



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y DIÓXIDO DE SILICIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS ANDRÉS DÍAZ BARRIGA GARCÍA

ASESOR: Dr. ROBERTO DÍAZ TORRES

COASESOR: Dra. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:
Evaluación toxicológica de nanopartículas de quitosán y dióxido de silicio

Que presenta el pasante: **Carlos Andrés Díaz Barriga García**
Con número de cuenta: 303005209 obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 07 de diciembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------------|--------------------------------------|--------------|
| PRESIDENTE | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo | |
| VOCAL | D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez | |
| SECRETARIO | Dr. Roberto Díaz Torres | |
| 1er SUPLENTE | M.C. Verónica Castro Bear | |
| 2do SUPLENTE | Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México en donde con orgullo me formé como un profesional.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me abrió sus puertas para estudiar la licenciatura y donde encontré grandes y magníficas experiencias. Curiosamente, cuando recibí la noticia de que había sido aceptado en la carrera de QFB en la FES, no tenía la más remota idea de donde se ubicaba geográficamente Cuautitlán. Ahora sé que soy afortunado por haber pisado cada aula y cada pasillo de esta honorable Facultad.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera y al Dr. Roberto Díaz Torres excelentes profesores y mejores como personas. De quienes además de recibir conocimiento, recibí también su calidez humana y amistad. Gracias por ser mi guía durante este trabajo y en las materias que cursé. Ustedes sin duda alguna son mi modelo a seguir como profesionales, amigos, padres y personas.

A la Dra. Elizabeth García de Psicofarma S.A. por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A Rodolfo Robles, Técnico del Laboratorio de Microscopía de la FES Cuautitlán por su colaboración en la toma de las micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido.

Al proyecto PAPIME del cual recibí beca con número PE202410 y al proyecto PAPIIT IN220612 y PACIVE, CD17 que apoyaron la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

Principalmente quiero dedicar este trabajo a mis padres: Rocío García Olivera y Jorge Andrés Díaz Barriga Juárez, de quienes he recibido todo sin saber a ciencia cierta si lo he merecido. No comprendía y recibía con cierta molestia las palabras "lo único que haces es estudiar", porque llega un momento de la vida en que uno cree que el mundo es muy pequeño para si mismo. Sin embargo, ahora que he terminado, creo que entiendo esas palabras, entiendo que todo su esfuerzo, palabras de aliento, ánimos y regaños fueron para que pudiera enfocarme solo en la escuela, para que aprovechara cada minuto de mi carrera, y es por esto que no solamente les dedico este trabajo sino, les digo de todo corazón: GRACIAS Y LOS AMO.

A Brenda Gasca Zacarías, a quien tuve la fortuna de encontrar en la recta final de la carrera y con quien llegue de la mano a la meta. Este trabajo es para ti y por ti. Gracias por todo el apoyo y los conocimientos compartidos, gracias por darme la fortaleza y hacerme creer y sentir de lo que soy capaz. Gracias por ser cómplice de este trabajo y de mi vida. TE AMO.

A Karen y César que aunque son muy pequeños para comprender las complejidades de una licenciatura son mi fuente de inspiración y gracias a su cariño pude encontrar las fuerzas y ánimos en los momentos de flaqueza. ¡Son mi adoración!

A Roberto (Bobby), María, Ivonne, Liz, Gustavo, Rosángel, Kiyomi, Uriel, Abraham Huitrón, Aldo, Alan (Rigo), Iván, Vida, Ilse, Prisci, Noé y Gaby... compañeros y también amigos con quienes comencé esta mágica historia y aunque no convivimos durante toda la carrera dejaron impresos recuerdos muy gratos en el tiempo que estuve en la FES!

A Hugo, Manuel e Isabel, amigos de la preparatoria que a pesar de no haber estudiado conmigo, estuvieron presentes durante toda la carrera.

La vida me trajo la fortuna de sentir el espíritu universitario desde que entré a la Preparatoria 9, grandes recuerdos vienen de aquella época. Y aunque muchas personas me han dicho que los mejores momentos de su juventud los vivieron en el bachillerato, para mí la universidad, mi carrera y la FES Cuautitlán fueron la mejor experiencia de lo que he vivido hasta ahora.

Por ahora se cierra un capítulo dentro de la FES, espero pronto volver. Gracias UNAM, gracias FES-C.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 10 |
| 1.1. ¿QUÉ SON LAS NANOPARTÍCULAS? | 10 |
| 1.2. MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS | 12 |
| 1.2.1. DISPERSIÓN DE POLÍMEROS PREFORMADOS..... | 12 |
| 1.2.2. MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN | 13 |
| 1.2.3. MÉTODO DE GELACIÓN IÓNICA O COACERVACIÓN | 13 |
| 1.3. CARACTERIZACIÓN | 14 |
| 1.3.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA | 14 |
| 1.3.2. CARGA SUPERFICIAL | 16 |
| 1.3.3. MICROSCOPIA | 18 |
| 1.4. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y DIÓXIDO DE SILICIO | 20 |
| 1.5. NANOTOXICOLOGÍA..... | 22 |
| 1.5.1. ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS | 22 |
| 1.5.2. ASPECTOS ÉTICOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS | 24 |
| 1.5.3. PRUEBAS DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA..... | 25 |
| 1.5.4. MECANISMOS DE TOXICIDAD | 28 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 30 |
| 3. METODOLOGÍA..... | 31 |
| 3.1. MATERIALES..... | 31 |
| 3.1.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS | 31 |
| 3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO..... | 31 |
| 3.1.3. SOLUCIONES DE USO BIOLÓGICO..... | 31 |
| 3.1.4. EQUIPOS..... | 32 |
| 3.1.5. MODELOS EXPERIMENTALES | 32 |
| 3.2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y DIÓXIDO DE SILICIO | 33 |
| 3.3. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA..... | 35 |
| 3.3.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA Y CARGA SUPERFICIAL | 35 |
| 3.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) | 35 |
| 3.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) | 35 |
| 3.4. EVALUACIONES TOXICOLÓGICAS..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 3.4.1. PRUEBAS CITOTÓXICAS | 36 |
| 4. RESULTADOS | 41 |
| 4.1. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA..... | 41 |
| 4.2. EVALUACIÓN CITOTÓXICA..... | 46 |
| 4.2.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DE MTT | 46 |
| 4.2.2. ENSAYO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA..... | 47 |
| 4.2.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR | 49 |
| 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 52 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 57 |
| 7. PERSPECTIVAS | 58 |
| BIBLIOGRAFÍA | 59 |
| ANEXO A CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA | 62 |
| CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA..... | 62 |
| CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL (POTENCIAL Z) | 64 |
| MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) | 66 |
| MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)..... | 68 |
| ANEXO B DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS CELULARES | 72 |
| Línea Celular HeLa..... | 72 |
| Línea Celular Vero | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1 EJEMPLO DE APLICACIONES COMERCIALES DE NANOPARTÍCULAS (SANVICENS & MARCO, 2008) | 10 |
| TABLA 2 INGREDIENTES DE LA FORMULACIÓN PARA LA PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN-SiO ₂ Y LOS SISTEMAS CONTROL..... | 34 |
| TABLA 3 RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SISTEMA CONTROL 1 (SiO ₂ DISPERSIÓN AL 0.1%) | 42 |
| TABLA 4 RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SISTEMA CONTROL 2 (NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN) | 43 |
| TABLA 5 RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SISTEMA A (NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN-SiO ₂) | 44 |
| TABLA 6 RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SISTEMA B (NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN-SiO ₂) | 45 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| GRÁFICA 1 PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS VERO POR TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 46 |
| GRÁFICA 2 PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS HELa POR TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 46 |
| GRÁFICA 3 COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS HELa Y VERO DURANTE EL TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 47 |
| GRÁFICA 4 CURVA DE CALIBRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA) 3 MM..... | 47 |
| GRÁFICA 5 CURVA DE CALIBRACIÓN ALBÚMINA SÉRICA BOVINA A 0.22 MG/ML | 47 |
| GRÁFICA 6 CONCENTRACIÓN TBARS POR MG DE PROTEÍNA TOTAL EN CÉLULAS VERO POR EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 48 |
| GRÁFICA 7 CONCENTRACIÓN TBARS POR MG DE PROTEÍNA TOTAL EN CÉLULAS HELa POR EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 48 |
| GRÁFICA 8 COMPARACIÓN DE TBARS/MG PROTEÍNA EN CÉLULAS HELa Y VERO DURANTE EL TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 49 |
| GRÁFICA 9 PORCENTAJE OBTENIDO DE PRIMERAS (M1), SEGUNDAS (M2) Y TERCERAS O SUBSECUENTES (M3) METAFASES AL CONTEO TOTAL DE LAS 100 MITOSIS CONSECUTIVAS | 49 |
| GRÁFICA 10 ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS HUMANOS POR EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS. | 50 |
| GRÁFICA 11 ÍNDICE MITÓTICO DE LINFOCITOS HUMANOS POR EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN, SiO ₂ Y LOS SISTEMAS COMBINADOS..... | 50 |

ÍNDICE DE IMÁGENES

| | |
|--|----|
| IMAGEN 1 PATRÓN DE DISPERSIÓN DE LA LUZ | 15 |
| IMAGEN 2 DETECCIÓN DE LA LUZ DISPERSADA (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2004) | 15 |
| IMAGEN 3 REGIONES DE CARGA ALREDEDOR DE UNA PARTÍCULA CON CARGA NEGATIVA (SANDOVAL YOVAL, MONTELLANO PALACIOS, & PIÑA SOBERAN, 2005)..... | 16 |
| IMAGEN 4 DETECCIÓN DE LA LUZ DISPERSADA POR EL PASO DE PARTÍCULAS EN LA CELDA CUANDO ES APLICADA UNA CARGA (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2004) | 17 |
| IMAGEN 5 ADUCTO (1,2) DE MALONDIALDEHÍDO CON ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (ZEPTOMETRIX, 2006) | 27 |
| IMAGEN 6 ESQUEMA DE LOS POSIBLES MECANISMOS ASOCIADOS A LA TOXICOLOGÍA QUE PRESENTA LA CÉLULA CUANDO INTERACTÚA CON NANOPARTÍCULAS (SANVICENS & MARCO, 2008) | 29 |
| IMAGEN 7 CELDA CAPILAR DTS 1060 “PARA DETERMINACIÓN DE TAMAÑO Y POTENCIAL Z” (MALVERN INSTRUMENTS, 2004) | 35 |
| IMAGEN 8 NÚCLEOS PROLIFERANTES..... | 40 |
| IMAGEN 9 PRIMERA METAFASE (M1) | 40 |
| IMAGEN 10 SEGUNDA METAFASE (M2) | 40 |
| IMAGEN 11 TERCERA METAFASE (M3) | 40 |
| IMAGEN 12 MICROGRAFÍA POR SEM DEL SISTEMA SiO ₂ . TOMADA A 10000X..... | 42 |
| IMAGEN 13 MICROGRAFÍA POR TEM DEL SISTEMA SiO ₂ . TOMADA A 40000X..... | 42 |
| IMAGEN 14 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA QUITOSÁN, FORMULACIÓN INICIAL. IMAGEN TOMADA A 10000X | 43 |
| IMAGEN 15 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA QUITOSÁN, FORMULACIÓN FINAL. IMAGEN TOMADA A 10000X | 43 |
| IMAGEN 16 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA QUITOSÁN, FORMULACIÓN FINAL. IMAGEN TOMADA A 40000X | 43 |
| IMAGEN 17 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA QUITOSÁN, FORMULACIÓN FINAL. IMAGEN TOMADA A 100000X | 43 |
| IMAGEN 18 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA A, FORMULACIÓN INICIAL. IMAGEN TOMADA A 10000X..... | 44 |
| IMAGEN 19 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA A, FORMULACIÓN FINAL. IMAGEN TOMADA A 10000X..... | 44 |
| IMAGEN 20 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA A. FORMULACIÓN FINAL. TOMADA A 100000X | 44 |
| IMAGEN 21 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA B, FORMULACIÓN INICIAL. IMAGEN TOMADA A 10000X..... | 45 |
| IMAGEN 22 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA B, FORMULACIÓN FINAL. IMAGEN TOMADA A 10000X..... | 45 |

| | |
|---|----|
| IMAGEN 23 MICROGRAFÍA DEL SISTEMA B, FORMULACIÓN FINAL. IMAGEN TOMADA A 100000X | 45 |
| IMAGEN 24 CÉLULA BINUCLEADA..... | 51 |
| IMAGEN 25 CÉLULA TETRANUCLEADA..... | 51 |

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ¿QUÉ SON LAS NANOPARTÍCULAS?

Las nanopartículas son materiales con un tamaño menor a 1000 nm y muestran propiedades físicas y químicas únicas, dependientes de su tamaño, forma y composición química (características ópticas, termodinámicas y electroquímicas). Se encuentran en el mismo rango de dimensión de diferentes biomoléculas como anticuerpos, ácidos nucleicos y algunos péptidos.

Estas características biomiméticas y la capacidad de modular sus propiedades, hacen a las nanopartículas un objetivo atractivo para su uso en el campo de la medicina, ya sea como sistemas de entrega de fármaco o herramientas para visualización y diagnóstico clínico (Sanvicens & Marco, 2008).

Las limitaciones de los fármacos administrados terapéuticamente con las tecnologías existentes, como baja eficacia y selectividad; además de la resistencia a nivel de sitio de acción debida a barreras fisiológicas o mecanismos celulares, aunado a la pobre solubilidad, baja biodisponibilidad y eliminación rápida que sufren diversos fármacos pueden minimizarse con el uso de la nanotecnología mediante sistemas de liberación de fármacos, reduciendo también los efectos negativos.

Esto puede lograrse debido a su talla, por lo cual pueden penetrar diferentes barreras biológicas. Además, las nanopartículas pueden prepararse para contener, encapsular o unir moléculas, mejorando la solubilidad, estabilidad y absorción de muchos fármacos. De hecho, se ha reportado que las nanopartículas pueden acarrear varios agentes terapéuticos como DNA, proteínas, péptidos y compuestos de bajo peso molecular. Como resultado, la comercialización de productos terapéuticos basados en nanopartículas está ganando terreno, con un creciente número de productos disponibles en el mercado (ver tabla 1).

Tabla 1 Ejemplo de Aplicaciones comerciales de nanopartículas (Sanvicens & Marco, 2008)

| Sistema | Aplicación | Indicación | Compañía |
|----------------------------------|--|---|---|
| Liposomas | Entrega de fármaco | Cancer Vacunas: Influenza, Hepatitis A | Liplasome Pharma Schering-Plough Corp |
| Dendrimeros | Terapeutica | VIH, cáncer, oftalmología, inflamación | Berna biotech AG Enzon Starpharma |
| Nanotubos de carbono | Diagnóstico in vitro | Monitoreo de la función respiratoria | Nanomix |
| Puntos Cuánticos | Diagnóstico in vitro Visualización | Agentes de marcaje, citometría de flujo, biodetección | Evident Technologies Quantum Dot Corp Nanoco Technologies |
| Nanopartículas magnéticas | Diagnóstico in Vitro Visualización Terapéutico | Cancer Tumores Hepáticos, enfermedades cardiovasculares, | Immunicon Advanced Magnetics Nanospectra Biosciences Inc |
| Nanopartículas de Oro | Diagnóstico in Vitro Visualización | VIH Agentes de Etiquetado | Amersham/GE Nanoprobes Inc |

Las ventajas de utilizar nanopartículas como sistemas de entrega de fármaco incluyen las siguientes:

- El tamaño de partícula y características de superficie de las nanopartículas puede ser fácilmente manipulado para lograr la entrega dirigida de fármacos de manera activa y pasiva después de administración parenteral
- Controlan y mantienen la liberación del fármaco durante el transporte y en el sitio de localización, alterando la distribución en órganos del fármaco y subsecuentemente la eliminación del mismo para lograr el incremento en la eficacia terapéutica y reducción de efectos secundarios.
- Las características de liberación controlada y degradación de partículas pueden ser moduladas fácilmente mediante la elección de los constituyentes de la matriz. El porcentaje de carga de fármaco es relativamente alta y los fármacos pueden ser incorporados en los sistemas sin alguna reacción química; esto es un factor importante para preservar la actividad del fármaco.
- La entrega dirigida en sitio-específico puede ser lograda mediante la unión de ligandos a la superficie de la partícula.
- Los sistemas nanoparticulados pueden ser incluidos para varias rutas de administración (oral, nasal, parenteral, intraocular).

Sin embargo, a pesar de las ventajas mencionadas, las nanopartículas también tienen limitaciones en su uso. Por ejemplo, su tamaño de partícula pequeño y gran área superficial puede llevar a la agregación de partículas, dificultando el manejo físico de éstas en sistemas líquidos o de forma seca. Además, el tamaño de partícula y área superficial limitan la carga de fármaco y la liberación. Estos problemas prácticos tienen que ser superados de acuerdo al fin que se les quiera dar y antes de ser propuestos para su uso clínico o tenerlos comercialmente disponibles en diversas áreas de la industria (Mohanraj & Chen, 2006).

1.2. MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Existe una amplia variedad de materiales para la preparación de nanopartículas, materiales tales como proteínas, polisacáridos, lípidos y polímeros sintéticos. La selección del material a ocupar se realizará dependiendo del objetivo de su fabricación (Mohanraj & Chen, 2006), basándose en:

- a) El tamaño requerido de nanopartículas
- b) Propiedades inherentes al fármaco (p. ej. solubilidad en agua, estabilidad)
- c) Características de superficie (p. ej. carga y permeabilidad)
- d) Grado de biodegradación, biocompatibilidad y toxicidad
- e) Perfil de liberación de fármaco deseado
- f) Antigenicidad del producto final

Los principales métodos de preparación de nanopartículas son los siguientes: Dispersión de polímeros preformados; Polimerización de monómeros; y Gelación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos.

1.2.1. DISPERSIÓN DE POLÍMEROS PREFORMADOS

Es una técnica común utilizada para preparar nanopartículas biodegradables de materiales como ácido poliláctico (PLA); poli (D,L-glicolido) PLG; poli (D,L-lactido-co-glicolido) PLGA y poli(cianoacrilatos) PCA. Esta técnica puede ser utilizada en varias maneras descritas a continuación. En esta vía de fabricación, se pueden incluir fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos.

Método de evaporación de solventes: En este método el polímero es disuelto en un solvente orgánico el cual es utilizado para disolver el fármaco hidrofóbico. La mezcla de polímero y fármaco es emulsificada en una solución acuosa que contiene un tensoactivo. Posteriormente la emulsión es evaporada por reducción de la presión o por agitación continua.

Método de emulsificación espontánea o difusión de solventes: Es una versión modificada del método de evaporación de solventes. En este método, el solvente miscible en agua junto con una pequeña cantidad de solvente orgánico es usada como fase oleosa. Debido a la espontaneidad de la difusión de solventes se crea una turbulencia interfacial entre las dos fases, lo cual lleva a la formación de pequeñas partículas.

1.2.2. MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN

La preparación de nanopartículas por esta vía, implica un proceso de polimerización de monómeros en solución acuosa. El fármaco puede ser incorporado tanto por la disolución en el medio de polimerización, como por la adsorción en la superficie de las nanopartículas una vez que haya culminado la polimerización. El tamaño y la formación de nanopartículas dependen de la concentración del tensoactivo y estabilizador empleado.

Una vez que se formaron las nanopartículas se purifican para remover exceso de materiales como estabilizadores o tensoactivos por ultracentrifugación y posteriormente resuspendidas en un medio isotónico libre de tensoactivos. Los principales materiales empleados en este método son los polialquil-cianoacrilatos.

1.2.3. MÉTODO DE GELACIÓN IÓNICA O COACERVACIÓN

La mayor parte de la investigación sobre nanopartículas se ha dirigido al uso de materiales poliméricos biodegradables e hidrofílicos como quitosán, gelatina y alginato de sodio; sin embargo existe un mayor enfoque hacia el material polimérico quitosán.

El método involucra dos fases acuosas, una de las cuales contiene al quitosán que presenta carga positiva en su estructura y en la otra fase está presente un polianión, generalmente tripolifosfato de sodio (TPP). En estas nanopartículas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida o semisólida. La formación de las nanopartículas se da de la siguiente manera (Goycoolea, Remuñán-López, & Alonso, 2003):

El grupo amino del quitosán, con carga positiva, interactúa con el tripolifosfato cargado negativamente en un proceso conocido como auto-asociación o entrecruzamiento en donde las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas también llamados coacervados.

Los coacervados son formados como resultado de la interacción electrostática de las dos fases acuosas; mientras que la gelación iónica involucra la transición del material de una forma líquida a un gel debido a las condiciones de interacción iónica a temperatura ambiente.

Entre las ventajas del método de gelación iónica, cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza policationica del Quitosán le confieren a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación.

1.3. CARACTERIZACIÓN

La caracterización de los materiales, y en este caso de las nanopartículas, es importante para asegurar que los resultados son reproducibles y proveen las bases para la comprensión de las propiedades de las nanopartículas que determinan sus efectos biológicos. Existen parámetros específicos que afectan la actividad biológica de las nanopartículas y hasta el momento no se conocen del todo; debido a esto la caracterización de estas partículas debe ser amplia.

Una caracterización completa (de nanopartículas) implica diversas mediciones que incluyen el tamaño y distribución de tamaño de partícula, forma y otras características morfológicas como cristalinidad, porosidad, rugosidad; química del material; solubilidad; área superficial; estado de dispersión y otras propiedades fisicoquímicas. Sin embargo las propiedades que comúnmente se caracterizan en sistemas nanoparticulados son tamaño y forma de partícula, y carga superficial (Powers, Brown, & Krishna, 2006)

1.3.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA

Un aspecto que debe considerarse para la determinación del tamaño de partícula es la premisa de que las partículas analizadas mantienen una forma esférica perfecta. Ocasionalmente este tipo de sistemas son esferas perfectas, e incluso es menos frecuente encontrar monodispersidad en estos. El modelo de *esfera equivalente* hace posible trazar la distribución del tamaño de partícula de sistemas con formas irregulares utilizando un valor único (diámetro) a lo largo de un solo eje. La propiedad descrita más a menudo en este tipo de sistemas es el volumen, que es el diámetro de la esfera de igual volumen a la partícula en cuestión.

Así, la representación del tamaño de partícula se muestra normalmente como un histograma log-normal localizando el diámetro de partícula en las abscisas y la cantidad de partículas (número de partículas) en un intervalo de tamaño dado en las ordenadas. Una de las técnicas más utilizadas para determinar tamaño y distribución de tamaño de partícula es la técnica de Dispersión dinámica de la luz.

1.3.1.1. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ

Para esta técnica el tamaño de partícula se determina mediante la medición del movimiento Browniano de las partículas en una muestra utilizando la Dispersión dinámica de la luz (DLS, Dynamic Light Scattering). Esto es por medio de la iluminación de las partículas con un láser y analizando las *fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada*. Las nanopartículas en un medio líquido se mueven aleatoriamente y su velocidad de movimiento es usada para determinar la talla de la partícula (Swarbrick, 2006; Malvern Instruments Ltd, 2004).

1.3.1.1.1. Fluctuaciones de intensidad dispersada

Si una pequeña partícula es iluminada con una fuente de luz como un láser, la partícula dispersará la luz en todas direcciones. Si una pantalla es sostenida cerca de la partícula, la pantalla será iluminada por la luz dispersada. Considerando que se trata de miles de partículas, la pantalla mostrará patrones de luz como se muestra en la imagen 1.

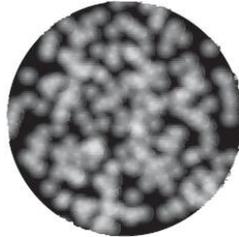


Imagen 1 Patrón de dispersión de la luz

El patrón reflejado consistirá en áreas de luz brillante y áreas oscuras donde la luz no será detectada. (Malvern Instruments Ltd, 2004)

Sin embargo, como se menciona arriba, las partículas en medio líquido se encuentran en movimiento constante debido a las colisiones aleatorias con las moléculas del líquido que rodea a las partículas. Una característica importante del movimiento Browniano para DLS es que las pequeñas partículas se mueven rápidamente mientras que las grandes se mueven lentamente. La relación entre el tamaño de una partícula y su velocidad debida al movimiento Browniano está definida en la ecuación Stokes-Einstein.

Mientras las partículas están en constante movimiento el patrón de luz también parecerá moverse. Al moverse alrededor, las fases constructivas y destructivas de la luz dispersada causará el incremento y disminución de la intensidad de las áreas luminosas y oscuras –en otras palabras, la intensidad parecerá fluctuar (ver Imagen 2).

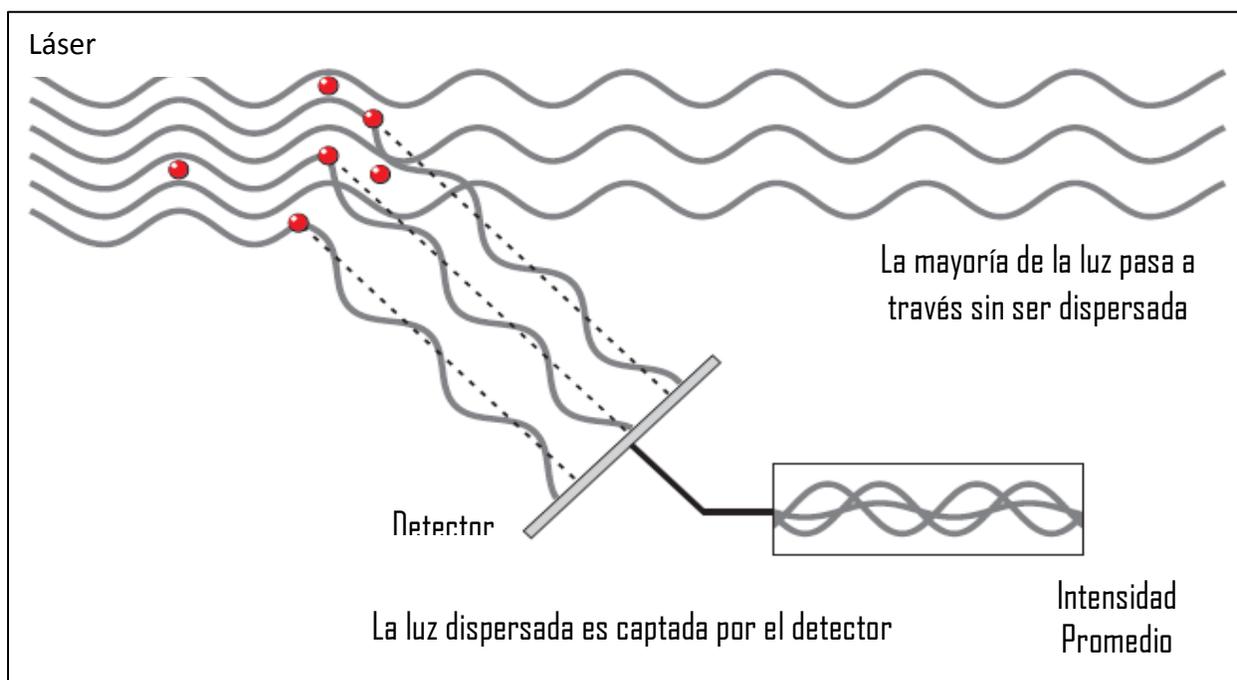


Imagen 2 Detección de la luz dispersada (Malvern Instruments Ltd, 2004)

1.3.2. CARGA SUPERFICIAL

La carga superficial de las nanopartículas es importante por dos razones: 1) es un factor mayor en la determinación de las características de dispersión de las partículas y 2) influenciará la adsorción de iones y biomoléculas, lo cual puede cambiar la manera en que las células reaccionan a las partículas (Powers, Brown, & Krishna, 2006). Generalmente las cargas superficiales de los sistemas particulados son estimadas a través de mediciones de potencial Z. El potencial Z es una función de la carga superficial de la partícula, sustancias adsorbidas sobre su superficie y la composición y fuerza iónica del medio que lo rodea. El potencial Z de las nanopartículas se mide generalmente por electroforesis de luz dispersada o métodos de electroacustoforesis.

1.3.2.1. POTENCIAL Z

El desarrollo de una carga neta en la superficie de las partículas afecta la distribución de iones en la región interfacial (Imagen 3), dando como resultado un incremento en la concentración de contraiones cerca de la superficie. Debido a esto existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula; la capa interna llamada Capa de Stern presenta iones fuertemente unidos a la partícula; la capa externa, región difusa, los iones están unidos con menor fuerza, sin embargo permanecen unidas a la partícula a pesar de que se encuentre en movimiento. Estos iones formarán un límite con el medio de dispersión, a éste límite se le conocerá como slipping plane (Malvern Instruments Ltd, 2004).

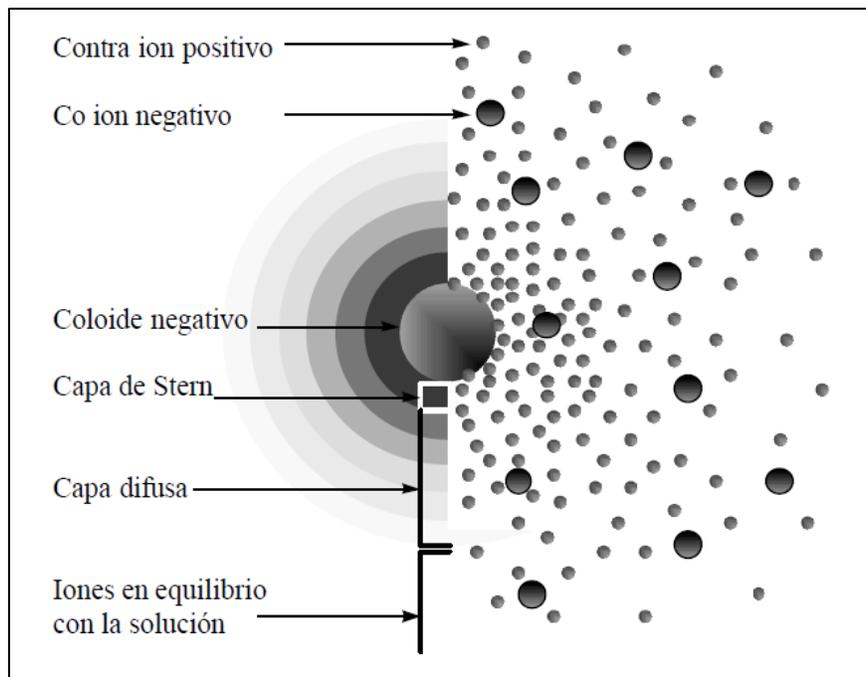


Imagen 3 Regiones de carga alrededor de una partícula con carga negativa (Sandoval, Montellano, & Piña, 2005)

Existe un potencial entre la superficie de la partícula y el líquido dispersor, el cual varía de acuerdo a la distancia de la superficie de la partícula – este potencial se conoce como Potencial Z. Dado lo anterior, el Potencia Z es usado para caracterizar las propiedades de carga superficial de las nanopartículas. Es un reflejo del potencial eléctrico de las partículas y está influenciado por la composición de las partículas y el medio en el cual están dispersadas. Las nanopartículas con Potencial Z superior a (+/-)30 mV han mostrado ser estables en suspensión ya que la carga superficial previene la agregación (floculación) de las partículas (Mohanraj & Chen, 2006).

1.3.2.1.1. Electroforesis de Láser Doppler

El potencial Z es medido utilizando una combinación de técnicas de medición: Electroforesis y Velocimetría de Laser Doppler, algunas veces llamado Electroforesis de Laser Doppler. Este método mide que tan rápido se mueve una partícula en un líquido cuando un campo eléctrico es aplicado. La luz dispersada en un ángulo de 17° es combinada con una luz de referencia. Esto produce una señal de fluctuación de intensidad en donde la fluctuación es proporcional a la velocidad de las partículas que se mueven debido a la aplicación de un campo eléctrico.

Un procesador digital de señales es utilizado para extraer las características de frecuencia en la luz dispersada. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula, y el campo eléctrico es aplicado, usando otras dos constantes de la muestra (viscosidad y constante dieléctrica) se puede conocer el potencial Z (Imagen 4).

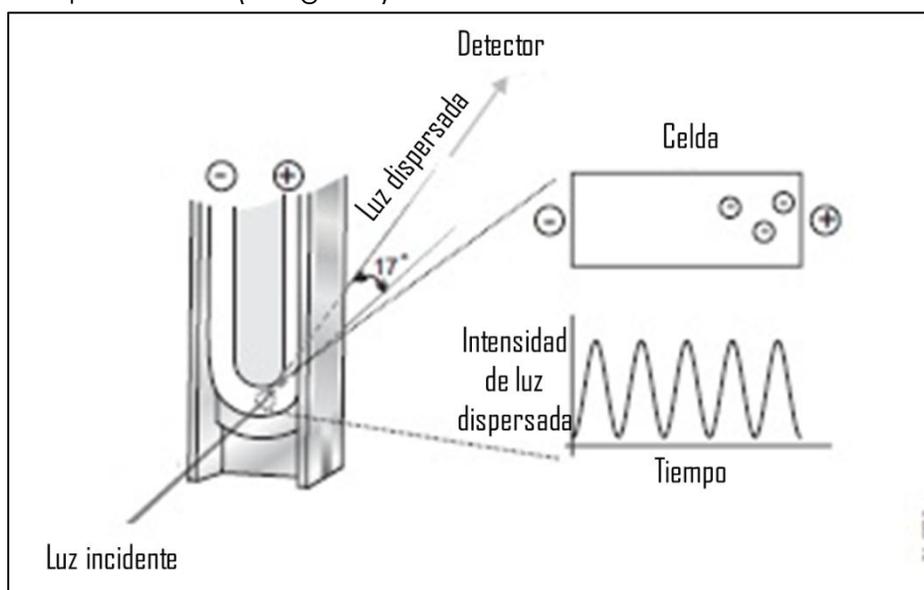


Imagen 4 Detección de la luz dispersada por el paso de partículas en la celda cuando es aplicada una carga (Malvern Instruments Ltd, 2004)

1.3.3. MICROSCOPIA

La microscopía es una de las técnicas más utilizadas para obtener información referente al tamaño y morfología. En el caso de sistemas nanoparticulados generalmente se utiliza la Microscopía Electrónica para la captura de imágenes. Es la única técnica que arroja información relevante a cerca de su forma, composición y superficie a esta escala.

1.3.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Debido a las limitaciones de los microscopios ópticos, la microscopía electrónica juega un rol importante en la visualización del tamaño de partícula de una muestra, así como la evaluación de su morfología. Ésta técnica, requiere que la muestra esté seca y que un agente de contraste sea aplicado a la superficie. El agente de contraste típicamente es oro o paladio, el cual es adherido a la superficie mediante un recubrimiento al alto vacío. Cabe señalar, que la adición de éstos agentes puede modificar tanto el tamaño o forma durante la visualización, lo cual es una de las desventajas de usar esta técnica. Otra de las limitaciones es la determinación de una distribución de tamaño de partícula, debido al número de partículas que pueden ser vistas; además de que puede resultar difícil la observación de partículas más pequeñas de 100 nm.

El microscopio electrónico de barrido (SEM, de su nombre en inglés Scanning Electron Microscopy) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, de una escala nanométrica (nm) a micrométrica (μm). Se distingue por su capacidad para mostrar imágenes aparentemente en tres dimensiones de las superficies de diversos materiales. A partir de él se producen distintos tipos de señales que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características.

Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor.

1.3.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM de su nombre en inglés, Transmission Electron Microscopy) es una técnica la cual un haz de electrones es transmitido a través de la muestra. La muestra es secada y teñida con un agente de contraste, como el acetato de uranilo o ácido fosfotungstico, y entonces es analizado. TEM provee información acerca del tamaño, forma e integridad de las nanopartículas.

Similar a SEM, la microscopía electrónica de transmisión es un método para la evaluación del tamaño de partícula y morfología de las partículas. Ésta técnica se realiza bajo alto vacío y requiere que la muestra se encuentre seca. La adición de un agente de contraste o recubrimiento no es requerida para esta técnica.

A diferencia de SEM, este tipo de microscopía electrónica transmite electrones a través de una partícula en lugar de reflejarlos. Por consecuencia, la muestra debe ser relativamente delgada. Un ángulo bajo de dispersión debido a la difusión de electrones es medido durante la operación normal de TEM (Swarbrick, 2006).

1.4. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y DIÓXIDO DE SILICIO

En los años recientes, las nanopartículas poliméricas han sido ampliamente investigadas dentro del campo de la medicina como acarreadores de fármaco. Se piensa que tienen un rol especial en la liberación dirigida de fármaco debido a su mayor tiempo de vida y una mejor capacidad de carga de fármaco en comparación con los liposomas (Wu, Yang, Wang, & Hu, 2004). Las características que deben cumplir las nanopartículas poliméricas son biodegradabilidad y biocompatibilidad, principalmente, para ser acarreadores de fármacos en la entrega dirigida.

El Quitosán, es un polímero que se ajusta al perfil de acarreadores de fármacos ya que presenta características favorables como biocompatibilidad, biodegradabilidad, incrementa la permeabilidad membranal tanto *in vitro* como *in vivo* (Tang, Quian, & Shi, 2007) y posee carácter policationico. Es un biopolímero polisacárido, específicamente un aminopolisacárido hidrosoluble que puede formar nanopartículas en condiciones y medios ácidos suaves. Su carácter policationico le confiere alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (insulina, pADN, siARN) y antigénicas a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica (Goycoolea, Remuñán-López, & Alonso, 2003).

Como resultado, se tienen nanopartículas con propiedades adecuadas para acarreamiento de fármacos; no obstante, el tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica. Generalmente, el tamaño de partícula en este sistema se encuentra en un rango de 100 a 350 nm; el potencial Z entre +20 y +50 mV y poseen una morfología esférica (Lemarchand, Gref, & Couvreur, 2004). Estas características, confieren a las nanopartículas de Quitosán propiedades óptimas para la interacción con diversos epitelios.

Recientemente se han preparado nanopartículas de Quitosán con diferentes sustancias para mejorar sus propiedades (liberación, estabilidad); sin embargo, no existe mucha información acerca de nanopartículas de Quitosán con Dióxido de Silicio (SiO_2 , sílica). El uso de nanopartículas a base de sílica como vehículos de entrega de fármaco ha ganado terreno como resultado de sus propiedades fisicoquímicas. La sílica amorfa es biocompatible y es por eso que se emplea como aditivo de alimentos o en implantes médicos.

La realización de este trabajo pretende aprovechar las ventajas que presentan el SiO_2 , al incluirlo en la preparación de nanopartículas de quitosán. Estas nanopartículas son más estables a variaciones de temperatura y fluctuaciones de pH y su superficie, al estar rodeada de grupos hidroxilo les permite ser menos vulnerables a ser blanco de los procesos de defensa del sistema inmune como la opsonización (Sin Cheow, Li, & Hadinoto, 2009).

La preparación de nanopartículas de quitosán y SiO_2 se realizó utilizando el método de preparación basado en el principio de gelación iónica de quitosán con un polianión, tripolifosfato (TPP) manteniendo una relación 3:1 de quitosán con respecto al TPP. Fue

necesario evaluar la adición de SiO₂ al sistema, en consecuencia se prepararon dos sistemas de nanopartículas de Quitosán y SiO₂ con diferente orden de adición de cada compuesto y se caracterizaron fisicoquímicamente. En el presente trabajo se evaluó la capacidad citotóxica *in vitro* mediante la estimación de la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de glutatión como principal sustancia antioxidante celular; así como la capacidad de reducir al MTT a formazan; y la estimación de la afectación del ciclo celular a través del ensayo de proliferación celular.

1.5. NANOTOXICOLOGÍA

El desarrollo de las nanopartículas se ha producido fundamentalmente por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales, a su vez, son las que contribuyen a su toxicidad en los organismos vivos. Así, su forma, tamaño, tipo de material, pureza, área superficial, carga eléctrica, características estructurales, dosis, vía de administración, concentración en el órgano diana y duración de la acción, son algunas de las variables que pueden contribuir con la capacidad tóxica de las nanopartículas (Sanvicens & Marco, 2008).

Dado lo anterior, la caracterización de los materiales es un requerimiento para cada estudio nanotoxicológico y llevará al mejor entendimiento de cómo las diferentes propiedades de las nanopartículas afectan su respuesta biológica. También la toxicidad de las partículas dependerá de su persistencia en los órganos en los que se depositan y de si el hospedador puede provocar una respuesta biológica para secuestrar o eliminar estos sistemas.

El hecho de que las nanopartículas se comporten de manera nueva –y en ocasiones inesperada- tiene implicaciones importantes para el campo de la toxicología. Por esto, nace un nuevo término: *Nanotoxicología*, que se define como la “ciencia que examina los efectos dañinos y tóxicos de las nanoestructuras diseñadas artificialmente y de los nanomecanismos en los organismos vivos” (Kunzmann & Andersson, 2010). Entonces, la Nanotoxicología es un campo multidisciplinario que involucrará las ciencias de materiales y toxicología para poder comprender las nano-biointeracciones adversas.

1.5.1. ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

Actualmente no existe regulación específica para los productos nanotecnológicos en general. Por tanto se ha buscado información de las agencias regulatorias de mayor importancia a nivel mundial sobre las acciones que se emprenderán para lograr regular materiales a escalas nano, la FDA en Estados Unidos (Food & Drug Administration) y en la comunidad Europea, la EMEA (European Medicine Agency).

La FDA en su publicado “2010 FDA Research Project Categories” declaró la ruta que tomará esta agencia para recabar información y así comenzar la regulación de productos nanotecnológicos. Algunos puntos que trata este documento son:

- Recolectar información de la caracterización de riesgos para determinar y clasificar los nanomateriales basados en sus propiedades físicas y químicas.
- Realizar evaluaciones *in vivo* e *in vitro* para lograr predecir las respuestas *in vivo* en humanos ante la exposición a nanomateriales.
- Establecer métodos para cuantificar y caracterizar la exposición a nanomateriales y caracterizarlos en matrices biológicas.

- Relacionar las propiedades de los nanomateriales con los efectos que producen en la absorción vía pulmonar, dérmica y gastrointestinal.

También la FDA dirige el grupo de trabajo sobre las Implicaciones Ambientales y de Salud de Nanomateriales para definir nuevos métodos de prueba/protocolos para definir la seguridad de estos productos. Finalmente, la Agencia contribuye directamente con las evaluaciones de la toxicidad de nanomateriales sustentado por el Programa Nacional de Toxicología (NTP, por sus siglas en inglés).

Por su parte, la EMEA en los documentos publicados en línea "Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use" y "Adecuabilidad de las metodologías para evaluar riesgos potenciales asociados con productos nanotecnológicos" se menciona, a manera de resumen, lo siguiente (EMEA 2006):

Debe hacerse énfasis en la seguridad y consideraciones éticas con respecto a los productos nanotecnológicos. Los datos concernientes a la caracterización, detección y medición del destino de las nanopartículas en humanos y el ambiente, son insuficientes; así como los aspectos toxicológicos y de toxicología ambiental para permitir el desarrollo de metodologías de evaluación de riesgo humana y ambiental.

Aunque los métodos toxicológicos y ecotoxicológicos sean apropiados para evaluar algunos de los riesgos asociados con los productos, no son suficientes. Las metodologías necesitan adaptarse y deben crearse nuevos métodos.

También se considera de gran importancia el establecer una base de datos reproducible y confiable como Hojas de Seguridad de los Materiales (MSDS, de Material Safety Data Sheet) para partículas pequeñas y relacionar efectivamente la información toxicológica con sus propiedades fisicoquímicas.

A pesar de que no existan regulaciones concretas, como cualquier producto medicinal, los productos nanomedicinales tienen que ser caracterizados. Su destino y toxicología debe ser establecida y se deben demostrar que los métodos de evaluación sean apropiados. Las metodologías usadas para evaluar su toxicidad deben ser probadas para autorizar su comercialización, y se hace necesario evaluar la relación riesgo/beneficio a los pacientes así como al ambiente.

Una vez que un producto sea permitido en el mercado, basándose en un balance positivo riesgo beneficio, la supervisión y farmacovigilancia deberá continuar de acuerdo a la legislación farmacéutica

Durante un congreso sobre toxicología llevado a cabo en el 2006 en Estados Unidos se analizaron dos aspectos sobre el estudio de las nanopartículas en donde se identificaron puntos críticos necesarios para evaluar la seguridad de las nanopartículas. Surgió a la luz la necesidad de recabar información crítica para la evaluación de la toxicidad de nanopartículas las cuales se listan a continuación (Balbus, Maynard, Colvin, & Castranova, 2007):

- a) Caracterización fisicoquímica extensiva
- b) Capacidad para la perturbación macromolecular
- c) Potencial de acarreamiento no intencional de moléculas tóxicas
- d) Translocación
- e) Estado de aglomeración
- f) Composición química

Otro punto es la estrategia para evaluar los riesgos a la salud humana de las nanopartículas. En donde se propone en primera instancia evaluar la adecuabilidad de los métodos actuales para estudiar la toxicidad de nanopartículas y/o generar y establecer protocolos de pruebas.

1.5.2. ASPECTOS ÉTICOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

El desarrollo de nanopartículas tiene un futuro prometedor hablando específicamente para aplicaciones médicas ya sea como formas de dosificación, dispositivos médicos o herramientas para visualización; sin embargo es necesario pensar en los beneficios o riesgos que se tienen al fabricar, administrar o disponer estos materiales ya que no se tiene certeza del impacto que tendrán en el ambiente y en la salud.

Las investigaciones actuales sugieren que las nanopartículas pueden producir efectos tóxicos para la salud y el medio ambiente. Diversos tipos de nanopartículas han demostrado tener potencial genotóxico e interactuar con el ADN, lo que puede iniciar o promover la transformación celular y eventualmente cáncer y modificar la fertilidad (Gutiérrez-Praena, Jos, & Pichardo, 2009); todos estos efectos hacen necesario evaluar la relación riesgo/beneficio de las nanopartículas y que los organismos reguladores establezcan las medidas adecuadas en función de los resultados que se obtengan.

1.5.2.1. EVALUACIONES DE RIESGO/BENEFICIO

Las evaluaciones riesgo beneficio se llevan a cabo en diferentes disciplinas, bajo diferentes perspectivas y utilizan herramientas cuantitativas o semicuantitativas. Sin embargo para productos para el cuidado de la salud en general, las evaluaciones se enfocan en los riesgos a la salud humana (y para nanopartículas, también en el riesgo al medio ambiente) y no considera aspectos económicos o de rentabilidad.

Se entiende por evaluación de riesgo como un proceso cuyo fin es calcular o estimar el riesgo hacia una población dada, incluyendo la identificación de incertidumbres

relacionadas a la exposición a un agente en particular, tomando en consideración las características inherentes del agente así como las características específicas del sistema blanco.

Por el contrario, la evaluación del beneficio se interpretará como la probabilidad que la exposición de un agente dado presente algún efecto positivo sobre la salud en un organismo, sistema o población, así mismo la reducción del riesgo también podrá ser considerada como beneficio.

Finalmente, en la evaluación riesgo-beneficio, la probabilidad de incidencia de un efecto adverso a la salud, como consecuencia de la exposición de un agente dado, puede ser sopesada contra la probabilidad de beneficio, si ambos son factibles de conocerse.

Los efectos a la salud pueden ser evaluados en diferentes dimensiones, tales como incidencia de efecto, severidad, morbilidad y mortalidad, y en el caso de efectos positivos también la calidad de vida. Puede emplearse más de una métrica para determinar todas las dimensiones de salud para evaluaciones riesgo/beneficio.

Consideramos que, los riesgos que conlleven el uso de nanopartículas de quitosán-SiO₂ deben ser evaluados para poder ser utilizados como sistemas de acarreamiento de fármaco.

1.5.3. PRUEBAS DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

Dentro de la gama de ensayos *in vitro* como métodos de evaluación de la capacidad tóxica de xenobióticos, se encuentran los ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación, así como la función de la regulación de diversos eventos celulares. Dentro de las estructuras celulares en riesgo se encuentran: la membrana celular y citoesqueleto, entre otros organelos así como procesos bioquímicos metabólicos; síntesis y degradación; liberación de constituyentes celulares o productos; regulación iónica; y división celular (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2009). Por tanto, la citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.

Dentro de los modelos experimentales en uso para realizar algunas pruebas de citotoxicidad *in vitro*, las líneas celulares representan un modelo útil, económico, seguro y reproducible. La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar propiedades específicas, si se les cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados.

Una de las formas de proliferación *in vitro* para las líneas celulares es el cultivo en monocapa. Cuando las células requieren adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se

realiza en una única capa celular. Esta monocapa crecerá hasta alcanzar un estado de confluencia (la máxima capacidad de cubrimiento de una superficie); pasado esta etapa, el crecimiento se detiene por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir.

1.5.3.1. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

1.5.3.1.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular puede determinarse por medio de evaluaciones del metabolismo celular el cual no provee información directa a cerca del número total de células, sin embargo mide la viabilidad relativa de una población en comparación con otra "control" de células no tratadas (Hillegass, Shukla, Lathrop, & MacPherson, 2010). Las células con actividad respiratoria mitocondrial reducen sales de tetrazolio como MTS (3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolico) o MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico) por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán (color púrpura). El producto de reacción queda retenido en las células y puede ser liberado mediante una alteración de la membrana celular (solubilización celular). Se cuantifica la cantidad de MTT reducido por un método colorimétrico.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir MTS o MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información sobre la toxicidad del compuesto que se evalúa (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2009).

Otra manera para determinar la viabilidad celular es la tinción con Azul de Tripán en donde las células son tratadas con agentes, tripsinizadas y subsecuentemente teñidas con azul de Tripán, un colorante diazo que es absorbido por la membrana de las células muertas pero evitado por las viables. Las células no teñidas reflejan el número total de células viables.

1.5.3.1.2. ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN

La peroxidación lipídica se relaciona con la formación de radicales libres reactivos e inestables a nivel de membrana celular, con reacciones en cadena subsiguientes que dan pie a oxidación y muerte celular. La peroxidación lipídica destruye a los lípidos en las membranas celulares y también genera formas tóxicas endógenas como los radicales lípidos LOO^{\cdot} y LO^{\cdot} que son especies reactivas con vida media más larga y, por lo tanto, tienen capacidad de difundirse hacia moléculas más distantes como el DNA. Además de la desintegración hidrolítica del DNA por LOO^{\cdot} y LO^{\cdot} , se le atribuyen también la fragmentación de proteínas.

La lipoperoxidación se estima mediante la reacción de especies reactivas de oxígeno (ROS) con el ácido barbitúrico (TBA) u otras especies reactivas. En esta reacción, el malondialdehído (MDA) o las ROS, incluyendo hidropéroxidos de lípidos, reaccionan con el TBA generando un producto rosado con un máximo de absorción a 523 nm. Los especímenes biológicos en los cuales se presume un incremento en las especies reactivas de oxígeno incrementan su presencia como resultado de un desequilibrio redox. Normalmente la célula regula este desequilibrio sin embargo, existen diferentes factores que pueden modificar considerablemente la respuesta celular a condiciones de estrés.

Las TBARS regresan a niveles normales con el tiempo, dependiendo de la presencia de antioxidantes. En la práctica, las TBARS se expresan en términos de los equivalentes de MDA. En este trabajo de tesis se utilizará un estándar de MDA para construir una curva de calibración y así conocer la concentración de esta especie en muestras desconocidas.

El Malondialdehído (MDA) forma un aducto 1,2 con el ácido tiobarbitúrico que puede ser medido por fluorometría o espectrometría a 532 nm y tiene la siguiente estructura (ZeptoMetrix, 2006):

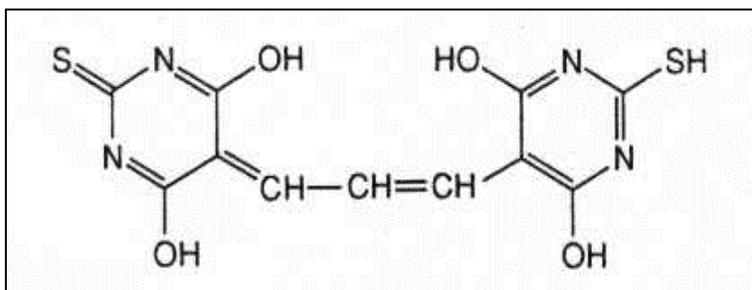


Imagen 5 Aducto (1,2) de Malondialdehído con ácido tiobarbitúrico (ZeptoMetrix, 2006)

1.5.3.1.3. PROLIFERACIÓN CELULAR

Existen diversos métodos para medir la proporción de células que proliferan. Los métodos actuales incluyen determinaciones histoquímicas, inmunohistoquímicas y citometría de flujo.

La observación y conteo de células en mitosis es una manera directa de cuantificar la proliferación e identificación de agentes que inhiben o reducen la progresión mitótica. El método requiere de una sustancia capaz de arrestar las células en metafase como Colchicina y durante la proliferación de las células. Otra de las técnicas más utilizadas es aquella que incluye un análogo de base de DNA, la 5-bromodesoxiuridina (BrdU), que se incorpora al DNA de las células. Para la prueba se adiciona fitohemaglutinina (PHA) que es un estimulante de la proliferación de linfocitos. Los cultivos se arrestan con Colchicina y se cuentan las metafases al microscopio después de haber realizado una tinción diferencial

(Goto, Akematsu, Shimazu, & Sugiyama, 1975), generalmente con un fluoróforo, principalmente Hoechst 33258 y colorante Giemsa.

Los resultados se expresan como el índice mitótico (IM) calculado por la división del número de células que se encuentran en mitosis entre el total de células en una población dada. El contenido de DNA de células en otras fases del ciclo celular puede ser evaluado como el estado de proliferación (Hillegass, Shukla, Lathrop, & MacPherson, 2010).

Esto permite determinar el índice mitótico (IM) e identificar las células que han completado uno o más ciclos de división, identificando el porcentaje de primera, segunda y tercera o subsecuentes divisiones en un periodo determinado de cultivo, el cual sirve para conocer no solo la velocidad de proliferación sino (Montuenga, Esteban, & Calvo, 2009) también para calcular la duración del ciclo celular (Rojas, 1994).

1.5.4. MECANISMOS DE TOXICIDAD

Existen varias razones del porqué las nanopartículas pueden tener mayor toxicidad que sus versiones macro. En general, pueden penetrar pequeñas estructuras y moverse más profundo a través de tejidos en comparación con partículas de mayor tamaño.

Los mecanismos de transporte, cohesión y adhesión son altamente dependientes del tamaño de partícula. Las partículas más pequeñas, pueden evadir al sistema reticuloendotelial con mayor efectividad, y por tanto permanecer en el organismo por tiempos más prolongados (Labhassetwa & Leslie-Pelecky, 2007).

Los mecanismos de toxicidad no están totalmente elucidados para la mayoría de las nanopartículas (ver Imagen 5). Una vez adentro de las células, pueden producir,:

- Estrés oxidativo
- Fagocitosis
- Inhibición de la proliferación celular
- Disminuir la viabilidad celular
- Disrupción de membranas o del potencial de membrana
- Genotoxicidad
- Interrupción en la transmisión de energía
- Inflamación
- Liberación de componentes tóxicos

Entre otros mecanismos de acción directa o indirecta como pudieran ser los mecanismos de modulación de la señalización celular.

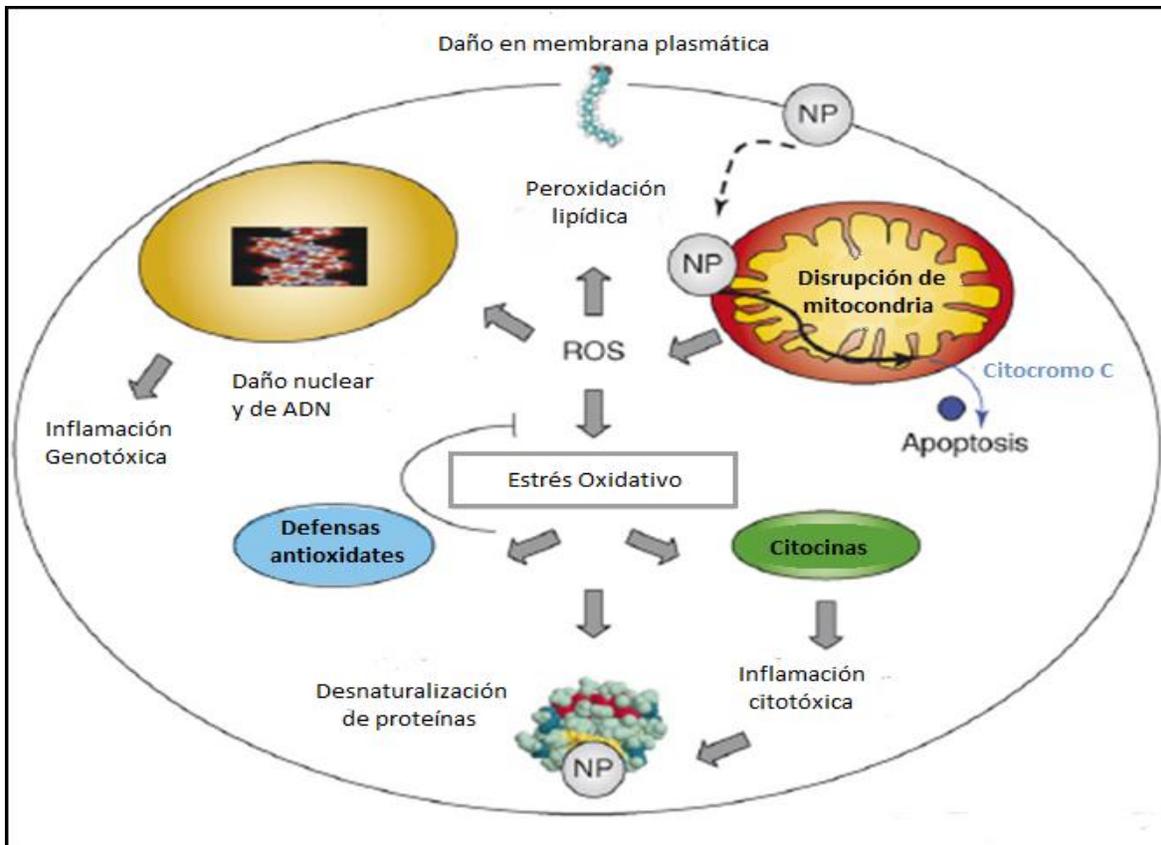


Imagen 6 Esquema de los posibles mecanismos asociados a la toxicología que presenta la célula cuando interactúa con nanopartículas (Sanvicens & Marco, 2008)

1.5.4.1. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Uno de los mecanismos de toxicidad más importantes es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ejemplo, la captura de electrones de O_2 puede llevar a la formación del radical superóxido O_2^- el cual generará ROS adicionales. Normalmente, el glutatión y otras enzimas antioxidantes mantienen el equilibrio en el organismo. Un incremento en la generación de ROS causa estrés oxidativo y dispara respuestas inflamatorias. Altos niveles de estrés oxidativo provocan la disrupción de la transferencia electrónica, lo cual puede producir apoptosis o necrosis celular. Las especies reactivas de oxígeno pueden producir daño a proteínas, lípidos, membranas y DNA (Labhasetwa & Leslie-Pelecky, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Considerando que la información en relación a la capacidad tóxica de diversos sistemas nanoparticulados es escasa y que muchos sistemas presentan características tecnológicas y de composición amplia, la realización del presente trabajo pretende generar información útil acerca de la preparación nanopartículas de Quitosán y SiO₂, ya que a la fecha no se tienen datos sobre la preparación de éste tipo de sistemas ni de sus características fisicoquímicas.

Con la caracterización de los sistemas preparados conoceremos algunas propiedades de los sistemas nanoparticulados como la distribución del tamaño de partícula, carga superficial y morfología. Lo anterior es de gran importancia si se considera el uso potencial de estas estructuras.

Además, se pretende aportar información nanotoxicológica; es decir determinar la citotoxicidad de las nanopartículas preparadas, mediante evaluaciones *in vitro* asociadas al estrés oxidativo en dos líneas celulares ampliamente establecidas y de características diversas, células Vero y células HeLa. También estudiaremos los efectos sobre la capacidad proliferativa de linfocitos humanos de sangre periférica.

La información que aportará este estudio nos permitirá conocer los efectos y el significado biológico de la exposición *in vitro* a nanopartículas de Quitosán-SiO₂; obteniendo así, información valiosa para las evaluaciones de riesgo-beneficio de las nanopartículas de Quitosán-SiO₂ como acarreadores de fármacos.

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIALES

3.1.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

- Ácido acético al 1% (v/v)
- Quitosán al 0.3% (p/v) en ácido acético al 1%
- Tripolifosfato pentasódico (TPP) 0.1% en ácido acético al 1%
- Dispersión de SiO₂ 0.1% (p/v) en ácido acético al 1%
- Hidróxido de sodio 1M
- Pluronic F-68 Sigma-Aldrich

3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio de cultivo DMEM Advanced GIBCO suplementado con L-Glutamina 0.04M, Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% y Antibiótico *Streptomycin Penicillium* GIBCO al 1%
- Medio de cultivo RPMI suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales GIBCO

3.1.3. SOLUCIONES DE USO BIOLÓGICO

- Buffer de Fosfatos PBS pH=7.2- 7.4
- MTT [5 mg/ml] estéril
- Solución de ácido clorhídrico al 0.04N con 1% de Nonidet® en Alcohol isopropílico de uso biológico
- PBS con 1% de Tritón
- Ácido Perclórico 0.5M
- Ácido Tiobarbiturico al 0.67%
- Reactivo de Bradford Marca BIO RAD®
- Stock de Albúmina sérica Bovina 2.2mg/ml
- Stock de Malondialdehido (MDA) 0.01M
- Fitohemaglutinina
- 5-Bromodesoxiuridina (BrdU)
- Colcemid® o Colchicina 0.04%
- Cloruro de Potasio al 0.075 M
- Solución de ácido metanol-acético 3:1
- Solución 10⁻³M Hoechst 33258
- Solución diluida de Giemsa-agua 1:4

3.1.4. EQUIPOS

- Agitador magnético MRC®
- Agitador mecánico *Homogenizer Glas-Col Variable Speed Reversible*
- Balanza analítica *Sartorius BL 120S*
- potenciómetro *OAKTON pH 510 series pH/mV/°C meter*
- Incubadora para cultivos celulares *Shel Lab CO₂ Incubator*
- Campana de flujo laminar *Industrias Figursa Mod. CFV-90*
- Centrifuga *Roto-Uni II BHG*
- Microcentrífuga con control de temperatura *Microfuge® 22R Centrifuge Beckman Coulter*
- Espectro UV-Vis *Spectrophotometer DU® 64 BECKMAN*
- Ultrasonido *Ultrasonic Processor Mod. CPX 130 Cole Parmer*
- Vórtex *Vortex-2 Gene Scientific Industries*
- Agitador *Orbital Shaker MRC*
- Microscopio Electrónico de Barrido *JEOL Mod. 25SII*
- Microscopio Electrónico de Transmisión
- Zetasizer Nanoseries

3.1.5. MODELOS EXPERIMENTALES

- Células Vero (Ver Anexo B para mayor información del modelo celular)
- Células HeLa (Ver Anexo B para mayor información del modelo celular)
- Linfocitos de sangre humana fresca (varones).

3.1.5.1. CULTIVO CELULAR

Para evaluar los efectos citotóxicos de las nanopartículas de quitosán-SiO₂, se emplearon las líneas celulares HeLa y Vero. Ambas líneas celulares se cultivaron y mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5% v/v cuidando de utilizar las células con no más de 4 pases en cultivo. Las células se mantuvieron en monocapa a 37°C en cámara húmeda con atmósfera de CO₂ al 5% y para la exposición a las nanopartículas se utilizaron cuando se encontraban en estado de confluencia.

3.2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y DIÓXIDO DE SILICIO

En este proyecto de trabajo se prepararon los sistemas de nanopartículas que se describen a continuación:

Preparación del sistema Nanopartículas de Quitosán (Control 1)

Transferir 20 ml de solución de **Quitosán al 0.3%** a un vaso de precipitados, agregar el 1% (p/v) de tensoactivo PLURONIC F-68(cantidad correspondiente al volumen final). Permitir la hidratación del tensoactivo en completo reposo (aproximadamente 30 minutos).

Al obtener una solución homogénea, colocar en el equipo de agitación mecánica. Iniciar la agitación a velocidad moderada y adicionar 20 ml de solución de **TPP al 0.1%** y aumentar velocidad gradualmente hasta alcanzar la mayor velocidad del equipo (aprox 4000 rpm). Mantener la agitación durante 1 hora. Dejar en reposo la solución final hasta la completa eliminación de burbujas.

Preparación del sistema Dióxido de Silicio en dispersión (Control 2)

Tomar 50 ml de la solución de **SiO₂ al 0.1%** y transferir a un vaso de precipitados, adicionar el 1% (p/v) del tensoactivo PLURONIC F68, permitiendo la completa hidratación en reposo. Al obtener una solución homogénea, colocar en el equipo de agitación mecánica e iniciar la agitación de la manera descrita anteriormente hasta alcanzar la mayor velocidad y manteniéndola así durante 1 hora.

Preparación del sistema Nanopartículas de Quitosán y SiO₂ (Sistema A)

Transferir 20 ml de solución de **Quitosán al 0.3%** a un vaso de precipitados, agregar el 1% (p/v) de tensoactivo PLURONIC F-68(cantidad correspondiente al volumen final). Permitir la hidratación del tensoactivo en completo reposo (aproximadamente 30 minutos).

Al obtener una solución homogénea, colocar en el equipo de agitación mecánica. Iniciar la agitación a velocidad moderada y adicionar 20 ml de solución de **TPP al 0.1%** y aumentar velocidad gradualmente hasta alcanzar la mayor velocidad del equipo (aprox 4000 rpm). Mantener la agitación durante 1 hora.

Adicionar 20 ml de la solución de **SiO₂ al 0.1%** bajo agitación constante por al menos 30 minutos más. Dejar en reposo la solución final hasta la completa eliminación de burbujas.

Preparación del sistema Nanopartículas de Quitosán y SiO₂ (Sistema B)

Transferir 20 ml de solución de **Quitosán al 0.3%** a un vaso de precipitados, agregar el 1% (p/v) de tensoactivo PLURONIC F-68(cantidad correspondiente al volumen final). Permitir la hidratación del tensoactivo en completo reposo (aproximadamente 30 minutos).

Por separado, preparar una mezcla del polianión con SiO₂ en un vaso de precipitados adicionando 20 ml de la solución de **TPP al 0.1%** y 20 ml de la solución de **SiO₂ al 0.1%**, bajo agitación magnética durante 10 minutos.

Colocar la solución de **Quitosán al 0.3%** con tensoactivo en el equipo de agitación mecánica. Iniciar la agitación a velocidad moderada. Añadir 40 ml de la solución mezcla de **TPP al 0.1%-SiO₂ al 0.1%** y aumentar velocidad gradualmente hasta alcanzar la mayor velocidad del equipo (aprox 4000 rpm). Mantener la agitación durante 1 hora. De igual manera, se observará la formación de espuma, por lo cual se deja en reposo la solución final hasta la completa eliminación de burbujas.

Tabla 2 Ingredientes de la formulación para la preparación de las nanopartículas de Quitosán-SiO₂ y los sistemas Control

| Sistema | Formulación Inicial | | Formulación Final | |
|---|---------------------|------|---|--------|
| Control 1 (Quitosán) | Quitosán | 0.3% | Quitosán | 0.3% |
| | TPP | 0.1% | TPP | 0.1% |
| | | | Pluronic F68 | 1% p/v |
| Control 2 (SiO₂) | SiO ₂ | 1.0% | SiO ₂ | 0.1% |
| | | | Pluronic F68 | 1% p/v |
| Sistema A (Quitosán-SiO₂) | Quitosán | 0.3% | Quitosán | 0.3% |
| | TPP | 0.1% | TPP | 0.1% |
| | SiO ₂ | 1.0% | SiO ₂ | 0.1% |
| | | | Pluronic F68 | 1% p/v |
| Sistema B (Quitosán-SiO₂) | Quitosán | 0.3% | Quitosán | 0.3% |
| | TPP | 0.1% | Mezcla (TPP 0.1%-SiO ₂ 0.1%) | |
| | SiO ₂ | 1.0% | Pluronic F68 | 1% p/v |

3.3. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA.

Se caracterizaron los sistemas preparados a partir de la formulación inicial, tomando muestras de manera directa. Se obtuvo la información de dichos sistemas y se realizaron ajustes a la formulación de donde se caracterizaron las nuevas nanopartículas preparadas; se filtraron muestras de los mismos por membranas de 0.2 μm para la caracterización.

3.3.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA Y CARGA SUPERFICIAL

La determinación del tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula se llevó a cabo en el equipo Zeta Sizer Nanoseries marca Malvern con una muestra de cada sistema (formulación inicial y formulación final, filtrado por membrana 0.2 μm). Se ingresó aproximadamente 2 ml en celdas capilares DTS 1060 (Malvern Instruments, 2004). Posteriormente se insertó la celda al equipo y por medio del programa Zeta Sizer Nano Software (DTS nano) se realizaron las determinaciones.



Imagen 7 Celda capilar DTS 1060 "para determinación de tamaño y potencial Z" (Malvern Instruments, 2004)

3.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Para el análisis morfológico por SEM, la muestra se dejó seca a temperatura ambiente una gota de cada sistema (muestras directas y muestras filtradas) previamente resuspendidas en un cubreobjetos completamente limpio y evitando el contacto con polvo o impurezas que puedan agregarse al exponerse al ambiente. Las muestras se sometieron a un proceso de recubrimiento con oro para su lectura en el microscopio electrónico. Esta actividad, así como la lectura de las muestras se realizó por el responsable del Microscopio Electrónico¹.

3.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Para la caracterización por TEM, se fijó una gota de cada sistema (formulación inicial y formulación final, filtrada previamente por membrana 0.2 μm) en una rejilla de cobre-carbono a temperatura ambiente para permitir la lectura en el microscopio de transmisión. El tratamiento de las muestras y su lectura fueron llevados a cabo por el responsable del microscopio de transmisión².

¹ Técnico Rodolfo Robles. Laboratorio de Microscopía Electrónica. FES-Cuautitlán, UNAM,

² Ivan Puente Luna. Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM.

3.4. EVALUACIONES TOXICOLÓGICAS

3.4.1. PRUEBAS CITOTÓXICAS

Los sistemas de nanopartículas obtenidos en este trabajo, presentaron un pH, alrededor de 2.3-2.4 y para la administración a los cultivos celulares se requiere un pH cercano al fisiológico, por lo que se añadió por goteo hidróxido de sodio 1M hasta conseguir elevar el pH alrededor de 7.0. Posteriormente, las soluciones son filtradas en ambiente estéril con filtros de membrana 0.2 µm.

3.4.1.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DE MTT

El ensayo de viabilidad se realizó en dos líneas celulares diferentes, HeLa y Vero. Las células se expusieron a los sistemas nanoparticulados obtenidos durante 6 horas. En las últimas cuatro horas de exposición, se agregó una solución de MTT y se incubó durante 4 horas más para completar el tiempo de exposición a las nanopartículas.

- Una vez que las células alcanzaron el estado de confluencia, se incubaron con una cantidad 50 y 100 µl de la solución de tratamiento (Nanopartículas).
- Después de 2 horas, se agregó 10 µl (5 mg/ml) de MTT obteniendo en cada pozo un volumen total de 1 ml. Se incubaron durante 4 horas más.
- Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cada pozo.
- Se agregó 1 ml de la solución de Ácido Clorhídrico al 4 mM con 0.1% de Nonidet en Isopropanol a cada pozo.
- Se agitaron por 10 minutos a 150 rpm. Se llevó a cabo la lectura de las soluciones en espectrofotómetro a $\lambda=590$ nm.
- Se determinó el % de viabilidad celular por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ VIABILIDAD} = 100 \left[1 - \left(\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \right) \right]$$

3.4.1.2. ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN

Se llevó a cabo en dos líneas celulares diferentes, HeLa y Vero. Las condiciones de prueba fueron 6 horas totales de exposición a los sistemas nanoparticulados, una vez que las células alcanzaron el estado de confluencia.

Para la determinación de proteínas totales y de las especies reactivas al Acido Tiobarbitúrico se realizaron curvas de calibración estándar las cuales relacionan la cantidad en mM de TBARs/mg de proteína total en las células. Las lecturas de las curvas se realizaron en un equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de 595 y 535 nm, respectivamente.

- Se agregó el tratamiento de 50 y 100 μ l de los sistemas preparados a células previamente en estado de confluencia en placas de 6 pozos y se incubaron durante 6 horas.
- Después de 6 horas de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS pH=7.4 frío.
- Se retiró la solución y agregó 1 ml de PBS frío a cada pozo.
- Se desprendieron las células por rasurado del fondo de las placas de cultivo y se transfirieron a tubos Eppendorf.
- Se centrifugaron a 1200 rpm 4° C por 8 minutos. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante.
- El botón celular fue resuspendido en PBS-Tritón frío para su lisis por ultrasonificación utilizando 3 ciclos al 97% de potencia durante 10 segundos cada ciclo.
- Se tomó una alícuota de 10 μ l de cada solución y se depositó en tubos Eppendorf para realizar posteriormente la cuantificación de proteínas.
- Al volumen restante, se adicionó aproximadamente 250 μ l de Ácido Perclórico o el volumen equivalente de la muestra. Se dejó en incubación a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 10 minutos.
- Se recuperó el sobrenadante para hacerlo reaccionar con 500 μ l de Ácido Tiobarbitúrico al 0.67%; Se incubó a 90° C por 30 minutos y se desechó botón.
- La lectura fue llevada a cabo en espectrofotómetro a $\lambda = 535$ nm.

Cuantificación de Proteínas Totales

- A los 10 μ l que se tomaron de cada muestra ultrasonificada, se añadió 1 ml de Reactivo de Bradford y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron lecturas de absorbancia a $\lambda = 595$ nm en espectrofotómetro de longitud de onda fija.

Curva de Calibración de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) – Malondialdehído (MDA)

- El stock de MDA se preparó una concentración de 0.01M protegiendo de la luz y manteniendo en refrigeración
- Se utilizaron 5 estándares de diferente concentración para la construcción de la curva y se definieron sus concentraciones de MDA con el rango de las lecturas obtenidas de las muestras a analizadas.
- Se añadió la alícuota de MDA más Agua desionizada teniendo como volumen 500 μ l y finalmente 500 μ l de TBA para tener siempre 1 ml de solución
- Se incubó a 90° C por 30 minutos y leyó en equipo espectrofotométrico a $\lambda = 535$ nm

Curva de Calibración para Proteínas Totales con Reactivo de Bradford

- Se preparó el reactivo de Bradford a una concentración 1:3 con agua desionizada
- La solución stock que se utilizó para esta curva fue Albúmina sérica Bovina 2.2 mg/ml
- Se preparan 5 sistemas de diferente concentración para la construcción de la curva. Los valores de absorbancia incluyeron los obtenidos en las muestras analizadas
- El orden de adición fue el siguiente: alícuota del stock de albúmina (o la dilución de esta, según sea el caso) más agua desionizada para tener 100 µl de solución y finalmente 1 ml de reactivo de Bradford preparado
- Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se leyeron los sistemas por espectrofotometría a $\lambda = 595 \text{ nm}$

CÁLCULO DE LIPOPEROXIDACIÓN

De la ecuación de la recta

$$y = mX + b$$

$$Y_{\text{TBARS}} = m_{\text{TBARS}} X - b_{\text{TBARS}}$$

$$Y_{\text{prot. tot.}} = m_{\text{prot. tot.}} X - b_{\text{prot. tot.}}$$

Donde X= absorbancia obtenida de las muestras en cada caso.

$$\frac{\text{mM TBARS}}{\text{mg Proteínas Totales}} = \frac{\frac{\text{abs TBARS} + b_{\text{TBARS}}}{m_{\text{TBARS}}}}{\frac{\text{abs prot} + b_{\text{prot tot}}}{m_{\text{prot tot}}}}$$

3.4.1.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se realizaron cultivos de sangre periférica humana fresca, estimulados con fitohemaglutinina (mitógeno); la exposición a cada uno de los sistemas de nanopartículas obtenidas previamente fue de 24 horas en medio RPMI con un tiempo total de prueba de 72 horas.

- Mediante punción venosa se obtuvo la cantidad de sangre periférica necesaria para exponerla a los sistemas de nanopartículas preparadas. La sangre fue heparinizada previo a la incubación.
- En tubos estériles adicionar 5ml de medio de cultivo RPMI suplementado, 0.2ml de fitohemaglutinina (PHA), 0.3 ml de 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) 0.23mg/ml y finalmente 0.5ml de sangre heparinizada, en condiciones asépticas.
- Transcurridas las primeras 48 horas de cultivo se adicionaron diferentes cantidades de nanopartículas en condiciones estériles.
- Los cultivos se mantuvieron a 37°C por 72 horas en un ambiente estéril.
- 24 horas antes de terminar el tiempo de incubación, se añadió el tratamiento de nanopartículas y 2 horas antes se añadieron 0.2 ml de Colcemid.

- Transcurrido el periodo de incubación, se centrifugaron los cultivos a 1500 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante.
- Se agregaron a cada tubo 5 ml de Cloruro de Potasio 0.075M y se dejó incubando a 37° C por 20-30 minutos.
- Se centrifugaron los cultivos a 1500 rpm por 10 minutos.
- Se agregó al botón celular una solución fijadora de ácido acético-metanol (1:3) agitando vigorosamente en el vórtex y se volvió a centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. Este proceso de lavado con la solución fijadora se realizó tantas veces fue necesario hasta observar el botón y solución completamente clarificado.
- Se almacenaron las células en refrigeración hasta la preparación de laminillas por goteo.
- Una vez preparadas las laminillas, se tiñeron con solución Hoechst 33258 10 minutos y al terminar este periodo, se lavaron con agua.
- Las lámina preparadas se expusieron a la luz solar por al menos 30 minutos y posteriormente se adicionó por goteo la solución diluida de Giemsa.
- Finalmente las laminillas se observaron en el microscopio.

Este ensayo permite determinar el índice mitótico (IM) e identificar las células que han completado uno o más ciclos de división (I.P.), en un periodo determinado de cultivo. Su análisis es posible ya que las preparaciones al microscopio después de la tinción con Giemsa muestran una tinción diferencial de las hebras de DNA hijas que incorporaron, durante la síntesis de DNA la bromodesoxiuridina. Este compuesto funciona como análogo de la timina en las células proliferantes. La evaluación de este biomarcador de efecto permite estimar el estado de la capacidad proliferativa de linfocitos periféricos y podemos conocer mediante la evaluación de cinética de proliferación con que velocidad se dividen éstas células.

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez fijadas y teñidas las muestras en laminillas, se realizó la observación minuciosa de los linfocitos en proliferación haciendo un recorrido campo por campo buscando al menos 100 metafases en 2000 núcleos consecutivos proliferantes. Así mismo, se registraron la proporción de primeras (M1), segundas (M2) y terceras o subsecuentes (M3) metafases en 100 mitosis consecutivas.

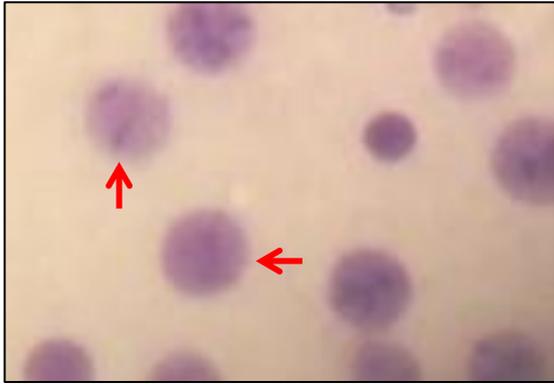


Imagen 8 Núcleos Proliferantes

Imagen tomada a 100X. Se señalan con flechas algunos nucleos proliferantes.



Imagen 9 Primera Metafase (M1)

Imagen tomada a 100X. En M1 las cromátides hermanas presentan una coloración morada intensa.

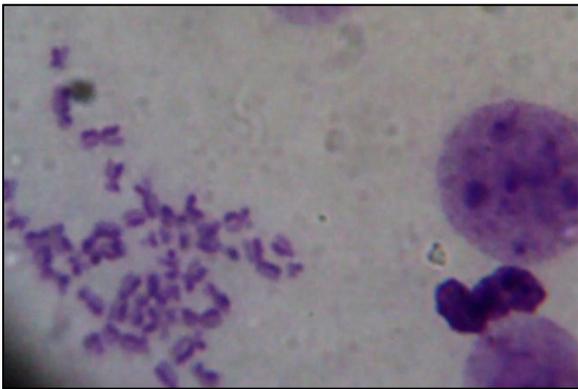


Imagen 10 Segunda Metafase (M2)

Imagen tomada a 100X. En M2 las cromátides se observan de dos intensidades de morado.



Imagen 11 Tercera Metafase (M3)

Imagen tomada a 100X. En M3 las cromátides hermanas presentan una coloración morada tenue.

- *Imágenes extraídas de las muestras observadas en el presente trabajo.*

CÁLCULO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

$$I. M. = 100 \left(\frac{\# \text{ Total de metafases}}{\# \text{ total de núcleos}} \right) \quad I. P. = \frac{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)}{100}$$

ESTADÍSTICA

Los resultados de viabilidad celular, lipoperoxidación y proliferación celular son presentados como el valor promedio \pm la desviación estándar. La comparación estadística se llevó a cabo mediante la prueba de TUKEY de comparación múltiple de medias con un valor de confianza del 90%.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

Se prepararon dos sistemas diferentes de nanopartículas con dos componentes: quitosán y dióxido de silicio (SiO_2), la diferencia entre cada sistema, denominados Sistema A y Sistema B consta en el orden de adición de los componentes de la formulación (ver sección Metodología). El método de preparación está basado en la gelación iónica del quitosán con tripolifosfato (guardando una relación 3:1), donde la adición de SiO_2 fue evaluada mediante la caracterización de las nanopartículas resultantes.

Cabe señalar que para que pueda realizarse una comparación –entre cada sistema- de las propiedades fisicoquímicas, así como su comportamiento toxicológico *in vitro*, fue necesaria la preparación de sistemas control, que en este caso, serían los componentes individuales de la formulación, es decir se preparó el Sistema Control 1 (SiO_2) y el Sistema Control 2 (Nanopartículas de Quitosán).

La caracterización fisicoquímica que se realizó a las nanopartículas se llevó a cabo en dos etapas:

1) Primero se obtuvieron nanopartículas a partir de una formulación inicial que incluía únicamente Quitosán 0.3%, TPP 0.1% y SiO_2 1.0% (ver Tabla 2 Ingredientes de la formulación de las nanopartículas de Quitosán- SiO_2), en donde se observó inestabilidad en los sistemas ya que sedimentaban y presentaban turbidez, denotando que no se alcanzó por completo un tamaño nanométrico.

2) Dado lo anterior, se realizaron ajustes a la formulación añadiendo un surfactante no iónico, Pluronic F68, para que no interfiera en la carga superficial; y la concentración de SiO_2 se diluyó 1/10 para obtenerlo al 0.1%.

Las tablas 3-6 muestran los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de cada sistema. El sistema Control 2 (Quitosán) será empleado como punto de comparación ya que es el componente principal y se tiene mayor información acerca del tamaño y potencial z que presenta este tipo de sistemas; y no con el sistema control 1, ya que éste último es el componente secundario y está compuesto de partículas en dispersión de SiO_2 y la información obtenida de su caracterización se utilizó para correlacionar con su respuesta toxicológica *in vitro*.

Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados de la caracterización de los sistemas control SiO_2 y Quitosán, respectivamente. Estos datos servirán como punto de comparación para evaluar los resultados de las nanopartículas de éste proyecto.

Tabla 3 Resumen de la caracterización fisicoquímica del sistema control 1 (SiO₂ dispersión al 0.1%)

| Sistema Control 1 (SiO ₂ dispersión al 0.1%) | | | | | | |
|---|---------------------|---------------|------------|--|---------------|------------|
| Característica | Formulación inicial | | | Formulación final, filtrado por membrana 0.2µm | | |
| | Pico | Diámetro (nm) | Intensidad | Pico | Diámetro (nm) | Intensidad |
| Tamaño de Partícula | 1 | 5.406 ± 1.054 | 60.8% | 1 | 5.873 ± 1.776 | 84.0% |
| | 2 | 619.0 ± 176.0 | 34.6% | 2 | 487.7 ± 212.9 | 16.0% |
| | 3 | 183.3 ± 32.73 | 2.7% | | | |
| Potencial Z | -3.40 mV | | | | | |

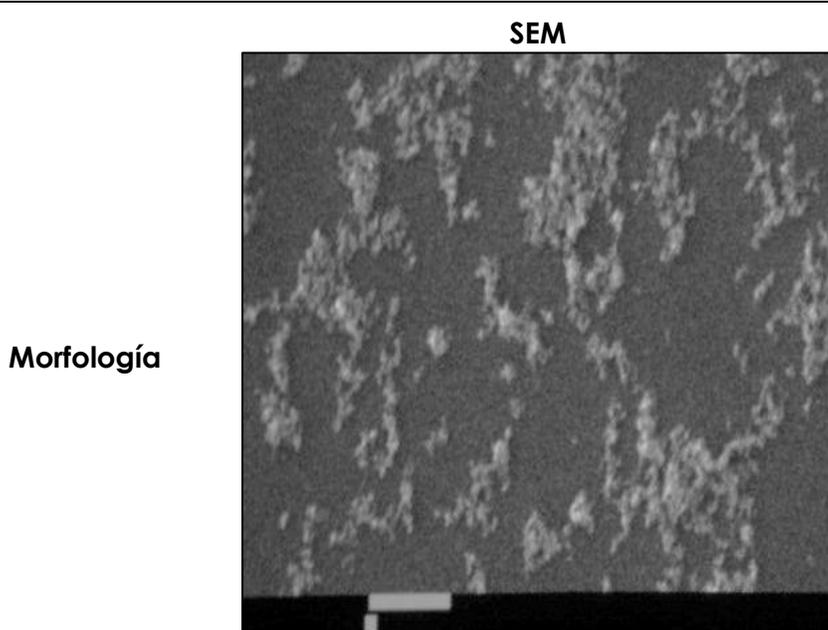


Imagen 12 Micrografía por SEM del sistema SiO₂. Tomada a 10000X

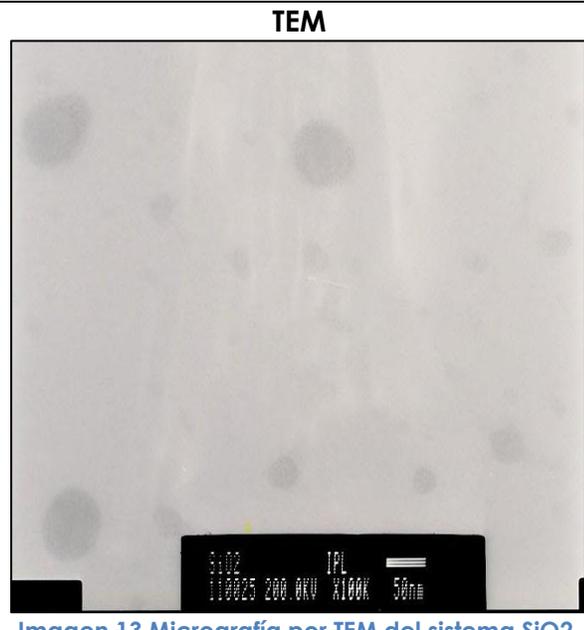
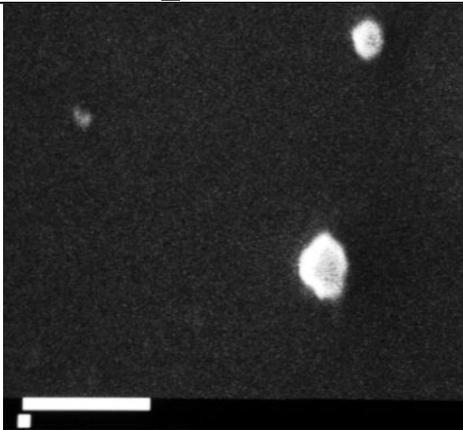
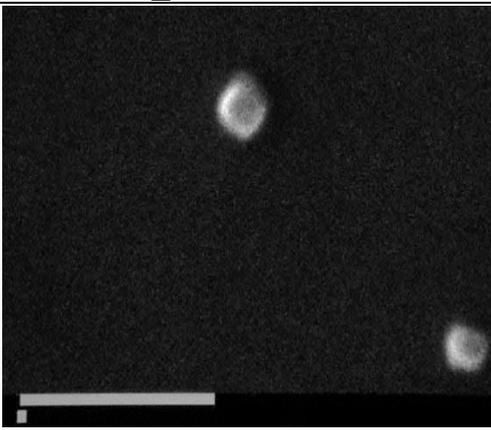
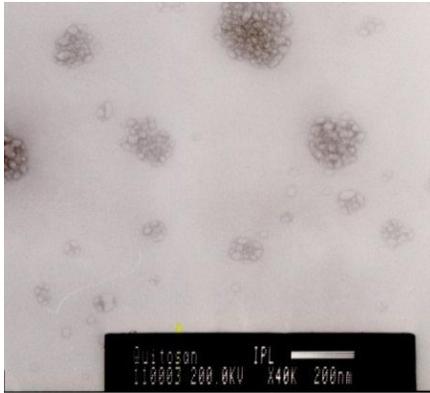
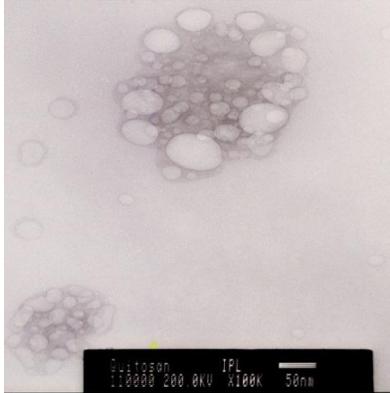


Imagen 13 Micrografía por TEM del sistema SiO₂. Tomada a 40000X

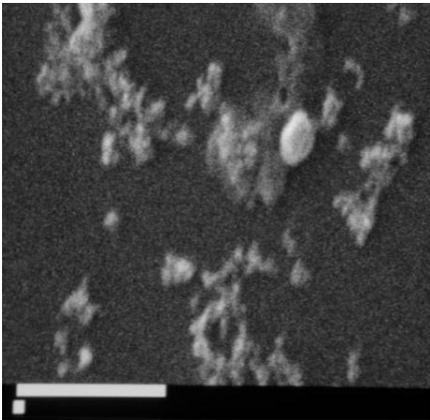
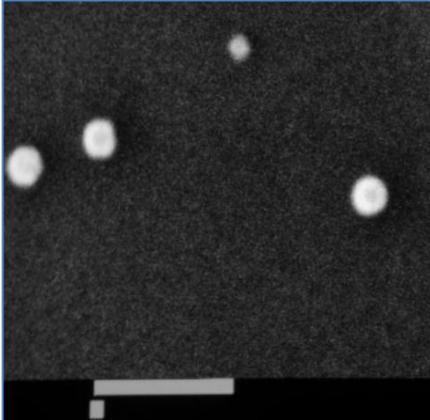
Se pueden observar los tamaños de partícula de la formulación inicial y la formulación final después de haber sido filtrada por membrana 0.2µm, Resalta la presencia de tamaños de partícula grandes y esto corresponde con el potencial Z el cual es cercano a cero, lo que conlleva a la agregación, como se puede apreciar en la micrografía SEM. Las nanopartículas evaluadas por TEM se ven más dispersas debido a la dilución que se utilizó para montar la muestra, pero gracias a esto es posible apreciar el tamaño de las nanopartículas de SiO₂. Para observar información más detallada de las nanopartículas de SiO₂ consultar el Anexo A Caracterización Fisicoquímica.

Tabla 4 Resumen de la caracterización fisicoquímica del sistema control 2 (Nanopartículas de Quitosán)

| Sistema Control 2 (nanopartículas de Quitosán) | | | | | | |
|--|---|---------------|------------|---|---------------|------------|
| Característica | Formulación inicial | | | Formulación final, filtrado por membrana 0.2µm | | |
| Potencial Z | +31.6 ± 3.34 mV | | | +26.2 ± 4.67 mV | | |
| Tamaño de partícula | Pico | Diámetro nm | Intensidad | Pico | Diámetro nm | Intensidad |
| | 1 | 882.9 ± 406.9 | 85.1 | 1 | 255.0 ± 118.6 | 31.5 |
| | 2 | 110.2 ± 29.24 | 11.2 | 2 | 9.635 ± 3.013 | 30.1 |
| SEM |  | | |  | | |
| | Imagen 14 Micrografía del sistema Quitosán, formulación inicial. Imagen tomada a 10000X | | | Imagen 15 Micrografía del sistema Quitosán, formulación final. Imagen tomada a 10000X | | |
| TEM |  | | |  | | |
| | Imagen 16 Micrografía del sistema Quitosán, formulación final. Imagen tomada a 40000X | | | Imagen 17 Micrografía del sistema Quitosán, formulación final. Imagen tomada a 10000X | | |

En los resultados que se muestran arriba se compara el tamaño de partícula de la Formulación inicial y Formulación final de nanopartículas de Quitosán. Los datos que se generaron de la formulación final se obtuvieron a partir de una muestra filtrada por membrana 0.2 µm (para mayor información consultar el Anexo A). El potencial Z mostró una reducción en las nanopartículas de la formulación final sin embargo, son capaces de mantenerse estables en solución. Las nanopartículas se comparan por SEM encontrando formas que tienden a la esfericidad en la formulación final. El análisis de nanopartículas de la formulación final por TEM revela la estructura de las nanopartículas son agregados de partículas de menor tamaño y tienen una apariencia clara, que se ordenan en estructuras semiesféricas o esféricas.

Tabla 5 Resumen de la caracterización fisicoquímica del sistema A (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

| Sistema A (nanopartículas de Quitosán-SiO ₂) | | | | | | |
|--|---|-------------|------------|--|---------------|------------|
| Característica | Formulación inicial | | | Formulación final, filtrado por membrana 0.2µm | | |
| Potencial Z | +40.9 mV ± 3.01 mV | | | +35.9 mV ± 5.64 mV | | |
| Diámetro promedio | Pico | Diámetro nm | Intensidad | Pico | Diámetro nm | Intensidad |
| | 1 | 1092 ± 1170 | 100 | 1 | 364.5 ± 209.7 | 83.7 |
| | | | | 2 | 5.536 ± 1.217 | 8.1 |
| | | | | 3 | 50.36 ± 12.66 | 7.1 |
| SEM |  | | |  | | |
| | Imagen 18 Micrografía del sistema A, formulación inicial. Imagen tomada a 10000X | | | Imagen 19 Micrografía del sistema A, formulación final. Imagen tomada a 10000X | | |

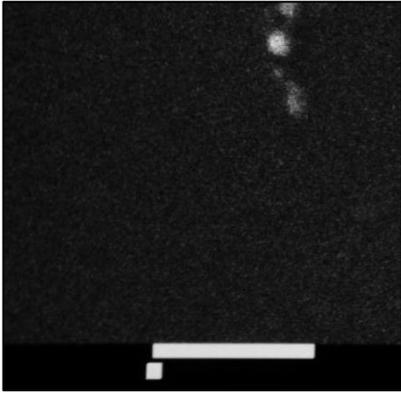
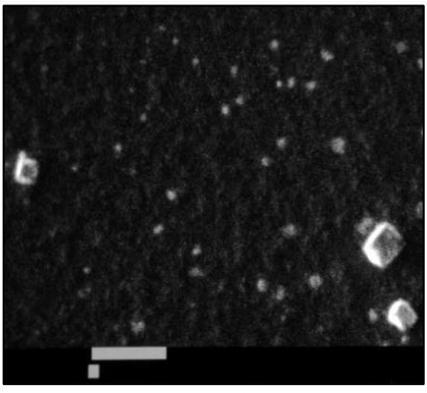
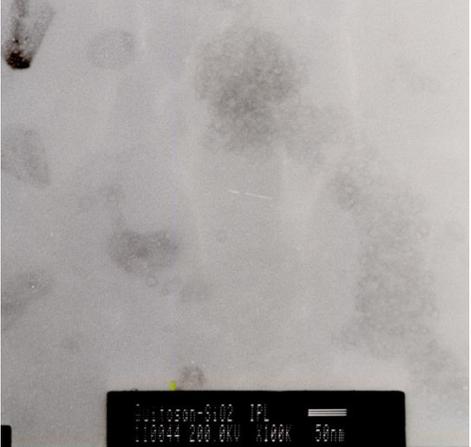
TEM



Imagen 20 Micrografía del sistema A. Formulación final. Tomada a 100000X

Se presentan los resultados de la caracterización de las nanopartículas del Sistema A, encontrando que en la formulación inicial presentan una gran dispersidad en el tamaño de partícula, mientras que en la formulación final se lograron obtener nanopartículas de escalas menores (ver Anexo A). El potencial Z en ambos casos se mantiene cercano y en niveles que sugieren que son estables en solución. En las micrografías por SEM se logra observar que existen formas irregulares y agregados de diferentes tamaños en la formulación inicial, mientras que para la formulación final se obtuvieron formas esféricas. El análisis por TEM muestra que las nanopartículas se componen de agregados de partículas con menor tamaño. Se encontró cierta opacidad con respecto a las nanopartículas de quitosán, lo cual puede deberse a la presencia de SiO₂ en las nanopartículas.

Tabla 6 Resumen de la caracterización fisicoquímica del sistema B (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

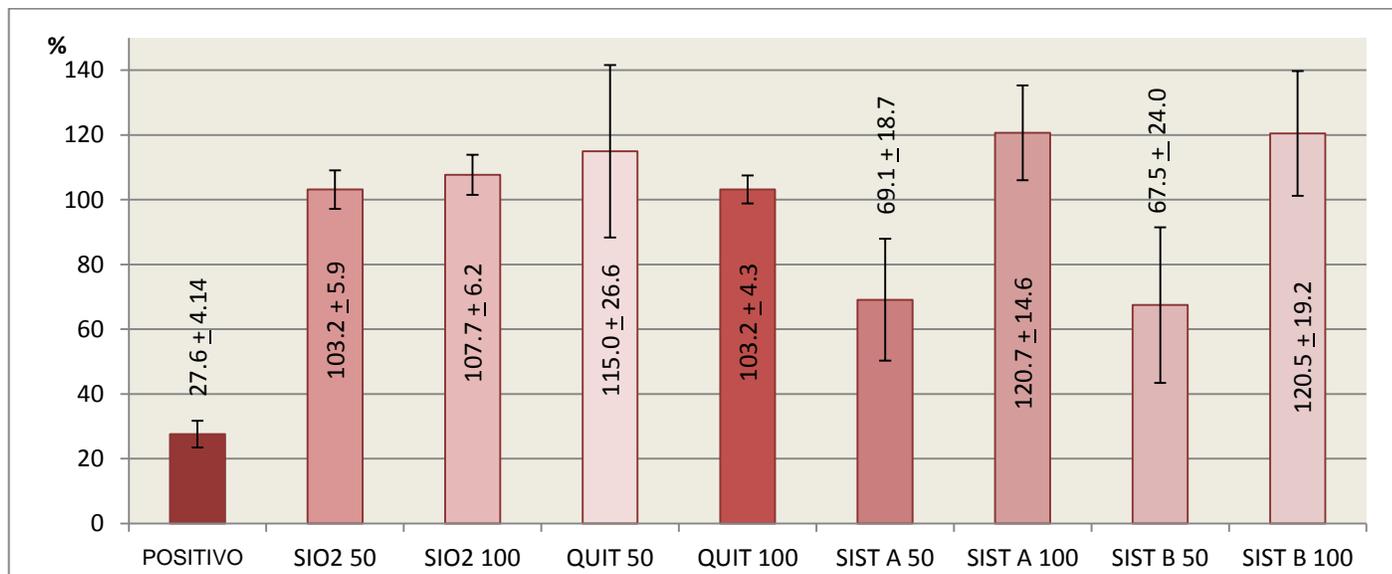
| Sistema B (nanopartículas de Quitosán-SiO ₂) | | | | | | |
|--|--|---------------|------------|--|---------------|------------|
| Característica | Formulación inicial | | | Formulación final, filtrado por membrana 0.2µm | | |
| Potencial Z | +39.5 mV ± 3.78 | | | +27.5 mV ± 7.33 mV | | |
| Diámetro promedio | Pico | Diámetro nm | Intensidad | Pico | Diámetro nm | Intensidad |
| | 1 | 363.0 ± 219.4 | 69.1 | 1 | 197.8 ± 99.3 | 88.9 |
| | 2 | 52.0 ± 15.09 | 10.09 | 2 | 5.274 ± 1.201 | 9.6 |
| SEM |  | | |  | | |
| | Imagen 21 Micrografía del Sistema B, formulación inicial. Imagen tomada a 10000X | | | Imagen 22 Micrografía del Sistema B, formulación final. Imagen tomada a 10000X | | |
| TEM |  | | | | | |
| | Imagen 23 Micrografía del Sistema B, formulación final. Imagen tomada a 100000X | | | | | |

Los resultados que se muestran arriba comparan el tamaño de partícula y potencial Z de la formulación inicial y final de nanopartículas del Sistema B. Se lograron obtener tamaños de partícula menores en la formulación final; por otra parte el potencial Z mostró una mayor diferencia entre los valores de la formulación inicial y final, aunque a esos valores mantienen estabilidad en suspensión. Por medio de SEM se observa que el cambio de formulación no modificó la forma irregular de las partículas y el análisis por TEM refleja que las nanopartículas de la formulación final están compuestas de partículas de menor tamaño y presentan mayor opacidad que las de quitosán y del sistema A.

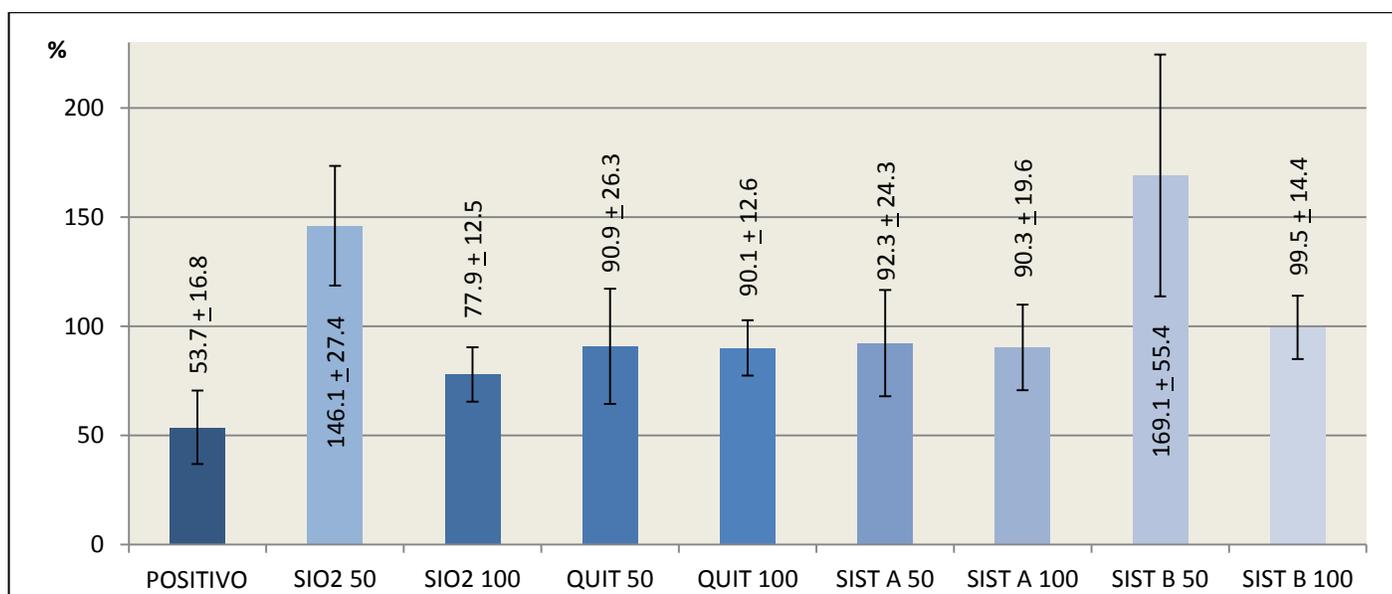
4.2. EVALUACIÓN CITOTÓXICA

4.2.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DE MTT

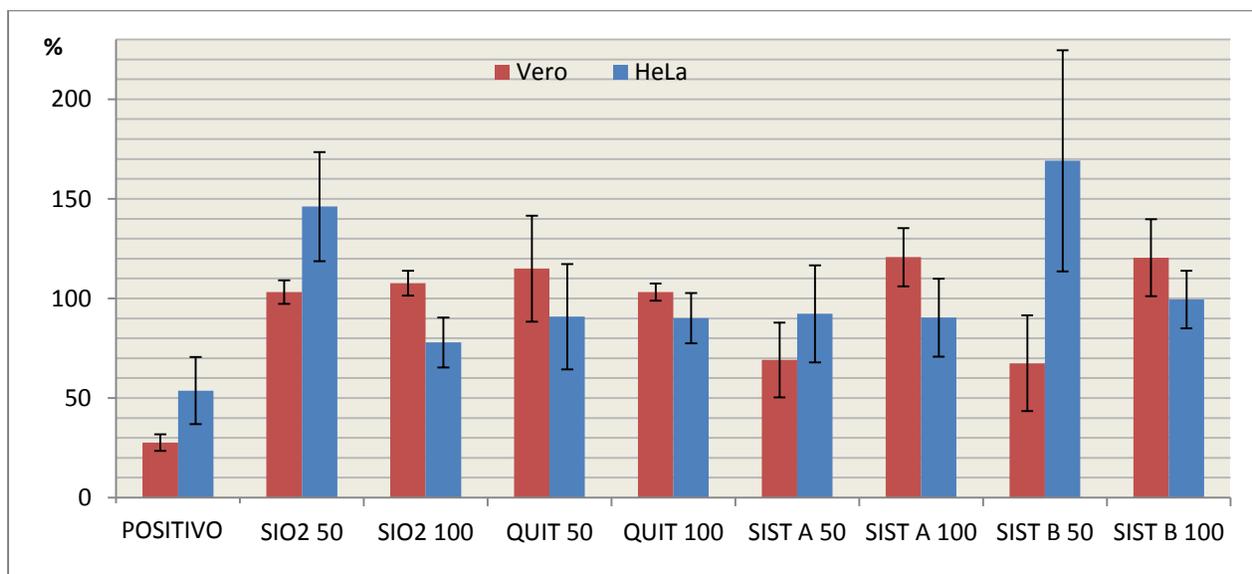
En las siguientes gráficas se muestran los resultados del ensayo de viabilidad por la prueba de reducción del MTT realizado en cultivos de células Vero y HeLa. El tiempo de exposición a las nanopartículas fue de 4 horas y los resultados que se muestran son el porcentaje relativo del control negativo (cultivo sin tratamiento). Los resultados se comparan contra un control positivo (cultivo tratado con solución de Arsenito de Sodio 0.3 mM)



Gráfica 1 Porcentaje de viabilidad en células Vero por tratamiento con nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados.



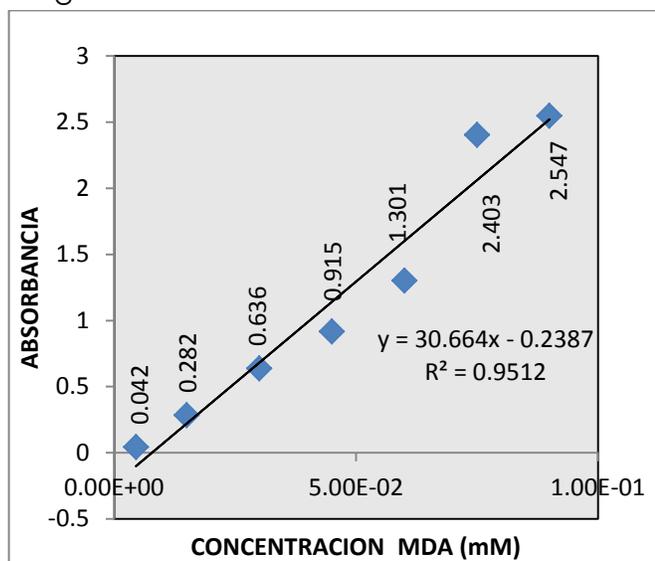
Gráfica 2 Porcentaje de viabilidad en células HeLa por tratamiento con nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados.



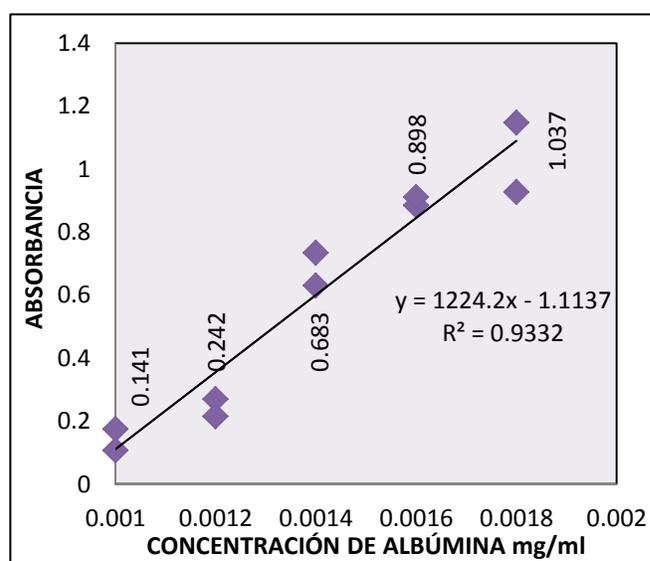
Gráfica 3 Comparación del porcentaje de viabilidad en células HeLa y Vero durante el tratamiento con nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados.

4.2.2. ENSAYO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Para el ensayo de lipoperoxidación por TBARS, se trazaron curvas de calibración de Malondialdehído (MDA) con la cual se van a correlacionar los datos obtenidos del ensayo de especies oxidantes; por otro lado, se trazó la curva de calibración con Albúmina Sérica Bovina para correlacionar la cantidad de proteína obtenida en cada pozo. Finalmente se correlacionan los datos obtenidos en absorbancias de cada muestra para obtener la concentración en milimoles (mM) de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) por miligramo de Proteínas Totales.

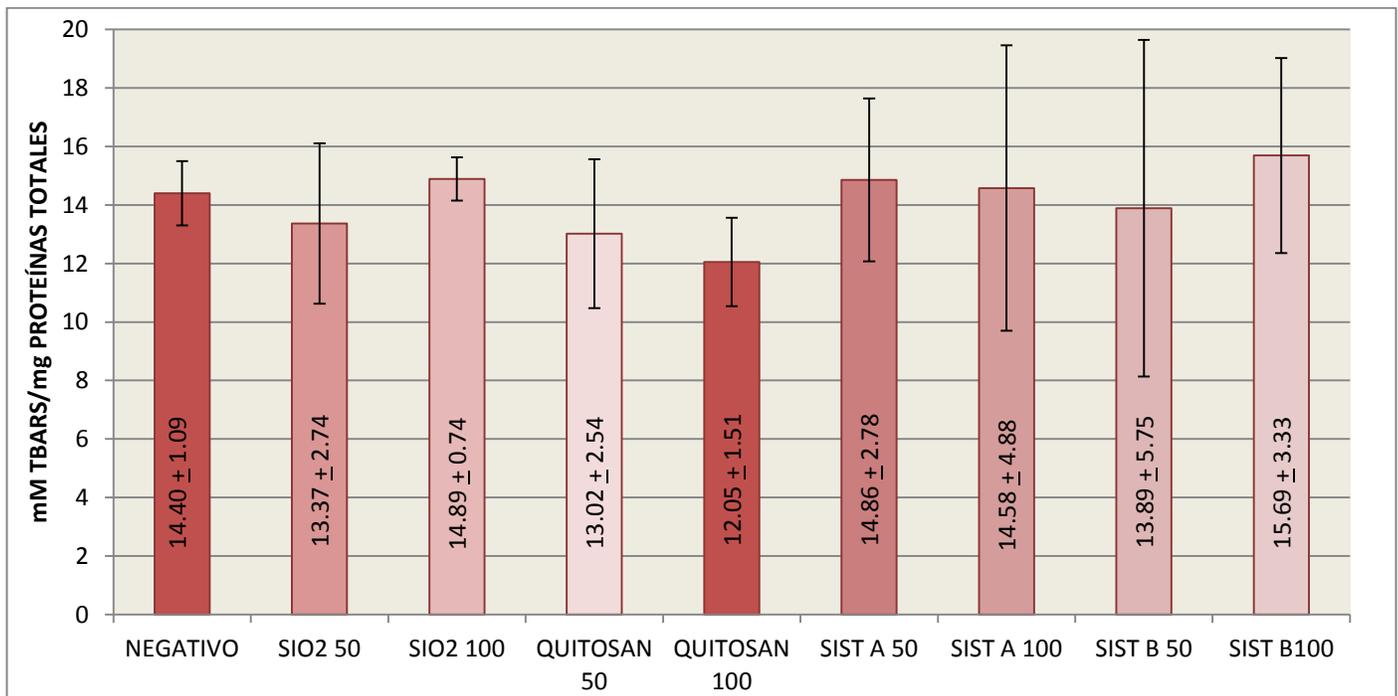


Gráfica 4 Curva de Calibración de Malondialdehído (MDA) 3 mM

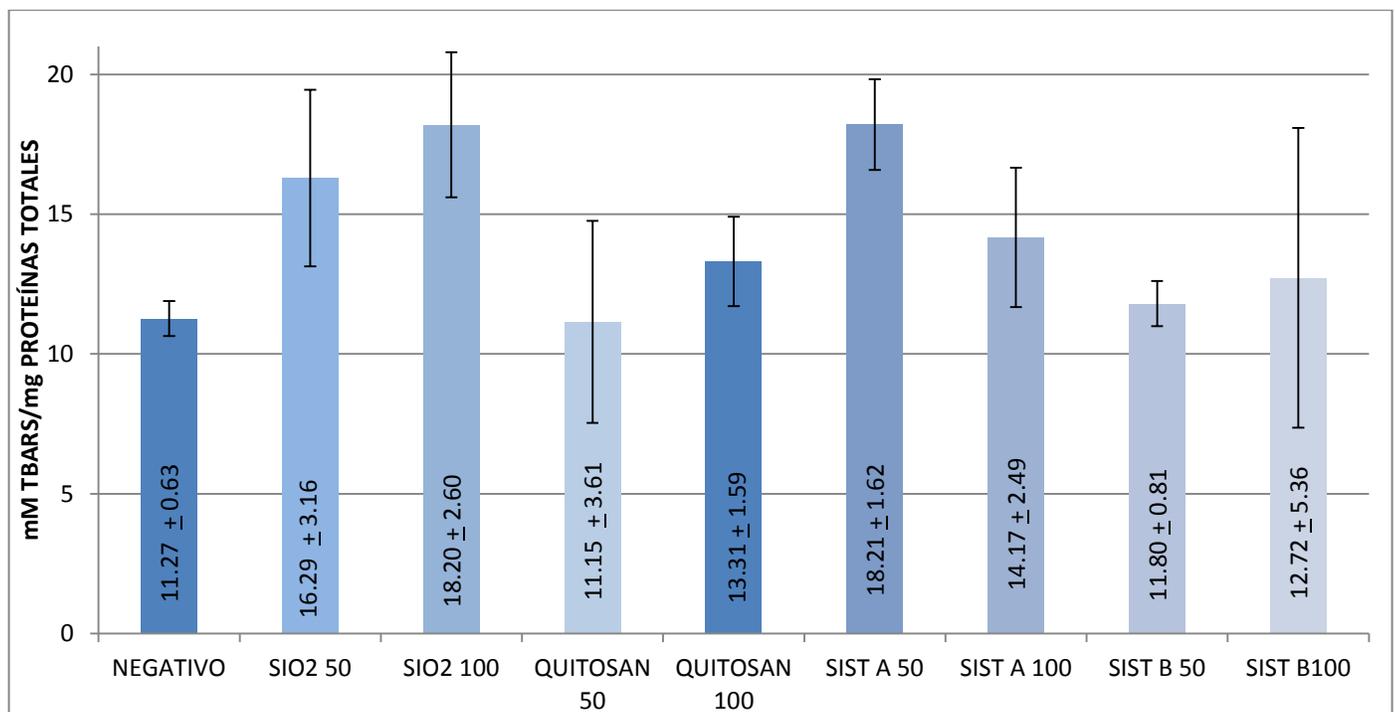


Gráfica 5 Curva de Calibración Albúmina Sérica Bovina a 0.22 mg/ml

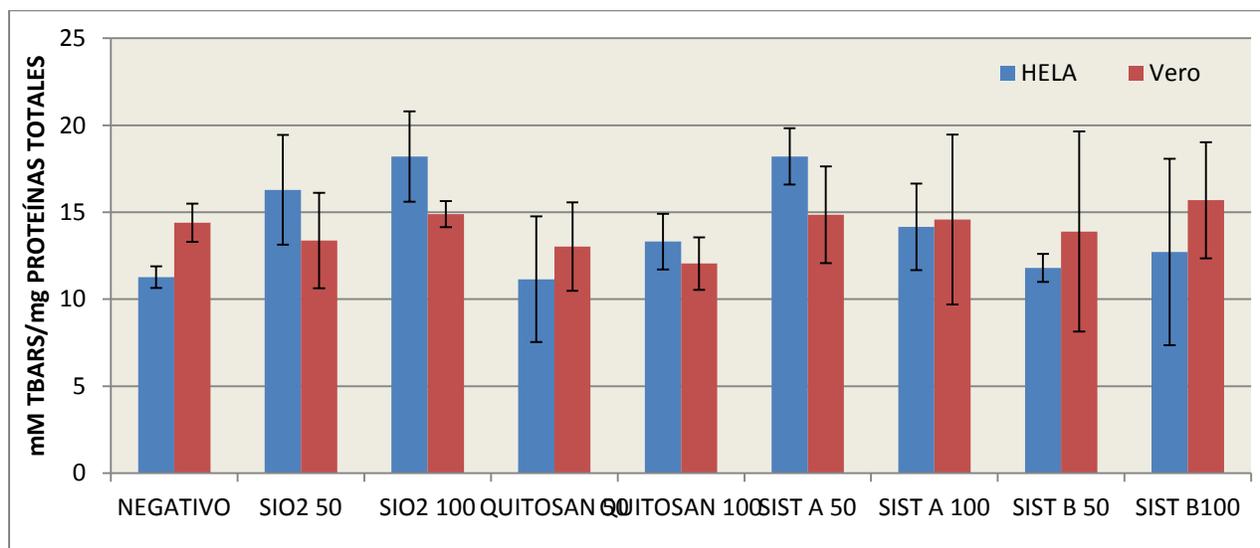
Las gráficas que se muestran a continuación presentan la cantidad de TBARS /mg de proteína en cultivos de células Vero y HeLa. El tiempo de exposición a las nanopartículas fue de 6 horas y los resultados se comparan contra un control negativo (cultivo sin tratamiento) el cual va a determinar la cantidad basal de especies oxidantes por mg de proteína.



Gráfica 6 Concentración TBARS por mg de proteína total en células Vero por efecto de la administración de nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados



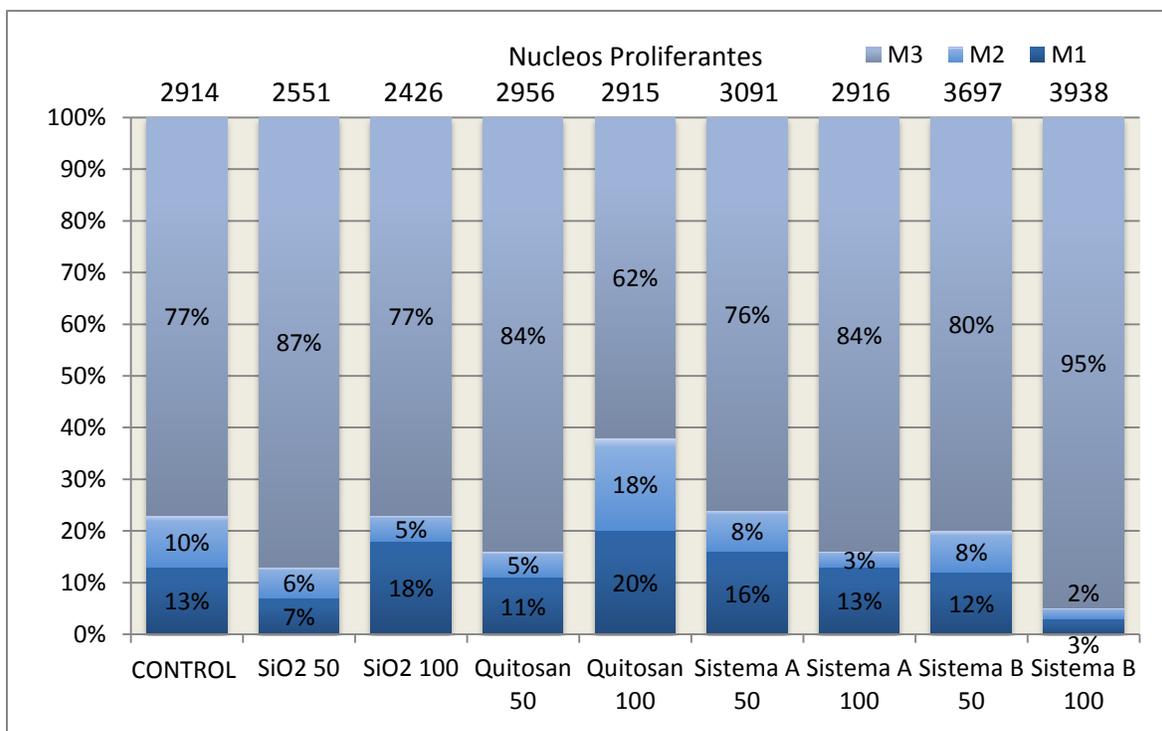
Gráfica 7 Concentración TBARS por mg de proteína total en células HeLa por efecto de la administración de nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados



Gráfica 8 Comparación de TBARS/mg Proteína en células HeLa y Vero durante el tratamiento con nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados.

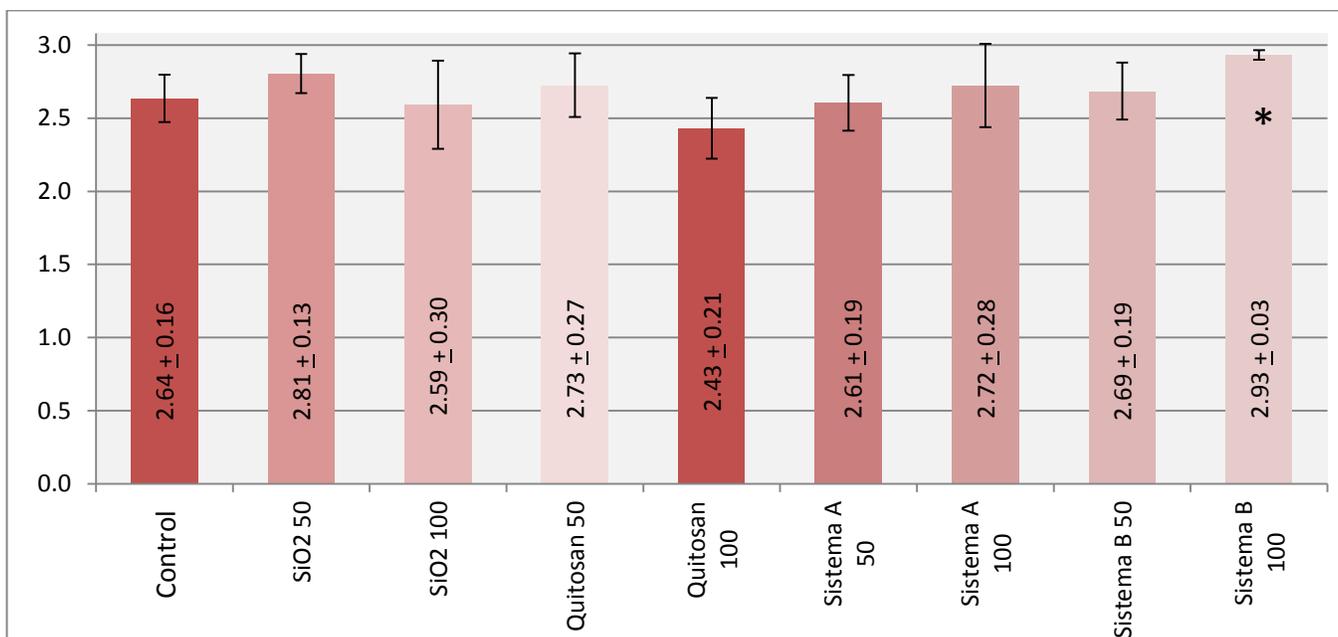
4.2.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para el ensayo de proliferación celular se realizó una observación minuciosa en microscopio óptico de metafases consecutivas y núcleos proliferantes (ver imágenes 8 - 11) después de haber realizado cultivos de linfocitos de sangre periférica humana fresca a los cuales se les dio un tratamiento de 24 horas con las nanopartículas preparadas. A continuación se muestran los resultados en la siguiente gráfica.



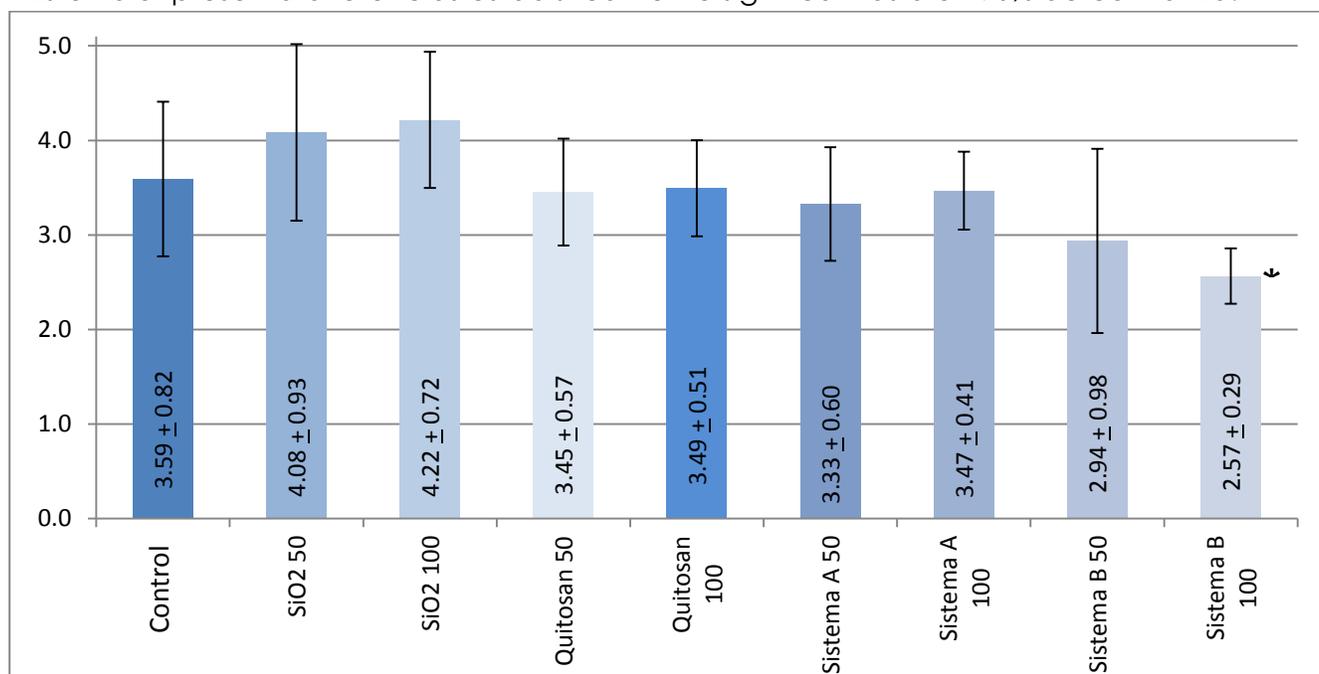
Gráfica 9 Porcentaje obtenido de Primeras (M1), Segundas (M2) y Terceras o subsecuentes (M3) metafases al conteo total de las 100 mitosis consecutivas

Una vez obtenidos los resultados del conteo de metafases se determinaron el Índice de Proliferación y el Índice Mitótico (ver fórmulas en la sección de Metodología). Los valores obtenidos se compararon contra un control el cual no recibió tratamiento de nanopartículas. Las gráficas siguientes muestran los resultados obtenidos.



Gráfica 10 Índice de proliferación de linfocitos humanos por exposición a nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados.

* Este valor presenta diferencias estadísticamente significativas a un 90% de confianza.



Gráfica 11 Índice mitótico de linfocitos humanos por exposición a nanopartículas de Quitosán, SiO₂ y los sistemas combinados.

* Este valor presenta diferencias estadísticamente significativas a un 90% de confianza.

Las siguientes imágenes muestran el tipo de alteraciones nucleares y cromosómicas en linfocitos de sangre periférica humana expuesta a las nanopartículas de Quitosán-SiO₂ encontradas en las muestras observadas.

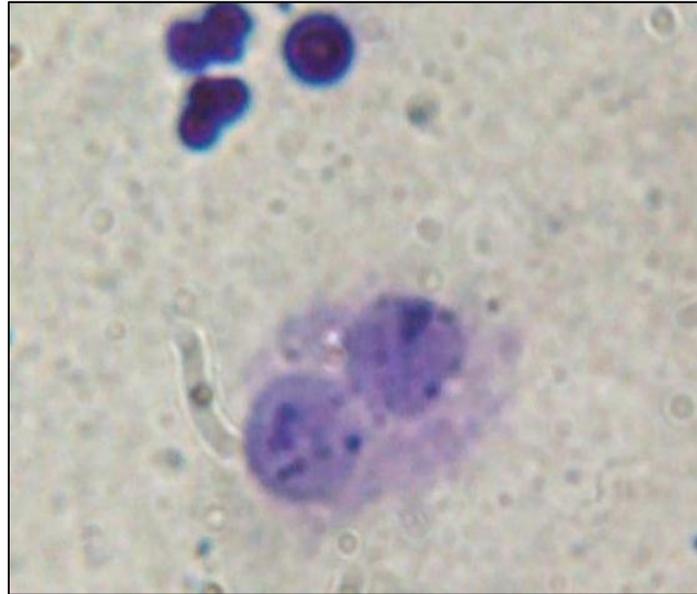


Imagen 24 Célula binucleada.

Imagen tomada a 100X encontrada en el tratamiento con 100 µl de nanopartículas de Quitosán

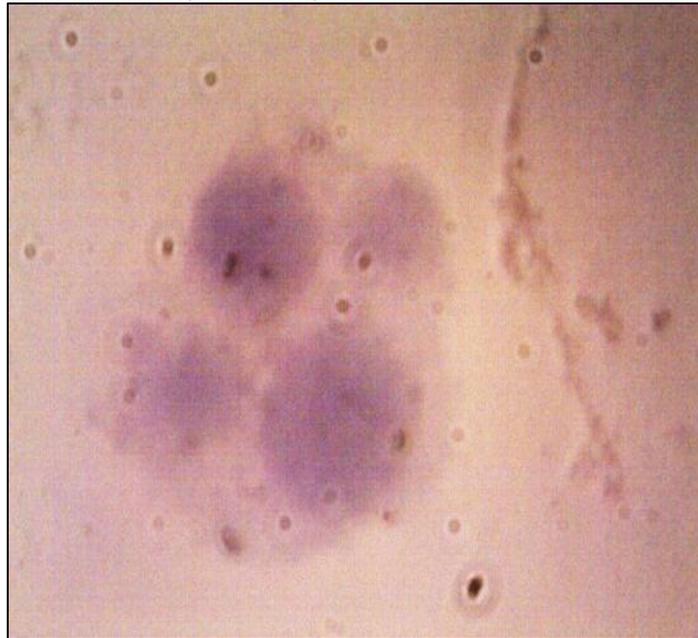


Imagen 25 Célula tetranucleada

Imagen tomada a 100X encontrada en el tratamiento con 100 µl de nanopartículas del sistema B

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Caracterización Físicoquímica

La caracterización de las nanopartículas preparadas (Sistemas A y B) reveló que las nanopartículas no se ven modificadas en su forma con respecto a las nanopartículas de Quitosán por la presencia de SiO₂ con en ambas formulaciones. Además el potencial Z se mantuvo dentro de los niveles reportados para las nanopartículas de Quitosán (+20 a +50 mV); por otra parte, el tamaño de partícula reportado para las nanopartículas de quitosán es 100 a 350nm (Lemarchand, Gref, & Couvreur, 2004), sin embargo las nanopartículas del Sistema A presentaron un tamaño de 364.5 ± 209.7 nm, el cual supera lo antes mencionado. Mientras que en el Sistema B se obtuvieron nanopartículas de 197.8 ± 99.3 nm.

Como se menciona en la sección de resultados, el método de preparación está basado en la gelación iónica de Quitosán con TPP sin embargo se encontraron dos vías de preparación diferentes para obtener las nanopartículas de los sistemas A y B lo cual resultó en la formación de nanopartículas con diferentes tamaño de partícula como principal característica; el potencial Z y la morfología esférica es similar aunque las imágenes del análisis por TEM revelan que las nanopartículas de ambos sistemas se ordenan aglomerados de partículas de menor tamaño, las nanopartículas del Sistema B presentan mayor opacidad que las del Sistema A, lo cual sugiere una mayor carga de SiO₂ en ese sistema.

EVALUACIÓN CITOTÓXICA

Los sistemas preparados recibieron un tratamiento previo para poder ser sometidos a las evaluaciones citotóxicas, se realizó un ajuste de pH buscando acercarse a los valores fisiológicos (\approx pH 7) y como se menciona arriba, se esterilizaron por filtración. Para cada prueba se administraron dos volúmenes de las soluciones de nanopartículas para obtener información asociada a la dosis-respuesta que presenten las células cuando son tratadas con éstos sistemas. Los resultados obtenidos son la comparación con un control negativo, es decir células que no recibieron tratamiento alguno, pero que se encuentren a las mismas condiciones de prueba. Estos datos fueron sometidos al análisis de comparación múltiple de medias Tukey al 90% de confianza.

Viabilidad Celular

La viabilidad celular se evaluó mediante la prueba de reducción de MTT. En donde el MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) es incorporado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2009). Esta capacidad de la célula para reducir dicho compuesto es considerada un reflejo de la actividad mitocondrial y se puede asociar con la viabilidad de las líneas celulares empleadas.

En la Gráfica 1 se presentan los porcentajes de viabilidad en células Vero por el tratamiento con los sistemas nanoparticulados preparados. Se puede observar que para los sistemas de nanopartículas control se mantiene una proporción con respecto al control negativo (células sin tratamiento), en niveles cercanos al 100%. Cabe mencionar que curiosamente, las células Vero que se expusieron a las nanopartículas del Sistema A mostraron una viabilidad disminuida con respecto al control (69.1%) cuando se expusieron los cultivos a dosis menores de nanopartículas. Sin embargo al incrementar la cantidad de nanopartículas para las células, el porcentaje de viabilidad incrementó (120.7%) lo cual se traduce en que el número de células viables fue mayor al control. Lo mismo ocurrió con el sistema B en donde con la menor dosis de exposición la proporción de células viables fue de 67.5% mientras que al aumentar la dosis se obtuvo un incremento de la viabilidad (120.5). Cabe señalar que por medio del análisis estadístico de Tukey no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de nanopartículas y sistemas control.

El efecto de la exposición a 50 μ l y 100 μ l de nanopartículas en células HeLa se muestra en la Gráfica 2. Se puede observar que el sistema control 1 (SiO_2) altera la viabilidad cuando se agrega una menor cantidad de nanopartículas (77.9%). La exposición a nanopartículas de Quitosán no modificó la viabilidad celular manteniendo en las células HeLa niveles de 90% para las dos concentraciones de nanopartículas de exposición. Caso similar ocurre para el sistema A que se mantienen alrededor de 90% cuando se adicionan 50 μ l y 100 μ l. Por otro lado, la adición de 50 μ l de nanopartículas del Sistema B incrementa la respuesta hasta obtener 169.0% de viabilidad, mientras que se alcanza 99.4% cuando se exponen las células a 100 μ l de nanopartículas. A pesar de las diferencias entre cada tratamiento no se hallaron diferencias significativas al realizarse la comparación múltiple de medias entre los valores obtenidos para las nanopartículas preparadas y los sistemas control.

La Gráfica 3 muestra un comparativo del efecto de la concentración de las nanopartículas en las dos líneas celulares empleadas en esta prueba, comparando cada tratamiento se muestra que las células HeLa parecen ser más susceptibles a la exposición de nanopartículas en particular de SiO_2 y las correspondientes al Sistema B (Nanopartículas de Quitosán- SiO_2) aunque estadísticamente no existan diferencias significativas entre los tratamientos.

Si bien es evidente que una disminución de la viabilidad celular puede representar un daño directo de la actividad mitocondrial enfocada a la óxido-reducción del MTT. Los resultados en este caso muestran que los efectos observados después de la exposición a los sistemas nanoparticulados (Quitosán, SiO_2 y Sistemas A y B), para cada dosis y nanosistema, no se comprometió significativamente la viabilidad celular.

Con los incrementos que se obtuvieron alrededor de 150% consideramos que no están relacionados directamente con una mejora hacia las células después de la exposición a los sistemas nanoparticulados. Existe la posibilidad de que las células presentan una mayor actividad mitocondrial logrando por tanto mayor reducción del MTT. Se tiene reportado que el quitosán incrementa la permeabilidad membranal (Tang, Quian, & Shi, 2007) con lo cual se

pudo haber permitido una mayor permeación del MTT hacia el interior de la célula y con esto se produjo el incremento en la respuesta obteniendo valores mayores al 100%.

Peroxidación lipídica

En numerosos estudios se ha sugerido que la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) es una de las primeras respuestas celulares al introducirse un nanomaterial, lo cual conlleva a la muerte celular (Sohaedbuudin, Thevenot, & Baker, 2010). La peroxidación de lípidos debida a la formación de ROS se midió mediante la prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

En la Gráfica 6 se muestran los valores obtenidos de la administración de las nanopartículas a células Vero durante 6 horas de exposición. Los resultados son comparados contra un control negativo (cultivo sin tratamiento). Se puede observar que la administración de 100 μ L de nanopartículas del sistema B presentó una mayor cantidad de TBARS por mg de proteína (15.688 mM TBARS/mg proteína) sin embargo entre los tratamientos no se observan variaciones importantes, lo cual se corrobora estadísticamente ya que por medio de la prueba de TUKEY no se encontraron diferencias significativas en ningún tratamiento.

De la misma manera, la Gráfica 7 presenta la concentración de TBARS/ mg de proteína de células HeLa en función a la cantidad expuesta de los sistemas nanoparticulados. Se encontró que el tratamiento con 50 μ L de nanopartículas del Sistema A incrementó la cantidad de especies oxidantes a 18.21 mM TBARS/ mg de proteína, en tanto que la administración de una concentración mayor de ese sistema disminuyó la generación de especies oxidantes a 14.17 mM TBARS/ mg de proteína sin presentarse entonces un efecto dosis/respuesta. Estos resultados pueden explicarse si consideramos que en exposiciones agudas a dosis altas de xenobióticos (nanopartículas) las células muestran una respuesta rápida encaminada a mantener el equilibrio, en este caso oxido-reducción. Esta respuesta se ha asociado con la síntesis rápida de agentes antioxidantes como el glutatión (GSH) y otras enzimas reguladoras del ambiente REDOX celular. En cuanto a las nanopartículas del sistema B, la exposición a ambos niveles de concentración mantuvo valores similares al control Negativo. Además, se demostró estadísticamente mediante la comparación de medias de TUKEY que la generación de especies oxidantes no es estadísticamente significativa.

Finalmente, el Gráfico 8 compara la sensibilidad de las estirpes celulares a la exposición de las nanopartículas preparadas para la generación de TBARS. Se observa que, las células Vero son más resistentes a generar radicales libres cuando se exponen a las nanopartículas del Sistema A, particularmente, como ya se mencionó, utilizando la menor concentración; por otra parte, las células HeLa presentaron una tendencia no significativa de mayor resistencia al estrés oxidativo cuando se trataron con nanopartículas del Sistema B. Aunque como se mencionó anteriormente en ambas líneas celulares no se encontraron afectaciones estadísticamente significativas.

Esto quiere decir, para ambas líneas celulares que no se generó una cantidad importante de peróxidos lipídicos que alteren la integridad de las membranas celulares. Es importante

recordar que las nanopartículas del sistema B presentan un tamaño menor (197.8 nm) y que el tamaño promedio de las partículas del sistema A fue 364.5 nm con lo cual se puede inferir que el rango de tamaño de partícula de las nanopartículas de Quitosán-SiO₂ no impone condiciones importantes de estrés oxidativo para las líneas celulares de éste trabajo.

Proliferación celular

En relación a las evaluaciones de la capacidad proliferativa de linfocitos humanos en sangre periférica expuestos a los sistemas nanoparticulados, los resultados que se muestran en la Gráfica 9 representan las proporciones de primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) metafase en 100 mitosis consecutivas. Se consideraron durante el conteo al menos 2000 núcleos proliferantes. En todos los sistemas se presentaron al menos 60% de terceras o subsecuentes metafases, esto sugiere que en los cultivos expuestos a nanopartículas no se altera el ciclo de división mitótica, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo para conocer si las nanopartículas eran capaces de alterar la proliferación celular estimamos el índice de proliferación celular en cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con Fitohemaglutinina.

La Gráfica 10 muestra los valores obtenidos de la determinación de Índice de Proliferación (IP). Éste índice refleja la proporción de células proliferantes en el cultivo celular. Se encontró que la mayoría de los sistemas con tratamiento de nanopartículas presentan un comportamiento similar al del control (cultivo sin tratamiento). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de TUKEY y se encontraron diferencias significativas en el cultivo tratado con una mayor cantidad de nanopartículas del Sistema B (2.93 ± 0.0032) ya que este valor se encuentra por encima de los demás valores. Esto indica que la exposición a una mayor cantidad de nanopartículas del Sistema B induce un incremento en la capacidad proliferativa de las células expuestas al sistema B.

El índice Mitótico determina la velocidad con la cual se cumplen los ciclos de proliferación celular; un valor elevado indicará que la proliferación es rápida, es decir que los ciclos serán de corta duración y que una fracción importante de la población completa los ciclos de división celular de forma más rápida o lenta (Lynne Bennington, 2000). Los resultados del Índice Mitótico son presentados en la Gráfica 12, comparando los valores determinados.

Se encontró que estadísticamente el único sistema que presenta diferencias significativas es el que recibió tratamiento con la mayor cantidad de nanopartículas del Sistema B (2.565 ± 0.294) el cual mostró una disminución en la capacidad proliferativa de los linfocitos en sangre periférica después de la exposición al Sistema B con respecto al control y a los demás tratamientos. Por tanto se infiere que el tratamiento con 100 µL de nanopartículas del Sistema B modifica la capacidad proliferativa después de 24 horas de exposición de nanopartículas de Quitosán-SiO₂.

Para recordar, las nanopartículas del sistema B presentaron un menor tamaño de partícula (lo que las distingue principalmente de las del sistema A), por lo cual podría atribuirse a su tamaño y dosis, el efecto de la alteración de la capacidad proliferativa.

Durante la observación de núcleos y metafases se encontraron algunos casos de incidencia de células binucleadas en la mayoría de los tratamientos con las nanopartículas preparadas, Ver imagen 24. Para el tratamiento con 100 μ l de nanopartículas del sistema B, se hallaron células multinucleadas (tetranucleadas) (Ver imagen 25). La observación de estas anomalías no fue de manera cuantitativa.

Las células binucleadas, multinucleadas son causadas por la inhibición de la citocinesis celular. Estas irregularidades mitóticas pueden estar asociados a los eventos de la división celular como anafases incompletas o la distribución desigual de cromosomas entre otros, pueden dar lugar a aneuploidias, o por acción indirecta de las nanopartículas sobre algún componente de la maquinaria de división celular como filamentos del citoesqueleto, centrosomas, centrómeros entre otros.

No obstante para conocer la probable participación de los sistemas nanoparticulados en este tipo de alteraciones es necesario diseñar trabajos de investigación complementarios al presente y conocer si las nanopartículas de Quitosán-SiO₂ presentan una susceptibilidad diferencial en comparación con los otros sistemas preparados en este estudio hacia la inducción de daño. Sería interesante abundar también en el estudio de los mecanismos de acción asociados con la citotoxicidad significativa inducida por los sistemas nanoparticulados obtenidos en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la preparación de dos tipos de nanopartículas de Quitosán-SiO₂ con diferentes tamaños de partícula, tomando como base el método de gelación iónica de Quitosán con TPP, variando el orden de adición de SiO₂. Se caracterizaron los sistemas preparados determinando su tamaño de partícula y distribución de tamaño; potencial Z y la morfología que presentaron las nanopartículas mediante la visualización por microscopía electrónica de barrido y transmisión (SEM y TEM, respectivamente). En resumen, el Sistema A presentó un tamaño de partícula predominante de 364nm, potencial Z de +35.9 a +40.9 mV y una morfología esférica con superficie aparentemente lisa y encontrando que las nanopartículas son producto de aglomerados de partículas de quitosán más pequeñas en las que se encuentra inmerso el dióxido de silicio. El Sistema B presentó un tamaño de partícula menor (197nm), potencial Z de +27.5 a +39.5 mV y una morfología irregular a esférica que de igual manera son producto de aglomerados de nanopartículas de menor tamaño.

Se evaluó la capacidad citotóxica de las nanopartículas preparadas a dos concentraciones o volúmenes de exposición (50 y 100 µl) mediante las pruebas de viabilidad, TBARS y proliferación celular. Se encontró que la administración de nanopartículas de Quitosán-SiO₂ de los sistemas preparados (A y B) no compromete la viabilidad de células HeLa y Vero. La estimación de las TBARS en las células expuestas a las nanopartículas preparadas en este trabajo no mostró diferencias significativas respecto al control. Lo que sugiere que las nanopartículas no modifican considerablemente el ambiente REDOX de las células expuestas después de 6 horas de exposición.

La prueba de proliferación celular arrojó que el tratamiento con 100 µl de nanopartículas del sistema B presenta diferencias significativas entre los tratamientos, generando una aceleración del ciclo celular determinado mediante el índice mitótico e índice de proliferación.

Aunque no era objetivo específico de este proyecto evaluar la capacidad aneúgena y de alteraciones nucleares asociadas a la exposición de nanopartículas, en las preparaciones de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, observamos con cierta frecuencia (no estimada cuantitativamente) células aneuploides (hipoploides e hiperploides). Además de la presencia de algunas células binucleadas, identificamos al menos un caso de linfocitos con células tetranucleadas en los cultivos expuestos a las nanopartículas preparadas del Sistema B.

Para el estudio de este tipo de alteraciones celulares asociadas con el proceso de proliferación es importante dar seguimiento dado que la presencia de éste tipo de biomarcadores de efecto ofrecen la oportunidad de asociar su presencia con el mecanismo de acción de los xenobióticos, en este caso de las nanopartículas específicamente.

7. PERSPECTIVAS

Uno de los objetivos principales del desarrollo de este trabajo de investigación fue obtener sistemas nanoparticulados con características fisicoquímicas y citotoxicidad baja o nula que pudieran y proponerse como sistemas para ser empleados con fines médicos o farmacéuticos (jugando el rol de acarreadores de fármacos). Existen algunos trabajos en los que se han preparado nanopartículas de quitosán y se han propuesto como acarreadores de agentes terapéuticos, sin embargo no se han realizado pruebas suficientes para sustentar su inocuidad.

En este trabajo demostramos la capacidad citotóxica de nanopartículas de Quitosán-SiO₂. Asociados con el estrés oxidativo celular mediante la cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y la determinación de óxido-reducción mitocondrial. Cabe resaltar que el diseño experimental consideró evaluar la toxicidad celular del vehículo acarreador. Para determinar el grado de toxicidad o riesgo que presente éste tipo de nanopartícula es necesario realizar pruebas toxicológicas adicionales tanto *in vitro* como *in vivo* para ahondar sobre el riesgo potencial que representa la exposición a diversos sistemas de nanopartículas que preparamos.

La dirección que tome el estudio de las nanopartículas, singularmente de las preparadas en este trabajo, puede ramificarse hacia varias vertientes, por ejemplo:

- Con respecto a los resultados obtenidos, sería importante determinar el potencial genotóxico de las nanopartículas, considerando las anomalías encontradas durante el ensayo de proliferación celular.
- La determinación de la relación tamaño de partícula- toxicidad, que aunque se realizó éste estudio citotóxico con nanopartículas de diferente talla, debe ahondarse más en ese tema para obtener datos precisos de la influencia del tamaño sobre la respuesta tóxica que presenten.
- Evaluación de la susceptibilidad diferencial entre sistemas nanoparticulados hacia su tejido blanco que sería importante para su uso clínico o diagnóstico
- La optimización de los sistemas obtenidos, ya que si se pretende utilizar éste tipo de partículas como acarreadores de fármaco, es importante que la preparación de nanopartículas sea reproducible.

BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia, D. F., Rosario, L. A., & Curveco, D. L. (2009). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea*.
- ATCC. (s.f.). *ATCC The Essentials of Life Science Research*. Recuperado el 16 de Julio de 2011, de Búsqueda en Catálogo: Línea Celular Vero: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1587&Template=cellBiology>
- ATCC. (s.f.). *ATCC The Essentials of Life Science Research*. Recuperado el 16 de Julio de 2011, de Búsqueda en Catálogo: Línea Celular HeLa: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2&Template=cellBiology#aPropb1944>
- Balbus, J. M., Maynard, A. D., Colvin, V. L., & Castranova, V. (2007). Meeting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles - Report from an interdisciplinary Workshop. *Environmental Health Perspectives*, 1654-1659.
- Gonsebatt, M., Del Razo, L., Cerbon, M., Zuñiga, O., & Ramírez, P. (2007). Arsenite induced oxidative damage in mouse liver associated with increased cytokerain 18 expression. *Inorganic Compounds*, 619-626.
- Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H., & Sugiyama, T. (1975). Simple Differential Giemsa Staining of Sister Chromatids after Treatment with Photosensitive Dyes and Exposure to Light and the Mechanism of Staining. *Chromosoma*, 223-230.
- Goycoolea, F., Remuñán-López, R., & Alonso, M. (2003). Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. *Universidad de Santiago de Compostela*, 103-131.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., & Pichardo, S. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Revista de Toxicología*, 87-92.
- Hillegass, J. M., Shukla, A., Lathrop, S. A., & MacPherson, M. B. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Nanomedicine and Nanotobiotechnology*, 219-231.
- Jayakumara, R., Menona, D., Manzoora, K., Naira, S., & Tamurab, H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based. *Carbohydrate Polymers*, 1-6.
- Kunzmann, A., & Andersson, B. (2010). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1-13.
- Labhassetwa, V., & Leslie-Pelecky, D. L. (2007). *Biomedical Applications of Nanotechnology*. Canada: Wiley-Interscience.

- Lemarchand, C., Gref, R., & Couvreur, P. (2004). Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 327-341.
- Lynne Bennington, J. (2000). *Diccionario Enciclopédico del Laboratorio Clínico*. España: Panamericana.
- Malvern Instruments. (2004). *Zeta Sizer Nano-Series User Manual* (págs. 53-81). England: Malvern Instruments Ltd.
- Medina, C., Santos-Martinez, M., & Radomski, A. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological relevance. *British Journal of Pharmacology*, 552-558.
- Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 561-573.
- Montuenga, L., Esteban, F. J., & Calvo, A. (2009). *Técnicas en Histología y Biología Celular*. España: Elsevier.
- Powers, K., Brown, S., & Krishna, V. (2006). Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. *Toxicological Sciences*, 296-303.
- Rodríguez Arnaiz, R. (2005). *Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo*. Mexico: UNAM.
- Rojas, G. E. (1994). Ensayo de la proliferación celular en cultivo de linfocitos de cerdo. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 60-64.
- Sandoval Yoval, L., Montellano Palacios, L., & Piña Soberan, M. (2005). Potencial Zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las nanopartículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*.
- Sanvicens, N., & Marco, M. (2008). Multifunctional nanoparticles –properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology*, 425-433.
- Sin Cheow, W., Li, S., & Hadinoto, K. (2009). Spray drying formulation of hollow spherical aggregates of silica nanoparticles by experimental design. *Chemical Engineering Research and Design*.
- Sohaedbuddin, S. K., Thevenot, P. T., & Baker, D. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7-22.
- Suh, W. H., Suslick, K. S., Stucky, G. D., & Suh, Y.-H. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 133-170.
- Swarbrick, J. (2006). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare.

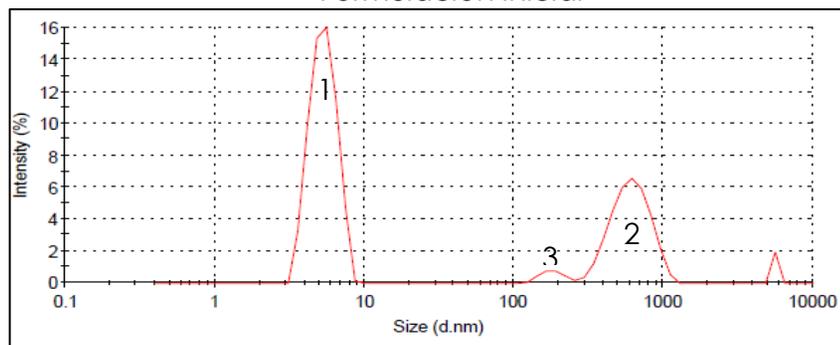
- Tang, Z.-X., Quian, J.-Q., & Shi, L.-E. (2007). Preparation of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilized Enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-96.
- Wu, Y., Yang, W., Wang, C., & Hu, J. (2004). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 235–245.
- ZeptoMetrix. (2006). *TBARS Assay Kit*. New York: ZeptoMetrix Corporation.
- Zonghua , L., Yanpeng , J., & Yifei , W. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1650–1662.

ANEXO A CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

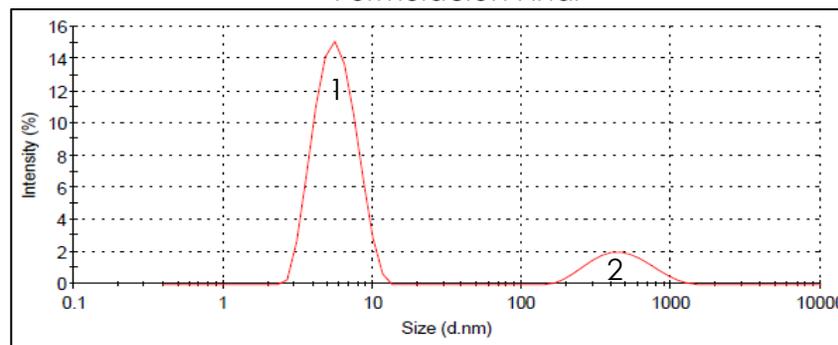
CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Sistema Control 1 (SiO₂)

Formulación Inicial



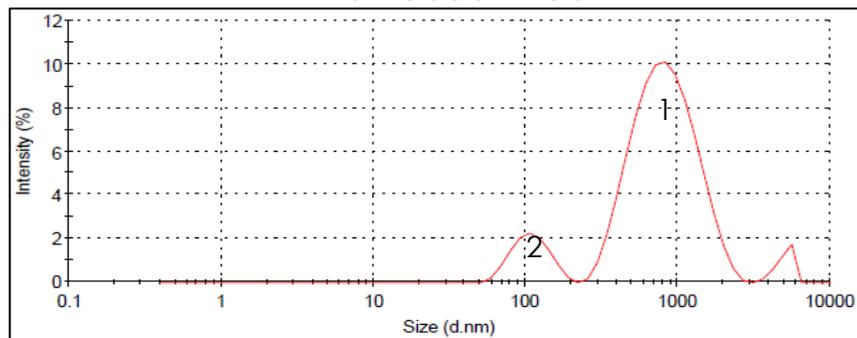
Formulación Final



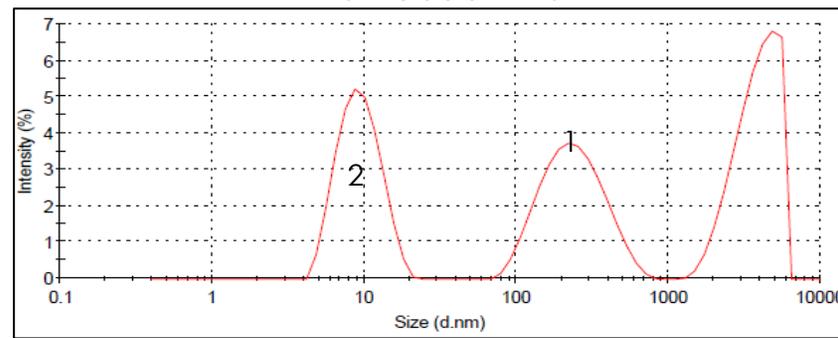
| Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) | Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) |
|------|---------------|----------------|---------------|------|---------------|----------------|---------------|
| 1 | 5.406 | 60.8 | 1.054 | 1 | 5.873 | 84.0 | 1.776 |
| 2 | 619.0 | 34.6 | 176.0 | 2 | 487.7 | 16.0 | 212.9 |
| 3 | 183.3 | 2.7 | 32.73 | | | | |

Sistema Control 2 (Nanopartículas de Quitosán)

Formulación Inicial



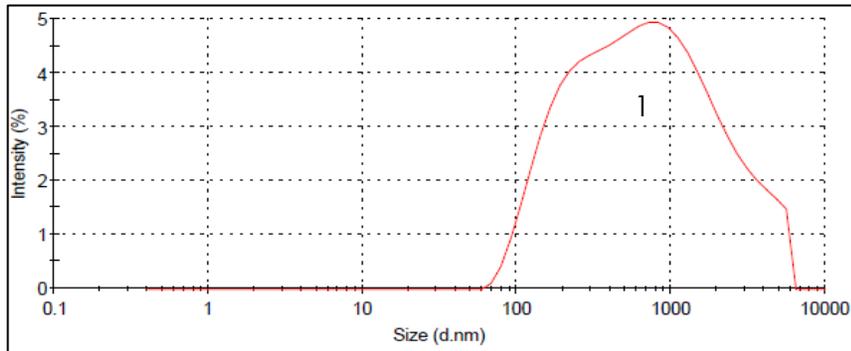
Formulación Final



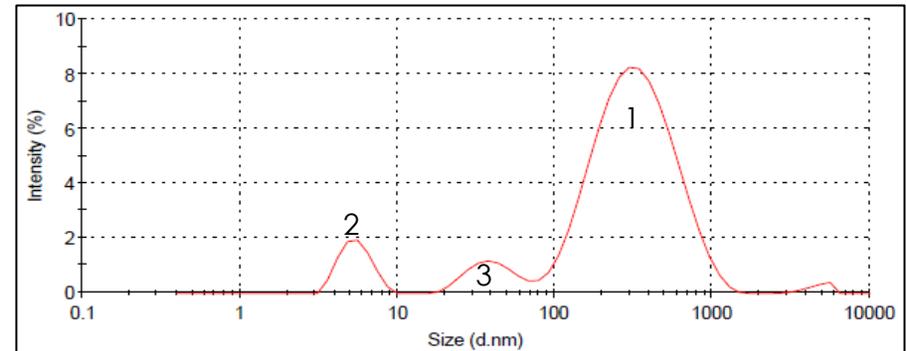
| Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) | Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) |
|------|---------------|----------------|---------------|------|---------------|----------------|---------------|
| 1 | 882.9 | 85.1 | 406.9 | 1 | 255.0 | 31.5 | 118.6 |
| 2 | 110.2 | 11.2 | 29.24 | 2 | 9.635 | 30.1 | 3.013 |

Sistema A (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

Formulación Inicial



Formulación Final

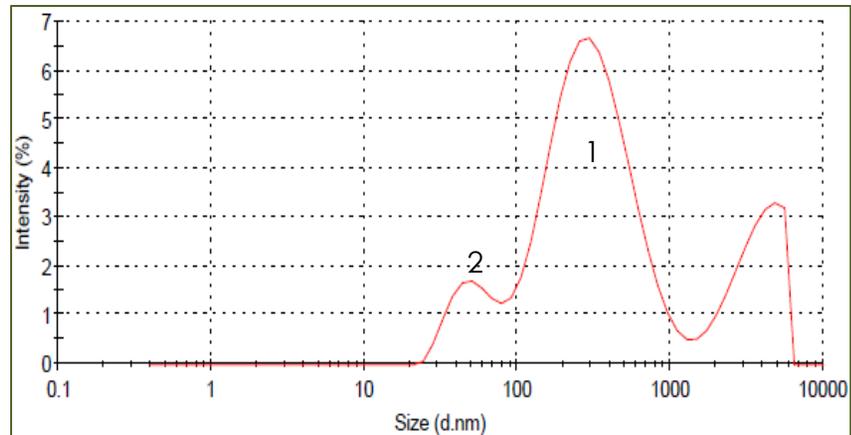


| Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) |
|------|---------------|----------------|---------------|
| 1 | 1092 | 100 | 1170 |

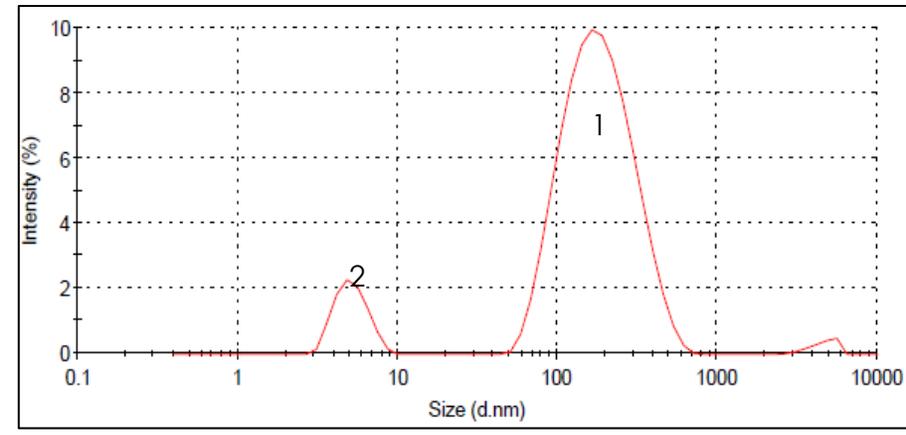
| Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) |
|------|---------------|----------------|---------------|
| 1 | 364.5 | 83.7 | 209.7 |
| 2 | 5.536 | 8.1 | 1.217 |
| 3 | 40.36 | 7.1 | 12.66 |

Sistema B (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

Formulación Inicial



Formulación Final



| Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) |
|------|---------------|----------------|---------------|
| 1 | 363.0 | 69.1 | 219.4 |
| 2 | 52.0 | 10.09 | 15.09 |

| Pico | Diámetro (nm) | Intensidad (%) | Amplitud (nm) |
|------|---------------|----------------|---------------|
| 1 | 197.8 | 88.9 | 99.33 |
| 2 | 5.274 | 9.6 | 1.201 |

CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL (POTENCIAL Z)

Sistema Control 1 (SiO₂)

Formulación Inicial
No se lograron adquirir los gráficos para este sistema debido a una falla del software.

Formulación Final
No se lograron adquirir los gráficos para este sistema debido a una falla del software.

Potencial Z (mV)

Potencial Z (mV)

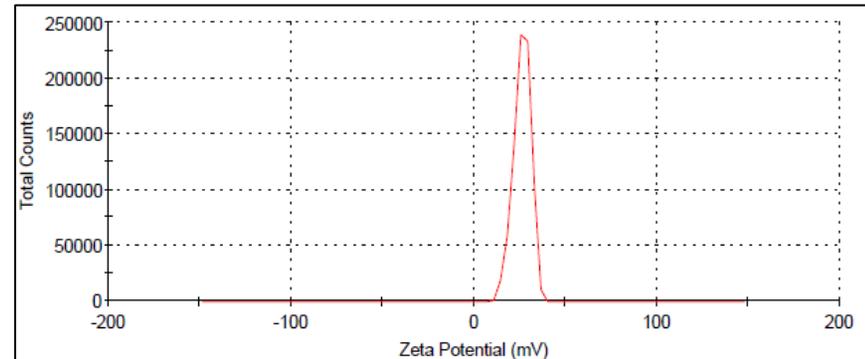
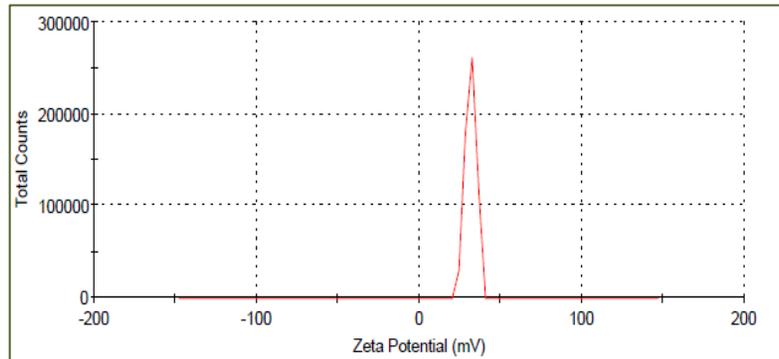
No se lograron adquirir datos para este sistema debido a una falla del software.

-3.40

Sistema Control 2 (Nanopartículas de Quitosán)

Formulación Inicial

Formulación Final



Potencial Z (mV)

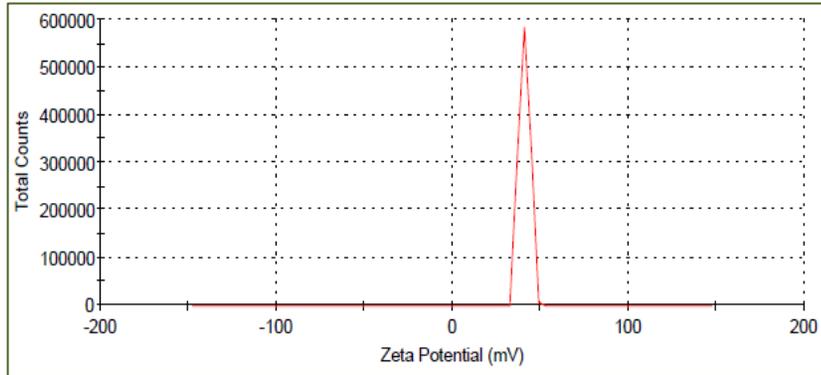
Potencial Z (mV)

31.6 ± 3.34

26.2 ± 4.67

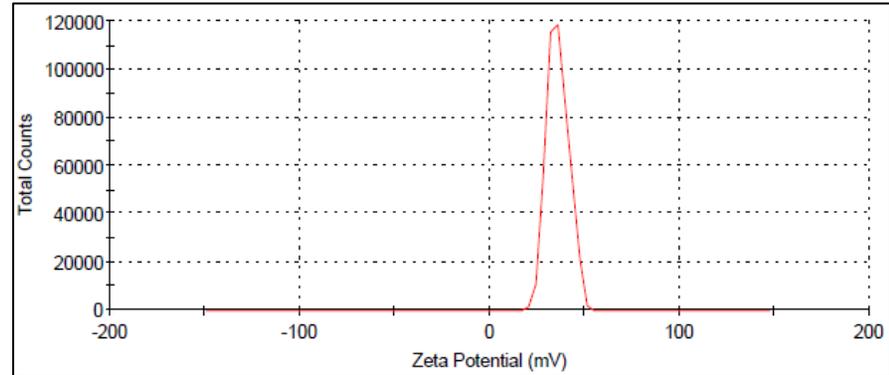
Sistema A (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

Muestra sin filtrar



Potencial Z (mV)
 40.9 ± 3.01

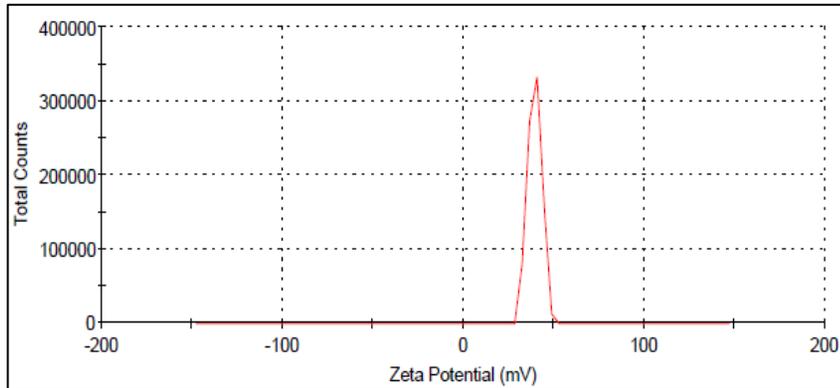
Muestra filtrada



Potencial Z (mV)
 35.9 ± 5.64

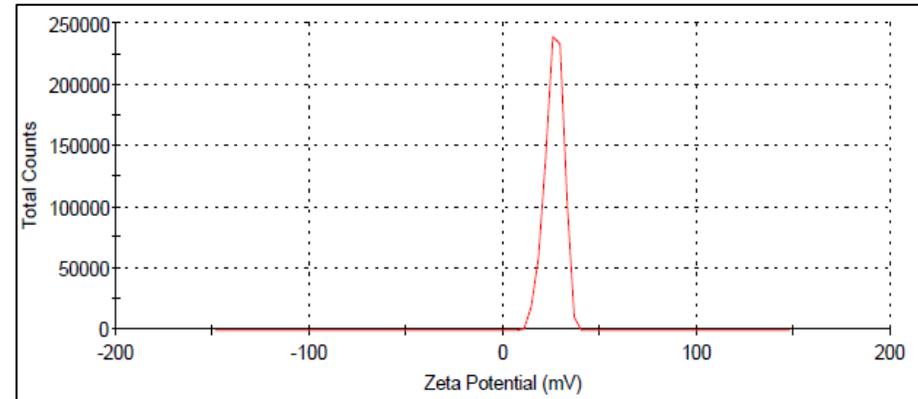
Sistema B (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

Muestra sin filtrar



Potencial Z (mV)
 39.5 ± 3.78

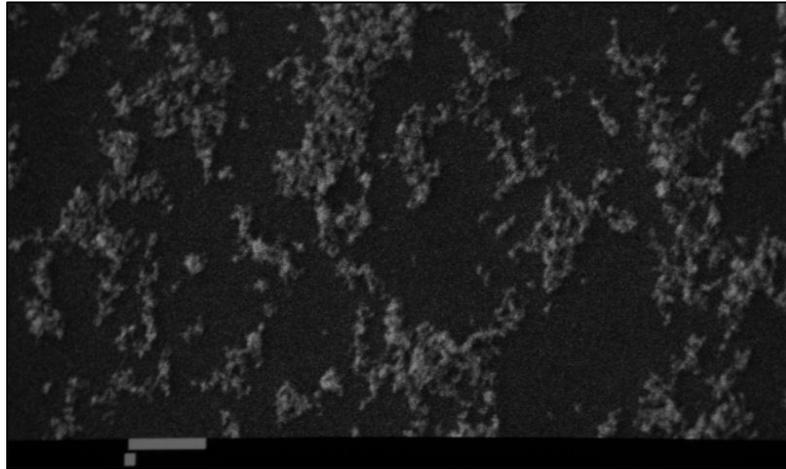
Muestra filtrada



Potencial Z (mV)
 27.5 ± 7.33

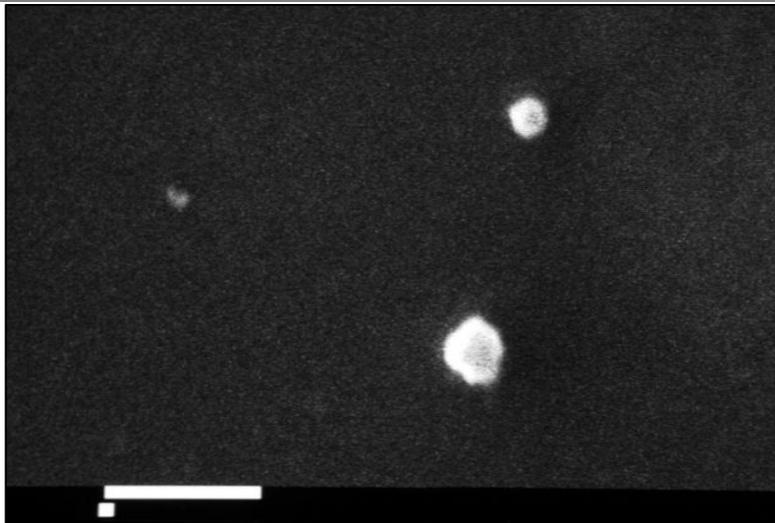
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Sistema Control 1 (SiO₂)

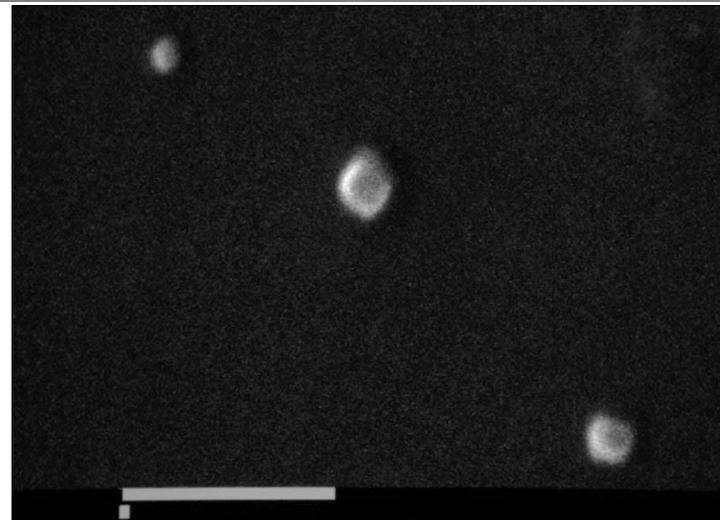


Micrografía del Sistema SiO₂. Imagen tomada a 10000X

Sistema Control 2 (Nanopartículas de Quitosán)

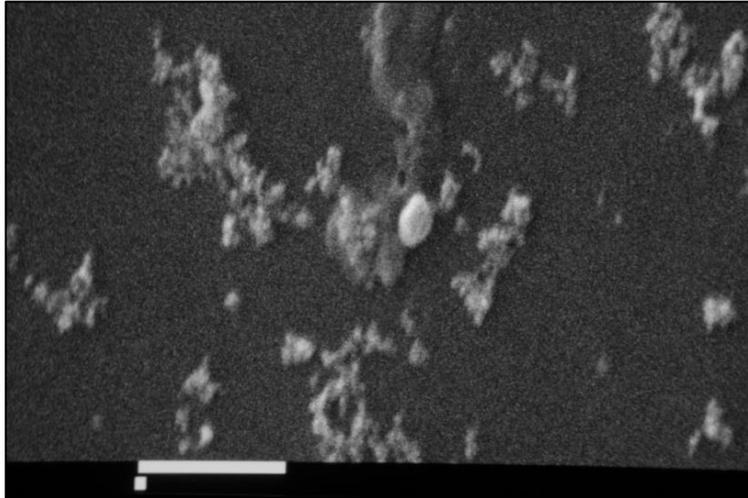


Micrografía del sistema Quitosán, formulación inicial
Imagen tomada a 10000X

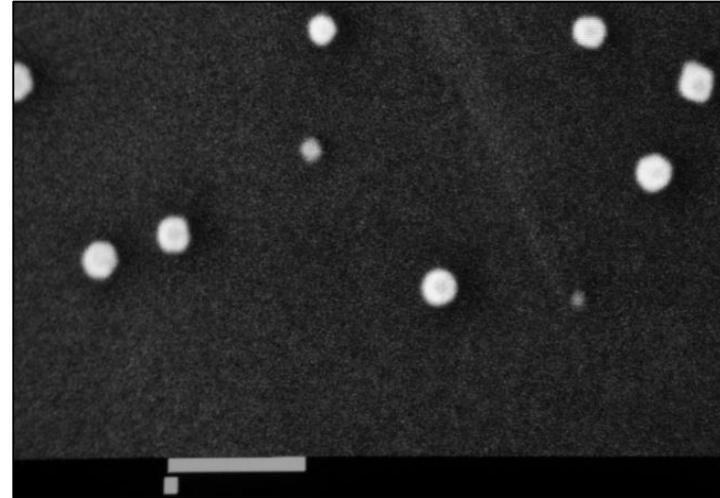


Micrografía del sistema Quitosán, formulación final.
Imagen tomada a 10000X

Sistema A (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)

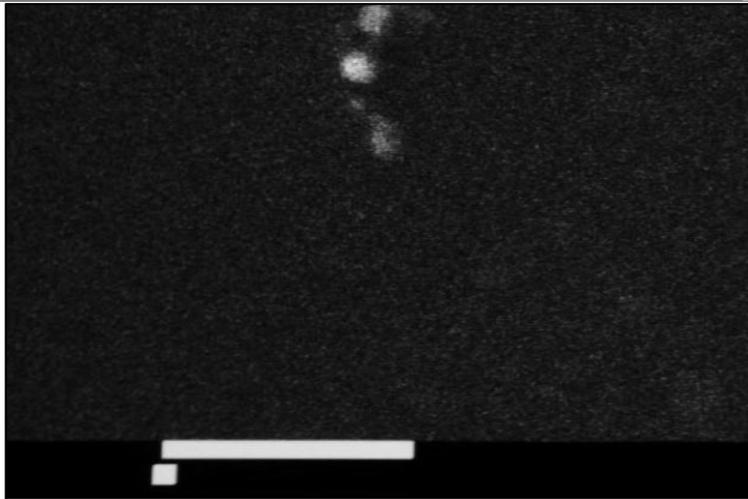


Micrografía del sistema A, formulación inicial.
Imagen tomada a 10000X

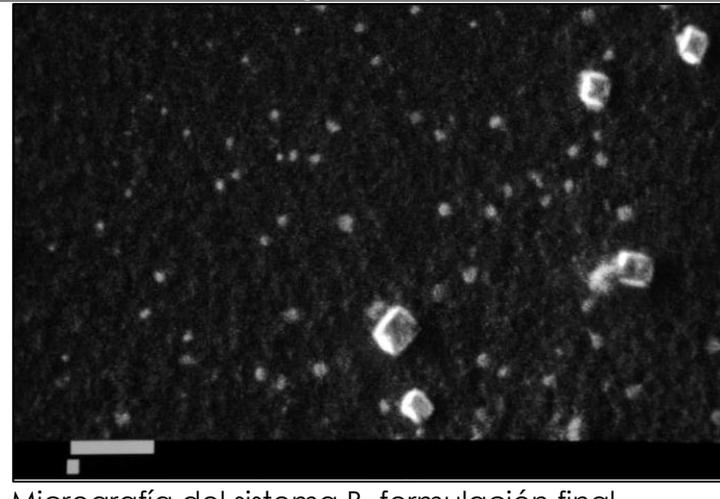


Micrografía del sistema A, formulación final.
Imagen tomada a 10000X

Sistema B (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)



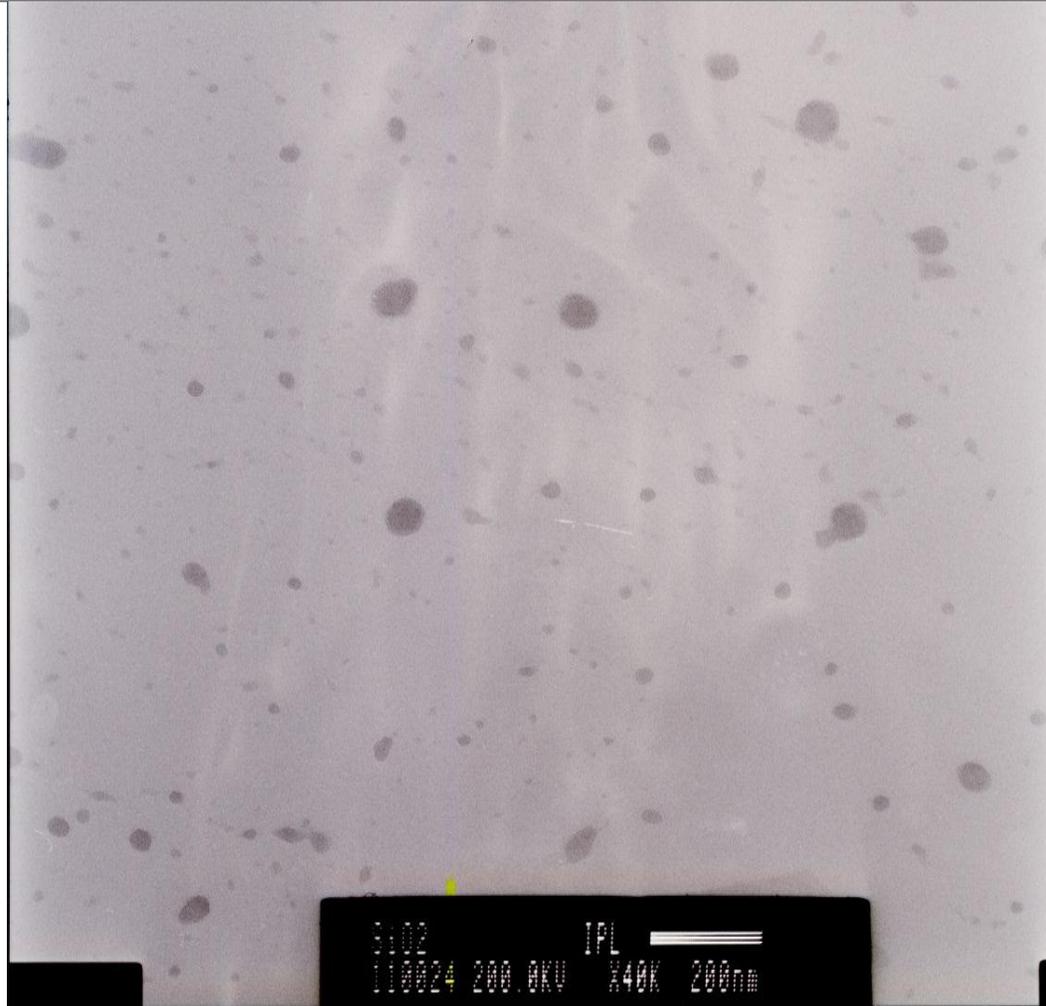
Micrografía del sistema B, formulación inicial.
Imagen tomada a 10000X



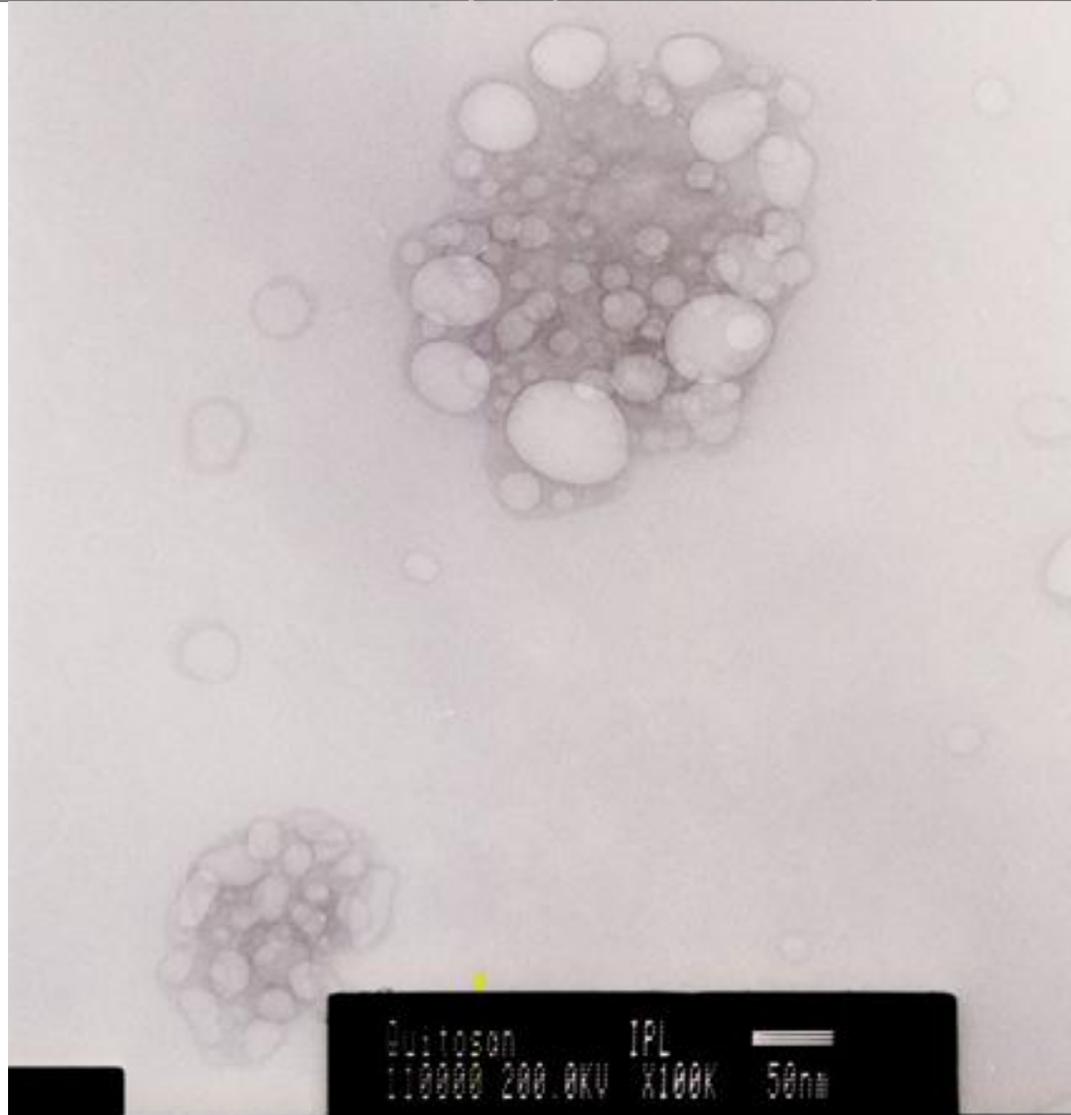
Micrografía del sistema B, formulación final.
Imagen tomada a 10000X

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSIMISIÓN (TEM)

Sistema Control 1 (SiO₂)

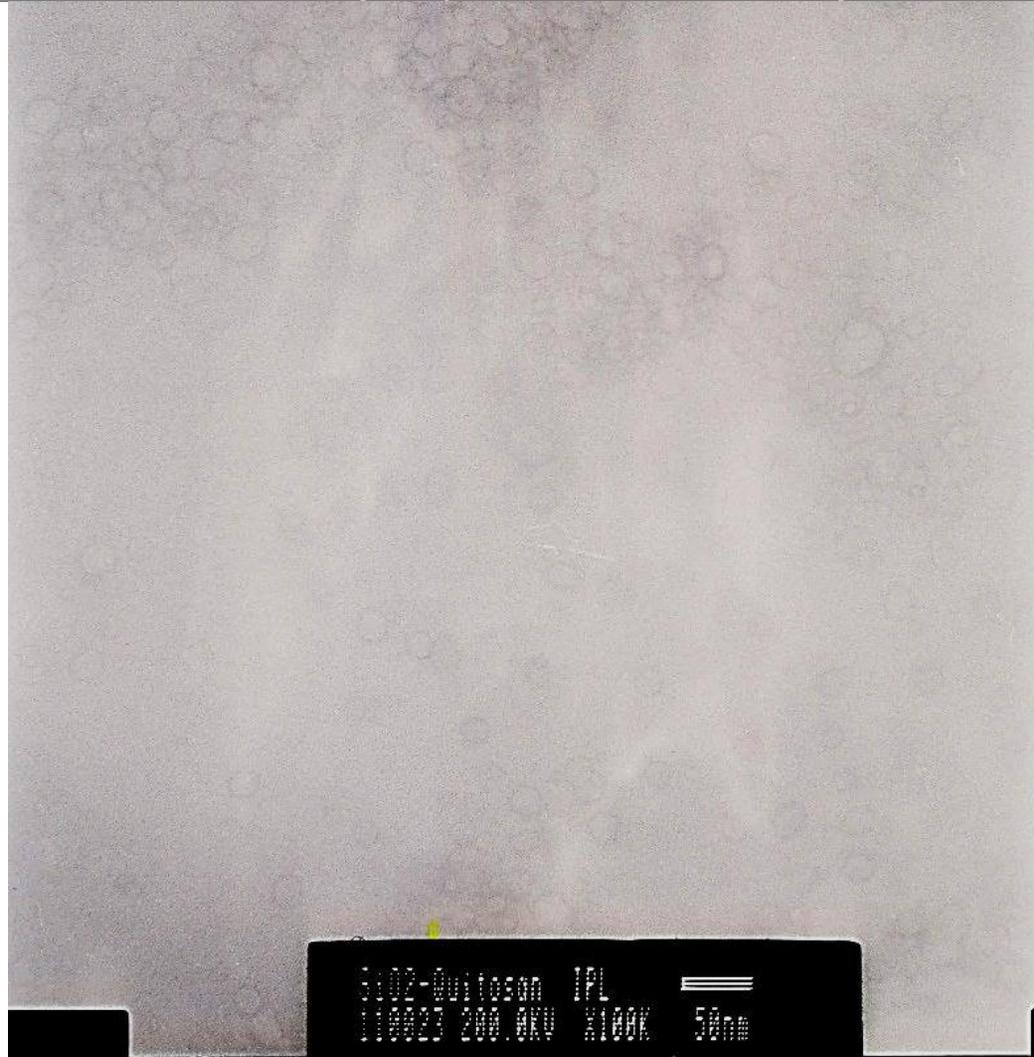


Micrografía del sistema SiO₂. Imagen tomada a 40000X



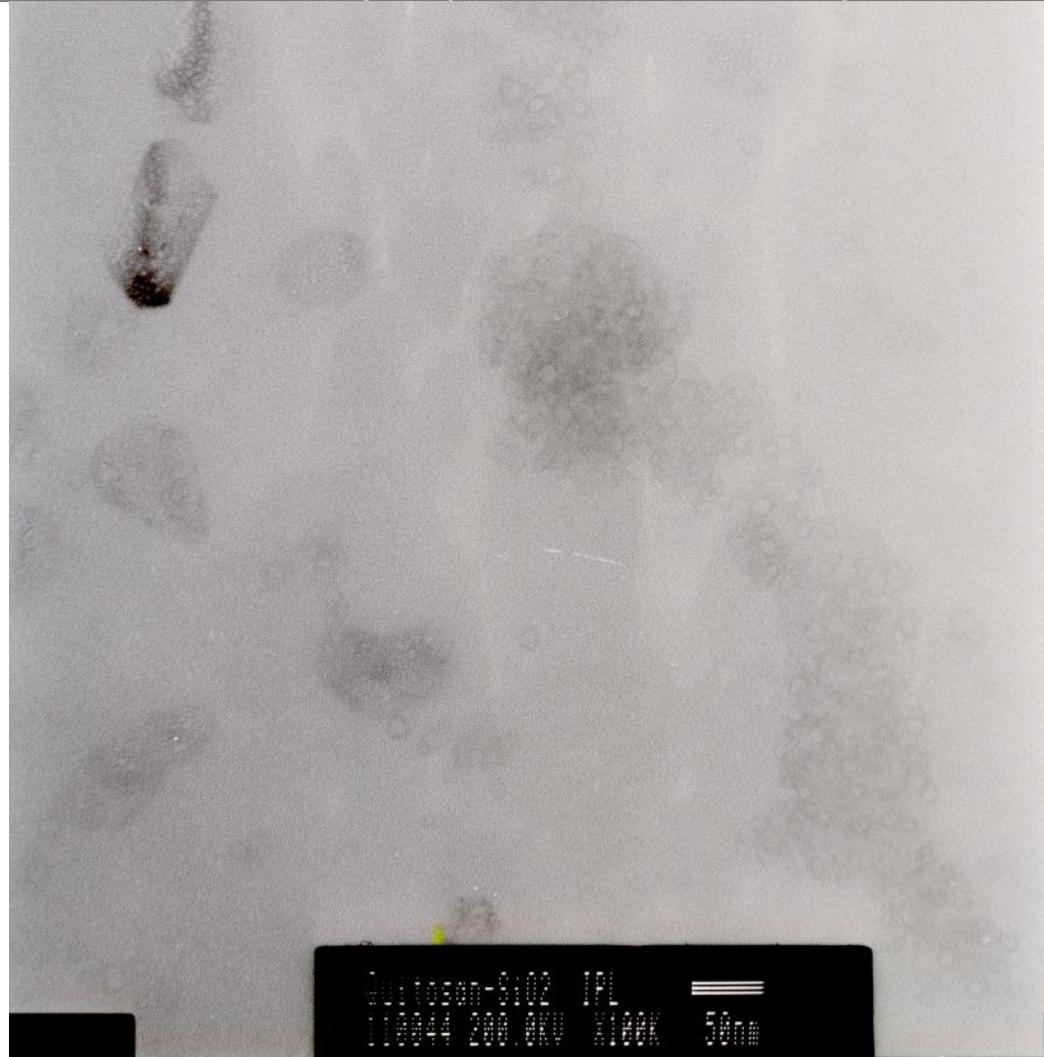
Micrografía del sistema Quitosán. Imagen tomada a 100000X.

Sistema A (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)



Micrografía del Sistema A. Imagen tomada a 100000X

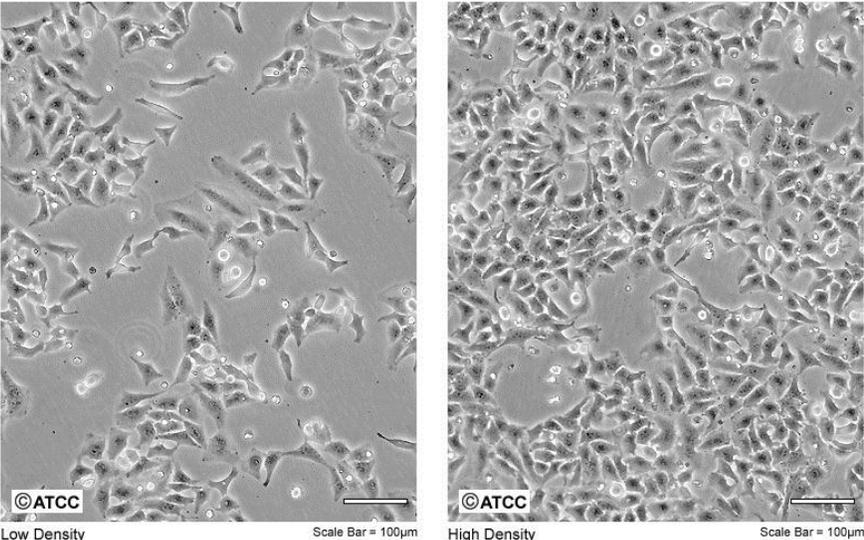
Sistema B (Nanopartículas de Quitosán-SiO₂)



Micrografía del sistema B. Imagen tomada a 100000X

ANEXO B DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS CELULARES

Línea Celular HeLa

| | |
|-----------------------------------|---|
| Designación: | HeLa |
| Propiedades de Crecimiento | adherente |
| Organismo: | <i>Homo sapiens</i> (humano) |
| Origen: | Órgano: cervix Enfermedad: adenocarcinoma Tipo de Célula: epitelial |
| Morfología | <p style="text-align: center;">Epitelial</p> <p>ATCC Number: CCL-2 Designation: HeLa</p>  <p>Low Density Scale Bar = 100µm High Density Scale Bar = 100µm</p> |
| Comentarios | Las células dan positivo para queratina por tinción de inmunoperoxidasa. Se ha reportado que contienen secuencias del virus del papiloma 18 (HPV-18), la expresión de P53 es baja y se reportan niveles de pRB (supresor retinoblastoma). |
| Edad | Adulto 31 Años |
| Género | Femenino |
| Etnicismo | Negro |

| | |
|----------------------|--|
| Propagación: | Para lograr el completo crecimiento adicionar al medio de cultivo suero fetal bovino en una concentración del 10% Atmósfera: Aire 95%, Dióxido de Carbono (CO2) 5% Temperatura: 37.0°C |
| Subcultivo: | <p>Protocolo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Remover y descartar el medio de cultivo. 2. Lavar la capa celular con una solución de tripsina 0.25% (p/v)- EDTA 9.53 mM para remover las trazas de suero el cual contiene inhibidor de tripsina. 3. Agregar de 2.0 a 3.0 ml de la solución de Tripsina-EDTA y observar las células en microscopio invertido hasta observar que la capa celular se haya dispersado (normalmente dentro de 5 a 15 minutos). 4. Agregar de 6.0 a 8.0ml de medio de crecimiento y aspirar las células por pipeteo gentilmente. 5. Adicionar alicuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevas placas de cultivo. 6. Incubar a 37°C. <p>Renovación de Medio : 2 a 3 veces por semana</p> |
| Preservación: | <p>Medio de congelación: Medio de crecimiento suplementado con 5% (v/v) de DMSO</p> <p>Temperatura de almacenamiento: Nitrógeno líquido en fase vapor</p> |
| Referencias: | <ul style="list-style-type: none"> • American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1992. • AOAC International Invasiveness by Escherichia coli of mammalian cells, microbiological method. Gaithersburg, MD:AOAC International;AOAC "Official Methods of Analysis of the AOAC International" 982.36. • Baldi A, et al. Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4629-4632, 1996. PubMed: 8643454 • Gey GO, et al. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res. 12: 264-265, 1952. • Chen TR. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEP-2 karyotypes. Cytogenet. Cell Genet. 48: 19-24, 1988. PubMed: 3180844 • Boshart M, et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J. 3: 1151-1157, 1984. PubMed: 6329740 • Schneider-Gadicke A, Schwarz E. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. EMBO J. 5: 2285-2292, 1986. PubMed: 3023067 • Schwarz E, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature 314: 111-114, 1985. PubMed: 2983228 • Pater MM, Pater A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. Virology 145: 313-318, 1985. PubMed: 2992153 • Yee C, et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. Am. J. Pathol. 119: 361-366, 1985. PubMed: 2990217 |

Linea Celular Vero

| | |
|------------------------------------|---|
| Designación: | VERO 76 |
| Propiedades de crecimiento: | adherente |
| Organismo: | <i>Cercopithecus aethiops</i> |
| Morfología: | epitelial |
| Origen: | Órgano: riñón Enfermedad: normal |
| Aislamiento: | Fecha de aislamiento: 1968 |
| Edad: | Adulto |
| Comentarios: | La línea VERO 76 fue derivada en 1968 por K.M. Johnson. Es un derivado de la original VERO. Cuando se infectan con virus de fiebre hemorrágica [Machupo (Boliviano), Junin (Argentino), Lassa (Africano)], virus de Marburg o Ebola, las células muestran efectos citopáticos. VERO 76 tiene una menor densidad de saturación que la original VERO. |
| Propagación: | Para lograr el completo crecimiento adicionar al medio de cultivo suero fetal bovino en una concentración del 10% Temperatura: 37.0°C |
| Subcultivo: | <ol style="list-style-type: none"> 1. Remover y descartar el medio de cultivo. 2. Lavar la capa celular con una solución de tripsina 0.25% (p/v)- EDTA 0.53 mM. 3. Agregar de 1 a 2 ml de la solución de Tripsina-EDTA y permitir que las células se hayan dispersado. 4. Agregar medio de cultivo y aspirar y dispensar en nuevas placas de cultivo. <p>Renovación de Medio : 2 a 3 veces por semana</p> |
| Preservación: | Medio de congelación: Medio de crecimiento suplementado con 5% (v/v) de DMSO Temperatura de almacenamiento: Nitrógeno líquido en fase vapor |
| Referencias: | <ul style="list-style-type: none"> • Earley EM, Johnson KM The lineage of Vero, Vero 76 and its clone C1008 in the United States/n: Earley EM, Johnson KM Vero cells: origin, properties and biomedical applications Tokyo Chiba Univ.pp. 26-29, 1988 • Policastro PF, et al. Improved plaque assays for Rickettsia prowazekii in Vero76 cells. J. Clin. Microbiol. 34: 1944-1948, 1996. PubMed: 8818887 • Schramm N, et al. Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. Infect. Immun. 64: 1208-1214, 1996. PubMed: 8606080 |