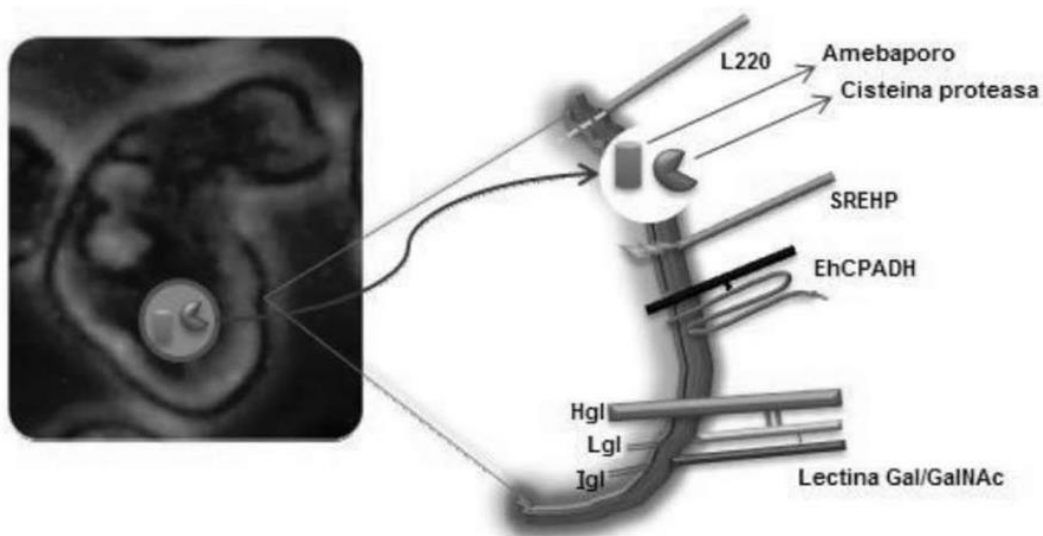
grupo de drogas contra aquellos trofozoítos no invasivos que permanecen en la luz intestinal, es muy pobre, por tanto es necesario co-administrarlo con otra droga que sea efectivo a este nivel. En la **Tabla 5** se concentra la información de este párrafo.

Amibiasis (tipos)	Droga de elección	Amibiasis (tipos)	Droga de elección
Extraintestinal		Intestinal	
Absceso hepático	Metronidazol	Asintomática	Paramomicina
	seguido por: Paramomicina		o Diloxanida
	o Diloxanida	Sintomática	Metronidazol
			seguido por: Paramomicina
			o Diloxanida

**Tabla 5.** Relación de fármacos de elección para las diferentes clasificaciones de la amibiasis. **(Chacín-Bonilla., 2012)**

#### 4.6 Factores de virulencia de *E. Histolytica*.

En bases a diferentes estudios experimentales en los últimos años, se ha demostrado que *E. Histolytica* tiene capacidad de colonizar, infectar y provocar cuadros clínicos que van desde cuadros leves a severos, como ya se planteó en párrafos anteriores. Pero en realidad que es lo que hace que este parásito pueda infectar al organismo humano y en especial a los epitelios de la mucosa intestinal, con énfasis en el colon. Bien, este parásito puede expresar sobre su membrana o secretar varias proteínas proteolíticas y de adhesión que le confieren esa capacidad de virulencia (**Imagen 21**) A continuación vamos a detallar un poco acerca del mecanismo de virulencia que tienen las principales proteínas secretadas o expresadas por *E. Histolytica*.



**Imagen 21** Proteínas expresadas/secretadas por el trofozoito de *E. histolytica* consideradas factores de virulencia. Las principales proteínas estudiadas a la fecha son: proteína de membrana de 220 kDa (L220), amebaporos, proteasas de cisteína, proteína rica en serina (SREHP), complejo heterodimérico adhesina/proteasa de cisteína (EhCPADH) y la lectina de adhesión lactina Gal/GalNAc. (**Trejos Suárez & Castaño Osorio, 2009**)

**Mecanismo de adherencia.**

Dentro proteínas más importantes participante en el mecanismo de virulencia de *E. Histolytica* se encuentran las proteínas de adhesión como la lectina Gal/GalNAc, una glucoproteína que tiene la capacidad de unirse a los residuos N-acetil-D-galactosamina, de las mucinas, proteínas que forman parte de la mucosa intestinal para poder empezar a desencadenar sus mecanismos de virulencia, y cuando estos residuos no son expresados en algunos organismos, como el de perros y gatos, las lectinas Gal/GalNAc no son capaces de adherirse a las mucosas y por tanto su capacidad patogénica en estos organismos se pierde dando como resultado a la no invasión en infección. Por otro lado, las mucinas al funcionar como mecanismos de defensa contra la adhesión de la *E. Histolytica*, esta responde con la secreción de más proteínas o enzimas citolíticas como glucosidasa, manosidasa, galactosidasa, fucosidasa, xilosidasa, glucoronidasa y N-acetil-D-galactosaminidasa, para generar la alteración de la mucosa y aumentar su afinidad por las proteasas y otras sustancias que la ameba secreta. **(Trejos Suárez & Castaño Osorio, 2009)**

Una proteína de adherencia muy importante de este parásito es adhesina EhADH112, se le relaciona directamente con el digerir a aquellas células que han sido fagocitada por el parasito, por tanto, es una de las proteínas más importante del mecanismo infectante de la *E. histolytica*. Otras proteínas que se le atribuye a la adhesina las células huésped es la proteína de membrana L220 y las llamadas proteínas ricas en Serina (SREHP) **(Trejos Suárez & Castaño Osorio, 2009)**

### **Formación de poros en la membrana de la célula huésped.**

Otra de las proteínas más importantes que la *E. histolytica* usa para llevar a cabo su mecanismo patogénico, son las proteínas solubles llamadas amebaporos, proteínas que son capaces de formar poros sobre la membrana de las células huésped y por tanto alterar la permeabilidad de las células huésped provocándoles finalmente lisis celular. Otras proteínas que se le atribuye la formación de poros en las células huésped es la Hemolisina III y Fosfolipasa A.

### **Proteínas que degradan la matriz de la extracelular del huésped.**

Las proteasas de cisteínas, son enzimas solubles que la parasito secreta y tienen la capacidad de destruir los tejidos. Esto se debe a que tienen la capacidad de degradar los componentes de la membrana celular como la fibronectina, laminina y colágeno, entre otros. Además de los efectos anteriores, estas proteínas son capaces también de degradar otras proteínas como la IgG e IgA. **(Trejos Suárez & Castaño Osorio, 2009)**

## **CAPITULO 3**

## **METODOLOGIA**

### **Materiales y equipos**

- 1 Vaso precipitado 40ml
- Vaso precipitado 5ml
- 1 probeta graduada 10ml
- 1 probeta graduada 25ml
- 2 viales con tapas.
- 1 embudo de decantación 50ml
- 1 soporte universal con anillo
- 1 piceta
- Tubos cónicos Milipore 50ml
- Balanza analítica (Derment Instrument M \_220)
- Agitador magnético (Dylastir Stirrer)
- Centrifuga (Moledo: VWR Clinical 50)
- Liofilizador (Modelo: Freeze Dry System/Freezone 4.5 LABCONCO)
- Micropipetas 100-1000 microlitros (Marca Thermo Scientific; modelos KH16016 y EH07068 4500)
- Homogeneizador (Politron PT 1600 E)
- Vortex (Thermolyne Type 167000 Mixer)
- Rotoevaporador.

**Reactivos.**

- PLGA 50:50 (Marca *Sigma-Aldrich*, Mw 24,000 – 38,000)
- Acetato de Etilo (Marca *EM Sciece*, Fw 88.11)
- Poli vinílico alcohol (Marca *Aldrich Chemistry* Mw 31,000)
- Agua grado MiliQ
- Manitol (Marca *Sigma* Fw 182.2)
- Anh. DMF (N, N Dimetilformamida) (Marca *Riedel-de Haen* PM 73.06)
- 5(6)-carboxitetrametilrodamina (Marca *Fluka Anylical*)
- Diciclohexilcorbodiimida (Marca *Aldrich* Fw 206.33)
- 4,4-dimetilaminopridina (Marca *Aldrich* Fw 122.17)
- Metanol (Marca *Sigma Aldrich* al 99.8% pureza)
- Diclorometano (Marca *Mallinckrodt* Fw 84.93)

## **1. PREPARACIÓN DE NPS DE PLGA 50:50**

(Alcala Alcala , Urban Morlan , Aguilar Rosas , & Quintanar Guerrero, 2013)

### **1.1 Obtención de fase orgánica y acuosa.**

Para preparar NPs de PLGA50:50 primeramente, se llevó a cabo una mezcla de 1:2 de acetato de etilo y agua grado MiliQ, 4ml y 8ml respectivamente en embudo de separación 30ml sostenido por un soporte universal y pinza. Se agitó manualmente cada 4 minutos por 10 segundos en 5 ocasiones, dejando reposar en el intervalo de cada agitación. Se observó en todo momento la formación de dos fases. Posterior a la última agitación, reposó por 5 a 10 minutos hasta que se observó dos fases completamente separadas. Por último, en dos viales previamente lavadas, fueron separadas las fases y tapando, para evitar evaporación de las fases, en especial la orgánica

### **1.2 Preparación del poli vinil alcohol al 5% (PVA)**

5 mililitros exactos de la fase acuosa, se agregó en un vaso de precipitado de 40ml y posterior 250mg de alcohol poli vinílico, con una barra de agitación magnética se agitó constantemente hasta obtener una disolución completa (entre 30 a 60 minutos aproximadamente) para obtener una concentración del 5. Al tener una disolución completa, se llevó al homogeneizador a 5,000 rpm inicialmente. Mientras este paso continuó, se procedió a preparar la fase acuosa con el PLGA.

### 1.3 Fase orgánica y la emulsión para preparar NPs-PLGA.

50mg se pesó de PLGA y fue agregado en un vaso de precipitado de 5ml e inmediatamente se agregó sobre el los 2.5ml de la fase orgánica, disolviéndolo manualmente con un agitador de vidrio, con la mayor rapidez posible para evitar la evaporación del solvente. Teniendo disuelto completamente PLGA, se procedió a llevar a cabo la emulsión. La fase acuosa que previamente estaba en 5,000 rpm en el homogenizador, se aumentó a 11,000 rpm, e inmediatamente se agregó gota a gota la fase orgánica de forma lenta. Al terminar de agregar toda la fase orgánica, inició un conteo de 10 minutos. Pasado este tiempo fue agregado medianamente rápido 20 ml de agua grado MiliQ, donde se conservó en todo momento la misma velocidad de agitación (rpm), se dejó emulsionando 10 minutos más. Cuando finalizó estos 10 minutos, la muestra reposó por 30 minutos hasta que descendió toda la espuma generada durante la emulsión.



**Foto 1A.** incorporación gota a la fase orgánica sobre la acuosa.



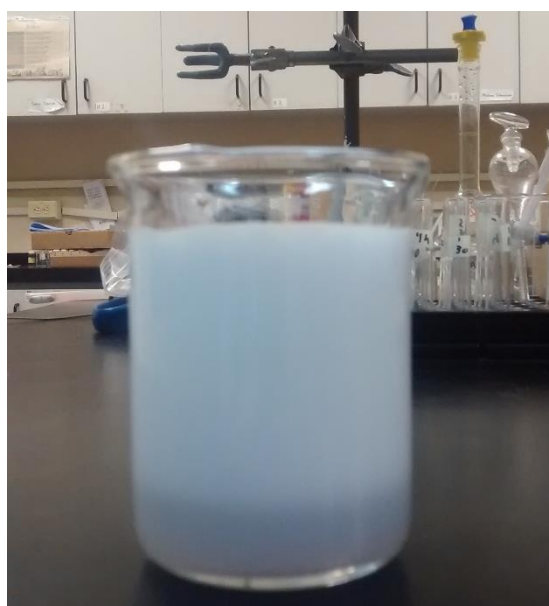
**Foto 1B.** Emulsión a 11,000 rpm.

#### 1.4. Eliminación del solvente.

Antes de proceder a eliminar el solvente, se tomó 2 alícuotas 1ml cada una aforada a 10 ml con agua MiliQ y se llevó a cabo la lectura de tamaños de nanopartículas. La lectura se ejecutó 3 veces para cada aforo.

Cuando descendió por completo la espuma generada durante la emulsión **(Foto 1)** transcurrido los 30 minutos de reposo, con un agitador magnético (Dy-lastir Stirrer) se agitó de manera constante a temperatura ambiente a una velocidad 1 del agitador por 3 horas. Con esto, se eliminó el solvente.

Se midió el volumen inicial de la muestra y pasado las 3 horas de agitaciones fue medido nuevamente. Con la finalidad de calcular una diferencia de volumen y corroborar que efectivamente se eliminó el solvente. Otro dato importante que se tomó en cuenta fue el olor del acetato de etilo, donde al inicio de la agitación tenía olor penetrante y al finalizar las 3 horas, no se alcanzó a percibir el olor de éste.



**Foto 2.** Muestra en reposo para el descenso de la espuma generada durante la emulsión.

### **1.5 Purificación por centrifugación.**

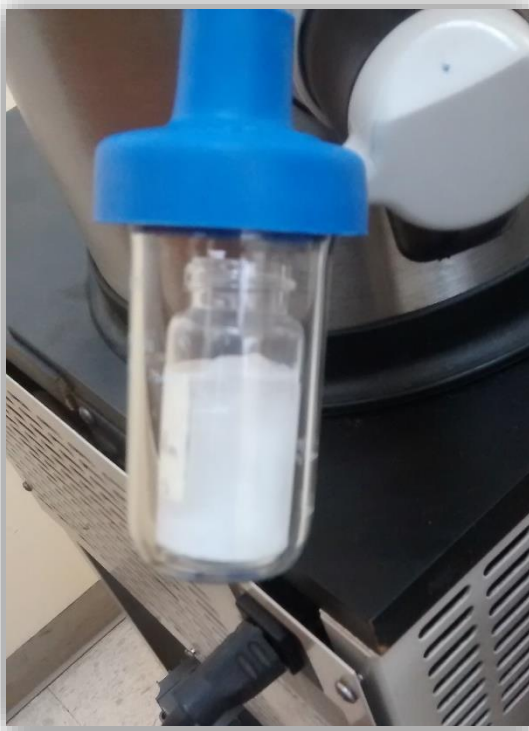
Antes de purificar la muestra, se tomó una alícuota de 1ml, aforado a 10ml con agua MiliQ para leer tamaños de NPs. Se ejecutó 3 lecturas con el mismo aforo.

Posterior a haber eliminado el solvente, la muestra se centrifugó para su purificación (centrifuga modelo: VWR Clinical 50) a 10,000 rpm por 15 minutos a 20°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado fue resuspendido en un volumen de agua MiliQ igual al volumen inicial de forma manual y el resto del precipitado que no se resuspendió, se terminó de resuspender con el vortex (Thermolyne Type 167000 Mixer). La muestra resuspendida se volvió a centrifugar con los mismos parámetros, un total de 3 repeticiones, con el último, se consideró una muestra purificada. Finalmente, fue extraído una alícuota de 1ml aforado a 10ml con agua MiliQ y se leyó tamaños de NPs en 3 repeticiones.

### 1.6 Adición de manitol como crioprotector y liofilización

A la muestra purificada se añadió 10mg de manitol por cada ml, se mezcló cuidadosamente hasta homogenizar y por último se congeló a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$

La muestra al quedarse completamente congelado, se liofilizo a  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. **(Foto 3)**



**Foto 3.** Muestra montada en el Liofilizador

Modelo *Freeze Dry System/Freezone 4.5*

## **2. UNIÓN COVALENTE DE ISOTIACIANATO DE TETRAMETILRODAMINA (TMRMNA) CON EL POLÍMERO PLGA (Costantino , y otros, 2005)**

### **2.1 Metodología de unión.**

En un matraz bola de 5ml se agregó 3ml de N, N-dimetilformamida y 200mg, posterior, con un agitador magnético (Dylastir Stirrer) se agitó a un nivel 1 de manera continua; enseguida se adicionó 17.2mg de 5(6)-carboxitetrametilrodamina (TMRMNA) junto con 8.2mg de dicitclohexilcarbodiimida. La muestra se agitó a nivel 1, de manera continua por 18 horas con matraz sellado con tapón septum.

### **2.2 Purificación y recuperación por el método disolución/precipitación**

Posterior a 18 horas, el producto se recuperó y purificó por el método de disolución/precipitación empleando diclorometano y metanol respectivamente. Pero antes, se trasladó la muestra a un matraz de 100ml.

Una vez listo el traslado de matraz, este fue sellado nuevamente con tapón septum. (Se mantuvo en todo momento sellado con septum, se abrió únicamente cuando realizó cambio de matraz) enseguida con jeringa de 10ml con aguja se inyectó 20ml de metanol de manera lenta y continua (1 minuto aproximadamente de duración) Terminado de agregar los 20ml, se observó rápidamente precipitado. Se dejó reposar por 30 minutos.

Trascurrido 30 minutos de reposo, se descartó el sobrenadante por decantación, enseguida se agregó 3ml de diclorometano y con agitación manual moderada se resuspendió hasta lograr una disolución completa. Teniendo resuspendida nuevamente la muestra, se procedió a agregar nuevamente 20 ml de metanol de la misma manera, dejando reposar otros 30 minutos. Se descartó nuevamente el

sobrenadante por decantación y fue adicionado por segunda vez 3ml de diclorometano, hasta lograr nuevo una disolución completa. Por tercera vez se adiciono metanol, pero en esta último, solo s adicionó 15ml, repitiendo mismos pasos. **(Foto 4A y B)**

Posterior a la última decantación de metanol, se agregó 1ml de diclorometano y este volumen fue nuevamente trasladado en un matraz bola de 5ml. Este solvente se eliminó por rotoevaporación con 60rpm a 45 grados centígrados por 30 minutos.

El producto final fue recuperado manualmente por raspado y finalmente se pesó para calcular el rendimiento, obteniendo el 53% de rendimiento neto.

**Foto 4A.**



**Foto 4B.**



**Foto 4A**, muestra en disolución de metanol y **Foto 4B**, muestra precipitada

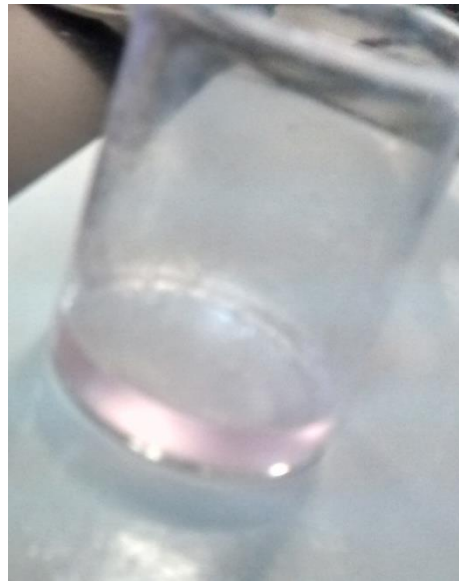
### 3. Preparación de NPs PLGA-(TMRMNA-PLGA) 80/20

Para la preparación de PLGA etiquetado con 5(6)-carboxitetrametilrodamina y polímero puro, el método que se empleo fue exactamente igual al empleado para la preparación de las NPs-PLGA. La única modificación fue en las proporciones de cada polímero. Se usó una proporción del 20% del polímero etiquetado con TMRMNA y 80% del polímero puro.

Para esta preparación en 5ml de la fase acuosa se agregó 250mg de PVA y con el agitador magnético se disolvió, cuando el PVA se disolvió por completo, en 2.5ml de fase orgánica se adiciono 10mg de PLGA-TMRMNA y 40 de PLGA de manera simultáneamente hasta disolverlos completamente. Posterior se inició la emulsión de ambas fases de manera idéntica al procedimiento de preparación de las NPs-PLGA de manera idéntica.



**Foto 5A.** NPs-PLGA-TMRMNA precipitada.



**Foto 5B.** Sobrenadante de NPs-PLGA-TMRMNA



**DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados que se discutirán, son el resultado de un total 13 muestras de preparación de NPs lo largo de la realización del presente trabajo, esto debido a la limitación de reactivos disponibles, principalmente PLGA 50/50 y TMRMNA.

Por razón anterior, se decidió modificar y establecer cantidades de cada reactivo que se empleó en cada una de las preparaciones realizadas. Para la modificación, se tomó en cuenta el reactivo más limitante y más importante, el PLGA 50/50, donde la reacción (Rxn) en la que se basó las preparaciones, indicaba 400mg de polímero, pero no fue posible emplear tan elevada cantidad debido al poco que se disponía, por ello se decidió usar una 1/8 parte de la Rxn de referencia, dando como resultado el pesado de 50mg de PLGA 50/50, el uso de 5ml de la fase acuosa y 2.5ml de la fase orgánica.

Fue difícil en las primeras Rxns llevar a cabo preparaciones de NPs empleando cantidades relativamente pequeñas en comparación con el de referencia y por no disponer de materiales que se adaptaran a las nuevas concentraciones. Pero conforme se fue realizando cada Rxn, se pudo estandarizar y manipular adecuadamente todos pasos que conllevó la preparación.

Antes de hablar de resultados obtenidos, es importante primero discutir los resultados del método de preparación empleado para las NPs y el etiquetado del polímero con TMRMNA.

## 1. EFICACIA E INCONVENIENTE EN EL PROCESO DE PREPARACIÓN.

### 1.1 Obtención de fase orgánica y acuosa.

Fue la etapa más simple, de producción de NPs-PLGA. En esta etapa lo importante que se cuidó fue de exponer el mínimo de tiempo al solvente en medio ambiente antes de incorporarlo en embudo de separación, ya que, al ser solvente, este rápidamente se evapora y es importante tener la proporción adecuada para las fases. Por otro lado, al momento de que fue mezclado las dos soluciones, el agua se agregó sobre el acetato de etilo, ya que el agua al ser de mayor densidad, al caer este sobre el solvente, tendera a suspenderse al fondo mientras que el acetato de etilo tendera ir hacia arriba, esto debido por las diferencias de densidades. Esto es de gran ayuda porque al haber cruzamiento entre ambas soluciones, estos empezaran a saturarse apoyados con las agitaciones. La solución fue sometida a agitaciones en los 20 minutos para lograr la saturación de las fases.

Una vez que pasaron los 20 minutos, ambas fases fueron separadas con mucha delicadeza y guardadas en viales con tapa, con el fin de evitar que se evaporara el solvente, además de disminuir el riesgo de contaminación que se pudo generar con cualesquiera partículas del ambiente.

## 1.2. Preparación de poli vinil alcohol al 5% p/v (PVA 5%p/v)

Fue llevado a cabo una vez que se tuvo la fase acuosa y para esta preparación se empleó el PVA de Mw 31,000. Este al no ser soluble en agua, pero al estar saturado la fase acuosa con el solvente, esta fase permitió que se pudiera disolver, aunque el tiempo que se requirió para una disolución completa de 250mg de PVA en 5ml de la fase acuosa tomó entre 30 a 40 minutos a una agitación por magnetismo moderada constante y es importante no detener el proceso antes de tiempo, porque se corre el riesgo de una disolución incompleta y por tanto tener efecto negativo al momento de la emulsión y por ende la calidad de NPs que se generen. En todo momento se cuidó de que no cayeran partículas del ambiente dentro de la muestra.

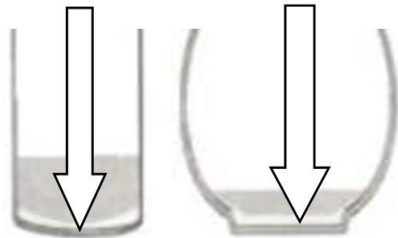
Se ha observado que mientras mayor sea la concentración de los estabilizantes, en este caso PVA, los tamaños de las NPs tienden a disminuir y por debajo concentración del 10% de PVA, el tamaño tiende a aumentar. **(F. Rocha Formiga, Sf).**

## 1.3 Preparación de fase orgánica con PLGA.

El PLGA antes de su emulsión, fue disuelto en 2.5ml de fase orgánica, el problema presentado en esta etapa es; la fase orgánica está compuesta principalmente por acetato de etilo, por tanto, al momento de agregar y agitar para la disolución del polímero, el solvente rápidamente empezó a evaporarse y esto se evidencio mucho más rápido debido al poco volumen con que se estaba trabajando, por ello, en este paso fue crucial la rapidez pero cuidando siempre lograr una disolución completa. Fuera de esto, no hubo más inconveniente con esta etapa.

### 1.4 La emulsión.

Etapa donde se tuvo poco más de dificultad en las primeras dos muestras, debido a que no se contaba con vaso de precipitado con forma física adecuada para la emulsión, se requería de un vaso con capacidad mínima de 30ml, el cual se tenía al alcance, pero al momento de la emulsión, la muestra aumentaba su volumen y por tanto el volumen de 30ml no era suficiente, se tuvo que cambiar a un vaso de 50ml, pero en este era demasiado angosto y el volumen tan pequeño inicialmente, no permitía que la punta del homogeneizador abarcara toda la muestra (**Imagen 22**). Para solucionar problema, manualmente se inclinaba el vaso hacia un lado para aumentar el volumen en uno de los lados, de esta manera el homogeneizador pudo ir más profundo y emulsionar adecuadamente la muestra. Se intentó con un vaso de 80ml, pero fue casi imposible, aun inclinándolo. Se estuvo emulsionando con vaso de 50ml, cuidando siempre inclinar la muestra al inicio de la emulsión.



**Imagen 22.** Representación gráfica de dos vasos de precipitado de mismo volumen, pero distinta forma física.

### 1.5 Eliminación de solvente.

De todas las etapas de preparación de NPs, la parte que mayormente presentó inconveniente, fue precisamente la eliminación del solvente. El trabajo de referencia, indicaba la eliminación de este mediante aplicación de vacío con un roto-evaporador a 30 °C por 90rpm, donde en las primeras dos reacciones se intentó esta técnica y con estos parámetros, pero no se logró eliminar en absoluto el solvente, por tanto se optó por aumentar a 45 °C y con este cambio, finalmente se eliminó adecuadamente el solvente. Pero al ser una temperatura elevada y al tratarse de polímeros sensibles a cambios de temperatura, hubo la necesidad de buscar alternativas para el inconveniente. Se revisaron algunos otros métodos de eliminación, se encontró la eliminación por medio de agitación a temperatura ambiente, el cual se probó y después de 3 horas, el solvente fue eliminado por completo. Las NPs no sufrieron cambio tamaños ni PDI, por ello se optó usar este método alternativo en todas las siguientes preparaciones. Al finalizar el presente trabajo, no se presentó ningún inconveniente en los resultados finales al cambiar el método original de eliminación.

### 1.6 Purificación por centrifugación.

Para la purificación de las muestras, en el trabajo de referencia indicaba centrifugar a 20,000 rpm por 20 minutos las muestras. Lo cual en la primera purificación se llevó a cabo, los resultados no fueron buenos, efectivamente hubo precipitación, pero este se adhería y se solidificaba fuertemente al fondo del tubo milipore al intentar una resuspensión, no fue posible lograr una resuspensión homogénea, la muestra quedaba con partículas sólidas insolubles. Por esta razón se tuvo la necesidad cambiar los parámetros de centrifugación, después de probar con diferentes tiempos y velocidades, el que dio mejor resultado fue a los 10,000 rpm por 15 minutos. Aunque con estos nuevos parámetros, el sobrenadante quedaba más turbio, lo que significaba que gran cantidad de nanopartículas no se

precipitaron traduciéndose a pérdidas de rendimiento de la preparación, pero no fue posible aumentar más la rpm porque se destruían las NPs precipitadas.

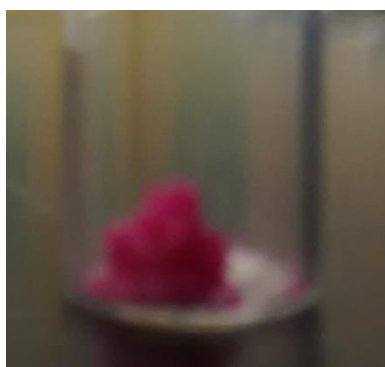
### **1.7 Adición de manitol y el proceso de liofilización.**

No se tuvo inconveniente alguno para la adición de manitol en las muestras. Existen varias opciones de sustancias con actividades crioprotectoras como el PEG y la treolasa que están siendo usadas, se tenía al alcance manitol y por tanto fue el que se empleó. Cabe recalcar que solo se probó con el 10% de manitol y no con otros porcentajes. Sería interesante probar con diferentes concentraciones para determinar cuál sería la mejor propuesta, aunque el % empleado dio resultados muy acordes al que se esperaba. A excepción cuando las NPs, fueron etiquetadas con TMRMNA. Quizás aquí lo interesante sería probar con diferentes concentraciones para descartar que la concentración de manitol afecta o favorece el tamaño NPs liofilizadas con él.

### 1.8 Etiquetado de TRMRMNA a PLGA

Para poder llevar a cabo la preparación de NPs-PLGA-TRMRMNA, fue necesario primero etiquetar al polímero con una reacción independiente, reacción que solo se llevó a cabo una única vez, debido a la limitada disponibilidad de reactivos, en especial TRMRMNA, donde solo se contaba con 100mg y la reacción de referencia se requería de 86mg, por tanto no era posible usar todo lo que se disponía con el riesgo que la reacción no resultara, por ello al igual que la preparación de NPs-PLGA, las concentraciones para esta reacción se tuvo que modificar a las mínimas concentraciones posibles a trabajar, optando finalmente por **1/5** parte de la reacción de referencia, con el fin de tener la oportunidad de replicar la reacción, en dado caso que fuese necesario.

Esta primera y única reacción realizado para el etiquetado con TMRMNA, se obtuvo muy buenos resultados teniendo en cuenta que al no considerar y no estar preparados en que la muestra requería de traslado de su matraz bola de 5ml inicial a uno de 100ml para los lavados y posteriormente volver a trasladar la muestra al matraz de 5ml para la eliminación de solvente en el rotoevaporador, esto implicó pérdidas de producto en cada cambio. Para el cálculo de rendimiento se tomó en cuenta el peso real de 3 de los 6 reactivos que se requirieron para la reacción y estos 3 fueron 17.3mg de TMRMNA, 201.5mg de PLGA y 8.3 mg de diclorohexilcarbodiimida (DCC). Sumando un total de 227.1mg de reactivo. Y el producto recuperado fue de 120mg. Con la regla de 3, se hizo el cálculo el cual dio como rendimiento un 52.84% de eficacia. Lo cual es un rendimiento bastante aceptable.



**Foto 6.** NPs-PLGA etiquetadas con TMRMNA

## 2. EVALUACION DE LOS RESULTADOS DE CARACTERIZACION DE NPs

Para poder realizar un análisis con más profundidad, el tamaño, PDI y desviación estándar de las NPs se comparó entre el registrado cuando estaban aún en medio acuoso con presencia del solvente, cuando se ha eliminado este, cuando se ha purificado y por último los resultados obtenidos cuando las NPs se han liofilizado. Se hace el análisis de esta manera, con el fin de evaluar la estabilidad y calidad de NPs elaboradas y de esta manera poder concluir con mayor certeza si son viables o no para emplearlas como vectores

### 2.1 Tamaño de NPs con y sin solvente, post-purificación frente a las liofilizadas.

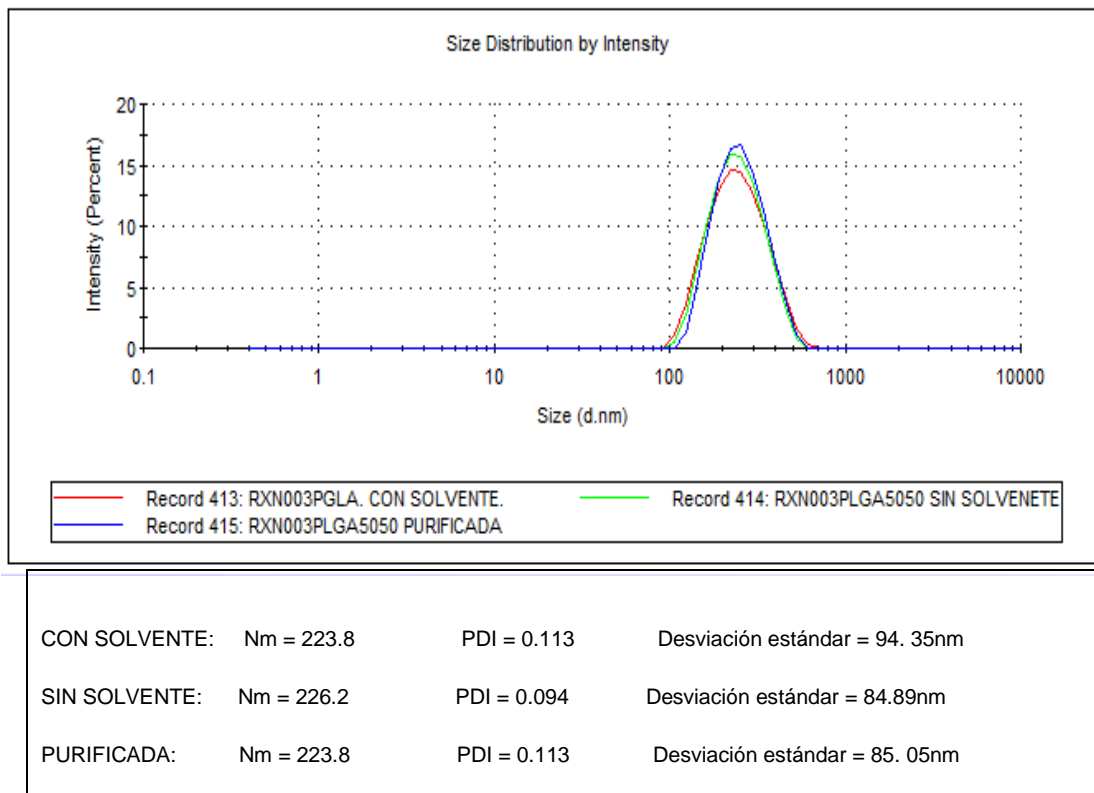
En la **Tabla 6** se ordenaron los resultados obtenidos a partir de promedios de todas las lecturas realizadas desde la preparación hasta la liofilización. En la primera fila cuando aún no había retiraba el solvente, en la segunda cuando ya se la ha retirado. En la tercera fila se coloraron los resultados cuando obtenidos cuando la muestra había sido purificada. Y en las últimas dos filas se registraron los resultados que arrojaron aquellas muestras que fueron sometidas al proceso de liofilización con la presencia de manitol como crioprotector y sin la presencia de este.

NUMERO DE RXN	Con solvente		Sin solvente		Purificadas		Liofilizado CM		Liofilizado SM	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn002 PLGA50/50 S/MANITOL	203	0,081	216	0,112			NO APLICA		257	0,2
Rxn003 PLGA50/50 S/MANITOL	224	0,106	248	0,178	270	0,175	NO APLICA		375	0,36
Rxn004 PLGA50/50 S/MANITOL			206	0,126	225	0,064	NO APLICA		384	0,386
Rxn005 PLGA50/50 S/MANITOL	231	0,111	244	0,177	252	0,142	NO APLICA		352	0,306
Rxn006 PLGA 50/50 S/MANITOL	209	0,073	206	0,069	219	0,003	NO APLICA		376	0,404
Rxn006 PLGA50/50 C/MANITOL	209	0,073	206	0,069	219	0,003	244	0,075	NO APLICA	
Rxn008 PLGA50/50 C/MANITOL	212	0,117	229	0,147	240	0,122	248	0,142	NO APLICA	
Rxn011 PLGA50/50 S/MANITOL	240	0,143			251	0,088	NO LIOFILIZADO			
PROMEDIO	<b>218</b>	<b>0,101</b>	<b>222</b>	<b>0,125</b>	<b>239</b>	<b>0,085</b>	<b>246</b>	<b>0.108</b>		

**Tabla 6.** Promedios de lecturas realizados para cada reacción y un promedio final para todas las Rxns. **CM:** Con Manitol. **SM:** Sin Manitol

Como se puede apreciar en los resultados concentrados en la Tabla 6, los tamaños de las NPs significativamente aumentaron conformen pasaron por los diferentes procesos hasta su liofilización. El cambio de tamaño entre la etapa con solvente y sin solvente, en casi todos los promedios de cada reacción, se registraron un ligero aumento, y una reacción (Rxn 006) el tamaño disminuyó 3nm, algo casi insignificante, pero importante tomar en cuenta, ya que al ser un cambio tan pequeño, se podría decir que el proceso no afectó a Las NPs. Para una mejor apreciación de estos resultados, en la **Gráfica 1**, se comparan los datos en las diferentes fases.

**Grafica 1.** Comparación de tamaño de las nanopartículas en presencia de acetato de etilo como solvente, sin la presencia de este y cuando han sido purificadas las NPs-PLGA.



## 2.2 Cambio en tamaño de NPs-PLGA con solvente y la purificada en medio acuoso.

En referencia a tamaños registrados al inicio, es decir cuando aún estaba la muestra en solvente comparado con los tamaños registrados después de la purificación, en el 100% de las reacciones hubo un aumento significativo de tamaño que van desde 10nm a 46nm. Se calculó el promedio de la diferencia que registraron las reacciones, nos arrojó 22nm de variación, este valor prácticamente lo podemos interpretar como NPs son estables y que sus tamaños se conservan a pesar de los diferentes procesos que se someten hasta la purificación. Los cam-

bios mínimos que generan probablemente se le atribuye a que algunas NPs pueden llegar a aglomerarse durante los procesos de purificación, pero de una manera muy discreta.

### 2.3 Cambio de tamaño de NPs-PLGA purificadas en medio acuoso y las post-liofilizadas con y sin manitol.

Para análisis más adecuado de estos cambios, en la **Tabla 7**, se concentraron los cambios presentados.

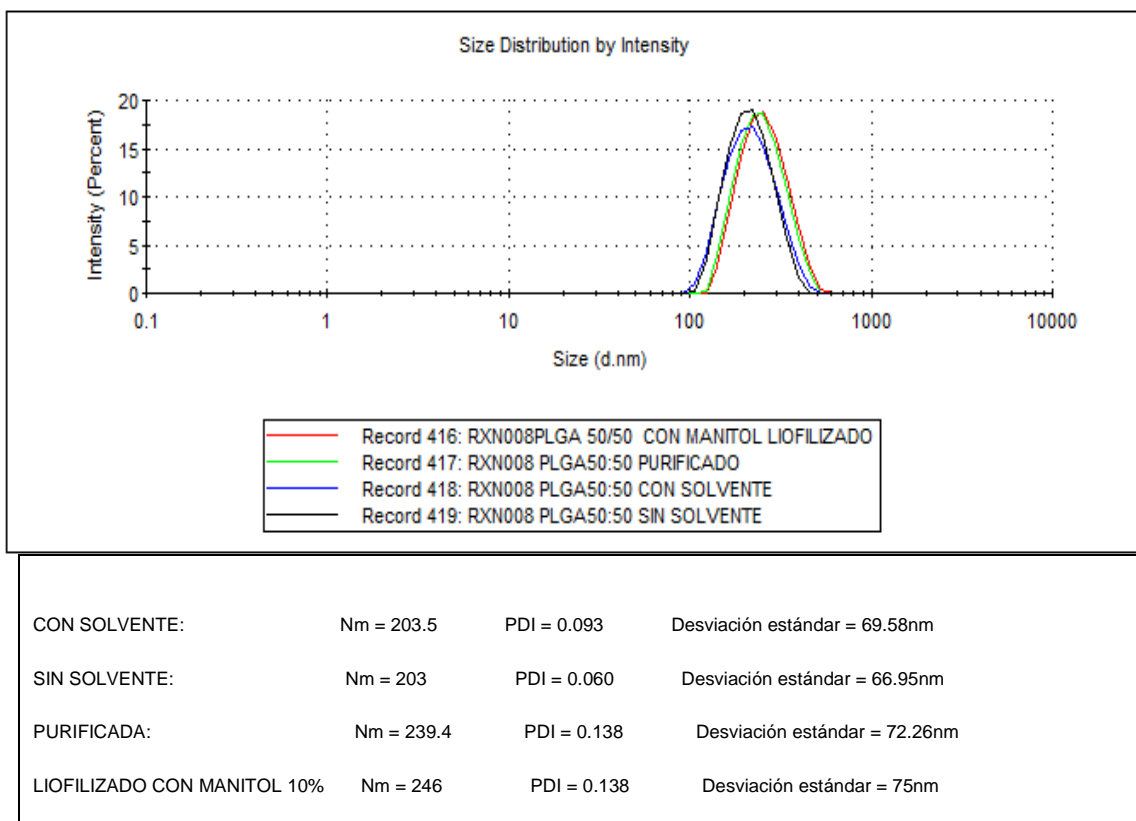
NUMERO DE RXN	Purificadas		Liofilizado SM		%AUMENTO	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn003 PLGA50/50 S/MANITOL	270	0,175	375	0,36	<b>38</b>	<b>102</b>
Rxn004 PLGA50/50 S/MANITOL	225	0,064	384	0,386	<b>70</b>	<b>500</b>
Rxn005 PLGA50/50 S/MANITOL	252	0,142	352	0,306	<b>39</b>	<b>115</b>
Rxn006 PLGA 50/50 S/MANITOL	219	0,003	376	0,404	<b>71</b>	<b>13366</b>

**Tabla 7.** Relación de cambios de tamaño y PDI en NPs-PLGA con respecto a los valores obtenidos en la etapa de purificación y los obtenidos después de la liofilización sin crioprotector.

#### Con manitol.

Dos de las reacciones que se elaboraron y llegaron a la etapa de liofilización en los cuales, al finalizar su purificación, se les agrego manitol en un 10% fueron solo dos de todas reacciones. Pero con estas dos muestras, se obtuvieron resultados muy buenos. El cambio fue mínimo, en la Rxn 006 de 219nm, paso a 244nm, con una diferencia de tan solo 25nm y en la rxn008 de 240nm a 248nm. Estos cambios, realmente no son cambios significativos y por tanto nos permite concluir que el manitol al agregarse a una proporción del 10% en base al volumen liofilizado, resulta ser un excelente crioprotector.

**Gráfica 2.** Relación de cambios en tamaño, PDI y desviación estándar cuando las NPs se encontraban en las diferentes fases de producción y cuando fueron liofilizadas con la presencia de manitol como crioprotector.

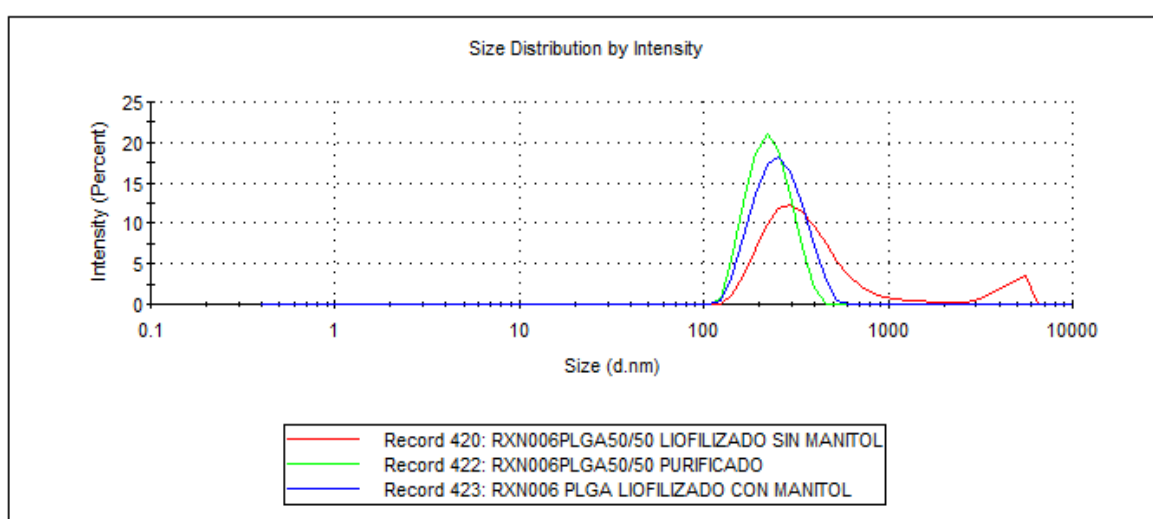


### Sin manitol

Como se puede observar en la **Tabla7**, las muestras que liofilizaron en sin la presencia de un crioprotector, en este caso el manitol, en relación a los tamaños, aumentaron significativamente y respectivo PDI de una manera descontrolada. Estos resultados obtenidos nos dicen que las NPs-PLGA no soportan el proceso de liofilización y por tanto, tienden a aglomerarse en tamaños muy pero variados, que es lo que nos indica el cambio de los PDI que presentaron. Aunque los tamaños promedios, sean viables para su empleo como sistemas de encapsulamiento de fármaco, por su PDI dejan de serlos, ya que tamaños muy variados, no podría permitir un buen encapsulamiento, cargado o funcionalización como lo sería en el caso de un anticuerpo, si este fuera el que se le funcionalizaron. Para

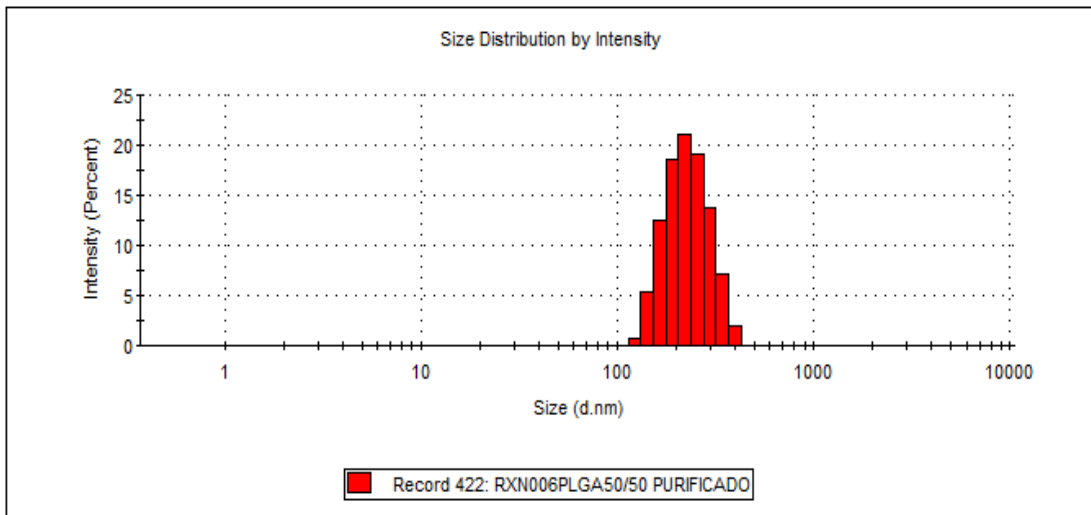
que un sistema sea viable, es necesario que tanto el tamaño y el PDI se encuentren dentro de los rangos aceptables y este caso no fue así. Por ello es necesaria la presencia de un crioprotector, antes del proceso de liofilización.

**Gráfica 3.** Relación del cambio de tamaño, PDI y de desviación estándar que sufrieron las NPs cuando estaban en la fase purificada y después de haber sido liofilizadas en presencia y ausencia de manitol.

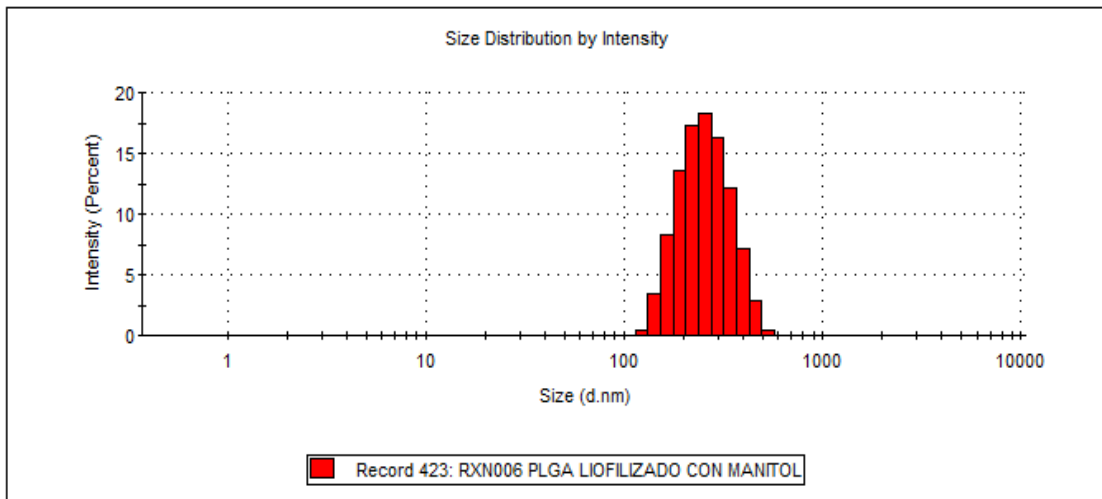


Purificado	Nm = 218.3	PDI = 0.050	Desviación estándar = 59.16nm
Liofilizado con manitol al 10%	Nm = 241.6	PDI = 0.072	Desviación estándar = 77.32nm
Liofilizado sin manitol	Nm = 375	PDI = 0.360	Desviación estándar = 232.6nm

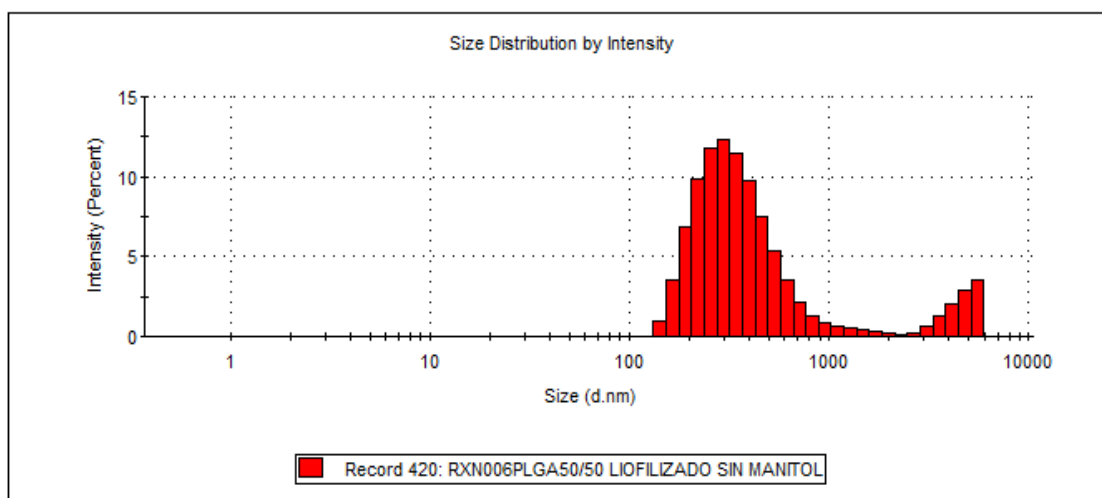
En los histogramas **1, 2 y 3**, se encuentran graficados los mismos datos que se encuentra en la gráfica anterior, para apreciar mejor es el proceso de liofilización afecta drásticamente el tamaño, PDI y desviación estándar de las NPs cuando estas están sin la presencia de un crioprotector.



Histograma 1



Histograma 2



Histograma 3

## 2.4 Cambio de tamaño de NPs-PLGA-TMRMNA en presencia de solvente y sin solvente (purificadas)

Las NPs que se etiquetaron con TMRMNA no sufrieron cambios significativos en relación a los procesos de purificación. La variación de tamaño fue muy similar como cuando se evaluó con las NPs-PLGA. Como se puede observar en la **Tabla 8**. Esto nos permite comprender que la forma y tamaño de nanopartículas no se ve afectada porque se haya empleado una proporción del polímero previamente etiquetado TRMRNA, esto nos permite esperar; si estas nanopartículas son empleadas para el cargado de un fármaco directo, se podría esperar tamaños muy similares a las que se obtuvieron en el presente trabajo.

NUMERO DE RXN	CON SOLVENTE		SIN SOLVENTE		PURIFICADAS		LIFILIZADA CM		LIOFILIZADA SM	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn001 PLGA-TMRMNA 80/20 S/MANITOL	214	0,084	210	0,07	253	0,138			377	0,379
Rxn007 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITOL	207	0,072	210	0,102	229	0,095	560	0,563		
Rxn012 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITOL	239	0,151			242	0,115	NO LIOFILIZADO			
Rxn013 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITOL	205	0,072	206	0,076	274	0,222	NO LIOFILIZADO			
PROMEDIO	<b>216</b>	<b>0,095</b>	<b>209</b>	<b>0,083</b>	<b>250</b>	<b>0,143</b>				

**Tabla 8.** Resultados de las lecturas que se le realizo a las NPs etiquetadas con TMRMNA al 20% en relación al polímero PLGA con el Z-sizer

## 2.5 Cambio de tamaño de NPs-PLGA-TMRMNA entre resultados obtenidos de muestras purificadas y muestras liofilizadas con manitol y sin manitol.

Definitivamente las NPs-PLGA-TMRMNA no se comportaron igual que las NPs-PLGA. En este experimento, cuando se liofilizaron sin la presencia del crioprotector, el proceso de liofilización tuvo un efecto directamente negativo sobre ellas, el resultado final fueron NPs con el 49% de aumento de tamaños y con un

179% más grande en PDI. (**Tabla 9**). Estas NPs durante el proceso de liofilización se aglomeraron en formando nuevas NPs de tamaño totalmente disperso. Se intentó solucionar este problema el adicionar manitol a la muestra, pero el resultado final fue peor, lejos de conservar los tamaños y el PDI, estos se dispararon más del 116% y 492% respectivamente. Los resultados obtenidos están totalmente descartados para ser emplearlos como vectores. Aunque técnicamente el tamaño se encuentre aún en escalas manométricas, pero los tamaños resultantes se encuentran fuera de los valores que actualmente se está considerando como sistemas nanométricos.

NUMERO DE RXN	PURIFICADAS		LIFILIZADA CM		LIFILIZADA SM	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn001 PLGA-TMRMNA 80/20 S/MANITOL	253	0,138			377	0,379
Rxn007 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITOL	229	0,095	560	0,563		
Rxn012 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITOL	242	0,115	NO LIOFILIZADO			
Rxn013 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITOL	274	0,222	NO LIOFILIZADO			
PROMEDIO	<b>250</b>	<b>0,143</b>				

**Tabla 9.** Cambio que sufrieron las NPs etiquetas con TMRMNA cuando fueron liofilizadas en presencia y ausencia de manitol.

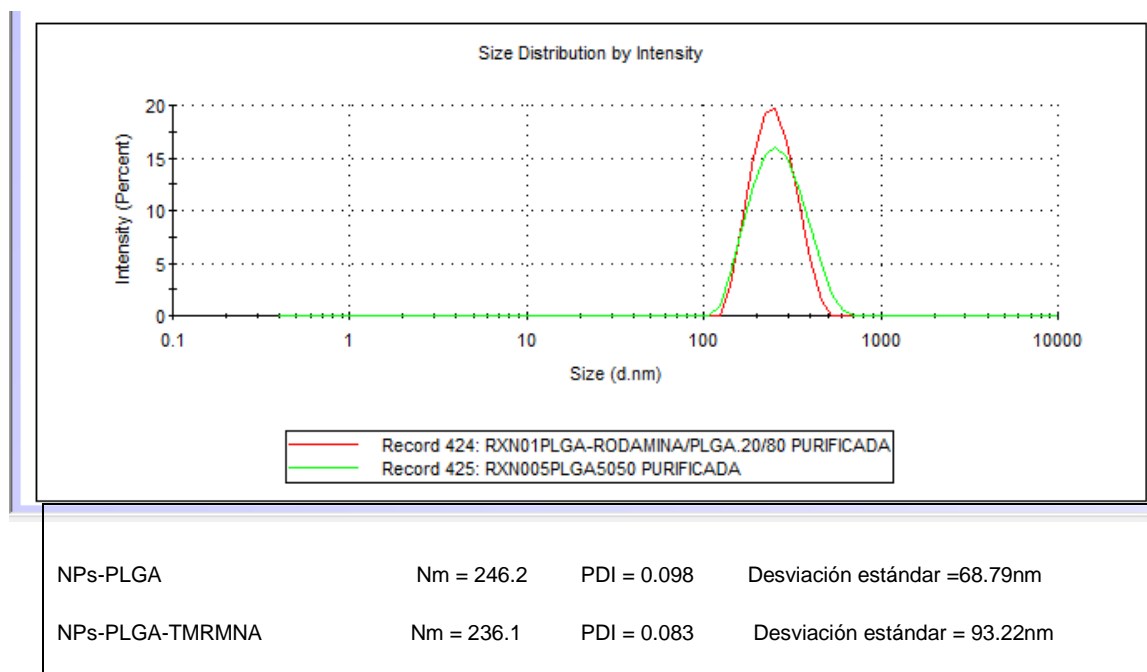
## 2.6 Tamaño de NPs-PLGA con respecto a las NPs-PLGA-TMRMNA hasta antes del proceso de liofilización.

Sin considerar hasta la etapa de liofilización y solo comparando los tamaños y PDI de las nanopartículas obtenidas desde antes de eliminar el solvente y hasta después de la purificación, se puede apreciar con los promedios finales calculados en los resultados de NPs-PLGA y NPs-PLGA-TMRMNA (**Tabla 10 y Grafica 4**), la variación prácticamente no es de importancia. Por tanto, se puede concluir que, empleando el mismo método de preparación y de purificación, el tamaño y calidad del producto final no se ve afectada.

NUMERO DE RXN	Con solvente		Sin solvente		Purificadas	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn002 PLGA50/50 S/MANITOL	203	0,081	216	0,112		
Rxn003 PLGA50/50 S/MANITOL	224	0,106	248	0,178	270	0,175
Rxn004 PLGA50/50 S/MANITOL			206	0,126	225	0,064
Rxn005 PLGA50/50 S/MANITOL	231	0,111	244	0,177	252	0,142
Rxn006 PLGA 50/50 S/MANITOL	209	0,073	206	0,069	219	0,003
Rxn006 PLGA50/50 C/MANITOL	209	0,073	206	0,069	219	0,003
Rxn008 PLGA50/50 C/MANITOL	212	0,117	229	0,147	240	0,122
Rxn011 PLGA50/50 S/MANITOL	240	0,143			251	0,088
<b>PROMEDIO</b>	<b>218</b>	<b>0,101</b>	<b>222</b>	<b>0,125</b>	<b>239</b>	<b>0,085</b>
Rxn001 PLGA-TMRMNA 80/20 S/MANITO	214	0,084	210	0,07	253	0,138
Rxn007 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITO	207	0,072	210	0,102	229	0,095
Rxn012 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITO	239	0,151			242	0,115
Rxn013 PLGA-TMRMNA 80/20 C/MANITO	205	0,072	206	0,076	274	0,222
<b>PROMEDIO</b>	<b>216</b>	<b>0,095</b>	<b>209</b>	<b>0,083</b>	<b>250</b>	<b>0,143</b>

**Tabla 10.** Promedio de las medidas registradas en las NPs-PLGA y las NPs-PLGA etiquetadas con TMRMNA.

**Grafica 4.** Comparación en tamaño, PDI y desviación estándar de las NPs-PLGA y las que se etiquetaron con TMRMNA.



## 2.7 Tamaño de NPs residuales en los sobrenadantes durante el proceso de purificación. (Centrifugación)

En la **Tabla 11** se muestran el diámetro (nm) de nanopartículas que no precipitaron durante las diferentes rpm y tiempo al que fueron sometidas, como se alcanza a ver, no hay alguna relación entre los resultados. Uno de los factores y más importante que pudo haber desviado los datos reales que pudieron haber arrojado este experimento fue; las lecturas de los sobrenadantes fueron basadas de una misma muestra, en cada ciclo, solo se estuvo modificando el tiempo y la velocidad. Por lo tanto, aun así, los resultados tuvieran alguna relación, no serían confiables.

Con los resultados obtenidos, no es suficiente para llevar cabo un análisis profundo y mucho menos poder plantear una hipótesis de lo que sucede, pero se podría sospechar que a mayor rpm y a mayor tiempo, las NPs de mayor peso molecular serían las que se precipiten primero y posteriormente las de menor peso molecular. Este tipo de pruebas sería de gran ayuda si se lleva a cabo un experimento mucho mejor estructurado con diferentes muestras para poder predecir los tamaños resultantes del precipitado en las diferentes variaciones de tiempo y velocidad de centrifugación, con el propósito de lograr desde la etapa de purificación controlar el tamaño de NPs que son precipitadas.

Revoluciones aplicadas (rpm)	Tiempo (min)	Diámetro (nm)	Polidispersidad (PDI)
10,000	10	205	0.096
10,000	15	183	0.123
10,000	15	156	0.098
10,000	15	180	0.011
10,000	30	316	0.416
10,000	30	309	0.450
15,000	15	170	0,061
20,000	20	200	0,098

**Tabla 11.** Medida (nm) de NPs en el sobrenadante durante la etapa de purificación en diferentes cambios de rpm y tiempo de centrifugación.

A diferencia de la tabla anterior, en la **Tabla 12** se muestran los resultados obtenidos cuando a 5 muestras diferentes fueron centrifugada una primera y segunda vez donde se leyó el tamaño de los sobrenadantes. Podemos apreciar que los tamaños y el PDI disminuyen conforme al primer y segunda centrifugación. Esto nos puede ser de utilidad en un futuro, si se planea un plan experimental mucho más elaborada como ya se mencionó para la tabla anterior y de esta manera se podría por medio de la centrifugación homogenizar más los tamaños y disminuir la desviación estándar. Y básicamente esto influirá de manera importante al momento de cargar anticuerpos que se pretender funcionalizar o el cargado de los antiambianos que se deseen llevar a cabo con las NPs, porque mientras más uniforme sean los tamaños, más fácil sería calcular la capacidad que pueden tener las NPs para captar y funcionalizarse.

Revoluciones aplicadas (rpm)	Tiempo (min)	Precipitado		1er Sobrenadante		2do sobrenadante	
		Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
10,000	15	242	0.138	184	0.140	158	0.109
10,000	15	225	0.064	197	0.106	153	0.102
10,000	15	252	0.142	157	0.075	148	0.08
10,000	15	229	0.095	190	0.100	-----	-----

**TABLA 12.** Resultado de 5 muestras diferentes en tamaño de NPs que no precipitaron en la primera y segunda centrifugación de una misma muestra. A la izquierda los precipitados y a la derecha de cada columna las NPs de cada sobrenadante.

### 3. Porcentaje de rendimiento del método elaboración de NPs

Para poder calcular y evaluar el porcentaje total de rendimiento del método de elaboración de NPs, fue necesario concentrar todos los datos en una sola tabla (**Tabla 13.**) De esta manera, se pudo calcular el total de producto que se obtuvo por el total de muestra (ml) liofilizados. Como referencia para el %, se tomó la concentración inicial de las muestras, es decir, para cada preparación se requirió 50mg de PLGA, el cual fue preparado en 27.5ml, de este volumen, se eliminó los 2.5ml de solvente, por tanto, queda una concentración teórica de 50mg/25ml, es decir 2mg/ml.

Con los cálculos anteriores y con los datos obtenidos a partir de la **Tabla 13**, se calculó el rendimiento final. Para ello se dividió los 135.2mg de producto total de

todas las muestras entre el volumen total a partir del que se obtuvieron los productos, 132ml (135.2mg/132ml) arrojando un rendimiento promedio final de 1.0242 mg/ml, En relación al rendimiento expresado en porcentaje (%), primero se calculó el % individual y después se obtuvo un promedio final, el cual fue de 54.41% de eficacia.

	Vol. (ml)	Tiempo (min) /RPM	No. de lavado	Peso de Vial SMST(gr)	Vial CMLST (gr)	Vial CMSST(gr)	Rendimiento (mg)	Rendimiento %	observaciones
2	5	15 min 10000	3	13	20	13,329	6,9	69	Sin manitol
	10	15 min 10000	4	13	22	13	12,3	61,5	Sin manitol
	10	15 min 10000	4	13	23	13	9,1	45,5	Sin manitol
	15	15 min 10000	4	13	28	13	17,3	57,7	Sin manitol
	10	15 min 10000	3	13	24	13	9,8	49	Con manitol
	9	15 min 10000	3	14	22	14	11	61	Con manitol
	15	15 min 10000	3	13	28	14	16,3	54,3	Con manitol
	8	15 min 10000	3	13	20	13	7,8	48,75	Con manitol
	15	15 min 10000	3	14	28	14	15,5	51	Con rodamina
	15	15 min 10000	3	13	28	13	17,9	59,6	Con rodamina
	11.5	15 min 10000	3	13	25	14	11,3	49,1	Con rodamina
	10	15 min 10000	3	13	25	13	16.9	56,3	Con rodamina, sin manitol
	10	15 min 10000	3	13	25	13	17.3	57,6	Con rodamina, sin manitol.
total	132						135,2	55,41	

**Tabla 13.** Resultados de rendimiento obtenido en cada muestra liofilizado. Un total de 132ml liofilizado repartido en 13 muestras distintas.

#### 4. Estabilidad de NPs.

Se han realizado estudios específicos con NPs elaboradas con PLA y PLGA. Los resultados muestran que las NPs de PLGA 50:50 de bajo peso molecular, el más hidrofílico, se degradan *in vitro* aproximadamente en un mes, mientras que las elaboradas con el polímero más hidrofóbico, D,L-PLA de gran peso molecular, requerían 12 a 16 meses para su hidrólisis completa. Son numerosos los estudios realizados para discutir el mecanismo de degradación *in vitro* e *in vivo* de PLA/PLGA y que ponen de manifiesto que la cinética de liberación de la molécula encapsulada depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas del biopolímero ( **Rosas & Pedraz, 2007** )

No se realizó estudios experimentales muy elaborados para evaluar la estabilidad de las NPs elaboradas en el presente trabajo. Solo pruebas estimatorias. En Las **Tablas A a E**, se muestran los resultados de lecturas de tamaño que se realizaron a algunas de las muestras conservadas a temperatura ambiente y a refrigeración a 4°C. La semana 0, se refiere en al día en que se elaboraron y purificaron las muestras. Para las Rxns de la **Tabla D y E**, la primera lectura se realizó sin la presencia de manitol. Para la conservación de la muestra, este se dividió en 4 partes iguales, en dos de ellas se agregó manitol en un 10% y a las otras 2 no. Una de las muestras con manitol y otro sin, se congelaron a y los otros dos restantes se refrigeraron. Para la evaluación de estabilidad, solo se le realizo a las muestras que estuvieron refrigeradas.

Tabla A

Temperatura ambiente	SEMANA 0		SEMANA 19		SEMANA 32	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn002 PLGA50/50	216	0,112	206	0,096	264	0,214

TABLA B

Temperatura ambiente	SEMANA 0		SEMANA 2	
	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn007PLGA-TMRMNA 80/20	229	0,095	250	0,211

Como se observa en la **Tabla A y B**, ambas muestras fueron almacenada a temperatura ambiente, en la A, de 0 a la semana a la semana 19 las NPs se mantuvieron estables, sin cambios drásticos y para la semana 32, el tamaño aumento un poco, pero aun encontrándose por debajo de los 300nm y su PDI si aumento casi 2 veces de la inicial. Este aumento de PDI indica que las NPs se empezaron a aglomerarse y a someterse al proceso de hidrolisis no enzimáticos. Mientras en la tabla B, sucedió prácticamente la misma situación. A diferencia de la A, el cambio sucedió a las 2 semanas, pero estas NPs estaban etiquetadas con TMRMNA. Muy probablemente este haya influido en este cambio en un tiempo más corto.



Foto.7 Muestras conservadas

a temperatura ambiente.

TABLA C

A 4 grados	SEMANA 0		SEMANA 10		SEMANA 17	
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn001 PLGA-TMRMNA 80/20	253	0,138	240	0,113	234	0,104

En la **Tabla C** se muestra la estabilidad de NPs etiquetadas con TMRMNA como en la **Tabla B**, pero en este caso la conservación se realizó en refrigeración y se aprecia, el cambio de la semana 0, semana 10 y semana 17, realmente los tamaños se mantuvieron igual. A lo que nos permite decir que la muestra se mantiene estable hasta las 17 semanas y este tiempo de conservación aun puede prolongarse, si se siguen evaluando los tamaños en las siguientes semanas.

TABLA D

A 4 Grados.			CON MANITOL	SIN MANITOL		
	SEMANA 0		SEMANA 8			
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn011 PLGA-TMRMNA 80/20	240	0.143	262	0,141	267	0,163

TABLA E

A 4 Grados.			CON MANITOL	SIN MANITOL		
	SEMANA 0		SEMANA 8			
	Nm	PDI	Nm	PDI	Nm	PDI
Rxn012 PLGA-TMRMNA 80/20	242	0,115	341	0,263	267	0,139

En las **Tablas D y E**, a diferencia de las anteriores, la estabilidad de las NPs se evaluó cuando estos fueron conservados en presencia y ausencia manitol. En la D, observa que de la semana 0 a la 8, el tamaño aumento ligeramente, pero los PDI se mantuvieron muy iguales, por tanto, al no registrarse tamaños muy grandes y PDI casi iguales, se puede considerar que las NPs en este caso, son estables hasta las 8 semanas y el tiempo de estabilidad puede ser mayor, si se

sigue evaluando en las siguientes semanas los tamaños. Además, con o sin presencia de manitol en el medio acuoso no afecta la estabilidad. En la última Tabla, la E, se puede apreciar que hubo cambio significativo con la presencia de manitol y sin la presencia de este la estabilidad se mantuvo. No necesariamente signifi- que que el manitol haya influido en este cambio, ya que como se vio en la tabla D, el manitol no influyó. Es importante mencionar que de las 10 lecturas de ta- maño que se les hizo a la muestra a la semana 8 de la **Tabla D**, 4 de estas lecturas se encontraban alrededor de los 250nm y con PDI de entre 0.80 a 0.120, pero al ser mayor las lecturas que resultaron mayor a los 300nm, el promedio de 341nm de la tabla, viene a partir de estos 6 datos, por tanto, pudiera ser que al momento del aforo no se haya realizado homogéneamente, o la cubeta no es- taba totalmente limpio, por tanto estos pudieron ocasionar esta variación de re- sultados. Aún con estos resultados, en conclusión, se puede decir que las NPs etiquetadas con TMRMNA por lo menos son estables hasta los 2 meses, con- servándose a una temperatura de entre 4 a 8 °C (**Foto 8**)



**Foto 8.** Muestras conservadas entre 4 a 8 °C.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se elaboraron NPs-PLGA y NPs-PLGA etiquetadas con moléculas del isotiocianato de tetrametilrodamina, un fluorocromóforo que se unió de manera covalente con las NPs, con ello permitirá una mayor facilidad de visualización de las NPs-PLGA por medio de microscopía por fluorescencia. El método que se empleó para la elaboración de las NPs-PLGA fue la de emulsión y evaporación de solvente, modificado en algunas de sus fases de preparación principalmente en el método de eliminación de solvente. Con este método modificado y totalmente replicable, se pueden elaborar NPs de tamaño promedio que van desde los 210 a 260nm, tamaño que se encuentran dentro del rango que han reportados otros autores, logrando conseguir estos tamaños solo cuando se usa el manitol como crioprotector durante la liofilización, de lo contrario sin él, se obtienen NPs aglomeradas y muy polidispersas. Por otro lado, las NPs que se elaboraron son estables por lo menos en los primeros 4 meses conservadas en medio acuosos a 4 y 8 °C y la presencia o no de manitol en el medio acuoso, no afecta la estabilidad. El tiempo de estabilidad puede aumentar, ya que una de las muestras a las que se les avaluó la estabilidad a las 24 semanas, estas se mantenían estables, por tanto, es posible que las NPs bien elaboradas y conservadas, tengan una estabilidad por encima de los 4 meses, aun estando en medio acuoso. Posiblemente aquellas muestras que se congelen, el tiempo de estabilidad sea mucho mayor. Por último, por el PDI y diámetro que presentaron los dos tipos de NPs que se elaboraron, son totalmente viables funcionalizarse o ser empleadas como vectores, debido a sus dimensiones y características fisicoquímicas.

## REFERENCIAS

(s.f.).

- 1 Espinosa Estrada, E. E., Ramón Rodríguez, L. G., Izquierdo Cano, L., Ávila Cabrera, O. M., Hernández Padrón, C., & Espinosa Martínez, E. (2010). *Rituximab: historia, farmacología y perspectivas*. Habana, Cuba.: Instituto de Hematología e Inmunología.
- 2 Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez, A., Martínez, C., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clinica e Investigaciones en Arteroesclerosis*, 219-227.
- 3 Rosas, J. E. & Pedraz, J. L. (2007). Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Revista Colombiana. Ciencia. Químicas. Farmaceuticas.*, 134-153.
- 4 Sanabria Ayala, V. & Landa Piedra, A. (2007). Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectiva. *MÉDICAS UIS*, 15-30.
- 5 Sun, C., Sze, R., & Zhang, M. (2006). Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *Issue Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 550–557.
- 6 Vila Jato J. L. (2011). *Nanotecnología Farmaceutica: una galénica emergente*. Madrid, España.: Instituto de España. Real academia de Farmacia.
- 7 Akrami M, B. S. (2016). Tuning the anticancer activity of a novel pro-apoptotic peptide using gold nanoparticle platforms. *Sci.Rep*, Abstract.
- 8 Alcalá Alcalá, S. Urban Morlan, Z., Aguilar Rosas, I., & Quintanar Guerrero, D. (2013). A biodegradable polymeric system for peptide–protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process. *International Journal of Nanomedicine*, 2141–2151.
- 9 Ávila., P. E. (2011). *Detección de anticuerpos mediante*. León, Guanajuato, México.: Centro de Investigaciones en Óptica A.C.
- 10 B. Hernández, C. G. (2011). Conjugados Anticuerpo-Fármaco: El estado de arte. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 7-16.
- 11 Bartley J, M. S. (2010). Does milk increase mucus production? *Med Hypotheses*, Resumen.

- 12 Berenguer, J. G. (2006). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Madrid, España: Universitat de Barcelona.
- 13 Bhargav N. Waghela, A. S. (2015). Curcumin Conjugated with PLGA Potentiates Sustainability, Anti-Proliferative Activity and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells. *Plos ONE*, S.P.
- 14 Cao, L.-B., & Zhao, S. Z. (Nanoscale Research Letters). Highly Stable PEGylated Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticles for the Effective Delivery of Docetaxel in Prostate Cancers. *Nanoscale Research Letters*, S.P.
- 15 Chacín-Bonilla, L. (2013). Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos. *Revista Medica de Chile* , 609-615.
- 16 Chacín-Bonilla., L. (2012). Farmacoterapia actual de la amibiasis,avance en nuevas drogas y diseño de una vacuna. *Investigacion Clinica.*, 301 - 314.
- 17 Costantino , L., Gandolfi, F., Tosi , G., Rivasi , F., Vandelli, M. A., & Forni, F. (2005). Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood–brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 84-95.
- 18 Cuevas Flores , O. (2012). *Identificación de antígenos de entamoeba histolytica virulenta*. N.I: universidad autónoma de nuevo león.
- 19 Estrada, E. E., Rodríguez, L. G., Cano, L. I., Cabrera, O. M., Padrón, C. H., & Martínez, E. E. (2010). Rituximab: historia, farmacología y perspectivas. *Instituto de Hematología e Inmunología*, artículo de revision.
- 20 F. Herrera Chalé, D. B. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías. *Nutricion Hospitalaria*, 10-20.
- 21 F. Rocha Formiga, E. A.-H. (SF). *Nanosistemas a base de poliésteres*. Pamplona, España: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
- 22 He Z, H. J. (2015). Co-delivery of cisplatin and paclitaxel by folic acid conjugated amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles for the treatment of non-small lung cancer. *Oncotarget*, 42150-68.
- 23 Henry CE, W. Y. (2016). Anti-PEG antibodies alter the mobility and biodistribution of densely PEGylated nanoparticles in mucus. *Acta Biomater*, s.p (resumen).
- 24 Hernández Baltazar E., G. C. (2011). Conjugados Anticuerpo-Fármaco: El estado de arte. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, Artículo de revision.
- 25 Hernandez Herrero, G., Moreno Gonzales , A., Zaragoza Garcia , F., & Porras Chavarrino, A. (2011). Tratado de Medicina Farmaceutica. En G.

Hernandez Herrero , *Formas farmaceuticas innovadoras y formas de liberacion sostenidas* (págs. 123-140). Madrid, España: Medica Panamericana.

- 26 Iñaki Rodríguez, A. (2012). *Estudio de la traveculectomia experimental mediante implante de PLGA como dispositivo liberador de farmacos*. Pais Vasco, España.: Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea.
- 27 Jafarzadeh Kashi, T. S., Eskandarion, S., Mehdi Esfandyari-Manesh, M., Amin Marashi, S. M., Samadi, N., Mostafa Fatemi, S., . . . Dinarvand, R. (2012). Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *International Journal Nanomedicine.* , 221–234.
- 28 Kalmodia S, V. S. (2016). Bio-conjugation of antioxidant peptide on surface-modified gold nanoparticles: a novel approach to enhance the radical scavenging property in cancer cell. *Cancer Nanotechnology.* , 19.
- 29 L. Osuna Torres, M. E. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales :estudios ecnobotanico,fotoquimico y farmacologico*. Madrid, España.: Universitat de Barcelona.
- 30 Latinoamericana, E. C. (2001). *Presente y futuro de los anticuerpos monoclonales*. FABA-Infoma.
- 31 Mohapatra, S., Mallick, S. K., Maiti, T. K., Ghosh, S. K., & Pramanik, P. (2007). Synthesis of highly stable folic acid conjugated magnetite nanoparticles for targeting cancer cells. *Nanotechnology*, s.p.
- 32 Navarrete, C. L. (2007). *Sintesis de Peptidos*. Cuernavaca, Morelos.: Universidad Nacional Autonoma De México, Instituto de Biotecnologia.
- 33 Ni, J., Wang, Q., Yang , W., Zhao, M., Zhang, Y., & Guo, L. (2016). Immobilization free electrochemical biosensor for folate receptor in cancer cells based on terminal protection. *Biosens Bioelectron.* , 496-501.
- 34 O.N.U. (1 de Junio de 2016). Population and Vital Statistic Report. *Department of Economic adn social Affairs.*, págs. 1-27.
- 35 Otero-Gonz-lez., A. (1995). Anticuerpos monoclonales murinos: descripcion de protocolos tecnicos. *Revista Biomedica.*, 157-165.
- 36 Pita Rodriguez, G. (1998). Acido Folico y vitamina B12 en la nutricion humana. *Revista Cubana Aliment Nutr.*, 107-119.
- 37 Quimica-Fisica, D. d. (s.f). *Interacciones por enlaces o puen tes de hidregones*. Granada, España.: Universidad de Granada.

- 38 Rubio Muñoz, I. (2013). *Nanoparticulas PLGA: Una aportación innovadora en el uso terapéuticos de los cannabinoides*. Sevilla, España.: Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia.
- 39 Saltzman, J. S. (2008). High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine. *Journal Control Release.*, 66-72.
- 40 Santiago Mauricio, M. G. (2010). *Expresión de factores de virulencia de Entamoeba histolytica en un nuevo modelo experimental*. Monterrey, NL.: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina; Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.
- 41 Smedley, K. S. (1986). *Serie de Biología Fundamental; Anticuerpos Monoclonales*. Bacerlona, España.: Reverte S.A.
- 42 Stella , B., Arpicco, S., Parachia, M. T., Desmaële, D., Hoebeke, J., Renoir, M., . . . Couvreur, P. (2000). Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1452–1464.
- 43 Tasnim Jahan, S., & Haddadi, A. (2015). Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *Internantional Journal Nanomedicine*, 7371–7384.
- 44 Trejos Suárez, J., & Castaño Osorio, J. C. (2009). Factores de virulencia del patógeno intestinal Entamoeba histolytica. *Revista Infeccion*, 100-111.
- 45 Xihui Mu, Z. T. (2016). An Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Gold-Magnetic Nanoparticles and Phage Displayed Antibodies. *Sensors (Basel)*, 1-22.