



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO EN LÍNEAS CELULARES DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS Y POLIMÉRICAS COMO VEHÍCULO DE ÁCIDO
GLICIRRICÍNICO PARA EL TRATAMIENTO DEL VIRUS DE PRRS

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
Me n C. SAMANTHA JARDON XICOTENCATL

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

TUTOR INVITADO:
DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX, ENERO 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A S E S O R E S D E T E S I S

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Laboratorio de Virología y MERC.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 1.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. David Quintanar Guerrero

Laboratorio de Investigación en Tecnología Farmacéutica.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 1.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Departamento de Morfología.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Laboratorio 4 “Biología celular y Morfología Veterinaria”.

Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.

Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	6
LISTAS DE FIGURAS	8
AGRADECIMIENTOS	9
INTRODUCCIÓN	10
1.1 Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo	10
1.1.1 Agente causal	11
1.1.2 Signos clínicos	14
1.1.3 Tratamiento y control del PRRS	15
1.2 Citoesqueleto	16
1.2.1 Filamentos intermedios	16
1.2.2 Microtúbulos	16
1.2.3 Filamento de actina	17
1.2.3.1 Estructuras de actina	18
1.2.3.2 Proteínas de unión a actina	20
1.3 Nanomedicina	21
1.3.1 Nanopartículas transportadoras de fármacos	22
1.3.1.1 Tipos	22
1.3.1.2 Capacidad de carga del fármaco	23
1.3.1.3 Propiedades de superficie	23
1.3.1.4 Potencial zeta (Ψ_z)	24
1.3.1.5 Caracterización de las nanopartículas	24
1.3.1.6 Tamaño	24
1.3.1.7 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	24
1.3.1.8 Movilidad electroforética-Velocimetría Láser Doppler	24
1.3.1.9 Microscopia electrónica de barrido (MEB)	25
1.3.2 Nanopartículas lipídicas sólidas	25
1.3.3 Nanopartículas poliméricas	25
1.4 Ácido glicirricínico (AG)	26
1.4.1 Estructura química	26
1.4.2 Características fisicoquímicas	27
1.4.3 Propiedades antivirales	27

1.4.4 Ácido glicirricínico y virus del PRRS	28
II. JUSTIFICACIÓN	28
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Soluciones de ácido glicirricínico	30
5.2 Cultivo celular	30
5.2.1 Línea MARC-145	30
5.3 Virus	30
5.3.1 Titulación viral	31
5.4 Elaboración de las “nanopartículas transportadoras de fármacos”	31
5.4.1 Nanopartículas lipídicas solidas	31
5.4.2 Nanopartículas poliméricas	32
5.5 Caracterización de las “nanopartículas transportadoras de fármacos”	32
5.6 Evaluación de la estructura celular	34
5.6.1 Fluorescencia directa para el citoesqueleto de actina	34
5.7 Viabilidad celular	34
5.7.1 Ensayo de MTT	34
5.7.2 Ensayo de rojo neutro	35
5.7.3 Tinción de azul de tripán	35
5.7.4 Tinción de naranja de acridina	36
5.8 Hematoxilina y Eosina	36
5.9 Captación celular	37
5.10 Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa	37
5.11 Análisis estadístico y Diseño experimental	37
VI. RESULTADOS	38
VII. DISCUSIÓN	56
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. REFERENCIAS	63
X. ANEXOS	68

RESUMEN

El virus del PRRS (*PRRSv*) está distribuido de manera mundial, presentando gran variabilidad genética y antigénica con un marcado incremento de la virulencia, siendo reconocida como una enfermedad económicamente devastadora. Las vacunas han sido una herramienta poco útil para controlar el problema por lo que este estudio representa una buena oportunidad de generar nuevas alternativas de tratamiento. El desarrollo de nuevas tecnologías que permitan combinar las ventajas de la nanomedicina con la medicina tradicional, es un campo prometedor. Estudios recientes reportaron que nanopartículas lipídicas solidas con GA disminuyen la infectividad del PRRSv en células MARC-145, sin embargo se reportó que éstas también inducen cambios en la morfología celular (Urbán, et al.2016) por lo que en esta investigación se plantea la evaluación del efecto de dos acarreadores nanoparticulados que permitan conservar la morfología celular y por lo tanto ser usados como vehículo de agentes antivirales como el GA, para sentar las bases a estudios que permitan a la comprensión del mecanismo de acción de este compuesto antes, durante y pos infección sobre la infección del PRRSv.

Dos diferentes “Nanopartículas transportadoras de fármacos” fueron elaboradas, de naturaleza lipídica y polimérica respectivamente, con talla nanométrica (*menos de 1000 nm*) y capacidad de incorporar al ácido glicirricínico. El margen de seguridad para la administración de los sistemas fue determinado con base en la viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición (*24-96h*) en cultivos MARC-145. Siendo las nanopartículas poliméricas con ácido glicirricínico el sistema más estable, tanto en el mantenimiento de su talla nanométrica, así como el menos citotóxico en comparación con el sistema lipídico.

Se logró la infección exitosa de los cultivos MARC-145 con 2 diferentes muestras de PRRSv cepa americana, una de origen vacunal y la otra proveniente de un aislado de campo. Mediante RT-PCR se determinó que todos los cultivos que presentaron cambios en su morfología, fueron positivos a la detección de PRRSv, por lo que las modificaciones en la estructura celular sugieren la presencia de un proceso de replicación viral activo. Se obtuvo un modelo de infección confiable para la evaluación detallada de las modificaciones del citoesqueleto por el efecto de nanosistemas en la infección *in vitro* por PRRSv.

A B S T R A C T

The PRRS virus (PRRSv) is distributed worldwide, presenting great genetic and antigenic variability with a marked increase in virulence, being recognized as an economically devastating disease. Vaccines have been an unhelpful tool to control the problem, so this study represents a good opportunity to generate new treatment alternatives. The development of new technologies that allow combining the advantages of nanomedicine with traditional medicine is a promising field. Recent studies reported that solid lipid nanoparticles with GA decrease the infectivity of PRRSv in MARC-145 cells, however it is reported that these also induce changes in cell morphology (Urbán, et al.2016), which is why this research raises the evaluation of the effect of two nanoparticle carriers that allow to conserve cell morphology and therefore be used as a vehicle for antiviral agents such as GA, to lay the foundations for studies that allow the understanding of the mechanism of action of this compound before, during and post infection on PRRSv infection.

Two different "drug transport nanoparticles" were elaborated, of lipid and polymeric nature respectively, with nanometric size (less than 1000 nm) and ability to incorporate glycyrrhizinic acid. The margin of safety for the administration of the systems was determined based on cell viability at different exposure times (24-96h) in MARC-145 cultures. Being the polymeric nanoparticles with glycyrrhizinic acid the most stable system, both in the maintenance of its nanometric size, as well as the less cytotoxic in comparison with the lipid system.

Successful infection of MARC-145 cultures was achieved with 2 different samples of PRRSV American strain, one of vaccinal origin and the other one from a field isolate. Through RT-PCR, it was determined that all cultures that showed changes in their morphology were positive for the detection of PRRSv, so that modifications in the cellular structure suggest the presence of an active viral replication process. A reliable infection model was obtained for the detailed evaluation of cytoskeletal modifications due to the effect of nanosystems on in vitro infection by PRRSv.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
ABP	Proteínas de unión a actina
ADP	Adenosín difosfato
AG	Ácido glicirricínico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
DAPI	Colorante del inglés " <i>Di Aminido Phenyl Indol</i> "
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ECP	Emergencia de focos de daño
FA	Faloidina
GRAS	Del inglés " <i>Generally Recognized as Safe</i> "
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ O _d	Agua destilada
hpi	Horas post infección
M	Molar
MARC-145	Células clon of MA-104 riñón de mono verde africano
MEB	Microscopia electrónica de barrido
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
MTT	[3- (4,5-dimetil tiazol-2-il)-bromuro de 2,5-difenil tetrazolio]
mV	Milivolts
nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
NPDC	Del inglés " <i>nanoparticles drug carriers</i> "
ORFs	Del inglés " <i>open reading frame</i> "
PAMs	Macrófagos alveolares porcinos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Post inoculación/infección
PNPs	Nanopartículas poliméricas

PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PRRSv	Virus del " <i>Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino</i> "
RK13	Células de riñón de conejo
RN	Rojo neutro
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo " <i>Roswell Park Memorial Institute</i> "
SLN	Nanopartículas lipídicas solidas
Sn	Sialoadhesina
TA	Temperatura ambiente

LISTA DE FIGURAS

Fig 1.	PRRS El origen del virus Vs. Situación actual de su distribución
Fig 2.	Estructura viral
Fig 3.	Mecanismo de infectividad del PRRSv
Fig 4.	Estructuras de actina presentes en la célula
Fig 5.	Tipos de NPDC
Fig 6.	Estructura química del ácido glicirricínico
Fig 7.	Método de enfriamiento de la microemulsión
Fig 8.	Método modificado de emulsificación-difusión
Fig 9.	Proceso de preparación de las NPDC
Fig 10.	Micrografías de las NPDC
Fig 11.	Caracterización de las NPDC
Fig 12.	Citoesqueleto de actina en células MARC-145
Fig 13.	Células MARC-145 expuestas a NPDC
Fig 14.	Evaluación del citoesqueleto de actina a la exposición con SLN y PNPs
Fig 15.	Curva # células vs. Absorbancia en células MARC-145
Fig 16.	Citotoxicidad de las SLN y PNPs
Fig 17.	Integridad nuclear y captación celular de las NPDC con GA
Fig 18.	Método para la propagación de PRRSv en células MARC-145
Fig 19.	Citotoxicidad de los PRRSv en células MARC-145
Fig 20.	Cambios citopáticos inducidos por PRRSv en células MARC-145
Fig 21.	Evaluación morfológica de células MARC-145 infectadas con PRRSv <i>in vitro</i>
Fig 22.	Puentes filopodiales inducidos por PRRSv
Fig 23.	Cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la infección <i>in vitro</i> del PRRSv
Fig 24.	Daño a la estructura nuclear en células MARC-145 inducidos por PRRSv
Fig 25.	Curvas qRT PCR vs. PRRSv
Fig 26.	Microscopía de campo claro infección <i>in vitro</i>
Fig 27.	ANOVA de los resultados de citotoxicidad por MTT a las 48 y 72 hpi
Fig 28.	Exclusion por Azul de tripán

AGRADECIMIENTOS

A la FES Cuautitlán por permitirme llevar a cabo en sus instalaciones esta investigación, por brindarme una formación académica de alta calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada para la realización de estudios doctorado # 486348/282140.

A los proyectos PIAPI 1827, PIAPI 1804,

A mi tutora la Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, por abriermi las puertas de su laboratorio, por ser una tutora, investigadora y mujer admirable con una calidez humana enorme.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por creer en mi desde hace 10 años y formarme durante este tiempo, ha sido un honor trabajar a su lado.

A mis Asesores Dr. David Quintanar Guerrero y Dra. Ma. Lourdes Juarez Mosqueda por permitirme trabajar y aprender de ustedes.

Al MVZ. José Luis Nieto Bordes por su apoyo técnico por su amistad y las incontables y motivadoras sonrisas.

Al M en C. Francisco Rodolfo González Díaz, por su tiempo, enseñanzas y asistencia técnica para la realización de este trabajo.

Mi gratitud a los doctores:

- Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate
- M en C. Sofía González Gallardo
- Dr. Germán Isauro Garrido Fariña
- C. Draucin Jiménez Celi
- Dra. Maria Zaida Urbán Morlán
- Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez

A los todas las personas que aportaron a este proyecto.

Los equipos, reactivos y materiales utilizados en esta investigación se encuentran en:

-Laboratorio de Posgrado y tecnología farmacéutica (L-323)

-Laboratorio de Virología y MERC; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1.

-Laboratorio 4 “Biología celular y Morfología Veterinaria” Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4.

I. INTRODUCCIÓN

La amenaza de las enfermedades virales se ha convertido en una de las principales preocupaciones de los productores y las autoridades sanitarias, debido a sus efectos devastadores.^{Albina, 1977} Los virus son agentes infecciosos intracelulares obligatorios formados por una cubierta proteica llamada cápside, que rodea el material genético. Algunos virus tienen además una envoltura lipídica proveniente de la célula que infectó previamente rodeando su cápside.^{Gutiérrez, 2010} Entre las enfermedades virales en los cerdos se encuentra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (*PRRSv*).^{Meredith, 1995}

1.1 Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo (*PRRS*) también llamado síndrome de la oreja azul, es una enfermedad que afecta a los cerdos domésticos, causando importantes pérdidas en la industria porcina por su efecto devastador en el área de producción.^{Zimmerman, 2006}

Anteriormente se le denominó como “*la enfermedad misteriosa del cerdo*”, siendo reconocida clínicamente por primera vez en 1987 en Carolina del Norte, Estados Unidos^{Loula, 1991}, manifestándose epidemias similares el mismo año en Canadá, y más tarde en Japón (1989), Alemania (1990), en Holanda, España, Francia y el Reino Unido (1991), en Dinamarca (1992) y posteriormente en la mayor parte del resto del mundo donde se crían cerdos.^{Meredith, 1993} En 1991 fue identificado el agente causal en Europa y se propuso como denominación internacional “síndrome reproductivo y respiratorio porcino” (“*PRRS*” del inglés “*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*”).^{Collins, 1992}

El PRRS posee una distribución geográfica mundial (*Fig.1*), es considerado una enfermedad enzoótica de la mayoría de las regiones donde existe la producción porcícola, convirtiéndose en una de las enfermedades más importantes, desde el punto de vista económico, en la producción intensiva de cerdos en América del Norte, Europa y en Asia, presentando en este último continente un aumento significativo en los últimos años. Australia, Nueva Zelanda, varios países de Europa, parte de África y la India son actualmente libres de la enfermedad.^{Wensvoort, 1993}

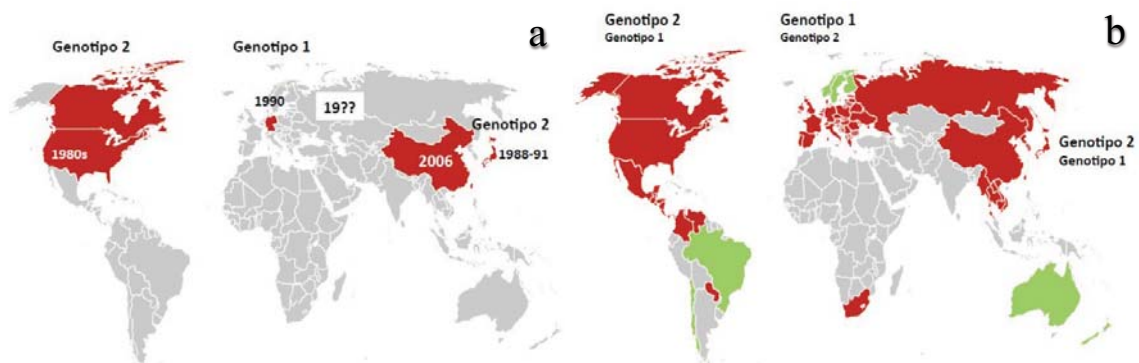


Fig 1. PRRS El origen del virus Vs. Situación actual de su distribución. Los países coloreados de rojo representan las zonas de principales brotes, los países en color verde corresponden a las zonas libres de la enfermedad. Mateu, 2012

1.1.1 Agente causal

El PRRS es causado por un virus del orden de los Nidovirales y miembro de la familia *Arteviridae* del género *Arterivirus*. Entre las propiedades importantes de los arterivirus, desde el punto de vista clínico, está su capacidad para producir infecciones desde asintomáticas-persistentes hasta graves-mortales; su capacidad de replicación en macrófagos y la considerable plasticidad de su genoma. Plagemann, 1992

El PRRSv posee de 40 a 70 nm de diámetro con una envoltura lipoglicoproteica de forma esférica presentando una cápside icosaédrica de 20-30 nm que engloba a una molécula de RNA lineal de cadena sencilla, poliadenilado y de polaridad positiva, con un genoma de 15-kb y contiene ocho marcos de lectura (*ORFs*) denominados ORF1a, ORF1b y ORFs 2 a 7 en sentido 5' a 3' que codifican proteínas virales específicas. Cavanagh, 1996; Wootton, 2002 Debido a que el PRRSv es un virus RNA su genoma cambia continuamente por lo que surgen rápidamente cepas heterólogas causando alta variación genética Can, 2016 se desconocen el número total de cepas y su relación serológica. Cavanagh, 1996 La variación considerable en la virulencia parece explicar el amplio espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad. Albina, 1997; Can, 2016; Domingo, 1997 Debido a la diversidad genética y antigénica del virus, este se agrupa en dos serotipos principales: el tipo europeo (*virus de Lelystad*) y el tipo americano (*VR-2332*). Molitor 1997

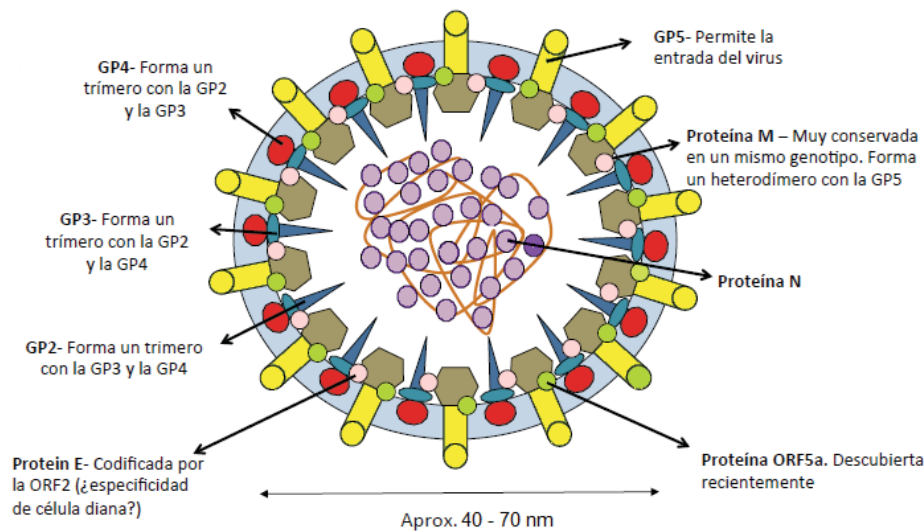


Fig 2. Estructura viral. Esquema de los componentes estructurales del PRRSV (imagen modificada) ^{Mateu, 2012}

El virión del PRRSV contiene tres proteínas estructurales mayores o principales; GP5, M y N (Fig. 2). La proteína N es altamente antigénica y es el componente principal de la nucleocápside, se localiza en el nucléolo de la célula huésped. Posee una región conservada en los aislados americanos y europeos. ^{Rowland, 2003}

El PRRSV posee un tropismo celular restringido tanto *in vivo* como *in vitro*. El virus fue aislado en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos (PAMs), que junto a monocitos sanguíneos porcinos son usados para la propagación viral *in vitro*. Infecta a macrófagos alveolares, epitelios respiratorios y células del epitelio bronquial, así como a macrófagos de bazo, hígado, islotes pancreáticos, timo y microglia según estudios de hibridación *in situ*. ^{Therrien, 2000; Delputte, 2002; Patton, 2008}

A nivel *in vitro* existen clonas celulares permisivas de origen no porcino como las MARC-145 y CL2621, derivadas de la MA104 de riñón de mono verde, que son empleadas para la propagación viral de cepas vacunales y de campo. ^{Therrien, 2000}

Se ha determinado que el PRRSV entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina durante la internalización interviene un receptor heparán sulfato, el cual interactúa con los ácidos siálicos de la superficie del virión, mediados por el receptor CD169 (*sialoadhesina*),

por lo que los mecanismos de unión son un factor determinante de su tropismo celular. ^{Terrien, 2000} Una vez endocitado la membrana viral se fusiona con la membrana del endosoma liberando el ssRNA viral en la célula, iniciando la traducción de poliproteínas replicasa *Ia* y *Iab*, las cuales son proteínas no estructurales que ensamblan complejos de replicación y transcripción (*RTC*) que aumentan la eficacia de la replicación viral. La cadena de -RNA es usado como plantilla para la síntesis de RNAm de cadena sencilla, permitiendo la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales, finalmente los nuevos genomas se ensamblan en las nucleocápsides en el retículo endoplásmico (*RE*) del huésped y luego los viriones se liberan a través de la exocitosis. ^{Kim, 2006}

El heparán sulfato y la sialoadhesina (*Sn*) son componentes esenciales en la unión e internalización viral, sin embargo, existen otros factores, esenciales para la infección productiva, dado que la expresión de Sn en células no permisivas al PRRSv, permite la internalización del virus pero no su desnudamiento, ni la liberación del genoma o la producción de virus infecciosos, por lo que la unión del virus a las células huésped no necesariamente conduce a una infección productiva. ^{Terrien, 2000; Delputte, 2007} Las cepas europeas del PRRSv son aisladas de manera más exitosa en PAMs, mientras que la gran mayoría de cepas norteamericanas pueden ser aisladas en subpoblaciones establecidas de células de mono, destacando en este rubro la línea MARC-145. ^{Benfield, 1999}

La replicación del PRRSv en células MARC-145 ha sido ampliamente estudiada, estas células carecen de receptores tipo heparán sulfato, pero poseen receptores ricos en cisteína denominados CD163, que se encuentran expresados naturalmente en PAMs. ^{Knipe, 2013} En los cultivos MARC-145 se detectan antígenos del PRRSv después de 10-20 horas post infección (*hpi*), la emergencia de focos de daño (*ECP*) a partir de las 48 h con un crecimiento logarítmico que termina con la muerte de la mayoría de las células después de 3-4 días. ^{Cafruny, 2006}

Los efectos citopáticos se observan de las 36 a las 48 hpi, caracterizándose por redondeo celular, aglutinación y lisis con una marcada granulación posterior a la destrucción de la monocapa. ^{Benfield, 1999}

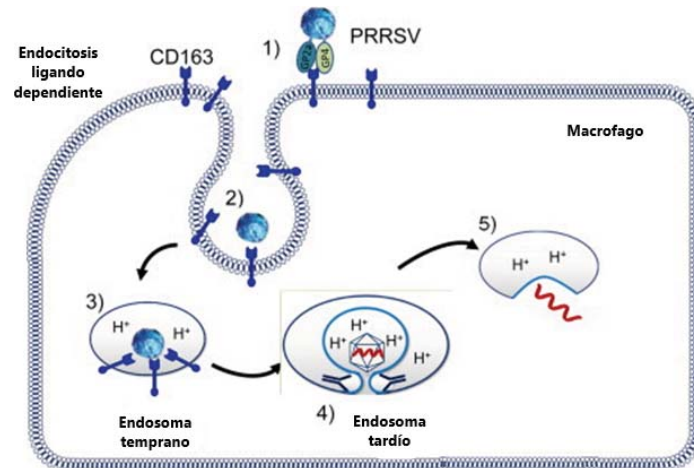


Fig 3. Mecanismo de infectividad del PRRSV. 1) El PRRSV se une a la membrana celular mediante el receptor CD163, 2) Proceso de internalización mediante clatrina, 3) Formación del endosoma temprano, 4) Endosoma tardío, 5) Liberación partícula viral. *Zhang 2015*

La infectividad del PRRSV involucra una unión mediada por receptor y una internalización regulada por clatrina (Fig. 3). *Zhang 2015* Existen dos fases reconocidas en la infectividad de cultivos MARC-145. Durante la fase primaria de la infección aguda (20 a 22 hpi) y una fase secundaria de infección logarítmica (48 a 72 hpi) que finaliza con la muerte de la mayoría de las células. La fase primaria afecta a un porcentaje bajo de la población, conformado por células con una posible permisividad innata al virus libre. En la etapa secundaria se lleva a cabo la afectación de la mayor parte de la población, está caracterizada por ser una transmisión dependiente del contacto célula-célula demostrada en cultivos confluentes cuya transmisión viral es dependiente de un citoesqueleto intacto, ya que existe una disminución de la infectividad correlacionada con expresión reducida de actina. *Cafruny, 2006*

1.1.2 Signos clínicos

Los dos grupos principales de signos clínicos asociados con la presencia del PRRSV son el reproductivo y el respiratorio. *White, 1991*

En los animales jóvenes los signos más comunes son de tipo respiratorio, mientras que en los animales adultos las manifestaciones clínicas predominantes son de tipo reproductivo, los cuales poseen una repercusión económica negativa importante en los centros de producción

pecuaria. [Meredith, 1995](#) Las cerdas y los verracos presentan signos clínicos como anorexia, somnolencia y fiebre, que van de leves a severos. [Goyal, 1993](#) Las hembras presentan abortos, mortinatos, infertilidad generalizada con incremento en el número de lechones débiles y mortalidad predestete. La presencia de cianosis en orejas, vulva y cola es habitual. [Albina, 1997](#)

Los efectos a la exposición al PRRSv en diversas etapas de la gestación son variables, durante los primeros días no existe evidencia de susceptibilidad embrionaria a la infección, siendo durante el segundo y tercer tercio de la gestación el periodo crítico de infección transplacentaria, en el cual la presencia del virus en los tejidos fetales se manifiesta. [Wang, 2015](#) En los verracos la disminución en la libido y pobre calidad seminal, expresada en volumen, motilidad y concentración espermática, con aumento de anomalías de los espermatozoides, perjudican el potencial reproductivo de los machos. Existen dos formas de transmisión del virus por contacto directo con cerdos susceptibles y por vía vertical a los fetos. [Zimmerman, 2006](#)

1.1.3 Tratamiento y control del PRRS

No hay un tratamiento específico para esta enfermedad. Sin embargo, se han establecido una serie de estrategias para tratar de controlar la aparición del síndrome. [Lyo, 2015](#) Una alternativa para combatir a esta enfermedad es la vacunación; sin embargo, hay reportes de que las vacunas inactivadas comerciales no confieren protección cuando se administran a cerdos que han sido desafiados. [Huang, 2010](#) Del mismo modo, las vacunas vivas modificadas actuales, se han asociado con un gran número de problemas como excreción del virus vacunal, infección persistente, protección incompleta y reversión de la virulencia. [Lyo, 2015](#)

Se ha reportado que algunos virus explotan el citoesqueleto de las células del huésped en formas fascinantes para facilitar aspectos importantes de su ciclo como puede ser la entrada, replicación, transporte, egreso y difusión intercelular. Los mecanismos mediante los cuales la infección de un virus induce alteraciones en las células son diversos, desde el resultado del empleo de la maquinaria celular para su propio beneficio hasta las respuestas producto de una acción citolítica. [Delorme-Axford, 2011](#)

1.2 Citoesqueleto

El citoplasma de una célula eucariota es organizado espacialmente por un citoesqueleto, el cual es una red compleja de filamentos proteicos que participa en un gran número de procesos biológicos esenciales como dar forma, fortaleza y soporte a la célula, participa en la adherencia de los organelos para la organización celular, así como controlar eventos de segregación de cromosomas en células hijas hasta su separación durante la división celular, transporte intracelular, comunicación intercelular y migración, en respuesta a estímulos externos e internos adoptando una nueva conformación. [Alberts, 2012](#)

El principio básico para el funcionamiento del citoesqueleto es la polimerización en donde subunidades proteicas se unen de manera no covalente, en forma lineal, para conformar los filamentos proteicos, este evento es dinámico debido a que las subunidades presentan eventos constantes de polimerización y despolimerización. El citoesqueleto está constituido por tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina. [Alberts, 2012](#)

1.2.1 Filamentos intermedios

Son polímeros estables, cordiformes de gran resistencia a la tensión y estables, compuestos por proteínas fibrosas que confieren resistencia mecánica a las células. Los filamentos intermedios se localizan debajo de la membrana nuclear y distribuidos en el citoplasma. Se agrupan en 4 familias:

- filamentos de queratina
- filamentos de vimentina
- neurofilamentos
- láminas nucleares. [Alberts, 2012](#)

1.2.2 Microtúbulos

Son tubos proteicos huecos, largos y relativamente rígidos de aproximadamente 25 nm de diámetro, que se ensamblan y desensamblan con rapidez. Sus subunidades están formadas por dímeros de tubulina (*constituidos por 2 isoformas α y β tubulina*) estrechamente unidas por enlaces no covalentes. [Pollard, 2008; Cooper, 2009 y Alberts, 2015](#)

En general, se originan del centrosoma (centro organizador de microtúbulos) y se extienden hacia la periferia celular. El extremo β es el extremo $+$, siendo este extremo al que más rápidamente se añaden los dímeros de tubulina y el otro extremo (denominado extremo $-$) con un crecimiento más lento. El centrosoma que está cerca del núcleo cuando la célula no está en mitosis, organiza la disposición que irradian hacia la periferia a través del citoplasma y posee unos anillos de γ tubulina que son el punto de partida para el crecimiento o nucleación del microtúbulo. Ya que los dímeros de $\alpha\beta$ tubulina se agregan al anillo con una orientación específica, estos anillos y la concentración de dímeros de $\alpha\beta$ tubulina permiten que la célula controle de manera dinámica su polimerización y despolimerización, así como los sitios en donde se forman. Las proteínas motoras que se mueven sobre los microtúbulos y participan en el transporte intracelular son las cinequinas y las dineínas, las cuales poseen un extremo globular en contacto con el microtúbulo y una cola en la cual se determina el tipo de carga a transportar. [Alberts, 2012](#)

1.2.3 Filamentos de actina

Se encuentran presentes en todas las células eucariotas y conforman tanto estructuras estables como temporales. Sus hebras poseen alrededor de 7 a 8 nm de diámetro, están formadas por dos cadenas de actina globular asociadas de manera helicoidal. Esta proteína está constituida por 375 aminoácidos (*43 kDa*). Los filamentos de actina, al igual que un microtúbulo, poseen una polaridad estructural conformada por un extremo $+$ y un extremo $-$. Los filamentos de actina crecen por agregados de monómeros de actina, siendo el más activo el extremo $+$. La hidrólisis de ATP a ADP, en un filamento de actina reduce la fuerza de unión entre los monómeros y la estabilidad del polímero, favoreciendo su despolimerización. [Alberts, 2012](#)

Debajo de la membrana plasmática se forma la corteza celular rica en filamentos de actina unidos entre sí por proteínas como la filamina, que entrecruza los filamentos en forma de una malla que sostiene a la membrana plasmática confiriéndole resistencia mecánica, los filamentos de actina pueden o no estar unidos al fosfatidilinositol bisfosfato (*PIP2*) de la membrana celular a través de proteínas como ezrina, radixin, moesina formando estructuras conocidas como dominios de membrana. Esta malla cortical de actina gobierna la forma y las propiedades mecánicas de la membrana plasmática y la superficie celular, siendo por ello

una estructura altamente dinámica. La reorganización de los filamentos de actina en el interior de la corteza es la base molecular de las modificaciones de forma y locomoción de las células. Cooper, 2009; Alberts, 2015

1.2.3.1 Estructuras de actina

Los filamentos de actina pueden formar estructuras estables como las microvellosidades o estructuras dinámicas y de reconocimiento que crecen y retraen a gran velocidad, como los lamelipodios, filopodios y pseudópodos (*Fig.4*). Defilippi, 1999

Cuando las células migran se polarizan, formando dos zonas (*polos*) con características estructurales y funcionales diferentes. En el polo anterior se forma una extensión aplanada de la membrana plasmática que dirige el avance de la célula, mientras que el polo posterior es una zona de contracción para el desplazamiento de la célula, este tipo de movimiento se conoce como “*ameboideo*”, en el cual se distinguen tres fases: protrusión (*formación del lamelipodio*), adhesión (*fijación del lamelipodio al sustrato*) y contracción (*retracción del polo posterior para desplazarse hacia adelante*). Pollard, 2008; Alberts, 2015

Los lamelipodios son estructuras delgadas y laminares, que contienen una red densa de filamentos orientados cerca de la membrana plasmática que se forman durante la migración celular en la parte frontal de la célula (*borde líder*). En los lamelipodios se encuentran haces de actina formando redes en forma de malla y dendríticas. Las redes en forma de malla se estructuran por el entrecruzamiento de los filamentos de actina mediante proteínas como la filamina. Las redes dendríticas se forman por filamentos de actina que polimerizan a partir del complejo *Arp2/3*, conformado a su vez por las proteínas relacionadas a actina (*Arp2 y Arp3*) y varias proteínas accesorias que forman un centro de nucleación de filamentos de actina y que se encuentra unido a filamentos de actina preexistentes, estas redes dendríticas empujan el borde líder del lamelipodio durante la fase de protrusión de la membrana en el movimiento ameboso que se presenta en la migración celular. Defilippi, 1999

Los filopodios son estructuras estables, capaces de mover moléculas en un transporte mediado por miosina, formar estructuras relacionadas con la comunicación célula-célula como “*citonemas y nanotubos*”. Sherer, 2009; Roy, 2015 Alberts, 2015

Los filopodios son proyecciones digitiformes tanto en el borde líder de un lamelipodio como en otras zonas de la superficie celular. Sus dimensiones van de 0.1-0.3 nm de ancho a 5-10 µm de largo, formadas por un haz laxo de 10 a 20 filamentos de actina orientados con sus extremos + hacia afuera (*haces paralelos*). Alberts, 2015 Pueden emitirse de forma individual o en gran número, incluso por todo el perímetro de la célula. Los filopodios son sensores de microambiente (*basados en actina*) permitiéndole a la célula interactuar tanto con el medio extracelular como con otras células, siendo las estructuras del contacto inicial para responder a fenómenos de atracción o repulsión entre ellas. Passey, 2004 y Heckman, 2013 Estas estructuras también regulan el anclaje de todos los tipos celulares a su blanco permisivo y a partir de ellas pueden formarse estructuras especializadas como las microvellosidades en las células epiteliales y los estereocilios estructuras mecanosensibles a través del flujo de iones, localizadas en el oído interno. Passey, 2004 y Heckman, 2013 Los filopodios son estructuras estables, capaces de mover moléculas en un transporte mediado por miosina, formar estructuras relacionadas con la comunicación célula-célula como “*citonemas y nanotubos*”. Sherer, 2009; Roy, 2015 También en la membrana se forman estructuras en forma de copa (*pseudópodos*) sostenidas por redes de filamentos de actina, utilizados por los macrófagos durante la fagocitosis. Alberts, 2015

Las fibras de estrés o tensión son estructuras conformadas por 10 a 30 filamentos de actina que forman haces contráctiles, están constituidos por haces antiparalelos (*filamentos dispuestos con su extremo + en direcciones opuestas*), interconectados por proteínas como *β-actinina*, entre los filamentos se unen proteínas motoras de la familia de las miosinas que permiten el deslizamiento de los filamentos entre sí formando estructuras contráctiles. Dentro de las estructuras celulares en las que participan las fibras de estrés están las adhesiones focales en donde la célula se une al sustrato, en estos sitios se localizan las *integrinas*, proteínas de membrana que se unen a proteínas de la matriz extracelular, las fibras de estrés se unen a las integrinas mediante proteínas tales como *talina y vinculina* que actúan como

mecanotransductores. El *anillo contráctil* es otro ejemplo de estructuras en donde participan fibras de estrés el cual se forma durante la división celular para la separación de las células hijas. ^{Alberts, 2015} Las fibras de tensión son las principales estructuras contráctiles en muchas células animales en cultivo, y se dividen en al menos 4 diferentes categorías: “*fibras de tensión dorsales y ventrales, arcos transversos y cubierta de actina perinuclear*”. ^{Tojkander, 2012}

Las microvellosidades, de forma similar a los filopodios, tienen un centro de haces paralelos de filamentos de actina, pero en este caso no son retráctiles ya que son estabilizados para evitar su polimerización y despolimerización, y de esta forma constituir estructuras permanentes en la superficie de las células como aquellas del epitelio intestinal (*epiteliocitos con microvellosidades*). ^{Alberts, 2015}

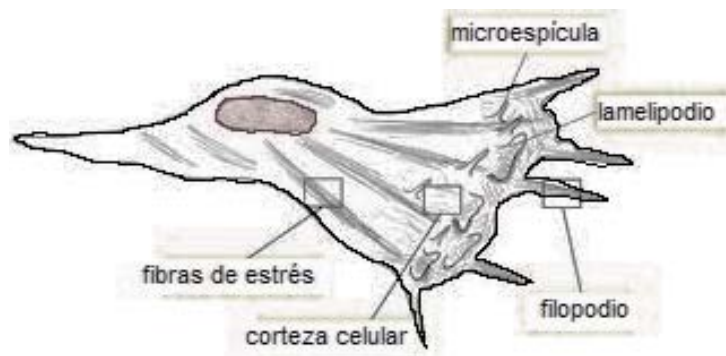


Fig 4. Estructuras de actina presentes en la célula. El esquema representa las diferentes estructuras formadas por el citoesqueleto de actina a nivel citoplásmico y corteza celular.

1.2.3.2 Proteínas de unión a actina

Las proteínas de unión a actina (*ABP*), regulan el comportamiento fisiológico de la dinámica filamentosa de actina, si estas no se encuentran presentes, los filamentos son totalmente inestables. ^{Gouin, 2015} Algunas de estas proteínas ya fueron mencionadas anteriormente, como son *filamina, complejo Arp2/3, β-actinina, talina y vinculina*. ^{Passey, 2004 y Heckman, 2013}

La mitad de la actina total está ensamblada formando filamentos y el resto se encuentra en forma de monómeros en el citoplasma. La proteína *timosina* se une a los monómeros de actina libres impidiendo agregarse a los extremos de los filamentos, manteniendo como reserva los monómeros de actina hasta el momento en que son requeridos (*secuestran los monómeros de actina*). Al contrario de *timosina*, la *profilina* se encarga de activar

monómeros de actina para que estén listos para agregarse a los filamentos durante la polimerización, actúan en colaboración de proteínas que ayudan a la adhesión de nuevos monómeros al extremo del filamento en crecimiento, como es el caso de la *formina*. ^{Pollard, 1986} La despolimerización y polimerización de los filamentos de actina dan las características del estado físico del citosol, pasando de un estado fluido (*sol*) a uno viscoso (*gel*) y viceversa ^{Pollard, 1986}

Las proteínas de caperuza (*capping*) son un tipo de *ABP* que se unen en los extremos del filamento controlando la adición o pérdida de subunidades. La *cofilina* es una proteína que segmenta los filamentos y favorece la despolimerización de actina. ^{Alberts, 2015}

La plasticidad del citoesqueleto de actina es regulada por señales extracelulares. Algunos autores reportan que el citoesqueleto desempeña un papel importante en la entrada y/o infección de distintos tipos de virus, como complejo receptor y en la transportación viral dentro del citosol. ^{Delorme-Axford, 2011; Kim, 2006}

1.3 Nanomedicina

Debido a la gran variabilidad de efectos inducidos por la vacunación es importante generar nuevos tratamientos contra el PRRSv. ^{Huang, 2010} Con base en lo anterior, se vuelve prioritario el desarrollo de alternativas para combatir el PRRSv, de tal manera que recientemente se ha empleado para este fin a la “*nanomedicina*”. ^{Urbán, 2010}

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud, la cual se define como el desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-1000 nm. Los sistemas a escala nanométrica, están formados por al menos dos componentes; uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y el segundo es el propio sistema que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad. ^{Irache, 2008} Dentro de la nanomedicina se encuentran una gran cantidad de compuestos diferentes, incluyendo las nanopartículas transportadoras de fármacos o acarreadores nanoparticulados. ^{Quintanar, 2005}

1.3.1 Nanopartículas transportadoras de fármacos

Las nanopartículas transportadoras de fármacos (*NPDC*, del inglés “*nanoparticle drug carriers*”) son sistemas coloidales sólidos formados por materiales macromoleculares (*biodegradables o no*) donde el principio activo (*fármaco o material biológicamente activo*) se disuelve, entrapa o encapsula, y/o adsorbe o une; lo que permite mejorar la seguridad y eficacia de los fármacos, así como la capacidad para proteger la molécula del fármaco frente a su eventual degradación desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción o absorción. Estos sistemas permiten trabajar a un nivel molecular con un rango de 10 a 1000 nm, en al menos una de sus dimensiones. [Wing, 2006](#)

Las NPDC poseen características que determinan su impacto biológico, como su composición química, el tamaño de partícula primaria, morfología y solubilidad, entre otros. Entre las ventajas del uso de estos sistemas se encuentra su capacidad para atravesar las barreras biológicas y alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana, asimismo llegar a compartimentos intracelulares y controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción, mejorando problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos. [Jabr-Milane, 2008](#)

1.3.1.1 Tipos

Considerando la estructura física, las NPDC pueden clasificarse en nanoesferas y nanocápsulas (*Fig. 5*). Las nanocápsulas son sistemas de tipo reservorio donde el fármaco está confinado a una cavidad rodeada por una membrana simple. Las nanoesferas son sistemas matriciales en donde el fármaco se encuentra disperso por todo el cuerpo de la partícula. [Couvreur, 1996](#)

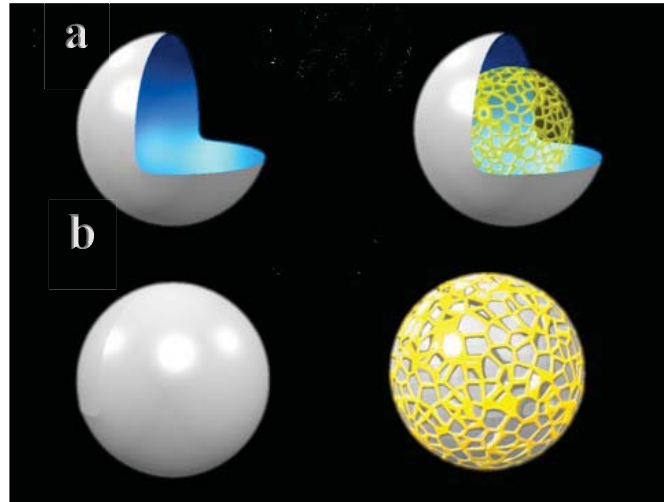


Fig 5. Tipos de NPDC. A: nanocápsulas y B: nanoesferas. Las imágenes esquematizan un nanotransportador esférico, el cual puede concentrar el fármaco en posición central (a) o distribuido en todo el sistema (b).

1.3.1.2 Capacidad de carga del fármaco

Idealmente, un buen sistema nanoparticulado debe poseer una alta capacidad de carga con lo que se reduce la cantidad de material que forma la matriz en la administración, la carga y la eficiencia de encapsulamiento del fármaco dependen de la solubilidad en el estado sólido de éste en la matriz, el cual se relaciona con la composición del polímero o lípido, el peso molecular y la interacción fármaco matriz. La carga del fármaco puede llevarse a cabo por dos métodos:

1. Incorporación durante la elaboración de las nanopartículas (*método de incorporación*),
2. Adsorción del fármaco después de la formación de las nanopartículas por incubación con una solución concentrada del fármaco (*método de adsorción/absorción*). Mohanraj, 2006

1.3.1.3 Propiedades de superficie

En los sistemas nanoparticulados las cargas eléctricas tienen un papel importante en la interacción de las partículas lo cual se refleja en la estabilidad física del sistema coloidal, desarrollando un campo eléctrico formado por una carga circundante que consta de una región interior donde los iones se encuentran fuertemente enlazados en la superficie de la partícula y que se denomina “*capa Stern*” y una región donde los iones están menos enlazados la cual se le conoce como “*capa Gouy*”. Shang, 1994

1.3.1.4 Potencial zeta (Ψ_z)

El potencial zeta es utilizado para caracterizar la carga de superficie, reflejando el potencial eléctrico de las NPDC y es influenciado por la composición de la matriz y por el medio de dispersión. Las NPDC con (+/-) 30 mV son estables en suspensión y la carga de superficie previene la agregación. ^{Riddick, 1968}

1.3.1.5 Caracterización de las nanopartículas

Considerando la importancia de las propiedades superficiales y las características fisicoquímicas de las nanopartículas, éstas deben ser caracterizadas durante su elaboración, de tal manera de poder asociar estas propiedades con el comportamiento *in vitro/in vivo*.

1.3.1.6 Tamaño

El tamaño en los sistemas nanoparticulados determina su destino biológico, toxicidad y estabilidad, así como la liberación del fármaco. Las partículas pequeñas poseen una mayor área superficial lo que facilita una rápida liberación, mientras que en las partículas grandes la menor área superficial resulta en una lenta difusión del fármaco. ^{Gaumet, 2008}

1.3.1.6.1 Dispersión dinámica de la luz

También conocida como “*Espectroscopía de correlación de fotones*” (DLS, del inglés “*Dynamic light Scattering*”), mide la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida la cual es causada por el movimiento browniano de las partículas. Por esta razón, el tamaño de partícula está influenciado por la interacción de las partículas con el medio en el que se encuentran, por lo cual debe conocerse la viscosidad del mismo. ^{Haskell, 2006}

1.3.1.7 Movilidad electroforética-Velocimetría láser doppler

El “potencial zeta” (Ψ_z) es una propiedad física que poseen todas las partículas en suspensión, específicamente en sistemas coloidales. Dicho potencial se obtiene usando la combinación de técnica de medición: Electroforesis y Velocimetría láser doppler, este método mide que tan rápido se mueve una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado se

puede obtener el Ψ_Z mediante el uso de otras constantes de la muestra analizada (*viscosidad y constante dieléctrica*). Haskell, 2006

1.3.1.8 Microscopia electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (*MEB, del ingles “Scanning Electron Microscopy”*) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales, proporcionando información morfológica del material analizado con alta resolución y profundidad de campo lo que permite la obtención de imágenes de apariencia tridimensional. Durante el proceso la muestra es cubierta con un material conductor (*oro o gráfita*), posteriormente se hace incidir un haz de electrones, que al focalizarse sobre la superficie de la muestra hacen un barrido de ésta; la señal emitida y la radiación resultante del impacto se detecta y simplifica. Bootz, 2004

Las nanopartículas con fines farmacéuticos son elaboradas principalmente con lípidos y polímeros.

1.3.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

(*SLN, del ingles “solid lipid nanoparticles”*) son consideradas como sistemas de liberación prolongada, que emplea lípidos fisiológicamente aceptables para su preparación. Las nanopartículas lipídicas poseen un núcleo sólido lipídico que se estabiliza con tensoactivos o emulsificantes. Para su utilización con fines farmacéuticos todos los excipientes utilizados en su preparación deben ser generalmente reconocidos como materiales seguros (*GRAS- Generally Recognized as Safe*). Urbán, 2015

1.3.3 Nanopartículas poliméricas

(*PNPs, “polymeric nanoparticles”*) Son sistemas fabricados con polímeros que el organismo vivo no reconoce como material extraño, son vectores sólidos de alta estabilidad. El tipo de polímero utilizado le confiere propiedades como liberación controlada, vectorización, transporte de sustancias hidrofílicas y lipofílicas. Escalona, 2014

La nanomedicina en combinación con la medicina tradicional, ha permitido el desarrollo de nuevas y prometedoras investigaciones, como el uso de nanopartículas transportadoras de fármacos como vehículo de principios activos de origen natural para el empleo en distintas enfermedades de interés en medicina humana y veterinaria, como el “ácido glicirricínico” (GA). Urbán, 2015

1.4 Ácido glicirricínico

La nanomedicina en combinación con la medicina tradicional, ha permitido el desarrollo de nuevas y prometedoras investigaciones, como el uso de nanopartículas transportadoras de fármacos como vehículo de principios activos de origen natural para el empleo en distintas enfermedades de interés en medicina humana y veterinaria, como el “ácido glicirricínico” (GA). Urbán, 2015 El GA es una saponina triterpénica, principal responsable de la actividad farmacológica de las especies de *Glycyrrhiza*, especialmente de la planta regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) conocida como “raíz dulce”, que es una leguminosa de regiones sub-tropicales, reconocida por sus propiedades antivirales, antioxidantes y antitumorales entre otras. Aguilar, 2014

1.4.1 Estructura química

Químicamente el GA es un glicosano triterpenoide activado a nivel de los grupos carboxilos en las posiciones 5, 10 y 20. Una molécula de ácido glicirretínico y dos moléculas de ácido glucorónico forman la glicirricina, saponina que también se encuentra en el extracto acuoso de *Glycyrrhiza glabra*. Segal, 1985

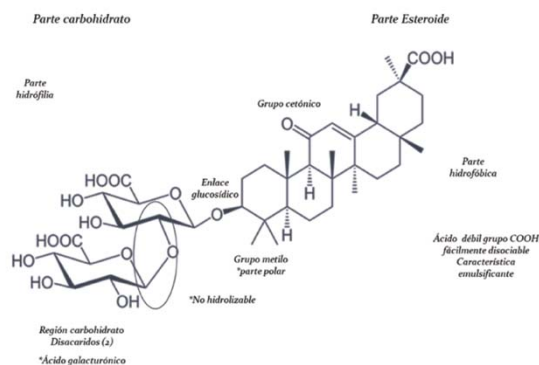


Fig 6. Estructura química del ácido glicirricínico. La estructura química ilustra los principales grupos funcionales del principio activo, así como la porción hidrófila (porción carbohidrato) y hidrofóbica (porción esteroide).

El GA es un ácido débil en cuya molécula se encuentran tres grupos carboxilo y cinco grupos hidroxilos capaces de interactuar con otros grupos funcionales por medio de la formación de puentes de hidrógeno (Fig.6). El GA presenta propiedades de superficie únicas en su tipo, como: actividad interfacial considerable, formación de micelas y geles rígidos termo-resistentes y capacidad de actuar como agente emulsificante debido al grupo COOH fácilmente dissociable del extremo hidrofóbico de la molécula. Posee un sabor altamente dulce debido a que forma agregados solubles en agua que se unen a los receptores en la lengua de dicho sabor (Cuadro.1). Izutani, 2014

1.4.2 Características fisicoquímicas

Formula molecular	$C_{42}H_{62}O_{16}$
Peso molecular	822.94 g/mol
Punto de fusión	209 °C
Coefficiente de partición (octanol/agua)	Log K o/w =2.80
Solubilidades	Muy soluble en agua caliente, alcohol. Prácticamente insoluble en éter
pKa's	pKa1 = 2.76 □} 0.70, pKa2 = 2.81 □} 0.70 y pKa3 = 4.71 □} 0.70
Concentración micelar crítica	2 a 3 x 10 ⁻⁴ mol/L
Apariencia física	Polvo fino blanco hasta amarillo claro
Naturaleza química	Saponina tripenoide de origen natural
Uso terapéutico	Posee actividad antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, hepatoprotectora, entre otras.

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido glicirricínico

1.4.3 Propiedades antivirales

La gran atención recibida hacia las diferentes especies de Glycyrrhiza en la medicina tradicional y el descubrimiento del GA como principal componente activo en las preparaciones a base de regaliz ha llevado al estudio de sus propiedades farmacológicas en los últimos años. En diferentes estudios, el GA se ha propuesto como antiviral, actuando sobre virus *in vitro* e *in vivo*, ya que impide la replicación de virus ADN y ARN, dicha

actividad antiviral está ligada a las propiedades generales de las saponinas. Investigaciones sobre la actividad de GA reportan que el compuesto inhibe el ciclo de replicación del virus de Epstein-Barr en una etapa temprana afectando el posible mecanismo de unión-penetración. [Lin, 2003](#)

1.4.4 Ácido glicirricínico y PRRSv

Estudios recientes demostraron que SLN con GA disminuyen la infectividad del PRRSv en células MARC-145, sin embargo, los autores reportaron que éstas indujeron cambios en la morfología de las células, por lo que su efecto sobre la estructura celular no ha sido estudiado.

[Urbán, 2015](#)

II. JUSTIFICACIÓN

El PRRSv está distribuido de manera mundial, presentando gran variabilidad genética y antigénica con un marcado incremento de la virulencia, siendo reconocida como una enfermedad económicamente devastadora. Las vacunas han sido una herramienta poco útil para controlar el problema por lo que este estudio representa una buena oportunidad de generar nuevas alternativas de tratamiento. El desarrollo de nuevas tecnologías que permitan combinar las ventajas de la nanomedicina con la medicina tradicional, es un campo prometedor. Estudios recientes reportaron que SLN con GA disminuyen la infectividad del PRRSv en células MARC-145, sin embargo se reportó que éstas también inducen cambios en la morfología celular [Urbán, 2015](#), por lo que en este trabajo se plantea realizar la evaluación del efecto de dos acarreadores nanoparticulados que permitan conservar la morfología celular y por lo tanto ser usados como vehículo de agentes antivirales como el GA, para sentar las bases a estudios que permitan a la comprensión del mecanismo de acción de este compuesto pre y pos-infección con el PRRSv.

III. HIPÓTESIS

Si las nanopartículas de naturaleza lipídica y polimérica conservan la integridad de la morfología celular, entonces permitirán su uso como vehículo del ácido glicirricínico para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el PRRSv.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nanopartículas lipídicas y poliméricas como vehículo del ácido glicirricínico sobre la morfología celular pre y post-infección *in vitro* con el PRRSv.

4.2 Objetivos Particulares

- Desarrollar formulaciones de nanopartículas lipídicas y poliméricas para su empleo como vehículo de ácido glicirricínico mediante el método de enfriamiento de la microemulsión (*homogeneización con rotor estator*) y emulsificación-difusión.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las nanopartículas mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz, microscopía electrónica de barrido, movilidad electroforética-velocimetría láser doppler para la caracterización del tamaño de partícula, morfología, potencial Z.
- Evaluar el efecto de las NPDC sobre las células MARC-145 determinando rearrreglos o alteraciones de los filamentos de actina mediante ensayos de fluorescencia directa y cambios en la morfología y estructura celular a través de microscopía de fluorescencia.
- Estandarizar la infección *in vitro* de células MARC-145 determinando el efecto del GA incluido en las NPDC antes y después de infección del PRRSv para establecer si existe un efecto de tipo preventivo, inhibitorio y/o curativo.
- Evaluar el efecto de las NPDC con y sin GA en células MARC-145 empleando la tinción de exclusión de azul de tripán para determinar su efecto sobre la viabilidad celular.
- Determinar el efecto de las NPDC con y sin GA sobre la actividad mitocondrial y lisosomal mediante los ensayos de MTT [*3- (4,5-dimetil tiazol-2-il)-bromuro de 2,5-difenil tetrazolio*] y Rojo neutro, para determinar citotoxicidad.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Soluciones de GA

Las soluciones de ácido glicirricínico se prepararon a partir de una solución stock de 10 mg/ml de GA en medio RPMI, todas las soluciones y la solución stock fueron filtradas empleando un filtro de 0.22 μ m bajo condiciones de esterilidad.

5.2 Cultivo celular

5.2.1 Línea RK13

La línea RK13 (*rabbit kidney, ATCC CCL37*) se empleó únicamente para la estandarización de las técnicas utilizadas en este trabajo, así como modelo de estudio sobre el citoesqueleto de actina y los posibles cambios inducidos por las NPDC. Las células se cultivaron independientemente en monocapa en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*).

5.2.2 MARC-145

La línea MARC-145 (*clon of MA-104 kidney african green monkey*), se utilizó en los desafíos de infección con el PRRSv. Las células se cultivaron en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*). Para ambas líneas celulares los medios de elección se suplementaron con 10 % y 2 % de suero fetal bovino (*SFB*) para crecimiento y mantenimiento respectivamente y penicilina, 5000 UI/ml y estreptomycin, 5 μ g/ml, manteniéndose los cultivos en una incubadora humidificada con una mezcla de 95:5 aire/CO₂ a 37°C, hasta alcanzar una confluencia de 80-90% para su uso en los distintos experimentos.

5.3 Virus

Se trabajó con dos cepas de PRRSv (*VR2332*), PRRSv1 fue obtenida a partir de la vacuna comercial de virus vivo “*Ingelvac® PRRS MLV*” laboratorio Bôehringer Ingelheim, y la PRRSv2 aislado de un brote de campo. El virus se reconstituyó en medio RPMI para su propagación en cultivos MARC-145 los cuales al mostrar cambios citopáticos fueron sometidos a 3 pasos de congelación/descongelación para lisar las células y liberar la carga viral al medio; el medio resultante fue centrifugado a 5000 rpm durante 20 min, se recuperó el sobrenadante para filtrarlo en una membrana de 0.22 μ m y alicuotó bajo condiciones de

esterilidad para su posterior uso en los ensayos. Posteriormente a la propagación y recuperación del virus, se calcularon los títulos virales.

5.3.1 Titulación viral

La titulación del PRRSv se realizó por medio del método de “*Reed and Muench*”, el cual es un análisis biológico de punto terminal 50, el cual depende de la medición de la muerte de un animal, infección o efectos citopáticos en los cultivos, a través de una serie de diluciones. Para evaluar la infectividad viral, se inoculan diluciones decuples del virus en un sistema de prueba (*embrión de pollo, cultivos celulares o animales*). Se cuantifica la infectividad de acuerdo a la observación de las lesiones en el sistema huésped y de efectos citopáticos en cultivos celulares, expresándose como “*Dosis Infectante en Cultivos o Tejidos*” ($TCID^{50}$), en embrión de pollo “*Dosis Infectante Embrión*” (DIE^{50}), o la muerte de animales experimentales “*Dosis Letal*” (DL^{50}). El título se expresa como 50% de la dosis infectante, que es el recíproco de la dilución del virus que produce el efecto en el 50% de las células o animales inoculados. ^{Mohanty, 1981} Células MARC-145 fueron sembradas en placas de 96 pozos, al alcanzar 90% de confluencia fueron infectadas con 180 μ l/pozo de PRRSv (10^{-1}) y partir de esta se llevaron a cabo diluciones del rango de 10^{-1} a 10^{-10} . El título se expresó como $TCID^{50}$.

5.4 Elaboración de NPDC

5.4.1 SLN

Las SLN se prepararon por el método de enfriamiento de la microemulsión a partir de minilotes (50 ml) 10% (5 g) de lípido sólido fundido de lauril polioxiglicéridos (*Gelucire 44/14 GATTEFOSSÉ*®), 1.5% (0.75 g) surfactante no iónico F127 (*Sigma-Aldrich*®) y 3 % (1.5 g) de GA (*Glycyrrhizic acid ammonium salt, $\geq 95.0\%$, Sigma-Aldrich*®). En el cual la fase oleosa se adicionó con flujo lento, dentro de un exceso de agua fría (1:50), dispersando con agitación a 1500 rpm con un agitador de varilla (*IKA*® *RW20*), hasta lograr la formación de nanogotas del lípido. Una vez obtenidas las SLN, se procedió a separarlas por ultracentrifugación con dos ciclos de 50 000 rpm (384 871 g) durante 1 h (*Optima LE-80K Beckman-Coulter*®), las SLN fueron resuspendidas en 1 ml de agua miliQ (*Millipore*®, USA-Bedford, MD) (Fig.7).

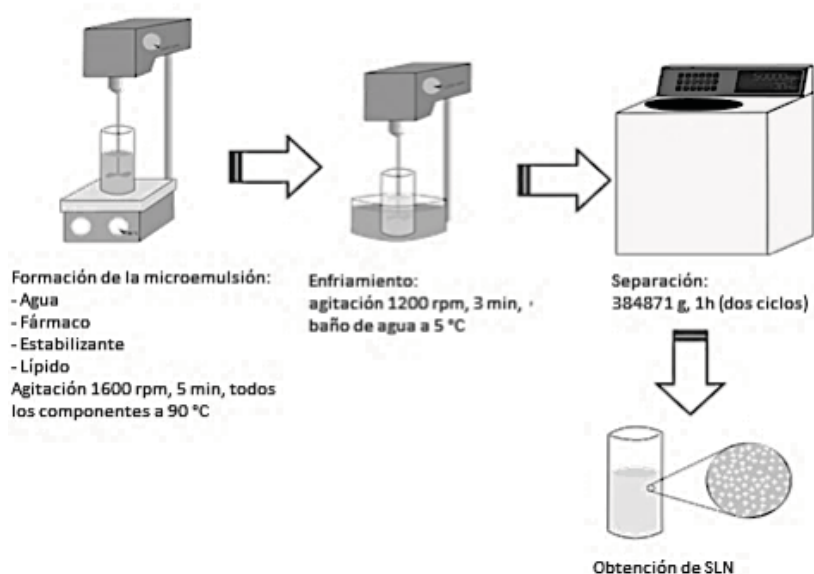


Fig 7. Método de enfriamiento de la microemulsión. Diagrama de la metodología empleada para la generación de SLN Urbán, 2015

5.4.2 PNPs

Las nanopartículas poliméricas (*poli ε-caprolactona*) se prepararon siguiendo el método modificado de emulsificación-difusión conforme a lo reportado por *Quintanar, 1998*. La saturación del solvente se realizó mezclando partes iguales de agua y acetato de etilo durante 20 min, posterior a la separación, ambas fases fueron recuperadas de manera independiente, desechando la interfase, 2 g de Mowiol 4-8 fueron disueltos en 40 ml de la fase acuosa y 400 mg de poli ε-caprolactona en 20 ml de la fase orgánica. La fase acuosa y orgánica fueron agitadas a 11000 rpm durante 10 min con un equipo *Ultraturax®*, al finalizar se les añadió 100 ml agua miliQ (*Millipore®*, *USA-Bedford, MD*) para la posterior evaporación del solvente en el rotavapor durante 1h a 40°C y 60 rpm.

Las PNPs se dejaron estabilizando 24 h a 4°C y se centrifugaron a 30000 rpm por 30 min, para re-suspenderlas en 2 ml de H₂O. Finalmente, las PNPs se adicionaron por flujo lento a una solución 20 ml de buffer de acetatos con 37 mg de GA, manteniendo la formulación en agitación magnética a 500 rpm durante 1 h para la absorción de fármaco. En todas las preparaciones el agua empleada fue calidad Milli-Q (*Millipore®*, *USA-Bedford, MD*) (Fig.8).

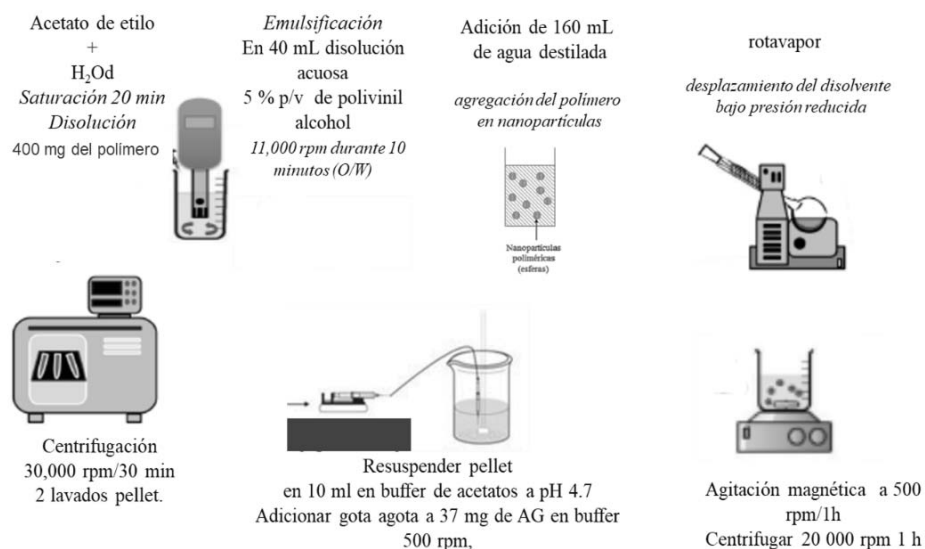


Fig 8. Método modificado de emulsificación-difusión. Diagrama de la metodología empleada para la generación de las PNPs.

5.5 Caracterización de las NPDC

Para la caracterización de las nanopartículas se determinó el tamaño de partícula, se empleó la técnica dispersión dinámica de la luz (*DLS*) usando un contador submicrónico de rayos láser de partículas con dispersión de láser a un ángulo de 90° (*Nanosizer® N4 Plus*) con longitud de onda de 680 nm durante 3 min a 25°C , las muestras fueron diluidas en agua destilada hasta estar en el rango de sensibilidad del aparato. Los datos de la luz dispersada se analizaron mediante un correlacionador digital en el modo de análisis unimodal. Se seleccionaron sólo las formulaciones con un *PI* menor a 1. Las muestras fueron analizadas a diferentes tiempos; 1, 2, 3, 4, 15 y 30 días post-elaboración, y al finalizar la medición las muestras fueron recuperadas para la evaluación del Potencial Z, mediante microelectroforesis láser Doppler, en un equipo *Malvern® Instruments Limited R.U Zetasizer Nano HS (ZEN3600)*, el cual emplea un láser de *He/Ne* de longitud de onda de 633 nm y 4 mW. Se realizaron un promedio de 100 lecturas. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Para el análisis de *MEB*, las muestras fueron colocadas en una membrana de filtración con poro de $0.22\ \mu\text{m}$ para ser secadas a 25°C y se colocaron sobre una rejilla para ser cubiertas

con una fina película de oro (~20 nm de grosor) durante 5 min a 7 amp en un equipo de *Denton Vacuum*, para su posterior visualización a 25 000x en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (*JSM-6010LA* marca *Jeol*®).

5.6 Evaluación de la estructura celular

Para la detección de los cambios en la estructura celular, las células se cultivaron en microplacas de 24 pozos con cubreobjetos circulares de 12 mm previamente esterilizados, a una densidad de 1×10^5 células por pozo, hasta alcanzar confluencia del 80-90% para someterlos a la exposición con los diferentes tratamientos.

5.6.1 Fluorescencia directa para la visualización del citoesqueleto de actina

Para la visualización del citoesqueleto de actina las células fueron fijadas con formalina acuosa al 10% durante 20 min, para su posterior permeabilización con tritón X-100 al 0.5%, y se bloquearon con albumina sérica bovina (*BSA*) al 1% en PBS. Para la detección de los filamentos de actina se utilizó faloidina conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (*Phalloidin-TRITC labeled, Sigma*) (diluida 1:100 en PBS) durante 20 min en cámara húmeda protegida de la luz, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X y un lavado final con agua desionizada, para hacer el montaje en portaobjetos utilizando medio de montaje especial para fluorescencia con 4'6-diamino-2-phenylindole (*DAPI*) (*Ultracruz™ Mounting Medium for Fluorescence, Santa Cruz*). Las muestras se observaron y analizaron con un microscopio de fluorescencia marca Carl Zeiss, modelo Axioscop 40 acoplado a una cámara de color marca *Evolution VF*.

5.7 Viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular se emplearon las determinaciones de la función mitocondrial y lisosomal empleando los ensayos de MTT (*Thiazolyl blue [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]*) y rojo neutro respectivamente.

5.7.1 Ensayo de MTT

Determina la capacidad de las células de convertir las *sales de tetrazolio* a *formazán*, por la acción de la enzima “*reductasa succinato-tetrazolio*”, la cual es una enzima mitocondrial

activa sólo en las células viables. La cantidad de colorante producido es proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas.

Para el ensayo de MTT una vez finalizadas las exposiciones, se añadió medio de cultivo con una solución de MTT (*0.5mg/ml*) para su posterior incubación durante 3 h en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ a 37 °C. Posteriormente las células fueron lisadas con 330 µl de *DMSO*. Finalmente, la intensidad del producto fue analizada por espectrofotometría a 570 nm en un lector de placas de *ELISA*.

5.7.2 Ensayo de Rojo neutro

El ensayo de rojo neutro (*NRU*, del inglés “*neutral red uptake assay*”) es un ensayo de quimiosensibilidad de supervivencia/viabilidad celular basado en la capacidad de las células viables para incorporar y unir el colorante supravital rojo neutro. El rojo neutro es un tinte catiónico débil que penetra fácilmente en las membranas celulares por difusión no iónica y se acumula intracelularmente en lisosomas. Alteraciones de la superficie celular o de la membrana sensitiva lisosómica conducen a fragilidad lisosómica y otros cambios que se vuelven irreversibles gradualmente. Tales cambios provocados por la acción de xenobióticos resultan en una disminución de la captación del colorante por ello este ensayo permite conocer si las células han experimentado citotoxicidad particularmente a nivel de lisosomal.

Después de la exposición a los diferentes sistemas, las células se incubaron con una solución de rojo neutro durante 3 h a 37°C, posteriormente, se retiró el colorante y las células se fijaron con una solución de formaldehído al 0.5%, una vez realizado lo anterior se extrajo el colorante con una solución de ácido acético al 1% y etanol al 50% para proseguir con una fase de agitación a temperatura ambiente durante 10 min, la lectura de la absorbancia se realizó a 540 nm.

5.7.3 Tinción exclusión de azul de tripán (Tripán Blue)

El azul tripán (*TB*) (*azul diamina*, *azul niagara*, *azul vital*) es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. En los ensayos de

citotoxicidad es empleado para evaluar la viabilidad celular por “*exclusión de captación*”, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras.

Las muestras fueron incubadas con proporción 1:1 de solución de azul de tripán al 0.4% (w/v) durante 10 minutos al empleando un equipo automatizado (*TC20TM Automated Cell Counter, Bio-Rad*), en un rango de concentración de detección de $5 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ cel/ml; 10 μ l de la suspensión celular fueron colocados por duplicado en un portaobjetos con doble cámara de conteo (*C20TM counting slides, Bio-Rad*). Inmediatamente después fueron introducidas en el equipo para su conteo.

5.7.4 Tinción de naranja de acridina (Acridine orange staining)

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min, posteriormente fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas durante 20 min con una solución de naranja de acridina al 0.001% en H₂O destilada, posteriormente fueron lavadas tres veces y observadas al microscopio de fluorescencia. Se capturaron imágenes de 10 campos aleatorios para su cuantificación y evaluación mediante el software *Image J*. La resolución nominal de las imágenes fue de 1 μ m/5 píxeles para el objetivo de 40x para el microscopio de fluorescencia *Zeiss Axio scope 40[®]* y 1 μ m/2 píxeles para el objetivo 10x del microscopio invertido marca *UNICO[®]*.

5.8 Hematoxina y eosina (H&E stain)

La coloración de hematoxilina - eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células, permite tener una herramienta sencilla para determinar si existe daño. Consiste en la tinción de los núcleos mediante el colorante hematoxilina, previamente oxidado y transformado en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (*para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o fierro*). Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron. El citoplasma y material extracelular es teñido por la eosina, la cual les confiere diversos grados de color rosado.

Después de las exposiciones a los diferentes sistemas, las células sembradas en portaobjetos circulares fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 min, lavadas

tres veces con PBS 1x y cubiertas con una solución de hematoxilina al 1% por 20 min, al finalizar el tiempo se procedió a retirar la hematoxilina mediante 3 lavados con PBS 1x y se cubrieron durante 10 min con eosina, finalmente las células fueron lavadas durante tres ocasiones con PBS 1x y montadas sobre portaobjetos con resina.

5.9 Captación celular

La captación celular (*del inglés, "Cellular uptake"*) SLN-GA y PNPs-GA fueron conjugadas con el fluoróforo Cumarina 6 (*C6, de Sigma Aldrich*[®]), los cultivos fueron expuestos a 50 μ l a los sistemas de NPDC durante 4 h, posteriormente fueron procesados por la técnica de fluorescencia directa mencionada anteriormente; 10 campos aleatorios por muestra fueron capturados y analizados para su cuantificación con el software *Image J*.

5.10. RT-PCR

Para la realización de la técnica de RT-PCR tiempo real (*qRT-PCR, del inglés "Reverse transcription polymerase chain reaction real"*), se empleó el conjunto de reactivos *POCKIT TM PRRSV-NA (GeneReach Biotech, Taichung, Taiwán)*, diseñado para la detección de dos de las regiones más conservadas encontradas en los genes *ORF6* y *ORF7* en el genoma de PRRSv. Las muestras fueron procesadas por el método de TRIzol[®] (*Reagent Total RNA Isolation Reagent, Life technologies*).

Los primers empleados para la identificación de ORF5-7 fueron: "*forward 5' TTT GGC AAT GTG TCA GGC ATC GTG 3'; reverse 5' CCA TTC ACC ACA CAT TCT TCC 3' "*.

5.11 Análisis estadístico y diseño experimental

Los datos obtenidos se analizaron de manera independiente con base a un diseño completamente al azar. La separación de medias se efectuó mediante las *pruebas de Tukey*. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (*ANOVA*) utilizando el paquete *GraphPad Prism 7*, empleando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ para distinguir diferencias entre los grupos. Para el análisis de imágenes se empleó el software *Image J*.

VI. RESULTADOS

Mediante el método de enfriamiento de la microemulsión y emulsificación-difusión se obtuvieron las nanopartículas las cuales fueron resuspendidas en 2 ml de agua destilada y se procedió a su caracterización y posterior esterilización con luz *UV* para su uso en los sistemas (*el tamaño de las NPDC fue determinado antes y después de la exposición a la luz UV para corroborar se mantuvieran dentro de la talla nanométrica*).

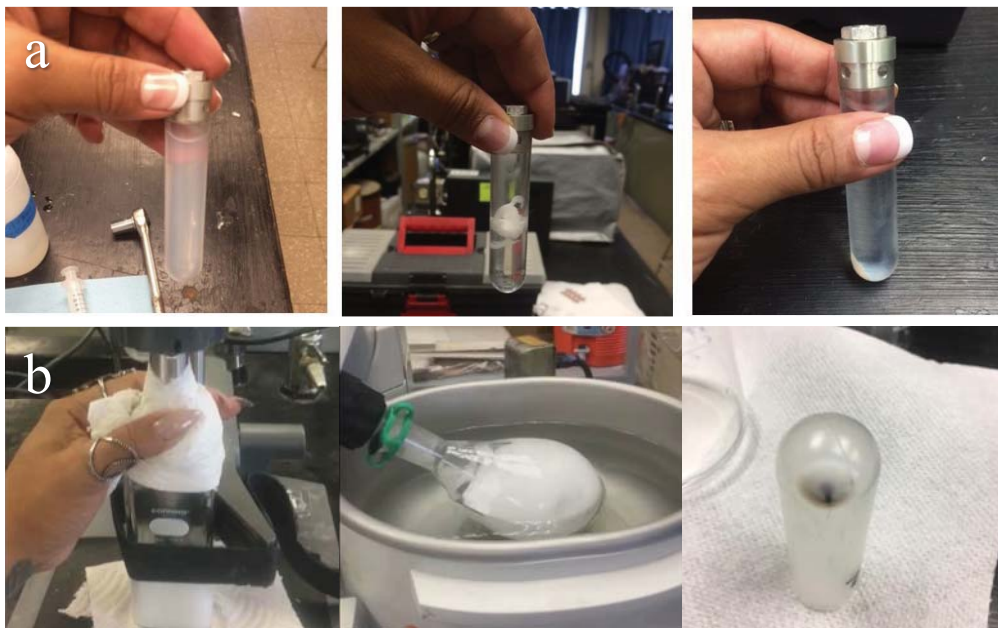


Fig. 9. Proceso de preparación de las NPDC. (a) el panel de 3 imágenes muestra el proceso se o para la obtención de las SLN antes (solución traslúcida), 1ra centrifugación y obtención de las SLN al fondo del tub después del segundo proceso de centrifugado. En el panel (b) se ilustra el proceso para la obtención de las PNPs, elaboración, evaporación del solvente y la obtención poscentrifugación.

Los NPDC fueron elaborados *Urbán et al. (2015) (Fig.9-a)* y *Escalona et al. (2017) (Fig.9-b)* para su subsecuente medición mediante la técnica DLS, se determinó que las SLN y PNPs presentaron un tamaño nanométrico con un pico máximo de intensidad a los 280.31 ± 58.73 y 217.43 nm respectivamente y con un índice de polidispersión mayor en las SLN que en PNPs, sin embargo, en ambos sistemas fue menor a 1, lo cual es indicativo de tamaños homogéneos (*Fig.11-a*).

Las SLN sin el fármaco son sistemas inestables los cuales tienden a aglomerarse formando estructuras de tamaño micrométrico desde las 96 h post-elaboración. En las formulaciones

con fármaco el periodo de estabilidad se mantuvo en escala nanométrica durante el periodo de evaluación, presentando un ligero incremento en el tamaño de partícula directamente proporcional al tiempo de elaboración en las SLN, siendo así las PNPs el sistema más estable en relación al tiempo. Las condiciones de almacenamiento de las formulaciones fueron a temperatura ambiente y sin protección de la luz (Fig.11-b).

El tamaño nanométrico fue congruente con las micrografías, las cuales evidenciaron estructuras de tamaño inferior a la micra con la formación de morfología tipo esfera (Fig.10; 11-c, d).

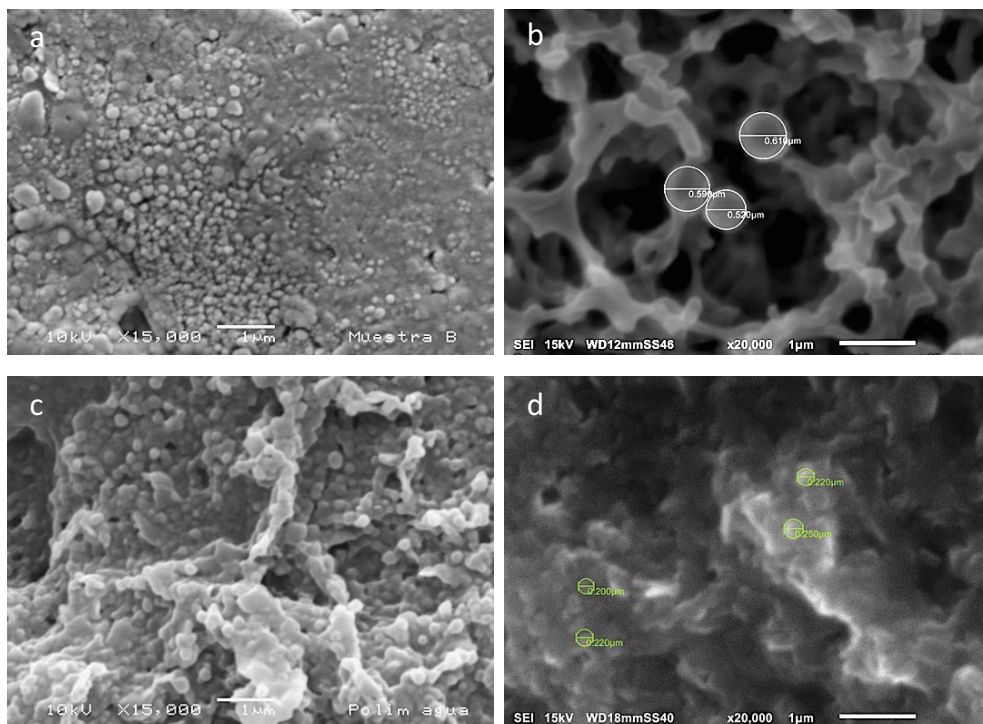


Fig 10. Micrografías de los NPDC. Las imágenes fueron tomadas con el SEM a 15 000 y 20 000x, (a,b) SLN, (c,d) PNPs. En ambos sistemas las micrografías evidenciaron que los nanotransportadores poseen tamaño inferior a la micra, así como formas esféricas. Barra= 1 μm.

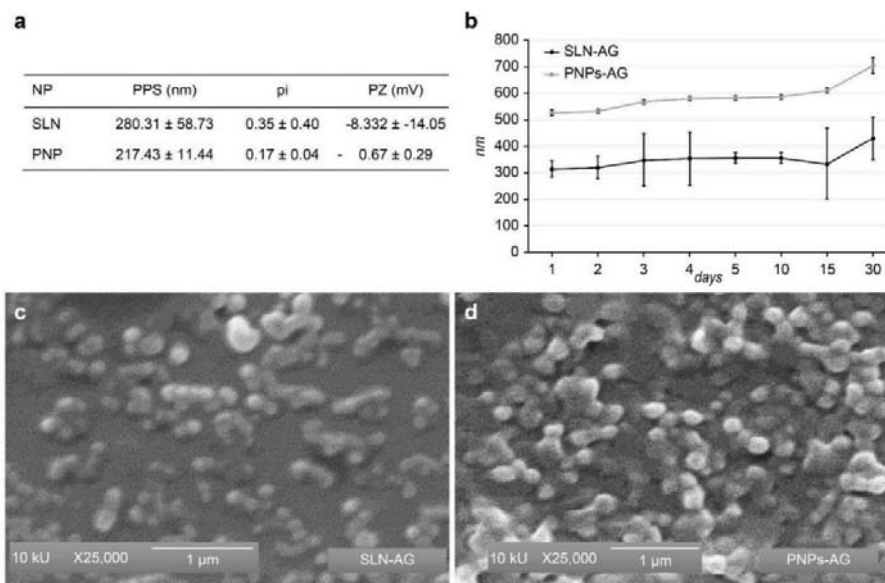


Fig 11. Caracterización de las NPDC. (a) Valores promedio de tamaño parcial de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de las NPDC. (b) Gráfico de la determinación del tamaño en rango nanométrico de las SLN-GA y PNP-AG, mediante la técnica DLS durante un periodo de 30 días, a temperatura ambiente. (c-d) Imagen de microscopia electrónica de barrido a 25 000x. Micrografías de las SLN-GA (c) y las PNP-AG (d). Barra = 1 μ m.

Para determinar el efecto de los transportadores sobre la morfología celular se realizó la evaluación del citoesqueleto de actina. Las células MARC-145 mostraron un patrón definido de los filamentos de actina que dan origen a diversas estructuras protrusivas y contráctiles para proporcionar la fuerza a una serie de procesos celulares vitales, los cuales se extienden desde la cubierta perinuclear hasta región cortical en el borde externo de la célula, con la formación de arcos (*Fig.12-a*). Los filamentos de actina forman fibras de estrés que dan soporte a la célula, en el lamelipodio forman una red dendrítica en el borde líder y tienen un papel importante en la mecanotransducción, característica de células que crecen en estratos rígidos, y claramente visibles en las células MARC-145 (*Fig.12-b, flechas amarilla y verde*).

El patrón de actina en cultivos de alta confluencia manifiesta una predominancia a nivel de la corteza celular y las fibras de estrés extendiéndose por el citoplasma (*Fig.12-c, flechas blancas y azules*).

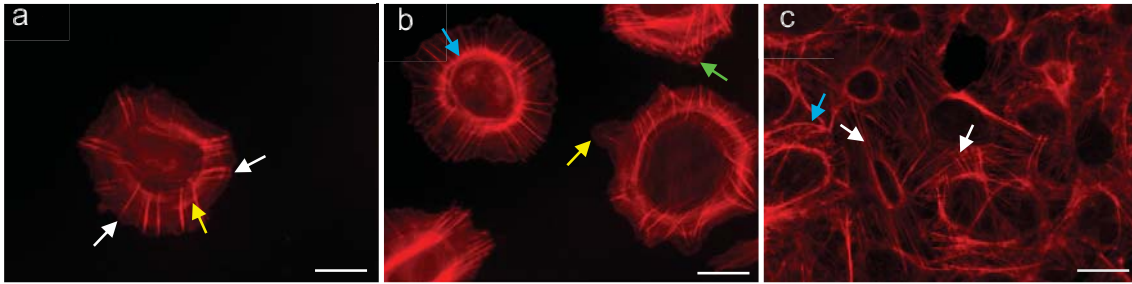


Fig 12. Citoesqueleto de actina en células MARC-145. Cultivo celular en diferentes etapas de confluencia. (a) Las células MARC-145 aisladas presentan la formación de un lamelipodio con una disposición radial soportado por fibras de estrés (flecha blanca) y formación de arcos (flecha amarilla). (b) Formación de lamelipodios (flecha amarilla), en el borde líder del lamelipodio se observa una zona enriquecida de actina (flecha verde), también se puede observar la cubierta perinuclear (flecha azul). (c) Fibras de estrés (flecha blanca) y corteza celular (flecha azul) en un cultivo celular con 90% de confluencia. Todas las células mostradas proceden de cultivos sin tratamiento. Técnica de fluorescencia directa, filamentos de actina marcados con faloidina conjugada con rodamina. Microscopía de fluorescencia 40x. Barra = 10 μm .

Para evaluar el efecto sobre la morfología y estructura de las células MARC-145 que fueron expuestas a 50 $\mu\text{l/ml}$ de las NPDC con y sin fármaco, el fármaco solo y los controles (*RPMI al 5%* y *H₂O₂ 5mM*); durante 24 h se evaluó la integridad de los cultivos mediante el microscopio invertido (*Fig.13*), para posteriormente realizar ensayos de fluorescencia directa con doble marcaje (*filamentos de actina y núcleos*) (*Fig.14*).

La exposición a las SLN sin fármaco afectó la integridad del cultivo celular en relación al control, y a los cultivos tratados con el GA (*Fig. 13*). En la *Fig. 13-c* se puede observar pérdida de la integridad de la monocapa, así como disminución del volumen celular con un patrón de células aisladas generalizado, afectando el 80% del cultivo en todos los campos observados.

Al realizar el marcaje de los filamentos de actina se obtuvieron resultados congruentes con lo observado en los monoestratos tratados con las SLN sin fármaco ya que se observó que se afectó de forma severa la morfología celular con pérdida de la estructura de los filamentos de actina (*Fig.14 SLN, flechas amarillas*), mientras que las PNPs con y sin fármaco, las SLN con fármaco y el fármaco puro mantuvieron patrones muy similares tanto en morfología celular como en la estructura de los filamentos de actina en relación al control, sin cambios celulares aparentes se conservó la estructura de la corteza celular, lamelipodios y fibras de

estrés (Fig.14-“actin”), además la presencia de núcleos céntricos y con una morfología bien definida (Fig.14-DAPI).

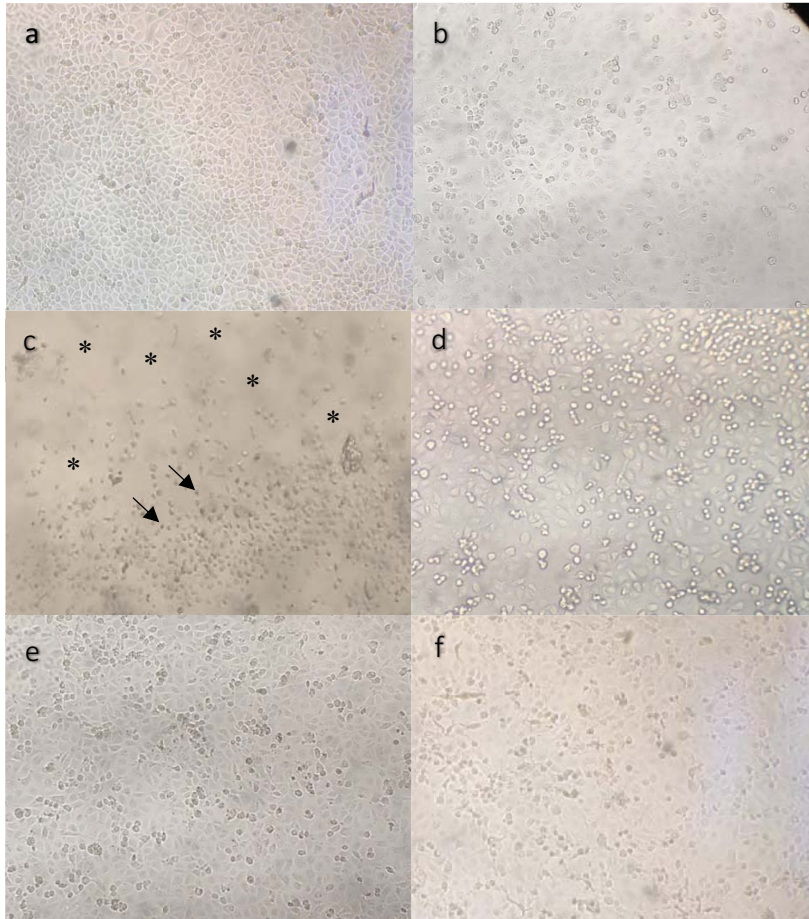


Fig 13. Células MARC-145 expuestas a NPDC. (a) cultivo control; (b) 50 mg/ml de GA; (c) SLN; (d) SLN-GA; (e) PNPs; (f) PNPs-GA. En el cultivo control (a), y los tratados con PNPs (e,f) se observa una integridad de la monocapa cercana al 100% , mientras que la afectación de la monocapa se presenta por el tratamiento con SLN, siendo la formulación sin fármaco (c) el tratamiento que evidenció el mayor daño con células compactadas de forma circular y con un patron aislado (flechas) que evoluciona a zonas acelulares (asteriscos) por desprendimiento celular.

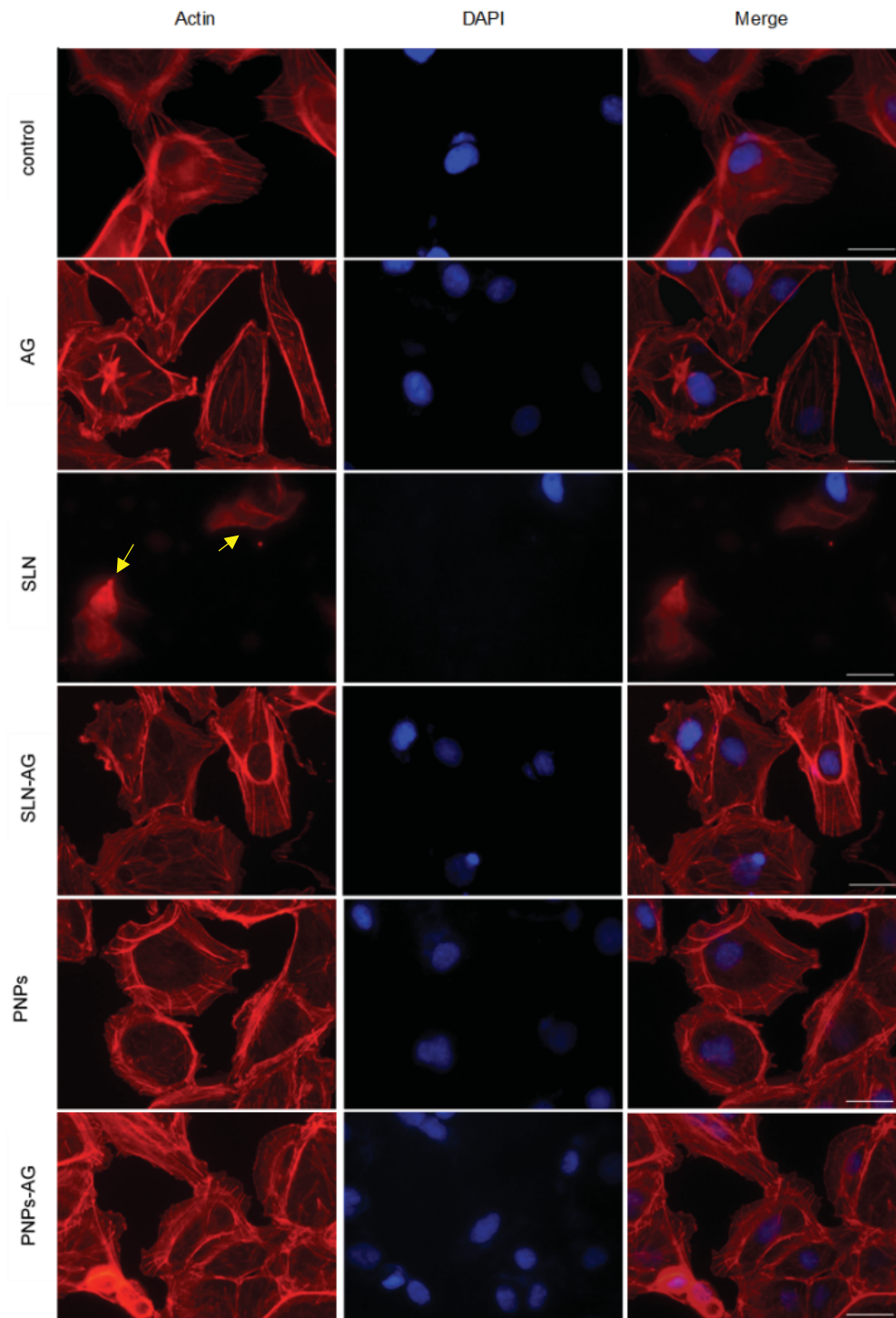


Fig 14. Evaluación del citoesqueleto de actina a la exposición con SLN y PNPs. Los cultivos fueron expuestos durante 24 h con los diferentes tratamientos a 50 $\mu\text{l/ml}$ de NPDC Técnica de fluorescencia directa con doble marcaje, filamentos de actina marcados con faloidina conjugada con rodamina y núcleos marcados con DAPI. Las flechas amarillas señalan zonas de despolimerización de la actina, característica de daño severo a la estructura celular. Microscopia de fluorescencia 40x. Barra = 10 μm .

Para iniciar con las pruebas de viabilidad se realizó una curva de absorbancia trabajando con diferentes poblaciones de células empleando la prueba de MTT. La curva se realizó a partir de 50 000, 100 000, 200 000, 400 000, 800 000 y 1 000 000 de células, las cuales fueron contadas previo a su siembra mediante una cámara de *Neubauer*. A partir de las absorbancias obtenidas se estimó la correlación entre el número de células y su viabilidad mediante una regresión lineal (*Fig.15*).

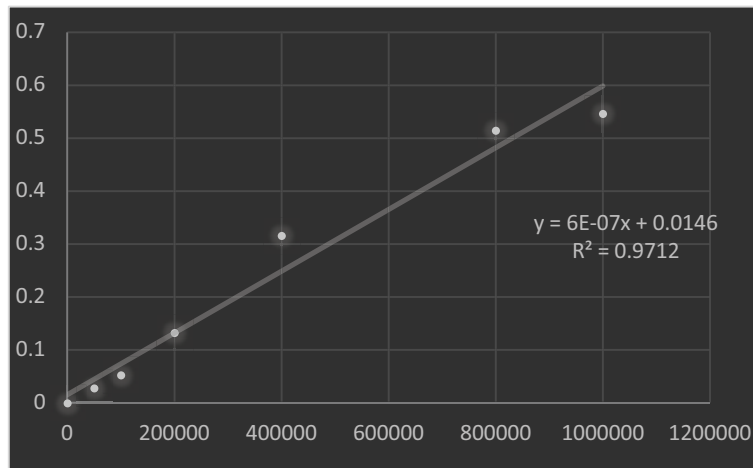


Fig 15. Curva # células vs. Absorbancia en células MARC-145. Datos obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. Regresión lineal. El análisis estadístico evidenció una correlación estadística entre la actividad de células y la absorbancia detectada por la cantidad de formazán generado por la actividad mitocondrial, fundamento de la prueba de MTT.

Mediante la estimación del índice de correlación a través de la regresión lineal se logró la obtención de concentración celular vs. absorbancia medida a 590 nm de longitud de onda. Se determinaron *valores de R^2* mayores a 0.97, esto permitió tener una curva patrón que sugiere una prueba confiable que refleja la relación entre los datos de absorbancia (*viabilidad*) y la población celular (*número de células*). Posteriormente a la exposición a los diferentes sistemas se realizó este ensayo. Las pruebas de citotoxicidad se llevaron a cabo mediante la medición de la actividad mitocondrial, actividad lisosomal (*Fig.16-a,b*) y evaluación de integridad nuclear (*Fig.17*). La prueba de MTT mostró que el rango de concentraciones de 100 a 1.25 $\mu\text{l/ml}$ de PNPs la viabilidad observada estaba por encima del 70 % en relación a las células control, condición que fue similar en el ensayo de NRU (*Fig.16-a,b*). Las SLN mostraron un menor margen de seguridad a concentraciones de mayores a 50 $\mu\text{l/ml}$ de SLN-GA y 5 $\mu\text{l/ml}$ SLN, notándose que inducen destrucción de la integridad de la monocapa

celular. A dosis menores a estas concentraciones la prueba de MTT mostró absorbancias por arriba del control que expresadas en porcentaje reflejaron un aumento de la viabilidad. Las células MARC-145 se trabajaron en una confluencia del 90% para los ensayos de citotoxicidad (Fig.16-c), el ensayo de MTT evidenció la formación de cristales de formazán al interior de las células desde la primera hora de exposición al MTT, hasta el final de la incubación a las 4 h (Fig.16-d,e).

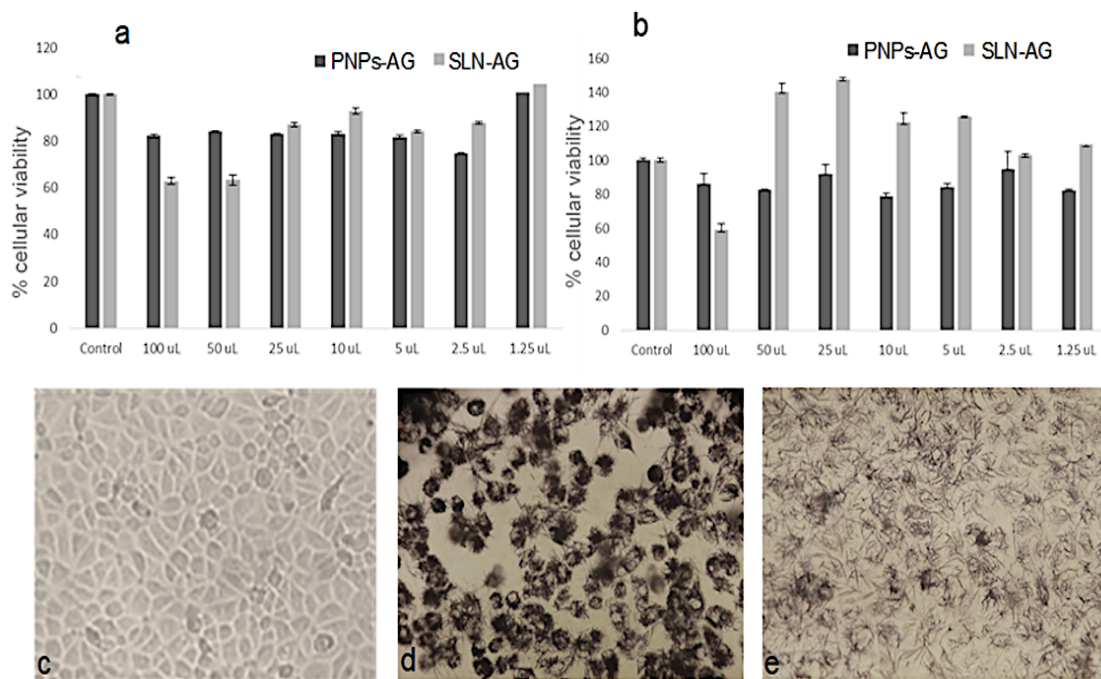


Fig 16. Citotoxicidad de las SLN y PNPs. (a) Medición de la actividad mitocondrial mediante el ensayo de MTT, (b) Determinación de la actividad lisosomal mediante ensayo de rojo neutro. Gráficos expresados en porcentaje con respecto al control de los distintos tratamientos. Datos obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. ANOVA. *** 0.001, **0.01, * 0.05. (c) Células MARC-145 control, cristales de formazán en células MARC-14 expuestas a SLN-GA (d) y a PNPs-GA (e). Barra = 100 μ m.

Las SLN-GA mostraron inducción de daño nuclear a las 72 h de exposición con disminución de la continuidad de la monocapa (Fig.17-b), resultados congruentes con lo observado en la Fig.13-c. Las PNPs-GA no evidenciaron pérdida de la integridad celular y nuclear bajo el mismo esquema de exposición (Fig.17-c). La capacidad de internalización celular de los sistemas fue medida mediante ensayos de fluorescencia. Durante la elaboración de las NPDC se añadió el fluoróforo cumarina 6, para someter a los cultivos a una exposición aguda durante 4 h, el citoesqueleto de actina y los núcleos fueron marcados y observados al

microscopio de fluorescencia. Los sistemas SLN-GA y PNPs-GA mejoraron los procesos de internalización celular medido indirectamente por desplazamiento de la cumarina 6.

Las NPDC mostraron un marcaje que sugiere su internalización en las estructuras celulares, el cual fue dependiente del tiempo de exposición, las SLN-GA y PNPs-GA con cumarina 6 evidenciaron un marcaje abundante en la periferia del citoplasma celular (*Fig.17-e,f*) en contraste con el cultivo expuesto a la cumarina 6 libre en el medio, en el cual el fluoróforo se observaba distribuido de manera uniforme en toda la preparación (*Fig.17-d*).

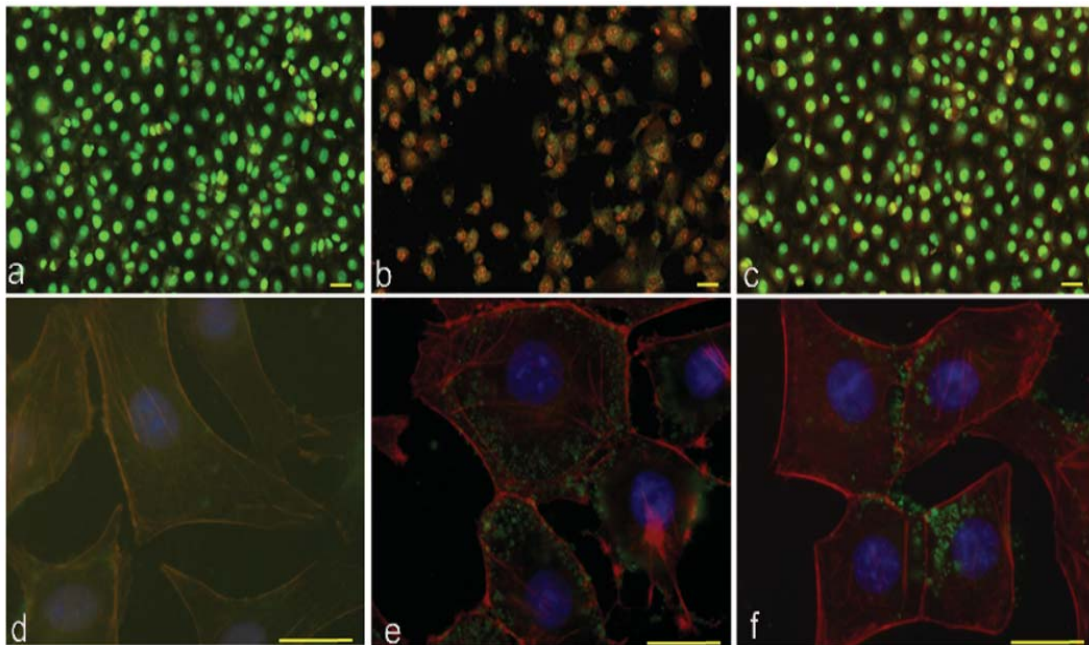


Fig 17. Integridad nuclear y captación celular de las NPDC con GA. Cultivos de células MARC-145 fueron expuestos a los sistemas nanoparticulados con el fármaco durante 24 h para su posterior tinción con naranja de acridina para evaluar el efecto sobre la integridad nuclear. (a) Control, (b) SLN-GA y (c) PNPs-GA. Internalización de las NPDC en las células a las 4 h de exposición mediante el marcaje con cumarina 6. (d) Cumarina6 libre en el medio, (e) SLN-GA y (f) PNPs-GA cargadas con cumarina 6. Técnica de fluorescencia directa con doble marcaje, filamentos de actina marcados con faloidina conjugada con rodamina y núcleos marcados con DAPI. Microscopía de fluorescencia 20x. Barra = 50 μ m.

Una vez establecida la seguridad de los sistemas se procedió a realizar los ensayos de infección en los cultivos. Dos muestras de virus cepa americana fueron evaluadas con la finalidad de establecer la que presentaba el mayor efecto citopático en las células. La muestra de PRRSv1 fue obtenido de la vacuna comercial Ingelvac, y la PRRSv2 fue un virus aislado de una infección de campo. Cultivos MARC-145 fueron sembrados a 70% de confluencia en

3 cajas de 60 mm, la caja 1 fue el cultivo control, la caja 2 se infectó con 500 μ l de PRRSv1, y la caja 3 con PRRSv2, la cual se dejó adsorbiendo durante 1 h a 37 °C. al concluir el tiempo de incubación se recuperó el virus y finalmente se añadió medio RPMI al 3% para seguir el curso de la infección. Al observarse la aparición de los primeros efectos citopáticos, el medio de cultivo fue retirado para adicionar 2 ml de medio RPMI sin SFB, las cajas fueron selladas bajo condiciones de esterilidad con parafilm y sometidas a 3 ciclos de congelación-descongelación para lisar las células y liberar las partículas virales al medio, el cual se recuperó en tubos falcon esteriles y se centrifugó por 20 min a 5000 rpm, al finalizar el procedimiento se recuperó el sobrenadante y se desecho el botón con los restos celulares, el medio se alicuotó para la infección en ensayos posteriores (Fig.18) .

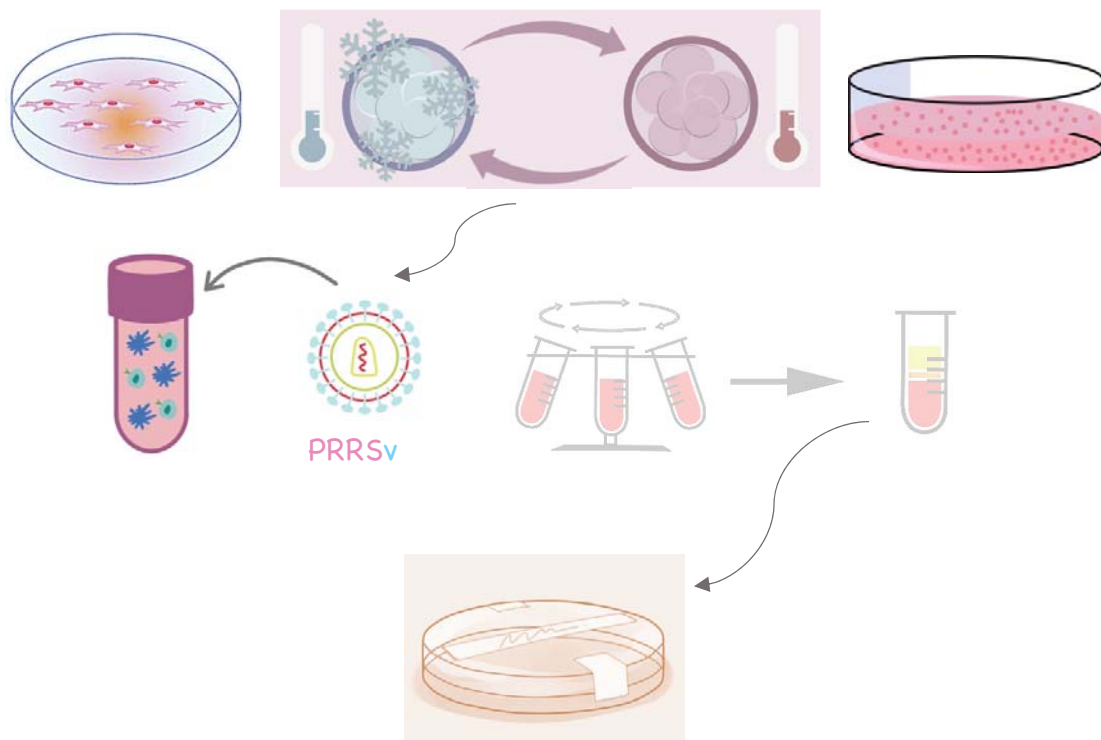


Fig 18. Método para la propagación de PRRSv en células MARC-145. Propagación del virus proveniente de una vacuna comercial, se llevó a cabo durante 48 hpi en cultivos MARC-145, seguidos de tres ciclos de congelación-descongelación, centrifugado y recuperación del sobrenadante para finalizar con su esterilización por filtración con poro de 0.22 μ m.

La titulación del virus propagado en las células MARC-145 se realizó por el método de *Reed and Muench 1938*. El PRRSv propagado presentó un título de $DIE_{50}=10^{6.77}$ (Fig.19-a).

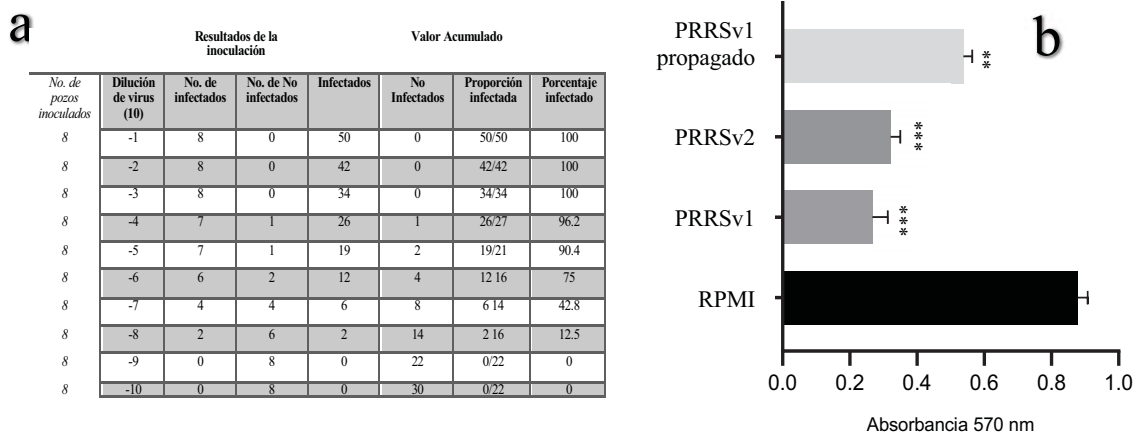


Fig 19. Citotoxicidad de los PRRSv en células MARC-145. Titulación por el método de Reed and Muench del PRRSv1 propagado. ANOVA de los resultados de citotoxicidad por MTT a las 72 hpi. (a) La prueba de Reed and Muench indicó que diluciones menores a la 10^{-5} son eficientes para la inducción de efectos citopáticos en el cultivo. El PRRSv1 presentó la mayor citotoxicidad comparado con el cultivo control; (b) Efecto citopáticos de dos PRRSv y el virus propagado y recuperado del 3er pase en células MARC-145. ANOVA, *** 0.001, **0.01, * 0.05 Datos obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

Una vez obtenido el título viral se realizó la infección en cultivos de células sembradas sobre cubreobjetos para determinar los cambios morfológicos (*efecto citopático*) y las alteraciones en la estructura del citoesqueleto de actina inducidos por el PRRSv. El efecto citopático producido por la infección con el PRRSv es visible al evaluar los cultivos mediante microscopía óptica, caracterizándose por la adquisición de una forma redondeada, pérdida de la relación núcleo-citoplasma, vacuolización, formación de sincitios, y lisis celular (*desprendimiento general del estrato*) afectando la integridad de la monocapa (Fig. 20). Los resultados mostraron que $200 \mu\text{l}$ de PRRSv1 son efectivos hasta el tercer pase, a partir de este pase la infectividad se ve disminuida bajo las condiciones experimentales mostradas en esta investigación (Fig. 19-b), siendo el virus PRRSv1 el que mostró el mayor efecto citopático destruyendo el 76.8% del monoestrato comparado con el 46.4% de daño producido por el PRRSv2 a las 48 hpi, por esta razón para los estudios de infectividad fue elegido el PRRSv1.

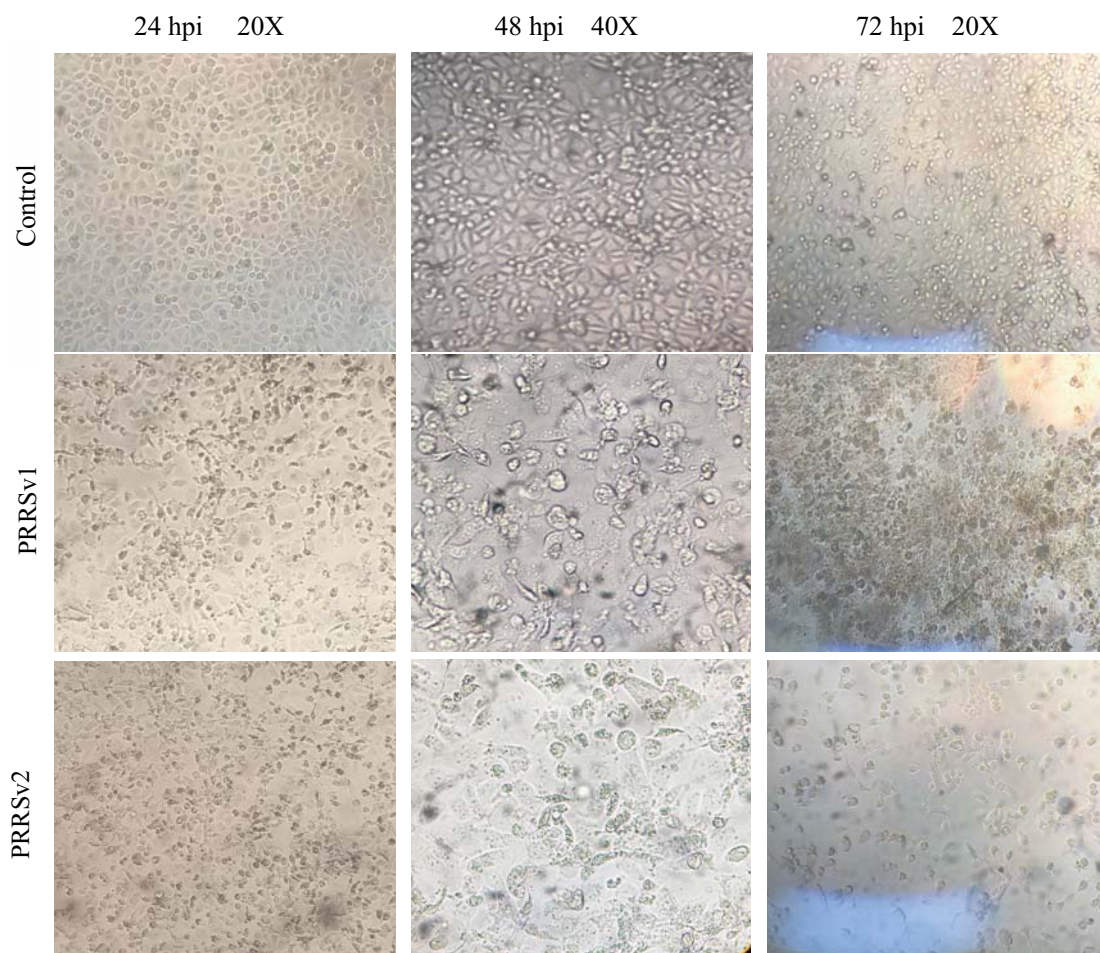


Fig 20. Cambios citopáticos inducidos por PRRSv en células MARC-145. La presencia de focos de daño fueron observados durante un periodo de las 24 a las 96 hpi. Cultivos MARC-145 control e infectados con PRRSv 1 y 2. Microscopia de campo claro. Imágenes obtenidas a partir de 3 experimentos independientes.

Los cultivos fueron teñidos mediante la tinción convencional *H&E* para evaluar la morfología durante la infección, los cuales se evidenciaron a partir de las 24 hpi (*Fig.21*). Se observaron cambios en la morfología celular, lisis, vacuolización y formación de sincitios a partir de las 24 hpi (*Fig.21-b*). El efecto citopático mayor se presentó entre las 48 y las 72 hpi, en este tiempo el daño a la integridad de la monocapa fue superior al 70%, las células adheridas presentaron un patrón aislado con numerosas vacuolas a nivel citoplasmático que proporciona un aspecto granular, pérdida de la relación núcleo-citoplasma y cambios morfológicos que van de formas redondeadas (*Fig.21-d*) hasta una morfología de tipo fusiforme con núcleos picnóticos (*Fig.21-e*), que finaliza con el desprendimiento por muerte celular (*Fig.21-f*).

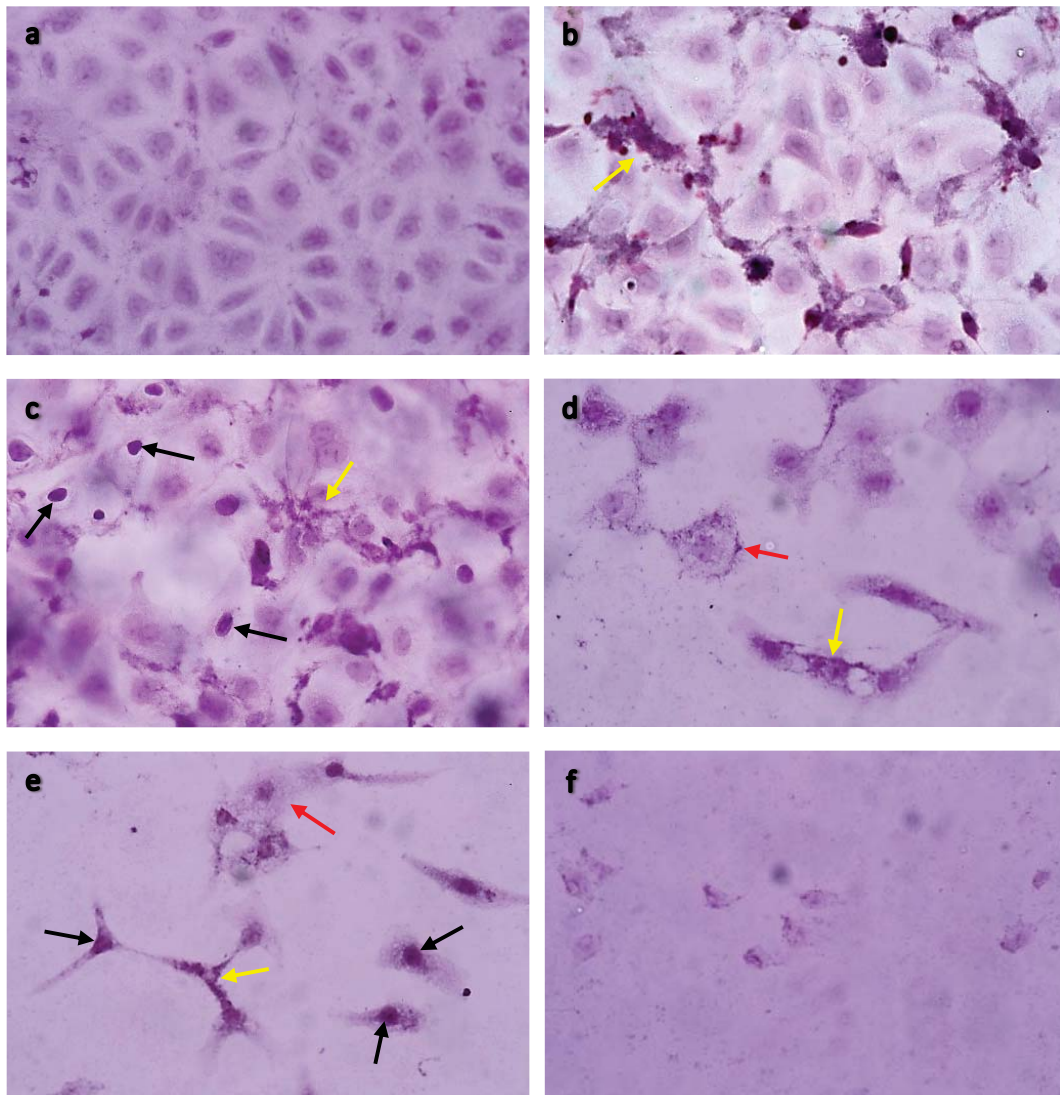


Fig 21. Evaluación morfológica de células MARC-145 infectadas con PRRSv *in vitro*. (a) control, (b) 24 hpi, (c) 48 hpi, (d,e) 72 hpi, (f) 96 hpi, tinción H&E. Las flechas negras señalan la presencia de núcleos picnóticos, flechas amarillas señalan la presencia de material basófilo de tipo granular a nivel citoplasmático, flechas rojas señalan las zonas de vacuolización.

En las etapas tempranas de la infección (24 hpi) la evaluación sobre el citoesqueleto de actina evidencia la formación de puentes delgados llamados “*citonemas o puentes filopodiales*”. Estas estructuras conectan a las células entre sí a través de mecanismos de adhesión membrana (Fig. 22).

El aumento en la formación de citonemas se relacionó con la formación de “*sincitios*”, los cuales se observan como grupos celulares cuya fusión da origen a células gigantes multinucleadas (Fig.23-d). Dichas estructuras no fueron observadas en los cultivos control.

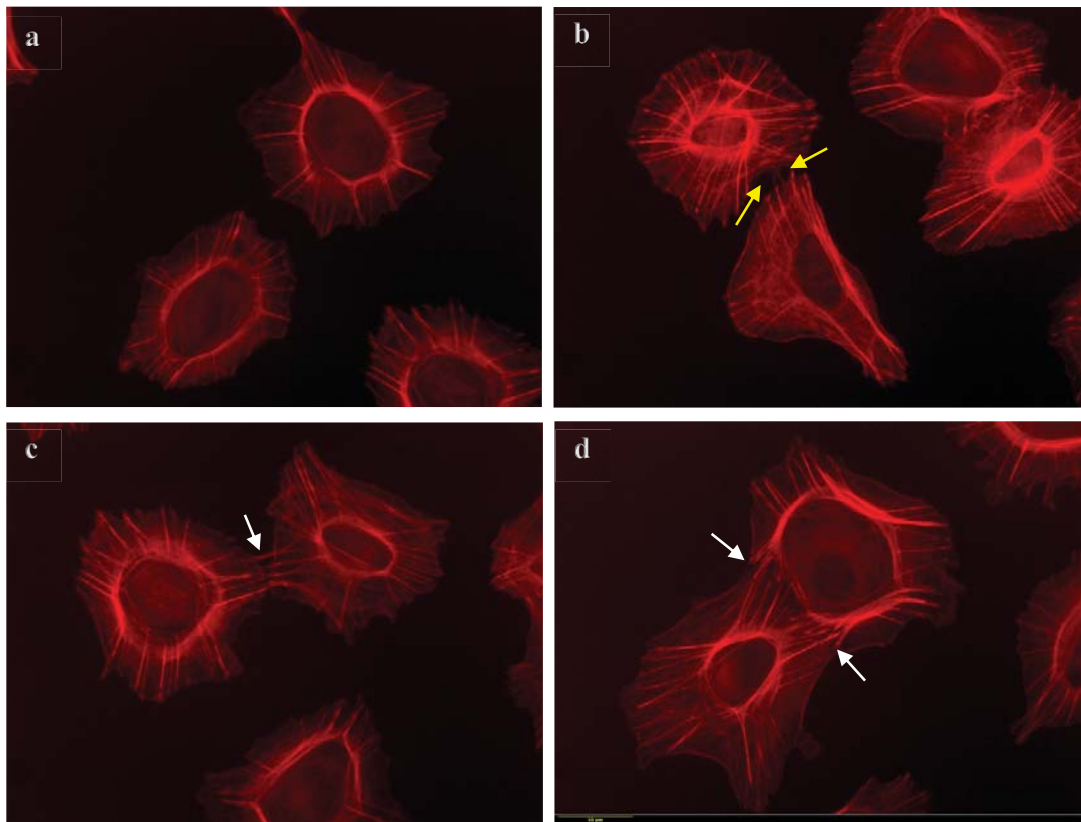


Fig 22. Puentes filopodiales inducidos por PRRSV. La infección con el PRRSV induce la formación de citonemas en células MARC-145 a las 24 hpi. (a) 2 hpi, (b) 6 hpi, (c) 12 hpi, (d) 24 hpi. Las flechas amarillas señalan la presencia de filopodios en las células confluentes; las flechas blancas señalan las zonas de formación de citonemas y sincitios. Microscopía de fluorescencia, 40x. Barra 10 μm .

La formación de sincitios marca el inicio de los cambios celulares en los cultivos infectados a las 24 hpi (Fig.23-a), el periodo de tiempo donde se evidenció el mayor daño al monoestrato fueron de las 48 a las 72 hpi (Fig. 23-b,c,d). Una vez establecidos los sincitios que evolucionan a la formación de células gigantes multinucleadas (*resultantes de la fusión de varias células como consecuencia del proceso de la infección viral*), se observa un cambio en la estructura de las fibras de estrés (*disminución o pérdida de las fibras de estrés*) (Fig.23-d) y de la integridad nuclear (Fig. 24), la cual evoluciona a la muerte de las células entre las 72 y 96 hpi. A las 48 hpi se aprecia un engrosamiento de la corteza celular (Fig.23.b, flecha amarilla) acompañado de despolimerización de las fibras de estrés (Fig. 23-b, flecha blanca), la cual se manifiesta de manera predominante en las células que forman sincitios (Fig. 23-c,d, flecha blanca).

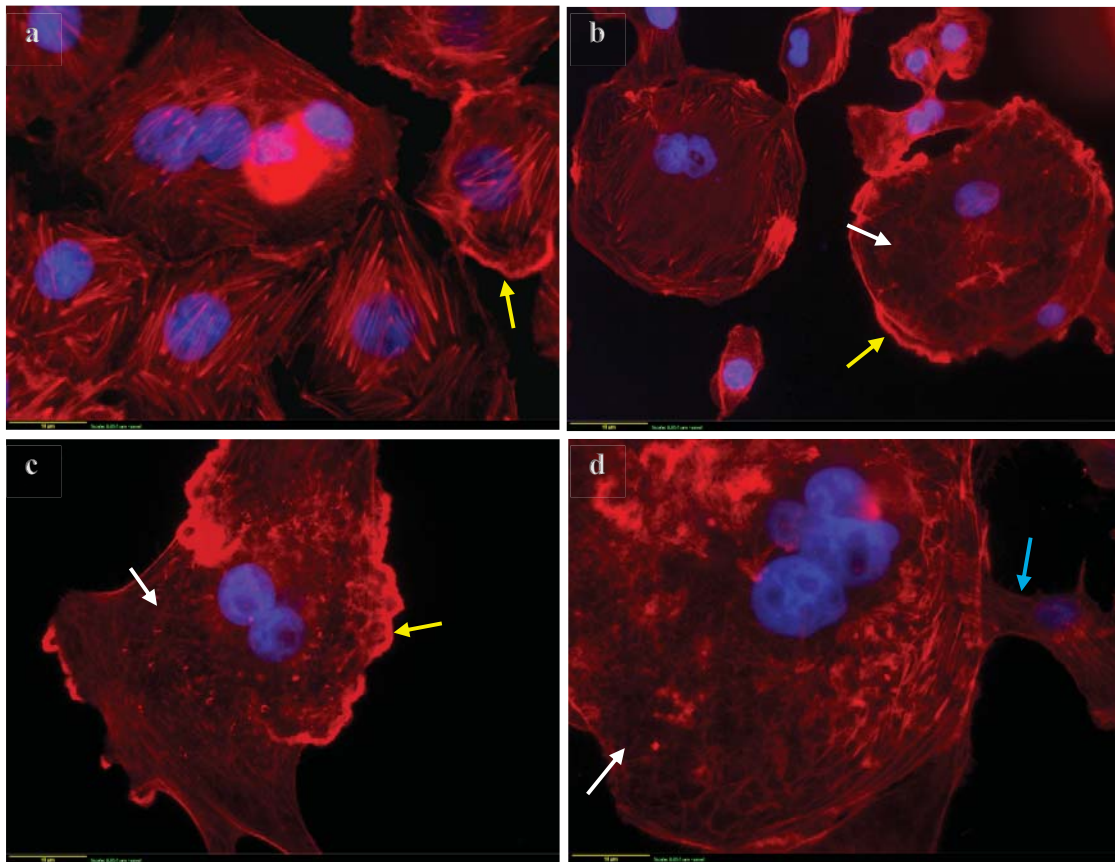


Fig 23. Cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la infección in vitro del PRRSV. (a) 24 hpi, (b) 48 hpi, (c, d) 72 hpi. Microscopía de fluorescencia. 40x, Merge faloidina rodaminada-DAPI. Las células mostrarán un aumento del grosor de la corteza celular (flechas amarillas), con un patrón de despolimerización en la actina citoplasmática (flechas blancas). A las 72 hpi, se observa el desarrollo de células gigantes, con estructuras de comunicación de actina con patrón de fibras longitudinales bien definidas (flechas azules).

Los daños nucleares son notorios después de las 48 hpi, los núcleos provenientes de las células que conforman los sincitios toman una posición central en la célula gigante. La condensación nuclear evoluciona en la formación de múltiples y pequeños fragmentos (Fig.24-c), que con llevan a la lisis celular del 100% al rededor de las 96 hpi (Fig.24-d).

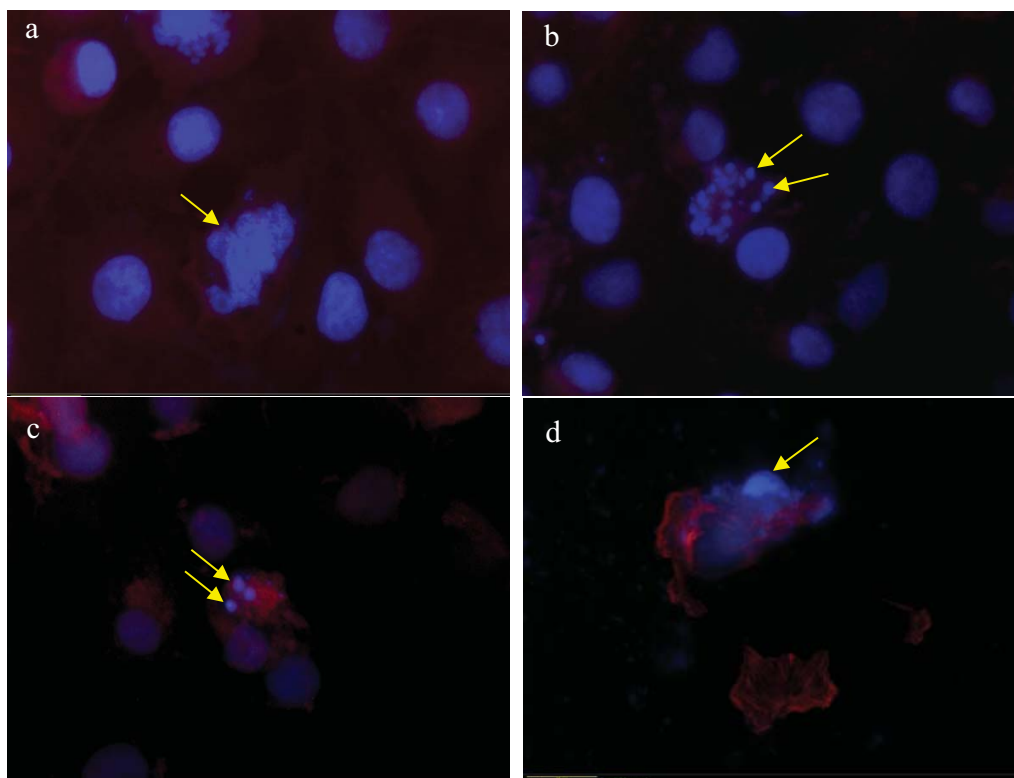


Fig. 24. Daño a la estructura nuclear en células MARC-145 inducidos por PRRSV. (a) 24 hpi, (b) 48 hpi, (c, d) 72 hpi. Las flechas amarillas señalan las alteraciones en la integridad de la morfología nuclear, que van desde una fragmentación hasta una destrucción difusa. Microscopía de fluorescencia 40x; Merge faloidina/rodaminada-DAPI.

La prueba de qRT-PCR, demostró la presencia de virus en los cultivos infectados con el PRRSV, sin señal positiva en los cultivos control (*sin infectar 3 y 6, Fig. 25- flecha azul*) determinando que los cambios citopáticos observados son atribuibles al proceso de infección viral. En los cultivos tratados 4h antes de la infección con PRRSV (*Fig. 25, línea verde olivo*) el número de ciclos para lograr la gráfica de amplificación fueron ligeramente mayores que los infectados sin el pretratamiento con las PNPs-GA (*Fig. 25, línea roja*), por lo que se busca realizar nuevos ensayos con diferentes concentraciones de PNPs-GA a distintos tiempos preinfección.

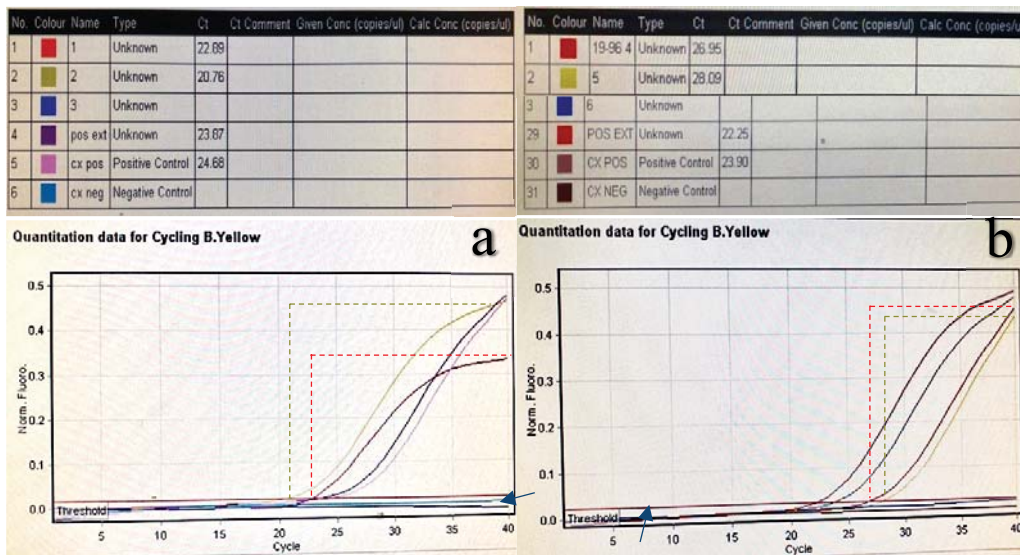


Fig 25. Curvas qRT PCR vs. PRRSv. Datos de cuantificación. (a), curvas de amplificación para cultivos infectados con PRRSv1, verde olivo y PRRSv2, rojo; (b) pre tratamiento con PNP-GA, rojo y PRRSv1, verde olivo. El pretratamiento con PNP-GA, requirió más ciclos de amplificación para dar señal positiva (línea verde punteada) en comparación del cultivo infectado no tratado con PNP-GA (línea roja punteada).

Con base en los ensayos de citotoxicidad, células MARC-145 fueron cultivadas hasta 70% de confluencia en placas de 24 pozos, se adicionó 50 μ l/ml de PNP-GA durante 4h, concluido el tiempo de incubación los cultivos fueron lavados 3 veces con medio RPMI 3% esteril y posteriormente se infectaron durante 1 h con 200 μ l de virus de PRRS, posteriormente el virus fue retirado y se adicionó medio RPMI 3% para seguir el curso de la infección hasta las 96 hpi y evaluar el efecto (Fig. 26).

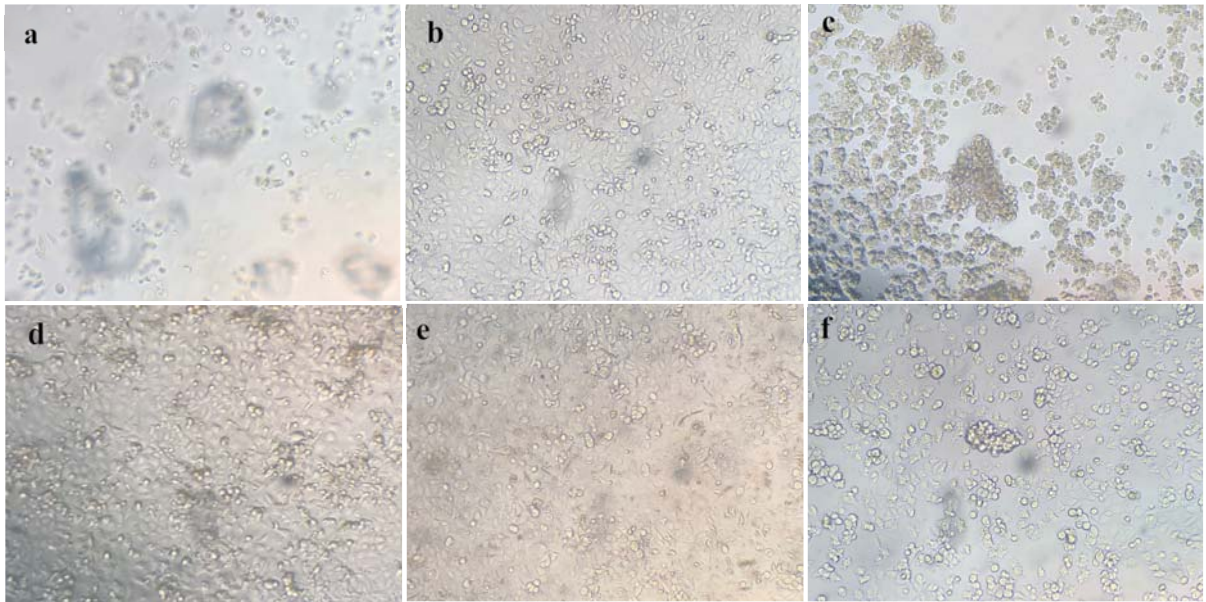


Fig 26. Cultivo de células MARC-145 infectadas con el PRRSv y tratadas con PNP-GA 78 hpi. Células MARC-145; a) H₂O₂ 30 mM (control positivo), b) RPMI (3% SFB), c) PRRSv1, d) PNP-GA, e) PRRSv1 incubado 24h con PNP-GA, f) PreTx.4h PNP-GA-inf PRRSv1. El daño citopático en los cultivos disminuyó durante la infección con PRRSv1 inactivado con PNP-GA durante 24 h pre infección (e) y con el pre tratamiento de PNP-GA 4 horas pre infección de las MARC-145. Microscopía de campo claro. 10X

Con base en la presentación del mayor efecto citopático producido por la infección *in vitro* con PRRSv1, los tiempos 48 y 72 hpi, se emplearon para la determinación del efecto del tratamiento con las PNP-GA sobre la viabilidad celular por el ensayo de MTT (Fig.27).

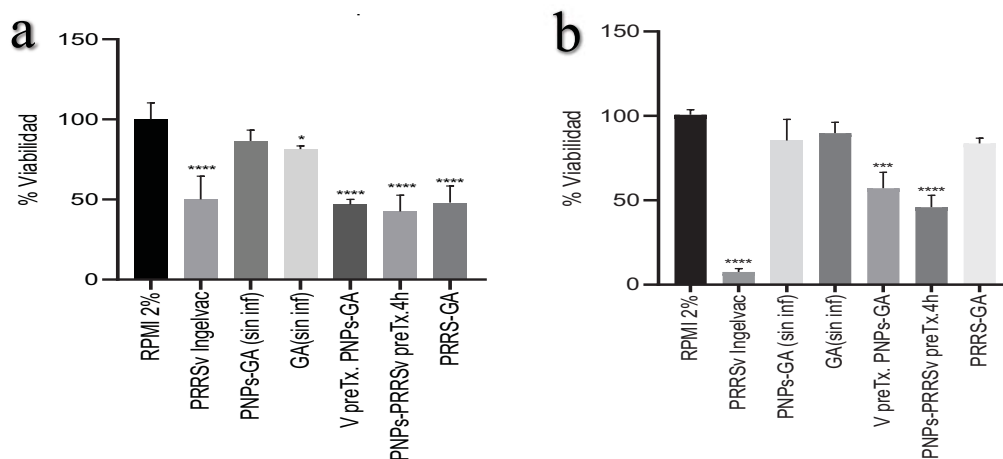


Fig 27. Valoración de la viabilidad en cultivos de células MARC-145 tratadas con GA. Los datos de los tratamientos con GA no evidenciaron diferencia significativa entre en cultivo infectado con el virus y los infectados y tratados con GA solo y en las PNP-GA 48 hpi (a), sin embargo si mostraron a las 72 hpi un efecto protector con diferencia significativa (b). ANOVA, *** 0.001, **0.01, * 0.05 Datos obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. Método MTT.

Los ensayos fueron realizados también para la evaluación de la viabilidad celular determinada por la tinción de Azul de Tripán. (Fig. 28) El pre-tratamiento durante 4 h con 50 μ l de PNP-GA disminuyó la citotoxicidad determinada por la prueba de MTT en un 38% en comparación con las células infectadas no tratadas, mientras el comportamiento de la viabilidad celular medida por la prueba de azul de tripan fue de 22%.

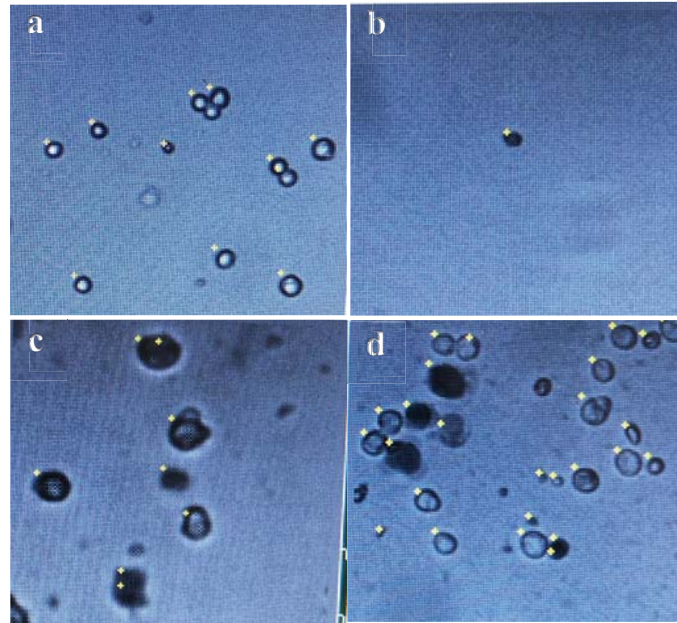


Fig 28. Exclusion por Azul de tripán. Efecto del tratamiento con PNP-GA en cultivos infectados con PRRSv sobre la viabilidad celular a las 72 hpi fue demostrado también por la tinción de azul de Tripán. (a) células refringentes que corresponden a células viables del cultivo control, (b) célula teñida con el colorante en el cultivo infectado con PRRSv correspondiente a una célula muerta. Células del cultivo tratado con PNP-GA 4h pre infección con PRRSv1, células viables (refringentes) y muertas (azules) 48 hpi (c) y 72 hpi (d). en la figura (d) se aprecia un incremento en el número y viabilidad celular.

VI. DISCUSIÓN

Este proyecto se enfocó en desarrollar un modelo nanoparticulado que funcione como vehículo del ácido glicirricínico (Fig.6), el cual es un componente de origen natural que ha demostrado poseer un efecto antiviral (Baltina 2009-2015 y Aguilar 2015), sobre virus como la influenza A (Harada 2005), virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y virus de Newcastle (Baltina 2009, Pompei 1983a, 1980b, 1979c), así como disminuyendo la replicación viral de virus como el del síndrome respiratorio agudo (SARS) como lo reporta Cinatl (2003). Los

agentes virales son un gran reto a la salud humana y animal, una de las enfermedades con mayor impacto negativo a la industria porcícola mundial es el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino , siendo reconocida por autores como *Albina (1997)*, *Tian (2007)*, *Zimmerman (2006)*, *Dea (2000)*, como una de las enfermedades con mayor impacto económico negativo a nivel mundial. Para el estudio de esta enfermedad *Kim (1993)* y *Dea (1995)* reportaron una población derivada de la línea celular MA-104 de riñón de mono verde, altamente permisiva para la replicación del virus de PRRS, la línea celular MARC-145, a partir de ese estudio es considerada como el cultivo de elección para la replicación de este patógeno. *Urbán (2015)*, describieron una disminución de la infectividad del PRRSv por el tratamiento con ácido glicirricínico en nanopartículas lipídicas, sin embargo, estos autores no realizaron estudios sobre la inocuidad de su sistema de transporte. El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo celular que permitiera evaluar la inocuidad de sistemas que permiten la incorporación de fármacos de origen natural a modelos nanoparticulados. Estos nanotransportadores mejoran la farmacocinética por su tamaño nanométrico que les confiere características para atravesar barreras biológicas, evitar la prematura degradación de los principios activos, entre otros beneficios descritos por autores como *Irache (2008)*. No solo el tamaño de las nanopartículas es una característica deseable de estos sistemas, la naturaleza de los materiales con que se elaboran les confieren propiedades únicas, tal es el caso de las SLN las cuales representan un buen sistema de entrega debido a su naturaleza lipofílica (*Mehnert 2001*) o las PNPs formadas a partir de polímeros inocuos para el organismo vivo (*Escalona 2014*), sin embargo no existe información sobre el mecanismo de acción así como de los efectos de estos sobre la estructura y la actividad celular interna.

Los sistemas realizados en este trabajo fueron desarrollados y caracterizados a partir de los trabajos realizados por *Urban (2015)*, *Escalona (2017)* y *Quintanar (2005)*. Estos sistemas presentan una capacidad de carga limitada y por la naturaleza de sus componentes son considerados biodegradables y con baja toxicidad o buena tolerancia en sistemas biológicos según *Garzón (2008)*.

La elaboración de SLN con GA se llevó a cabo por microemulsificación (*crystalización de las gotas de lípido dentro del medio acuoso*) de 10% de lípido sólido fundido, 15% de tensoactivo y 10% de co-tensoactivo empleando un homogeneizador tipo rotor-estator. En la formulación el Poloxámero 407 (*Pluronic®F127*) y el mismo fármaco ácido glicirricínico, funcionaron como tensoactivos; la razón de ello es que el AG al poseer porciones hidrofílicas e hidrofóbicas en su estructura química, y al ser una saponina, se comporta como un agente activo de superficie (*Urbán 2015*). El tamaño de partícula dependió del uso del tensoactivo y las condiciones experimentales de elaboración (*temperatura*) características descritas por autores como *Medina (2010)*.

Las ventajas de la metodología empleada fue su bajo costo de elaboración, no se requiere uso de solventes orgánicos, reproducibilidad y fácil escalamiento (*Mehnert 2001, Müller 2000*). La principal desventaja que presenta el sistema lipídico comparado con el sistema polimérico, fue la inestabilidad del mantenimiento de la talla nanométrica durante su almacenamiento, desarrollando cambios de transición polimórficas, coalescencia, formación de conglomerados y su inevitable gelificación, los factores anteriores aunado a su baja capacidad de incorporación de fármaco debido a la estructura cristalina del lípido sólido (*Villafuerte 2008*), fueron las bases para elegir al nanotransportador de origen polimérico para los ensayos en el modelo celular de infección.

La diversidad de tipos celulares con patrones distintivos en la estructura y función permite su uso en modelos celulares, los cuales proporcionan una herramienta de conocimiento amplia con aplicaciones variables. Uno de los elementos a considerar en un modelo celular para establecer cambios en la estructura celular originados por un agente externo, es el estudio del citoesqueleto. El citoesqueleto es una red dinámica conformada por diferentes grupos proteicos entre los que destaca la actina.

Autores como *Guirardo (2002)* describen las funciones mecánicas del citoesqueleto de actina como las responsables que mantienen la integridad estructural de la célula y funciones no mecánicas como la regulación de la arquitectura celular, por lo que la inducción de cambios morfológicos como respuesta a diversas señales extracelulares, se encuentran relacionados con él. Los filamentos de actina permiten hacer una evaluación de la integridad de la

estructura celular, en el caso de las células MARC-145 presentaron una clara definición y disposición de las fibras de estrés características de células relativamente estables que crecen en estratos rígidos (*Pellegrin 2007, Tojkander 2012 y Pollard 2007*). El patrón de actina en cultivos de alta confluencia manifiesta una predominancia a nivel de la corteza celular y las fibras de estrés extendiéndose por el citoplasma, lo que puede sugerir una importante regulación en la forma celular y su participación en la formación de uniones intercelulares y adhesiones focales, participando también en las vías de señalización (*Khatau 2009*).

Además de del estudio del citoesqueleto que permite la evaluación de la estructura celular para determinar la seguridad de los nanosistemas, se encuentran los ensayos de citotoxicidad los cuales permiten establecer los rango mínimos y máximos de las dosis que conforman el “*rango de seguridad*” en la administración de nuevos NPDC en sistemas biológicos

Los rangos de seguridad de las SLN y las PNPs con y sin fármaco fueron determinados mediante los ensayos de MTT, Rojo neutro y naranja de Acridina, siendo las PNPs con y sin fármaco los sistemas con el mayor rango de seguridad. Las SLN sin fármaco fueron los sistemas más citotóxicos con márgenes de seguridad muy bajos, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la adición del ácido glicirricínico permite elevar la dosis a un rango máximo de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas de exposición medido por actividad mitocondrial y lisosomal, lo que parece sugerir que la concentración del lípido es crucial para establecer su seguridad, lo anterior nos indica que la presencia de altos contenidos lipídicos permite una fusión abrupta con la membrana celular ocasionando desequilibrios osmóticos graves y muerte celular ya que este induce despolimerización de las fibras de estrés, pérdida de la integridad en la corteza celular y destrucción nuclear (*Fig.13-c, 14*), al adicionar el fármaco este se impregna dentro de la nanopartícula ocupando un espacio en su estructura con la suficiente eficacia para disminuir la concentración de lípido que permite mantener a las SLN-GA con márgenes de seguridad 10 veces mayores. Por lo cual en el caso de las SLN el margen terapéutico debe estandarizarse para el transporte de otros fármacos. A dosis inferiores a de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ambos sistemas no afectan la morfología celular y la estructura de los filamentos de actina. La actividad mitocondrial y lisosomal por arriba del 80%, sugieren que no existe daño celular (*Fig.16-a,b*).

En el caso de las PNP con y sin fármaco, no existió evidencia de disminución de la viabilidad celular por debajo del 80% en relación al control en el rango de 100 a 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las PNP fueron el nanotrasportador con menor citotoxicidad, esta propiedad podría relacionarse con su menor tamaño (*Fig.11-a*). *Katsumiti (2015)* reportó la presencia de efecto citotóxico dependiente del TPP medido por los ensayos MTT y RNU. La actividad mitocondrial en cuanto a la reducción de metil tetrazolio a formazán por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa se ve aumentada en las SLN, el formazán es un compuesto impermeable para la membrana por lo cual se acumula al interior de las células sanas y es fácilmente observable por microscopia de campo claro (*Fig.16-d,e*), como lo reportan autores como *Mossman (1983)* y *Fotakis (2006)*. El formazán es una sustancia fuertemente lipofílica por lo que el aumento de la presencia de los cristales en forma de aguja del formazán al interior de las células tratadas con las SLN-GA, sugiere también la internalización óptima de los sistemas nanoparticulados, como lo describe *Angius (2015)*.

Durante su elaboración, las NPDC se conjugaron con el fluoróforo cumarina 6, para someter a los cultivos a una exposición aguda durante 4 h para evaluar la internalización de las NPDC. Se hizo la valoración del citoesqueleto de actina y los núcleos al microscopio de fluorescencia. Las SLN-GA y las PNP-GA conjugadas con cumarina C6 evidenciaron un marcaje abundante en la periferia del citoplasma celular (*Fig.17-e*). La ausencia de las NPDC conjugadas con la cumarina en todo el espacio existente entre las células es sugestiva de la captación de los sistemas nanoparticulados al interior de las células. En las células tratadas con SLN-GA se observó una predominancia de marcaje distribuidos de forma más difusa en el citoplasma y las PNP más hacia la periferia.

Las NPDC parecen ser sistemas facilitadores de la internalización del fármaco, ya que el marcaje sobre las células mostró un patrón dependiente del tiempo de exposición, datos similares a los observados por *Kim (2016)*, quienes reportaron la presencia de marcaje positivo al interior de las células Caco-2 expuestas durante 4 h a NPDC conjugadas con isotiocinato de fluoresceína (FITC). Estos resultados sugieren que las SLN y las PNP pueden ser usadas como sistemas de suministro del GA ya que con el ensayo de NPDC conjugadas a cumarina 6 se demostró que el proceso de la internalización del fármaco no

ocasionó alteración en la morfología celular y estructura del citoesqueleto de actina, medido indirectamente por desplazamiento de la cumarina 6, sin embargo estudios de microscopia confocal deben realizarse para poder establecer mediante distintos cortes ópticos una reconstrucción tridimensional de las células y así poder determinar el sitio exacto donde se concentra el marcaje.

Los virus en general solo tienen un número mínimo de genes y por lo tanto, para la replicación, deben utilizar la maquinaria de las células infectadas. Como resultado, la replicación viral depende estrictamente del huésped, por lo que el funcionamiento óptimo del citoesqueleto está relacionado directamente con la capacidad de internalización viral. Para la evaluación del efecto de la infección viral sobre el citoesqueleto de actina, se estableció un periodo de tiempo que va de las 24 a las 120 hpi. En el presente estudio se trabajó con 4 diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 hpi), periodo similar a lo reportado por autores como Flores (2008) en la infección de virus del PRRS en células dendríticas porcinas y por Du (2011) en la infección de macrófagos alveolares porcinos y células MARC-145.

Los resultados de la observación de la microscopia de fluorescencia revelan cambios sutiles en la estructura del citoesqueleto de actina a partir de las 24 hpi caracterizados por la formación de sincitios, dichos cambios aumentan en el periodo que comprende de las 48 a 72 hpi, y finalizan con la destrucción de las células a las 96 hpi. Autores como Du (2011), reportan que en macrófagos alveolares porcinos los efectos citopáticos se presentan a las 16 hpi y finalizan a las 24 hpi con la destrucción total de las células, dicho efecto es más tardío en los cultivos MARC-145 en la cual reportan efectos citopáticos a las 48 h, tiempo similar a los cambios en nuestros resultados, seguidos de un periodo predominante de daño entre las 48-72 hpi, durante el cual se presenta el pico máximo de afectación como lo reportado por Zhang (2011) y Howerth (2002) a las 72 h en ensayos similares, finalizando en un desprendimiento de la monocapa a las 96 hpi, como lo reporta Zheng (2015).

La variación en la aparición de los cambios citopáticos en los cultivos se puede atribuir a la fuente del virus, ya que al provenir de un biológico comercial (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim) puede perder infectividad debido a las características propias de un

virus vivo atenuado a través de múltiples pases, en este caso realizados en células de riñón de mono verde *Du (2011)*.

En los ensayos de infección, la administración conjunta (*PNPs-GA+PRRSv1*) y el tratamiento 12 hpi (*PNPs-GA administrado 12 hpi con PRRSv1*) no evidenciaron diferencias estadísticas significativas con el cultivo infectado (*PRRSv1*), el curso de la infección fue similar terminando con la destrucción de la monocapa, por lo que el efecto terapéutico de la administración conjunta del PNP-GA-PRRSv1 y el tratamiento posinfección en células MARC-145 quedó descartado, resultado contrario a lo reportado por *Duan 2015*, el cual reportó que no existía evidencia de efectos sobre capacidad de penetración y absorción viral en las células MARC-145 cuando el virus es tratado con el AG. Estos resultados pueden explicarse debido a la reconocida capacidad de los nanotransportadores como estructuras que mejoran la capacidad de penetración celular de algunos fármacos.

En las PNP-GA, la capacidad de carga del PNP-GA es de 58.81 ± 0.14 , lo anterior puede sugerir que la ausencia de efecto en las etapas pos infección, administración conjunta del virus e inactivación de la solución viral, se deba a una insuficiente concentración del principio activo en las PNP-GA.

Adicionalmente se llevó a cabo la incubación del PRRSv1 durante 24 h con PNP-GA para evaluar un posible efecto inhibitorio sobre la capacidad infectiva de las partículas virales, sin embargo este fue excluido al observarse efectos similares a las células infectadas con PRRSv1, este mismo efecto inhibitorio fue reportado por *Duan 2015 con el GA en solución*. El mayor efecto antiviral de las PNP-GA se presentó en las células pretratadas durante 4 h con PNP-GA.

VIII. CONCLUSIONES

- I. Se desarrollaron dos diferentes nanotransportadores de ácido glicirricínico en cultivos celulares, uno polimérico y uno lipídico.
- II. La caracterización fisicoquímica y estructural demostró que las PNP-GA son sistemas más estables y presentan una mayor capacidad de carga de GA que las SLN, sin embargo la formulación debe ser optimizada para aumentar la capacidad de transportar el GA, con la finalidad de evaluar una posible potencialidad terapéutica asociada a la concentración del principio activo.
- III. Se estableció un modelo celular confiable para el estudio del efecto del PRRSv sobre el citoesqueleto de las células MARC-145, determinando a las PNP-GA como los sistemas más seguros para el transporte del GA hasta por 72 h.
- IV. El modelo celular de infección es una herramienta útil para la generación de investigación sobre los mecanismos de acción de este virus y la evaluación de la efectividad de nuevos sistemas antivirales.
- V. El mejor tiempo para la administración de las PNP-GA en los cultivos fue 4 h antes de la infección con el PRRSv, por lo que el desarrollo de esta tecnología podría sugerir un efecto terapéutico de tipo preventivo.
- VI. Se desarrolló y evaluó un nanosistema transportador de ácido glicirricínico que reduce en un 38% el daño celular inducido por la infección del PRRSv en células MARC-145*.

**(Además, disminuye de 2 a 3 ciclos la amplificación y detección de secuencias del PRRSv por RT-PCR).*

IX. REFERENCIAS

1. Aguilar, R.I., Alcalá, A.S., Llera, R.V., Ganem, R.A. (2015). Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) containing glycyrrhizic acid intended for vaginal administration. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(10): 1632-1639.
2. Alberts, J., Lewis, Raff, Roberts y Walter. (2012). *Biología molecular de la célula*. Omega. Barcelona 6ta edición. Barcelona, España.
3. Albina, E. (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Veterinary microbiology*, 55(1):309-316.
4. Angius, F., Floris, A. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicology in vitro*, 29(2):314-319.
5. Baltina, L. A., Kondratenko, R. M., Baschenko, N. Z., Pl'yasunova, O. A. (2015). Synthesis and biological activity of new glycyrrhizic acid conjugates with amino acids and dipeptides. *Russian journal of bioorganic chemistry*, 35(4):510-517.
6. Baltina, L.A., Kondratenko, R. M., Plyasunova, O. A., Pokrovskii, A. G., Tolstikov, G. A. (2009). Prospects for the creation of new antiviral drugs based on glycyrrhizic acid and its derivatives (a review). *Pharmaceutical chemistry journal*, 43(10):539-548.
7. Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., & Doerr, H. W. (2003). Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The lancet*, 361(9374):2045-2046.
8. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2009). Cell death and cell renewal. *The Cell: A molecular approach*, 693-722.
9. Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of virology*, 145(4):659-688.
10. Dea, S., Sawyer, N., Alain, R., Athanassious, R. (1995). Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome

- virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. In *Corona-and Related Viruses*, 95-98.
11. Delorme-Axford, E., Coyne, C. B. (2011). The actin cytoskeleton as a barrier to virus infection of polarized epithelial cells. *Viruses*, 3(12):2462-2477.
 12. Du, Y., Yoo, D., Paradis, M. A., & Scherba, G. (2011). Antiviral activity of tilmicosin for type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cultured porcine alveolar macrophages. *J Antivir Antiretrovir*, 3(3), 028-033.
 13. Escalona, R.O. (2017). Desarrollo y caracterización de nanopartículas con superficie modificada como potenciales transportadores de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Tesis Maestría, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
 14. Escalona, R.O., Quintanar, G.D. (2014). Nanogeles poliméricos: Una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(3):17-38.
 15. Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Mata-Haro, V., Osorio, F. A., & Hernández, J. (2009). Efecto del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en células dendríticas de cerdo derivadas de monocitos. *Veterinaria México*, 40(1), 39-54.
 16. Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2):171-177.
 17. Garzón M.L, Hernández A., Vázquez M. L., Villafuerte L., García B., Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2008; 39(4), 50-66
 18. Guirado, B.O.; Solanas G.M.; Costa T.I.; ESCRICH E.E. (2002). El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 21(2):115-122.
 19. Harada, S. (2005). The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochemical journal*, 392(1): 191-199.

20. Hotulainen, P., Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*, 173(3): 383-394.
21. Howerth, E. W., Murphy, M. D., & Roberts, A. W. (2002). Failure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to replicate in porcine endothelial cell cultures. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 14(1), 73-76.
22. Irache, J. M. (2008). In Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra. SciELO España*, 7-10.
23. Izutani, Y.; Kanaori, K.; Oda, M. (2014). Aggregation property of glycyrrhizic acid and its interaction with cyclodextrins analyzed by dynamic light scattering, isothermal titration calorimetry, and NMR. *Carbohydrate research*, 392:25-30.
24. Jabr-Milane, L.; Van Vlerken, L.; Devalapally, H.; Shenoy, D.; Komareddy, S.; Bhavsar, M.; Amiji, M. (2008). Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. *Journal of controlled release*. 130(2): 121-128.
25. Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M. P. (2015). Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *PloS one*, 10(6), e0129039.
26. Khatau, S. B., Hale, C. M., Stewart-Hutchinson, P. J., Patel, M. S., Stewart, C. L., Searson, P. C., Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 106(45): 19017-19022.
27. Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S., Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology*, 133(3-4): 477-483.
28. Kim, J.H., Park, E.Y., Ha, H.K., Jo, C.M., Lee, W.J., Lee, S.S., Kim, J.W. (2016). Resveratrol-loaded Nanoparticles Induce Antioxidant Activity against Oxidative Stress. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 29(2):288.
29. Mateu E, Díaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J* 2007; 177:345-351.
30. Macías, S.M.; Vázquez, V.G.; Ríos L.D.G. (2016). The actin-cytoskeleton: a dynamic structure at the service of signal transduct. *Mensaje bioquímico XL*.

31. Medina, M. (2010) "Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas (investigación bibliográfica)" Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México
32. Mehnert, W., Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, 47(2):165-196.
33. Miller, L. C., Laegreid, W. W., Bono, J. L., Chitko-McKown, C. G., Fox, J. M. (2004). Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Archives of virology*, 149(12):2453-2463.
34. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
35. Müller, R.H., Mäder, K., & Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000;50, 161-177.
36. Pellegrin, S., Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science*, 120(20):3491-3499.
37. Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36:451-477.
38. Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M. A., Pani, A., Loddo, B. (1979). Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, 281(5733):689-690.
39. Pompei, R., Paghi, L., Ingianni, A., Uccheddu, P. (1983). Glycyrrhizic acid inhibits influenza virus growth in embryonated eggs. *Microbiologica*, 6(3):247-250.
40. Pompei, R., Pani, A., Flore, O., Marccialis, M. A., Loddo, B. (1980). Antiviral activity of glycyrrhizic acid. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 36(3):304-304.
41. Provost, C., Jia, J. J., Music, N., Lévesque, C., Lebel, M. È., del Castillo, J. R., Gagnon, C. A. (2012). Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virology journal*, 9(1):267.
42. Quintanar, G.D.; Tamayo, E.D.; Ganem, Q.A.; Allémann, E.; Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European journal of pharmaceutical sciences*, 26(2): 211-218.

43. Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Liu, D. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PloS one*, 2(6):e526.
44. Tojkander, S.; Gateva, G.; Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science*, 125(8):1855-1864.
45. Urbán, M.Z. Evaluación de la actividad terapéutica del ácido glicirricínico formulado en sistemas submicrónicos contra el virus de PRRS. (2015). Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
46. Wensvoort, G. (1993). Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Veterinary research*, 24(2), 117-124
47. Villafuerte R. García B. F., Hernández A. L., Vázquez M.L. (2008) Nanopartículas lipídicas sólidas *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39 (1) 38-52.
48. Zhang, Q., & Yoo, D. (2015). PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary microbiology*, 177(3-4), 229-241.
49. Zhang, S., Zhou, Y., Jiang, Y., Li, G., Yan, L., Yu, H., & Tong, G. (2011). Generation of an infectious clone of HuN4-F112, an attenuated live vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology journal*, 8(1), 410.
50. Zheng L, Li X, Zhu L, Li W, Bi J, Yang G, Yin G, Liu. (2015). Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in vitro using DNA-based short antisense oligonucleotides. *J - BMC Vet. Res.*
51. Zimmerman, J., Benfield, D. A., Murtaugh, M. P., Osorio, F., Stevenson, G. W., Torremorell, M. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). *Diseases of swine*, 9:387-418.

X. AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca # 486348/282140, otorgada para la realización de estudios doctorales; así como a los proyectos PIAPI 1602, PIAPI1655 (FESC-UNAM) CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940 y PIAPI 001, PAPITT IN18516.

ANEXO I

Medida de tamaño de partícula de los sistemas

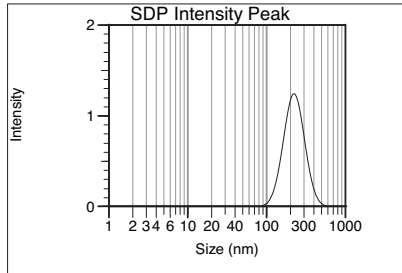
Elaboración: Lote1

Unimodal Summary

Angle	Run Time (sec)	Sample Time (μs)	Prescale	Counts per Sample Time	Overflows	Baseline Error	Intensity (counts/sec)	Unimodal Mean (nm)	Unimodal S.D. (nm)	Polydispersity Index
90.0°	120	4.5	16	4.107	0	0.15%	9.126e+005	238.5	Narrow	-0.030

Intensity Peak

Amount	Size (nm)	SD (nm)
100.0%	219.0	52.1



Intensity Analysis

Size (nm)	Intensity
1.0	1.3%
1.5	0.1%
2.4	0.0%
3.7	0.0%
5.6	0.0%
8.7	0.0%
13.3	0.0%
20.5	0.0%
31.6	0.0%
48.7	0.0%
75.0	0.0%
115.5	0.0%
177.8	56.3%
273.8	42.3%
421.7	0.0%
649.4	0.0%
1000.0	0.0%

Intensity Mean

Mean Diameter: 219.0 nm
Standard Deviation: 57.0 nm

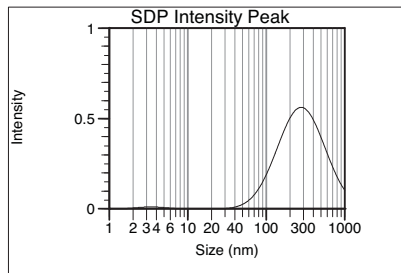
Elaboración: Lote2

Unimodal Summary

Angle	Run Time (sec)	Sample Time (μs)	Prescale	Counts per Sample Time	Overflows	Baseline Error	Intensity (counts/sec)	Unimodal Mean (nm)	Unimodal S.D. (nm)	Polydispersity Index
90.0°	120	5.5	8	2.066	0	2.52%	3.756e+005	221.6	73.1	0.192

Intensity Peak

Amount	Size (nm)	SD (nm)
98.5%	353.4	224.7
1.5%	3.6	1.3



Intensity Analysis

Size (nm)	Intensity
1.0	0.2%
1.5	0.4%
2.4	0.6%
3.7	0.6%
5.6	0.3%
8.7	0.0%
13.3	0.0%
20.5	0.0%
31.6	0.0%
48.7	0.4%
75.0	3.0%
115.5	8.9%
177.8	17.3%
273.8	25.1%
421.7	25.4%
649.4	15.0%
1000.0	2.9%

Intensity Mean

Mean Diameter: 348.3 nm
Standard Deviation: 249.5 nm

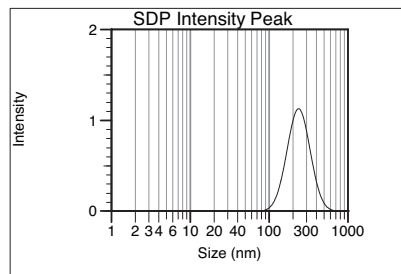
Elaboración: Lote 3

Unimodal Summary

Angle	Run Time (sec)	Sample Time (μs)	Prescale	Counts per Sample Time	Overflows	Baseline Error	Intensity (counts/sec)	Unimodal Mean (nm)	Unimodal S.D. (nm)	Polydispersity Index
90.0°	120	4.5	8	3.573	0	0.19%	7.941e+005	222.2	75.6	0.216

Intensity Peak

Amount	Size (nm)	SD (nm)
100.0%	234.5	62.0



Intensity Analysis

Size (nm)	Intensity
1.0	3.3%
1.5	0.1%
2.4	0.0%
3.7	0.0%
5.6	0.0%
8.7	0.0%
13.3	0.0%
20.5	0.0%
31.6	0.0%
48.7	0.0%
75.0	1.2%
115.5	7.0%
177.8	25.5%
273.8	62.9%
421.7	0.0%
649.4	0.0%
1000.0	0.0%

Intensity Mean

Mean Diameter: 234.5 nm
Standard Deviation: 67.9 nm

SLN-GA (Equipo Coulter N4 Plus)

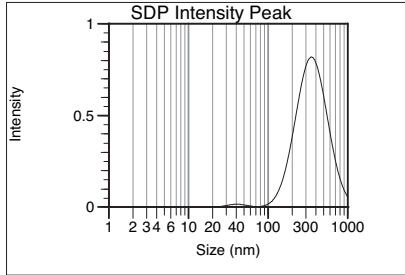
Elaboración: Lote 3 lect 2

Unimodal Summary

Angle	Run Time (sec)	Sample Time (μs)	Prescale	Counts per Sample Time	Overflows	Baseline Error	Intensity (counts/sec)	Unimodal Mean (nm)	Unimodal S.D. (nm)	Polydispersity Index
90.0°	120	6.0	16	3.977	0	0.37%	6.628e+005	291.8	Broad	0.445

Intensity Peak

Amount	Size (nm)	SD (nm)
98.6%	366.5	138.6
1.4%	39.8	9.3



Intensity Analysis

Size (nm)	Intensity
1.0	0.3%
1.5	0.5%
2.4	0.4%
3.7	0.0%
5.6	0.0%
8.7	0.0%
13.3	0.0%
20.5	0.0%
31.6	0.7%
48.7	0.6%
75.0	0.0%
115.5	0.0%
177.8	10.0%
273.8	34.7%
421.7	43.0%
649.4	9.7%
1000.0	0.0%

Intensity Mean

Mean Diameter: 362.0 nm
Standard Deviation: 157.5 nm

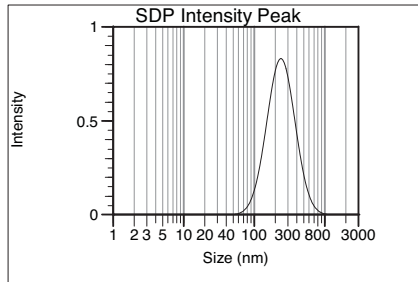
Elaboración: Lote 4 lect 4

Unimodal Summary

Angle	Run Time (sec)	Sample Time (μs)	Prescale	Counts per Sample Time	Overflows	Baseline Error	Intensity (counts/sec)	Unimodal Mean (nm)	Unimodal S.D. (nm)	Polydispersity Index
90.0°	120	4.0	8	2.327	0	0.09%	5.817e+005	199.9	73.0	0.286
	120	4.5	8	2.645	0	0.27%	5.878e+005	203.8	73.1	0.265
	120	4.0	8	2.346	0	0.10%	5.864e+005	199.6	Broad	0.393
Average:								201.1	74.7	0.315
Run Average:								201.1	74.7	0.315

Intensity Peak

Amount	Size (nm)	SD (nm)
100.0%	249.6	94.1



Intensity Analysis

Size (nm)	Intensity
1.0	1.9%
1.6	0.2%
2.6	0.0%
4.2	0.0%
6.8	0.0%
11.1	0.0%
17.9	0.0%
29.0	0.0%
46.9	0.0%
75.9	2.0%
122.7	20.2%
198.6	20.4%
321.2	55.2%
519.7	0.0%
840.7	0.0%
1359.9	0.0%
2200.0	0.0%

Intensity Mean

Mean Diameter: 249.6 nm
Standard Deviation: 103.1 nm

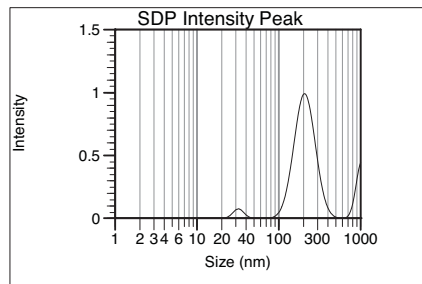
Elaboración: Lote 4 lect 4

Unimodal Summary

Angle	Run Time (sec)	Sample Time (μs)	Prescale	Counts per Sample Time	Overflows	Baseline Error	Intensity (counts/sec)	Unimodal Mean (nm)	Unimodal S.D. (nm)	Polydispersity Index
90.0°	120	4.0	16	5.972	0	0.03%	1.493e+006	192.3	Broad	0.482

Intensity Peak

Amount	Size (nm)	SD (nm)
78.3%	203.0	47.3
18.5%	1000.0	116.8
3.2%	31.1	3.7



Intensity Analysis

*** Range Warning ***

Size (nm)	Intensity
1.0	0.1%
1.5	0.1%
2.4	0.0%
3.7	0.0%
5.6	0.0%
8.7	0.0%
13.3	0.0%
20.5	0.2%
31.6	3.0%
48.7	0.0%
75.0	0.0%
115.5	0.6%
177.8	56.6%
273.8	20.9%
421.7	0.0%
649.4	0.0%
1000.0	18.5%

Intensity Mean

Mean Diameter: 345.2 nm
Standard Deviation: 379.2 nm

Anexo II

Determinación de la capacidad de carga

Eficiencia de Adsorción (EA) y Capacidad de Carga (LC) de Ammonium Glycyrrhizinate en las nanopartículas

La eficiencia de adsorción y capacidad de carga de las nanopartículas fueron determinadas mediante ultracentrifugación a 20,000 rpm, 10 °C por 30 min. El sobrenadante resultante que contiene Ammonium glycyrrhizinate no asociado a las nanopartículas fue medido por HPLC. El sobrenadante se llevó a un volumen de 250 mL, se tomó una alícuota de 4 mL y se llevó a un volumen final de 25 mL. 20 µL de la disolución anterior fueron inyectados en un cromatógrafo, columna fase inversa C₁₈ (150mm, 4.6 mm, 5 µm), la fase móvil fue una mezcla de metanol/agua acidificada al 1 % con ácido acético glacial (68.5:31.5). la velocidad de flujo fue de 1 mL/min. La eficiencia de adsorción (AE) del Ammonium glycyrrhizinate y la capacidad de carga de Ammonium glycyrrhizinate en las nanopartículas fueron calculadas mediante las siguientes ecuaciones:

$$EA (\%) = \frac{\text{total de AG} - \text{AG libre}}{\text{total de AG}} \times 100$$

$$CC (\%) = \frac{\text{total de AG} - \text{AG libre}}{\text{peso de las nanopartículas}} \times 100$$



Effect of two glycyrrhizinic acid nanoparticle carriers on MARC-145 cells actin filaments

Samantha Jardon¹ · Carlos G. García¹ · David Quintanar² · José L. Nieto¹ · María de Lourdes Juárez³ · Susana E. Mendoza⁴

Received: 2 February 2018 / Accepted: 29 March 2018
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The development of technologies that combine the advantages of nanomedicine with natural medicine represents a versatile approach to improve the safety and efficacy of drugs. Glycyrrhizinic acid (GA) is a natural compound that has a wide range of biological activities for the treatment of diseases. To establish a safe nanotransport system for this drug, two different nanoparticles with glycyrrhizinic acid, solid lipid nanoparticles (SLN-GA) and polymeric nanoparticles (PNP_s-GA) were elaborated to obtain nanostructure sizes between 200 and 300 nm. The nanoparticles were evaluated at concentrations of 1.25–100 µl/ml using the MARC-145 cell line to determine the effects on cell morphology, cellular structure (actin filaments) and cell viability (mitochondrial and lysosomal) at 24 and 72 h post-exposure. The safety range of the nanoparticles was 50 µl/ml, to determine that PNP_s-GA had an optimal safety profile and no cytotoxic effects, as there was no evidence of changes in morphology, internal cellular structures (stress fibers and the cell cortex formed by actin filaments) or viability under the experimental concentrations and conditions employed.

Keywords Solid lipid nanoparticles · Polymeric nanoparticles · Glycyrrhizinic acid · Actin cytoskeleton · Morphologic changes · Cytotoxicity

Introduction

Application of nanotechnology to the health sciences has permitted the development of systems on the nanometric scale, which are denominated “nanoparticle drug carriers” (NPDC). These systems comprise at least two components; the first component is the active principle or the biologically

active molecule, and the second is the system which allows for a special function related to the diagnosis, treatment or prevention of disease (Irache and Nanomedicina 2008) (Fig. 1a).

The NPDC term includes nanocapsules and nanospheres. Nanocapsules are “vesicular systems” in which the drug is located inside of the particle and is usually dissolved in an oily vehicle. Nanospheres are “matrix-type” systems in which the drug is dispersed homogeneously into the constituent material (Olivier 2005) (Fig. 1a). These systems possess characteristics that determine their biological impacts, such as the chemical composition, size of the primary particle, morphology and solubility, among others. The advantages of using these systems is their ability to cross biological barriers and reach the organ, tissue or target cell group, arrive at intracellular compartments and control the release of the active molecule at its action or absorption site, thereby improving problems associated with the solubility, bioavailability, immunocompatibility and cytotoxicity of many drugs (Ramos et al. 2018; Kou et al. 2018; Jabr-Milane et al. 2008). NPDC with pharmaceutical purposes are mainly elaborated with polymers and lipids that are selected as raw material

✉ Susana E. Mendoza
 seme_6@yahoo.com.mx

¹ Unidad de Investigación Multidisciplinaria L4 (Morfología Veterinaria y Biología Celular), UNAM-FESC, Campus 4, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico

² Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, UNAM-FESC, Campus 1, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico

³ Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM-FMVZ, Mexico City, Mexico

⁴ Laboratorio de Virología y Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo, UNAM-FESC, Campus 1, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico

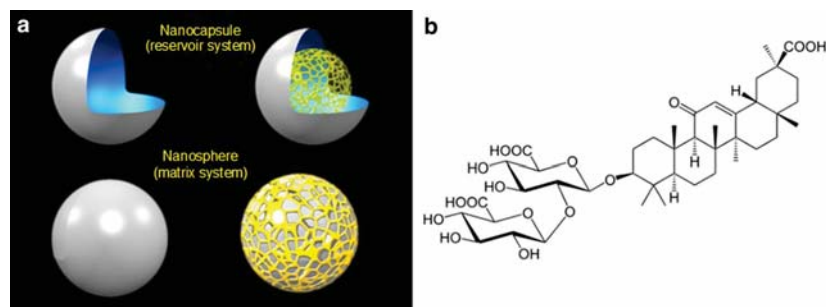


Fig. 1 **a** Drug nanotransporters and **b** the chemical structure of glycyrrhizinic acid

for the elaboration of the latter concern and are generally recognized as safe (GRAS) materials (Irache 2008).

Solid lipid nanoparticles (SLN) are considered prolonged release systems, due to possession of a solid nucleus stabilized with tensoactive or emulsifying elements (Urbán 2015, 2010). Müller et al. (2002) reported that although polymer nanoparticles (PNPs) were fabricated with polymers, the organism *in vivo* did not recognize them as foreign. Thus, PNPs are highly stable solid vectors that tend to encapsulate themselves in the interior of the capsule (Kumari et al. 2010). The development of these systems as a vehicle for active ingredients of natural origin for application in distinct diseases of interest in human and veterinary medicine is a promising field. Active ingredients of natural origin include glycyrrhizinic acid (GA) (Urbán 2015), which is a triterpenic saponin mainly responsible for the pharmacological activity of *Glycyrrhiza* species (Fig. 1b). In particular, the licorice plant (*Glycyrrhiza glabra*), known as “sweet root”, is a legume found in sub-tropical regions that is recognized for its antiviral, antioxidant and antitumor properties, among others (Aguilar-Rosas et al. 2015; Izutani et al. 2014).

The development of novel drug administration systems should maintain a high safety range and permit the cells to monitor the environment and respond to external signals to survive. Vital physiological processes, such as cell division, adhesion, polarity, secretion, migration, changes in shape and ciliary and flagellar movement, are regulated by diverse signaling pathways and are executed through cytoskeletal reorganization (Liu et al. 2013). The cytoskeleton is a dynamic network composed of different proteins. The most predominant protein is actin, which possesses functions related to maintenance of the architecture and structural integrity of the cell; these functions are mainly associated with changes in shape and movement through structures, which is accomplished by filament rearrangements. Thus, the induction of changes in cell form and

migration in response to diverse extracellular signals is related to these filaments (Guirado et al. 2002). Actin presents in a globular/monomeric (G-actin) or filamentous/polymeric (F-actin) form. Actin monomers and filaments are attached to an important variety of proteins that regulate and modify their structures and functions. Actin filaments adopt distinct types of arrangements, such as bundles (parallel and contractile) and networks (mesh-like and dendritic). Parallel bundles are formed by actin filaments that are tightly associated and provide support to structures such as filopodia and microvilli. The contractile axes are composed of tightly associated antiparallel bundles of actin filaments and provide support for structures such as myosin (motor protein) that allows displacement of the filaments among them to form contractile structures, such as stress fibers or the muscular sarcomere. The mesh-formed networks comprise intertwined actin filaments and form the support for the lamellar part of the lamellipodia. The dendritic networks are composed of actin filaments that polymerize in a branched fashion and are found at the leading edge of the lamellipodia to produce membranous protrusions. The cell cortex is composed of a network of actin filaments bound to a plasma membrane. These actin filaments can be associated with myosin, which affords the cortex the capacity of contraction and tenses the filament network, rendering it more resistant and maintaining cell shape (Hotulainen and Lappalainen 2006; Cooper and Hausman 2009; Alberts 2014; Tojkander et al. 2012).

Because understanding the processes involved in exposure to NPDC is important, this work aimed to study the effects of two NPDC on the cell morphology, actin filament structure and internal cell activity of the MARC-145 cell line and to assess the possible therapeutic use of an active ingredient contained in nanotransporters. First, we performed actin cytoskeletal staining of control cultures at low and high confluence to establish the distribution of the actin filaments in these cells. Then, two different NPDC were

elaborated as the GA transport systems. Once the formulations were obtained, they were incubated with the cultures at concentrations ranging from 1.25 to 100 µg/ml to determine changes in actin filament structure via a direct fluorescent technique and the integrity of the internal cellular activity through the thiazolyl blue [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], neutral red and acridine orange assays.

Materials and methods

Glycyrrhizic acid solutions

Glycyrrhizic acid or ammonium salt (GA) (Sigma-Aldrich[®], 99% purity) was prepared from a 10 mg/ml stock solution of GA in RPMI medium. Dilutions were prepared to obtain the concentrations of the solutions employed in this work. All solutions were filtered through a 0.22-µm filter (Millipore[®]) under sterile conditions.

Nanoparticles preparation

The SLN were prepared by cooling the microemulsion as described by Urbán (2015) from 10% solid lipid fused lauroyl polyoxyglycerides (Gelucire 44/14 GATTEFOSSÉ), 1.5% surfactant poloxamer 407 (Pluronic F-127 cat. P2443) and 3% GA. The oleous phase was added with a slow flow in an excess of cold water (1:50) and dispersed with agitation at 1500 rpm in an IKA[®] RW20 shaker until the formation of lipid drops and their later precipitation was observed. Once the nanoparticles were obtained, they were separated by ultracentrifugation with two cycles at 50,000 rpm for 1 h in the Beckman-Coulter[®] LE-80K optimal ultracentrifuge; then, the SLN were resuspended in 1 ml of water. The PNPs were elaborated following the method described by Escalona (2017), which was a modification of the emulsification–diffusion technique described by Quintanar et al. (2005). The solvent was saturated by mixing water with ethyl acetate for 20 min; after separation, both phases were recovered independently and the interphase was discarded. Two grams of Mowiol 4–8 was dissolved in the aqueous phase with 1 ml of glacial acetic acid and 150 mg of chitosan. The aqueous and organic phases were mixed and centrifuged at 11,000 rpm for 10 min in an Ultraturax[®] equipment for the subsequent evaporation of the solvent in the Rotavapor for 1 h at 40 °C and 60 rpm. The PNPs were left to stabilize for 24 h and then centrifuged at 30,000 rpm for 30 min and resuspended in 2 ml of distilled water. Finally, the PNPs were added by slow flow to a 20 ml solution of water with 37 mg of GA. The formulation was maintained under magnetic agitation at 500 rpm for 1 h for absorption of the drug. In all

the preparations, the water employed was Milli-Q quality (Millipore[®], Bedford, MD, USA).

Nanoparticle drug carrier characterization

Partial particle size, polydispersion index and the Z potential

To determine the partial particle size (PPS), we employed the dynamic light scattering (DLS) technique (photon correlation spectroscopy, PCS) utilizing the Nanosizer[®] N4 Plus laser particle beam submicronic counter with laser beam dispersion at a 90 °C angle with a 680-nm wavelength for 180 s at 25 °C. The samples were diluted in distilled water until they corresponded to the sensitivity range of the apparatus. Dispersed-light data were analyzed using a digital correlator in unimodal analysis mode. Only formulations with a polydispersion index less than 0.5 were selected. The samples were analyzed at seven different time points post-elaboration on days 1, 2, 3, 4, 15 and 30. After the measurements were finalized, the samples were recovered for evaluation of the Z potential. These previous samples were subjected to Doppler laser microelectrophoresis in the Malvern[®] Zetasizer Nano HS, which employs an He/Ne laser beam 633 nm in length and 4 mW. We performed an average of 100 readings, and the determinations were conducted in triplicate.

Analysis of transmission scanning electron microscopy (SEM)

The samples were processed according to the method described by Quintanar et al. (2005). Following this method, the samples were placed on slides containing a 0.22 µm pore diameter membrane to dry at 25 °C. Then, the samples were covered with gold plating for 5 min at 7 amps in a Denton vacuum equipment for subsequent visualization at 25,000× in a JSM-6010LA model JEOL[®]-brand electron microscope.

In vitro evaluation in the cell line

Cell culture

We used the MARC-145 cell line (a clone of MA-104 African green monkey kidney cells). The cells were cultured in RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute) medium supplemented with 10 and 5% fetal bovine serum (FBS) for the growth and maintenances phases, respectively, and penicillin/streptomycin (5000 IU/ml and 5 µg/ml, respectively). The cultures were maintained in a humidified incubator with a mixture of 95:5 air:CO₂ at 37 °C until the cells reached 90% confluence for use in the experiments. To detect changes in the cellular structure, the cells were cultured in

24-well microplates with previously sterilized 12-mm circular coverslips at a density of 1×10^5 cells per well.

Evaluation of the actin cytoskeleton and nuclei

To visualize the actin filaments and nuclei, we applied the direct fluorescent double-staining assay. The cells were fixed with 10% aqueous formalin in a phosphate-buffered saline (PBS) solution for 20 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS. To help reduce nonspecific binding, the cells were incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. To evaluate the actin filaments, the cells were incubated with tetramethyl rhodamine-isothiocyanate (TRITC)-labeled phalloidin (Sigma-Aldrich®) and diluted 1:100 in PBS for 20 min in a humid chamber in the dark. Then the cells were washed twice with PBS and once with deionized water. Finally, the coverslips were mounted onto slides using mounting medium with 4'-diamino-2-phenylindole (DAPI), to visualize the nuclei (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA). The slides were observed under the Zeiss® Axio scope 40 fluorescence microscope. The MARC-145 cell cultures were divided into groups that received different treatments as follows: GA (pure drug); SLN, PNP, SLN with GA (SLN-GA); and PNP with GA (PNPs-GA). For evaluation of the NPDC, we employed concentrations of 2.5, 5, 10, 25, 50 and 100 µg/ml. The positive control cells were exposed to 5 µl of 30 mM H₂O₂. The exposure times evaluated were 24 and 72 h.

Cytotoxicity assay

MTT assay For the thiazolyl blue [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) assay, we incubated the cells with an MTT solution (0.5 mg/ml in each well) for 4 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Then the cells were lysed with 400 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO). Finally, the intensity of the product was analyzed by spectrophotometry at 570 nm in a BioRad® model 550 microplate reader.

Neutral red assay The cells were incubated in a neutral red (NR) solution at a 33 µg/ml concentration in RPMI medium for 3 h at 37 °C; then, the colorant was removed, and the cells were washed with PBS. The colorant was extracted with a solution of acetic acid and ethanol (1:50), followed by agitation at room temperature (1:50) for 10 min. Finally, the absorbance was read at 540 nm. In each experiment, we utilized H₂O₂ (20 mM) as a positive control for cell death.

Acridine orange staining The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. Then, they were washed three times with PBS and incubated for 20 min in a 0.001% acridine orange solution in distilled water. Finally, the cells

were washed three times and directly observed under a fluorescence microscope.

Cellular uptake

First, 3 mg of coumarin 6 was dissolved in the AG absorption phase. The non-adsorbed fluorophore was removed by ultracentrifugation and washing in both methods. The cultures were exposed to 50 µl of SLN-GA and PNPs-GA with the fluorophore coumarin C6 for 4 h, and then processed as described for the direct fluorescence assay. Ten randomized fields per sample were captured and analyzed with the ImageJ® software. The nominal resolution of the images was 1 µm/5 pixels for the 40× objective for the Zeiss Axio scope 40® fluorescence microscope and 1 µm/2 pixels for the 10× objective with the UNICO® brand inverted microscope.

Statistical analysis

The data obtained from the experiments were analyzed independently based on a completely randomized design. Separation of media was effected by Tukey's test. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) utilizing the GraphPad Prism 7® statistical software package employing a significance level of $\alpha = 0.05$ to distinguish differences among groups. For the image analysis, we utilized the ImageJ® software.

Results

The SLN were prepared via microemulsion cooling according to the methodology described by Urbán (2015, 2010), whereas the PNPs were prepared using the emulsification-diffusion method described by Escalona (2017). Through the DLS technique, we determined that the SLN and PNPs presented nanometric sizes with maximal peak intensities at 280.31 ± 58.73 and 217.43 ± 11.44 nm, respectively, with a greater polydispersion index in the SLN than in the PNPs. However, this index was less than 1 in both systems, which was indicative of homogeneous sizes (Fig. 2a). The nanometric size was congruent with the micrographs, which evidenced structures inferior to micrometric size with the formation of a spherical-type morphology at 25,000× magnification (Fig. 2c, d). SLN without the drug are unstable systems that tend to agglomerate and form micrometric-sized structures from 96 h post-elaboration. In formulations with the drug, the stability period was maintained at the nanometric scale during the evaluation period and presented a slight increase in the particulate size that was directly proportional to the SLN elaboration time, thus

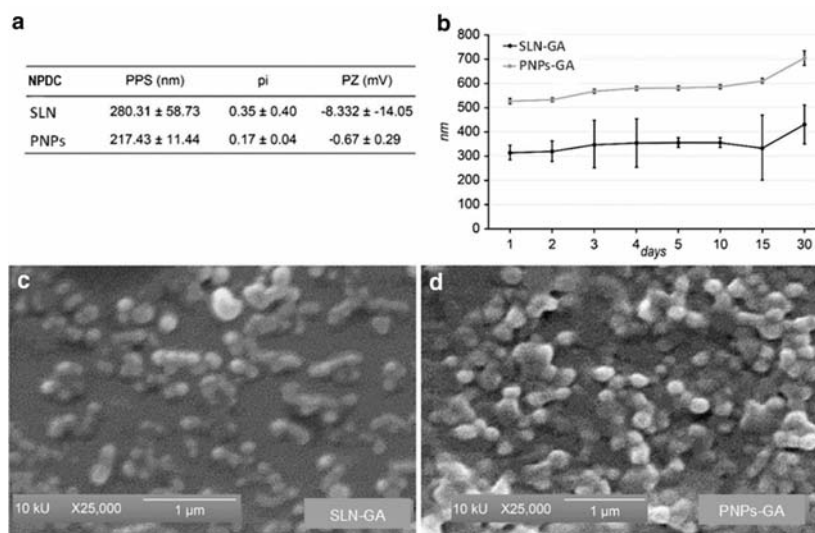


Fig. 2 Nanoparticle drug carrier characterization. **a** Average partial particulate size (PPS), polydispersion index and Z potential values of NPDC. **a** Graph of the size determination in the nanometric range of the SLN and PNPs via the DLS technique during a 30 day period at

ambient temperature. Scanning electron microscopic images taken at $\times 25,000$ magnification. Micrographs of the SLN-GA (**c**) and PNPs-GA (**d**). Bar = 1 μ m

rendering the PNPs with a more stable system time. The storage conditions of the formulations were ambient temperature without protection from light (Fig. 2b).

To determine the effect of the NPDC on cellular morphology, we evaluated the actin cytoskeleton. MARC-145 cells showed a defined pattern of actin filaments that gave rise to diverse protrusive and contractile structures to provide strength to a series of vital cellular processes; these filaments extend from the perinuclear actin cap to the cortical region of the cell. Actin filaments form stress fibers that provide support to the cell and play an important role in mechanotransduction, which is a characteristic of cells that grow in rigid strata. The filaments are visible in MARC-145 cells, where they form radial longitudinal bundles and arcs (Fig. 3a). We observed a lamellipodia with an actin-enriched zone at the leading edge corresponding to a dendritic network (Fig. 3b). The actin pattern observed in a highly confluent culture showed a predominance at the cell cortex level and stress fibers spreading through the cytoplasm (Fig. 3c).

To evaluate the effects on the morphology and structure of MARC-145 cells exposed to 50 μ l/ml of the NPDC with and without the drug, the drug alone, and the controls (5% RPMI and 5 mM H₂O₂) for 24 h, we conducted direct double-staining fluorescent assays (actin filaments and nuclei).

Only the SLN treatment without the drug induced destruction of the monolayer, which severely affected the cellular morphology with a loss of the actin filament structure, whereas the PNPs treatment with and without the drug, the SLN treatment with the drug and the treatment with the pure drug maintained very similar cellular morphology patterns and actin filament structures compared to those of the control culture. We did not observe apparent cellular changes, because the cell cortex, lamellipodia and stress fiber structure were maintained; in addition to the presence of the cell cortex, the cells showed centric nuclei with a well-defined morphology (Fig. 4).

The cytotoxicity tests were performed by measuring the mitochondrial and lysosomal activity and evaluating nuclear integrity (Fig. 5). The MTT test demonstrated that the PNPs concentration range of 1.25–100 μ l/ml maintained viability above 70% compared to the control cells, similar to the results obtained with the NR assay (Fig. 5a, b). The SLN exhibited a lower margin of safety at concentrations greater than 50 μ l/ml of SLN-GA and 5 μ l/ml of SLN induced destruction of the cell monolayer integrity (Fig. 4). At doses lower than these ranges, the MTT test showed absorbances above the control that reflected an increase in viability when expressed as percentages. The MARC-145 cells were used

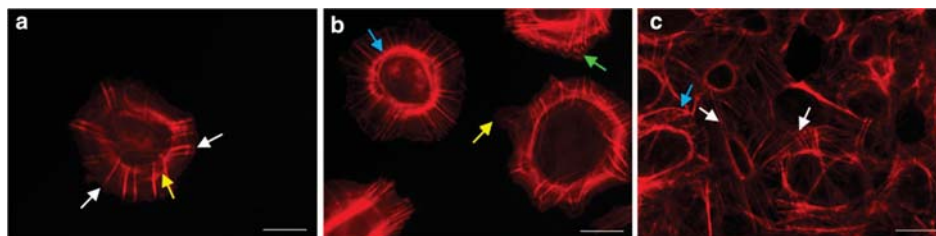


Fig. 3 Actin cytoskeleton in MARC-145 cells. Cell cultures at different stages of confluence. **a** The MARC-145 cells showed stress fibers with radial arrangement (white arrow) and the formation of arcs (yellow arrow). **b** The cells also showed the presence of lamellipodia (yellow arrow), as well as an actin-enriched zone corresponding to a dendritic network at the leading edge (green arrow) and a perinuclear

actin cap (blue arrow). **c** Stress fibers (white arrow) and the cell cortex (blue arrow) observed in a cell culture with 90% confluence. All cells shown are from cultures without treatment. Direct fluorescence assay, actin filaments stained with TRITC-labeled phalloidin. Fluorescence microscopy at $\times 40$ magnification. Bar = 10 μm

at 90% confluence for the cytotoxicity assays (Fig. 5c). MTT assay evidenced the formation of formazan crystals inside the cells from 1 h of exposure to MTT, until the end of incubation at 4 h (Fig. 5d, e).

SLN-GA induced nuclear damage at 72 h of exposure, with diminution of monolayer continuity (Fig. 6b), compared to the control cells (Fig. 6a); these results were congruent with those shown in Fig. 4. The PNPs-GA did not evidence loss of cell and nuclear integrity under the same exposure scheme (Fig. 6c). The cellular internalization capacity of the systems was measured by fluorescence assays. During the elaboration of the NPDC, the fluorophore coumarin C6 was added, to assess the effects of acute exposure of the cultures for 4 h, and the actin cytoskeleton and nuclei were stained and observed under the fluorescence microscope. The SLN-GA and PNPs-GA systems improved the cellular internalization processes measured indirectly by coumarin C6 displacement. The NPDC were detected in a pattern that suggested their internalization into cellular structures, and the staining was dependent on the exposure time. Coumarin C6-labeled SLN-GA and PNPs-GA showed abundant staining on the periphery of the cell cytoplasm (Fig. 6e, f), which was in contrast to the culture exposed to medium containing coumarin C6, in which the fluorophore was distributed uniformly throughout the entire preparation (Fig. 6d).

Discussion

We centered our attention on the search for a nanoparticulate model that functioned as a vehicle for GA (Fig. 1a) GA is a component of natural origin that has been demonstrated to possess an antiviral effect (Baltina et al. 2009a, b; Aguilar-Rosas et al. 2015) against viruses such as influenza A (Harada 2005), herpes simplex virus type 1 (HSV-1), and

Newcastle virus (Baltina et al. 2009a, b; Pompei et al. 1979, 1980, 1983) and to diminish the viral replication of viruses such as severe acute respiratory syndrome (SARS) virus, as reported by Cinatl et al. (2003). Viral agents comprise a great challenge to human and animal health. One of the diseases with the greatest negative impact on the porciculture industry is reproductive and respiratory porcine syndrome (PRRS), which has been recognized by the authors including Albina (1997), Tian et al. (2007), Zimmerman et al. (2006) and Dea et al. (2000) as one of the diseases with the greatest negative economic impact worldwide. Kim et al. (1993) and Dea et al. (1995) reported a population derived from the MA-104 African green monkey kidney cell line than was highly permissive for replication of the PRRS virus (i.e., the MARC-145 cell line). Based on the results of the study, the MARC-145 cell line is considered the culture of choice for the replication of this pathogen. Urbán et al. (2015) described diminution of the infectivity of the PRRS virus due to treatment with GA in SLN; however, these authors did not conduct studies on the innocuousness of their transport system. The objective of this work was to establish a cellular model that allowed evaluation of the innocuousness of systems to examine the incorporation of drugs of natural origin into nanoparticulate models. These nanotransporters improve pharmacokinetics due to their nanometric sizes, which confer characteristics such as the ability to cross biological barriers and avoid premature degradation of the active ingredient, among other benefits described by authors such as Irache (2008). Not only is the size of the NPDC a desirable characteristic of these systems, but the nature of the materials with which they are elaborated also confer unique properties. SLN represent a good drug delivery system due to their lipophilic nature (Mehnert and Mäder 2001), as do PNPs, which are formed from polymers that are innocuous for living organisms (Escalona and

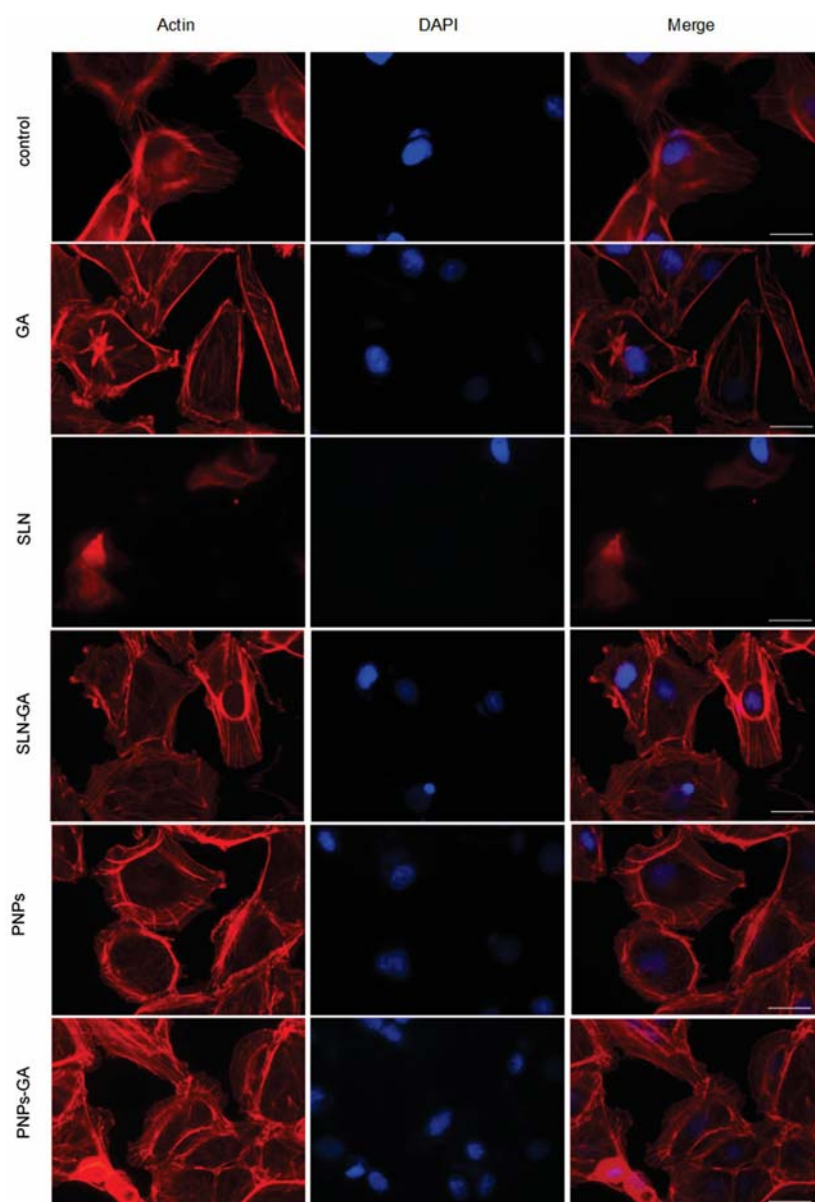


Fig. 4 Evaluation of the actin cytoskeleton to exposure to SLN and PNP's. The cultures were exposed for 24 h to the different treatments at an NPDC concentration of 50 $\mu\text{l/ml}$. The direct double-staining

fluorescent assay showed actin filaments stained with TRITC-labeled phalloidin and nuclei detected with DAPI. Fluorescence microscopy $\times 40$ magnification. Bar = 10 μm

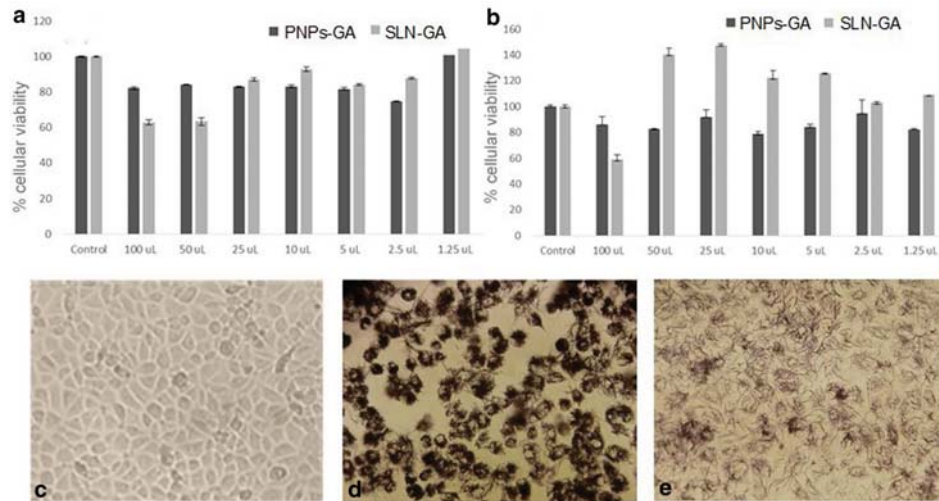


Fig. 5 SLN and PNP cytotoxicity. **a** Measurement of mitochondrial activity with the MTT assay, **b** determination of lysosomal activity with the neutral red assay. Graphs expressed in percentages compared to the controls for each treatment. Data were obtained from three

independent experiments. ANOVA. *** $p < 0.001$, cells; ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$. **c** Formazan crystal formation in MARC-145 control cell compared to MARC-145 cells exposed to SLN-GA (**d**) and PNP-GA (**e**). Bar = 100 μm

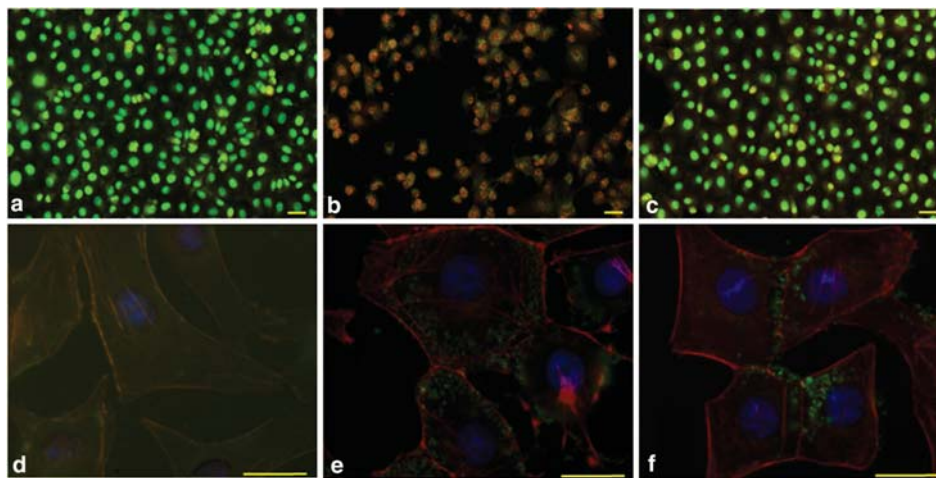


Fig. 6 Nuclear integrity and cellular uptake of NPDC. Cultures of MARC-145 cells were exposed to NPDC with the drug for 24 h, followed by acridine orange staining to evaluate the effect on nuclear integrity. **a** Control, **b** SLN-GA, **c** PNP-GA. Fluorescence micros-

copy, $\times 20$ magnification. Internalization of NPDC into the cells at 4 h of exposure based on coumarin C6 staining. **d** Medium-free coumarin C6, **e** coumarin C6-labeled SLN-GA, **f** coumarin C6-labeled PNP-GA. Fluorescence microscopy, $\times 40$ magnification. Bar = 50 μm

Quintanar 2014). However, to the best of our knowledge, no information is available on the mechanism of action and the effects of these particles on cellular structure and internal cellular activity.

We assessed actin filaments to evaluate the structural integrity of the cells. In MARC-145 cells, actin filaments presented a clear definition and disposition of the stress fibers characteristic of relatively stable cells that grew in rigid strata (Pellegrin and Mellor 2007; Pollard 2007; Tojkander et al. 2012). The pattern of actin in highly confluent cultures manifests predominance at the cell cortex level with stress fibers spreading through the cytoplasm, suggesting important regulation of the cell form and its participation in the formation of cell junctions and focal adhesions as well as participation in signaling pathways (Khatau et al. 2009).

The safety ranges of SLN and PNPs with and without the drug were determined by the MTT and NR assays. The PNPs systems with and without the drug possessed a greater safety range. SLN without the drug were the most cytotoxic system, with very low safety margins (i.e., 5 µg/ml). The addition of GA raises the dose to a maximal range of 50 µg/ml at 24 h of exposure as measured by mitochondrial and lysosomal activity; this finding suggests that the lipid concentration is crucial for establishing safety. Additionally, the latter finding indicates that the presence of high lipid contents permits abrupt fusion with the cell membrane, causing severe osmotic disequilibria and cell death, due to induction of actin filament depolymerization, with a resultant loss of stress fiber and the cell cortex structure and subsequent nuclear destruction (Fig. 4). The drug is adsorbed inside the NPDC, where it occupies space in its structure with sufficient effectiveness to diminish the lipid concentration and permit maintenance of the SLN-GA with a tenfold greater safety margin. Therefore, for SLN, the therapeutic margin should be standardized for the transport of other drugs. At doses less than 50 µg/ml, neither system affects the cellular morphology and actin filament structure. The mitochondrial and lysosomal activities were greater than 80%, suggesting that no cell damage occurred (Fig. 5a, b). For PNPs with and without the drug, there is no evidence of diminution of cell viability under 80% compared to the control within the 100–1.25 µg/ml concentration range. The PNPs nanotransporters exhibited less toxicity, which could be related with their smaller sizes (Fig. 2a). Katsumiti et al. (2015) reported the presence of PPS-dependent cytotoxic effects measured by the MTT and NR assays. Mitochondrial activity results in reduction of methyl tetrazolium into formazan via the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, which is increased in the presence of SLN. Formazan is a membrane-impermeable compound; thus, it accumulates in the interior of healthy cells and is easily observed by bright-field microscopy (Fig. 5d, e), as reported by authors such as Mossman (1983) and Fotakis and Timbrell (2006). Formazan is a

strongly lipophilic substance; therefore, the presence of the needle-shaped crystals of formazan is increased inside cells treated with SLN-GA, suggesting optimal internalization of the nanoparticulate systems, as described by Angius and Floris (2015).

During elaboration of the NPDC, they were conjugated with the fluorophore coumarin C6. To evaluate internalization of the NPDC, the cell cultures were acutely exposed to coumarin C6-labeled NPDC for 4 h. We evaluated internalization of NPDC, as well as the actin cytoskeleton and nuclear integrity through fluorescence microscopy. The coumarin C6-conjugated NPDC allowed visualization of the degree of internalization in the cells; thus, internalization of the NPDC conjugated with coumarin C6 could be estimated based on displacement inside the cells by observing the fluorescence emitted by the coumarin C6. Coumarin C6-labeled SLN-GA and PNPs-GA showed fluorescent staining in the cell cytoplasm (Fig. 6e, f). The absence of coumarin C6-labeled NPDC throughout the entire existing space among the cells is suggestive of the uptake of the NPDC systems inside the cells. In cells treated with SLN-GA, we observed a predominance of staining that was distributed more profusely in the cytoplasm, and PNPs were observed to a greater degree toward the periphery. NPDC appear to be facilitator systems for the drug, because the detection of coumarin C6-labeled NPDC in the cells revealed a pattern dependent upon the time of exposure. These data were similar to the results observed by Kim et al. (2016), who reported the presence of positive fluorescence in the interior of Caco-2 cells exposed to fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled NPDC for 4 h. These results suggest that SLN and PNPs can be employed as GA-supplier systems. In the assay with coumarin C6-labeled NPDC, the drug internalization process did not cause alterations in cellular morphology or in the actin cytoskeleton structure, measured indirectly by coumarin C6 displacement. However, confocal microscopy studies should be conducted to establish a three-dimensional (3D) reconstruction of the cells using distinct optical cuts to determine the exact site where the stain is concentrated.

Conclusions

The cooling of microemulsion and emulsification-diffusion methods are optimal for obtaining homogeneous and spherical nanometric-dimension structures that are lipidic and polymeric in nature. These structures are employed as nanotransporters for glycyrrhizic acid. The structures did not affect MARC-145 cell integrity and viability at doses lower than 50 µl/ml, because we did not observe changes in actin filament structures or in mitochondrial and lysosomal activity. Acridine orange staining suggests that polymeric nanoparticles comprise an innocuous system that is

superior to lipid nanoparticles at 72 h of exposure under the conditions evaluated in the present investigation. Using assays with coumarin C6-labeled NPDC, we corroborated the internalization of GA transported by the NPDC, which suggested a facilitator role for crossing the cell membrane and internal transport. MARC-145 cells represented a good model for evaluation of the morphological, structural and functional integrity of the cells through the determination of rearrangements and modification in the actin cytoskeleton and internal cell activity, the latter with the aim of assessing the effects induced by the NPDC. The results will be highly useful for later works evaluating the antiviral effects of GA transported by NPDC.

Acknowledgements We are grateful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for grant # 486348/282140, awarded perform doctoral studies and for projects PIAPI 001, PIAPI 1602 and PIAPI 1655 (FESC-UNAM), CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940, and PAPIIT IN18516 (DGAPA-UNAM). Thanks to M.C. Francisco Rodolfo González Díaz and M.C. Sofia González Gallardo, for their technical support during the realization of this work; and to laboratory 6 of the Unidad de Investigación Multidisciplinaria for facilitate the use of fluorescence microscope.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors of this manuscript do not have any conflicts of interest related to the information cited herein.

References

- Aguilar-Rosas I, Alcalá-Alcalá S, Llera-Rojas V, Ganem-Rondero A (2015) Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) containing glycyrrhizic acid intended for vaginal administration. *Drug Dev Ind Pharm* 41:1632–1639. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.980425>
- Alberts B (2014) *Molecular biology of the cell*, 6th edn. Garland Science, New York
- Albina E (1997) Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 55:309–316. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01322-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01322-3)
- Angius F, Floris A (2015) Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicol In Vitro* 29:314–319. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
- Baltina LA, Kondratenko RM, Baltina LA, Baschenko NZ, Pi'yasunova OA (2009a) Synthesis and biological activity of new glycyrrhizic acid conjugates with amino acids and dipeptides. *Russ J Bioorg Chem* 35:510–517. <https://doi.org/10.1134/S1068162009040141>
- Baltina LA, Kondratenko RM, Baltina LA, Piyasunova OA, Pokrovskii AG, Tolstikov GA (2009b) Prospects for the creation of new antiviral drugs based on glycyrrhizic acid and its derivatives (a review). *Pharm Chem J* 43:539–548. <https://doi.org/10.1007/s11094-010-0348-2>
- Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr HW (2003) Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet* 361:2045–2046. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13615-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13615-X)
- Cooper GM, Hausman RE (2009) *Cell death and cell renewal. The cell: a molecular approach*. Sinauer and Associates, Sunderland, pp 693–722
- Dea S, Sawyer N, Alain R, Athanassios R (1995) Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. *Adv Exp Med Biol* 380:95–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1899-0_13
- Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D (2000) Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 145:659–688. <https://doi.org/10.1007/s007050050662>
- Escalona RO (2017) *Desarrollo y caracterización de nanopartículas con superficie modificada Como potenciales transportadores de fármacos a través de la barrera hematoencefálica*. Tesis Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Escalona RO, Quintanar GD (2014) Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Rev Mex Cienc Farm* 45:17–38
- Fotakis G, Timbrell JA (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160:171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- Guirado BO, Solanas GM, Costa TI, Escrich EE (2002) El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Rev Cuba Invest Biomed* 21:115–122
- Harada S (2005) The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem J* 392:191–199. <https://doi.org/10.1042/BJ20051069>
- Hotulainen P, Lappalainen P (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* 173:383–394. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511093>
- Irache JM (2008) In *Nanomedicina nanopartículas con aplicaciones médicas*. Anal Sist Sanit Navar SciELO Esp 31:1–7–10
- Izutani Y, Kanaori K, Oda M (2014) Aggregation property of glycyrrhizic acid and its interaction with cyclodextrins analyzed by dynamic light scattering, isothermal titration calorimetry, and NMR. *Carbohydr Res* 392:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.04.017>
- Jabr-Milane L, Van Vlerken L, Devalapally H, Shenoy D, Komareddy S, Bhavsar M, Amiji M (2008) Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. *J Control Release* 130:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.016>
- Katsumi A, Gilliland D, Arostegui I, Cajarville MP (2015) Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *PLoS ONE* 10:e0129039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129039>
- Khataou SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, Patel MS, Stewart CL, Searson PC, Hodzic D, Wirtz D (2009) A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19017–19022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908686106>
- Kim HS, Kwang J, Yoon JJ, Joo HS, Frey ML (1993) Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133:477–483. <https://doi.org/10.1007/BF01313785>
- Kim JH, Park EY, Ha HK, Jo CM, Lee WJ, Lee SS, Kim JW (2016) Resveratrol-loaded nanoparticles induce antioxidant activity against oxidative stress. *Asian-Australas J Anim Sci* 29:288–298. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0774>
- Kou L, Bhitia YD, Yao Q, He Z, Sun J, Ganapathy V (2018) Transporter-guided delivery of nanoparticles to improve drug permeation across cellular barriers and drug exposure to selective cell types. *Front Pharmacol* 9:27

- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 75(1):1–18
- Liu C, Fallen MK, Miller H, Upadhyaya A, Song W (2013) The actin cytoskeleton coordinates the signal transduction and antigen processing functions of the B cell antigen receptor. *Front Biol* 8:475–485. <https://doi.org/10.1007/s11515-013-1272-0>
- Mehnert W, Mäder K (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47:165–196. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Müller RH, Radtke M, Wissing SA (2002) Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 242(1–2):121–128
- Olivier JC (2005) Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* 2(1):108–119
- Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres. *J Cell Sci* 120:3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>
- Pollard TD (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:451–477. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936>
- Pompei R, Flore O, Marcialis MA, Pani A, Loddo B (1979) Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* 281:689–690. <https://doi.org/10.1038/281689a0>
- Pompei R, Pani A, Flore O, Marcialis MA, Loddo B (1980) Antiviral activity of glycyrrhizic acid. *Experientia* 36:304. <https://doi.org/10.1007/BF01952290>
- Pompei R, Paghi L, Ingianni A, Uccheddu P (1983) Glycyrrhizic acid inhibits influenza virus growth in embryonated eggs. *Microbiologica* 6:247–250
- Quintanar-Guerrero D, Tamayo-Esquivel D, Ganem-Quintanar A, Allémann E, Doelker E (2005) Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur J Pharm Sci* 26:211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.06.001>
- Ramos MA, Da Silva PB, Spósito L, De Toledo LG, Bonifácio BV, Rodero CF, Bauab TM (2018) Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *Int J Nanomed* 13:1179
- Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF (2007) Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRSV in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE* 2:e526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526>
- Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P (2012) Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 125:1855–1864. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>
- Urbán MZ (2015) Evaluación de la actividad terapéutica del ácido glicirricínico formulado en sistemas submicrónicos contra el virus de PRRS. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Zimmerman J, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, Torremorell M (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). *Dis Swine* 9:387–418

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anexo II

Nota divulgación

Nanopartículas, una tecnología de impacto en el campo veterinario

Samantha Jardón Xicotencatl, Susana E. Mendoza, David Quintanar Guerrero*

El descubrimiento acerca de los inesperados comportamientos fisicoquímicos de la materia a escala nanométrica ha despertado el interés en la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías y sus posibles aplicaciones. El potencial de esta tecnología radica en su pequeño tamaño, el cual se encuentra dentro de la escala de la billonésima parte de un metro (10⁻⁹), el nanómetro. A este diminuto tamaño, factores químicos, eléctricos, ópticos, mecánicos y propiedades magnéticas se ven modificadas debido a cambios de sus propiedades cuánticas en comparación con sus mismos elementos a escalas mayores a la micra (10⁻⁶), dando inicio a la era de la nanotecnología.^{1,2,3}

La nanotecnología es la ciencia que estudia el diseño, síntesis, caracterización y aplicaciones de sistemas cuyas dimensiones son inferiores a los 1000 nanómetros (nm), en al menos una de sus dimensiones; estas estructuras con características de interacción celular y molecular altamente específica se denominan nanopartículas (NPs).

Las NPs poseen características que determinan su impacto a nivel biológico, como su composición química, su tamaño y forma, entre otros, lo cual permite hacer uso de ventajas importantes como su capacidad para atravesar las barreras biológicas y alcanzar el órgano, tejido o grupos celulares específicos, controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción, mejora de problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y disminución de la citotoxicidad, entre otros.^{4,5}

En el campo de la medicina veterinaria, las aplicaciones de esta tecnología están enfocadas a dos grandes rubros: los nanofármacos y los nanodispositivos. Los nanofármacos deben sus efectos a la química y estructura propia de las NPs, mientras que los nanodispositivos son empleados como vehículos de carga y transporte de principios activos.⁶

Diversos investigadores han puesto sus ojos en los beneficios que esta tecnología en el ámbito veterinario, este artículo resume de manera general algunos de ellos.

Las aplicaciones de esta tecnología en la medicina veterinaria están enfocadas en los nanofármacos y los nanodispositivos.



La Seguridad Alimentaria

Del maíz, la alimentación y los retos

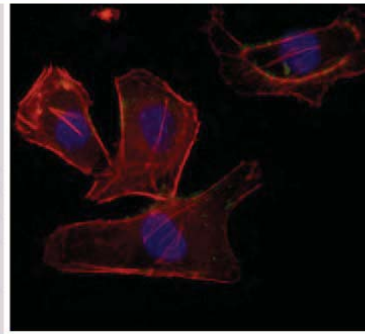
Desarrollo Sostenible... ¿y eso qué es?

Productos de origen animal

La nanotecnología permitirá la generación de alimentos más saludables, palatables, resistentes a enfermedades, alargando su vida de anaquel sin sacrificar su calidad organoléptica, incluso en este sentido las NPs pueden mejorar las condiciones de los productos alimenticios de origen animal, un ejemplo claro de ello son las investigaciones que buscan optimizar la textura de productos cárnicos y lácteos, el control de la difusión de gases y oxidación para prolongar el tiempo de conservación, o la mejora de la resistencia mecánica aplicables a productos como la cáscara de huevo para plato 9,10 La inocuidad alimentaria y la conservación de alimentos parecen también beneficiarse de las NPs, por ejemplo en el desarrollo de nanotécnicas que permiten la generación de materiales de contacto con efectos bactericidas, antimicrobicos, que permitan una mejor estabilidad térmica de los productos. Estos nanomateriales pueden además tener las funciones de monitoreo, usados como sondas capaces de detectar o absorber sustancias tóxicas en leche y carne.^{10,11,12,13}

Medicina veterinaria

NPs en contra de agentes infecciosos, las enfermedades infecciosas los virus, bacterias y hongos parecen encontrar un nuevo enemigo, NPs metálicas están diseñándose para dar frente contra enfermedades virales, generación de nuevas vacunas y mejora de las ya existentes.¹⁷ El desarrollo de complementos nanofuncionales que confieren una protección tipo barrera a las células contra infecciones, ya sea absorbiendo o aglutinando a los microorganismos facilitando su expulsión, permite no solo mantener a los animales en un buen estado de salud sino también maximizar su potencial genético mejorando su estado sanitario. La industria veterinaria está apostando trabajar en el área diagnóstica por el desarrollo de sistemas a nanoescala para el procesamiento rápido de las muestras con alta sensibilidad y resolución, lo cual hará posible la implementación de planes terapéuticos en etapas tempranas que permitan mejorar el control y disminuir el impacto económico negativo en los centros de producción pecuaria.¹⁸



Producción pecuaria

La producción de nanosensores biodegradables, implantados en los animales, permiten el monitoreo constante de su localización, mejorando considerablemente los procesos de trazabilidad, y no solo eso, investigaciones recientes buscan mejorar el sabor de las pasturas, haciéndolas más atractivas para los animales. La producción pecuaria podría beneficiarse del uso de estos sistemas, que permiten emplear dosis menores de antibióticos que afectan la calidad de la leche en los tratamientos convencionales, así como mejorar sus planes de medicina preventiva al permitir la diferenciación de animales sanos, vacunados o portadores de alguna enfermedad.¹⁹

Nanotoxicología

La nanotecnología posibilitó la existencia de una nueva ruta en el transporte de fármacos. En modelos animales, nanopartículas pudieron ser transportadas directamente desde la nariz al cerebro a través del epitelio olfativo y los nervios trigéminos, con la ventaja de no ser afectadas por reflujo mucoso ni degra-

dación en la cavidad nasal.²⁰ esto es tan solo un ejemplo del potencial para atravesar barreras anatómicas y vectorización, la cual por la especificidad de descarga de las diminutas dosis de los principios activos hacia las células diana hacen posible la disminución de los efectos adversos con los que se enfrentan algunas terapias tradicionales, repercutiendo así en una mejora del potencial toxicológico.

A pesar de que actualmente existe un gran vacío en cuanto a la seguridad del uso de estos sistemas, sus ventajas parecen ser mayores. Actualmente en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, el laboratorio de "Biología celular y morfología veterinaria" en campo 4 y los laboratorios de "Investigación en tecnología farmacéutica" y el de "Virología y microbiología de las enfermedades respiratorias del cerdo" desarrollan un modelo celular que permita evaluar la seguridad de las NPs transportadoras de fármacos, mediante el estudio del citoesqueleto en líneas celulares. Estas investigaciones permitirán contribuir al uso de estos sistemas con un impacto prometedor en el diagnóstico, tratamiento, producción pecuaria y de alimentos.

Anexo III. Artículo Científico (Colaboración)

Journal of Drug Delivery Science and Technology 52 (2019) 488–499



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst



Rapamycin-loaded polysorbate 80-coated PLGA nanoparticles: Optimization of formulation variables and *in vitro* anti-glioma assessment



Oscar Escalona-Rayo^a, Paulina Fuentes-Vázquez^a, Samantha Jardon-Xicotencatl^{b,c}, Carlos G. García-Tovar^b, Susana Mendoza-Elvira^c, David Quintanar-Guerrero^{a,*}

^aLaboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Ave. 1° de Mayo S/N, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, C.P.54745, Estado de México, Mexico

^bUnidad de Investigación Multidisciplinaria LA (Morfología Veterinaria y Biología Celular), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, C.P.54714, Estado de México, Mexico

^cLaboratorio de Microbiología y Virología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Ave. 1° de Mayo S/N, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, C.P.54745, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Glioma chemotherapy
Rapamycin
Nanoparticles
Emulsification–diffusion
Surfactant coating
Controlled release

ABSTRACT

Rapamycin is a promising anticancer agent, but because it has poor water solubility and low bioavailability its clinical use is limited. The aim of this study was to develop rapamycin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles coated or not with polysorbate 80 for drug delivery to glioma cells. Nanoparticles were prepared using the emulsification–diffusion method, formulated and optimized through Box-Behnken design, and characterized by DLS, SEM, and DSC. *In vitro* drug release and stability studies were also performed. The anti-glioma activity of the optimized nanoformulations was tested on C6 glioma cells by cytotoxicity assay and cytoskeletal integrity assessment. The respective values for the particle size, polydispersity index, zeta potential, and drug entrapment efficiency of the optimized uncoated and polysorbate 80-coated nanoparticles were 232 vs. 247 nm, 0.059 vs. 0.103, –16.69 vs. –11.76 mV, 43.7 vs. 28.51%. SEM and DSC analyses revealed that rapamycin was entrapped into spherical nanoparticles. These nanoparticles showed a biphasic drug release pattern and exhibited satisfactory storage stability for at least three months. Anti-glioma activity studies demonstrated that the polysorbate 80-coated nanoparticles were more effective than the uncoated ones and the free rapamycin. These findings suggest that these nanoformulations could be useful in glioma chemotherapy.

1. Introduction

Rapamycin (Rapa), a hydrophobic macrolide derived from the bacterium *Streptomyces hygroscopicus*, is an immunosuppressive agent clinically approved for preventing organ transplant rejection [1,2]. But recently Rapa was shown to have anticancer properties in several human cancers, including malignant brain gliomas [3,4]. Rapa's anticancer activity consists of the selective inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR), which regulates cell growth, proliferation, motility, metabolism, and survival [5]. mTOR is found to be over-activated in certain cancer cells, so inhibiting it could promote both apoptotic and autophagic cell death [6]. Therefore, mTOR inhibition is an effective approach for targeted cancer therapy.

Though Rapa has a high potential for treating cancer, several challenges to its clinical applicability must be addressed. These include water insolubility (2.6 µg/mL), low tumor specificity, dose-dependent

toxicity, low bioavailability, and rapid systemic clearance [4,7]. Also, Rapa is pumped out of tumor cells by drug efflux transporters (mainly P-glycoprotein) that impede its cellular accumulation [8]. These drug efflux transporters are over-expressed not only in brain glioma cells, but also in endothelial cells of the blood–brain barrier (BBB), which control the entry of numerous drugs into the brain [9,10]. Given these conditions, developing nanoparticulate drug delivery systems could be an excellent strategy for overcoming these problems.

Biodegradable polymeric nanoparticles (NPs) are colloidal particles that range from 1 to 1,000 nm in diameter and are frequently used as drug delivery systems. They can pass through biological barriers, transport drugs to target sites, increase drug solubility and stability, and reduce side-effects [11]. Because of its broad range of properties such as biodegradability and biocompatibility, poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) –an FDA-approved polymer for human applications– has been widely employed in developing NPs that carry hydrophilic or lipophilic

* Corresponding author.

E-mail address: quintana@unam.mx (D. Quintanar-Guerrero).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.026>

Received 11 January 2019; Received in revised form 2 April 2019; Accepted 12 May 2019

Available online 13 May 2019

1773-2247/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado con todo mi amor a mi hermoso hijo Matías, quien es mi fuerza e inspiración, mi cómplice y compañero en desvelos, por mostrarme su admiración y orgullo por lo que hago.

Mati todo esto se queda tan pequeño con lo orgullosa que me siento ser tu mamá, deseo de corazón que resignifiques nuestra historia de manera positiva y resiliente, pero sobre todo deseo que este trabajo y lo vivido en el proceso te motive a hacer grandes cosas, jeres la mejor persona que he conocido!, cree siempre en ti mi niño, te amo profundamente.

A mis padres por su amor incondicional y a mis hermanas por ser la otra mitad de mi corazón.

Samantha Jardon Xicotencatl