



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE SISTEMAS
NANOPARTICULADOS A BASE DE QUITOSÁN Y
POLIETILCIANOACRILATO (PECA)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

BRENDA CECILIA GASCA ZACARÍAS

ASESORES: Dr. ROBERTO DÍAZ TORRES

Dra. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE SISTEMAS
NANOPARTICULADOS A BASE DE QUITOSÁN Y
POLIETILCIANOACRILATO (PECA)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

BRENDA CECILIA GASCA ZACARÍAS

ASESORES: Dr. ROBERTO DÍAZ TORRES

Dra. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA



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

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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 de la Capacidad Citotóxica de Sistemas Nanoparticulados a Base de Quitosán y Polietilcianoacrilato (PECA)

Que presenta la pasante: Brenda Cecilia Gasca Zacarías

Con número de cuenta: 302319992 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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 7 de septiembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|--------------|---------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | D.A.R. Juan José Díaz Esquivel | |
| VOCAL | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo | |
| SECRETARIO | Dr. Roberto Díaz Torres | |
| 1er SUPLENTE | D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez | |
| 2do SUPLENTE | M.C. Verónica Castro Bear | |

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

HHH/pm

AGRADECIMIENTOS

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste

MARIE CURIE

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me recibió en el glorioso Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Azcapotzalco hace aproximadamente 10 años y a la que le debo respeto y total gratitud.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la cual recibí un sinnúmero de conocimientos, vivencias, sinsabores pero sobre todo porque me brindo la oportunidad de conocer a gente excepcional en la mejor carrera

Al Dr. Roberto que no sólo fue un gran asesor, fue amigo y la guía que todos quisiéramos en nuestra vida profesional. Le agradezco enormemente por el compromiso que siempre mostro a lo largo de este proceso; por compartirnos sus vivencias pues pude darme cuenta que es posible ser el mejor estudiante y mantener una vida como cualquier otro joven y compartirnos un poco de su hermosa familia.

A la Dra. Paty, a quien le tengo gran admiración y respeto. Una mujer quien primero me mostró una actitud seria y reservada y con el tiempo me dio la oportunidad de conocerla tanto en el ámbito profesional como personal. Es una de las mujer que tengo claro como ejemplo a seguir, pude aprender que es posible mantener un equilibrio entre la vida profesional, la vida familiar y la vida personal y con todo ello ser feliz haciendo feliz a los demás.

Al técnico Rodolfo Robles, por haber tomado las micrografías en Microscopía Electrónica de Barrido para el presente trabajo en la FES Cuautitlán, Campo I.

Al ingeniero Iván Puente, por haber tomado las micrografías en Microscopía Electrónica de Transmisión en el Laboratorio de Microscopía, edificio E en Facultad de Química.

A la Dra. Elizabeth García por habernos permitido determinar las pruebas de Tamaño de partícula y Potencial Z en el laboratorio a su cargo en Psicofarma.

Al proyecto PAPIME PE202410 y PAPIIT IN221007 de la DGAPA de la UNAM por apoyar el presente trabajo.

DEDICATORIAS

Alguna vez alguien me dijo que era carrera, no a la carrera... pero por fin puedo decir que he terminado.

Hay muchas personas que participaron en este proceso y la aparición no está relacionada con la importancia, únicamente es la forma en la que fluyen las ideas.

Esta etapa de mi vida no habría sido posible sin mi familia y sin mis hermosas Keyla y Marvel pues sin emitir palabras, me demostraron su cariño y compañía en cada día desde su existencia.

A ti Cynthia Gasca, que siempre has sido mi “pepito grillo” o esa piedra en el zapato (cuando estamos de buenas y de malas), porque la vida no pudo darme a una mejor hermana que tú; eres mi mejor amiga, mi confidente, mi conciencia y la persona con la que puedo reírme por horas. Sin tus palabras, tu aliento y tu impulso nada habría sido igual.

A mi mamá, Julieta Zacarías. Pues toda la vida diciendo que “cuando hagas algo, hazlo bien” y eso no lo olvide en gran parte de la carrera; porque a raspones y a tropezones es como se aprende. Tu apoyo e impulso fueron fundamentales.

A mi papá, Carlos Gasca, quien diría que el lugar en el que crecí marcaría la forma en la que me ganaré la vida. Tu insistencia, tu perfección, tu apoyo y esa insistencia tuya por querer que siempre seamos las mejores, estuvieron presentes en mí todo el tiempo.

A la familia Gasca Porres quienes me brindaron su apoyo en el momento más difícil de mi vida.

A Carlos A. Díaz Barriga G. que desde el momento en el que lo conocí creyó en mí, me dió fuerza para terminar la carrera y el impulso para este trabajo. Gracias amor por cada consejo, abrazo, palabra de aliento, por tu tiempo, tu paciencia y tu gran inteligencia; por ser la persona de la que siempre he tenido su apoyo moral. Porque juntos hemos pasado por muchas facetas, momentos difíciles y grandes vivencias. Tú eres mi motor día a día, este trabajo también es tuyo. TE AMO

A Janet Loredó; pues pasamos juntas momentos inolvidables, aprendizajes invaluable. Porque sin ti nenita, habría sido muy complicado seguir. Gracias por brindarme tu amistad por estos años, por ser la mejor en mis equipos y mi cómplice en muchas travesuras. Sabes que tienes mi admiración pues ser madre, hija y una dedicada estudiante no es fácil y eso siempre me impulsó a hacer las cosas lo mejor posible.

A Daniel Castro, Esteban Camacho, Luis Rodríguez, Antonio Hernández, Ludwig García, Juan Ovando, Alberto Vega, Iván Alcántara, Siddhartha Rodríguez y Lilia Silva. Empezamos juntos este camino y la vida nos ha llevado por diferentes caminos.

A Nallely Ruiz, Norma Calzoncít y Linda Pastrana. Gracias por estar conmigo en todo momento. Con ustedes sé que no hay distancia o tiempo que separe una amistad como la nuestra. Las quiero

A cada una de las personas con las que conviví y conocí dentro y fuera de la carrera a lo largo de esta historia.



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. OBJETIVOS | 10 |
| 1.1 Objetivo General | 10 |
| 1.2 Objetivos Particulares | 10 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 11 |
| 2.1 Definición de las Nanopartículas | 11 |
| 2.2 Historia | 13 |
| 2.3 Métodos de Fabricación de Nanopartículas | 14 |
| 2.3.1 Método Basado en las Propiedades Físicoquímicas de los Polímeros en Solución | 14 |
| 2.3.2 Método Derivado de las Técnicas de Microencapsulación | 16 |
| 3. CARACTERIZACIÓN | 21 |
| 3.1 Tamaño de Partícula | 21 |
| 3.1.1 DLS o Espectroscopia de Correlación de Fotones | 21 |
| 3.1.2 Dispersión de la Luz..... | 21 |
| 3.1.3 Dispersión de Luz Láser..... | 22 |
| 3.2 Potencial Z | 22 |
| 3.2.1 Modelo de la Doble Capa..... | 23 |
| 3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) | 24 |
| 3.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) | 25 |
| 4. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO) (PECA) | 25 |
| 5. NANOTOXICOLOGÍA | 26 |
| 1.1 Biomarcadores de Exposición | 26 |
| 1.2 Biomarcadores de Efecto | 27 |
| 1.3 Biomarcadores de Susceptibilidad | 27 |
| 6. ASPECTOS ÉTICOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS | 29 |
| 7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA | 30 |
| 7.1 Ensayos de Citotoxicidad Celular | 31 |
| 7.1.1 Ensayo de Reducción del MTT | 33 |
| 7.1.2 Ensayo Cuantificación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico | 33 |
| 7.1.3 Ensayo de la Proliferación Celular | 35 |
| 7.2 Cultivo Celular | 37 |
| 8. ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS | 38 |
| 9. JUSTIFICACION | 40 |
| 10. METODOLOGÍA | 41 |
| 10.1 Materiales Y Métodos..... | 41 |
| 10.1.1 Materiales..... | 41 |
| 10.1.2 Soluciones | 42 |
| 10.1.3 Equipos..... | 43 |
| 10.1.4 Modelos Experimentales | 43 |
| 10.2 Métodos | 43 |
| 10.2.1 Preparación de nanopartículas | 43 |
| 10.2.2 Acondicionamiento de las Nanopartículas para la caracterización | 44 |
| 10.2.3 Acondicionamiento de las Nanopartículas para los cultivos celulares..... | 45 |
| 10.2.4 Mantenimiento de los cultivos celulares | 45 |
| 10.2.5 Ensayo de Viabilidad Celular por MTT | 45 |
| 10.2.6 Ensayo de lipoperoxidación..... | 46 |
| 10.2.7 Ensayo de proliferación celular | 48 |



| | | |
|------------|---|-----------|
| 10.3 | Análisis estadístico | 49 |
| 11. | RESULTADOS | 50 |
| 11.1 | Caracterización | 50 |
| 11.1.1 | Tamaño de Partícula..... | 50 |
| 11.1.2 | Potencial Z..... | 51 |
| 11.1.3 | Microscopía Electrónica De Barrido (Sem) | 52 |
| 11.1.4 | Microscopía Electrónica De Transmisión (Tem) | 54 |
| 11.2 | Evaluaciones Citotoxicológicas | 55 |
| 11.2.1 | Viabilidad Celular | 55 |
| 11.2.2 | Especies Reactivas De Oxígeno: TBARS | 57 |
| 11.3 | Proliferación de Linfocitos..... | 59 |
| 12. | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 61 |
| 12.1 | Caracterización de Nanopartículas | 61 |
| 12.2 | Evaluación de la Capacidad Citotóxica de Nanopartículas | 63 |
| 12.2.1 | Viabilidad | 63 |
| 12.2.2 | TBARS | 63 |
| 12.2.3 | Proliferación Celular | 64 |
| 13. | CONCLUSIONES | 66 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 67 |
| | ANEXO I. Gráficos obtenidos de la Caracterización del Tamaño de Partícula y Potencial Z..... | 70 |
| | ANEXO II. Ciclo celular y Mutaciones..... | 73 |
| | ANEXO III. Propiedades de los Materiales..... | 82 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1. | Escala aproximada que relaciona el tamaño de diferentes estructuras con respecto a las nanopartículas | 11 |
| Figura 2. | Estructura de una nanoesfera | 12 |
| Figura 3. | Estructura de una nanocápsula..... | 12 |
| Figura 4. | Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por <i>Salting-Out</i> | 15 |
| Figura 5. | Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en una fase orgánica continua..... | 17 |
| Figura 6. | Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en una fase acuosa..... | 17 |
| Figura 7. | Representación esquemática de los posibles mecanismos de polimerización del monómero alquilcianoacrilato aniónico (a), anfótero (b) y radical libre (c) iniciado por una base (B ⁻), un nucleófilo (Nu) y un radical (P*), respectivamente..... | 18 |
| Figura 8. | Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación/evaporación..... | 19 |
| Figura 9. | Resumen de los diferentes métodos de preparación de nanoesferas y nanocápsulas de un polímero. O/W: aceite en agua; W/O: agua en aceite; W/O/W: agua en aceite en agua | 20 |



| | |
|---|----|
| Figura 10. Gráfico que relaciona los valores del potencial Z a diferentes ph estableciendo los puntos de estabilidad física en la solución..... | 23 |
| Figura 11. Esquema de una partícula y sus capas eléctricas..... | 23 |
| Figura 12. Diagrama de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) convencional | 24 |
| Figura 13. Diagrama de un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) convencional | 25 |
| Figura 14. Relación paralela entre el diseño del material y pruebas al material (Nanotecnología y Nanotoxicología) | 30 |
| Figura 15. Reducción Metabólica del MTT a sales de Formazán por células viables..... | 33 |
| Figura 16. Esquema que muestra el efecto que producen las ROS sobre lípidos de membrana en el ensayo de TBARS formando un aducto con MDA | 35 |
| Figura 17. Núcleos proliferantes* | 37 |
| Figura 18. Primera metafase (M1)* | 37 |
| Figura 19. Segunda metafase (M2)*..... | 37 |
| Figura 20. Tercera metafase (M3)* | 37 |
| Figura 21. Una línea celular se origina a partir de un cultivo primario en el primer subcultivo exitoso. | 38 |
| Figura 22. Micrografía de las nanopartículas de PECA en la formulación inicial (20,000X) | 52 |
| Figura 23. Micrografía de las nanopartículas de PECA en la formulación final (20,000X)..... | 52 |
| Figura 24. Micrografía de las nanopartículas de Quitosán en la formulación inicial (30,000X) | 52 |
| Figura 25. Micrografía de las nanopartículas de Quitosán en la formulación final (30,000X)..... | 52 |
| Figura 26. Micrografía de las nanopartícula del Sistema 1 (Quitosán y PECA) en la formulación inicial (30,000X) | 53 |
| Figura 27. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 1(Quitosán y PECA) en la formulación final | 53 |
| Figura 28. Micrografía de las nanopartícula del Sistema 2 (PECA y Quitosán) en la formulación inicial | 53 |
| Figura 29. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 2 (PECA y Quitosán) en la formulación final | 53 |
| Figura 30. Micrografía de las nanopartículas del Sistema Control PECA | 54 |
| Figura 31. Micrografía de las nanopartículas del Sistema Control Quitosán | 54 |
| Figura 32. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 1 (Quitosán-PECA) | 54 |
| Figura 33. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 2 (PECA-Quitosán) | 54 |
| Figura 34. Célula trinucleada con micronúcleo..... | 60 |
| Figura 35. Célula binucleada..... | 60 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ensayos para evaluar el grado patogénico y potencial de los nanomateriales | 32 |
| Tabla 2. Propuesta para evaluar el peligro de la salud humana. | 39 |
| Tabla 3. Resumen de caracterización fisicoquímica de las nanopartículas fabricadas a las condiciones antes descritas | 55 |



ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Comparación del diámetro promedio de los sistemas nanoparticulados sin filtrar y filtrado | 50 |
| Gráfico 2. Índice de polidispersidad (Pld) de los sistemas nanoparticulados. Resultados de los sistemas sin filtrar y filtrados | 51 |
| Gráfico 3. Potencial Z de los sistemas nanoparticulados con pH ácido (alrededor de 2.54) y pH cercano a la neutralidad..... | 51 |
| Gráfico 4. Porcentaje de viabilidad de células Vero expuestas a las nanopartículas comparadas con el control negativo el cual se considera al 100% de viabilidad. | 55 |
| Gráfico 5. Porcentaje de viabilidad de células Hela expuestas a las nanopartículas comparadas con el control negativo, el cual se considera el 100% de viabilidad. | 56 |
| Gráfico 6. Comparación del porcentaje de viabilidad entre las líneas celulares probadas al exponerlas con las nanopartículas | 56 |
| Gráfico 7. Curva de calibración para cuantificar las especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) usando como Stock Malondialdehído (MDA) a 3 mM. | 57 |
| Gráfico 8. Curva de Calibración para cuantificar proteínas usando como Stock Albúmina Sérica Bovina a 0.22 mg/ml. | 57 |
| Gráfico 9. Cantidades TBARS expresadas en mM por mg de proteínas totales en células Vero expuestas a las nanopartículas | 58 |
| Gráfico 10. Cantidades de TBARS en mM por mg de proteínas totales en células Hela expuestas a las nanopartículas. | 58 |
| Gráfico 11. Comparación de la cuantificación de TBARS obtenidas entre las líneas celulares probadas al exponerlas con las nanopartículas | 58 |
| Gráfico 12. Índice mitótico de los linfocitos expuestos a las nanopartículas | 59 |
| Gráfico 13. Índice de proliferación celular en linfocitos expuestos a las nanopartículas..... | 60 |
| Gráfico 14. Porcentaje obtenido de Primeras (M1), Segundas (M2) y Terceras o subsecuentes (M3) metafases al conteo total de las 100 mitosis consecutivas..... | 59 |





1. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad citotóxica de sistemas nanoparticulados fabricados a base de Quitosán y Polietilcianoacrilato (PECA).

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaborar sistemas nanoparticulados a base de Quitosán y Polietilcianoacrilato (PECA) bajo condiciones de proceso específicas.
- Caracterizar los sistemas fabricados por Potencial Z, tamaño de partícula por la técnica de Dispersión Dinámica de la Luz (DSL) y la morfología, mediante las Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM).
- Evaluar la capacidad citotóxica a los sistemas descritos por medio de los ensayos: Viabilidad celular (MTT), Generación de especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS); ambas en dos líneas celulares y Ensayo Cinética de Proliferación celular e Índice Mitótico en cultivos de linfocitos humanos.
- Realizar el análisis estadístico a los resultados obtenidos para interpretar y evaluar la existencia de diferencias significativas entre sí a cada ensayo.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son definidas como dispersiones particuladas o partículas sólidas con un tamaño en el rango de 10–1000 nm generalmente constituidos por polímeros sintéticos o naturales. Para su aplicación, el fármaco es disuelto, atrapado, encapsulado o atraído a la matriz de la nanopartículas, así que dependiendo del método de preparación, pueden ser obtenidas nanopartículas, nanoesferas o nanocápsulas.

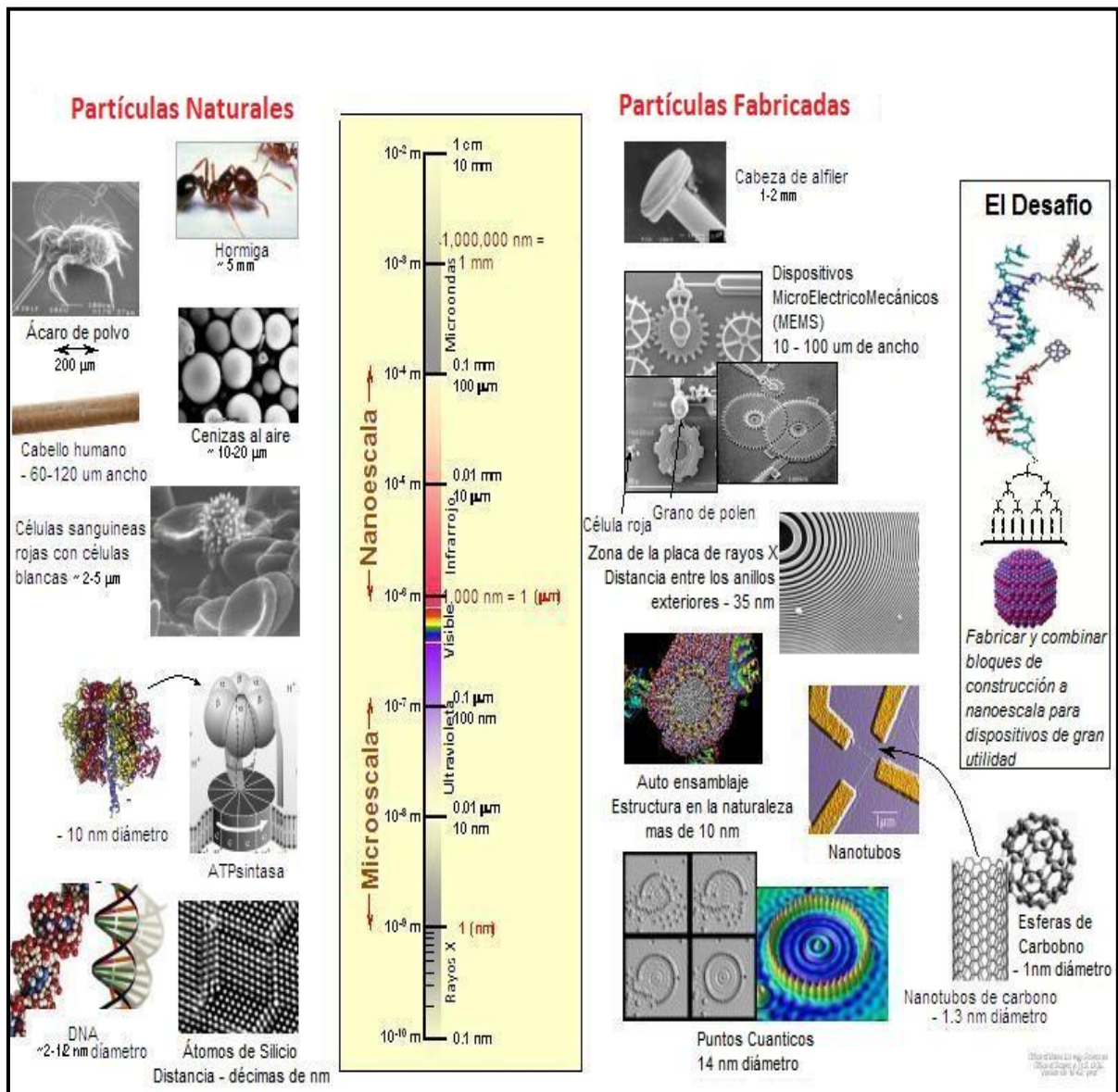


Figura 1. Escala aproximada que relaciona el tamaño de diferentes estructuras con respecto a las nanopartículas (<http://orise.orau.gov/iros/images/scaleOfThings.jpg>).



2. MARCO TEÓRICO

Las nanoesferas son sistemas matriciales en los que el fármaco se dispersa completamente en la partícula o se adsorbe en la superficie.

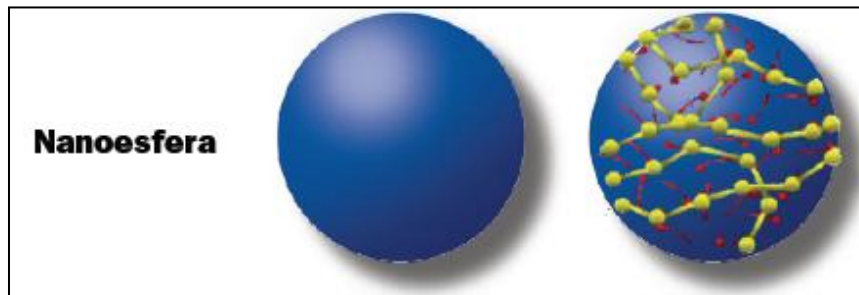


Figura 2. Estructura de una nanoesfera (Manuel L., 2008)

Las nanocápsulas son sistemas en las cuales el fármaco es confinado a una cavidad envuelta por una única capa de polímero (Chavez Monroy, 2002).



Figura 3 Estructura de una nanocápsula (Manuel L., 2008)

Dentro de los mayores logros en el diseño de nanopartículas como un sistema de liberación se identifican el control del tamaño de partícula, las propiedades superficiales y la relación farmacológica de los agentes activos en el sitio específico de acción del fármaco en el rango óptimo terapéutico y régimen de dosificación

Las ventajas del uso de nanopartículas como un sistema de liberación de fármaco incluyen lo siguiente:

1. El tamaño de partícula y las características superficiales de las nanopartículas pueden ser fácilmente manipuladas para la activación tanto pasiva como activa en la entrega del fármaco después de su administración parenteral.
2. El control y relación de la duración en el transporte del fármaco y en el sitio de localización, alterando la distribución orgánica del fármaco y en consecuencia en la depuración del fármaco así como en el incremento activo en la eficacia terapéutica del fármaco y la reducción de efectos secundarios.



3. La liberación controlada y las características de degradación pueden ser realmente moduladas por la elección de los constituyentes de la matriz.
4. El sitio específico de entrega puede ser logrado por la adhesión de ligandos a la superficie de las partículas.
5. Los sistemas pueden ser usados por varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc. (Mohanraj & Y Chen, June 2006)

2.2 HISTORIA

Aunque las nanopartículas se consideran en general un invento de la ciencia moderna, en realidad tienen una historia muy larga. Las nanopartículas fueron utilizadas por los artesanos en el 9 a. de C. de Mesopotamia para generar un efecto brillante en la superficie de las ollas.

Estas nanopartículas fueron creadas por los artesanos mediante la adición de sales de cobre, plata y óxidos junto con vinagre, ocre y arcilla, en la superficie de la cerámica vidriada con anterioridad. El objeto fue colocado entonces en un horno a 600° C, en una atmósfera reductora (Creative Commons Attribution–ShareAlike License).

Las primeras nanopartículas transportadoras de fármacos estaban constituidas por gelatina y albúmina; sin embargo, el uso de proteínas puede estimular el sistema inmune y presentarse problemas de antigenicidad y toxicidad. Para disminuir estos efectos se desarrollaron las nanopartículas de polímeros sintéticos. Los primeros utilizados, propuestos por Speiser y Birrenbach en 1976, fueron los de poliacrilamida, que se elaboraron a partir de monómeros de acrilamida y de metacrilato por el método de polimerización en emulsión.

El primer reporte de nanoesferas con aplicaciones farmacéuticas fue realizado por Birrenbach y col. (1976), conteniendo diversos trazadores o sustancias activas como IgG marcada con Yodo, toxoide tetánico y ureasa, utilizando un método de polimerización acrilaminada y N–N'–metilen bisacrilamida en una emulsión inversa (w/o). Este método requirió: 1) grandes cantidades de disolventes orgánicos (Hexano, Tolueno o Cloroformo) como fase externa; 2) tensoactivo aniónicos como bis (2–etil hexil) sulfocinato de sodio para producir la microemulsión y finalmente 3) un iniciador de polimerización (químico o físico).

Respecto a las nanocápsulas, Al Khouri Fallouh y col. presentaron en 1986 una técnica de polimerización interfacial con monómeros de alquilcianoacrilatos, con el objetivo de atrapar fármacos lipofílicos que no habían podido ser utilizados en nanoesferas de polialquilcianoacrilatos. En esta técnica, los monómeros de alquilcianoacrilato y el fármaco son disueltos en una fase constituida por etanol conteniendo un aceite, una mezcla de fosfolípidos o bencilbenzoato; dicha fase es inyectada dentro de agua que contiene tensoactivo de tipo no iónico bajo agitación magnética. La dispersión de la fase orgánica en la acuosa ocurre simultáneamente, produciéndose tanto la difusión del etanol en la fase externa como la



2. MARCO TEÓRICO

polimerización del monómero en la interface agua-aceite. Posteriormente, la suspensión de nanocápsulas es concentrada bajo presión reducida. En esta técnica el polímero esencialmente utilizado es isobutilcianoacrilato (IBCA) (Chavez Monroy, 2002).

2.3 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos en la fabricación de nanopartículas como: emulsión-difusión, doble emulsión, *Salting Out*, fluido supercrítico y evaporación del disolvente, entre otros (Martínez Pérez, 2010).

Todos los métodos de fabricación pueden ser clasificados dentro de dos grupos: a) dependiendo de si las nanopartículas son formadas al mismo tiempo que el polímero requiere para sí mismo una reacción de polimerización, o b) es directamente obtenida del polímero.

Algunas nanoesferas se preparan mediante un proceso de emulsión/polimerización, en el que gotas de monómero insoluble en agua se emulsionan en una fase acuosa. El pH del medio determina la velocidad de polimerización y la adsorción de fármaco cuando este último es ionizable. El tamaño de las partículas es de 200 nm aproximadamente, pero puede reducirse a 30 a 40 nm.

Las nanocápsulas de ciertos materiales son obtenidas por polimerización preformada interfacial en emulsión o microemulsión. La preparación consiste en la solubilización del monómero en una fase alcohólica que contiene un aceite, para luego realizar una dispersión en una fase acuosa que contenga el tensoactivo. En contacto con el agua, la fase alcohólica difunde y favorece la formación de una emulsión o/w muy fina. El monómero, insoluble en agua, polimeriza en la zona interfacial, formando un muro polimérico (Couvreur, Dubernet, & Puisieux, 1995).

2.3.1 MÉTODO BASADO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS POLÍMEROS EN SOLUCIÓN

2.3.1.1 MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN

En el método de polimerización, el monómero es polimerizado para formar nanopartículas en una solución acuosa. El fármaco es incorporado tanto por una disolución en el medio de polimerización o por adsorción las nanopartículas después de ser completada la polimerización. La suspensión de nanopartículas es entonces purificada para remover varios estabilizadores y tensoactivos empleados para la polimerización por ultracentrifugación y resuspendiendo las partículas en un medio isotónico libre de tensoactivos. La formación de las nanocápsulas así como su tamaño dependen de la concentración de los tensoactivos y estabilizantes usados (Mohanraj & Y Chen, June 2006).



La mayoría de los autores han empleado el método de polimerización en emulsión para la síntesis de esferas coloidales de poli(etil-2-cianoacrilato). La técnica implica la polimerización del monómero en una solución acuosa (de P.A. en la mayoría de los casos).

2.3.1.2 POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN EN UNA FASE ORGÁNICA CONTINUA

La polimerización en emulsión en una fase orgánica continua es uno de los primeros procesos para la producción de nanopartículas. En este proceso la fase es reversa y se emplean monómeros muy solubles en agua. Inicialmente la acrilamida y el N, N'-diacrilamida son usados como monómeros. El monómero es solubilizado por tensoactivos. La iniciación de la polimerización puede llevarse a cabo químicamente usando N, N, N', N'-tetrametil endiamina y peroxodisulfato de potasio como iniciadores, por radiaciones gama o UV (De la Cruz Medina, 2010).

2.3.1.3 SALTING-OUT

Este método se basa en la separación de un disolvente miscible con agua de una disolución acuosa mediante efecto de *Salting-Out*. En esta técnica no pueden ser utilizados disolventes clorados, ya que puede existir alguna competencia entre los iones. Mediante esta técnica se obtiene una emulsión agua en aceite (w/o). La fase oleosa de la emulsión está compuesta por el polímero y el activo, los cuales están disueltos en acetona (ya que se conoce muy bien su comportamiento) y la fase acuosa contiene acetato de magnesio tetrahidratado (electrolito) y un estabilizante coloidal. Posteriormente se agrega agua hasta tener un volumen suficiente en el cual se permita la difusión de la acetona en la fase acuosa y se formen las nanopartículas. Esta suspensión puede ser separada por filtración o liofilización (De la Cruz Medina, 2010).

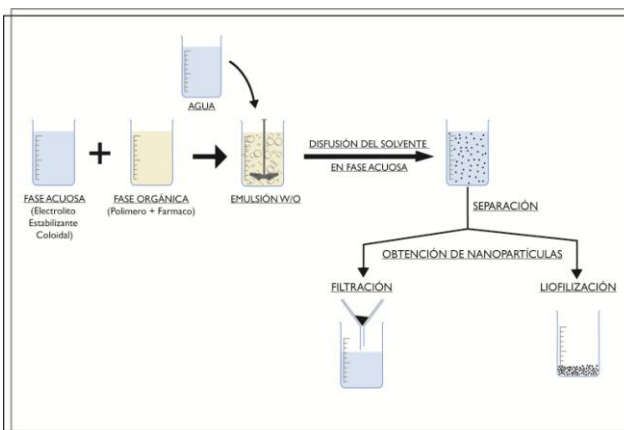


Figura 4. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método Salting-Out.



2. MARCO TEÓRICO

COACERVACIÓN O GELACIÓN IÓNICA

El método de coacervación o gelación iónica involucra una mezcla de dos fases acuosas, una es el polímero y la otra es un polianión. Un ejemplo es el caso del Quitosán; el grupo aminoestá cargado positivamente e interactúa con las cargas negativas del Tripolifosfato para formar coacervados con un tamaño en el rango de nanómetros. Los coacervados son formados como resultado de la interacción electrostática entre las dos fases acuosas, mientras que la gelación iónica envuelve el material sufriendo una transición del líquido a gel debido a la interacción iónica de las condiciones a temperatura ambiente (Mohanraj & Y Chen, June 2006).

2.3.2 MÉTODO DERIVADO DE LAS TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN

2.3.2.1 POLIMERIZACIÓN/EMULSIFICACIÓN

El principio de la nanoemulsión está basado en la emulsificación espontánea que ocurre o mezcla una fase orgánica y una fase acuosa. La fase orgánica es una solución homogénea oleosa, tensoactivo lipofílico y disolvente miscible en agua; en cuanto a la fase acuosa, consiste en un tensoactivo hidrofílico y agua. Este método puede ser descrito como la disolución hidrofóbica de sustancias en disolvente orgánico el cual posteriormente es emulsificado con una solución acuosa (Sishmitha, Joydip, & Subhas, 2010).

La polimerización/emulsificación es uno de los métodos más rápidos para la preparación de nanopartículas y es fácilmente escalable. El método es clasificado en dos categorías, basadas en el uso de una fase continua orgánica o acuosa.

2.3.2.2 POLIMERIZACIÓN-EMULSIÓN EN FASE ORGÁNICA

La metodología de una fase continua orgánica involucra la dispersión del monómero dentro del material en el cual éste no es soluble (no disolvente). En uno de los primeros métodos de producción de nanopartículas, tensoactivos o polímeros protectores solubles eran usados para prevenir agregación en cada estado de polimerización. Este procedimiento se ha hecho menos importante, porque esto requiere disolventes orgánicos tóxicos, tensoactivos, monómeros e iniciadores que son subsecuentemente eliminadas por la formación de partículas. Como resultado de la naturaleza no biodegradable de estos polímeros así como el difícil procedimiento, algunos procesos alternativos son de mayor interés hoy en día.

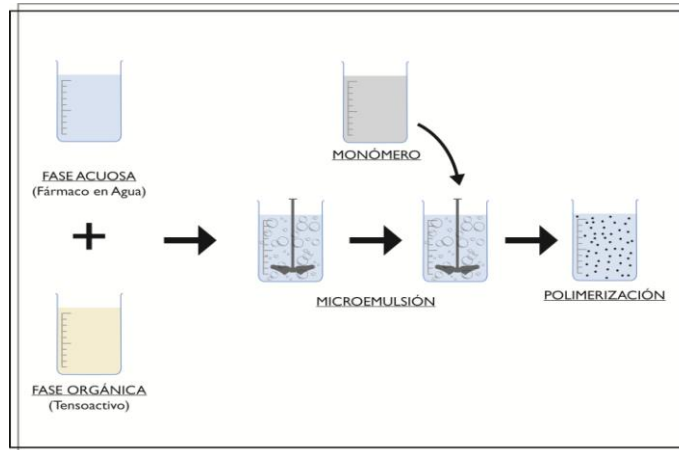


Figura 5. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de Polimerización en una fase orgánica continua.

2.3.2.2 POLIMERIZACIÓN-EMULSIÓN EN FASE ACUOSA

En este método de preparación de nanopartículas, el monómero es disuelto en una fase continua que es usualmente una solución acuosa, y el tensoactivo o emulsificante no es necesario. El proceso de polimerización puede ser iniciado por diferentes mecanismos. La iniciación ocurre cuando una molécula de monómero es disuelta en la fase continua coloidal con una molécula iniciadora que podría ser un ion o un radical libre. Alternativo, la molécula de monómero puede ser transformada dentro de un radical iniciador por radiación de alta energía, incluyendo radiación *Gamma*, ultravioleta o luz fuerte visible. El inicio del crecimiento de cadenas se da cuando el monómero iniciador iónico reacciona con otra molécula de monómero por medio de un mecanismo de polimerización aniónica. La separación de fases y formación de partículas sólidas pueden tomar lugar antes o después de terminar la reacción de polimerización (Pinto & Ronald, 2005).

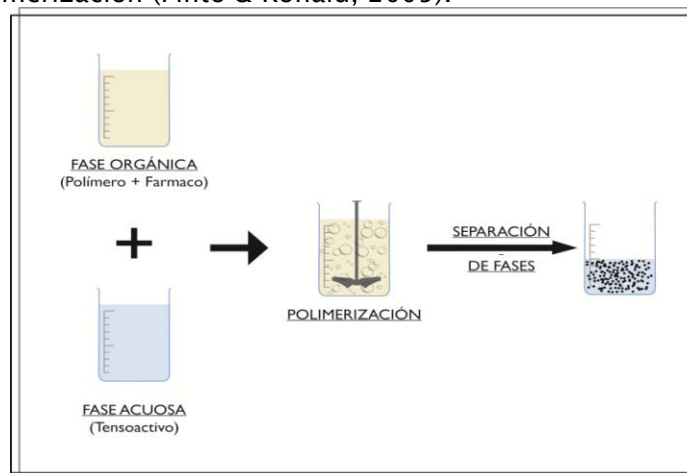


Figura 6. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en una fase acuosa.



2.3.2.2.1 Mecanismo de Polimerización de Radical Libre

Está determinado por una alta energía de activación ($125 < \text{kJ/mol}$). Se trata de una polimerización lenta, cuya velocidad de reacción depende fuertemente de la temperatura y de cantidad de radicales libres.

2.3.2.2.2 Mecanismo de Polimerización Aniónica/Anfótera

Tiene mayor interés por ser más rápido y fácil de realizar, además de ser apropiado para las aplicaciones biomédicas. Incluso bases muy débiles como los iones OH^- derivados de la disociación del agua son capaces de iniciarla. Los iniciadores clásicos son compuestos iónicos (I^- , CH_3COO^- , Br^- , OH^- , etc.) pero también compuestos nucleofílicos pueden iniciarla (bases terciarias: piridina, fosfina). Presumiblemente estos generan *zwitteriones* (ion híbrido con carga negativa y positiva), más que especies iónicas cargadas capaces de realizar una propagación aniónica. En este caso, los iones de OH^- de la disociación del agua son los encargados de actuar como iniciadores de la reacción de polimerización (Arias Mediano, 2003).

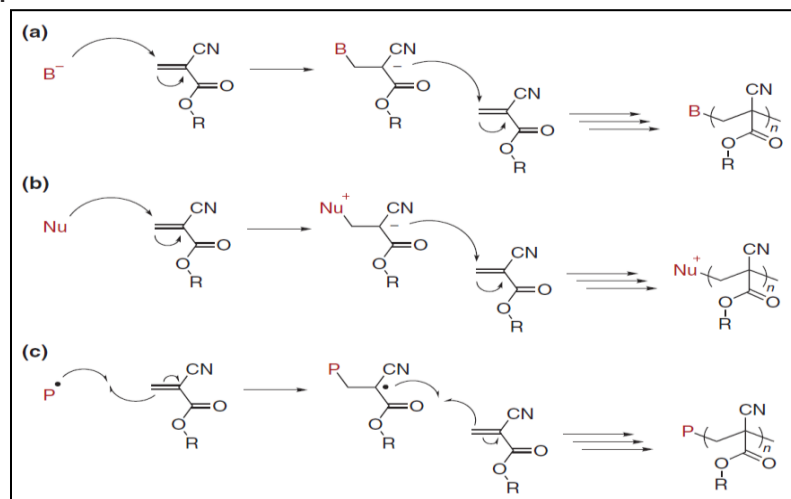


Figura 7. Representación esquemática de los posibles mecanismos de polimerización del monómero alquilcianoacrilato aniónico (a), anfótero (b) y radical libre (c) iniciado por una base (B^-), un nucleófilo (Nu^+) y un radical (P^*), respectivamente.

2.3.2.3 EVAPORACIÓN DE DISOLVENTE

El método de evaporación de disolvente involucra la disolución de un fármaco y polímero dentro de un disolvente orgánico. Esta solución se emulsiona en un no disolvente para formar una microemulsión. Con el tiempo y con la ayuda de vacío, en algunos casos el disolvente orgánico será evaporado causando supersaturación en



nanogotas y precipitación del polímero y fármaco en nanopartículas. Este método crea nanopartículas con alto carga de fármaco eficientemente aunque esto es limitado por los fármacos que son solubles en el mismo disolvente que el polímero (Williams III & Vaughn, 2007).

2.3.2.4 POLIMERIZACIÓN POR DOBLE O MÚLTIPLE EMULSIÓN

Con este método se ha hecho posible la encapsulación de compuestos hidrófilos. En primer lugar, un fármaco hidrófilo y un tensoactivo se disuelven en agua. La emulsión primaria es preparada por la dispersión de la fase acuosa en un disolvente orgánico que contiene un polímero disuelto. Se trata entonces de una re-emulsificación con una nueva fase acuosa que contiene también tensoactivo. Luego, el procedimiento de eliminación de disolvente y recolección de las nanopartículas es similar a la emulsión simple.

2.3.2.5 DIFUSIÓN DE DISOLVENTE O EMULSIFICACIÓN ESPONTÁNEA

La difusión de disolvente o proceso de emulsificación espontánea puede crear gotas de menor tamaño que el método de evaporación de disolvente. En este caso, la fase dispersada está compuesta de un disolvente inmiscible y uno miscible al agua, el cual es emulsionado dentro de una solución acuosa. La difusión del disolvente miscible en agua causa turbulencia y mayor ruptura de las gotas en la emulsión.

Aunque los disolventes inmiscibles en agua muestran baja solubilidad, hay alguna cantidad de solubilizarse. En esta técnica, el fármaco y el polímero son disueltos en un disolvente orgánico, el disolvente inmiscible en agua que es emulsificado dentro de una solución acuosa que contiene emulsificadores y estabilizantes. La emulsión es entonces diluida con agua para incrementar el nivel del disolvente orgánico, el cual puede ser disuelto en la fase continua. Esto causa la disminución en el contenido del disolvente orgánico dentro de la fase dispersada, la cual conduce a la precipitación del polímero y el fármaco para formar las nanopartículas (Williams III & Vaughn, 2007).

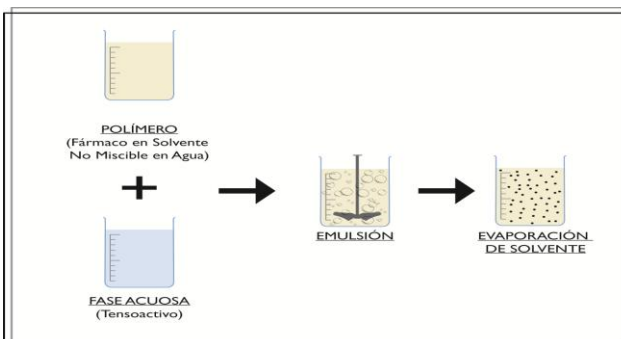


Figura 8. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación/evaporación

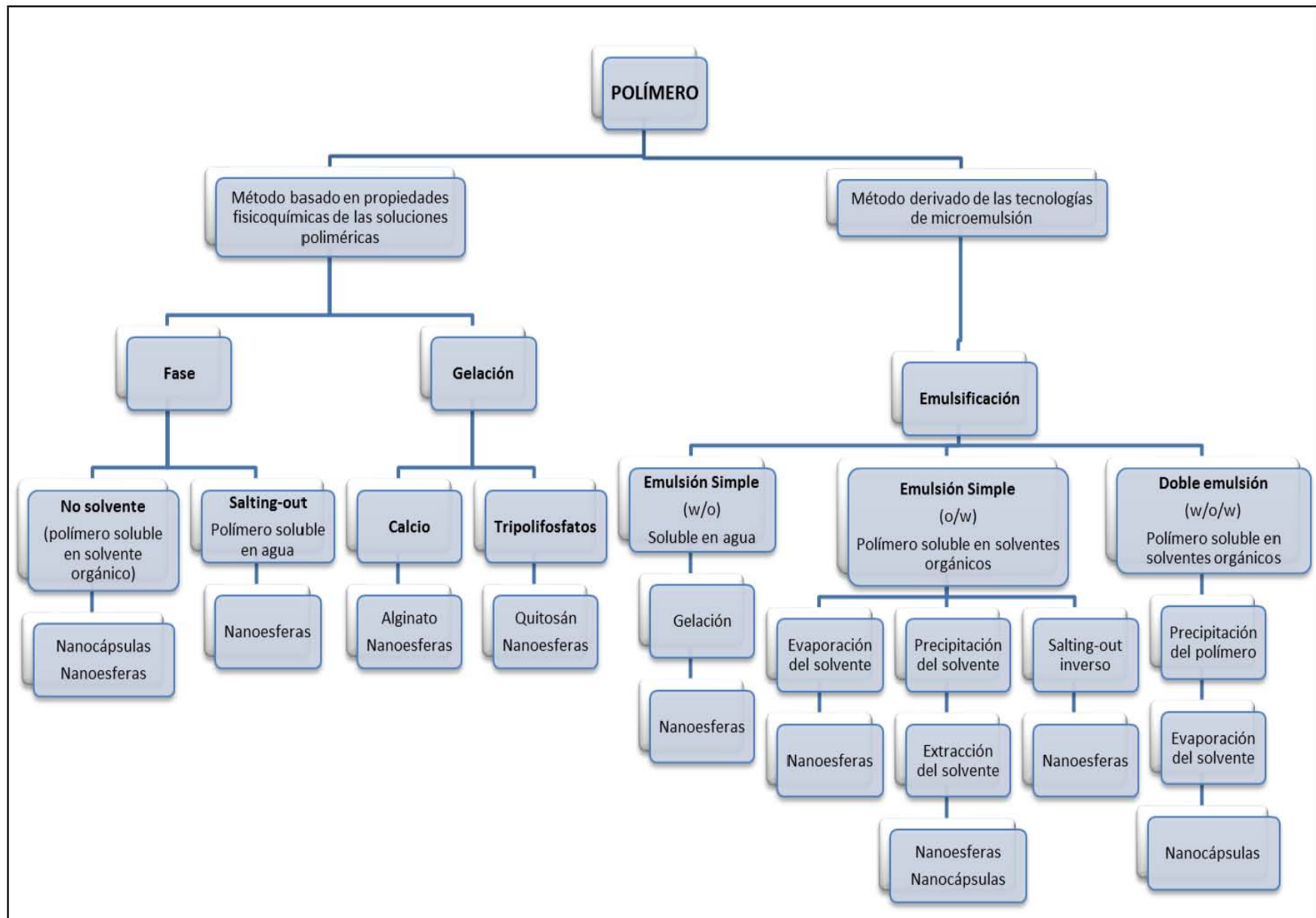


Figura 9. Resumen de los diferentes métodos de preparación de nanoesferas y nanocápsulas de un polímero. O/W: aceite en agua; W/O: agua en aceite; W/O/W: agua en aceite en agua (Fattal&Vauthier, 20023).



3. CARACTERIZACIÓN

La nanometrología es la ciencia que mide a nanoescala y esta aplicación es la base tanto de toda la nanociencia como de la nanotecnología. La habilidad para medir y caracterizar materiales, así como determinar su tamaño, forma y propiedades físicas a nanoescala es vital para los nanomateriales y dispositivos. Estos deben ser producidos con un alto grado de precisión y fiabilidad, para realizar las aplicaciones de las nanotecnologías. La nanometrología incluye longitud y/o el tamaño (donde las dimensiones son normalmente en nanómetros), así como la medición de la fuerza, masa, carga eléctrica y otras propiedades (Thassu, Deleers, & Pathak, 2007).

3.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño son las características más importantes de los sistemas nanoparticulados. Ellas determinan la distribución *in vitro*, destino biológico, toxicidad y la habilidad de entrega de los sistemas nanoparticulados. Así, estas pueden también influenciar la carga del fármaco, la liberación del fármaco y la estabilidad de las nanopartículas (Mohanraj & Y Chen, June 2006).

3.1.1 DLS O ESPECTROSCOPIA DE CORRELACIÓN DE FOTONES

Comúnmente, el método de rutina y la prueba más segura de determinación del tamaño de partícula es por espectroscopia de fotón-correlación o luz dinámica de barrido.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) también llamada espectroscopia de correlación de fotones, es basada en la interacción de las partículas con una barra de luz incidente. La intensidad de la luz dispersada detectada en un ángulo fijo provee la media del tamaño, distribución del tamaño e índice de polidispersidad (PId) de la muestra. El modelo del cálculo está basada en el principio equivalente de la esfera; la presencia de agregados incrementa la media del tamaño (Thassu, Deleers, & Pathak, 2007).

La distribución del tamaño es normalmente descrita como un histograma log-normal con el diámetro de la partícula sobre la abscisa y la cantidad de partículas en un tamaño dado ordenado en una clase. A no ser que la densidad de la partícula varíe con el tamaño, la distribución del volumen es equivalente a la distribución de la masa (Thassu, Deleers, & Pathak, 2007).

3.1.2 DISPERSIÓN DE LA LUZ

Técnicas de dispersión de luz han sido el pilar de la determinación del tamaño de partícula y la distribución del tamaño.

Varias teorías se utilizan para calcular el tamaño de partícula de distribución de nivel y el ángulo de luz difractada. Cuando la luz se dirige a una partícula, que puede ser desviado o absorbido por la partícula, que depende del tamaño de la partícula relativa a la longitud de



3. CARACTERIZACIÓN

onda de la fuente de luz. Las partículas que son grandes en comparación con la fuente de longitud de onda de la luz tienden a difractar la fuente de luz. Las partículas más pequeñas, cerca del tamaño de la longitud de onda o menores tienden a dispersarla luz (Williams III & Vaughn, 2007).

3.1.3 DISPERSIÓN DE LUZ LÁSER

Los analizadores de tamaño de partícula con difracción de luz láser hacen uso de la luz difractada, luz difusa, o ambos, en el cálculo de las distribuciones de tamaño de partícula. El análisis preciso puede llevarse a cabo en las partículas en el rango de 10nm–1 mm de diámetro. Este método es simple, y el equipo Zetasizer Nano ZS permite que muchas miles de mediciones se promedien para dar con la distribución final.

Además, parámetros como son la viscosidad o pH del medio de suspensión, temperatura, concentración y sedimentación de las partículas puede influenciar los datos.

3.2 POTENCIAL Z

El potencial Z es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria del fluido unido a la partícula dispersada. Este parámetro puede ser determinado por electroforesis, en el cual un campo eléctrico es aplicado a través de la dispersión. Las partículas migran hacia el electrodo de carga opuesta con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z.

El potencial Z es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial Z es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula.

Este parámetro es usado comúnmente para caracterizar la propiedad de la carga superficial de las nanopartículas. El potencial eléctrico de las partículas es influenciado por la composición de la partícula y el medio en el cual es dispersado. Las nanopartículas con potencial entre ± 60 y 100 mV tienen una excelente estabilidad física, entre $(\pm) 30$ mV y $(\pm) 60$ mV han sido descritas para ser de estabilidad moderada en suspensión y es atribuible a la carga de repulsión entre las partículas, lo cual puede ser suficiente para prevenir su agregación. El potencial Z puede también ser usado para determinar si un material cargado activamente es encapsulado dentro de la nanocápsula o adsorbido en la superficie (Mohanraj & Y Chen, June 2006).

El potencial Z es influenciado por la carga de los diferentes componentes de las nanopartículas, especialmente tensoactivos localizados en la interface con el medio de dispersión, tanto como la composición del medio de dispersión además, los valores de potencial Z puede ser generalmente asociados con los valores de pH del sistema.

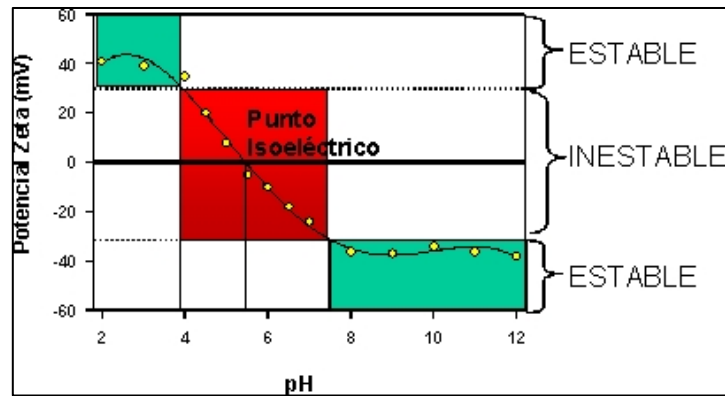


Figura 10. Gráfico que relaciona los valores del potencial Z a diferentes pH estableciendo los puntos de estabilidad física en la solución (<http://www.iesmat.com>).

La figura 9 relaciona los valores de potencial Z de las soluciones coloidales con el pH de estas. La zona del centro muestra las condiciones en las cuales una solución es inestable y a los extremos las condiciones de estabilidad.

Cuando el potencial Z pasa a través del cero, en el eje de las X, a este punto se le llama punto isoeléctrico. Esto significa que las partículas no experimentan repulsión, por lo que la aglomeración puede ser un efecto esperado.

3.2.1 MODELO DE LA DOBLE CAPA

Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente separados (Figura 10).

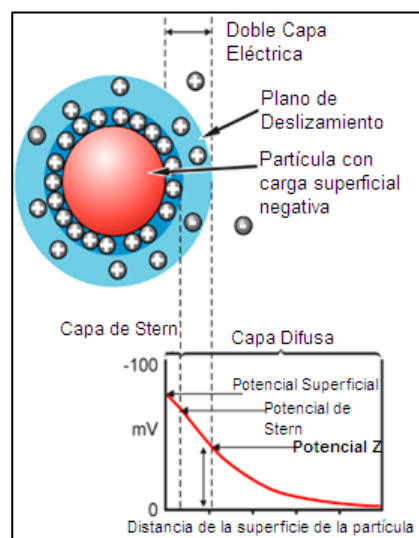


Figura 11. Esquema de una partícula y sus capas eléctricas. (Coagulation & Flocculation, Zeta-Meter, 2008)



3. CARACTERIZACIÓN

La relación entre el potencial Z y el potencial de superficie depende del nivel de iones en la solución. Así, en el agua, la doble capa hace que el potencial Z sea una buena aproximación del potencial de superficie.

3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El microscopio Electrónico de Barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal 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, que pueden dispersarse en 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 de la muestra. Cada punto leído 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 mostrado. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor.

Para facilitar esta emisión de electrones se metaliza la muestra que es recubierta de una pequeña capa de oro o platino. El haz de electrones se puede concentrar en una zona diminuta ($\sim 20 \text{ \AA}$) que puede barrer la superficie de la muestra al ser reflectado por bobinas adecuadas. Los electrones secundarios se detectan por encima del espécimen y la imagen muestra la intensidad de los electrones secundarios emitidos por las diferentes partes de la muestra (Thassu, Deleers, & Pathak, 2007).

Este método da información sobre aspectos como el tamaño, forma y superficie de las nanopartículas. Sin embargo, partículas más pequeñas que 100 nm puede ser difícil su observación además del agente de contraste o el proceso de secado que puede cambiar la morfología y el tamaño de las partículas durante la visión, que es una de las desventajas de usar esta técnica (Williams III & Vaughn, 2007)

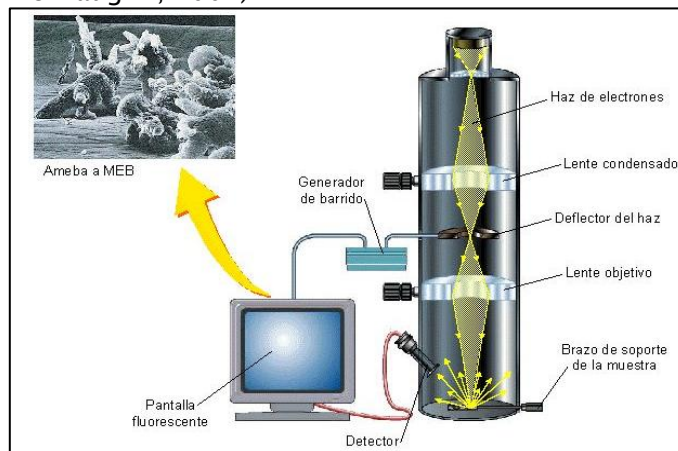


Figura 12. Diagrama de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) convencional (almez.pntic.mec.es)



3.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) es una técnica en la cual un haz de electrones es transmitido a través de la muestra seca. La TEM provee información acerca del tamaño, forma e integridad de las nanopartículas y permitir la observación estructural.

Los electrones difractados al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones. Tanto el difractograma de electrones como la imagen reconstruida se pueden proyectar en una pantalla (Thassu, Deleers, & Pathak, 2007).

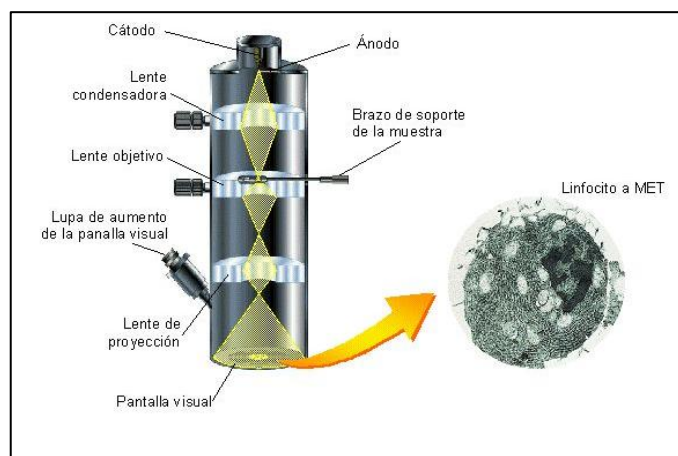


Figura 13. Diagrama de un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) convencional (almez.pntic.mec.es)

4. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO) (PECA)

Las nanoesferas del monómero PECA se preparan mediante un proceso de emulsión/polimerización, en el que gotas de monómero insoluble en agua se emulsionan en fase acuosa. El mecanismo de polimerización es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio de polimerización (por ejemplo, iones OH^- derivados de la disociación del agua). La reacción se produce en micelas tras la difusión de moléculas de monómero a través de la fase acuosa rápidamente.

Con respecto a las nanopartículas de Quitosán, son formadas por el método de gelación iónica en el cual el pH del medio determina la velocidad de polimerización y la adsorción de fármaco cuando este último es ionizable, ya que el Quitosán es soluble a pHs ácidos. La formación de las nanopartículas se inicia con la adición de Tripolifosfato pentasódico (TPP) que es un polianión o un agente que satura el medio de cargas negativas para que éstas sean captadas por las cargas positivas del Quitosán.

Ambas preparaciones coinciden en la saturación de iones negativos en el medio para llevar a cabo el proceso, ya sea en agitación a gran velocidad o de forma espontánea y tomando como punto de



4. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO) PECA

partida esta condición se fabrican las nanopartículas de los dos componentes mezclando las dos técnicas, por un lado, cuando el polisacárido en solución es la fase continua, requiere que la adición del polianión y el monómero sean casi simultáneas pues la formación de las nanocápsulas es espontánea por el efecto que por sí solo tiene el medio en cada componente.

A su vez, cuando el monómero en solución es la fase continua, se requiere que gran parte de este material sea polimerizado en el medio formando nanopartículas de este componente ya que este proceso es muy rápido y difícilmente controlado. Posteriormente, se añade el polianión y con esto cada nanopartícula formada quedará cargada negativamente y así el Quitosán se una espontáneamente a estas cargas.

La formación de las nanopartículas es muy rápido por lo que se deben controlar algunos aspectos en su preparación y lograr la formación e integración de ambos componentes. El tamaño de las partículas es variable, pero pueden incluirse en un rango de 200 a 40 nm empleando tensoactivos no iónicos en el medio de polimerización (Arias, 2003).

5. NANOTOXICOLOGÍA

La Nanotoxicología se define como la ciencia que examina los efectos dañinos y tóxicos de las nanopartículas diseñadas artificialmente así como de los mecanismos en los organismos vivos y el medio ambiente (Klaine, y otros, 2008).

Un aspecto crucial en la Toxicología es la medición de los efectos de xenobióticos en los organismos y su ecosistema. Las alteraciones bioquímicas, fisiológicas moleculares o celulares inducidas por agentes xenobióticos permiten correlacionar estos eventos con la dosis de exposición y los niveles del agente tóxico con la magnitud de los diferentes efectos al organismo. Por ello se ha tenido que utilizar biomarcadores, los cuales son observaciones medibles de las alteraciones biológicas. Se pueden definir como modificaciones, presencia de componentes, estructuras, procesos y/o reacciones que se atribuyen de manera directa o indirecta a la exposición de sustancias xenobioticas. Los biomarcadores se dividen en tres categorías: de exposición, efecto o susceptibilidad. Con ellos es posible establecer una evaluación de riesgo en consideración de variables toxicocinéticas y toxicodinámicas.

1.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

Estos consisten en la medición de la sustancia xenobiótica o un metabolito de la misma, también puede ser un efecto directamente atribuible al xenobiotico que se encuentre dentro del organismo. Por ejemplo, un biomarcador de exposición a la anilina en humanos consiste en la medición del metabolito p-aminofenol el cual se encuentra en sangre y orina. Los xenobióticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos, orina, sangre y heces así como en el aire exhalado y otros fluidos corporales y en algunos casos reflejar la magnitud de la exposición. Los compuestos carcinógenos o sus metabolitos son generalmente especies electrofílicas que pueden causar cambios bioquímicos por su afinidad a grupos nucleofílicos que se encuentran en biomoléculas o moléculas orgánicas e inorgánicas. Estos efectos pueden cuantificarse y considerarse como biomarcadores de exposición (Manahan S.E., 2003).



1.2 BIOMARCADORES DE EFECTO

Son alteraciones en la fisiología, bioquímica u organización celular atribuidas a la exposición de sustancias tóxicas. En el caso de la anilina se puede medir el p-aminofenol en sangre pero también puede medirse la producción de metahemoglobina en sangre (un producto de la hemoglobina inútil para acarrear el oxígeno en sangre). La exposición a sustancias como los gases nerviosos, organofosfatos, y los insecticidas carbamatos y organofosfatos pueden inhibir la actividad de la enzima colinesterasa la cual puede ser medida fácilmente reflejando una relación entre el daño tóxico y la exposición (Monahan S. E., 2003).

1.3 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD

Este tipo de biomarcadores pueden relacionarse con un incremento o disminución en las respuestas celulares hacia un efecto tóxico que se refleja en el organismo a nivel celular, tisular u orgánico. Esto provoca una vulnerabilidad diferenciada hacia los signos, síntomas o enfermedades generados tras la exposición a agentes físicos, químicos o biológicos.

En términos de impacto a la salud y el medio ambiente es necesario evaluar los riesgos de nanomateriales mediante estudios toxicológicos y epidemiológicos así como el manejo de los riesgos que conlleva a su uso por medio de decisiones políticas, sistemas regulatorios y todo aquello que relacione el uso de nuevas tecnologías aplicadas a la salud.

Existen dos criterios para identificar nanomateriales que podrían constituir un riesgo para la salud humana

1. El material debe ser capaz de interactuar con el cuerpo de tal forma que su nanoestructura se encuentre biodisponible
2. El material debe ser capaz de provocar una respuesta biológica que se encuentra asociada a la nanoestructura.

Es necesario establecer la relación del posible impacto en la salud humana a partir de la nanoestructura de la partícula más que del diámetro de la partícula.

Investigaciones demostraron que cuando materiales normalmente inocuos se elaboran a manera de partículas ultra finas tienden a volverse tóxicos. Existe una relación entre el grado de toxicidad con el tipo de células, el tamaño, la forma y concentración de las nanopartículas expuestas. No se conoce con exactitud el límite de tamaño para que las partículas ultra finas no sean tóxicas, pero se piensa que puede ser entre los 65 y los 200 nm (Donaldson, Stone, Clouter, Renwick, & Macnee, 2001).



5. NANOTOXICOLOGÍA

El desarrollo tecnológico de las nanopartículas se ha producido fundamentalmente por sus propiedades fisicoquímicas, que 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 van a determinar la toxicidad.

Los mecanismos de toxicidad no están totalmente elucidados para la mayoría de las nanopartículas. Entre otros incluyen la disrupción de membranas o del potencial de la membrana, la oxidación de proteínas, genotoxicidad, interrupción en la transmisión de energía, formación de especies reactivas de oxígeno y liberación de componentes tóxicos (Klaine, y Col., 2008).

Diversos modelos celulares como células renales, hepáticas o neuronales también han mostrado sensibilidad a distintos tipos de nanopartículas.

En relación a la toxicidad sistémica de las nanopartículas, se han realizado ensayos de toxicidad aguda principalmente, que no identifican en su mayoría los órganos diana y en los que la caracterización del nanomaterial empleado es muy limitada. No obstante, de forma general, los resultados de estos estudios muestran unos datos de dosis letal media en el rango de mg/kg a g/kg, lo que se considera de ligera a moderadamente tóxico.

Diversos tipos de nanopartículas han demostrado tener potencial genotóxico e interactuar con el ADN lo que puede iniciar o promover cáncer y afectar a la fertilidad. Todos estos efectos adversos sobre la salud que se están observando a nivel experimental ponen de manifiesto la necesidad de evaluar la relación riesgo/beneficio del uso de la nanotecnología (Gutierrez-Praena, y otros, 2009).

Hay numerosas razones por las que los nanomateriales pueden tener mayor toxicidad que sus contrapartes en volumen. En general, los nanomateriales pueden penetrar dentro de pequeñas estructuras y moverse profundamente dentro de espacios celulares estrechos y tejidos que las partículas más grandes. Una vez dentro de las células, ellas pueden inducir estrés oxidativo, alteraciones fagocíticas, inhibición de la proliferación celular, y disminuir la viabilidad celular entre otros efectos. Las partículas más pequeñas pueden evadir sistemas reticuloendoteliales con mayor facilidad, y así permanecer por más tiempo en el cuerpo. Los nanomateriales pueden generar complejos móviles que entran en tejidos normalmente inaccesibles. Reacciones químicas inesperadas debido al incremento en la reactividad puede dañar las propiedades estructurales y funcionales de la célula. Todas estas posibilidades contribuyen al potencial toxicológico de los nanomateriales.



Farmacológicamente, muchos estudios han demostrado que las nanopartículas de tamaño submicrónico tienen un número de ventajas sobre micropartículas como un sistema de liberación. Generalmente, las nanopartículas tienen relativamente alta carga intracelular comparada con micropartículas y disponibilidad para un rango amplio de blancos biológicos, debido a su pequeño tamaño de partícula y relativa movilidad (Hirano, 2009).

6. ASPECTOS ÉTICOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

La nanotecnología es considerada como la fuerza más influyente en los últimos años después, de las tecnologías aplicadas al internet. Si bien es cierto que la nanotecnología es uno de los avances científicos más prometedores, se hace evidente que su definición estará basada en el uso o destino que se le aplique. Se sabe que en países como China, Japón y Corea centran su interés en los materiales y, especialmente, la electrónica, mientras que los investigadores en África y América Latina suelen hacer hincapié en los materiales en el contexto de la medicina y la ciencia del medio ambiente. La *Royal Society* del Reino Unido hace la distinción entre "nanociencia" y "nanotecnología", donde el primero incluye el "estudio y manipulación" de las partículas de nanoescala, y la segunda la "caracterización, diseño y producción de estructuras, dispositivos y sistemas" a nanoescala (Kelty, 2006).

Es entonces donde surgen todas aquellas aplicaciones que la ciencia ficción se encargó en su momento de poner en el aire y no había sido posible realizar en la vida real. Las ideas van desde la purificación del ambiente, la protección a la capa de ozono, la erradicación del cáncer, hacer ordenadores o *chips* con mayores capacidades, alimentos con mejor aprovechamiento al ser humano y un sinnúmero de posibilidades a descubrir.

Sin embargo, aún existen dudas acerca del uso o la exposición a estos materiales se tienen pruebas que muestran un comportamiento diferente dependiendo del tamaño de las partículas. Por otro lado, aún no se asegura que la manipulación de este tipo de tecnologías puedan poner en riesgo el ambiente, aunque esto no será evidente hasta transcurridos algunos años, por lo cual es imposible esperar hasta observar el impacto o qué tipo de daño es el que causa tanto en seres vivos como al planeta en general. Y en un enfoque a corto plazo, es indispensable conocer el tipo de riesgo toxicológico que presentan los nanomateriales o productos de degradación en el ser humano.



7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

Hablando de ética, es imposible dejar de lado los aspectos sociales y políticos que a lo largo de la historia han puesto a la ciencia como el principal objetivo de los avances tecnológicos; y será ingenuo pensar que únicamente se aplicará la nanotecnología en pro de la preservación de la salud o el mejoramiento de ciertos artículos, pues entendiendo el alcance y sitios que pueden alcanzar por su tamaño, antes era imposible pensar en acceder a esto. Por lo anterior, se debe evitar que la nanotecnología sirva como instrumento de terror o de uso político con fines de sometimiento social y se hace necesario tener una entidad que regule y dé límites a los alcances que pueden llegar a tener los nanomateriales

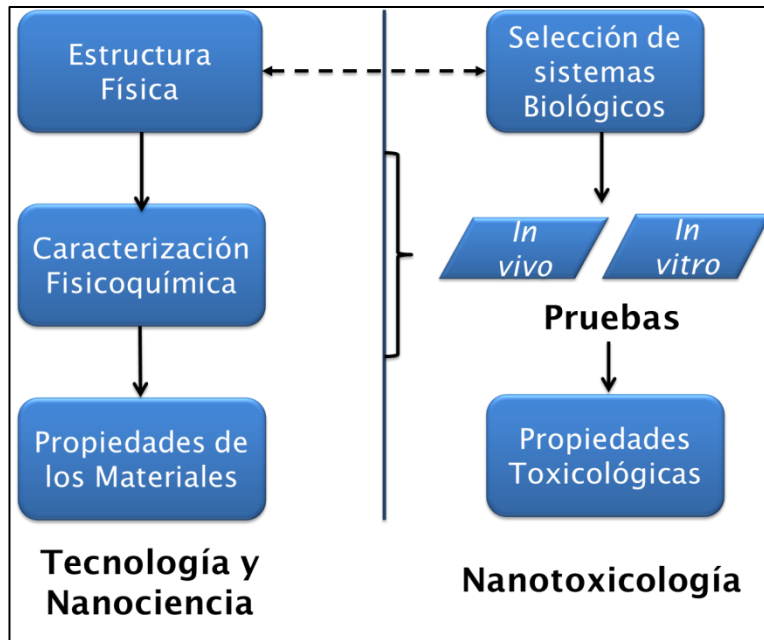


Figura 14. Relación paralela entre el diseño del material y pruebas al material (Nanotecnología y Nanotoxicología) (Balbus, y otros, 2007).

7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

La citotoxicidad se considera principalmente como el potencial de un compuesto que induce la muerte celular. La mayoría de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* mide la necrosis. Sin embargo, un mecanismo tan importante de la muerte celular es la apoptosis, lo que requiere diferentes métodos para su evaluación. La inhibición de la apoptosis es también de importancia toxicológica. Además, estudios detallados sobre la dependencia de la dosis y el tiempo de los efectos tóxicos para las células, junto con la observación de los efectos sobre el ciclo celular y su reversibilidad, puede proporcionar información valiosa sobre los mecanismos y el tipo de toxicidad, incluyendo los eventos de necrosis, apoptosis y otros (Eisenbrand, y otros, 2002).



Desde el punto de vista toxicológico, la toxicidad de los nanomateriales debe incluir: reacción alérgica, reacción tóxica, carcinogénesis, mutagénesis y toxicidad genética, e idiosincrasia como efecto de toxicidad reversible, efectos irreversibles, toxicidad local, y toxicidad sistémica. La intensidad tóxica de los nanomateriales puede depender del sitio de acción del tóxico. Los tipos de reacciones tóxicas están clasificadas dentro de enlaces no covalentes, enlaces covalentes, atracción H^+ (radicales libres), transporte de electrones, y reacciones enzimáticas que en consecuencia pueden unirse su productos con alguna molécula diana para dar lugar a la disfunción celular (Eisenbrand, y otros, 2002).

Los llamados ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar mediante diferentes herramientas metodológicas, alteraciones a mecanismos celulares conocidos, efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o reparación del daño entre otras. Estos nos permiten conocer las repercusiones producto de la exposición de sustancias xenobióticas con la potencialidad para comprometer la viabilidad de diversos fenómenos celulares, bioquímicos o moleculares. Dentro de estos eventos destaca el estudio de la integridad membranal. Este tipo de daño, puede a su vez; relacionarse con alteraciones específicas de estructuras como el citoesqueleto, metabolismo celular, síntesis y degradación proteica, liberación de constituyentes celulares o productos, la regulación iónica y la división celular entre otros eventos toxicodinámicos (Eisenbrand, y otros, 2002).

7.1 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* son útiles y necesarias para definir la citotoxicidad basal, por ejemplo, la capacidad intrínseca de un compuesto que causa la muerte celular como consecuencia de daños en las funciones celulares básicas. Las pruebas de citotoxicidad son también necesarias para definir el rango de concentración en la cual genera una respuesta tóxica y para proporcionar información más detallada y significativa en las pruebas *in vitro* sobre parámetros tales como la genotoxicidad, la inducción de mutaciones o muerte celular programada. Al establecer la dosis a la que se ve afectado el 50% de las células (es decir, TC_{50}), es posible comparar cuantitativamente las respuestas de los compuestos individuales en diferentes sistemas o de varios compuestos en los sistemas individuales (Eisenbrand, y otros, 2002).

Se realizó la selección de las pruebas de citotoxicidad que aportaran la información más relevante en la exposición de las nanopartículas a dos concentraciones distintas, 50 y 100 μl de las soluciones de nanopartículas usando como referencia un control negativo, siendo éste el que daría la referencia de un comportamiento natural y se mantuvo a las condiciones de cultivo *in vitro* sin la exposición a un xenobiótico. En algunos casos se añadió un control positivo, en el cual el cultivo celular sería expuesto a un agente que induzca daño o alteraciones a las funciones de las células como lo es el Arsenito de sodio una concentración del 0.3 M.



7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

En la siguiente tabla se realiza un listado de los criterios de evaluación que existen para realizar los ensayos con los que se conocen los efectos tóxicos de algunas sustancias divididos en algunos aspectos, ya sea que en algunos casos se pruebe el metabolismo celular, las reacciones bioquímicas celulares o su funcionamiento en general.

Tabla 1. Ensayos para evaluar el grado patogénico y potencial de los Nanomateriales (Hillegass Y Col. Et Al, 2010).

| Criterios de evaluación | Ensayos |
|---------------------------|--|
| Citotoxicidad | <ul style="list-style-type: none"> • Azul de Tripán • MTT o MTA • Clonogénico (CFE) • LDH • TUNEL • Técnica Apostan • PI con Citometría de Flujo • 7AAD y/o Anexina V • Lipoperoxidación • Relación citocromo C con mitocondria • Activación de Caspasa |
| Proliferación | <ul style="list-style-type: none"> • Contenido de DNA • Incorporación de Timidina • Incorporación de BrdU • Ki-67 • Detección de PCNA |
| Genotoxicidad | <ul style="list-style-type: none"> • Ames (S. typhimurium o E. coli) • Detección de modificaciones basadas en DNA • Análisis de cariotipo (inducción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos) • Ensayo Cometa |
| Expresión de genes | <ul style="list-style-type: none"> • Análisis Northern blot • Proteína ribonucleasa (RPA) • PCR en tiempo real • Matrices PCR • Micromatrices |

Los ensayos subrayados en la tabla anterior fueron los que se determinaron en el presente trabajo, ya que los biomarcadores estiman el mecanismo por el cual se conoce el nivel de daño que puede causar un xenobiótico; en algunos casos es por efecto del metabolismo y medido en soluciones coloridas, y en otro, por medio de la evaluación del funcionamiento celular. Los fundamentos de los ensayos se describen a continuación.



7.1.1 ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo, lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto colorido en las mitocondrias de las células viables. El MTT [(Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico)] de color amarillo, es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble (formazán), utilizando el nicotin adenin dinucleótido (NADH) como cofactor.

El producto de la reacción es el formazán, un compuesto de color azul que queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización no polar y cuantificado mediante métodos espectrofotométricos. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad mitocondrial y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un xenobiótico permite obtener información acerca del potencial citotóxico de estos sistemas (Arencibia y Col. 2003).

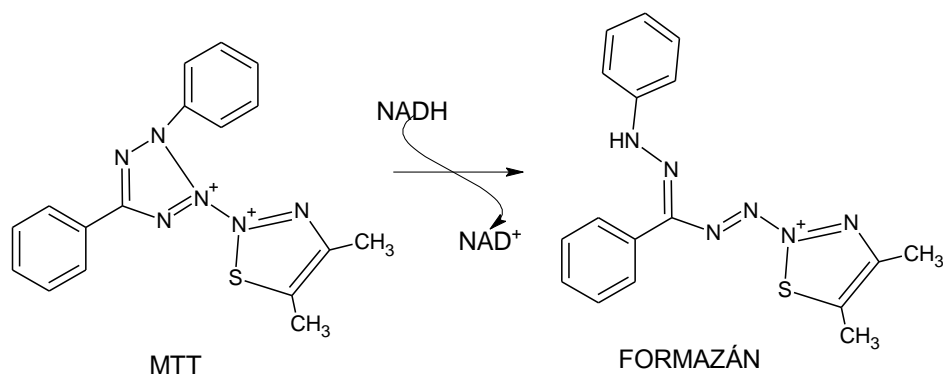


Figura 15. Reducción Metabólica del MTT a sales de Formazán por células viables (Montuenga L. y Col., 2009).

7.1.2 ENSAYO CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

La cuantificación de especies reactivas de oxígeno utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA) permite estimar la lipoperoxidación celular en la cual el malondialdehído (MDA) es derivatizado.

Es bien conocido que los organismos aeróbicos requieren del oxígeno para realizar sus funciones vitales pero una vez que el oxígeno es activado se convierte en tóxico para este tipo de organismos. El exceso de formas activas de oxígeno conduce al estrés oxidativo. La estructura electrónica del oxígeno hace que sea susceptible a reducciones parciales, produciéndose Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).



7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

Las células vivas están constantemente expuestas a ROS como son: Radical Superóxido, Peróxido de Hidrógeno, Radical Hidroxilo, Radicales Orgánicos; algunas de las cuales son capaces de iniciar la lipoperoxidación al extraer un protón alílico de un ácido graso poliinsaturado. Este proceso por múltiples etapas conduce a la formación de hidroperóxidos. Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, de tal manera que la concentración sérica de MDA es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y, por lo tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica (Montoya. A., 2008)

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. Los peróxidos lipídicos alteran la estructura primaria de las moléculas endógenas por medio de entrecruzamiento y fragmentación de moléculas. El entrecruzamiento impone restricciones tanto estructurales como funcionales sobre las moléculas enlazadas. La peroxidación lipídica destruye a los lípidos en las membranas celulares y también genera formas tóxicas endógenas como los radicales lípidos LOO^- y LO 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^- y LO^- , se le atribuyen también la fragmentación de proteínas (Klaassen, 2001).

7.1.2.1 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL OXÍGENO (ROS)

Uno de los mecanismos de toxicidad más importantes es la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS). Si un electrón captura el O_2 puede llevar la información del radical superóxido O_2^- , el cual entonces genera además ROS. Normalmente, el glutatión y otras enzimas antioxidantes mantienen en equilibrio el cuerpo. Un incremento en el índice generación de ROS causa estrés oxidativo y desencadenar respuestas inflamatorias. Altos niveles en el estrés oxidativo perturba el poro PT mitocondrial y entorpece la transferencia de electrones, lo cual puede producir apoptosis o necrosis celular (Leslie-Pelecky, 2007).

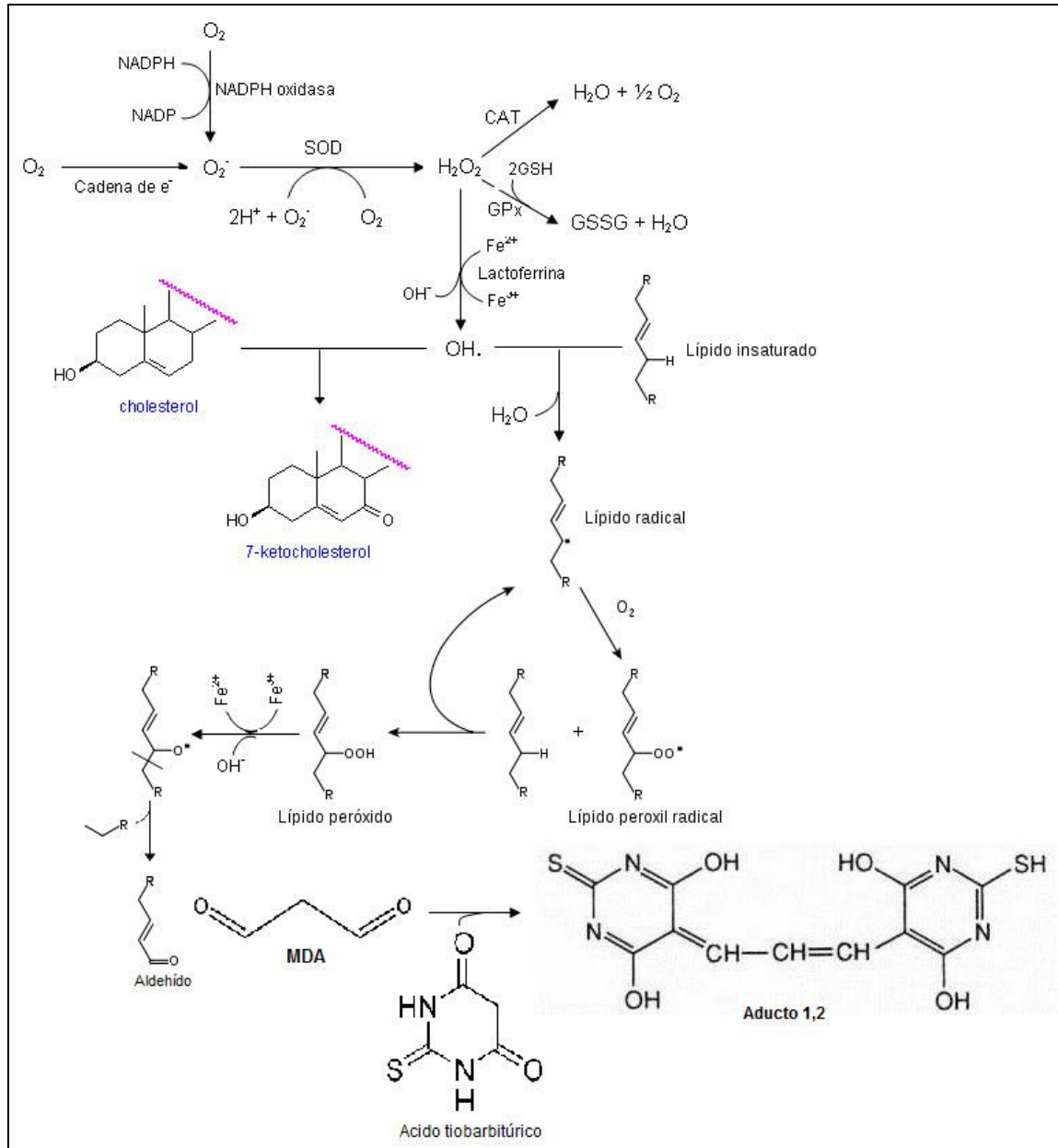


Figura 16. Esquema que muestra el efecto que producen las ROS sobre lípidos de membrana en el ensayo de TBARS formando un aducto con MDA

7.1.3 ENSAYO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Los procedimientos empleados más frecuentemente para evaluar la proliferación celular recurren a las técnicas del cultivo celular *in vitro*.

Las células vivas más fácilmente accesibles son las obtenidas mediante una punción venosa de sangre periférica. Las células que se estudian son los linfocitos, dado que los eritrocitos han perdido su núcleo y por lo mismo no tienen cromosomas.



7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

En condiciones normales, los linfocitos no se multiplican en sangre periférica. Sin embargo, *in vitro*, se logra su proliferación y por consiguiente su división celular al incorporar a las células vivas un análogo de timina (como la timina tritiada o la bromodesoxiuridina [BrdU]), que se incorpora al DNA de las células que lo estén sintetizando activamente; es decir, en fase S (Montuenga L. y Col., 2009) y adicionando al medio de cultivo un agente mitógeno (que induce mitosis), siendo el más empleado la fitohemaglutinina (FHA), obtenida de un extracto de *Phaseolus vulgaris* (frijol). Este agente induce la proliferación de linfocitos, estimula la síntesis de ARN una hora después de su adición al medio de cultivo y de ADN después de 24 horas; actuando sobre la membrana celular produce leucoaglutinación y, desde el punto de vista químico, consta de dos componentes: una proteína y una mucoproteína.

Los cromosomas se observan mejor en el estadio de metafase de la división celular, por lo que no basta mantener las células en multiplicación activa, sino que es necesario detenerlas en dicho estadio, lo cual se logra con el empleo de Colchicina, sustancia que impide la formación del huso acromático. Las preparaciones deben tener una adecuada dispersión de los cromosomas, esto se logra con el uso de soluciones hipotónicas.

Un reto inicial con respecto al comportamiento cromosómico era establecer en qué momento del periodo sintético (S) del ciclo celular los cromosomas se duplicaban y si los homólogos replicaban sincrónicamente (Salamanca Gómez, 1988).

Se cuentan las metafases al microscopio después de haber realizado una tinción con Giemsa. Esto permite determinar la proporción de figuras mitóticas en 2000 núcleos consecutivos estimado por el índice mitótico (I.M.), el cual sirve para conocer la velocidad de proliferación. También se identifican células que han completado uno o más ciclos de división mediante la cinética de proliferación (I. P.) como la proporción de primera (M1), segunda (M2) y tercera o subsecuentes (M3) metafases en 100 mitosis consecutivas (I.P.) en un periodo determinado de cultivo y así calcular la duración del ciclo celular.

Con este ensayo es posible identificar las células que se encuentran en una fase de primera división, en que la BrdU sustituirá con base en el principio de semiconservatividad una sola de las cadenas de la doble hélice en las cromátidas hermanas de un cromosoma. Los cromosomas en esta metafase adquieren una tinción homogénea. Consecuentemente en una segunda división, una cromátida de cada cromosoma ha incorporado en la hebra hija la base análoga; Al microscopio se observa una cromátida más clara que la otra en cada cromosoma. En las metafases en tercera división y en las subsecuentes y a consecuencia de la duplicación semiconservativa del DNA, la proporción de coloración clara con respecto de la oscura, se va haciendo mayor según ocurran las divisiones celulares (Mäki-Paakkanen, 1998)

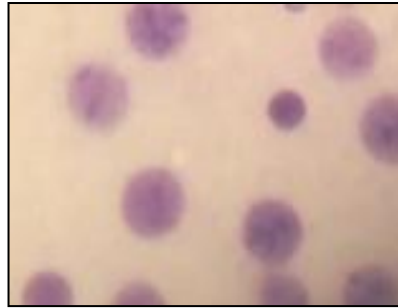
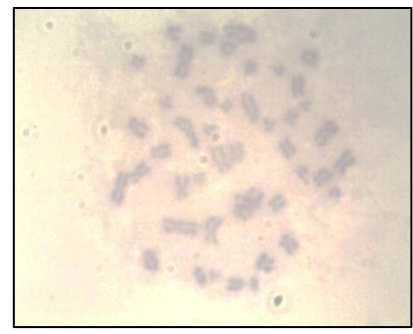


Figura 17. Núcleos Proliferantes*

Figura 18. Primera Metafase
(M1)*Figura 19. Segunda Metafase
(M2)*Figura 20. Tercera Metafase
(M3)*

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

7.2 CULTIVO CELULAR

Algunas de las pruebas comúnmente empleadas para evaluar el potencial citotóxico de partículas nanométricas *in vitro* emplea cultivos celulares primarios o de células transformadas provenientes de diversos órganos y tejidos.

Las técnicas de cultivo celular (*cell culture*) consisten en el cultivo de células dispersas obtenidas de un tejido a partir de disgregación mecánica, enzimática o química, o de líneas celulares establecidas. En un principio se utilizó el término cultivo tisular, puesto que los cultivos se realizaban a partir de fragmentos de tejidos de los que, sin disgregación alguna, migraban células que comenzaban a proliferar. Posteriormente se realizaron los cultivos de células aisladas tras la disgregación, pero se ha seguido usando el término cultivo celular incluso para referirse a los cultivos tridimensionales de tejido no disgregado que permite mantener todas o muchas de las características del tejido *in vivo*. Cuando el cultivo se comienza a partir de células procedentes de un tejido, por disgregación o migración, se denomina cultivo primario.



7. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

En cultivos primarios, por disgregación o migración, se realiza un proceso de selección de algunas células que proliferan más que otras. Tras sucesivos ciclos de división las células llegan a cubrir toda la superficie disponible del recipiente y se dice que han alcanzado el estado de confluencia. Si se quiere mantener el cultivo, es necesario en ese momento diluir las células en nuevo medio de cultivo y pasarlas a otros recipientes, realizando sucesivos subcultivos, en cuyo caso ya podemos hablar de línea celular (Montuenga, Esteban, & Calvo, 2009).

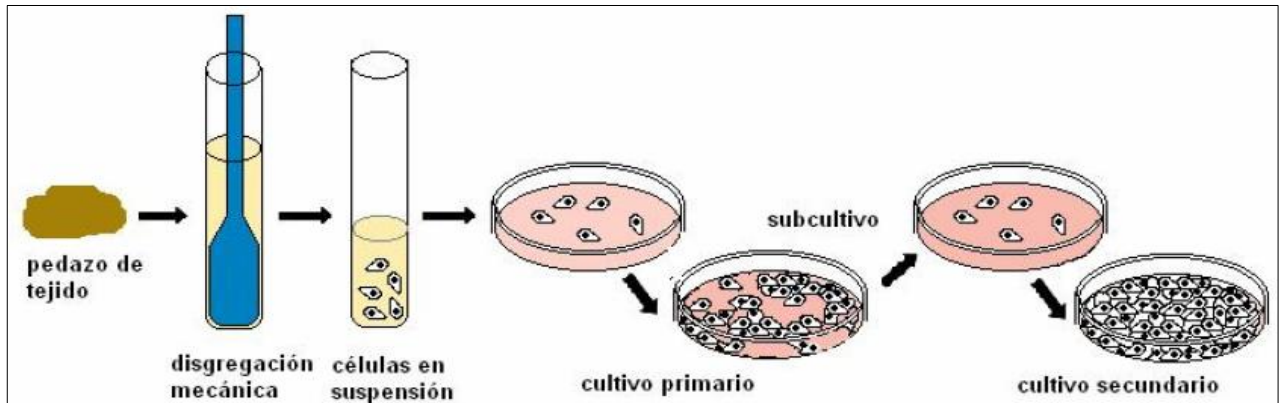


Figura 21. Una línea celular se origina a partir de un cultivo primario en el primer subcultivo exitoso. (Segretín, 2009).

8. ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

Actualmente no existe legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales.

La FDA (Food and Drug Administration) establece únicamente una serie de recomendaciones subraya la necesidad de la investigación sobre la caracterización de los nanomateriales en el rango de nanoescala, métodos para identificar los peligros, la comprensión de la respuesta biológica a los materiales a nanoescala y la exposición y caracterización de materiales a nanoescala y el transporte (en los seres humanos y el medio ambiente).

Así, en el reglamento (CE) N 1907/2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos no hay ninguna referencia explícita a los nanomateriales. Sin embargo, los nanomateriales entran dentro de la definición de “sustancia” incluida en el REACH.

Según la Comunidad Europea “Nanociencias y nanotecnologías: Un plan de acción para Europa 2005–2009” todos los usos y aplicaciones de las nanociencias y nanotecnologías deben satisfacer el nivel elevado de protección de la población, la salud, la seguridad, los consumidores y los trabajadores, así como el medio ambiente a que aspira la Comunidad.



8. ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

En la Comunidad Europea “Aspectos reguladores de los nanomateriales” se establece que la legislación actual cubre en gran medida los riesgos derivados de las Nanopartículas. No obstante, esta normativa puede tener que modificarse en el futuro con base en la nueva información disponible.

En relación con los nanomateriales, el Parlamento Europeo recoge, entre otras premisas, que los beneficios de los nanomateriales sólo pueden ser tenidos en cuenta dentro de un marco de regulación conciso en el que se exponga la verdadera naturaleza de los problemas de salud relacionados con los nanomateriales; que la legislación debe actualizarse conforme se vayan conociendo nuevos datos sobre los nanomateriales; que se debe proteger por encima de todo la salud humana y el medio ambiente; el público tiene que estar informado de los productos que contienen nanomateriales; que hay que desarrollar protocolos de control para prevenir riesgos de exposición en los trabajadores; limitar los derechos de patentes a aplicaciones específicas o métodos de producción, etc. (Gutierrez-Praena, y Col., 2009).

Por su parte, algunos investigadores que dedican su trabajo a la nanotecnología han planteado la necesidad de comprobar la forma en que interactúan las nanopartículas en sistemas biológicos. Existe un riesgo para las personas que manipulan materiales como el silicio o el asbesto, los cuales llegan a tamaños nanométricos y, por lo tanto, es posible inhalarlos y absorberlos fácilmente, por lo que existe la posibilidad de sufrir enfermedades ocupacionales o también para aquellas que fabrican las nanopartículas y no se tiene un conocimiento del riesgo que implica mantener un contacto directo con estas, ambos casos a corto o largo plazo.

Estos investigadores se centran en dos aspectos en saber ¿qué información se necesita conocer sobre el impacto a la salud en la ingeniería de las nanopartículas y como es mejor obtenida esta información? Ya sean ensayos *in vivo* o *in vitro*, aseguran que es fundamental contar con un set de pruebas básicas para conocer si pudiera haber propiedades peligrosas en las nanopartículas. Este set de pruebas lo plantan en los siguientes niveles:

Tabla 2. Propuesta para evaluar el peligro de la salud humana (Balbus, y otros, 2007).

| Nivel 1 | Nivel 2 | Nivel 3 |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Absorción/ Translocación • Estudios de los mecanismos <i>in vitro</i>. • Selección de alto rendimiento. • Generación de Especies reactivas de Oxígeno. • Disolución en configuración biológica. | <ul style="list-style-type: none"> • Estudios de toxicidad subcrónicos extendidos histopatológicamente. • Estudios extendidos ADME. | <ul style="list-style-type: none"> • Toxicidad basada en órganos específicos en consideraciones ADME. • Estudios adicionales elucidando mecanismos de toxicidad evaluados en los niveles anteriores. |

Tomando las pruebas resaltadas como base para generar la información en la investigación de la toxicidad de las nanopartículas en el presente trabajo.



9. JUSTIFICACIÓN

9. JUSTIFICACION

La nanotecnología, y específicamente las nanopartículas, son el tema a abordar desde su aspecto, tanto tecnológico como toxicológico, pues son producidas y estudiadas en el presente trabajo. Desde el punto de vista ético y regulatorio, se hacen suposiciones acerca de la acción y las posibles consecuencias que puede haber al exponer las nanopartículas con las células de todo ser vivo y el impacto que podría tener en el ambiente a corto, mediano o largo plazo.

Se ha realizado una búsqueda exhaustiva en las principales entidades regulatorias de medicamentos y aditivos del mundo, encontrando que en general sólo hacen recomendaciones acerca de qué consecuencias pueden traer consigo la manipulación o fabricación de las nanopartículas y los cuidados frente a los posibles riesgos en su manipulación y exposición. Sin embargo, ninguna hace especificaciones concretas en pruebas mínimas que reten a las nanopartículas para comprobar que este tipo de materiales conservan la inocuidad que se obliga en los demás aditivos en la preparación de medicamentos, o bien, que especifique el nivel de toxicidad que mantiene la interacción con las nanopartículas.

Se ha tomado iniciativa en grupos de investigación internacional para conocer cómo interactúan las nanopartículas en la salud humana y el grado de daño causaría por contacto directo siendo un ejemplo la manipulación o de manera indirecta indirecta como la inhalación o absorción, y por ello se desea iniciar con una práctica similar nacional. Así como se han encontrado múltiples ventajas en la aplicación de las nanopartículas, también se requiere obtener información sobre el efecto a corto y largo plazo, de la misma manera que ocurre con los materiales utilizados en la fabricación y aplicación de aquellos productos de uso humano o que pueden estar expuestos al medio ambiente. Se sabe que con base en la bioética, se deben realizar ensayos *in vitro* como primer paso para correlacionar los efectos, ya sea a favor o en contra y, una vez sabiendo la citotoxicidad que induce el material (en este caso, las nanopartículas) será necesario probarlo en modelos biológicos posteriormente.

Con este trabajo se pretende generar información y los datos experimentales sobre el impacto que tienen las nanopartículas al ser expuestas en células, evaluando la capacidad citotóxica que éstas inducen. Así mismo, teniendo una caracterización fisicoquímica será posible entender cómo interactúan las nanopartículas en los sistemas biológicos, yendo de lo general a lo particular, es decir, conociendo la forma, estructura y tamaño será posible evaluar los eventos que debe realizar la célula o mantenerla de manera continua, y así saber mediante técnicas de identificación indirecta el riesgo que inducen las nanopartículas fabricadas. Se realizan comparaciones por dosis–efecto y en algunos casos por estirpe celular.



10. METODOLOGÍA

10.1 MATERIALES Y MÉTODOS

10.1.1 MATERIALES

10.1.1.1 PREPARACION DE NANOPARTÍCULAS

- Quitosán de cáscara de camarón $\geq 75\%$ deacetilado *Sigma*
- Tripolifosfato 96.2% *Procter & Gamble Manufactura*
- Etil 2-cianoacrilato *Aldrich*
- Pluronic F-68 *Sigma-Aldrich*
- Ácido acético glacial *J. T. Backer*

10.1.1.2 CULTIVOS CELULARES

- Buffer de fosfatos
- Pen Strep (Penicilin Streptomycin) *GIBCO*
- Suero Fetal Bovino (FBS) *GIBCO*
- L-Glutamine 200 mM 100X *GIBCO*
- Aminoácidos no esenciales MEM (MEM NEAA) *GIBCO*
- Advanced DMEM (*Dilbecco's Modified Eagle Medium*) 1X *GIBCO*
- RPMI 160 1X *GIBCO*
- Para la preparación de PBS:
 - Fosfato de potasio monobásico 99.2% *J. T. Baker*
 - Fosfato dibásico de sodio 99-100.5% *J. T. Baker*
 - Cloruro de sodio 99.5% *Prod. Quim. Monterrey*
 - Cloruro de potasio 100% *J. T Baker*

10.1.1.3 ENSAYO DE VIABILIDAD

- 2-Propanol, for molecular biology $\geq 99\%$ *Sigma*
- Detergente biológico Nonidet®P40 Substitute *Biochemika Fluka*
- MTT thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 97.5% TLC *Sigma*

10.1.1.4 ENSAYO DE TBARS

- Ácido perclórico *J. T. Backer*
- Detergente biológico Triton®
- Malondialdehido (MDA) bis (dimetyl acetal) 99% *Aldrich*
- (Meta) Arsenito sódico $\geq 99.0\%$ *Sigma-Aldrich*
- Albúmina sérica bovina Molecular Biology Tested *Sigma*
- Ácido 2-tiobarbiturico $\geq 98\%$ *Sigma-Aldrich*
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate *BIO RAD*



10. METODOLOGÍA

10.1.1.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

- KARYO MAX® Colcemid® Solution 10µg/ ml *GIBCO*
- 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) *MP Biochemicals*
- Fitohemaglutinina (Forma M) *GIBCO*
- Heparina Inhepar 1000 UI/ml *PISA*
- Metanol *J. T. Backer*

10.1.2 SOLUCIONES

10.1.2.1 MEDIOS DE CULTIVO

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

10.1.2.2 SOLUCIONES DE USO BIOLÓGICO

- Buffer de Fosfatos (del inglés *Phosphate Buffered Saline*, PBS) pH=7.2- 7.4
- MTT una concentración de 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 Tiobarbitúrico al 0.67%
- Reactivo de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate) Marca BIO RAD
- Stock de Albúmina sérica Bovina 2.2mg/ml
- Stock de Malondialdehído (MDA) 0.01M
- Fitohemaglutinina (PHA)
- Colcemid® o Colchicina 0.04%
- Bromodesoxiuridina (BrdU) a una concentración de 5 µM.
- Cloruro de Potasio al 0.075 M
- Solución de ácido acético-metanol 3:1
- Solución diluida de Giemsa-agua 1:4

10.1.2.3 SOLUCIONES PARA PREPARACION DE NANOPARTÍCULAS

- Ácido acético Glacial
- Quitosán al 0.3%
- Tripolifosfato pentasódico (TPP) 0.1%
- Hidróxido de sodio 1M



10.1.3 EQUIPOS

- Agitador magnético *MRC®*
- Agitador mecánico
*Homogenizer Glas-Col
Variable Speed Reversible*
- Balanza analítica *Sartorius
BL 120S*
- pHmetro *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

10.1.4 MODELOS EXPERIMENTALES

Las líneas celulares utilizadas para este proyecto fueron Hela y Vero.

También se utilizaron linfocitos contenidos en la sangre venosa heparinizada extraída en fresco a un individuo del sexo masculino clínicamente sano.

10.2 MÉTODOS

10.2.1 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

10.2.1.1 CONTROL PECA (20 ML)

A 20 ml de Ácido Acético al 1% se agregó el 1% (p/v) de tensoactivo PLURONIC F-68, se dejó hidratar en reposo completamente (aproximadamente 10-20 minutos). Observando una solución homogénea, se colocó la propela modificada en el agitador mecánico y se accionó el equipo gradualmente hasta aproximadamente 143 rpm. A esta velocidad, se agregó 35 µl del monómero PECA con micropipeta. La adición se hizo lentamente para que se agregaran sólo gotas pequeñas. Se mantuvo la agitación por 1 hora aproximadamente. Siempre se debe observar en el primer minuto pequeñas esferas del monómero y pasado este tiempo se empezará a notar que la solución es turbia blanquecina.



10. METODOLOGÍA

10.2.1.2 CONTROL QUITOSÁN

Se tomaron 20 ml de solución de Quitosán al 0.3% (p/v) en un vaso de precipitados, posteriormente se agregó el 1% (p/v) de tensoactivo PLURONIC F-68(cantidad correspondiente a la solución final). Se dejar hidratar por completo en reposo (30 min aproximadamente). Cuando se observó una solución homogénea, se colocó en el equipo de agitación mecánica e inició la agitación a velocidad moderada; se adicionó a este sistema los 20 ml de la solución de TPP al 0.1% y se aumentó la velocidad gradualmente hasta llegar a aproximadamente 3000 rpm. Se Mantuvo la velocidad de agitación hasta que el volumen de la solución llegaba al borde del recipiente. Se prolongó la agitación durante 1 hora.

10.2.1.3 SISTEMA 1 (QUITOSÁN-PECA)

Se tomaron 20 ml de solución de Quitosán al 0.3% (p/v) y agregó el 1% (p/v) de tensoactivo. Una vez que estuvo completamente hidratado, se colocó la solución en el agitador magnético. Al iniciar la agitación, se agregaron 20 ml de TPP al 0.1% e inmediatamente 35 μ l de monómero PECA (**importante:** no debía pasar más de 5 segundos en este paso). La agitación debió ser muy turbulenta y a gran velocidad. Se mantuvo por 1 hora aproximadamente.

10.2.1.4 SISTEMA 2 (PECA -QUITOSÁN)

A 20 ml de solución de ácido acético 1% se agregó el 1% (p/v) de tensoactivo dejando en reposo hasta su completa hidratación. Posteriormente se agregaron 35 μ l de monómero PECA bajo agitación magnética constante durante 30 minutos. Luego, se agregó el mismo volumen de la solución de TPP al 0.1% (p/v) continuando con la agitación 20 minutos más. Al finalizar este tiempo, se agregó la solución de Quitosán al 0.3% (p/v) agitando por 30 minutos más.

10.2.2 ACONDICIONAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LA CARACTERIZACIÓN

Una vez obtenidas las nanopartículas, se hicieron diluciones a las soluciones (de 1:2 hasta 1:10, dependiendo de la turbidez original de la solución). Para SEM, se tomó un poco de la solución diluida y recién resuspendida con pipeta o cuentagotas, se fijó en un cubreobjetos el cual era previamente limpiado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente evitando el contacto con polvo o impurezas del lugar.

Con respecto a las pruebas en TEM, tamaño de partícula y potencial Z, se entregó una porción de las soluciones diluidas al personal responsable de realizar las pruebas. Para TEM, únicamente se requería una gota fijando en una rejilla de cobre-carbono. Se dejó secar a temperatura ambiente. En cuanto al tamaño de partícula y potencial Z, las



determinaciones se realizaron en solución y en celdas especiales para las determinaciones descritas, estableciendo las especificaciones de materiales y disolventes en el equipo.

10.2.3 ACONDICIONAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LOS CULTIVOS CELULARES

A las soluciones de nanoparticuladas se les midió pH, el cual es ácido (alrededor de 2.3–2.4) por lo que para la administración a los cultivos celulares se requirió un pH cercano al fisiológico, sin comprometer la estabilidad de las nanopartículas; se añadió por goteo hidróxido de sodio 1M hasta conseguir elevar el pH. Posteriormente, las soluciones fueron filtradas en ambiente estéril con filtros tipo pirinola de poro 0.2µm. Las estas condiciones descritas en éste apartado serán consideradas en adelante como formulaciones finales.

La administración se realizó de la siguiente manera:

- NEGATIVO: células sin tratamiento o exposición a agente tóxico.
- POSITIVO: para los casos que aplique, se administró una solución de Arsenito de Sodio (AsNO_2) $1 \times 10^{-3} \text{M}$ estéril.
- 50 y 100: cantidad en micro litros (µl) de las nanopartículas neutras y estériles.

10.2.4 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

El mantenimiento de los cultivos para las líneas celulares se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sembraron las células en suspensión en cajas Petri plásticas con superficie para cultivo celular y añadió medio Advanced DMEM suplementado al 5% y 3% para las células Vero y Hela, respectivamente. Después de 48 a 72 horas de incubación se llegó a un estado de confluencia y posteriormente fueron tripsinizadas para recuperar las células en suspensión y realizar subcultivos. Las condiciones de incubación fueron a 37° C, 5% de ambiente de CO_2 y 90% de humedad Relativa en completa esterilidad.

Con respecto a los cultivos de linfocitos el mantenimiento *in vitro* se realizó como sigue: una vez que se extrajo la sangre con aguja estéril y previamente heparinizada, inmediatamente se cultivó en tubos estériles con el medio y tratamiento correspondiente. Se incubó por 72 horas a 37° C a condiciones asépticas.

10.2.5 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR MTT

El ensayo de viabilidad se realizó en dos líneas celulares diferentes, las células Hela (células transformadas de cáncer cervicouterino) y Vero (células transformadas de riñón de mono verde africano). Los cultivos empleados para la exposición a las nanopartículas se mantuvieron hasta su confluencia en placas de cultivo (NUNC). Una vez en confluencia



10. METODOLOGÍA

total, se expusieron durante 6 horas a los sistemas nanoparticulados en estudio. Cuando transcurrieron 2 horas de cultivo se agregaron 10 μ l de MTT a una concentración de 5 mg/ml obteniendo en cada pozo un volumen total de 1 ml. Se dejó incubando por 4 horas más. Transcurrido el tiempo se retiró el medio de cultivo de cada pozo y 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 las placas durante 10 minutos a 150 rpm con objeto de extraer el azul de formazán (soluciones desde morado hasta amarillo) y posteriormente se realizó la lectura a $\lambda=590$ nm en espectrofotómetro.

10.2.5.1 CÁLCULO DE VIABILIDAD CELULAR POR MTT

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

10.2.6 ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN

Se llevó a cabo en las líneas celulares mencionadas. Para la determinación de las especies reactivas al Acido Tiobarbitúrico (TBARS) y de proteínas totales se realizaron curvas de calibración estándar. En el caso de TBARS, se realizó una curva de calibración usando como reactivo stock Malondialdehido (MDA). Con respecto a la estimación de proteínas totales, el reactivo stock utilizado fue albúmina sérica bovina (SBA). Ambas curvas de calibración correlacionan la absorbancia obtenida con la concentración de TBARS por mg de proteínas totales de cada muestra (mM de TBARS/mg de proteína total en las células). Las determinaciones, tanto para las curvas de calibración estándar como de las muestras analizadas, se realizaron en un equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de 595 y 535 nm, respectivamente.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford. Se basa en la unión de un colorante, *Comassie Blue G-250* (también *Serva Blue*) a las proteínas. Se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre que tiene un máximo de 595 nm. Este método depende, de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes, tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Este método es sensible (1–15 μ g), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.



Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la albúmina sérica bovina (Hammond, 1988).

10.2.6.1 ESTIMACION DE ESPECIES REACTIVAS AL ACIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Una vez que las células llegaron a confluencia y pasaron 6 horas expuestas al tratamiento (Nanopartículas), se retiró el medio de cultivo y lavaron las células con PBS pH=7.4 frío. Se retiró por completo la solución y agregó 1 ml de PBS frío a cada pozo para obtener las células por raspado. Se mantuvieron las células en tubos Eppendorf para centrifugar y después el botón que se obtuvo resuspendido en PBS-Tritón frío para llevar a ultrasonido.

Ya sonificado, se tomaron 10 μ l de cada solución y depositaron en tubos Eppendorf debidamente etiquetados, posteriormente se realizó la determinación de proteínas.

Al volumen restante, se agregó aproximadamente 250 μ l de Ácido Perclórico o el volumen equivalente de la muestra. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 10 minutos. El sobrenadante se hizo reaccionar con 500 μ l de Ácido Tiobarbitúrico al 0.67% y después de incubar a 90° C por 30 minutos y se leyeron las muestras a λ = 535 nm en espectrofotómetro.

10.2.6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD

A los 10 μ l que se tomaron de cada muestra, se les añadió 1 ml de Reactivo de Bradford (*Biorad*) y se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente y leer a λ =595 nm en espectrofotómetro.

10.2.6.3 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROTEÍNAS TOTALES CON REACTIVO DE BRADFORD

Se preparó el reactivo de Bradford (Biorad) tomando una parte de éste más 3 de agua desionizada. Así mismo, para la curva de calibración se preparó el *stock* de albúmina a una concentración de 2.2 mg/ml. De igual forma, se realizaron al menos 5 sistemas cuyos valores de absorbancia incluyeron los obtenidos en las muestras a analizar.

El orden de adición fue el siguiente: alícuota del *stock* de albúmina (o la dilución de esta, según sea el caso), agua desionizada para tener 100 μ l de solución y finalmente 1 ml de reactivo de Bradford preparado. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 minutos y leer a λ = 595 nm.



10. METODOLOGÍA

10.2.6.4 CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO- MALONDIALDEHÍDO (TBA)-(MDA)

El *stock* de Malonaldehído (MDA) se preparó una concentración de 0.01M cubriendo siempre de la luz y manteniendo en refrigeración.

Se definieron los sistemas (al menos 5) cuyas concentraciones de MDA se encontraban en el rango de las lecturas obtenidas de las muestras a analizar. A cada alícuota se añadió MDA, agua desionizada y 500 μ l de TBA para tener siempre 1 ml de solución. Se dejó incubando a 90° C por 30 minutos y leyó en equipo espectrofotométrico a $\lambda = 535$ nm.

10.2.6.5 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.

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

10.2.7 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se realizó con sangre periférica humana después de 72 horas de haber incubado; la exposición al tratamiento (nanopartículas) fue de 24 horas en medio RPMI.

El 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, el cual sirve para conocer la velocidad de proliferación.

10.2.7.1 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

A 5 ml de medio de cultivo RPMI suplementado se añadió fitohemaglutinina (PHA), Bromodesoxiuridina (BrdU) y finalmente 0.5 ml de sangre heparinizada la cual había sido extraída minutos antes de la siembra en condiciones asépticas. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C en ambiente estéril por 72 horas. 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® o 230 μ l de Colchicina al 0.04%.

Después de centrifugar, se agregaron a cada botón 5 ml de la solución de Cloruro de Potasio 0.075M y se dejaron incubando las muestras a 37° C por 30-40 minutos. Después se agregó únicamente al botón celular solución fijadora (ácido acético-



metanol) y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Este paso se realizó en repetidas ocasiones hasta observar la solución y botón de cada muestra completamente clarificado.

Se prepararon las laminillas por goteo, en el cual se esperó romper los núcleos, y tñió con solución de Giemsa en agua (1:4) por 2 minutos.

10.2.7.2 CÁLCULO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

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

10.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó cada prueba por duplicado con 3 repeticiones por condición en diferentes días; en los gráficos se presentan los datos promedio y desviación estándar para cada muestra comparando con un Negativo, el cual para todos los casos, no contiene nanopartículas es decir, es únicamente el comportamiento de las muestras biológicas en un ambiente *in vitro*. El análisis estadístico que se realizó es Tukey (comparación múltiple de medias) al 90% de confianza en programa OriginPro Ver. 8 SRO, con el cual se conocen las diferencias significativas entre las pruebas realizadas.



11.RESULTADOS

11.1 CARACTERIZACIÓN

11.1.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se realizó una prueba del tamaño de partícula a las soluciones las cuales únicamente contenían el monómero y/o el polisacárido en solución con un pH de aproximadamente 2.4, tales condiciones se les considera como formulación inicial. Posteriormente, se realizó una segunda prueba al tamaño de partícula a las soluciones debido a que se modificaron las condiciones de fabricación de la siguiente manera: adición de un tensoactivo no iónico, aumento en el pH de las soluciones a uno cercano al fisiológico, implementación de un método de esterilización el cual fue la filtración por membrana con poro 0.2 μm . las muestras fabricadas a estas condiciones se consideraron como formulación final.

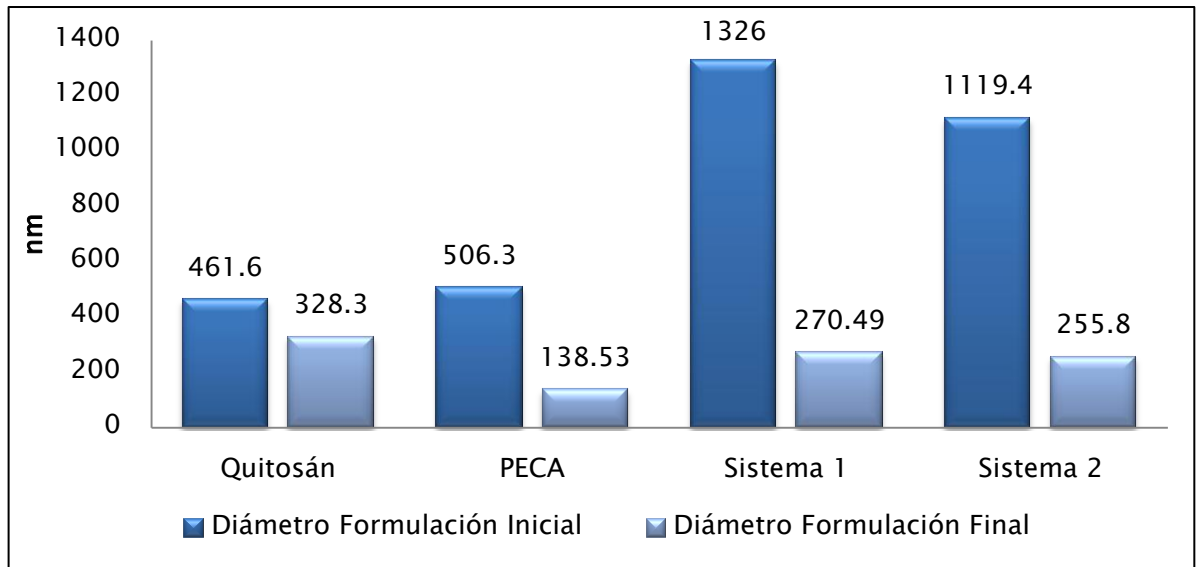


Gráfico 1. Comparación del Diámetro promedio de los sistemas nanoparticulados fabricados con la formulación inicial y los sistemas fabricados con la formulación final.

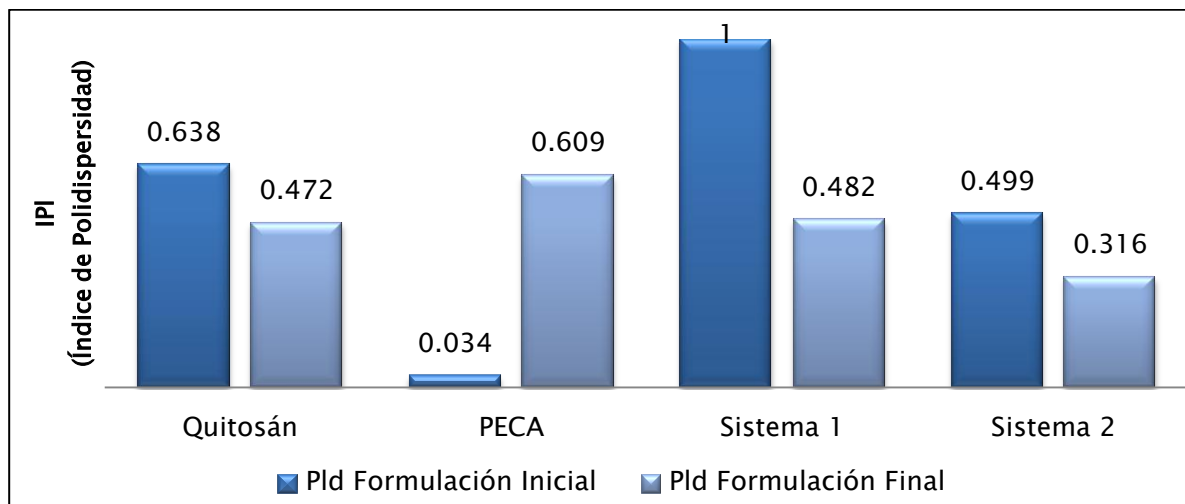


Gráfico 2. Índice de Polidispersidad (PI) de los sistemas nanoparticulados. Resultados de los sistemas fabricados con la formulación inicial y los sistemas fabricados con la formulación final.

Este gráfico indica el tipo de dispersión en la población observada en la muestra durante el análisis, teniendo valores de 0 a 1, siendo 0 una población monodispersa o con un tamaño uniforme en toda la muestra y 1 refiere a una población polidispersa o con múltiples tamaños en la muestra.

11.1.2 POTENCIAL Z

Valores de Potencial Z obtenidos en el equipo Zetasizer Nano Z de las soluciones con nanopartículas fabricadas a las diferentes condiciones establecidas.

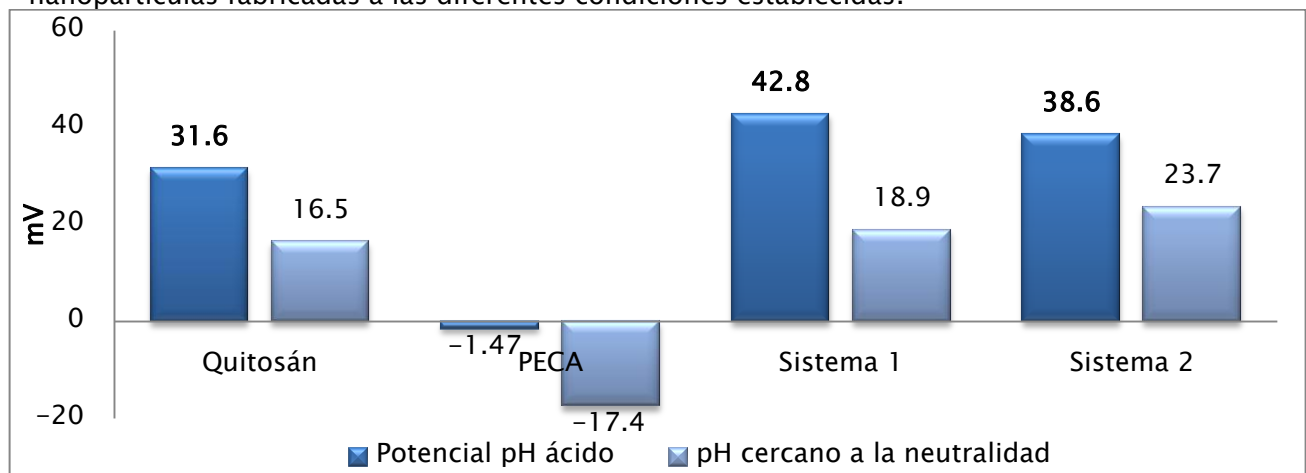


Gráfico 3. Potencial Z de los sistemas nanoparticulados con pH ácido (alrededor de 2.54) y pH cercano a la neutralidad.

Los valores señalados en negritas son considerados como estables de acuerdo a su valor y lo que dice la literatura (Mohanraj & Y Chen, June 2006).



11. RESULTADOS

11.1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

A continuación se muestran imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido (SEM)¹ de los sistemas de nanopartículas fabricados. Las imágenes de la izquierda refieren a las nanopartículas fabricadas con una fórmula inicial y a la derecha se observan las nanopartículas fabricadas con una formulación final. La escala que se muestra en la parte inferior de cada imagen representa 1 μm .

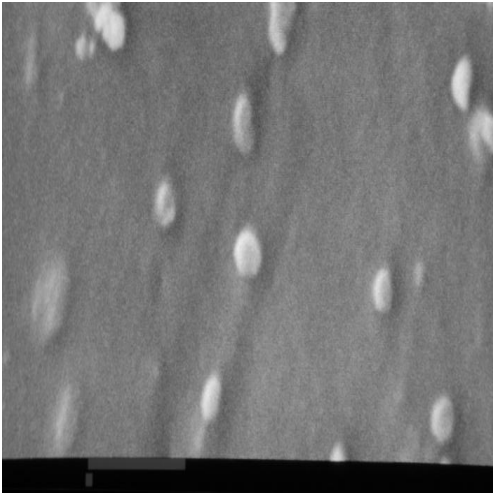


Figura 22. Micrografía de las nanopartículas de PECA en la formulación **inicial** (20,000X)

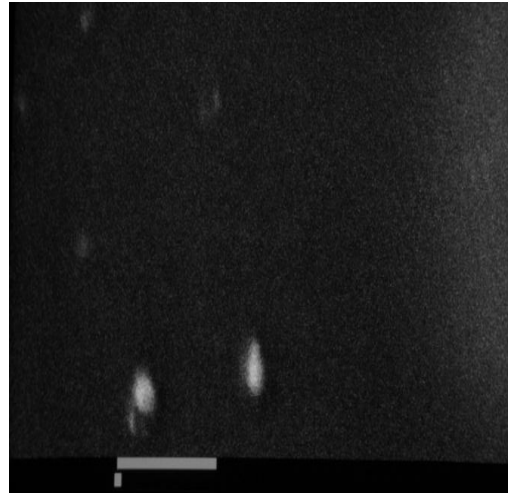


Figura 23. Micrografía de las nanopartículas de PECA en la formulación **final** (20,000X)

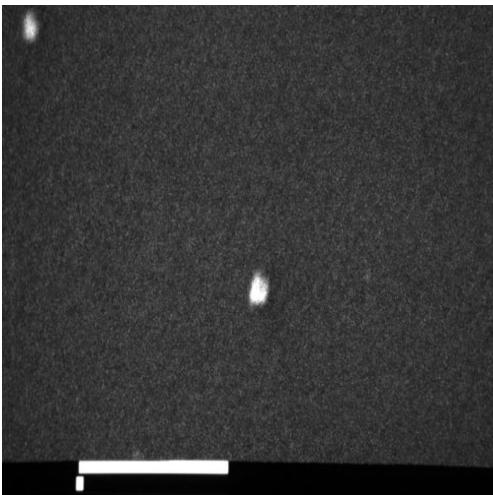


Figura 24. Micrografía de las nanopartículas de Quitosán en la formulación **inicial** (30,000X)

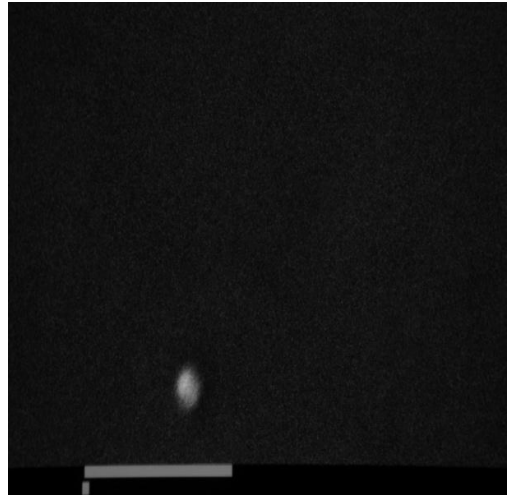


Figura 25. Micrografía de las nanopartículas de Quitosán en la formulación **final** (30,000X)

¹ Imágenes tomadas por el Técnico Académico Rodolfo Robles en Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

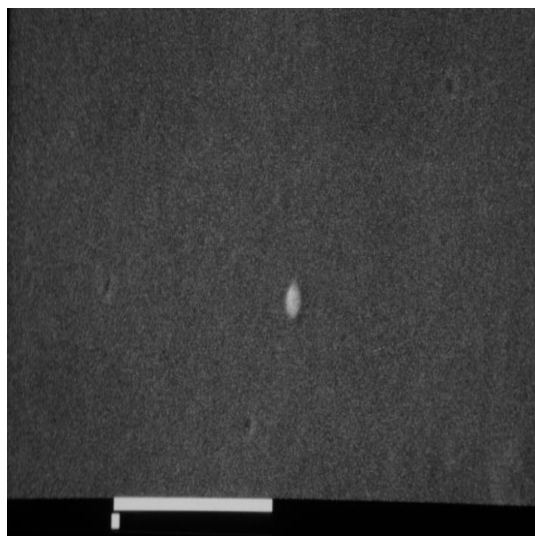


Figura 26. Micrografía de las nanopartícula del Sistema 1 (Quitosán y PECA) en la formulación **inicial** (30,000X)

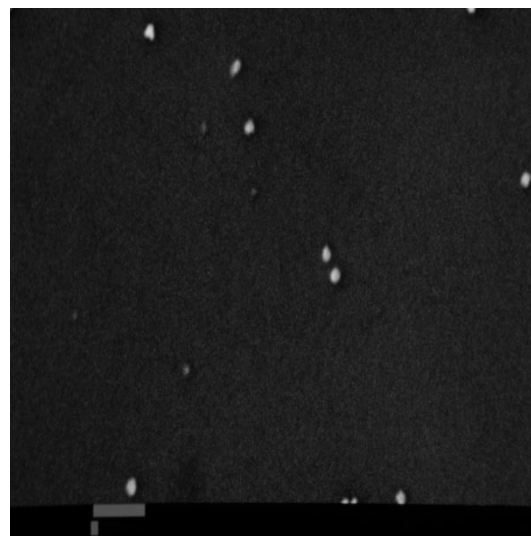


Figura 27. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 1 (Quitosán y PECA) en la formulación **final** (10,000X)

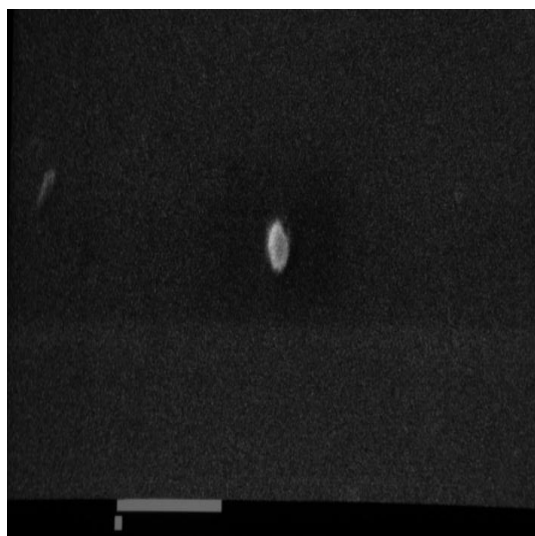


Figura 28. Micrografía de las nanopartícula del Sistema 2 (PECA y Quitosán) en la formulación **inicial** (20,000X)

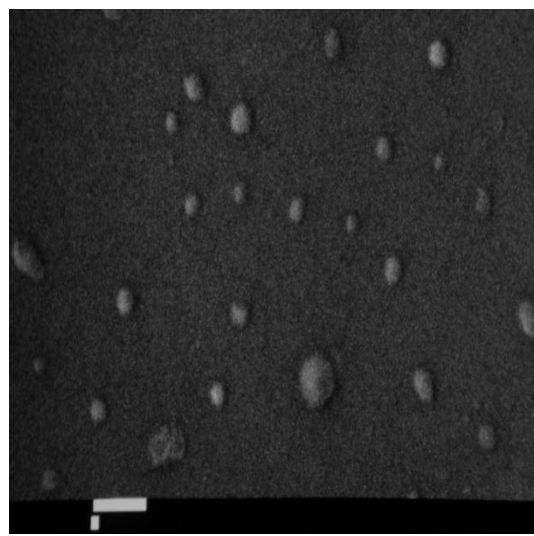


Figura 29. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 2 (PECA y Quitosán) en la formulación **final** (10,000X)



11. RESULTADOS

11.1.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Las muestras a evaluar se prepararon y acondicionaron a las condiciones descritas. Para su observación, debían estar completamente secas y fijadas o adheridas en rejillas de carbono-cobre.

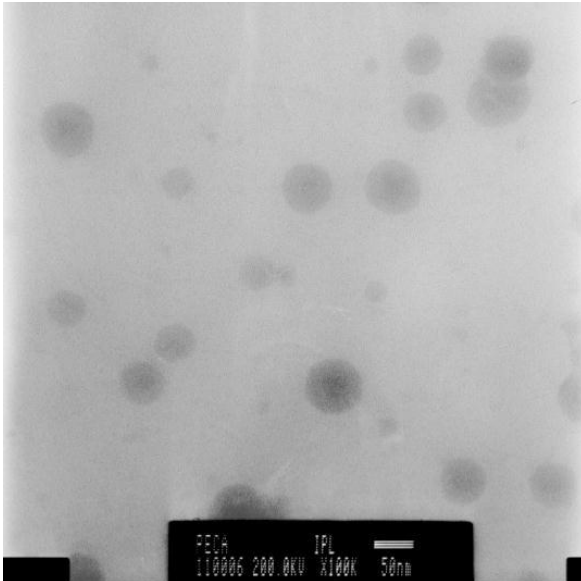


Figura 30. Micrografía de las nanopartículas del Sistema Control PECA (100,000X)

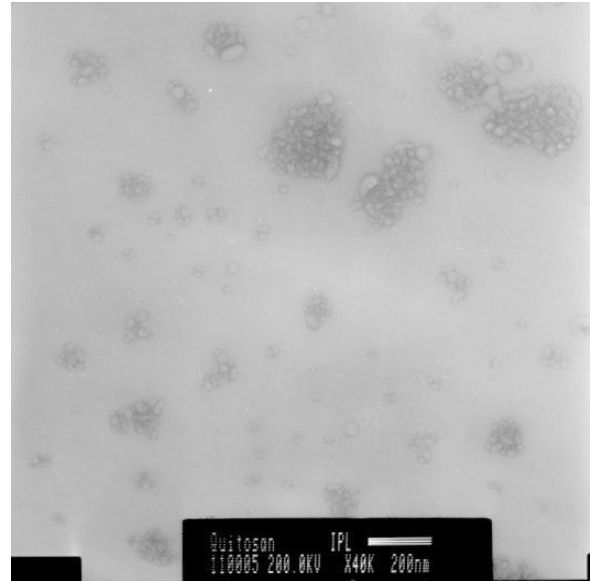


Figura 31. Micrografía de las nanopartículas del Sistema Control Quitosán (40,000X)

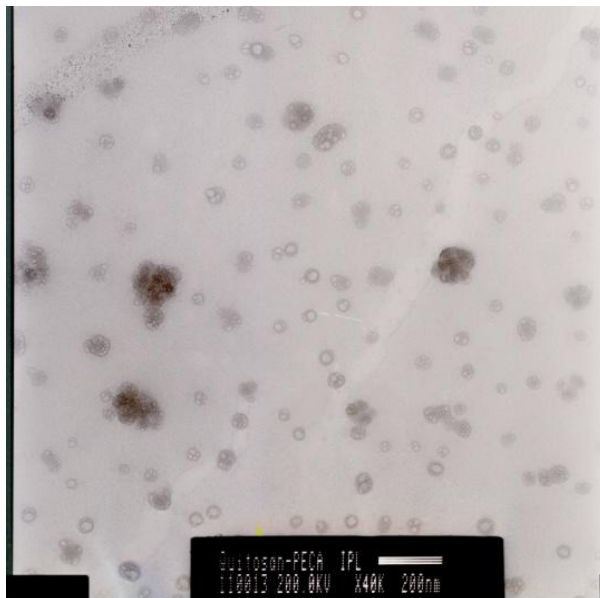


Figura 32. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 1 (Quitosán-PECA) (40,000X)

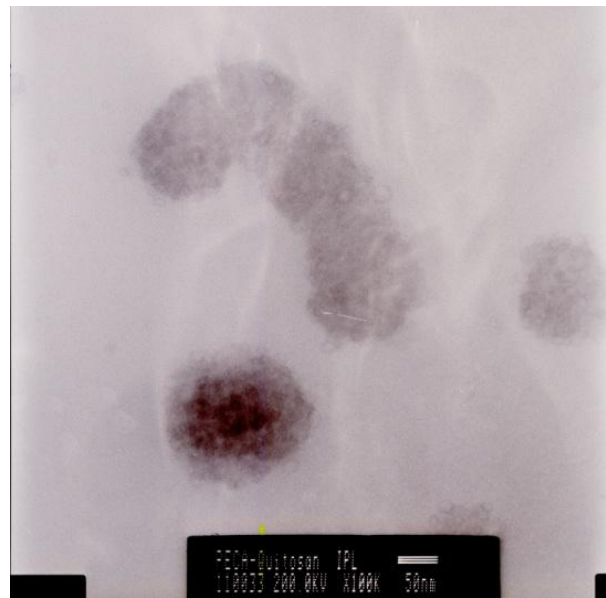


Figura 33. Micrografía de las nanopartículas del Sistema 2 (PECA-Quitosán) (100,000X)



Tabla 3. Resumen de caracterización fisicoquímica de las nanopartículas fabricadas a las condiciones antes descritas.

| MUESTRA | FORMA | | ESTRUCTURA APARENTE | | TAMAÑO (nm) | | Ipd | | POTENCIAL Z (mV) | |
|-----------|---------|-------|---------------------|-------|-------------|--------|---------|-------|------------------|-------|
| | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | Final |
| QUITOSÁN | E | E | SR | SR | 461.6 | 328.3 | 0.638 | 0.472 | 31.6 | 16.5 |
| PECA | E | E | R | R | 506.3 | 138.53 | 0.034 | 0.609 | -1.47 | -17.4 |
| SISTEMA 1 | E | E | R | R | 1326 | 270.49 | 1 | 0.482 | 42.8 | 18.9 |
| SISTEMA 2 | E | E | R | R | 1119.4 | 255.8 | 0.499 | 0.316 | 38.6 | 23.7 |

Inicial: Soluciones ácidas (pH aproximado de 2.4)

Final: Aumento de pH cercano al fisiológico, adición de tensoactivo y filtradas por membrana de poro 0.2 μm

Ipd= Índice de Polidispersidad

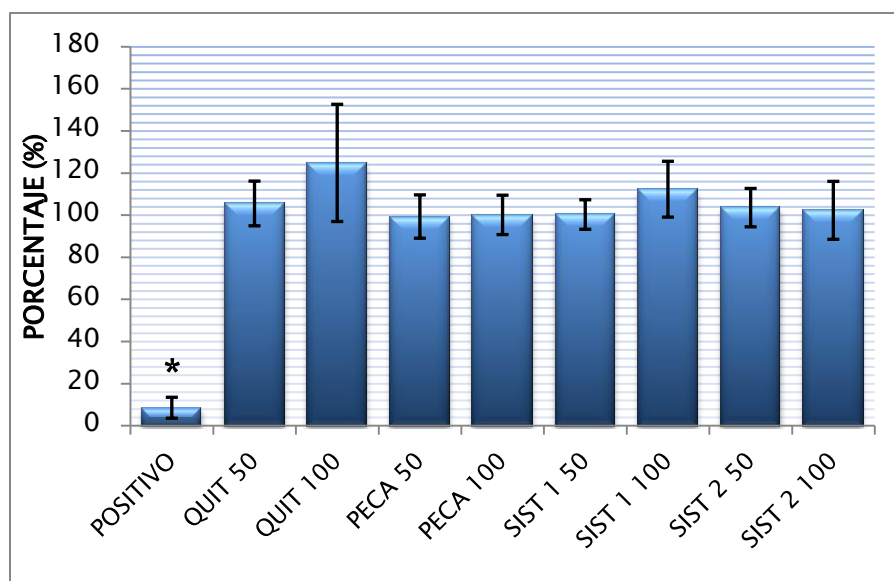
E= Esférica

R=Rígida

SR= Semirrígida

11.2 EVALUACIONES CITOTOXICOLÓGICAS

11.2.1 VIABILIDAD CELULAR



| MUESTRA | PROM. \pm DESV. EST. |
|-------------------------|------------------------|
| POSITIVO | 8,597 \pm 4,972 |
| QUITOSAN ₅₀ | 124,859 \pm 27,826 |
| QUITOSAN ₁₀₀ | 105,595 \pm 10,615 |
| PECA ₅₀ | 100,175 \pm 9,351 |
| PECA ₁₀₀ | 99,386 \pm 10,293 |
| SIST 1 ₅₀ | 112,378 \pm 13,252 |
| SIST 1 ₁₀₀ | 100,351 \pm 7,011 |
| SIST 2 ₅₀ | 102,339 \pm 13,750 |
| SIST 2 ₁₀₀ | 103,621 \pm 9,107 |

Gráfico 4. Porcentaje de viabilidad de células Vero expuestas a las nanopartículas referenciadas con el control negativo (muestras sin exposición a las nanopartículas) el cual se considera al 100% de viabilidad. Las barras marcadas con * prueba diferencias estadísticamente significativas.



11. RESULTADOS

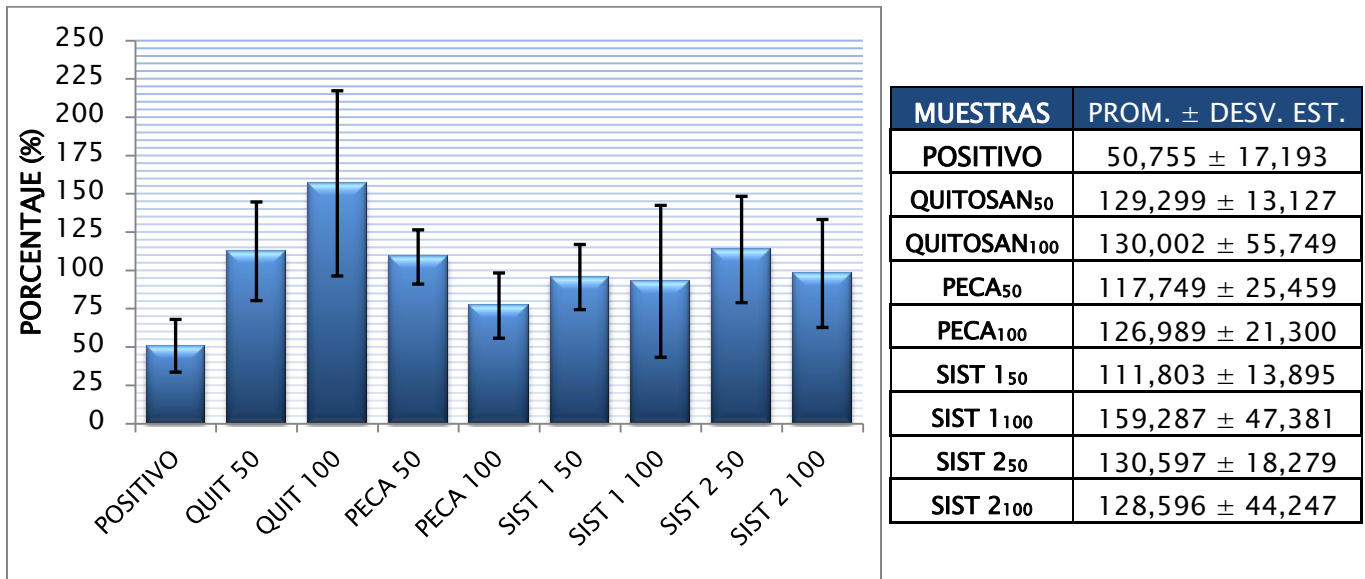


Gráfico 5. Porcentaje de viabilidad de células Hela expuestas a las nanopartículas referenciadas con el control negativo (muestras sin exposición a las nanopartículas) el cual se considera al 100% de viabilidad. Las barras marcadas con * prueba diferencias estadísticamente significativas.

En los gráficos 4 y 5 se hace la comparación entre las dosis administradas, que fue de 50 y 100 μ l, de acuerdo a la línea celular probada.

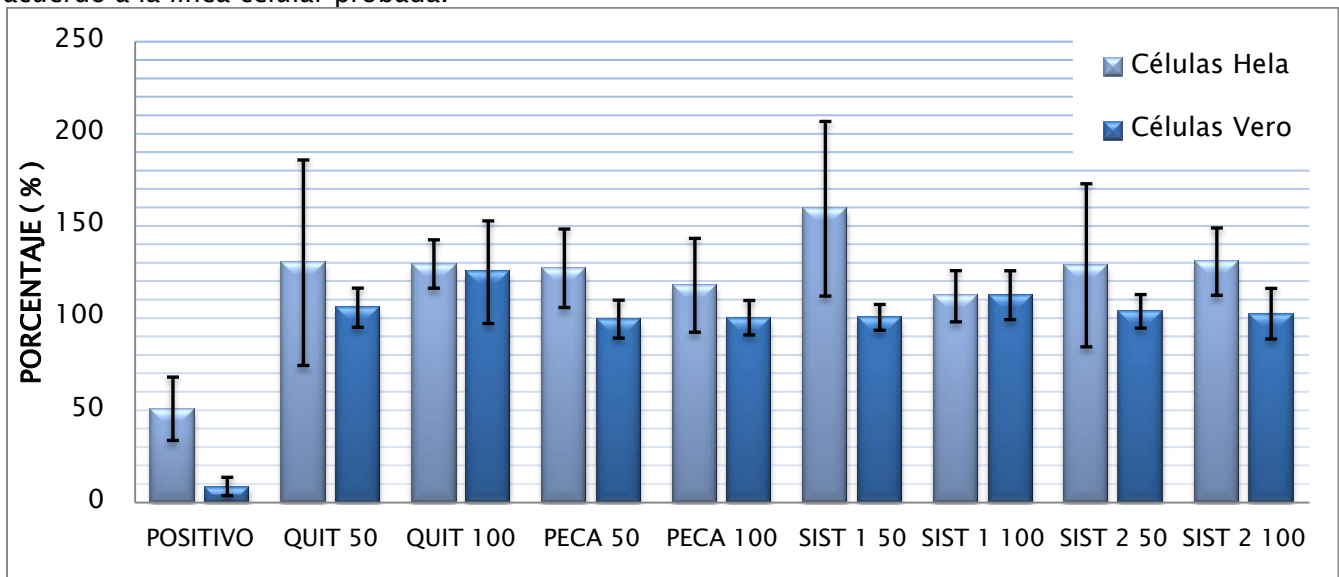


Gráfico 6. Porcentaje de viabilidad entre las estirpes celulares probadas al exponerlas con las nanopartículas



11.2.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO: TBARS

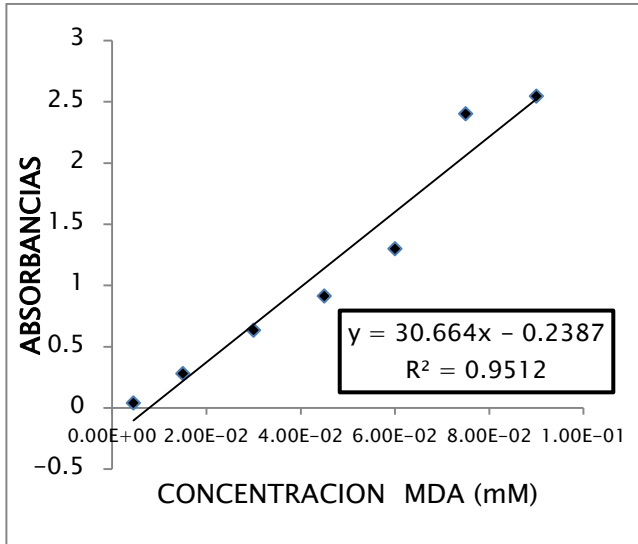


Gráfico 7. Curva de Calibración para cuantificar las especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) usando como Stock Malondialdehído (MDA) a 3 mM.

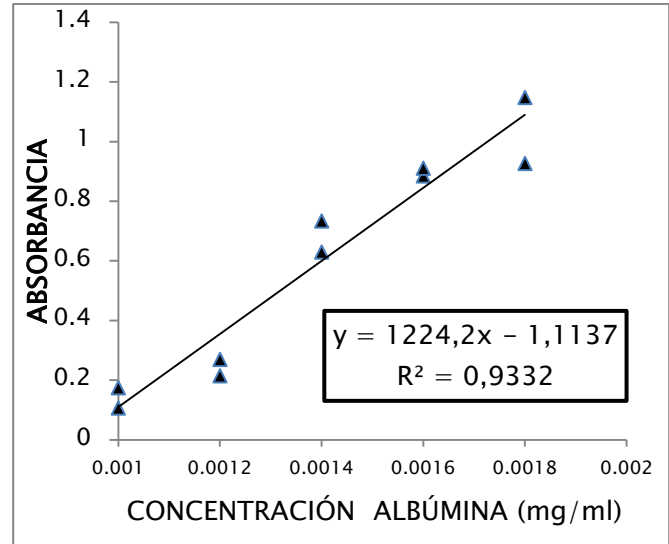
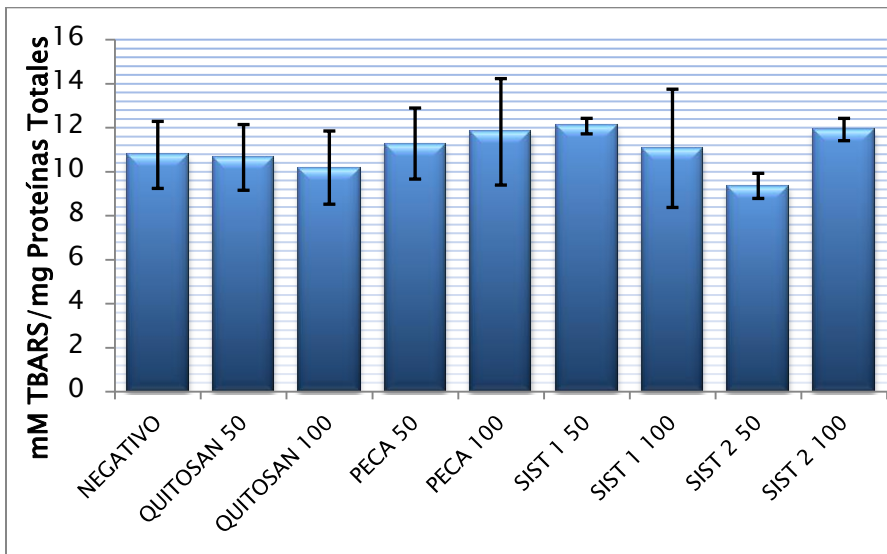


Gráfico 8. Curva de Calibración para cuantificar Proteínas usando como Stock Albúmina Sérica Bovina a 0.22 mg/ml.

Usando los parámetros como ordenada al origen (b) y pendiente (m) de las ecuaciones correspondientes a cada curva de calibración, se correlacionan los datos obtenidos en absorbancias en cada muestra, para así tener la concentración en milimoles (mM) de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) por miligramo (mg) de Proteínas Totales (mM TBARS/mg Prot. Totales).



| MUESTRAS | PROM. ± DESV. EST. |
|-------------------------|--------------------|
| NEGATIVO | 10.764 ± 1.524 |
| QUITOSAN ₅₀ | 10.186 ± 1.664 |
| QUITOSAN ₁₀₀ | 10.650 ± 1.494 |
| PECA ₅₀ | 11.813 ± 2.420 |
| PECA ₁₀₀ | 11.279 ± 1.615 |
| SIST 1 ₅₀ | 11.063 ± 2.688 |
| SIST 1 ₁₀₀ | 12.073 ± 0.353 |
| SIST 2 ₅₀ | 11.918 ± 0.507 |
| SIST 2 ₁₀₀ | 9.355 ± 0.571 |



11. RESULTADOS

Gráfico 9. Estimación de TBARS. Las cantidades están expresadas en mM por mg de proteínas totales en células Vero expuestas a las nanopartículas.

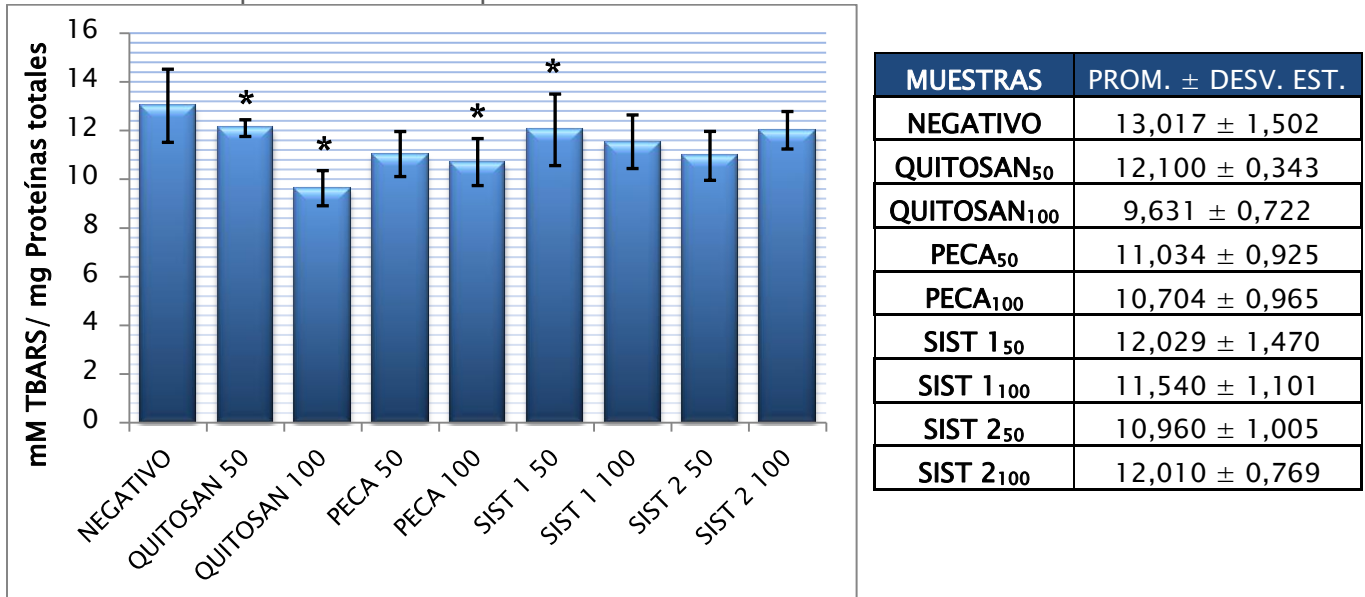


Gráfico 10. Estimación de TBARS. Cantidades expresadas en mM por mg de proteínas totales en células Hela expuestas a las nanopartículas. Las barras marcadas con * prueba diferencias estadísticamente significativas.

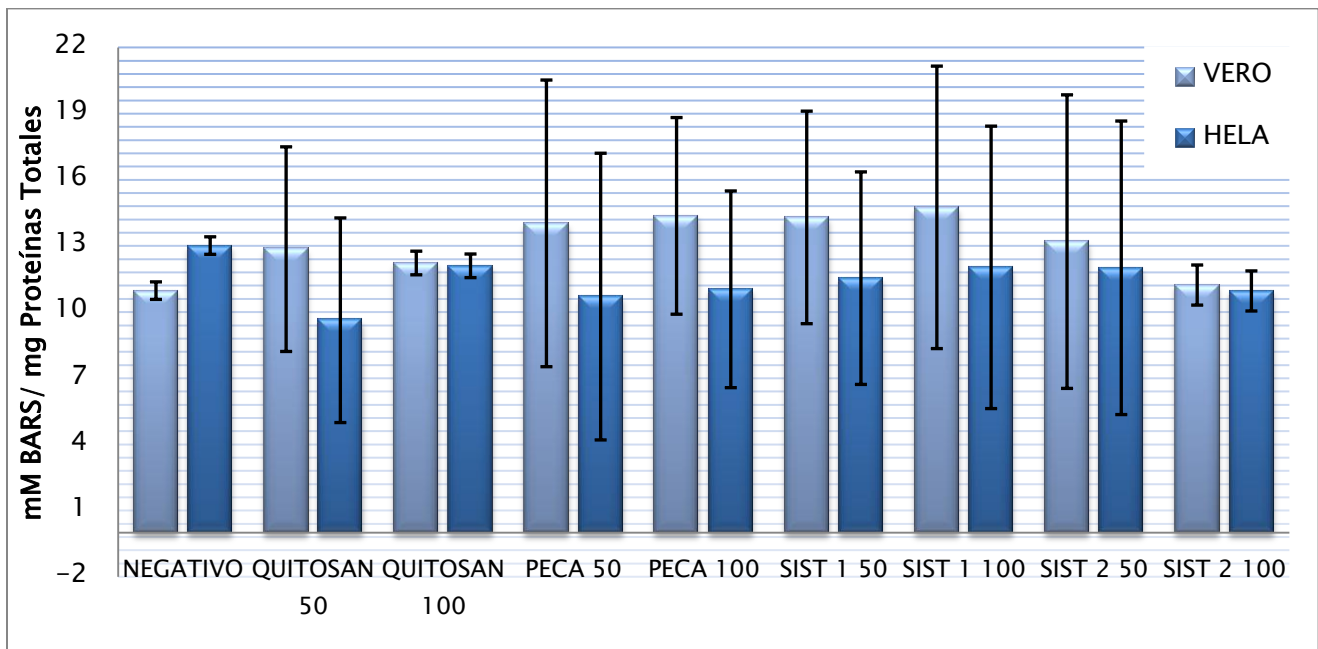


Gráfico 11. Comparación de la cuantificación de TBARS obtenidas entre estirpes celulares probadas al exponerlas con las nanopartículas.



11.2.3 PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS

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

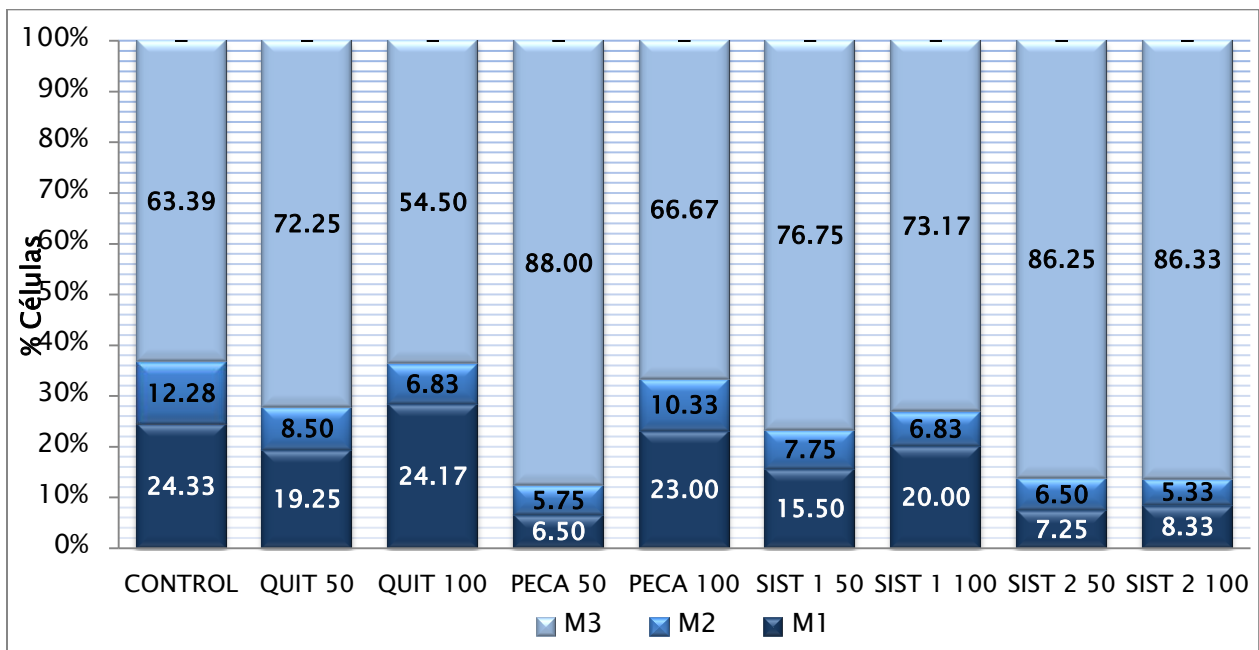
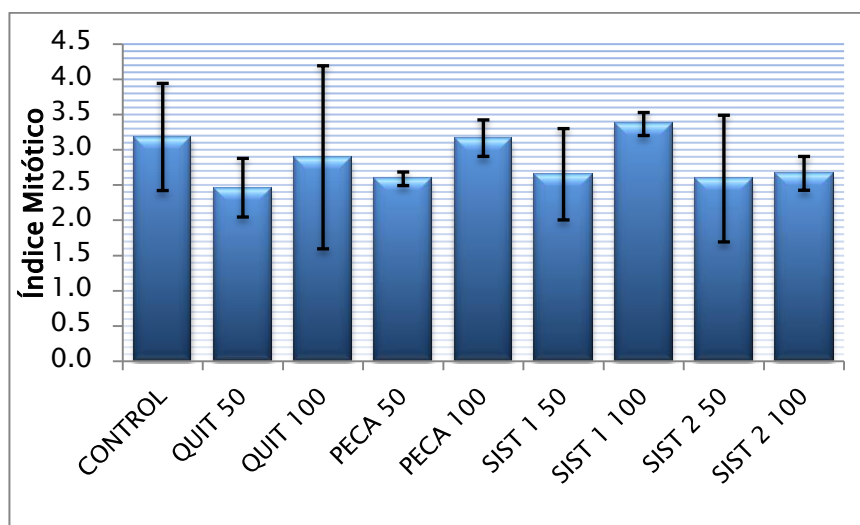


Gráfico 12. Porcentaje obtenido de Primeras (M1), Segundas (M2) y Terceras o subsecuentes (M3) metafases al conteo total de las 100 mitosis consecutivas.



| MUESTRA | PROM. ± DESV EST |
|-------------------------|------------------|
| NEGATIVO | 3,509 ± 0,926 |
| QUITOSAN ₅₀ | 2,588 ± 0,089 |
| QUITOSAN ₁₀₀ | 3,242 ± 0,781 |
| PECA ₅₀ | 2,462 ± 0,792 |
| PECA ₁₀₀ | 3,630 ± 0,745 |
| SIST 1 ₅₀ | 2,653 ± 0,553 |
| SIST 1 ₁₀₀ | 3,437 ± 0,194 |
| SIST 2 ₅₀ | 2,591 ± 0,741 |
| SIST 2 ₁₀₀ | 2,799 ± 0,428 |

Gráfico 13. Índice Mitótico de los linfocitos expuestos a las nanopartículas



11. RESULTADOS

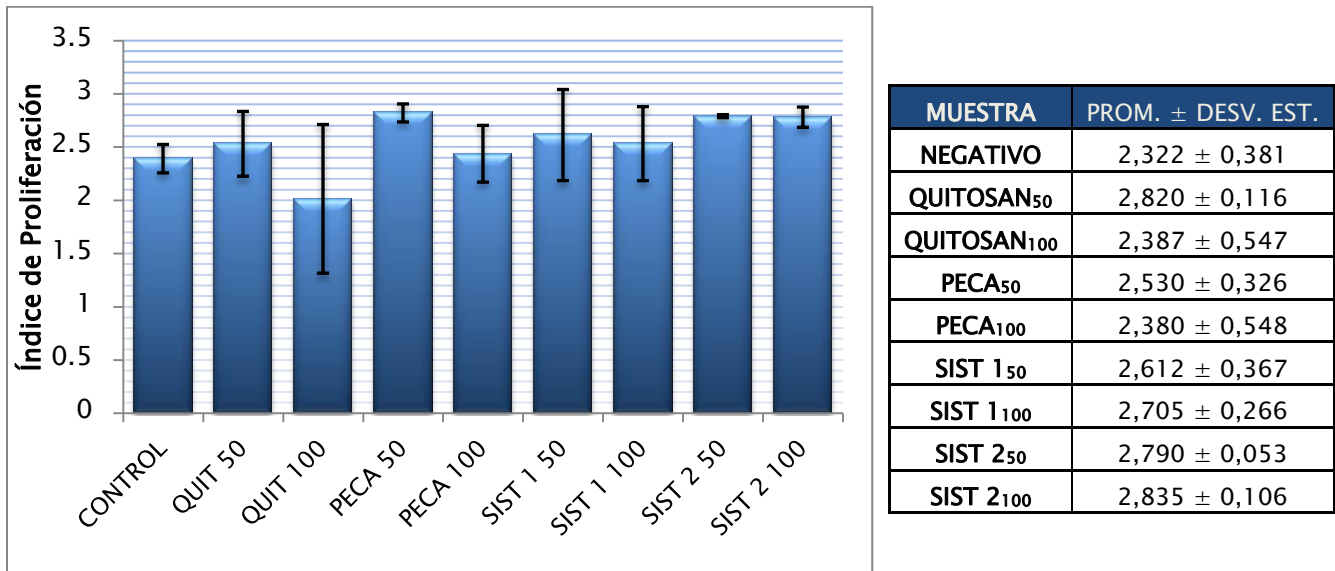


Gráfico 14. Índice de Proliferación celular en linfocitos expuestos a las nanopartículas

Cabe señalar que se observaron células binucleadas en las muestras observadas y en algunos casos células multinucleadas, aneuploidias o la presencia de micronúcleos lo cual será discutido posteriormente. Las siguientes imágenes muestran el tipo de alteraciones encontradas en algunas muestras observadas.



Figura 34. Célula trinucleada con micronúcleo (100 X)

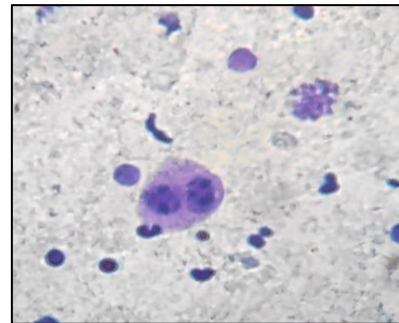
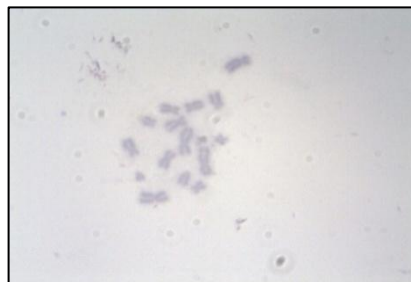
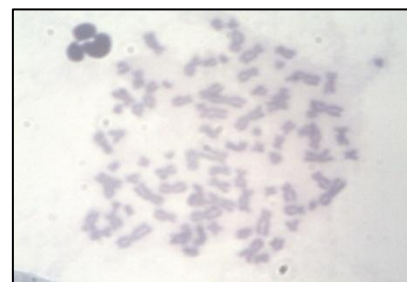


Figura 35. Célula binucleada (40X)



Célula con aneuploidias (100 X)



*Las imágenes que aquí se muestran son tomadas del presente trabajo de las muestras observadas.



12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

12.1 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Se obtuvieron nanopartículas esféricas en un rango de tamaño de 50 hasta 400 nm, estables a pH ácido. Se logró obtener nanopartículas de tamaño menor o igual a 200 nm (**ver tabla 3**), después de haber sido filtradas por membranas con un tamaño de poro de 2 μm para su esterilidad conservando sus características aún con las modificaciones de las formulaciones y así poder administrarse en cultivos celulares, como cambios de pH (fisiológico), la adición de un tensoactivo y la filtración por membrana

En cuanto al sistema control de Quitosán (**ver tabla 3, valores de Quitosán**), después de haber modificado la formulación y haberse filtrado, se observa que su tamaño es mayor a 200 nm, lo cual se asume al observar las micrografías obtenidas en TEM. Su estructura semirrígida hace que se adecúe al tamaño de poro de la membrana y pase a través de ella. El potencial Z se modificó considerablemente ya que este material es muy susceptible a cambiar su estabilidad al incremento de pH dada su influencia directa sobre ellas. El pH óptimo para su estabilidad está por debajo de 3, mismo que se mantuvo en la formulación inicial pero fue modificado a pH 5 al ser acondicionado para administrarse en los cultivos celulares; esto aumenta su tamaño y por esto se afecta su estabilidad, observando aglomeraciones; lo anterior se observa en el valor de Potencial Z obtenido.

En el sistema control de PECA (**ver tabla 3, valores de PECA**) se identifica que las condiciones de fabricación iniciales son de una estructura rígida y uniforme, su tamaño tiene una distribución homogénea a pH ácido y, aún sin filtrarse, tiene tamaño nanométrico además de un potencial Z negativo. Al modificar la formulación, se observa que disminuye su tamaño pero existe una distribución heterogénea en el tamaño de la muestra y el potencial Z se modifica considerablemente aumentando su valor de -1.47 a -17.4 , muy cercano al punto isoeléctrico de la solución, lo que genera que la estabilidad sea mala y que las partículas posiblemente se aglomeren.

En el sistema 1 o Quitosán-PECA (**ver tabla 3, valores de Sistema 1**) se lograron formar nanopartículas con ambos materiales, las cuales tienen una apariencia rígida en el exterior que es proporcionada por el monómero PECA y en su interior se observan esferas semirrígidas de Quitosán. La fabricación de este sistema generó la existencia de nanopartículas de múltiples tamaños desde los 20 nm en adelante, esto se observa en las micrografías y se corrobora con el valor del PId. Se tiene un potencial Z positivo lo cual se atribuye a la influencia del Quitosán y sus valores; al ser acondicionados disminuyen su valor el cual puede considerarse inestable o con posibilidades de aglomerar sus componentes, sin embargo, las soluciones continuaron traslúcidas.



12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el segundo sistema mezclado PECA–Qitosán (**ver tabla 3, valores de Sistema 2**) se observan nanopartículas con los dos componentes, estando en la parte externa el polisacárido Qitosán y en la interna las esferas de PECA. En este caso, se obtuvieron nanopartículas con tamaños más regulares entre sí por encima de los 100 nm después de su acondicionamiento.

El potencial Z de los sistemas mezclados (**ver gráfico 3**) es positivo y considerado como estable lo cual es debido a la manera en que interaccionan los componentes de las nanopartículas ya que al estar de forma hibridada en sus cargas independientes habrá un balance para formar una carga neta superficial la cual, al ser positiva la impone el Qitosán y puede ser este componente quien esté en mayor proporción con respecto al PECA.

La aglomeración de las partículas ocurre dado que, al modificar el pH agregando iones OH^- o H_3O^+ , causará una disminución del potencial Z debido a la compresión de la doble capa eléctrica. La teoría DLVO explica la tendencia de los coloides a aglomerarse o permanecer separados al combinar la atracción de Van der Waals y la curva de repulsión electrostática. Para aglomerar dos partículas que van a chocar, éstas deben tener suficiente energía cinética, debido a su velocidad y masa como para pasar sobre la barrera de energía. Si la barrera desaparece, entonces la interacción neta es totalmente atractiva y consecuentemente las partículas se aglomeran. Esta región interna es referida como la trampa de energía, pues los coloides pueden considerarse como sistemas unidos por fuerzas de Van der Waals (Sandoval, Montellano, & Piña, 2005).

Posiblemente en este caso, el tamaño y el potencial Z de las nanopartículas fueron características fundamentales al ser expuestas en las líneas celulares probadas, ya que existían de tamaños muy pequeños y muy probablemente pudieran atravesar la membrana celular. Con respecto a la carga superficial de las nanopartículas, contribuyen entre sí a que no hayan agregados y se mantenga la estabilidad hasta su interacción con la célula y los procesos metabólicos que en ésta se efectúen. Sin embargo, al aumentar el pH de las soluciones nanoparticuladas, se modificaron los valores del potencial (**Tabla 3 y Gráfico 3**) y esto impacta en la estabilidad de las soluciones, como se explicó en cada sistema.

Se pretendía ajustar las soluciones a niveles de pH cercano al fisiológico, pero no fue posible elevarlo a más de 5.8 en el caso del sistema control Qitosán pues es susceptible de perder estabilidad si es modificado a un pH por encima de este valor. En los casos de las nanopartículas fabricadas con los dos componentes se lograba aumentar un poco el pH sin alterar su estabilidad.



12.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS

Una vez que se caracterizó cada uno de los sistemas nanoparticulados *in vitro*, se efectuaron los ensayos que evaluaron la capacidad citotóxica, estimando la viabilidad celular, la lipoperoxidación por medio de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico así como la cinética de proliferación celular e índice mitótico.

12.2.1 VIABILIDAD

Realizando el análisis estadístico para la prueba de Viabilidad Celular (**gráfico 4 y 5 y tablas adyacentes**), los resultados muestran que la exposición de las nanopartículas con las células no altera su viabilidad, teniendo valores por encima del 70%; esto indica que es apto para considerar a una célula en condiciones viables, realizando la comparación con respecto al control negativo (sin exposición a agente tóxico). Se encontraron en varios casos que se obtenían valores superiores al 100%. La reducción del compuesto se realiza en la mitocondria y la intensidad del color es el indicativo de la viabilidad de la célula por lo que el hecho de que sean valores superiores con respecto al control refleja únicamente el proceso de reducción que se llevó a cabo en el periodo expuesto, con ello se identifica que es posible que a periodos de exposición mayores se reflejen porcentajes menores debido a la activación de los fenómenos de modulación del estrés oxidativo que ocurre tanto en el organelo probado como en la célula en general.

En el **gráfico 6** se hace una comparación entre estirpes celulares en cuanto a los porcentajes de viabilidad obtenidos de las nanopartículas expuestas a las líneas celulares a las mismas condiciones. Se identifica que las células Hela son ligeramente más resistentes pues se observan valores más elevados con respecto a los datos de las células Vero, sin embargo, no prueba diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia puede deberse al tipo de metabolismo que presenten cada una de ellas o bien, a la susceptibilidad o resistencia presentes en cada caso.

12.2.2 TBARS

Se puede tener un compuesto que genere estrés oxidativo a la célula de manera natural en mecanismos incluidos en la respiración mitocondrial, isquemia/perfusión, inflamación, y metabolismo de compuestos extraños, pero la célula cuenta con sustancias antioxidantes como el Glutación, Ascorbato, Coenzima Q entre otras, y enzimas como Catalasa, Superóxido Dismutasa o peroxidasa, las cuales serán el primer recurso que se agota una vez que la cantidad de radicales libres excede el límite de estas que pueden metabolizarlos. Hay diferentes maneras en las que puede causar daño del estrés oxidativo. En los lípidos, causa una reacción en cadena de peroxidación (lipoperoxidación); en proteínas, hay alteraciones



12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

estructurales en primera, segunda o terceras estructuras. En el ADN, pueden ocurrir deleciones, roturas y uniones a proteínas no programadas y en general, entre otro tipo de daños más específicos.

El estrés oxidativo fue estimado por medio del ensayo que relaciona las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) metabolizándose con el malondialdehído (MDA) y sus productos de degradación, encontrando que no existían radicales libres en forma de lipoperóxidos que alteraran la integridad membranal; se argumenta lo anterior con los resultados aunque no son estadísticamente significativos y observando la tendencia en las gráficas, pues las muestras expuestas a las nanopartículas presentan valores muy cercanos al control negativo (ver gráfico 9 y 10 y tablas adyacentes). Es posible que la exposición de las nanopartículas no genere una cantidad de ROS que la célula no pueda metabolizar, reflejado en la síntesis de antioxidantes por lo que no inducen un daño agudo.

El tamaño de algunas nanopartículas está dentro de un rango en el cual pueden penetrar la membrana celular sin modificar su estructura. Además, en algunos casos pueden ser polarmente afines, por lo es necesario conocer que de qué manera actúa una vez que han interactuado con la célula y a qué nivel ha sido modificada o alterada la integridad membranal, siendo TBARS una de las respuestas más confiables para conocer esta información, pues la estimación que aporta es con respecto a la cantidad de proteínas que están incluidas en la célula a evaluar.

Para esta prueba también se realizó la comparación entre estirpes celulares (gráfico 11) y se observa que, de igual manera, las células Hela son más resistentes al estrés oxidativo que las células Vero, pues los valores de estas últimas son mayores lo que indica que a mayor concentración de TBARS, hay mayor cantidad de radicales libres que interactúan con el compuesto.

12.2.3 PROLIFERACIÓN CELULAR

Se relacionó la proliferación celular por medio del Índice Mitótico (I.M.) y el Índice de Proliferación (I.P.) en linfocitos de sangre humana fresca de varones, eligiendo únicamente a éste género pues se sabe que no se modifican drásticamente los procesos de división celular como ocurre con las mujeres al haber variaciones hormonales.

Se demostró que, al exponer los linfocitos con las nanopartículas, éstas no modifican la proliferación celular, teniendo en su mayoría terceras o subsecuentes metafases. Hablando del I. M., un valor alto indica que la proliferación celular es rápida; es decir, un ciclo celular de corta duración y que una importante fracción de la población se encuentra en ciclo (Lynne Bennington, 2000). Dicho lo anterior, se puede observar en el gráfico 13 que las muestras que refieren a las expuestas a las nanopartículas, se encuentran en proporción con respecto al control ± 1 , por lo cual se considera que mantienen una actividad de replicación normal y que la adición de las nanopartículas no altera su proliferación celular ni los tiempos de división



celular. Únicamente los sistemas a los cuales se añadieron 50 μ l, muestran índices por debajo del control pero no de manera significativa.

Con respecto al índice de proliferación (I.P.) informa acerca de la proporción que hay con el tipo de fase mitótica en la que se encuentren las células y el número de núcleos proliferantes. Existe una relación directamente proporcional entre el I.P. y la cantidad de terceras o subsecuentes metafases pues entre más alto sea este valor indica que no hubo alteraciones en la división celular al tiempo de incubación. Es importante tomar en cuenta el tiempo que se mantienen los cultivos en incubación, pues antes de 72 horas es probable que no se obtengan terceras metafases o subsecuentes, y por lo tanto, no se puede inferir algún tipo de daño o alteración en cualquier punto del ciclo celular.

La gráfica 14 expone los resultados obtenidos del I.P. observando que todos los valores se encuentran alineados con respecto al control, el cual no estuvo expuesto a ningún tratamiento; se puede decir entonces que no altera significativamente la división celular ni altera algún proceso, teniendo a la mayoría de las células en proceso de terceras metafases. En la gráfica 12 se observan como porcentajes la cantidad de primeras, segundas y terceras metafases observadas de manera subsecuente en todas las muestras analizadas. Este gráfico muestra los datos después de haber sido analizados estadísticamente; se observa también que en las muestras expuestas con 50 μ l existe una tendencia en el incremento de terceras o subsecuentes metafases lo cual se interpreta como una aceleración en el proceso de división celular.

Ya se dijo que con los datos y gráficas mostrados se demuestra que al exponer las nanopartículas a las células no alteran significativamente la velocidad o cantidad de ciclos de división; sin embargo, se observaron (en la mayoría de las muestras) casos de células binucleadas y esporádicamente poliploides, una célula trinucleada acompañada por un micronúcleo.

Las células binucleadas, multinucleadas o poliploides surgen como consecuencia de la inhibición de la citocinesis celular. La ausencia de citocinesis en estas células puede dar origen a células multinucleadas. Es posible que las irregularidades mitóticas puedan estar asociados a los eventos de la división celular como anafases incompletas o la distribución desigual de cromosomas, entre otros, que pueden dar lugar a aneuploidias.

Los micronúcleos son el resultado de fragmentos acéntricos o cromosomas con centrómero inactivado los cuales fueron excluidos del núcleo durante la mitosis. Los micronúcleos son evidentes en las células interfásicas o profásicas, y su presencia revela efectos clastogénicos al ADN (Rodríguez-Arnaiz, 2005).

Existen sustancias capaces de provocar alteraciones en la división celular, tanto de la mitosis como de la citocinesis. Una de estas es la colchicina, un alcaloide que actúa como inhibidor de



13. CONCLUSIONES

la mitosis a nivel de la metafase que impide la formación de huso acromático y, por lo tanto, evita la separación de las cromátidas hermanas y su migración a los polos de la célula.

Se añadirá como anexo una breve explicación del tipo de alteraciones que pueden ocurrir durante el ciclo celular y cómo impactan al ser humano.

En este ensayo no se tenía contemplado como objetivo principal la identificación de este tipo de alteraciones. Sin embargo, al ser una prueba tanto cuantitativa como cualitativa, es posible observar más de un evento inusual de manera indirecta, como fue el. Para poder comprobar en un futuro el comportamiento de las nanopartículas y saber si inducen o no desde alteraciones hasta un posible daño a nivel cromosómico es necesario someterlas a pruebas estimuladas por algún agente mitogénico como la Fitohemaglutinina (FHA) como pruebas complementarias y específicas para la evaluación de células aneuploides en la proliferación celular.

13. CONCLUSIONES

- Se evaluó la capacidad citotóxica de los sistemas nanoparticulados que fueron fabricados a base de Quitosán y Polietilcianoacrilato (PECA).
- Se elaboraron los sistemas nanoparticulados a base de Quitosán y Polietilcianoacrilato (PECA) bajo condiciones de agitación, pH y adición específica.
- Se caracterizaron los sistemas fabricados por medio de: Potencial Z, el cual sufre cambios al modificar el pH; tamaño de partícula, por la técnica de dispersión Dinámica de la Luz (DSL) en un rango de 50 hasta 400 nm y menores o igual a 200 nm después de haber sido filtradas por membranas de 0.2 μm . Se observó la morfología mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM) observando nanopartículas esféricas de diferentes tamaños y con estructuras rígidas y semirrígidas, de acuerdo al tipo de fabricación.
- Se evaluó la capacidad citotóxica a los sistemas descritos mediante Viabilidad celular (MTT), Generación de especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS); ambas en las líneas celulares Hela y Vero y Ensayo Cinética de Proliferación celular e Índice Mitótico en sangre periférica, observando que no hay un efecto citotóxico agudo en las nanopartículas pues no se encontraron diferencias significativas en el análisis estadístico (Tuckey, comparación múltiple de medias). En este último ensayo existe una tendencia a acelerar el proceso de división celular con 50 μL de soluciones nanoparticuladas expuestas, aunque los valores del índice mitótico e índice de proliferación mantienen valores similares al control.



BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia, D., Rosario, I., & Curvenco, D. (2003). Principales Ensayos para Determinar la Citotoxicidad de una Sustancia, Algunas Consideraciones y su Utilidad. Habana Cuba. *Revista Toxicológica En Linea Sertox*.
- Arias Mediano, J. L. (2003). *Evaluación de Nanopartículas de Poli(Etil 2 Cianoacrilato) con Núcleo Magnético como Sistemas de Liberación Controlada del Antineoplásico 5 Fluorouracilo*. Granada: Tesis Doctoral.
- Balbus, J., Maynard, A., Colvin, V., Castranova, V., Daston, G., Denison, R., y otros. (2007). Meeting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles—Report from an Interdisciplinary Workshop. *Environmental Health Perspectives*, 1654–1659.
- Chavez Monroy, F. (2002 16/02). *Estudio de la Liberación de Sustancias Lipofílicas en Sistemas Nanoparticulados*. QFB FES Cuautitlán.
- Couvreur, P., Dubernet, C., & Puisieux, F. (1995). *Eur. J Pharm Biopharm*, 42, 42.
- Creative Commons Attribution–ShareAlike License. (s.f.). *The Medical News*. Recuperado el 01 de 02 de 2011, de <http://www.news-medical.net/health/Nanoparticles-What-are-Nanoparticles-%28Spanish%29.aspx>
- De la Cruz Medina, M. (2010). Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas. Investigación Bibliográfica. *tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB*. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: FES Cuautitlán.
- Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., & Macnee, W. (2001). Ultrafine Particles. *Occup Environ Med* 58, 211–216.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B., Boobis, A., y otros. (2002). Methods of in Vitro Toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 193–236.
- Fattal, E., & Vauthier, C. (2002). Nanoparticles as Drug Delivery Systems. En J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (págs. 1864–1877). New York: Marcel Decker.
- Gimenez, I. F., Almeida, L. E., & Barreto, L. S. (2007). Pharmaceutical Developments Based on Cytotoxicity of Nanoparticles: Supramolecular, Strategies and Study of Biological Interactions. En Y. Zhao, & H. Singh Nalwa, *Nanotoxicology. Interactions of Nanomaterials with Biological Systems* (pág. 295). USA: American Scientific Publishers.



BIBLIOGRAFÍA

- Goycoolea, F. M., Remuñan-López, C., & Alonso, M. J. (2007). Nanoparticulas a base de polisacarido: Quitosano. 103–106.
- Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sanchez-Granados, E., Grilo, A., y otros. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Revista de Toxicología Vol. 26 Asociación Española de Toxicología*, 87–92.
- Hammond, J. (1988). The Bradford for Protein Quantitation. En W. J. M., *Methods in Molecular Biology Vol. 3* (págs. 25–31). Clifton, New Jersey: Human Press.
- Hillegass, J., Shukla, A., Lathrop, S., MacPherson, M., Fukagawa, N., & Mossman, B. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *NIH Public Access*, 219–231.
- Hirano, S. (2009). A current overview of health effect research on nanoparticles. *Environ Health Prev Med*, 223–225.
- Kelty, C. (2006). *The Ethics and Politics of Nanotechnology*. Francia: UNESCO.
- Klaine, S., Alvarez, P., Batley, G., Fernandez, T., Handy, R., Lyon, D., Y Otros. (2008). Nanomaterials In The Environment: Behavior, Fate, Bioavailability And Effects. *Environ Toxicol Chem* 27 (9), 1825–1851.
- Leroueil-Le, M. V. (1998). Preparation and characterization of nanoparticles containing and antihypertensive agent. *European Journal Pharm. Biopharm*(46), 137–145.
- Leroux, J.-C. (1996). Biodegradable nanoparticles from sustainer release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*(39), 339–350.
- Lynne Bennington, J. (2000). *Diccionario Enciclopédico del Laboratorio Clínico*. España: Panamericana.
- Martínez Pérez, A. (2010). Sistemas Nanoparticulados de Aplicaciones Farmacéuticas (Revisión Bibliográfica). Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. FES Cuautitlan.
- Mohanraj, V. J., & Y Chen. (June 2006). Nanoparticles– A Review. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, 561–573.
- Montuenga Badía, L., Esteban Ruiz, F. J., & Calvo González, A. (2009). *Técnicas en Histología y Biología Celular*. España: Elsevier.



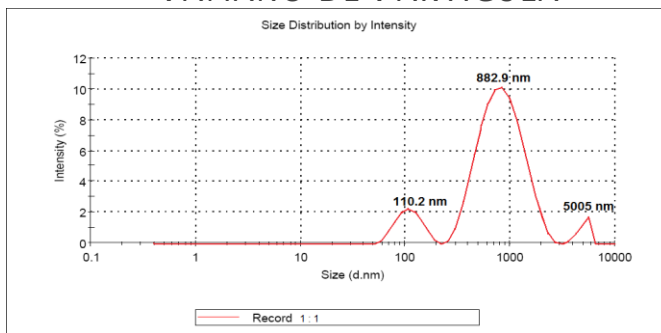
- Pinto, C., & Ronald, J. (December De 2005). Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. Coimbra, Portugal: Laboratorio Tecnologia Farmacéutica, Facultad de Farmacia. Universidad de Coimbra.
- Riki, K. J. (1997). Natural And Modified Polisaccharides. En A. J. Domb, J. Kost, & D. M. Wiseman, *Handbook of Biodegradable Polymers*. Amsterdam: Crc Press Taylor & Francis Group.
- Rodriguez-Arnaiz, R. (2005). *Manual de Prácticas de Genética y Cuaderno de trabajo*. México: UNAM Facultad de Ciencias.
- Rojas Wastavino, G. E. (1994). Ensayo de la Proliferación Celular en Cultivo de Linfocitos de Cerdo. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 60-64.
- Salamanca Gómez, F. (1988). Metodologías Citogenéticas y sus Fundamentos. En F. Salamanca Gómez, *Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. Panamericana.
- Segretín, M. E. (s.f.). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *INGEBI-CONICET Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA*, 6.
- Sishmitha, S., Joydip, K., & Subhas, C. K. (2010). Biopolymeric Nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 13pp.
- Thassu, D., Deleers, M., & Pathak, Y. (2007). Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview. En D. Thassu, M. Deleers, & Y. Pathak, *Nanoparticulate Drug Delivery Systems* (pág. 382). New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Williams III, R. O., & Vaughn, J. M. (2007). Nanoparticle Engineering. En S. James, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (pág. 4372). Pinehurst, North Carolina, USA.: PharmaceTech, Inc.



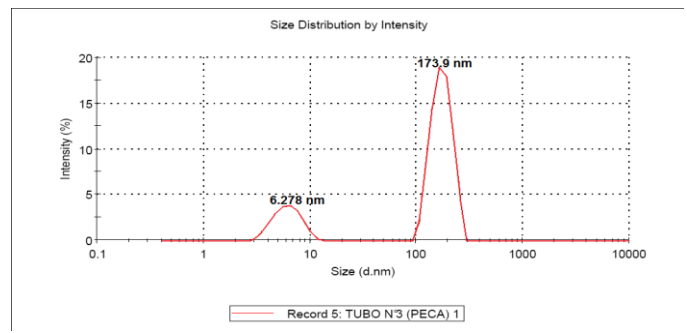
ANEXO 1. GRÁFICOS OBTENIDOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL Z

GRÁFICOS OBTENIDOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

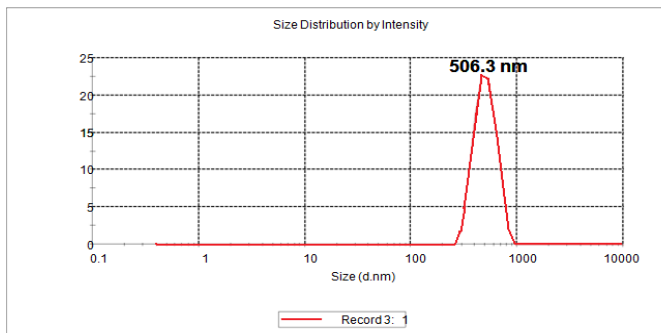
● TAMAÑO DE PARTÍCULA



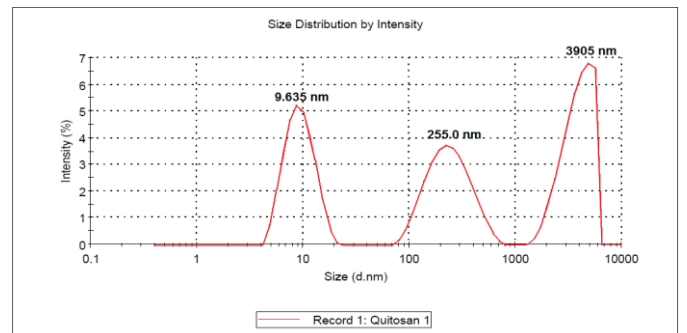
Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas de PECA en la fórmula inicial.



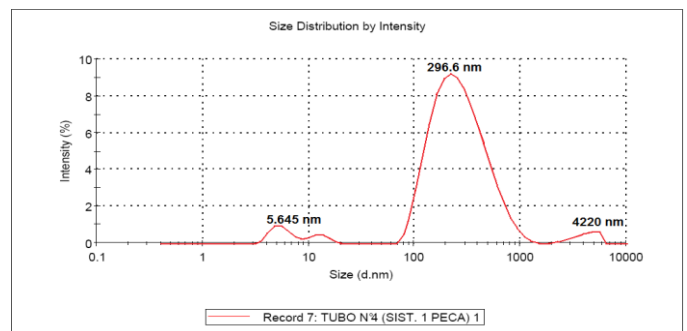
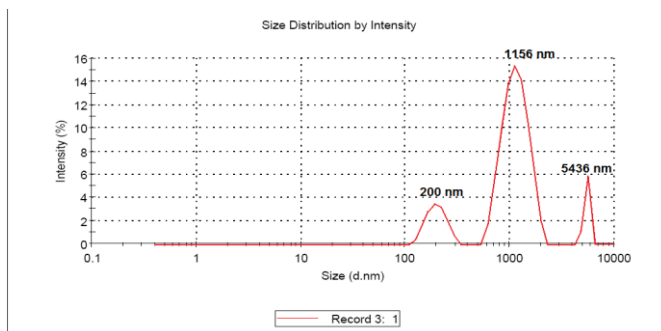
Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas de PECA en la fórmula final.



Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas de Quitosán en la fórmula inicial.



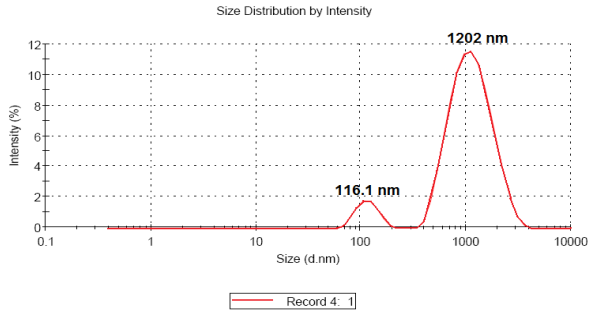
Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas de Quitosán en la fórmula final.





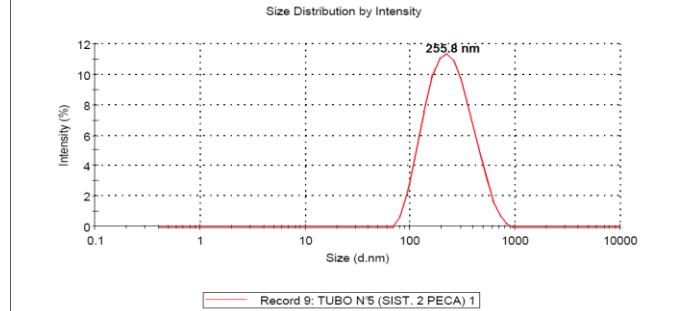
ANEXO 1. Gráficos obtenidos de la caracterización del Tamaño de Partícula y Potencial Z

Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 1 en la fórmula inicial.



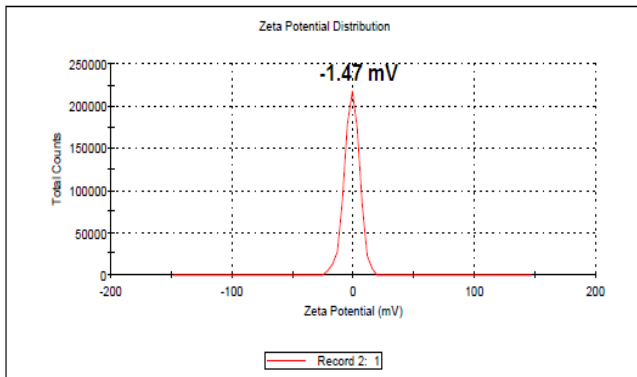
Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 2 en la fórmula inicial.

Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 1 en la fórmula final.

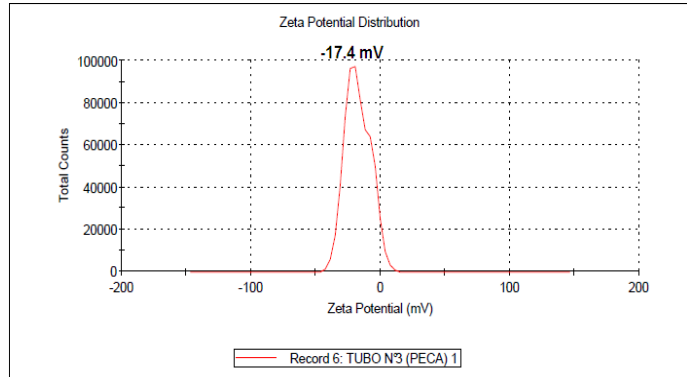


Distribución del tamaño de partícula de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 2 en la fórmula final.

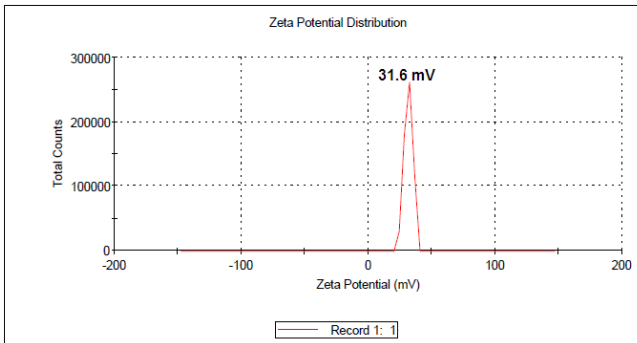
● POTENCIAL Z



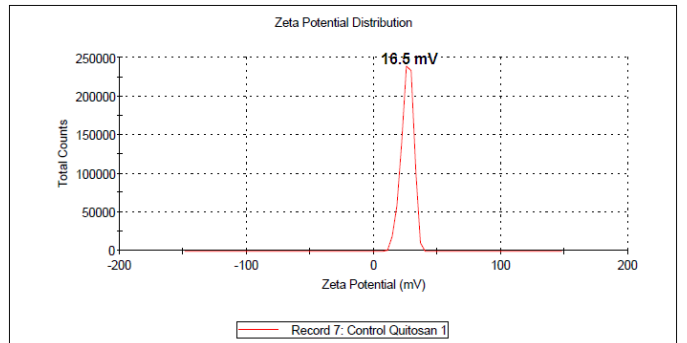
Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas de PECA en la fórmula inicial.



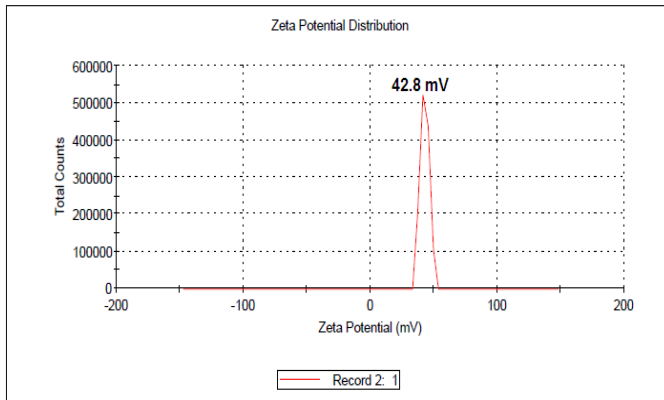
Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas de PECA en la fórmula final.



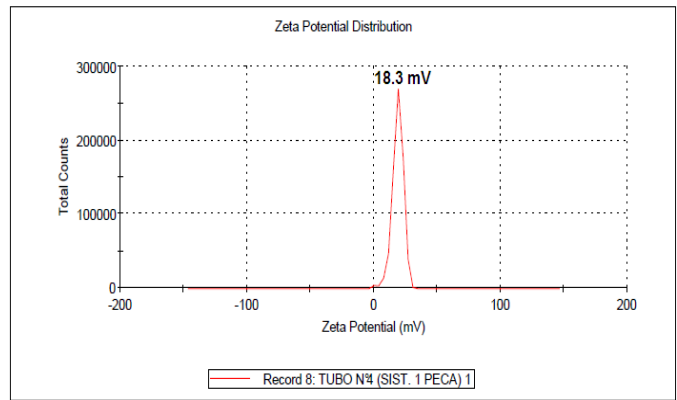
Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas de Qitosán en la fórmula inicial.



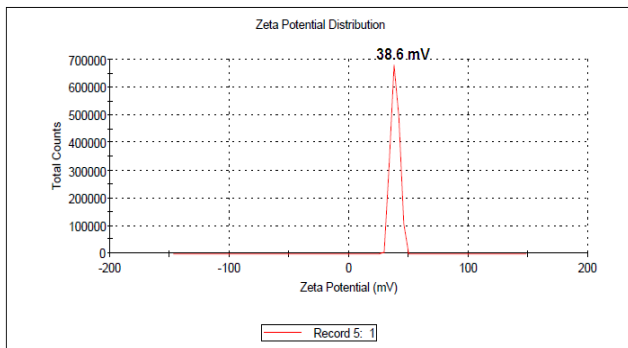
Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas de Qitosán en la fórmula final.



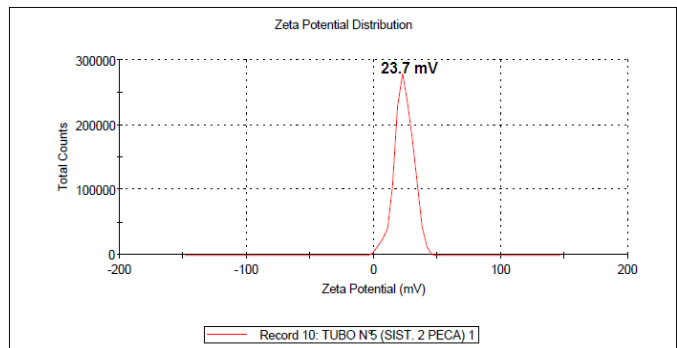
Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 1 en la fórmula inicial.



Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 1 en la fórmula final.



Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 2 en la fórmula inicial.



Potencial Z obtenido de las muestras analizadas a las nanopartículas del Sistema 2 en la fórmula final.

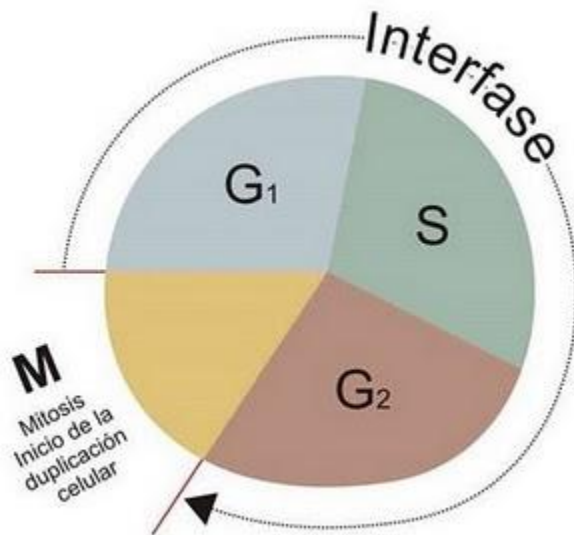


ANEXO II. CICLO CELULAR Y MUTACIONES

1. CICLO CELULAR

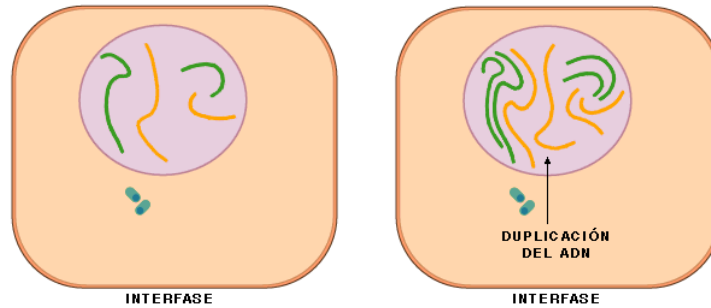
De acuerdo a la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, “las células sólo provienen de células”. Las células existentes se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular; en él la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos) duplica su material genético y finalmente se divide.

El ciclo celular se divide en dos fases: La Interfase y la Fase M o Mitosis.



1.1 INTERFASE

La interfase es una etapa muy larga en la cual tiene lugar el crecimiento de la célula y el desarrollo de las actividades metabólicas normales. La interfase es de gran importancia para la célula. No es un momento de reposo, pues en ella tiene una gran actividad metabólica. La interfase se puede subdividir para su estudio en tres periodos: G₁, S y G₂.



El periodo G_1 sigue a la mitosis anterior y corresponde a la fase de desarrollo de la célula. Los cromosomas se encuentran esparcidos en el interior del núcleo celular asociados a las histonas formando las fibras nucleosómicas. Los genes se transcriben de acuerdo con las necesidades metabólicas que presenta la célula en cada momento. En el citoplasma se suceden los diferentes procesos metabólicos y los orgánulos celulares se forman también en este periodo.

El periodo S es el de síntesis de ADN. En él, la doble hélice se abre en diversos puntos llamados ojos de aplicación, es en ellos donde se produce la síntesis del ADN. Simultáneamente se transcriben los genes necesarios.

El periodo G_2 es el que antecede a la mitosis. En este periodo los cromosomas están ya duplicados, es decir, están formados por dos cromátidas con uniones a nivel del centrómero.

1.2 FASE M

La mitosis es un proceso continuo en el cual se distinguen convencionalmente cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, que se reconocen por el arreglo de los cromosomas en el citoplasma.

1.3 DURACIÓN DEL CICLO CELULAR

La duración de los periodos G_1 , S, G_2 y de la mitosis (M) depende del tipo de célula que se trate. También depende de las condiciones fisiológicas y de determinados factores y, en particular, la temperatura.

1.4 LA DIVISIÓN CELULAR

La división celular es un proceso biológico que en los seres pluricelulares permite el crecimiento, el desarrollo, la regeneración de órganos y tejidos y las funciones de reproducción.



En la división celular típica, la célula inicial, célula madre, divide su núcleo en dos núcleos hijos con la misma información genética que, además es la misma que la de la célula madre. Al dividirse la célula, el citoplasma y los diferentes orgánulos celulares quedan repartidos y durante la posterior interfase se producirán nuevos orgánulos a partir de los que cada célula hija ha recibido. Por consiguiente, en una división hay que distinguir dos aspectos distintos:

- División del núcleo: carionesis o mitosis.
- División del citoplasma: citocinesis o citodiéresis.
-

A partir de la fase M o de mitosis, la célula puede entrar de nuevo en la fase G_1 y dividirse otra vez o entrar en la llamada fase G_0 en la que sufre una serie de transformaciones que conducen a la diferenciación celular.

1.5 LA MITOSIS. FASES

Aunque la mitosis es un proceso continuo se acostumbra a dividirlo en cuatro fases distintas: profase, metafase, anafase y telofase.

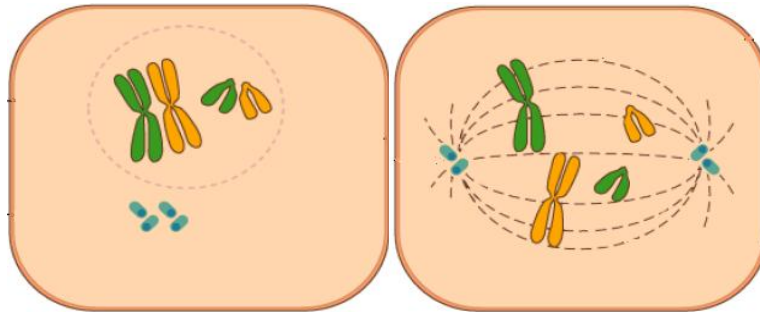
1.5.1 PROFASE

Es la fase más larga (1 a 2 horas en el ápice de raíz) y en ella se suceden una serie de fenómenos y los nucléolos van desapareciendo progresivamente.

Debido al superenrollamiento de la cromatina se produce una condensación del material genético y los cromosomas se van haciendo cada vez más visibles. Puesto que el ADN se replicó en el periodo S de la interfase, cada cromosoma está formado por dos cromátidas unidas por el centrómero.

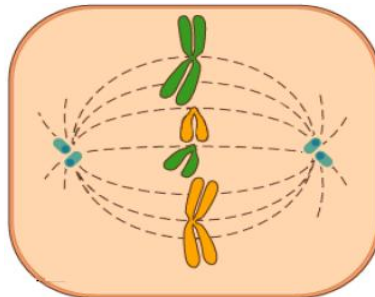
En las células animales el par de centriolos se ha dividido en interfase y ha dado lugar a dos pares de centriolos que constituirán los focos de unas ordenaciones radiales de microtúbulos: los ásteres. Los dos ásteres que al principio están juntos se separan a polos opuestos de la célula y los haces de microtubulos que surgen de ellos se alargan y forman un huso mitótico o huso acromático bipolar.

Los túbulos del huso se forman a partir de las moléculas del citoesqueleto. Éste se desorganiza y la célula adquiere una forma más redonda.



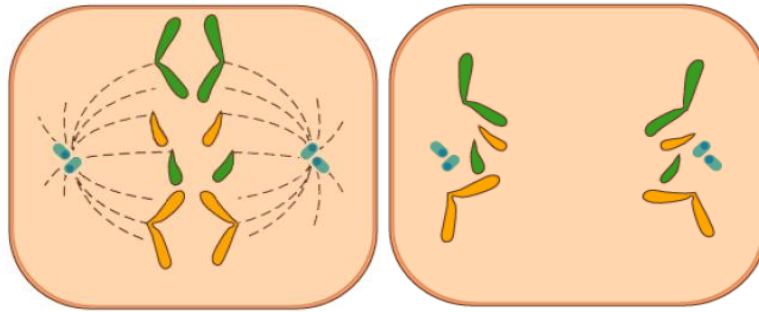
1.5.2 METAFASE

Es una fase corta (5 a 15 minutos en el ápice de la raíz). El huso mitótico ya está perfectamente desarrollado. Los cinetócoros de los cromosomas interactúan por medio de unos microtúbulos con los filamentos del huso y los cromosomas son alineados en la placa ecuatorial de la célula o placa metafásica. En esta fase los cromosomas se encuentran todos en la zona ecuatorial, orientados perpendicularmente a los microtúbulos que forman el huso acromático constituyendo la denominada placa ecuatorial. Esta es la fase más adecuada para la observación de los cromosomas.



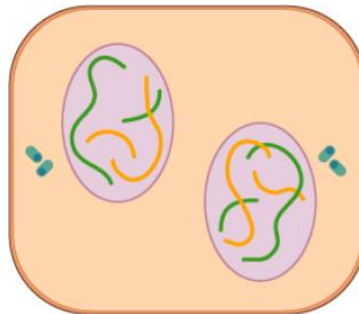
1.5.3 ANAFASE

Es la fase más corta (2 a 10 minutos en el ápice de la raíz). Los cinetócoros se separa y cada cromátida es arrastrada hacia un polo de la célula. El movimiento parece ser que se produce un desensamblaje de los microtúbulos. Al desplazarse cada cromátida, sus brazos se retrasan formando estructuras en V con los vértices dirigidos hacia los polos.



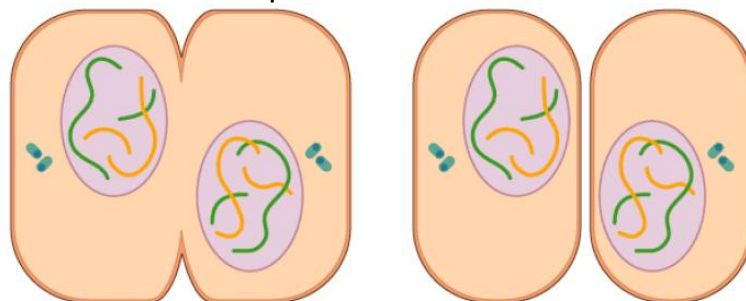
1.5.4 TELOFASE

Su duración en el ápice de la raíz es de 10 a 30 minutos. Los cromosomas son revestidos por fragmentos del retículo endoplasmático que terminarán soldándose para constituir la envoltura nuclear. Poco a poco los cromosomas van descondensándose y se desfiguran adquiriendo el núcleo un aspecto cada vez más interfásico, los nucléolos comienzan a reaparecer. Los microtúbulos del huso se agrupan en haces por la aparición en la región media de cilindros de una sustancia densa y pierden sus conexiones con los polos. Finalmente los cilindros se fusionan en un solo haz y la célula se divide en dos.



1.5.5 CITOCINESIS

La división del citoplasma se inicia ya al final de la anafase y continúa a lo largo de la telofase. En las células animales tiene lugar por simple estrangulación de la célula a nivel del ecuador del huso. La estrangulación se lleva a cabo gracias a proteínas ligadas a la membrana que formarán un anillo contráctil.





1.6 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA MITOSIS

A nivel genético representa un sistema de reparto equitativo e idéntico de la información genética. Ambas células hijas tendrán la misma información genética, que es la misma que poseía la célula madre.

A nivel celular la mitosis permite la perpetuación de una estirpe celular y la formación de colonias de células.

A nivel orgánico la mitosis permite el crecimiento y desarrollo de los tejidos y de los órganos de los seres pluricelulares y la reparación y regeneración de los mismos. De esta manera, todas las células de un organismo pluricelular, a excepción de las células sexuales, dispondrán de idéntica información genética.

2. MUTACIONES

Una mutación se define como cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos o en la ordenación del ADN. Las mutaciones pueden clasificarse en tres categorías: las que afectan al número de cromosomas en la célula (mutaciones genómicas), las que alteran la estructura de cromosomas individuales (mutaciones cromosómicas) y las que alteran los genes individuales (mutaciones génicas). Gracias a la meiosis, va a haber variabilidad en una población. La variabilidad puede ser continua cuando son suaves o discontinua cuando el cambio es brusco, sin fenotipos intermedios.

2.1 MUTACIONES GENÓMICAS

Las mutaciones cariotípicas o genómicas son alteraciones del número de cromosomas intactos (denominadas aneuploidias) que se producen por errores en la segregación de los cromosomas durante la meiosis o mitosis. Este tipo de mutaciones también recibe el nombre de aberraciones o variaciones cromosómicas. Hay dos tipos:

- **Poliploidia:** consiste en que la serie haploide del cromosoma se repite más de dos veces. Se produce cuando no se da la meiosis. Los individuos con un número impar de series cromosómicas van a ser estériles. La poliploidia es mucho más frecuente en vegetales que en animales.
- **Aneuploidia:** consiste en algún cromosoma está de más o menos en la dotación cromosómica de la especie.

2.2 MUTACIONES CROMOSÓMICAS



Las mutaciones cromosómicas son cambios en que implican sólo una parte de un cromosoma, como las duplicaciones, las deleciones, las inversiones y las translocaciones, que pueden producirse de manera espontánea o ser el resultado de una segregación anómala durante la meiosis de cromosomas translocados.

- **Deleciones:** ocurre cuando hay una pérdida de cromosoma. Esto puede ser letal en homocigosis, por que supone la pérdida de muchos genes.
- **Duplicación:** es un segmento cromosómico que aparece repetido. La duplicación suele hacer en tándem (parejas). Esta repetición del tándem admite muchas posibilidades, que se repita inverso, desplazando e inverso desplazado.
- **Translocación:** el fragmento de un cromosoma se une a otro cromosoma homólogo. Si se uniera a un homólogo, lo que se produciría es la recombinación.
- **Inversiones:** un fragmento del cromosoma, cambia de sentido dentro del propio cromosoma. Esto puede traspasar el centrómero.

2.3 MUTACIONES GÉNICAS

Las mutaciones génicas son cambios en la constitución química de los genes o en la secuencia del ADN, que van desde un solo nucleótido hasta cambios que afectan a muchos miles de pares de bases, pero siempre en una escala pequeña para ser observada en análisis citogenéticos. Las alteraciones del ADN mitocondrial también entran dentro de la categoría de mutaciones genéticas. Se considera que son las verdaderas mutaciones.

Cuando un gen muta se le llama mutante y este se transmite a la generación siguiente. El gen parental es el silvestre.

Estas mutaciones tienen una frecuencia de aparición muy baja, pero varía según las especies. Hay tres tipos de mutaciones:

- **Regresivas:** producen un efecto negativo o incluso la muerte.
- **Progresivas:** producen un efecto positivo.
- **Indiferente o silenciosas:** no son positivas ni negativas.



Para aumentar la frecuencia de mutación de un gen existen los agentes mutagénicos lo que hacen es cambiar la composición química de los nucleótidos o provocar un mal funcionamiento de los procesos enzimáticos. Pueden ser:

- **Ambientales:** temperatura, edad.
- **Químico:** sustancias con algún compuesto como ácido nitroso, acrinina, formaldehído, entre otros.
- **Radiaciones:** ultravioleta (provoca dímeros de timina), rayos X, catódicos

2.4 ORIGEN DE LAS MUTACIONES

2.4.1 MUTACIONES GENÓMICAS

Los errores en la segregación de un par de cromosomas durante la meiosis causan mutaciones genómicas responsables de trastornos, como síndrome de Down (trisomía 21). Las mutaciones genómicas producen aneuploidia cromosómica y son las mutaciones observadas con más frecuencia en los humanos, con una tasa de error de 25–50 divisiones celulares meióticas evidentemente mínima, debido a que las consecuencias para el desarrollo embrionario de muchas de estas mutaciones pueden ser tan graves que los embriones resultantes son abortados de manera espontánea poco después de la concepción, sin ser detectados. Las mutaciones genómicas son también muy frecuentes en las células cancerosas.

2.4.2 MUTACIONES CROMOSÓMICAS

Las mutaciones cromosómicas se producen con mucho menos frecuencia que las genómicas, con una tasa de una reordenación de cada 1700 divisiones celulares. Aunque las frecuencias de las mutaciones pueden ser elevadas, raramente se perpetúan de una generación a la siguiente porque suelen ser incompatibles con la supervivencia o con la reproducción. Las mutaciones cromosómicas también son frecuentes en células cancerosas.

2.4.3 MUTACIONES GÉNICAS

Las mutaciones génicas, incluidas las sustituciones de un par de bases, las inserciones y las deleciones, se originan mediante uno de dos mecanismo básicos: errores producidos durante el proceso normal de replicación del ADN o fallos en la reparación de los errores del ADN. Algunas mutaciones son espontáneas, mientras



que otras son inducidas por agentes físicos o químicos, llamados mutágenos porque incrementan la frecuencia de mutación.

TABLA 4. PARÁMETROS PARA DETERMINAR LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LAS ETAPAS DEL CICLO CELULAR

| Parámetro | Etapas del análisis celular | Eventos genéticos |
|----------------------------------|-----------------------------|--|
| <u>Micronúcleos</u> | Interfase | Fragmentos acéntricos y/o cromosomas con centrómero inactivado |
| <u>Células binucleadas</u> | | Alteraciones de la citocinesis |
| <u>Aberraciones cromosómicas</u> | Metafase | Rompimiento cromatídico Rompimiento cromosómico Figuras cromatídicas (tri, tetra radiales) Intercambio de cromátidas hermanas Alteraciones en el Huso mitótico (c-mitosis) |
| | Anafase y Telofase | Puentes Fragmentos Cromosomas con centrómero inactivado Alteraciones en el huso mitótico Poliploidía |
| <u>Toxicidad</u> | Interfase y Mitosis | Índice Mitótico = $\frac{\text{Número de células en mitosis}}{\text{total de células analizadas}} \times 100$ |

- **Puentes y/o fragmentos:** son el resultado de rompimientos cromosómicos o cromatídicos.
- **C-mitosis:** son producto de una inactivación del huso mitótico seguido por una dispersión al azar de los cromosomas en la célula.
- **Células binucleadas, multinucleadas y poliploides:** las células binucleadas surgen como consecuencia de la inhibición de la citocinesis celular. La ausencia de citocinesis en estas células puede dar origen a células multinucleadas. Las irregularidades mitóticas, tales como anafases incompletas o la distribución desigual de los cromosomas producen aneuploidias.
- **Fragmentación cromosómica:** resulta de múltiples rompimientos de los cromosomas en los cuales hay una pérdida de la integridad cromosómica. La fragmentación



puede variar desde una desintegración parcial o total (esta última se denomina pulverización cromosómica).

- **Rompimientos e intercambios cromosómicos:** son las anormalidades más comunes entre las cuales se encuentran: rompimientos cromosómicos y cromatídicos, fragmentos acéntricos, intercambios subcromatídicos, cromatídicos, huecos (gaps) cromatídicos (lesiones acromáticas), regiones heterocromáticas e intercambio de cromátidas hermanas en metafase, puentes cromosómicos y cromatídicos y fragmentos en anafase. Los rompimientos cromosómicos, fragmentos, intercambios cromatídicos y los cromosomas dicéntricos son generalmente considerados como aberraciones inestables, mientras que las deleciones, inversiones, duplicaciones y translocaciones se consideran como aberraciones estables.
- **Micronúcleos:** son el resultado de fragmentos acéntricos o cromosomas con centrómero inactivado los cuales fueron excluidos del núcleo durante la mitosis. Los micronúcleos son evidente en las subsecuentes generaciones en las células interfásicas o profásicas. La presencia de estos revela efectos clastogénicos al ADN.



ANEXO 3. PROPIEDADES DE LOS MATERIALES

QUITOSAN

El quitosán es obtenido de la quitina. La quitina es una sustancia ampliamente distribuida en la naturaleza, que sostiene y protege el cuerpo de los crustáceos y microorganismos. La quitina es el segundo polímero más abundante después de la celulosa. El Quitosán raramente existe natural, excepto en pocas especies de hongos. Comercialmente, el Quitosán es producto de la quitina por deacetilación con soluciones alcalinas concentradas a elevadas temperaturas. (RIKI, 1997). La solubilidad del polímero y sus propiedades reológicas son determinadas por el grado de deacetilación. Es biodegradable, no tóxico, y biocompatible pero no es bioactivo a sí mismo.

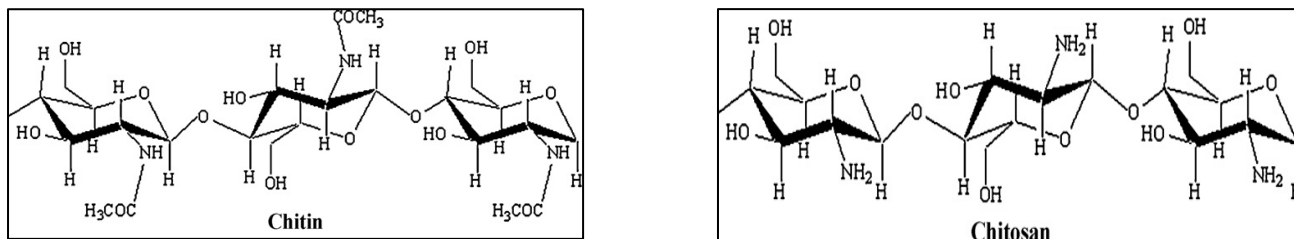


Figura 1. Estructuras de la Quitina y el Quitosán

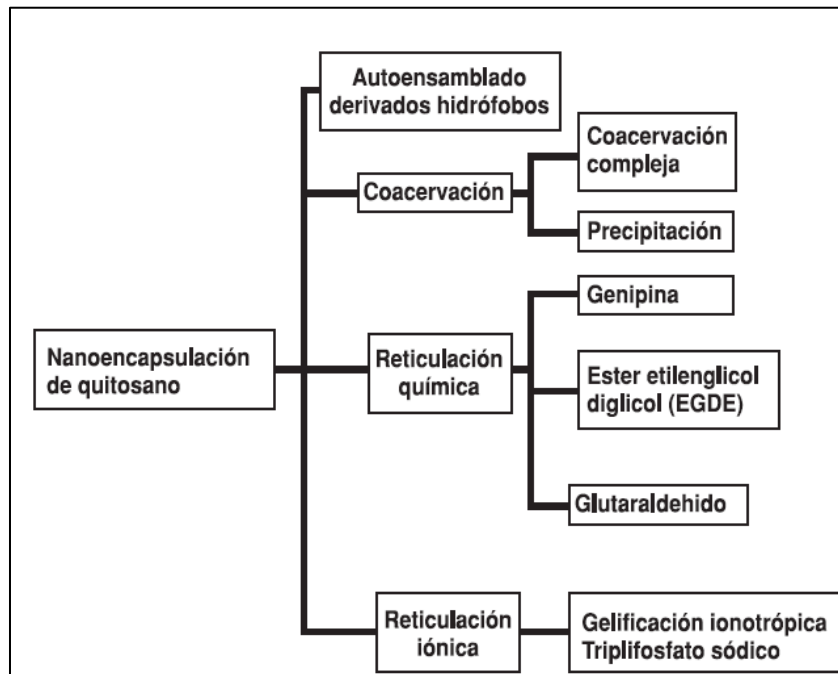
En la industria farmacéutica, las microesferas de Quitosán son prometedoras al administrar por vía oral y mucosal.

El término Quitosán define a una familia de heteropolisacáridos lineales que están formados por {poly[-(1,4)-2-amino-2-deoxi-d-glucopiranosA]}. Las unidades de tipo "A" a menudo están presentes en menor proporción que las de tipo "D", y su contenido, expresado como la relación molar de unidades "A" frente al total (A+D), se conoce como el grado de acetilación que se expresa como porcentaje (GA) o como una fracción (FA). Junto al grado de polimerización, el GA es un parámetro fundamental que determina directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del Quitosán.

Además de la proporción molar neta de unidades A, su distribución en la cadena del Quitosán determina las propiedades y varía con el protocolo de preparación



Desde el punto de vista fisicoquímico, el Quitosán es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policatiónico le confiere al Quitosán alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas. Las nanopartículas a base de Quitosán se forman de acuerdo a una aproximación de tipo “bottom up” como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o



no covalente.

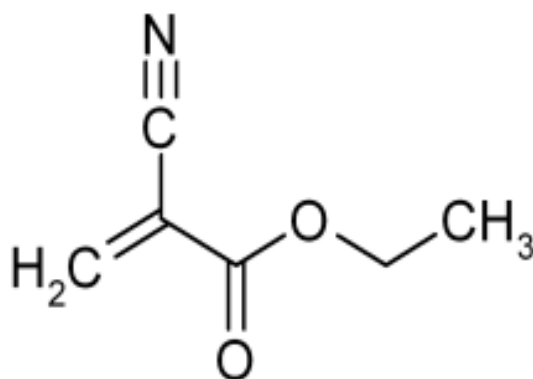
Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelación iónica del Quitosán utilizando Tripolifosfato Pentasódico (TPP)

El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de Quitosán –TPP plantea que la gelación iónica del Quitosán que ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P3O10^{5-}$ y $HP3O10^{4-}$), con los grupos $-NH_3^+$ del Quitosán (Goycoolea, Remuñan-López, & Alonso, 2007)



POLI ETIL 2 CIANOACRILATO

Pertenece a la familia de los poli (alquil cianoacrilatos), de gran interés por la elevada reactividad de sus monómeros, capaces de polimerizar fácilmente en varios medios, incluyendo el agua. Han sido usados con materiales quirúrgicos, en particular como adhesivos en tejidos biodegradable desde 1960. Entre sus múltiples aplicaciones destaca su uso como adhesivo quirúrgico y como sistema coloidal de transporte controlado la liberación de fármaco.



Su aplicación en el caso concreto de vehículos de fármaco se debe a su capacidad de polimerizar en medio acuoso, a sus propiedades mecánicas, a su biocompatibilidad y compatibilidad con fármacos, a su permeabilidad, a ser un polímero biodegradable y a que su amplio uso adhesivo quirúrgico en humanos constituye una garantía de baja toxicidad.

Una de las aplicaciones terapéuticas más prometedoras es el tratamiento de cáncer, donde incrementan la eficacia terapéutica como consecuencia de su capacidad *in vitro* para revertir la resistencia tumoral *in vitro* a anticancerígenos.

La polimerización en medios heterogéneos (por ejemplo, emulsión, dispersión, microemulsión o minieulsión) y emulsificación espontánea son dos técnicas bien conocidas aplicadas para la preparación de partículas poliméricas, las cuales han sido intensamente usadas para la concentración de nanopartículas de PACA como acarreadores coloidales de fármacos para la administración *in vitro*.

En 1979, Couvreur desarrolló un proceso para generar nanoesferas de etil cianoacrilato y metil cianoacrilato, consistió en la adición del monómero en una solución de HCL con pH entre 2 y 3 el cual contenía un tensoactivo no iónico o uno macromolecular. Ha sido mostrado que la naturaleza y concentración del tensoactivo juega un significativo rol en el tamaño de partícula, mientras que tanto el tipo del monómero como del tensoactivo fuertemente influyen la masa molar del polímero obtenido, el pH del medio de reacción y



la concentración del inhibidor de la polimerización fueron parámetros cruciales los cuales son afectan fuertemente las propiedades macromoleculares y/o coloidales de las nanoesfera. El tamaño de los objetos coloidales pueden ser obtenidos usualmente en el rango entre 50 y 300 nm

El PACA puede ser sintetizado de acuerdo a tres tipos de polimerización: a) aniónica, b) anfotérica, y c) por radical. La excepcional reactividad de los derivados alquil cianoacrilato, los mecanismos de polimerización aniónico y anfotérico son los mecanismos predominantes bajo condiciones convencionales experimentales con respecto a un proceso únicamente de radical.

La obtención de cada uno de los polímeros de esta familia se logra mediante la polimerización del monómero correspondiente. Los monómeros presentan la estructura química de un éster del ácido cianoacrilico con diferentes cadenas laterales alquílicas que van desde el metil al decil. El método general de síntesis de los monómeros fue descrito por Leonard y colab. Obteniéndose purezas del 98.5% o más. Sin embargo, es muy difícil manejar el monómero en forma pura, es precisa un estabilizador ácido (SO_2 , ácido sulfónico, etc.) o eliminadores (scavengers) de radicales libres (hidroquinona) para prevenir la polimerización espontánea cuando estén congelados (Arias Mediano, 2003)

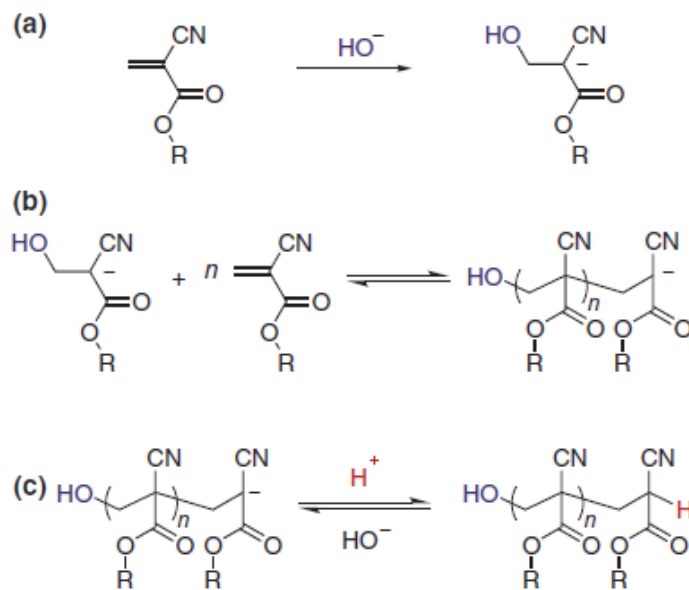


Figura 1. Representación esquemática de poli(alquil cianoacrilato) por polimerización aniónica en el mecanismo emulsión/dispersión. a) iniciación, b) propagación reversible, c) terminación reversible (Nicolas ,2009).