

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“Nanopartículas en la liberación controlada de
angiotensina-(1-9) para prevenir la hipertrofia cardiaca
experimental”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor Farmacología por:

SABRINA SEPÚLVEDA RIVAS

**Directores de Tesis: Dr. Javier Morales Montecinos
Dra. María Paz Ocaranza**

**Santiago - CHILE
2019**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

SABRINA CAMILA SEPÚLVEDA RIVAS

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día de de 2019.

Directores de Tesis:

Dr. Javier Morales Montecinos

Dra. María Paz Ocaranza

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz

Dra. Gina Sanchez

Dr. José Manuel Perez

Dr. Ramón Rodrigo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han prestado su apoyo, tanto profesional como personal, durante todo el camino recorrido para finalizar esta tesis doctoral.

A mis directores de tesis, los profesores Javier Morales Montecinos y María Paz Ocaranza, por haberme recibido y dado la gran oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por sus orientaciones y correcciones todo el tiempo que duró la parte práctica y escrita de esta tesis.

A todos los demás profesores, investigadores y colaboradores del grupo: Magdalena Gonzalez, Maria Nella Gai, Olosmira Correa, Edda Costa, Jaime Riquelme y Zully Pedrozo. Todos, tienen además de grandes cualidades profesionales, una inmejorable calidad humana, lo que se ha manifestado en innumerables oportunidades y con motivo de situaciones de variada índole.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: David Mondaca, Matías Leal, Paula Solar, Paloma Lillo, Luan Da Silva, José Luis Galaz, Javiera Aguilera, todos han aportado y hacen irrepensible e inolvidable esta etapa de mi vida.

Finalmente agradezco el apoyo y comprensión de toda mi familia y especialmente a mi madre quién me mostró el camino de la ciencia e investigación, por su constante apoyo y sus palabras de aliento. A mi abuelo materno, quién ya no está con nosotros, pero estoy segura desde el cielo estará disfrutando y acompañandome en la culminación de esta etapa de mi vida.

Sabrina Sepúlveda Rivas

INDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. Sistemas de entrega de péptidos bioactivos	1
1.3. Nanopartículas como vector de péptidos bioactivos	2
1.4. Nanopartículas poliméricas	3
1.5. Nanopartículas de oro para la entrega temporalmente controlada	4
1.6 Enfermedades cardiovasculares (ECV)	6
1.8 Hipertrofia cardiaca.....	6
1.9 Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	7
1.10 Tratamiento de la hipertrofia cardiaca y limitaciones de la terapia actual ..	8
1.11 Angiotensina-(1-9)	9
1.12 Angiotensina-(1-9) en la hipertrofia cardiaca	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo General	11
3.2 Objetivo Específicos	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Reactivos.....	12
4.6 Formulación y desarrollo de nanopartículas poliméricas	13
4.7 Caracterización fisicoquímica de las NPs	14
4.8 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro: nanoesferas de oro ..	14
4.10 Espectrofotometría de absorción molecular	15
4.13 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	17
4.14 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	17
4.15 Estudio de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) ...	18
4.16 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).....	18
4.17 Determinación de la eficiencia de asociación por HPLC de fase reversa	19
4.18 Estabilidad coloidal de pNPs de EE/Alg vacías y cargadas con lisozima	20
4.20 Estudio de liberación <i>in vitro</i> de lisozima	21

4.21 Estudio liberación <i>in vitro</i> de Ang-(1-9)	21
4.22 Prueba de liberación <i>in vitro</i> de Ang-(1-9) mediada por irradiación	21
4.2 Modelo experimental	24
4.3 Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas	24
4.4 Ensayos de seguridad:.....	25
4.5 Ensayos de eficacia en cardiomiocito de rata neonata:	27
4.23 Tamaño muestral y análisis estadístico	28
5. RESULTADOS.....	31
5.1.1 Preparación de nanopartículas poliméricas por coacervación compleja	31
5.1.2 Caracterización fisicoquímica de las pNPs: Tamaño, potencial Z (PZ) y polidispersión (PDI)	33
5.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	34
5.1.4 Estudio de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	35
5.1.5 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).....	37
5.1.6 Determinación de la eficiencia de la asociación	38
5.1.7 Estabilidad de las pNPs de EE/Alg cargadas con Lys.....	39
5.1.8 Liberación <i>in vitro</i> de lisozima.....	40
5.9 Ensayos de seguridad <i>in vitro</i>	41
8. RESULTADOS CAPITULO 1	48
8.1 Desarrollo de pNPs EE/alginato y EE/sulfobutil- β -ciclodextrina por coacervación compleja	48
8.2 Caracterización de las pNPs: Tamaño, PZ y PDI	48
8.3 SEM de pNPs de EE/alginato y EE/sulfobutil- β - ciclodextrina	51
8.4 Síntesis de nanoesferas de oro (AuNE)	52
8.5 Caracterización de las AuNE de oro por absorción atómica	52
8.6 Caracterización fisicoquímica de las AuNE: tamaño, PZ y PDI	53
8.7 Microscopia electrónica de Transmisión (TEM).....	53
8.8.1- Encapsulación de AuNE en pNPs de EE/Alg	54
8.8.2 Caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con AuNE por tamaño, PZ y PDI	54
8.8.3 Caracterización de pNPs EE/Alg con AuNE por TEM.....	55
A B	55
8.8.5 Caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con distintas concentraciones de angiotensina-(1-9) y AuNE por tamaño, PDI y PZ.....	57
8.8.7 Determinación del %EA de Angiotensina-(1-9) en la pNPs EE/Alg	58

8.8.8 Evaluación del %EA de Angiotensina-(1-9) en las pNPs híbridas EE/Alg con AuNE	59
8.8.97 Estudio de liberación <i>in vitro</i> de Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg	60
8.8.10 Determinación <i>in vitro</i> de la seguridad de administración de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) y AuNE	62
8.8.10.1 Ensayos de viabilidad celular: MTS	62
9. RESULTADOS CAPÍTULO II	66
9.1 Estabilidad coloidal de las pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE en diferentes medios de relevancia.....	66
9.2 Liberación de Ang-(1-9) desde las pNPs híbridas EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE mediada por irradiación láser.....	68
9.3 Determinación de la liberación producida por irradiación de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) que contienen diferentes porcentajes de AuNE.	70
10. RESULTADOS CAPÍTULO III.....	72
10.1 Eficacia anti-hipertrófica <i>in vitro</i> del sistema de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2% en cultivo primario de cardiomiocito de rata neonata sometido a estímulo con norepinefrina (NE)	72
6. DISCUSIÓN	78
CAPITULO I.....	82
CAPITULO II.....	91
CAPÍTULO III.....	96
16. BIBLIOGRAFÍA.....	100

IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El trabajo de tesis que aquí se presenta fue desarrollado en el Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en conjunto con la División de Enfermedades Cardiovasculares de la Facultad de Medicina Universidad Católica. Contó con el apoyo instrumental de la Escuela de Ingeniería de la Universidad de Chile y el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La realización de esta investigación tuvo el apoyo y financiamiento siguiente:

- Beca de Facultad para doctorado año académico 2013
- Beca CONICYT N°21130766 para estudios de Doctorado Nacional, convocatoria 2013
- Proyectos de investigación FONDECYT N°1181689
- Proyecto de investigación FONDAP N°15130011

Durante la ejecución del proyecto de tesis, se realizaron actividades de difusión de esta línea de investigación y de los resultados obtenidos.

Publicaciones

1. Rivas R Edith, Sepúlveda R Catalina, Bustos M Luis, Sepúlveda R Sabrina. Condiciones sociales, factores biológicos y conducta de cuidado materno en prevención de enfermedades respiratorias en lactantes. Cienc. enferm. 2011; 17 (1): 105-115.

2. J.O. Morales, S. Sepúlveda-Rivas, F. Oyarzun-Ampuero, S. Lavandero, M.J. Kogan. Novel nanostructured polymeric carriers to enable drug delivery for cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2015; 21(29):4276-4284(9).
3. S. Sepulveda-Rivas, Hans F. Fritz, Camila Valenzuela, Carlos A. Santiviago, Javier O. Morales. Development of Novel EE/Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lysozyme Delivery: Physicochemical Properties and In Vitro Safety. *Pharmaceutics* 2019, 11(3), 103.

Congresos

1. III Congreso Nacional de Nanotecnología. Puerto Varas 10-12 de septiembre 2014. Programa interdisciplinario nanociencia. Efecto de la composición del polianión en las características de los sistemas de Nanopartículas de Eudragit E PO/alginate y Eudragit E PO/sulfobutil- β -ciclodextrina. S. Sepúlveda-Rivas, V. Miranda, F. Oyarzun-Ampuero, J.O. Morales.
2. 31 Congreso Latinoamericano de Química. Lima-Perú 14-17 de octubre 2014. Sociedad química del Perú. Federación Latinoamericana de asociaciones químicas. Nanopartículas de Eudragit E PO/alginate y Eudragit E PO/sulfobutil- β - ciclodextrina: Efecto de la composición del polianión en las características de los sistemas. S. Sepúlveda-Rivas, Natalia Hassan, Víctor Miranda, Ignacio Moreno- Villoslada, Marcelo J. Kogan, Javier O. Morales y Felipe Oyarzun-Ampuero.

3. 10° Seminario Internacional Nanotecnología Fundación Copec-UC. Santiago, 13 noviembre del 2014. Nanopartículas poliméricas: un avance prometedor a los vehículos convencionales de liberación de fármacos. S. Sepúlveda-Rivas, Johanna Catalán-Figueroa, Javier O. Morales.

4. IV Escuela de Nanomedicinas 2014. 4to Simposio de jóvenes investigadores. Asociación Argentina de Nanomedicina. Buenos Aires- Argentina, 25-28 noviembre 2014. Desarrollo de nanotransportadores para entrega de fármacos al sistema nervioso central. J.F.Catalán-Figueroa, S. Sepúlveda-Rivas, J.O. Morales.

5. "VII Escuela de Nanoestructuras". Formulación y caracterización de nanopartículas poliméricas: Eudragit E PO/Alginato y Eudragit E PO/sulfobutil- β - ciclodextrina. H. Fritz, S. Sepúlveda-Rivas, V. Miranda, J.O. Morales. Valparaíso, 6-9 enero del 2015. UTFSM, Chile.

6. 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition. Toxicity Evaluations of Polymeric Nanoparticles: Cell Viability versus Physicochemical Properties of Nanoparticles. Sabrina Sepúlveda-Rivas, María Gomez, Javier Morales. October 26-29, 2015 at the in Orlando, FL, USA.

7. DDTE'16 - International Conference on Nanomedicine, Drug Delivery, and Tissue Engineering (NDDTE'16). In vitro evaluation of cell viability and cytotoxicity of novel polymeric nanoparticle delivery system with potential biomedical application. Sabrina Sepúlveda-Rivas, Camila Valenzuela, Javier Morales. Prague, April 1-2, 2016. (Accepted).

8. 7th International Congress BioNanoMed 2016- Nanotechnology enables Personalized Medicine. The influence of novel polymeric nanoparticle delivery system on cell morphology. In the high-quality poster session. S. Sepúlveda-Rivas, C.Valenzuela, C.A. Santiviago, J.O. Morales. Krems, Austria from 6-8 april, 2016.

9. 43rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. ID 3221 - “Stability study of a novel polymeric nanoparticle system for biologics and evaluation of its activity protection potential”. S. Sepúlveda-Rivas, F.Campano- Hantscheruk, J.O. Morales. July 17 – 20, 2016, at the Washington State Convention Center in Seattle, Washington, U.S.A. (Accepted).

10. CNN- IV Congreso Nacional de Nanotecnología 2016. “Nanopartículas poliméricas multifuncionales de EE-Alg para la entrega de fármacos biológicos con alta eficiencia de asociación y biocompatibilidad”.

S.Sepúlveda-Rivas, R. Reyes-Ramírez, F. Marchant, C. Otero, J.O. Morales.
Olmué, 5-7 de Septiembre de 2016.

11. Conferencia Internacional de Nanomedicina y Nanobiotecnología (ICONAN).

“Stability and drug release of anti-cardiac hypertrophic peptide loaded in new nanohybrids based on gold nanoparticles embedded into a polymeric matrix”.

S.Sepúlveda-Rivas, María Paz Ocaranza, J.O. Morales. September 25-27, 2017, at the University Pompeu Fabra in Barcelona-Spain.

12. 2nd Congress of Educational Innovation, "New Horizons in Higher Education". Santiago, November 6 and 7, Universidad Santo Tomás.

RESUMEN

En esta tesis se formularon y desarrollaron nanopartículas poliméricas que fueron cargadas con el péptido angiotensina Ang-(1-9) y nanoesferas de oro. Ang-(1-9) corresponde a un péptido vasodilatador el cual contrarresta el efecto vasopresor de la Ang II, previene la hipertrofia cardiomiocitaria *in vitro e in vivo*, disminuye la presión arterial y el remodelado cardiovascular patológico.

Ang-(1-9) presenta una reducida vida media en la circulación por lo que su uso terapéutico requiere de un vehículo/vector. Para dar solución a este problema se protegió la Ang-(1-9) dentro de una nanopartícula polimérica y se incorporaron nanoesferas de oro para que a través del estímulo fototérmico, gatillar la liberación temporalmente controlada de Ang-(1-9).

Las nanopartículas fueron caracterizadas por dispersión dinámica de la luz, potencial zeta, microscopía electrónica de barrido y de transmisión, distribución de tamaño y concentración por *nanoparticle tracking analysis*. La eficiencia de asociación de Ang-(1-9) y el perfil de liberación se confirmó mediante HPLC. Se determinó la estabilidad de las nanopartículas en diferentes medios de relevancia. Las nanopartículas de Ang-(1-9) no mostraron efectos citotóxicos a concentraciones bajas e intermedias en una línea celular de cáncer cérvicouterino y en cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonata. Las nanopartículas de Ang-(1-9) fueron eficaces en prevenir la hipertrofia cardiomiocitaria inducida por norepinefrina en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.

Esta tesis muestra un promisorio nanosistema basado en nanopartículas poliméricas de Ang-(1-9) con potenciales aplicaciones para el tratamiento de la hipertrofia cardiovascular.

ABSTRACT

In this doctoral thesis, polymeric nanoparticles were formulated and developed, which were loaded with the angiotensin (Ang)-(1-9) peptide and gold nanospheres. Ang- (1-9) corresponds to a vasodilator peptide which counteracts the vasopressor effect of Ang II, prevents cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* and *in vivo*, decreases blood pressure and, pathological cardiovascular remodeling.

Ang -(1-9) inside a polymeric nanoparticle and incorporated gold nanospheres that through the photothermal effect, it triggers the controlled release temporarily through the application of radiation.

The nanoparticles were characterized by dynamic light scattering, zeta potential, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy, size distribution and concentration by nanoparticle tracking analysis. The association efficiency of Ang- (1-9) and the release profile was confirmed by HPLC. The stability of the nanoparticles in different relevant media was determined. Their safety was evaluated, for which cytotoxicity and viability tests were carried out against the cervical cancer cell line (HeLa) and neonatal rat cardiomyocyte primary culture. Ang- (1-9) nanoparticles were effective in preventing cardiomyocyte hypertrophy induced by norepinephrine in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes.

This thesis shows a promising nanosystem based on polymeric nanoparticles of Ang - (1- 9) with potential applications for the cardiovascular hypertrophy treatment.

LISTADO ABREVIATURAS

Agua MilliQ:	Agua destilada y desionizada
ANOVA:	Análisis de la varianza
Ang I:	Angiotensina I
Ang II:	Angiotensina II
Ang-(1-7):	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9):	Angiotensina-(1-9)
ANP:	Péptido natriurético auricular
Alg:	Alginato
AT2R:	Receptor de Angiotensina II tipo 2
AuNE:	Nanoesfera de oro
AuNP:	Nanopartícula de oro
BSA:	Albúmina de suero bovino
D.E.:	Desviación estándar
DMEM:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DLS:	Dispersión dinámica de la luz
DTA:	Análisis térmico diferencial
EA:	Eficiencia de asociación
ECA:	Enzima convertidora de Angiotensina I
ECA2:	Enzima homóloga de la ECA
ECV:	Enfermedad cardiovascular
EDTA:	Ácido etilendiamino tetra-acético
FBS:	Suero fetal bovino
FTIR:	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
HAuCl4:	Ácido cloro aúrico
HeLa:	Células de cáncer cérvico-uterino
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTA:	Hipertensión arterial
IECA:	Inhibidores de la enzima convertidora angiotensina I
IR:	Espectroscopía Infrarroja
LDH:	Lactato deshidrogenasa
Lys:	Lisozima
MTS:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
M199:	Medio de cultivo 199
NaBH4:	Borohidruro de sodio
NE:	Norepinefrina
NPs:	Nanopartículas
NTA:	Nanoparticle tracking analysis
PBS:	Tampón de fosfato salino
PDI:	Índice de polidispersión
pNPs:	Nanopartículas poliméricas
PZ:	Potencial Z
RCV:	Remodelado cardiovascular
SEM:	Microscopia electrónica de barrido
TEM:	Microscopia Electrónica de Transmisión

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Péptidos bioactivos como nuevos fármacos

Los péptidos bioactivos han emergido como nuevos y prometedores medicamentos para el tratamiento de muchas patologías, incluyendo las enfermedades cardiovasculares (CV) [1]. Muchos de estos péptidos han mostrado significativa eficacia terapéutica, selectividad, especificidad, actividad, reducidas interacciones entre fármacos y baja toxicidad [1,2]. Así el año 2012 fue todo un hito ya que 5 y 6 péptidos recibieron aprobación del mercado respectivamente en Europa y en los Estados Unidos, constituyéndose como el número más alto de aprobaciones logradas para nuevos péptidos bioactivos [2,3].

La vía de administración oral de fármacos de uso CV sigue siendo la vía de elección. Sin embargo esta vía no puede usarse para la administración de péptidos debido a: a) biodisponibilidad muy limitada, debido al mayor peso molecular (> 1000 Da) que limita el paso a través de membranas; b) labilidad a enzimas y medio ácido debido a, la exposición extensa a través del área de superficie del tracto gastrointestinal, y el efecto de primer paso por el hígado [4]. Esto ha llevado a los investigadores a acelerar el desarrollo de nuevos sistemas de administración de péptidos, que pueden mantener su estructura, eficacia, seguridad de administración y que liberen el agente terapéutico de manera predecible en el tiempo y sean degradado a metabolitos que son absorbidos o excretados [5].

1.2. Sistemas de entrega de péptidos bioactivos

En los últimos años, prometedores sistemas de entrega basados en nanopartículas poliméricas han atraído significativa atención y se pueden sintetizar a través de varias técnicas que incluyen emulsificación, microemulsión inversa, polimerización

de monómeros biodegradables y no biodegradables como también la coacervación [6,7]. En particular, la coacervación conduce a la formación de un sistema de matriz en medio acuoso, también conocido como complejo de polielectrolito (PEC), formado entre al menos dos moléculas de carga opuesta, una de las cuales puede ser un policationión y otra polianión. Por lo tanto, esta combinación se ha investigado ampliamente para la formulación de fármacos [6,7], probablemente debido al hecho de que la asociación espontánea de los polímeros cargados de forma opuesta conduce a la formación de PEC a través de enlaces electrostáticos fuertes y reversibles [8]. Las propiedades de los PEC están influenciadas por la composición química de los polímeros (su peso molecular, estereoquímica, densidades de carga, etc.), también por condiciones experimentales como las concentraciones de los polielectrolitos antes de la mezcla, su proporción en mezcla, la fuerza iónica de la solución, orden en que son adicionados, etc. [9,10]. Polímero-polímero, polímero-fármaco, polímero-fármaco-polímero y polímero-proteína son tipos de complejos de polielectrolitos que se han estudiado con frecuencia para la administración de fármacos y aplicaciones biomédicas [11-15].

Las nanopartículas de complejo polielectrolitos obtenidas por coacervación compleja, encapsulan péptidos bioactivos en la matriz del polímero a nivel molecular. Esto ofrece mayores ventajas ya que mejoran la actividad farmacológica de los péptidos al aumentar su estabilidad, protección a la degradación y controlan su liberación [16-17]. Además, son ampliamente utilizados debido a las mejores propiedades funcionales que ofrecen en comparación con el uso de polianiones y policationes solos [18]. Por ejemplo, alginato/quitosano, dermatán sulfato/quitosano polielectrolito complejo y Eudragit L100-55/quitosano, son algunas de las nanopartículas que se han descrito para el encapsulamiento de polipéptidos hidrófilicos [19-21].

1.3. Nanopartículas como vector de péptidos bioactivos

Las nanopartículas (NPs) son un tipo de estructuras con formas, tamaños definidos en el rango nanométrico que se describen como nuevos sistemas de entrega de

péptidos. A nivel celular, la entrega de péptidos *in vivo* puede verse obstaculizado por su estructura tridimensional, naturaleza hidrofílica/hidrofóbica, y estabilidad [22]. Estos factores hacen que los péptidos sean altamente vulnerables, con vida media corta, debido a la degradación por enzimas y proteasas, ya sea en el lugar de administración o en ruta al sitio de acción farmacológica, resultando en una pobre biodisponibilidad [23,24].

Por estas razones, un vehículo o sistema de suministro para péptidos bioactivos se hace muy necesario. Estos sistemas de liberación controlada deben estar constituidos por materiales biocompatibles, y en este sentido, los biopolímeros tienen una amplia aplicación en el desarrollo de estos sistemas.

1.4. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (pNPs), especialmente las compuestas por polímeros biodegradables, representan una mejora sobre los métodos tradicionales de administración de fármacos [25] en términos de eficiencia y efectividad. Sus ventajas son principalmente su alta compatibilidad al interactuar con células y tejidos y buen perfil de biodegradación. Además: i) sus métodos de formulación son altamente reproducibles, ii) los distintos tipos de pNPs permiten encapsular tanto péptidos hidrofílicos como hidrofóbicos, iii) permiten modificar la velocidad de liberación del fármaco, iv) presentan una baja toxicidad, v) estabilidad, vi) fácilmente modificables para presentar una gran variedad de ligandos adheridos a su superficie, vii) baja respuesta inflamatoria, y viii) su tamaño permite que lleguen de manera más fácil a distintos sitios del organismo [26,27].

El ingreso de las NPs a los distintos tipos de células y su velocidad de transición están mediados por sus propiedades fisicoquímicas, tales como tamaño, carga superficial e hidrofobicidad. En la sangre, las superficies no iónicas e hidrofóbicas son rápidamente opsonizadas seguido del reconocimiento del sistema retículo endotelial (SRE). Las partículas cargadas positivamente presentan una mayor tasa de internalización celular, debido a la carga negativa de las membranas celulares.

Sin embargo, nanopartículas cargadas de manera negativa, también pueden presentar una internalización eficiente, luego de los procesos de adsorción o por ligando adheridos a su superficie [28].

La velocidad de difusión de los fármacos desde las matrices, junto con su incompatibilidad son, probablemente, los criterios más importantes a la hora de elegir o desarrollar una determinada matriz [22]. Los polímeros naturales que se usan incluyen quitosano, gelatina y alginato de sodio [29]. Algunos ejemplos de sustancias activas encapsuladas formuladas con nanomateriales poliméricos, son principalmente contra el cáncer como la adriamicina [30], paclitaxel [31] y la doxorubicina [32,33], o proteínas y moléculas anti-sentido para la terapia génica [34,35].

1.5. Nanopartículas de oro para la entrega temporalmente controlada

Las NPs de oro (AuNp) han emergido como un atractivo candidato para la entrega de fármacos. Al ser tan pequeñas tienen la propiedad de difundir a través de barreras biológicas, pudiendo llegar al sitio de interés [36] y su uso incluye diversas formas como nanoesferas (NE) y nanovarillas (NV). Por otra parte, las AuNp presentan resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), por efecto de la interacción de la luz con los electrones en la superficie de la nanopartículas [37]. El plasmón superficial hace que la partícula pueda absorber y disipar la luz de manera muy eficiente en ciertas longitudes de onda; lo que también es responsable de las distintas coloraciones de estas dispersiones de acuerdo al tamaño de partícula. Además, presentan un efecto fototérmico que está asociado a que parte de la luz absorbida se disipe como calor localizado (**Figura.1**) [38,39].

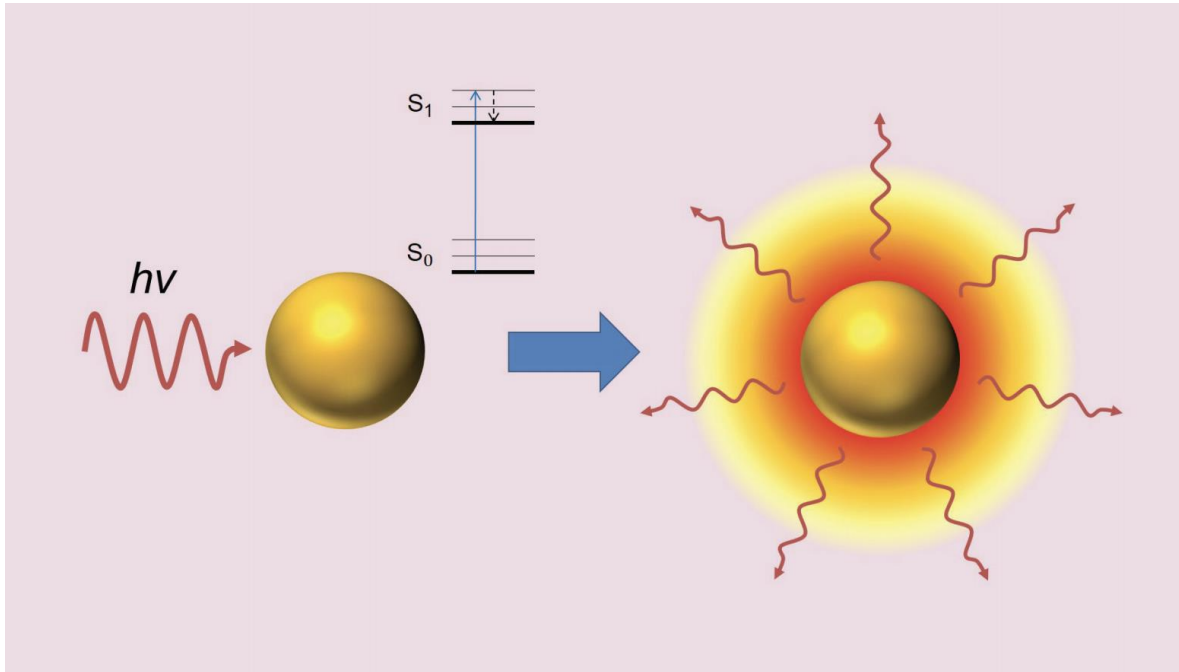


Fig 1. Resonancia de plasmón superficial localizada

Las AuNp pueden emplearse para la liberación temporalmente controlada de fármacos mediante la aplicación de radiación electromagnética. Pueden distinguirse cuatro escenarios principales a nivel farmacéutico en que se ha empleado el efecto fototérmico para activar la liberación de fármacos desde nanopartículas: i) el fármaco está embebido en una matriz polimérica que rodea a la nanopartículas, y el calor local cambia la estructura del polímero, lo que permite la liberación del fármaco, ii) el fármaco y la nanopartículas se encuentran embebidos en liposomas que son desorganizados por el calor local, facilitando la liberación del fármaco, iii) el fármaco está unido covalentemente a una molécula espaciadora que está unido a la nanopartículas, y el calor local provoca la ruptura de la unión liberando así el fármaco, iv) similar al caso anterior, pero el fármaco no está covalentemente unido a la superficie de las nanopartículas de oro, sino por lo general incrustado en una matriz de sílice, y el calentamiento local facilita la liberación del fármaco [39].

La clase de estímulo externo para el efecto fototérmico, corresponde a luz infrarroja cercana (650-900nm, NIR) que exhibe una máxima penetración de los tejidos debido a la mínima absorción óptica por los componentes fisiológicos como la

hemoglobina (<650 nm) y agua (> 900 nm). De este modo el tratamiento bajo la radiación infrarroja cercana (NIR) podría lograr un buen rendimiento sin efectos secundarios [40].

Una forma de aumentar la eficiencia de AuNp para la liberación de fármacos es a través de incorporación de una corona termo-sensible de polímeros biocompatibles tales como poli (ácido láctico- co-glicólico) (PLGA), polietilenglicol (PEG) y otros [41]. El uso de este tipo de polímeros permite ampliar el campo de aplicaciones de AuNp. Como ejemplo, se sintetizó AuNp con una corona termosensible de poli (glicol de etileno)-b-poli (N-vinilcaprolactama) (PEG-B-PNVCL), se aplicó la irradiación con láser (802nm, 805nm), la potencia de irradiación también se exploró mediante pruebas a diferente potencias de láser: 50, 100, 150, 200 y 250 mV. Esto generó un calentamiento interno, y se indujo la transición de fase del polímero con liberación de la molécula de fármaco pre-cargado. Estos resultados evidencian la dependencia de concentración y potencia de irradiación dependiente de la radiación infrarroja cercana inducida, como también la dependencia del calentamiento sobre la morfología de las AuNp [42].

1.6 Enfermedades cardiovasculares (ECV)

Las ECV son la primera causa de muerte en todo el mundo y corresponden a un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos que comprende: la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad cerebro vascular, la hipertensión arterial, la enfermedad vascular periférica, la cardiopatía reumática, la cardiopatía congénita, y la falla cardíaca [43]. La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre los factores de riesgo, como el consumo de tabaco, malnutrición, obesidad, inactividad física, hipertensión arterial (HTA), diabetes, entre otros.

1.8 Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca (HC) es uno de los procesos que ocurren en el remodelamiento cardíaco patológico presente en las enfermedades CV. La HC se

define macroscópicamente como un incremento del grosor de la pared y/o septo interventricular [44]. A nivel celular y bioquímico, un corazón hipertrófico se caracteriza por un incremento del tamaño de los cardiomiocitos, expresión de genes silentes en la etapa adulta pero activos en la etapa fetal, mayor número de sarcómeros y aumento de la síntesis proteica total y de proteínas contráctiles [45].

El estrés biomecánico estimula el desarrollo de HC del miocardio, y puede producirse por dos tipos de factores: estiramiento mecánico o liberación de factores neurohumorales con un incremento en la síntesis de proteínas cardíacas [46,47]. Estudios realizados en modelos animales con HC patológica han demostrado que mayores niveles de noradrenalina, Ang II, endotelina (ET), entre otros, producen HC [48,49].

En la fase inicial de la HC, crecen los cardiomiocitos en longitud y/o ancho, aumenta la función cardíaca disminuyendo la tensión de la pared ventricular, lo que se define como HC compensatoria [50,51]. Se constituye por tanto una respuesta adaptativa del corazón a una variedad de estímulos intrínsecos y extrínsecos, que normaliza transitoriamente el estrés biomecánico y optimiza la función de la bomba cardíaca [52,53]. Finalmente, la mantención del estrés biomecánico conduce a HC patológica [54].

1.9 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

En la etiología de la HC se ha identificado como determinante la mayor activación del sistema renina-angiotensina (SRA), [55-57] específicamente la vía clásica con mayor actividad de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) y mayores niveles circulantes de Ang II.

El SRA responde a un conjunto de péptidos vasoactivos, que se compone de dos ejes con acciones opuestas (**Figura 2**). La cascada del SRA se inicia con la acción de la renina sobre el angiotensinógeno circulante de origen hepático produciendo Ang I que es transformada al octapéptido biológicamente activo Ang II, por acción de la ECA [58-60]. La Ang II ejerce su acción en células blanco a través de

receptores acoplados a proteína G, subtipos 1 y 2 (AT1 y AT2, respectivamente). Al unirse a su receptor AT1, la Ang II activa las vías de señalización que desencadenan cambios celulares, no celulares y funcionales en los distintos tejidos blanco como corazón y vasos, entre otros [61].

La vía paralela del SRA iniciada por la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2), [62] metaloproteasa con considerable grado de homología a ECA [63,64] compite con la ECA por la hidrólisis de Ang I para formar Ang-(1-9) [64]. Además, ECA2 puede hidrolizar Ang II y producir Ang-(1-7) [65].

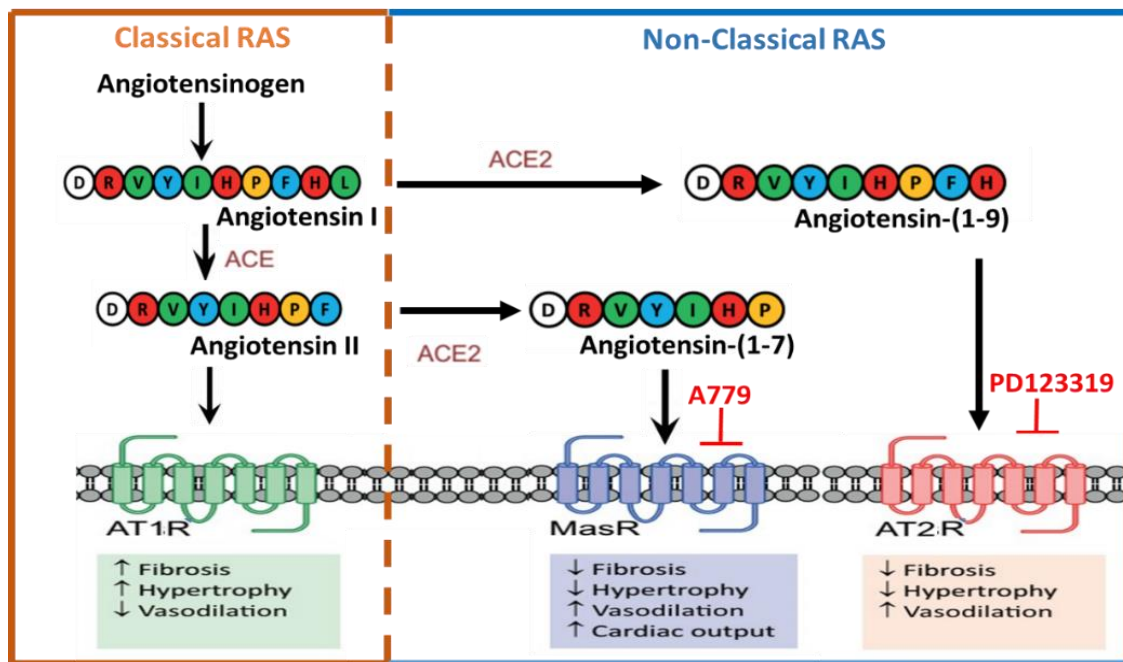


Fig 2. Sistema Renina Angiotensina clásico y no clásico

1.10 Tratamiento de la hipertrofia cardíaca y limitaciones de la terapia actual

Actualmente la farmacología para el tratamiento de la HC se basa ya sea en el bloqueo del tono simpático (β - bloqueadores), los diuréticos tiazídicos o tiazidas que producen natriuresis [66,67], los bloqueadores de canales de calcio y los bloqueadores del SRA que actúan en el eje renina angiotensina aldosterona (RAA):

antirenininas, inhibidores de la ECA y bloqueadores del receptor tipo 1 de Ang II (RAT1). Este último grupo indicado en el tratamiento de la HTA esencial o asociada a nefropatía diabética, infarto agudo al miocardio (IAM) e insuficiencia cardiaca (IC) [68].

De estos fármacos antihipertensivos, se reporta en el meta-análisis de Klingbeil, Arnfried U et al., que ninguno de ellos muestra eficacia en el tratamiento de la hipertrofia ventricular izquierda y en el mejor de los casos los antagonistas del receptor de Ang II logran disminuir solo en un 13%, mientras un 11% con antagonistas del calcio, un 10% con inhibidores de IECA, 8% con diuréticos y 6% con β - bloqueadores la hipertrofia ventricular izquierda [69,70].

Por estos motivos uno de los desafíos actuales es el manejo de la HC, para prevenir el remodelado CV patológico. Para esto, la inhibición de la vía clásica del SRA y/o favorecer vía paralela del SRA, específicamente aumentando los niveles terapéuticos de Ang-(1-9) podrían constituir una nueva forma de tratar la HC.

1.11 Angiotensina-(1-9)

Ang-(1-9) corresponde a un péptido derivado Ang I obtenido por proteólisis y es un intermediario relativamente más estable que luego es escindido por la ECA a Ang-(1-7) [71], péptido vasodilatador que contrarresta el efecto vasopresor de la Ang II.

Ang(1-9) está presente en plasma humano y de rata en rangos de concentración de 2 a 6 fmoles/mL [72, 73]. Su nivel circulante se incrementa en el remodelado temprano post infarto agudo al miocardio (IAM) en animales [72]. Además, la administración de Ang- (1–9) durante 2 semanas posterior a un IAM evita el desarrollo de hipertrofia cardiomiocitaria *in vivo* [74].

El último reporte que ha sido recientemente publicado corresponde a un estudio piloto en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda que evidenció que los pacientes que presentaban altos niveles de Ang-(1-9) sobrevivieron a la enfermedad, versus pacientes con bajos niveles plasmáticos, además del posible

rol como biomarcador de Ang-(1-9) en la prognosis de la enfermedad de dificultad respiratoria [75].

1.12 Angiotensina-(1-9) en la hipertrofia cardiaca

En relación a su actividad biológica, estudios en ratas infartadas y en cardiomiocitos estimulados con norepinefrina (NE) muestran que Ang-(1-9) previene la HC *in vitro* e *in vivo*. El efecto anti-hipertrofico de Ang-(1-9) no es mediado por el receptor asociado a proteína G (GPCR) Mas y tampoco se asocia a incremento en los niveles de Ang-(1-7) [74]. Además, se ha observado una disminución significativa de los niveles de Ang-(1-9) y ECA2 en la pared aórtica de animales con HTA y remodelado cardiovascular hipertensivo [76].

Resultados recientes han mostrado que el tratamiento con Ang-(1-9) a ratas hipertensas por infusión de Ang II, o por coartación de la arteria renal (modelo Goldblatt) disminuye la presión arterial sistólica (PAS), disminuye el RCV, mejora la función CV de animales hipertensos y disminuye los niveles de Ang II, estrés oxidativo CV y la actividad de la ECA. Por otra parte, Ang-(1-9) vasodilata anillos de aorta pre-contraídos con NE de manera dosis –dependiente, efecto que es revertido por la disminución de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Todos estos efectos son mediados por el receptor AT2. Los bajos niveles de Ang-(1-9) en modelos experimentales de hipertensión (Goldblatt e infusión de Ang II), junto con el efecto antihipertensivo de Ang-(1-9) sugieren que Ang-(1-9) se constituye como nuevo blanco para el tratamiento de la HTA. Estos hallazgos junto con que Ang-(1-9) es parte de un eje opuesto al SRA clásico, apoyan el concepto que este péptido disminuye eficazmente el RCV [77].

Uno de los inconvenientes que presenta Ang-(1-9) es su reducida vida media, lo que justifica el desarrollo de un vehículo/vector que proporcione una mayor estabilidad a este péptido. Además de incorporar en el vehículo/vector nanopartículas de oro, de manera de proteger el péptido y gatillar la liberación por efecto de plasmón, precisamente hasta el momento y lugar de acción. El diseño

farmacéutico que contenga Ang-(1-9) debería mantener y/o mejorar las propiedades bioactivas de Ang-(1-9) en el tratamiento del RCV. Todo esto, con el objetivo de elevar los niveles circulantes y/o en tejido del péptido Ang-(1-9).

2. HIPÓTESIS

"La incorporación de angiotensina-(1-9) con nanoesferas de oro en un sistema polimérico nanoestructurado, permite su liberación temporalmente controlada con efecto cardioprotector en la hipertrofia cardiomiocitaria".

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Producir la liberación sostenida de angiotensina-(1-9) mediante una formulación nanoparticulada con efecto cardioprotector en la hipertrofia cardiomiocitaria.

3.2 Objetivo Específicos

Objetivo específico 1

Desarrollar y caracterizar la nanoestructura que contiene Angiotensina-(1-9) y AuNE.

Objetivo específico 2

Determinar *in vitro* la estabilidad y liberación de Angiotensina-(1-9) desde pNPs híbridas de EE/alginate con AuNE.

Objetivo específico 3

Determinar eficacia anti-hipertrófica *in vitro* del sistema nanoparticulado híbrido EE/alginate/Ang-(1-9)/AuNE de aquí en adelante pNPs, en cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonata sometido a estímulo con norepinefrina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Los reactivos copolímero de metacrilato de dimetilaminoetilo Eudragit E (EE), fue donado por Industrias Evonik (Germany). Alginato de bajo peso molecular (Alg), lizozima de clara de huevo de gallina y *Micrococcus lysodeikticus*, suero fetal bovino (FBS), soluciones de 1x trypsin–EDTA, penicilina-streptomocina, medio Hank's, medio DME, medio 199, pancreatina, gelatina, triton X-100, 5- bromo-2'-deoxiuridina, H₂AuCl₄, bromuro de cetiltrimetilamonio, borhidruro de sodio, ácido ascórbico y filtros de jeringa 0,22 µm, fueron comprados en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Todos los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. La albúmina de suero bovino (BSA) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpintería, CA, EEUU).

El agua bidestilada usada para todos los experimentos fue producida en el laboratorio (Milli-Q- Directed; Millipore, SAS- 67120, Molsheim, France).

SnakeSkin™ 3.5K MWCO Dialysis Tubing, Hyclone Penicilin-Streptomycin solution (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA).

Los reactivos CellTiter 96® Aqueous ensayo de proliferación celular no radioactivo y CytoTox 96® ensayo de citotoxicidad no radioactivo se adquirieron en Promega (Madison, WI, USA). Las células HeLa (American Type Culture Collection CCL-2) células derivadas de carcinoma cervical y tubos de centrifuga con filtros de Amicon Ultra-4 Ultracel-100k se compró en Merck Millipore (Ireland, Cork). En BD Biosciences Pharmigen (San Diego, CA, EEUU) se adquirió el kit de detección de muerte celular por Anexina V.

4.6 Formulación y desarrollo de nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se fabricaron mediante coacervación de soluciones acuosas de EE (policación) y alginato acuoso (polianión). La solución de polianión se añadió sobre la solución de policación bajo condiciones controladas de pH (4.8), a temperatura ambiente 25°C y con agitación vigorosa. La formación de pNPs es impulsada por las interacciones electrostáticas entre los polímeros catiónicos y amónicos bajo concentraciones y condiciones de mezcla controladas [18].

Las cantidades y relación de los polímeros mezclados se determinaron mediante la cuantificación de las contribuciones de carga de cada polímero en función de la masa utilizada y la densidad de carga del monómero. La relación de carga (RC) se definió como el cociente de cargas positivas y negativas, mientras que la suma de las cargas positivas y negativas se definió como carga total (CT) y se calcularon de la siguiente manera:

$$RC = \frac{carga_{EE} (\mu mol)}{carga_{Alg} (\mu mol)}$$

Ecuación 1

$$CT = carga_{EE} (\mu mol) + carga_{Alg} (\mu mol)$$

Ecuación 2

Donde la carga_{EE} es la cantidad total de cargas positivas aportadas por EE (en μmol) y carga_{Alg} es la cantidad total de cargas negativas contribuidas por Alg (en μmol) [22].

Se evaluaron varias combinaciones de RC y CT para encontrar las condiciones óptimas que permitan la formación de nanopartículas.

4.7 Caracterización fisicoquímica de las NPs

Los parámetros fisicoquímicos del tamaño promedio de las NPs, las distribuciones de tamaño y la polidispersidad se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz y el potencial zeta se determinó mediante electroforesis Doppler micro láser usando un Malvern NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El tamaño promedio de las NPs se determinó calculando el diámetro a partir de la función acumulativa de la intensidad de dispersión de la luz por las NPs en triplicado. Una alícuota de 1,0 mL de muestra fue colocada en una cubeta plástica de 1 cm de paso óptico (clear disposable zeta cell), para luego ser analizada. La medición fue realizada con un control preciso de la temperatura a 25°C o de acuerdo con el estudio. Los análisis de los datos obtenidos, se llevaron a cabo usando una versión del programa Zetasizer facilitado por Malvern Instruments, England.

4.8 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro: nanoesferas de oro

Existen numerosos protocolos de obtención de nanopartículas de oro dependiendo del tamaño y la forma que se pretenda obtener. Se sintetizaron nanoesferas de oro (NE de oro), utilizando síntesis química mediante reducción de una sal áurica (AuCl_4^-) con citrato de sodio en presencia de calor, descrito inicialmente por Turkevich y cols [78]. Para esto, una solución de 100 mL de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4 , 1 mM) se depositó en un balón de dos cuellos de 250 mL. El balón se dejó sobre un manto calefactor y se calentó a reflujo constante por unos 5 a 10 minutos. Posteriormente, se agregó rápidamente por el cuello lateral del balón una solución de citrato de sodio dihidratado (38.8 mM) calentada previamente por baño maría a 50-60 °C. La mezcla se dejó con agitación constante, manteniendo el reflujo durante 30 minutos exactos desde que se agregó el citrato. La solución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, las nanopartículas obtenidas fueron filtradas con un filtro de PVDF (0.45 μm) y almacenadas a 4°C. Este método de síntesis sigue siendo uno de los métodos más utilizados para obtener AuNE homogéneas en cuanto a tamaño y forma.

Para caracterizarlas, se determinó su distribución de tamaño e índice de polidispersidad (PDI), mediante DLS. Se midió el potencial zeta mediante la técnica de LDA. En ambos casos, se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS y una celda capilar plegada desechable, las mediciones se realizaron por triplicado.

4.10 Espectrofotometría de absorción molecular

Para observar las bandas características de absorción plasmónica superficial de las AuNE y su correlación con tamaño, se llevó a cabo una caracterización mediante espectrofotometría de absorción UV-Visible. El espectro de absorción UV-Vis de las AuNE fue obtenido a temperatura ambiente, con un espectrómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV/Vis. Se realizó un barrido entre 400 y 800 nm, utilizando cubetas de plástico desechable de 1 cm de paso óptico y empleándose citrato de sodio 1,2 mM como blanco en el espectrofotómetro de doble haz.

4.11 Formulación y caracterización de pNPs EE/alginato cargadas con lisozima

Las nanopartículas poliméricas cargadas con lisozima se fabricaron mediante coacervación de soluciones acuosas de EE (policación) y alginato acuoso (polianión). La solución de polianión y lisozima se añadió sobre la solución de policación bajo condiciones controladas de pH (4.8), a temperatura de 25°C y bajo agitación vigorosa de 600 rpm por 25 minutos, (**Figura 3**). La formación de pNPs es impulsada por las interacciones electrostáticas entre los polímeros catiónicos y amónicos bajo concentraciones controladas y condiciones de mezcla.

La caracterización del tamaño, PDI y PZ de las pNPs híbridas, se realizó mediante DLS.

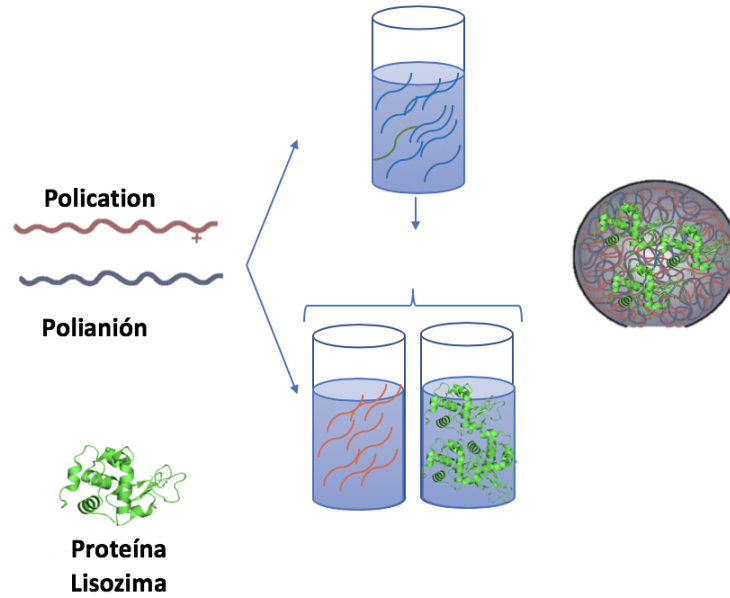


Fig 3. Representación esquemática de la formación de pNPs de EE/Alg cargadas con lisozima.

4.12 Formulación y caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con Ang-(1-9)/AuNE de oro

Para la elaboración de las pNPs EE/Alg cargadas con Ang-(1-9) y AuNE, también llamadas nanopartículas poliméricas híbridas se utilizó el método de la coacervación compleja que consiste en la mezcla de soluciones acuosas del polication (EE Eudragit) y el polianión (alginato) a concentraciones de 1% m/v, adicionando alginato (polianión) y las nanoesferas de oro sobre EE (polication) y Ang-(1-9) como se aprecia (**Figura 4**) en condiciones controladas de pH (~4,8) y a temperatura de 25 °C, aplicando agitación vigorosa de 600 rpm por 25 minutos.

La caracterización del tamaño, PDI y PZ de las pNPs híbridas, se realizó mediante DLS.

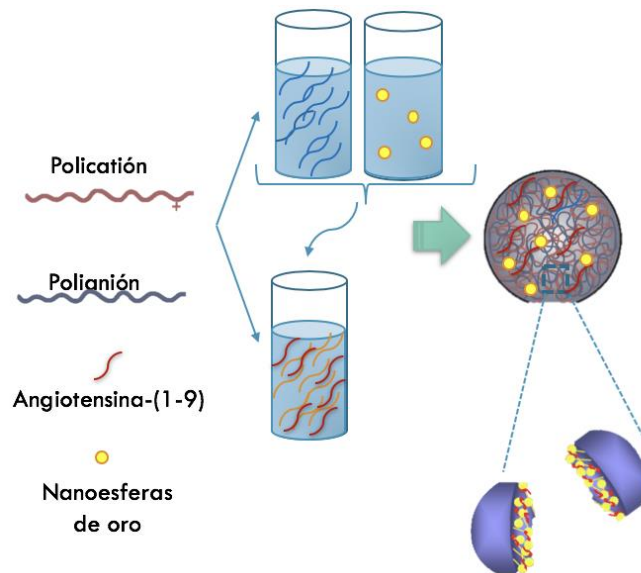


Fig 4. Representación esquemática de la formación de pNPs híbridas de EE/alginato/Ang-(1-9)/AuNE

4.13 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las formulaciones de NPs seleccionadas se liofilizaron, luego se colocaron sobre superficie de montaje SEM, previamente la superficie de montaje fue cubierta con una capa de adhesivo de carbono. Las muestras de NPs se recubrieron por pulverización con oro paladio hasta un espesor de 10 a 12 nm durante 7 minutos a máximo voltaje de 5 kV en un evaporador de alto vacío (108 Auto, Cressington Scientific Instruments Ltd, Watford, Reino Unido). Posteriormente las muestras se analizaron mediante SEM en un Inspector F50 (FEI, Hillsboro, OR, EE. UU.).

4.14 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Esta técnica se ha descrito para estudiar morfología y homogeneidad del tamaño de las nanopartículas, usando un microscopio electrónico de barrido con módulo de transmisión electrónica (STEM) FEI Inspect F50. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de una suspensión de nanopartículas (17 μ L) sobre grillas de cobre 200 mesh recubiertas con polímero formvar carbón y dejadas secar por al menos 30 minutos. Se retiró el exceso con papel filtro y se procedió a adicionar 1

gota de ácido fosfotúngstico 1% por 1 minuto y se dejó secando 24 horas a temperatura ambiente. La muestra se observó por TEM en un microscopio FEI Inspect F-50 empleando una aceleración de los electrones desde 120 keV.

Para obtener datos poblacionales se midieron 100 partículas empleando el programa ImageJ representándose los datos como histogramas de frecuencia versus relación de aspecto.

4.15 Estudio de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de FT-IR se tomaron en un espectrómetro Interspec 200-X FT-IR para investigar la posible interacción entre las pNPs de EE/alginato vacías y las cargadas de lisozima (EE/alginato Lys). En resumen, 2 mg de las muestras en polvo se mezclaron suavemente con KBr (en una proporción de 1:10) de manera de obtener pellets utilizando una prensa hidráulica. Los espectros FT-IR se escanearon en el rango de 4000 y 500 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . Todos los datos se recopilaron y extrajeron utilizando el software Essential FTIR® Spectroscopy Toolbox.

4.16 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Un NS300 NanoSight (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) equipado con un NS300.

Todas las muestras se diluyeron 1:100 a una concentración apropiada utilizando agua bidestilada filtrada antes del análisis. Además, se analizó el medio de dilución en busca de partículas antes de diluir las muestras. Cada análisis se realizó por triplicado para cada muestra, lo que dio como resultado capturas de video por muestra a cada velocidad de flujo. La luz dispersada de las partículas fue capturada por una cámara sCMOS. Todas las mediciones se realizaron a 25°C. El tamaño promedio, concentración y los valores desviación estándar obtenidos por el software NTA corresponden a los valores aritméticos calculados con todas las partículas analizadas por el software.

4.17 Determinación de la eficiencia de asociación por HPLC de fase reversa

La eficiencia de asociación (EA) se determinó indirectamente cuantificando Ang-(1-9) o proteína (lisozima) en el sobrenadante después de la separación por centrifugación de las pNPs y péptido/proteína no encapsulada (13.000 rpm, 20° C durante 30 min). La siguiente ecuación se utilizó para determinar EA:

$$EA (\%) = \frac{(\text{masa cargada en el inicio formulación} - \text{masa en sobrenadante})}{\text{cargada en inicio formulación}} \times 100$$

Ecuación 3

El contenido de péptido/proteína en las pNPs se cuantificó mediante un método validado de HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Se disolvió un peso conocido de sólido seco en suficiente tampón fosfato de pH 7,0 y se filtró una alícuota de 500 µl finalmente se almacenó en viales para la cuantificación por HPLC.

El contenido ya sea péptido/proteína de las muestras se determinó mediante HPLC (Flexar Perkin Elmer, EE. UU), utilizando una columna Symmetry 300 C18 (3.5 µ 4.6 x 150 mm).

La fase móvil para lisozima consistió en un gradiente compuesto de 90% solvente A (agua mili-Q, 5% v/v de acetonitrilo y 0.1% v/v de ácido trifluoroacético) y 10% solvente B (acetonitrilo, 5% v/v de agua y 0.085% v/v de ácido trifluoroacético). La fase móvil descrita consistió de una gradiente de 60% v/v solvente B en 16 minutos y luego nuevamente 10% v/v de solvente B en 4 minutos. El flujo se ajustó a 1 ml/min, la temperatura se mantuvo constante a 25°C y el volumen de inyección fue de 50 µL. El límite de cuantificación fue determinado a 12,5 µg/mL a 215 nm. Tiempo de retención 14,2 minutos.

La fase móvil para Ang-(1-9) consistió en un gradiente compuesto de solvente A (0.1% v/v de ácido trifluoroacético en 100% de acetonitrilo) y solvente B (0.1% de ácido trifluoroacético en 100% de agua mili-Q). La fase móvil descrita consistió inicialmente de 90% de solvente B y 10% de solvente A. Luego 70% solvente A y 30% solvente B durante 15 minutos. Para nuevamente subir a 100% solvente A por

20 minutos. El flujo se ajustó a 1 ml/min, la temperatura se mantuvo constante a 25°C y el volumen de inyección fue de 50 µL. El límite de cuantificación fue determinado a 12,5 µg/mL a 220 nm. Tiempo de retención 13 minutos. El método de HPLC se validó con respecto a la linealidad, la repetibilidad, el límite de cuantificación y límites de detección.

4.18 Estabilidad coloidal de pNPs de EE/Alg vacías y cargadas con lisozima

Formulaciones seleccionadas de pNPs vacías y cargadas con lisozima se fabricaron y se evaluó su estabilidad. Para ello, las nanopartículas recién preparadas se dispusieron en viales de vidrio borosilicato, previamente fueron filtradas con filtros de jeringa de 0.22 µm y se almacenaron a temperatura ambiente (15° a 25°C) y 37°C (humedad relativa del 75%). A determinados tiempos, se tomó una alícuota de 1 mL de las nanopartículas se dispusieron en las celdas de medición para determinar la distribución de tamaño, potencial Z y polidispersidad de los nanosistema mediante la técnica DLS usando Malvern NanoZS.

4.19 Estabilidad coloidal de las pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE en diferentes medios de relevancia

Se evaluó la influencia de las propiedades fisicoquímicas de las pNPs híbridas cuando interactúan con los componentes presentes en diferentes medios tampón fosfato pH 7.4 (PBS), DMEM suplementado con 10% FBS y plasma, incubadas a temperatura 25°C y 37° C por tiempos de 0, 15, 60 y 120 minutos. Para ello pNPs híbridas recién fabricadas fueron diluidas en H₂O miliQ , a partir de esta dilución se tomó 1 mL y se incubó en 500 uL de los diferentes medios y condiciones descritas para finalmente obtener una concentración de 34,4 ug/mL que corresponde a la máxima concentración evaluada de pNPs híbridas con buen perfil de seguridad. Las pNPs híbridas fueron sonicadas durante 25 minutos y el promedio de tamaño,

potencial Z y polidispersión se determinó para todos los experimentos en triplicado, utilizándose H₂O ultra pura como control negativo.

4.20 Estudio de liberación *in vitro* de lisozima

Las pNPs una vez que son fabricadas fueron separadas por centrifugación y luego se resuspendieron en 30 mL de medio de disolución (agua miliQ). El estudio de liberación se ajustó a temperatura de 37°C, con agitación constante, y se tomaron muestras (300 µL) en tiempos específicos durante 72 horas para ser cuantificados mediante HPLC UV-Vis a 280 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de incremento de la concentración lisozima, como sigue:

$$lisozima \% = \frac{[Lisozima]_{T_n} * 100}{[Lisozima]_{T_x}}$$

Ecuación 4

Donde T_n es la muestra de lisozima a diferentes tiempos y T_x es el total de lisozima que puede ser liberada, respectivamente.

4.21 Estudio liberación *in vitro* de Ang-(1-9)

Las pNPs una vez fabricadas se dispusieron en una membrana de diálisis con peso molecular de corte 3.500 g/mol. Experimentalmente, se depositó 1 mL de formulación EE/alginato/Ang-(1-9) dentro de bolsas de diálisis. Posteriormente se sumergió en 30 mL de buffer fosfato pH 7,4 a 37°C y 100 rpm. Se extrajeron alícuotas de 1 mL cada 1 hora hasta transcurridas 7 horas de tiempo, y luego a 24 y 48 horas. Finalmente se cuantifico por HPLC en un Flexar, Perkin Elmer.

4.22 Prueba de liberación *in vitro* de Ang-(1-9) mediada por irradiación

Las pNPs de EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE una vez fabricadas se dispusieron en una membrana de diálisis con peso molecular de corte 3.500 g/mol la cual permite el paso de Ang-(1-9) y fue adaptada como bolsa para contener 1 mL de la solución de pNPs híbridas. Esta bolsa fue dispuesta dentro de una cubeta de policarbonato

desechable de volumen 50 mL, con un volumen de buffer PBS de 30 mL como medio de liberación, se muestra (**Figura 5**). La temperatura fue ajustada a 37°C, para lograr esta temperatura, se calentó el agua del baño termostático B-491 (Büchi) hasta 40°C y se mantuvo constante durante el ensayo con un termómetro de inmersión (**Figura 6**).

Para irradiar la muestra se utilizó el láser modelo LDCU5/9020 (Power Technology) que emite un haz de luz con una longitud de onda de 532 nm y una potencia aproximada de 2 mW, el que se colocó a una distancia de 30 cm de la cubeta (**Figura 7**). La irradiación láser fue continua durante 1 hora y se fueron obteniendo 200 uL desde el medio de liberación durante 9 tiempos de muestreo, estos fueron: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutos. Finalmente se cuantificó por HPLC en un Flexar, Perkin Elmer.

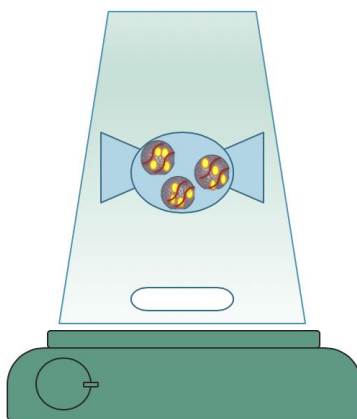


Fig 5. Representación esquemática de la cubeta de polycarbonato conteniendo la bolsa de membrana de diálisis en que se irradiaron las pNPs híbridas



Fig 6. Fotografía que representa el sistema de liberación e irradiación de las pNPs híbridas

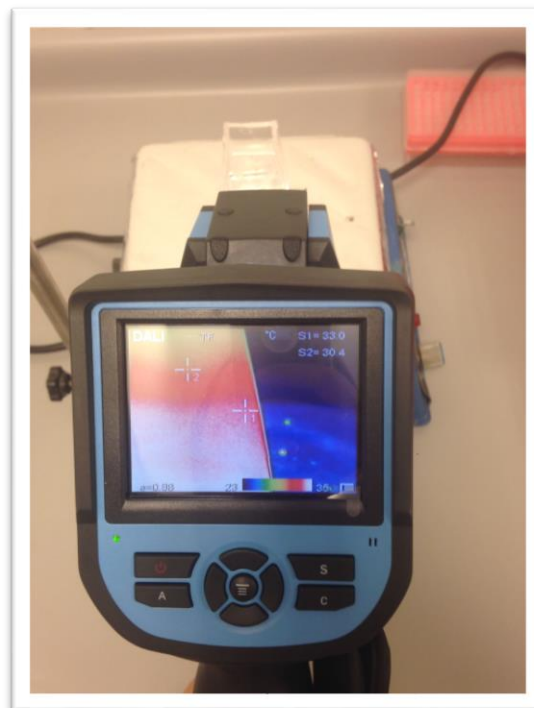


Fig 7. Fotografía del sistema dispuesto para la irradiación de las pNPs híbridas y la determinación de la temperatura generada por el láser.

4.2 Modelo experimental

Para la ejecución de esta tesis se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas, los cuales se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for The Use of Laboratory Animals (NIH, Publication No. 85-23, revised 1996), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

4.3 Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones de ratas neonatas se removieron y lavaron en medio Hank's estéril a 37 °C. Las aurículas se eliminaron y los ventrículos se disgregaron mecánicamente para ser sometidos a digestiones enzimáticas sucesivas con colagenasa tipo II (0,02 gr/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 gr/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los dos tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión enzimática se pre-plaqueó en placas de 100 mm durante 2 h a 37 °C en medio DME:M199 (4:1) (Medio de mantención, MM) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendieron en 20 mL de MM 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el cual permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer. Conocida su concentración, los cardiomiocitos se sembraron en MM 5% FBS-10% FCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5- bromo-2'-deoxiuridina 100 µM, sobre placas de cultivo cubiertas previamente con una monocapa de gelatina (2% p/v). Las células se mantuvieron en incubadoras termorreguladas a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% aire.

Luego de aproximadamente 24 h las células se lavaron para retirar los residuos propios del cultivo primario y se mantuvieron en MM 5% FBS al menos por 24 h antes de exponerlos a cualquier estímulo.

4.4 Ensayos de seguridad:

4.4.1 Modelos y cultivo celular en seguridad

Se realizaron ensayos de seguridad de las nanopartículas en células HeLa y cardiomiocitos de rata neonata mantenidos en medio DMEM alto en glucosa suplementado con FBS al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL en una atmósfera de aire al 95% y CO₂ al 5% a 37 ° C.

4.4.2 Cultivo celular HeLa

Para los experimentos de seguridad, se utilizaron células HeLa provenientes de ATCC entre los pasajes 10 y 30. Estas se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% FBS en un incubador a 37°C y atmósfera húmeda con 5% CO₂. La manipulación de las células se realizó en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en placas de 10 cm para permitir su proliferación. Tras alcanzar una confluencia del 90%, las células se desprendieron de la placa para su posterior utilización. Para ello, el medio de cultivo se removió por aspiración y la placa se lavó dos veces con 1 mL de tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS). Luego, la placa se trató con 1 mL de solución de tripsina/EDTA entre 5 y 10 min a 37°C. La tripsinización se detuvo añadiendo 5 mL de medio fresco. Distintas porciones de la suspensión celular se sembraron en nuevas placas, de acuerdo con el experimento, y otra porción se sembró nuevamente a baja confluencia en placa de 10 cm, para continuar con la proliferación celular.

4.4.3 Ensayo de MTS

El ensayo de proliferación celular MTS se usa rutinariamente para determinar la viabilidad celular basado en el metabolismo celular después de la exposición a nanopartículas. Experimentalmente las células ya sea HeLa o cardiomiocitos se sembraron a una densidad de 20×10^3 células/pocillo durante la noche y se trataron con seleccionados controles y estímulos, para lo cual fueron diluídos en el medio de cultivo en las concentraciones deseadas de pNPs para así determinar los efectos en la viabilidad celular. Se utilizaron DMEM/FBS al 10% (Dulbecco's Modified Eagle's Medium /suero fetal bovino) como control de vida, SDS al 10% (dodecilsulfato sódico) como control de muerte y vehículo (agua mili-Q) a 37°C y 5% CO₂. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos por triplicado a tiempos determinados y luego se analizó con un lector de microplacas (BioTek's Synergy, Mx) a 450 y 490 nm. La viabilidad celular se calculó comparando las muestras con células incubadas en medio de cultivo normal con una tasa de supervivencia del 100% (control de vida). Cada muestra fue medida en triplicado y se obtuvieron promedios y desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.4.4 Ensayo de LDH

El ensayo Cytotox96 de Promega es un ensayo de citotoxicidad basado en colorimetría que mide cuantitativamente la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células dañadas. Las células se cultivaron y se trataron como se describe para el ensayo MTS. Después del período de incubación, las células no tratadas de 3 pocillos se lisaron con 10 µl de Triton-X100 al 10% en agua Millipore como control positivo. Después de 5 minutos de incubación, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 400 x g. El ensayo Cytotox96 se realizó como lo describe el fabricante y se midió a 490 nm. La citotoxicidad celular se calculó comparando las muestras con células incubadas con solución de lisis como 100% de liberación máxima de LDH.

4.4.5 Viabilidad celular por Citometría de flujo de Angiotensina-(1-9)

Para esto, se evaluó si la exposición a Ang-(1-9) afecta la viabilidad de los cardiomiocitos, por lo cual las células se trataron a distintos tiempos (24, 48 y 72h) con Ang-(1-9) a concentraciones de 1, 10, 100 nM y 1 μ M. Como control positivo de muerte se utilizó H₂O₂ 100 μ M por 24h.

Experimentalmente, fueron sembradas 3×10^6 millones de cardiomiocitos de ratas neonatas en placas de 12 pocillos. Luego de los tratamientos, se determinó el porcentaje de células vivas y muertas midiendo la incorporación de yoduro de propidio (PI) a las células por citometría de flujo. Esta técnica se basa en el hecho que las células no viables pierden integridad de membrana, permitiendo la marcación del ADN con PI.

4.4.6 Morfología de la interacción de las pNPs en línea celular HeLa

La morfología de las células incubadas con pNPs de EE/alginato se observaron con microscopio Nikon eclipse TE2000U (Tokio, Japón). Células HeLa a una densidad de 20×10^3 células/ml (sembradas en placas de 12 pocillos) se trataron con las suspensiones de vehículo (agua Mili Q) y pNPs de EE/alginato con PZ negativo y PZ positivo diluidas en medio de cultivo a concentraciones que van desde 0.06 a 1.5 μ M durante 1 y 24 h. Después de la incubación, se observó la morfología celular. El ensayo se realizó por triplicado. Se observaron cinco campos por muestra y se contaron 30 células por campo para evaluar los posibles daños o cambios en la morfología celular en términos de aumento del volumen celular, rugosidad e integridad de la membrana, entre otros.

4.5 Ensayos de eficacia en cardiomiocito de rata neonata:

4.5.1 Estímulo hipertrófico

Después de 24 h de sembrados 0.25×10^6 células por pocillo de cardiomiocitos de rata neonata, las células fueron lavadas 3 veces con PBS estéril mantenido a 37°C, para luego ser dejadas por 24 horas con medio DME:M199 (4:1) en ausencia de

suero fetal. Transcurrido este tiempo los cardiomiocitos se estimularon con norepinefrina 10 μ M por 24 horas.

4.5.2 Muestras para microscopía de epifluorescencia

Los cardiomiocitos de rata neonata se sembraron en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de 18 mm, a una confluencia del 80%. Tras de someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las células se lavaron 2 veces con PBS a 4°C, se fijaron con PBS 4% paraformaldehído por 30 min y se permeabilizaron con PBS 0,1% Tritón X-100 por 10 min. Posteriormente, las células se bloquearon con PBS 1% BSA durante 30 min, fueron teñidas con rodamina-faloidina 1:500 y Hoescht (1:1000) por 1 hora, para visualizar f-actina y núcleos respectivamente. Finalmente se lavaron nuevamente con PBS para ser mantenidos a 4 °C. Las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando medio de montaje DAKO.

4.5.3 Determinación de área, perímetro y sarcomerización del cardiomiocito

Esta técnica se utilizó para detectar hipertrofia de los cardiomiocitos. Los portaobjetos montados en DAKO con cardiomiocitos estimulados, se utilizaron para obtener las imágenes utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido Zeiss, Axio vert.A1 con iluminación colibrí y se analizaron con el software ImageJ.

4.5.4 Captura y procesamiento de imágenes

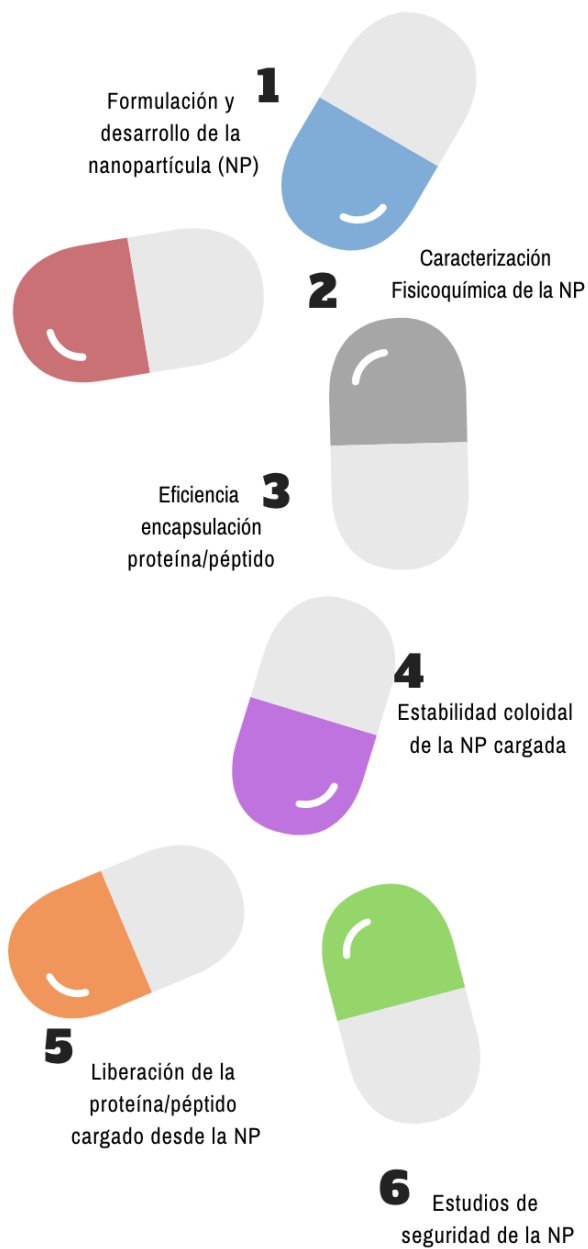
Las imágenes se obtuvieron utilizando microscopio de epifluorescencia invertido Zeiss, Axio vert. A1 con iluminación colibrí y captura de imágenes con aumento 63x procesadas con software Image J.

4.23 Tamaño muestral y análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Se realizaron 3 experimentos independientes para cada condición y se presenta una figura

representativa de cada experimento. Las comparaciones entre los grupos experimentales se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism versión 6 (La Jolla, CA, USA), utilizando ANOVA de una vía o de dos vías para más de dos grupos seguido por post-análisis Tukey, Dunnett o Bonferroni. El umbral de significación fue $p = 0.05$ y los valores de $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**) y < 0.001 (***) se consideraron con diferencia estadística significativa. Para los experimentos de caracterización físico química de las nanopartículas y seguridad, se proyectó una capacidad de diferencia del 20% con una desviación estándar convencional de la técnica del 10% y para un valor de $p = 0.05$ lo que resultó en tres replicados. Y para el estudio de eficacia en cultivo de cardiomiocito de rata neonata, se proyectó una capacidad de diferencia del 25% con una desviación estándar convencional de la técnica del 10% y para un valor $p = 0.05$ lo que resultó en tres replicados.

Fig 8. Esquema que representa los estudios realizados para dar respuesta al objetivo específico 1a de este trabajo de tesis.



5. RESULTADOS

5.1 Objetivo específico 1a. Desarrollar y caracterizar la nanoestructura polimérica cargada con proteína, modelo lisozima

Para dar respuesta al primer objetivo específico, se procedió en una primera etapa a seleccionar los polímeros candidatos para ser vehículos de Ang-(1-9). Para ello, se diseñaron, desarrollaron y evaluaron nanopartículas poliméricas utilizando el polication (polímero con carga positiva) Eudragit E, en combinación con el polianión (polímero con carga negativa) alginato. Estas nanopartículas poliméricas fueron cargadas con lisozima como un modelo de vehículo y fueron caracterizadas sus propiedades físico-químicas, eficiencia de encapsulación, estabilidad en distintos medios de relevancia y perfil de seguridad (**Figura 8**). Este trabajo fue publicado en marzo 2019 y permitió sentar las bases de un sistema nanoparticulado polimérico encapsulando lisozima como modelo de biológico con buenas características físico-químicas, una alta eficiencia de encapsulación y seguro como un efectivo y viable vehículo para aplicación de entrega de fármacos [79]. De esta manera, el estudio consecuente fue evaluar este sistema polimérico nanoparticulado seleccionado con nuestro péptido de interés de esta tesis.

5.1.1 Preparación de nanopartículas poliméricas por coacervación compleja

Para esto, se seleccionaron el alginato de sodio y un derivado de metacrilato (Eudragit EE). El alginato de sodio [80] es un polímero obtenido de las algas pardas, caracterizado por su alto peso molecular, su extensión de cadenas en función de la fuente de extracción y variedad de la especie, además de poder ser biodegradado [81].

La coacervación compleja como método de producción, necesita un polímero con carga contraria para que interactúe con el alginato. Es por esto, que decidimos

optar por el polímero Eudragit EE [82] de carga positiva, el cual en entorno neutro o alcalino se hincha, y por esto se utiliza convencionalmente como películas de revestimiento permeables al agua, que sufren una erosión lenta y posterior disolución dependiente de pH [83].

Razón de cargas y suma de cargas totales:

Razón de cargas (n+n-): la razón que hay entre los moles de carga positiva y negativas del polielectrolito utilizado. Ej.: Razón de carga EE/alginato.

Suma de cargas totales (n++n-): es el total de moles de cargas, tanto positivas como negativas de los polielectrolitos interactuando.

Se fabricaron nanopartículas poliméricas mediante la mezcla de soluciones acuosas del policatión (EE Eudragit) y el polianión alginato adicionando el polianión sobre el policatión en condiciones controladas de pH (~4,8) y a temperatura ambiente (Figura 9). Alginato tiene un pKa 3.21 por lo que a pH ~4.8 se encuentra totalmente desprotonado, carga negativa. Por otro lado Eudragit tiene pKa 10.0 por lo que al pH de ~4.8 pierde el protón después de 10 lo que confiere carga positiva. Por lo tanto se estima un balance de cargas por la relación 2:1 eudragita/alginato y por tanto carga neta muy cercana a 0. Las formulaciones evaluadas tenían razones de cargas eléctricas entre el policatión y el polianión (n+/n-) entre 0.5; 1.33 y 10.0 (Tabla 1), lo que permitió comparar el efecto del alginato y eudragit EE en los potenciales nanosistemas. Para controlar el número total de cargas, la suma de cargas totales (n+ + n-) se evaluó entre 10, 20 y 30 μmol . El método de coacervación compleja se utilizó con éxito para fabricar las diferentes combinaciones de nanopartículas de alginato/EE vacías y cargadas con Lys según correspondiera.

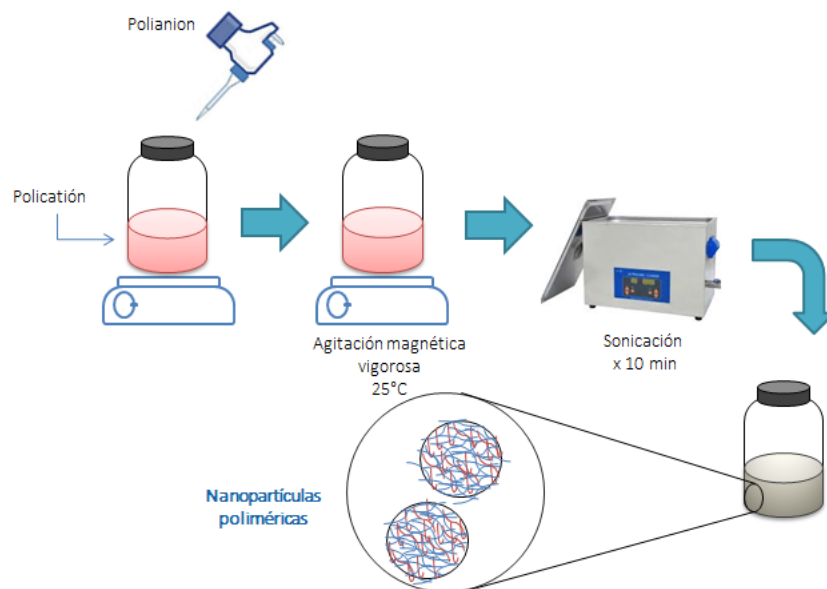


Fig 9. Diagrama del proceso de fabricación de pNPs EE/alginato y EE/ sulfobutil- β -ciclodextrina por coacervación compleja

5.1.2 Caracterización fisicoquímica de las pNPs: Tamaño, potencial Z (PZ) y polidispersión (PDI)

Las características de las nanopartículas vacías de EE/alginato y cargadas con Lys de EE/ alginato se resumen en la **(Tabla 1)**. Las nanopartículas muestran tamaños homogéneos, según lo determinado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Los tamaños de pNPs se distribuyeron principalmente en un rango estrecho de 94.1 ± 11.7 y 171.8 ± 4.7 nm para EE/alginato vacía en comparación con 112.1 ± 1.1 y 181.5 ± 1.1 nm para las nanopartículas de EE/alginato cargadas con Lys. No se observó influencia de la carga de Lys sobre el tamaño de las nanopartículas. Además, la distribución del tamaño fue estrecha, como lo muestra el PDI (de 0.100 a 0.321), lo que indica una dispersión homogénea tanto para las pNP vacías como para las cargadas con Lys.

El potencial zeta muestra un cambio de negativo a positivo después del punto de precipitación (1.0 RC), que está relacionado con el predominio de polímeros cargados por encima o por debajo de este punto. Los resultados del PZ muestran 2 tipos de nanopartículas. Las nanopartículas que contienen predominio de polianión

alginate con RC 0.5 mostraron un potencial zeta negativo y RC 1.33 y 10 el potencial zeta fue positivo, debido al predominio de polimerización EE.

Los mejores resultados en términos de tamaño y PDI fueron a RC de 0.5, 1.33 y 10 para CT 20 y 30 (**Tabla 1**). Por lo tanto, estas formulaciones se seleccionaron para incorporar la lisozima como modelo biológico y para los siguientes estudios de caracterización.

Formulación		Tamaño (nm)		PDI		PZ (mV)	
CT	RC	EE/Alginato vacía	EE/Alginato cargada lys	EE/Alginato vacía	EE/Alginato Cargada lys	EE/Alginato vacía	EE/Alginato cargada lys
10	0.5	110.4±1.6	112.1±1.1	0.100±0.002	0.224±0.016	-40.1±0.1	-50.4±5.0
10	1.33	130.3±18.7	161.3±67.8	0.144±0.075	0.321±0.035	39.3±1.2	50.6±3.7
10	10	122.7±1.7	121.1±1.8	0.114±0.027	0.160±0.009	44.0±3.1	25.5±1.2
20	0.5	171.8±4.7	181.5±1.1	0.153±0.130	0.193±0.016	-37.3±1.2	-30.6±0.4
20	1.33	132.2±0.6	118.5±0.0	0.150±0.004	0.145±0.001	27.6±3.6	35.3±0.0
20	10	94.1±11.7	133.9±1.2	0.233±0.046	0.212±0.006	44.7±4.7	43.9±0.2
30	0.5	154.5±5.7	158.8±1.1	0.176±0.019	0.191±0.044	-42.4±1.2	-40.0±1.0
30	1.33	106.8±2.5	155.1±9.4	0.221±0.012	0.154±0.016	38.1±1.6	38.1±0.9
30	10	150.4±3.2	158.8±3.4	0.181±0.10	0.262±0.001	38.5±0.8	33.7±2.0

Tabla 1. Características de la formulación, en términos de tamaño, PDI y potencial zeta. Datos expresados como promedio ± DS (n=3).

5.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la morfología de las nanopartículas, se realizaron estudios de SEM. Las imágenes SEM revelaron la forma esférica de las nanopartículas de EE/alginate (**Figura 10**). Estas partículas no mostraron agregación o adhesión entre las pNPs.

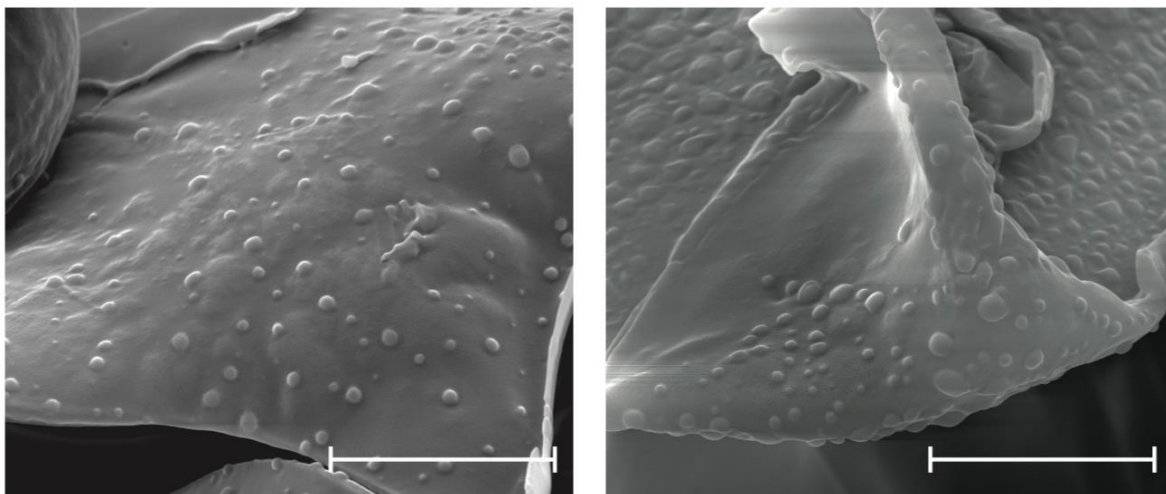


Fig 10. Imágenes SEM representativas de (CT 20 RC 0.5) pNPs después del método de coacervación compleja. Las barras de escala representan 4 μm .

5.1.4 Estudio de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La **Figura 11** muestra los espectros FTIR de todos los materiales puros que componen pNPs, a saber, alginato, EE y Lys que muestran sus respectivos peaks característicos. El alginato muestra sus peaks característicos a aproximadamente 3300 cm^{-1} (ancho de peak para el estiramiento -OH), 1640 cm^{-1} (-COO asimétrico) y 1420 cm^{-1} (-COO simétrico) [84]. El polímero catiónico EE muestra sus máximas características en torno a 1720 cm^{-1} (para el grupo éster) y leves crestas en aproximadamente 2780 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} como evidencia de los grupos dimetilamino [85, 86]. Mientras que Lys muestra sus peaks característicos, que se encuentran alrededor de 1630 cm^{-1} y 1520 cm^{-1} correspondientes a sus bandas de las aminas [87-89]. El sistema combinado, ejemplificado por pNPs CT 20 y RC 0.5 cargados con Lys, muestra peaks similares a los materiales puros sin evidencia de nuevos grupos químicos. Esto está alineado con la naturaleza electrostática de este sistema polimérico, donde no se forman enlaces covalentes durante el ensamblaje de partículas.

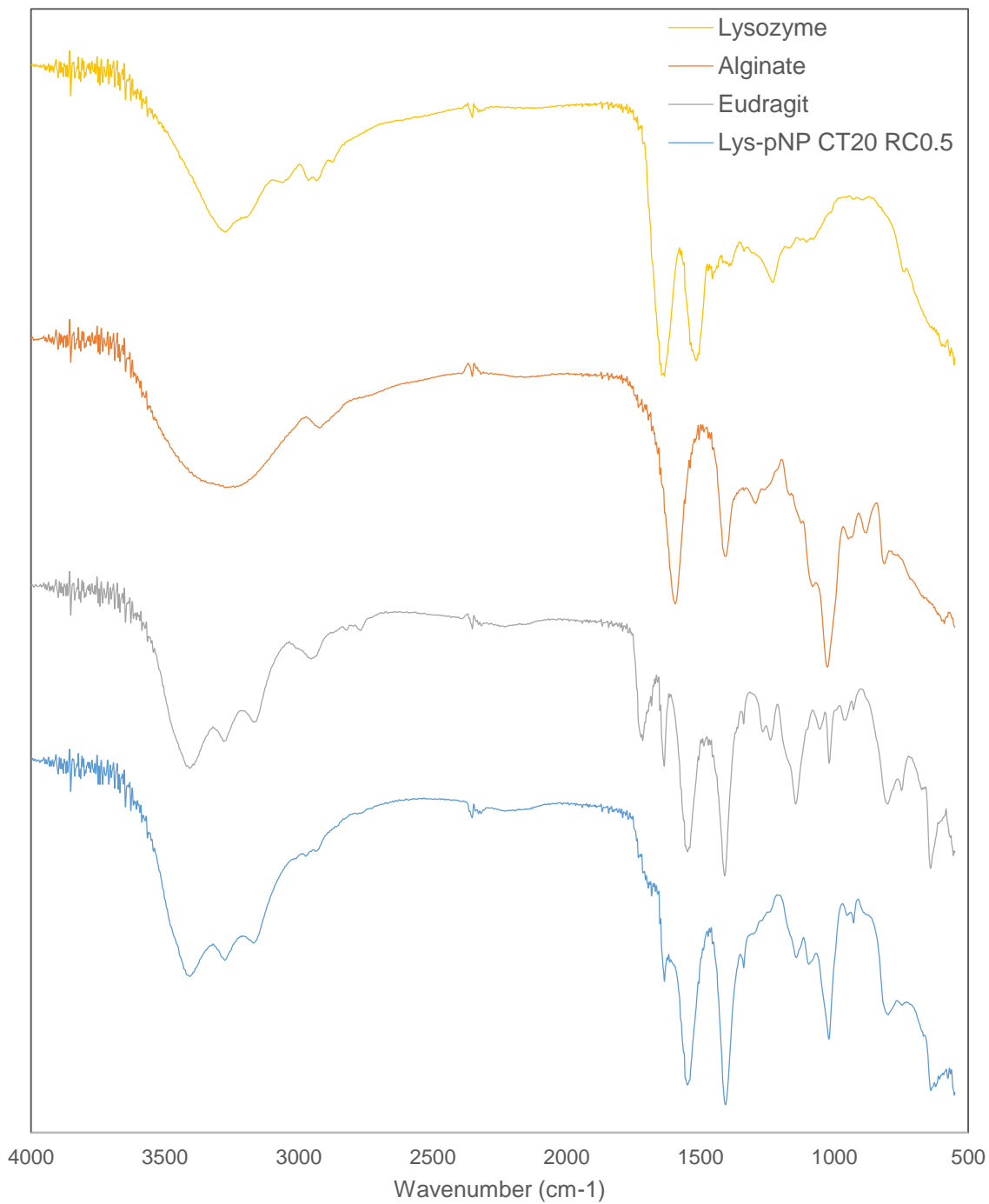


Fig 11. Espectros FTIR de materiales puros y pNPs CT 20 y RC 0.5 cargados con Lys que muestran peacks característicos de cada material separado y no hay evidencia de interacciones covalentes entre Lys y los materiales, lo que respalda las interacciones electrostáticas que sostienen el sistema polimérico.

5.1.5 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Al contrario de DLS, NTA permite la visualización de nanopartículas y proporciona las concentraciones de nanopartículas aproximadas por mL (video complementario). La concentración para pNPs de EE/Alg vacías fue de 1.1×10^{11} partículas/mL mientras que 9.0×10^{11} partículas/mL corresponden a pNPs de EE/alginate cargados con Lys (**Figura 12**).

Tanto el DLS como el NTA mostraron una buena precisión de tamaño para el EE / alginate vacías (DLS: 106.8 ± 2.5 ; NTA: 93.5 ± 7.5) y el EE/alginate cargado de Lys (DLS: 155.1 ± 9.4 ; NTA: 91.6 ± 2.1) pNPs. Sin embargo, es posible observar una tendencia de todas las distribuciones de tamaño en DLS hacia tamaños más grandes, principalmente debido a la contribución de unas pocas partículas grandes a la dispersión general (**Tabla 1 y Figura 12**). Los valores de tamaño promedio, obtenidos por NTA fueron ligeramente más pequeños que los datos mostrados por DLS (**Tabla 1**). Sin embargo, la desviación estándar de la distribución de tamaño obtenida para cada muestra es menor con DLS (**Tabla 1**), lo cual es una consecuencia de la gran cantidad de datos estadísticos recopilados por DLS en comparación con la NTA [90]. De hecho, estas desviaciones estándar en los resultados de NTA son causadas principalmente por diferentes conteos de partículas entre cada medición (**Figura 12**) [91].

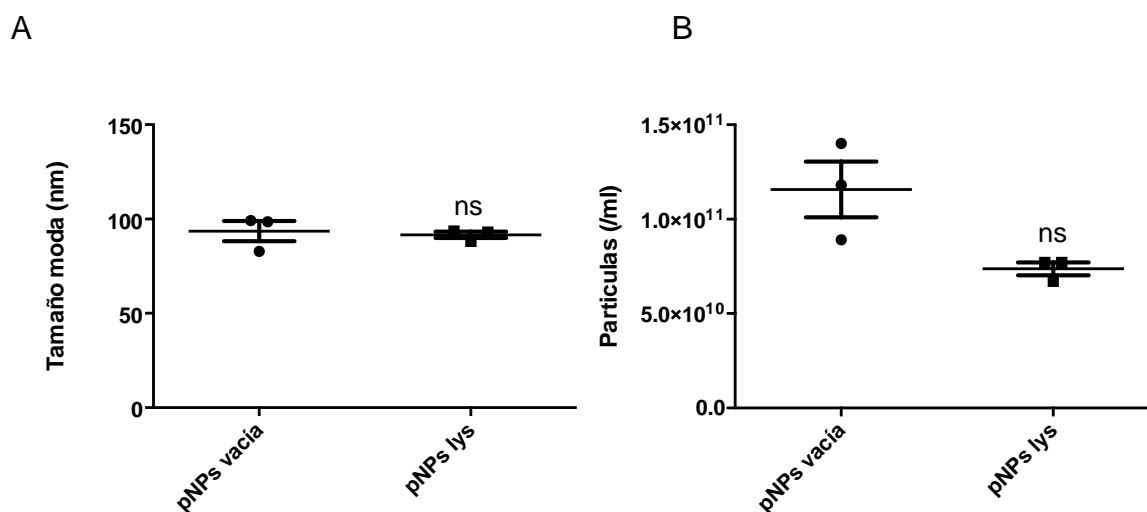


Fig 12. Tamaño de partícula (a) y concentración de partículas (partículas / ml) (b) pNPs EE /alginato vacías y pNPs EE/alginato cargadas con Lys (CT 30 RC 1.33 y 30% p/ p Lys). Los datos representan el promedio \pm SD (n= 3) post-prueba t-student ns = no estadísticamente significativo respecto pNPs vacía.

5.1.6 Determinación de la eficiencia de la asociación

La eficiencia de asociación (%EA) de la lisozima para las formulaciones ensayadas fue alta y varió en el rango 65-89% (**Figura 13**). La eficiencia de la asociación siempre fue mayor para RC 0.5 e independiente del CT. La mayor eficiencia de asociación para estas nanopartículas corresponde precisamente a aquellas con PZ negativo. Por lo tanto, aquellos con un predominio del polímero alginato (carga negativa) conducen a una mayor interacción con la lisozima cargada positivamente, permitiendo así su mayor eficiencia de asociación.

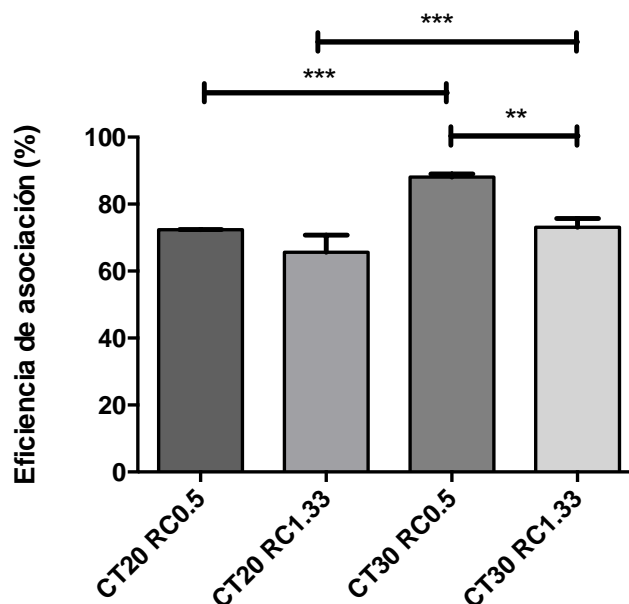


Fig 13. Eficiencia de asociación de cuatro diferentes pNPs de EE/alginato cargadas con 30% p/p Lys con varias cargas totales (CT) y razón de carga (RC). Los valores son promedio \pm DS (n=3). El valor estadísticamente significativo se evaluó mediante

un análisis de varianza ANOVA, seguido de la prueba de Tukey. ** ($p < 0.001$), *** ($p < 0.0001$).

5.1.7 Estabilidad de las pNPs de EE/Alg cargadas con Lys

Las propiedades fisicoquímicas de las pNPs de EE/Alg cargados con Lys se evaluaron después del almacenamiento hasta 1 mes a 25 y 37°C. Después de 4 y 30 días de incubación tanto a 25°C como a 37°C, se observó que el tamaño de los pNPs de EE/Alg cargadas con Lys aumentaba y el PDI a 37°C se mantuvo dentro de los rangos aceptables de distribución homogénea. Las pNPs incubadas durante 4 días a 25 °C muestran el mayor aumento de tamaño, lo que concuerda con un aumento en la polidispersidad a un valor de 0.34 (**Figura 14A**).

Los tamaños de las pNPs de EE/Alg cargadas con Lys permanecen estables durante el período de incubación de 30 días para ambas temperaturas evaluadas. A una temperatura de incubación de 37 ° C, el PDI de las pNPs se mantuvo estable durante 30 días. Mientras que, después de 4 días de incubación, el PDI de las pNPs incubadas a 25 ° C aumentó de 0.12 a 0.25 y alcanzó 0.20 después de 30 días (**Figura 14B**). Por otro lado, después de 4 y 30 días de incubación a 37°C, observamos una reducción en el tamaño de los pNPs cargadas con Lys., pero la polidispersidad se mantuvo dentro de rangos estables a lo largo del tiempo de incubación y para ambas temperaturas evaluadas (**Figura 14C**).

Es evidente que el tamaño de las pNPs incubadas a 25 y 37°C permanece estable después de 30 días. La polidispersión aumenta justo después de 4 y 30 días de incubación para ambas temperaturas (**Figura 14D**). En general, estos resultados sugieren que las pNPs tienen una estabilidad física relativamente buena durante el almacenamiento y la temperatura probada.

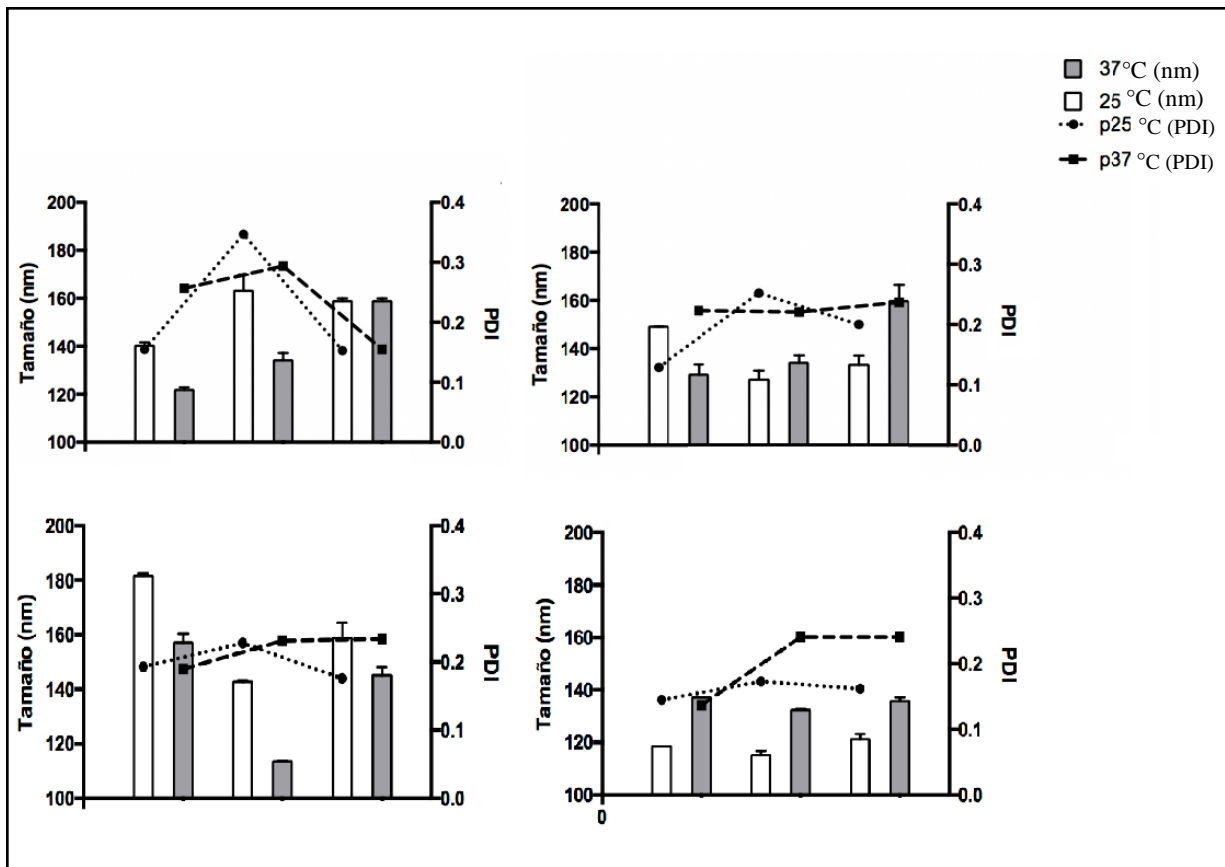


Fig 14. Tamaño de nanopartículas y PDI de las formulaciones obtenidas por DLS a 25 y 37 ° C durante 0, 4 y 30 días. A: CT 20 RC 0.5; B: CT 20 RC 1.33; C: CT 30 RC 0.5; D: CT 30 RC 1.33. Datos expresados como promedio \pm DS (n=3).

5.1.8 Liberación *in vitro* de lisozima

El perfil de liberación de todos los sistemas fue bifásico y se caracterizó por una liberación instantánea inicial rápida (<13%) seguido de una liberación sostenida de lisozima (<50%) durante un período de 72 horas. La cinética de liberación inicial mostrada por todas las formulaciones evaluadas se puede atribuir a la disociación de la lisozima que está asociada físicamente en la superficie de las nanopartículas, mientras que un segundo proceso más lento correspondió a la liberación de las

moléculas de lisozima más estrechamente asociada a las nanopartículas de EE/Alg como consecuencia de una fuerte interacción electrostática.

Además, las formulaciones de pNPs RC 0.5 CT 20 y RC 0.5 CT 30 mostraron una cinética de liberación similar, esto puede deberse al alto %EA de estas formulaciones y la composición de cada nanopartícula (**Figura 15**).

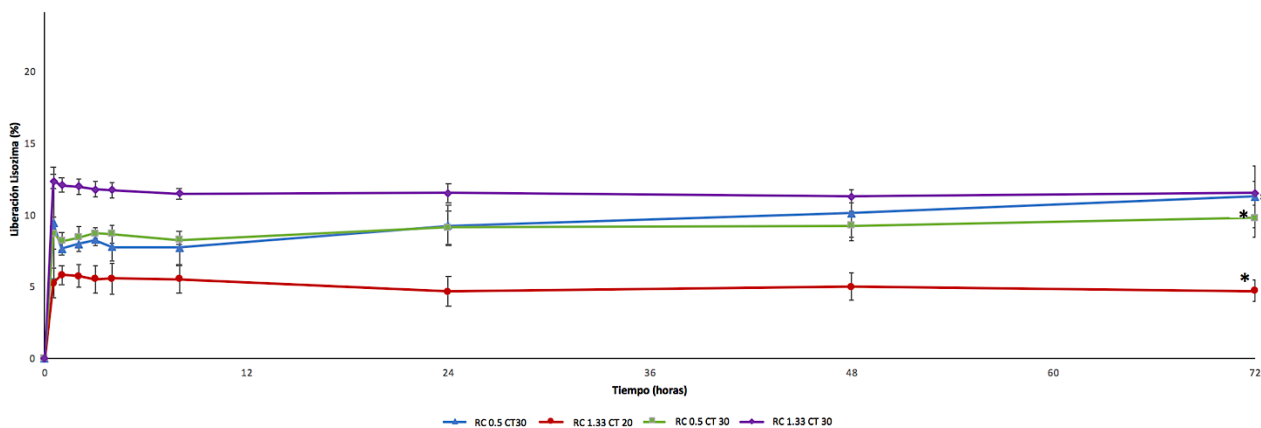


Fig 15. Lys liberada de las pNPs de EE/Alg cargadas a 30% p/p en varias RC y CT. Los datos representan valores promedios \pm SD (n= 3) $p < 0.05$ de Tukey post-hoc. La línea morada representa: A, celeste: B, verde: C y rojo: D. * diferencia significativa desde tiempo de 0.5 horas hasta 72 horas del estudio de liberación, comparando A con B, C y D,

5.9 Ensayos de seguridad *in vitro*

5.9.1 Ensayo de MTS

Se usaron células HeLa para evaluar la citocompatibilidad de las diferentes pNPs analizadas, utilizando concentraciones que oscilan entre 0.06 y 1.5 μM y para dilucidar la mejor concentración no tóxica que se usará más adelante. La proliferación de células HeLa no se vio afectada en las concentraciones más bajas probadas de pNPs de EE/Alg (0.06 y 0.1 μM). Nuestros resultados muestran que la

viabilidad celular es superior al 90% después de la exposición a nanopartículas de EE/Alg durante 24 h. Por otro lado, se observó una disminución en la viabilidad celular a 1 y 1.5 μM de pNPs de EE/Alg, tanto para nanopartículas positivas como negativas, después de la incubación durante 1 y 24 horas. Esto fue especialmente significativo para las células HeLa tratadas durante 24 h con nanopartículas positivas (**Figura 16**).

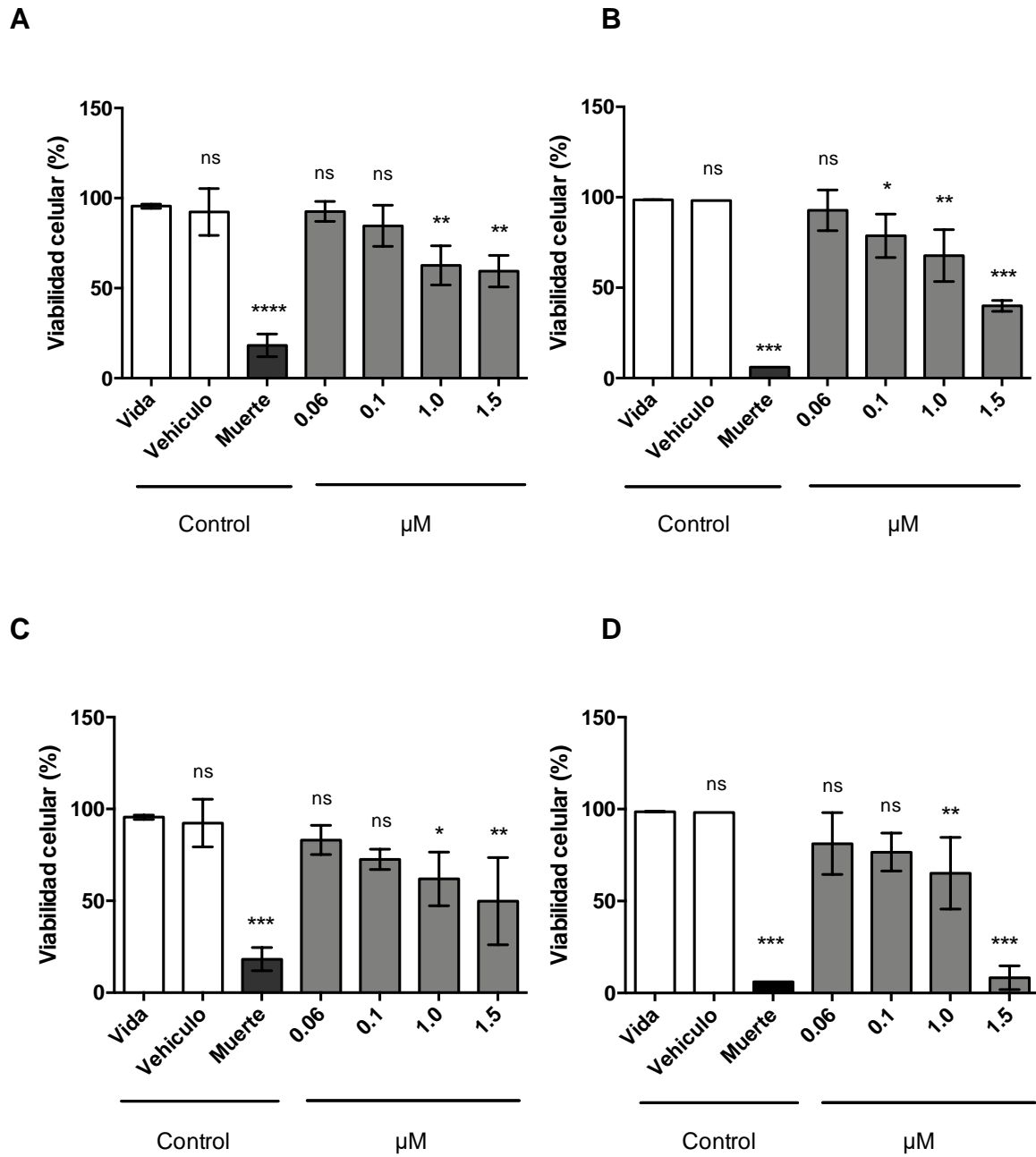


Fig 16. Viabilidad expresada como porcentaje de viabilidad celular de células HeLa tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de EE/Alg en comparación con el control de medio de cultivo. A: CT 30 RC 0.5 / 1 hora; B: CT 30 RC 0.5 / 24 horas; C: CT 30 RC 1.33 / 1 hora; D: CT 30 RC 1.33 / 24 horas. Control vida: células HeLa en medio de cultivo DMEM, vehículo: agua-mili-Q, muerte: dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%. Los valores corresponden a promedio \pm DS (n=3) de ANOVA- Dunnett's * = P <0.1, ** = P <0.01, *** = P <0.001, ns = no estadísticamente significativo respecto del control vida.

5.9.2 Ensayo de LDH

El efecto de las nanopartículas de EE/Alg en la integridad de la membrana celular se evaluó mediante un ensayo LDH que proporciona una medida precisa de la citotoxicidad. La liberación total de LDH se midió a partir de células HeLa después de la exposición a diferentes concentraciones de nanopartículas de EE/Alg. Como podemos observar en (Fig. 7), las concentraciones más bajas analizadas (0.06 y 0.1 μ M) tuvieron un porcentaje de citotoxicidad que osciló entre \sim 0.0 y 29%. Este resultado muestra que estas concentraciones no causaron ningún daño significativo a la membrana plasmática de las células HeLa hasta 24 h. Células HeLa tratadas con concentraciones más altas (1.0 y 1.5 μ M) mostraron aumento significativo en la liberación de LDH, alcanzando valores de citotoxicidad del 50% a la hora de incubación. Los niveles de citotoxicidad solo alcanzaron el 100% para pNPs negativas después de 24 horas de incubación a una concentración de 1.5 μ M (**Figura 17**).

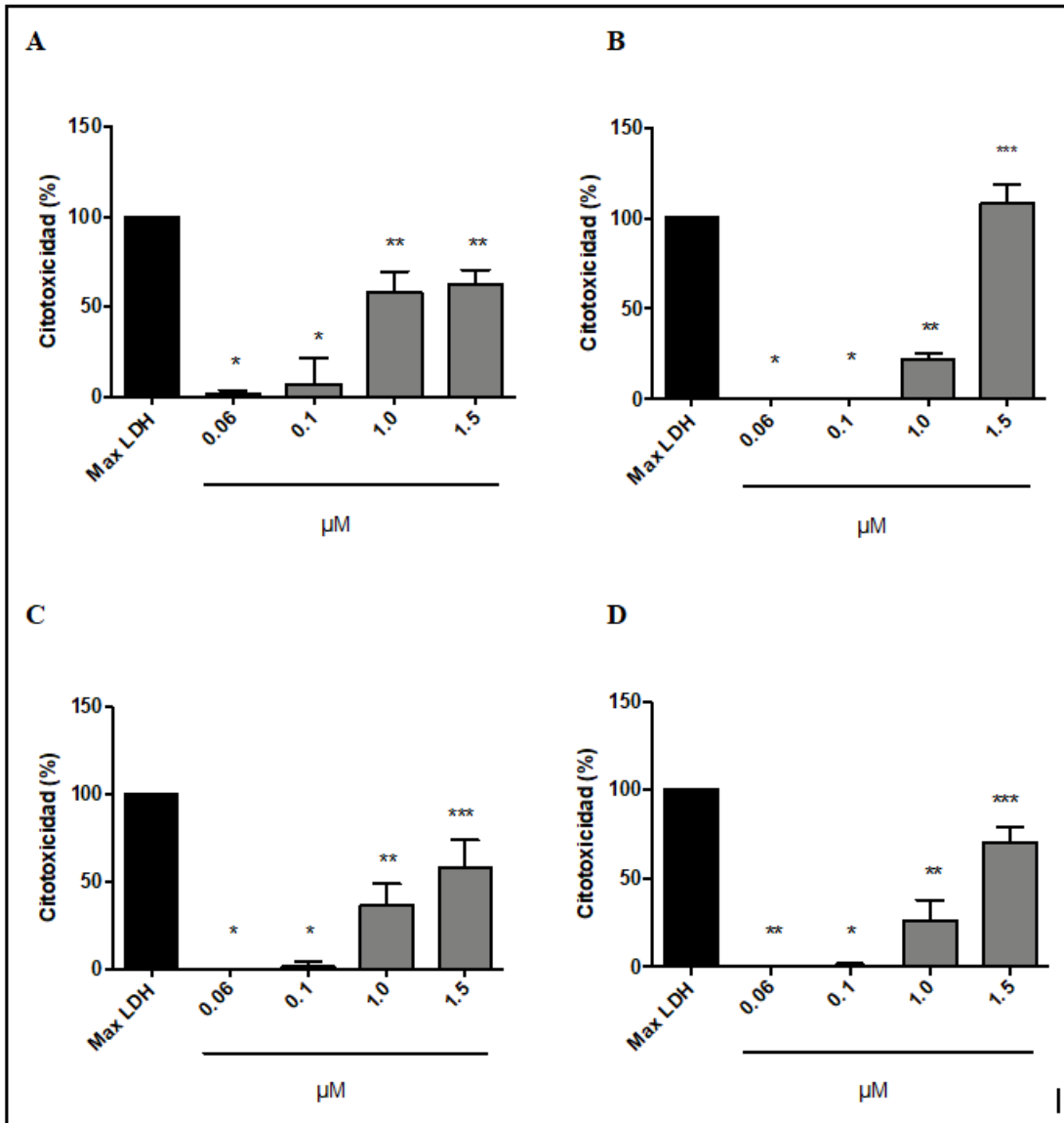


Fig 17. Liberación total de LDH expresada como porcentaje de citotoxicidad de células HeLa tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de EE/Alg

en comparación con el control del medio de cultivo. A: CT 30 RC 0.5 / 1 hora; B: CT 30 RC 0.5 / 24 horas; C: CT 30 RC 1.33 / 1 hora; D: CT 30 RC 1.33 / 24 horas. Los valores corresponden a promedio \pm DS (n=3) de ANOVA- Dunnett's. * = P <0.1, ** = P <0.01, *** = P <0.001 respecto de Max LDH.

5.9.3 Ensayo de morfología celular

Se evaluó por microscopía de contraste de fase.; el cambio morfológico celular en respuesta a las pNPs de EE/Alg. Para esto, las células HeLa se incubaron con las diferentes preparaciones o con el control del vehículo (C.Ve), agua mili-Q. No se observaron cambios en las células tratadas con el control de vehículo en comparación con la morfología normal de las células. La morfología celular fue normal a 0.1 μ M para las diferentes pNPs de EE/Alg tanto para pNPs negativas como para pNPs positivas. Además, se encontró un ligero efecto sobre la adhesión celular a concentraciones más altas de nanopartículas de EE/Alg (1.0 y 1.5 μ M) con potencial zeta negativo y positivo. Solo a una la concentración de 1.5 μ M post 24 horas encontramos a constricción y redondeo de la morfología celular de las células HeLa (**Figura 18**).

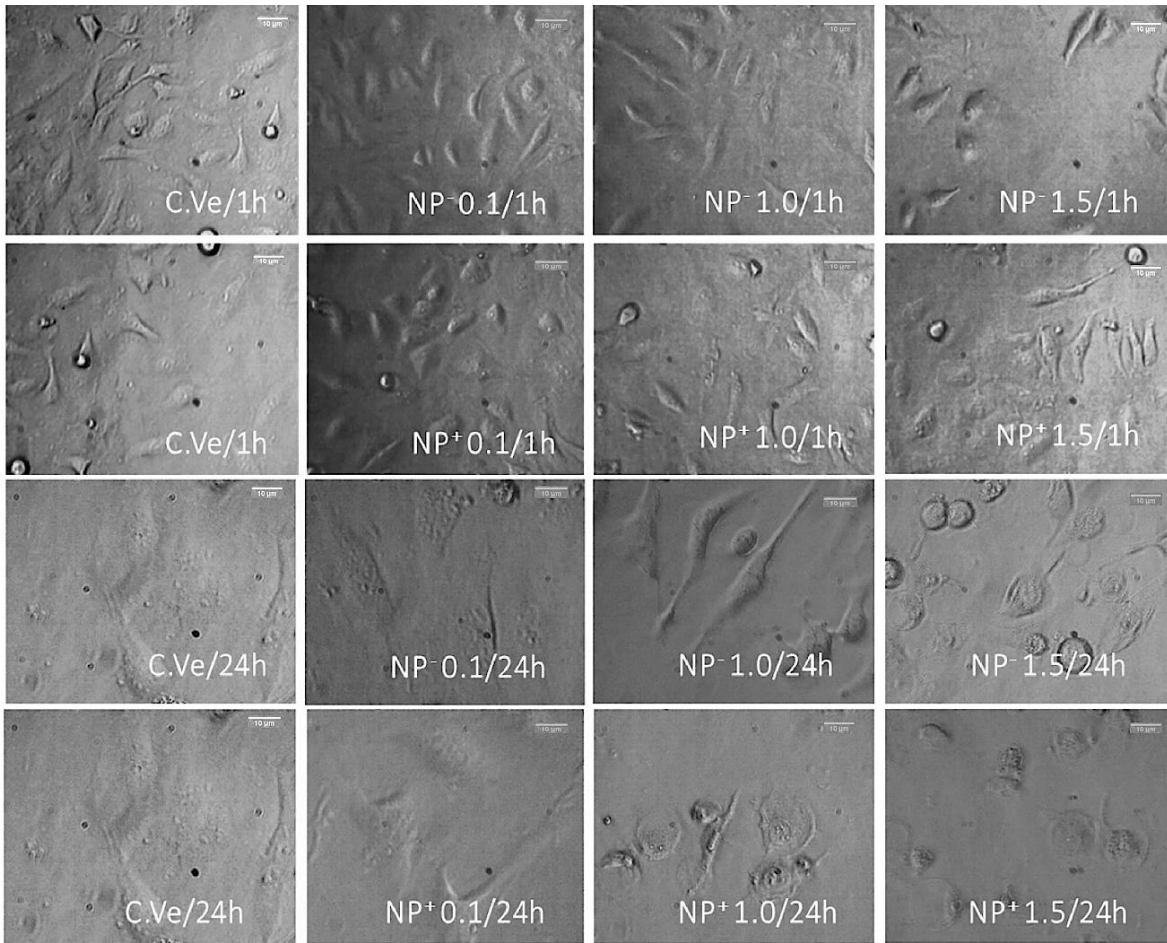
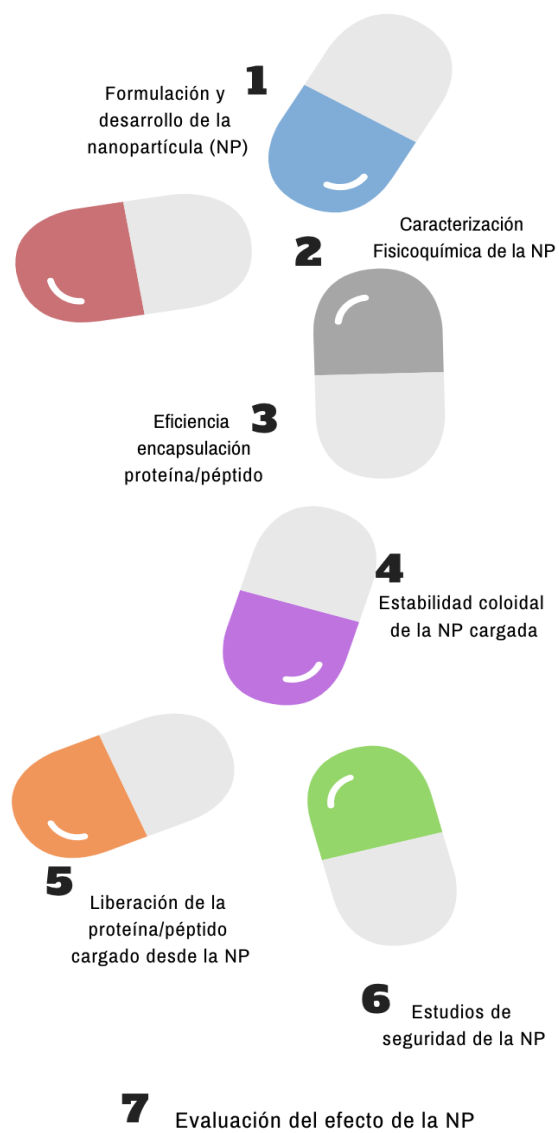


Fig 18. Resultados de la morfología celular para varias pNPs de EE/Alg. Las células HeLa se trataron con diferentes concentraciones de pNPs de EE/Alg. Control de vehículos (C.Ve) (40x) y regla de medición 10 µm.

Fig 19. Esquema que representa los estudios realizados para dar respuesta al objetivo específico 1b.



8. RESULTADOS CAPITULO 1

8.1 Desarrollo de pNPs EE/alginato y EE/sulfobutil- β -ciclodextrina por coacervación compleja

Se desarrollaron nanopartículas seleccionando el polímero EE Eudragit como policación y se probaron dos polianiones (alginato y sulfobutil- β -ciclodextrina), para seleccionar el vehículo polimérico con mejores propiedades de tamaño, polidispersión y potencial Z que será la nanopartícula con la cual continuaremos los estudios para la vehiculización de Ang –(1-9).

Las nanopartículas fueron preparadas mediante la mezcla de soluciones acuosas del policación (EE Eudragit) y dos tipos de polianiones (alginato o sulfobutil- β -ciclodextrina) adicionando el polianión sobre el policación en condiciones controladas de pH (~4,8) y a temperatura 25 °C. Las formulaciones evaluadas tenían razones de cargas eléctricas entre el policación y el polianión (n^+/n^- entre 0.1 y 10, **Tabla 2**) lo que permitió comparar el efecto del alginato y sulfobutil- β -ciclodextrina en los potenciales nanosistemas. Además, para controlar el número total de cargas, la suma de cargas n^+ y n^- se mantuvo en 4.4 μmol .

8.2 Caracterización de las pNPs: Tamaño, PZ y PDI

Las formulaciones realizadas tenían razones de cargas eléctricas entre el policación y el polianión n^+/n^- entre 0.25 y 2.0. Para controlar el número total de cargas, la suma de cargas n^+ y n^- se mantuvo en 4.4 μmol . Estas mediciones fueron realizadas por triplicado en un equipo Malvern Instrument Zetasizer Nano ZS en cubetas plásticas de 1cm. Los resultados de tamaño, PDI, y PZ se muestran en la **Tabla 2**).

Polianión	Razón carga [EE /polianión]	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)
Alginato	0.1	101.3 ± 1.49	0.265 ± 0.007	-36.8 ± 2.5
	0.25	113.3 ± 1.53	0.176 ± 0.015	-28.0 ± 1.2
	0.5	145.1 ± 1.7	0.136 ± 0.022	16.0 ± 0.6
	0.75	78.85 ± 1.0	0.312 ± 0.333	26.1 ± 1.8
	1	67.69 ± 0.7	0.414 ± 0.405	30.5 ± 0.6
	1.33	121.0 ± 8.7	0.416 ± 0.150	28.2 ± 2.4
	2.0	131.3 ± 42.4	0.497 ± 0.205	27.3 ± 5.0
	4.0	174.8 ± 34.0	0.634 ± 0.169	27.2 ± 7.6
	10	238.8 ± 35.1	0.596 ± 0.154	28.3 ± 3.6
Sulfobutil-β-ciclodextrina	0.1	544.4 ± 19.2	0.389 ± 0.002	-17.1 ± 0.8
	0.25	498.1 ± 1.0	0.103 ± 0.009	-18.5 ± 0.7
	0.5	pp*	pp*	pp*
	0.75	165.8 ± 79.6	0.323 ± 0.050	14.8 ± 3.3
	1	272.5 ± 85.8	0.449 ± 0.084	18.1 ± 5.7
	1.33	300.0 ± 32.5	0.451 ± 0.014	44.4 ± 1.0
	2.0	351.3 ± 40.2	0.588 ± 0.156	44.5 ± 2.9
	4.0	309.6 ± 39.4	0.615 ± 0.189	41.9 ± 2.6
	10	636.4 ± 47.0	0.677 ± 0.226	34.4 ± 3.9

Tabla 2. Efecto del tipo de polímero y de la relación entre carga positiva y negativa en el proceso de fabricación de nanopartículas por coacervación compleja. Resultados de tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta. Datos expresados como promedio ± DS (n=3). *: Formulaciones que precipitaron.

Para expandir el entendimiento de las variables que influyen en el proceso de coacervación, se estudiaron distintas sumas de cargas totales y razones de carga. Soluciones acuosas del Eudragit® EE y alginato o sulfobutil-β-ciclodextrina fueron mezclados en condiciones controladas de pH y temperatura. Se controló las relaciones estándares de cargas eléctricas entre polication y polianión (n+/n- entre 0.1 y 10.0) y el número total de cargas (n+ + n-) se evaluó entre 2.0 y 20.0 μmol (Figuras 20-22).

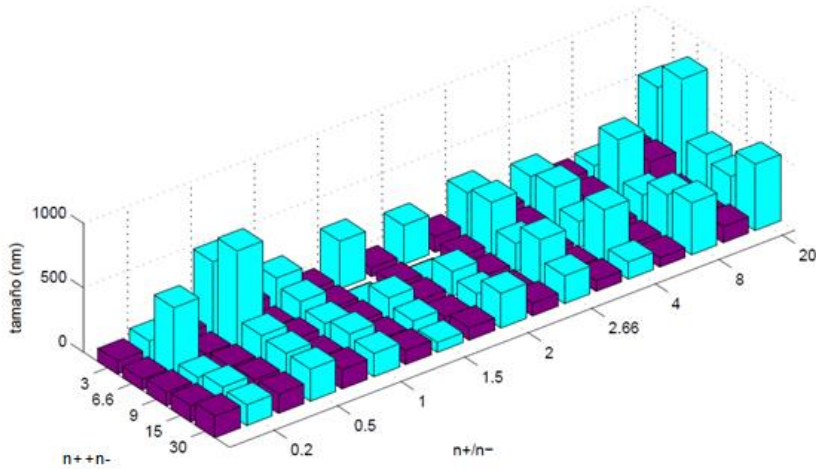


Fig 20. Influencia de la razón de carga (n+/n-) y número total de cargas (n+ + n-) ■ EE/alginate y ■ EE/sulfobutil-β-ciclodextrina sobre tamaño promedio.

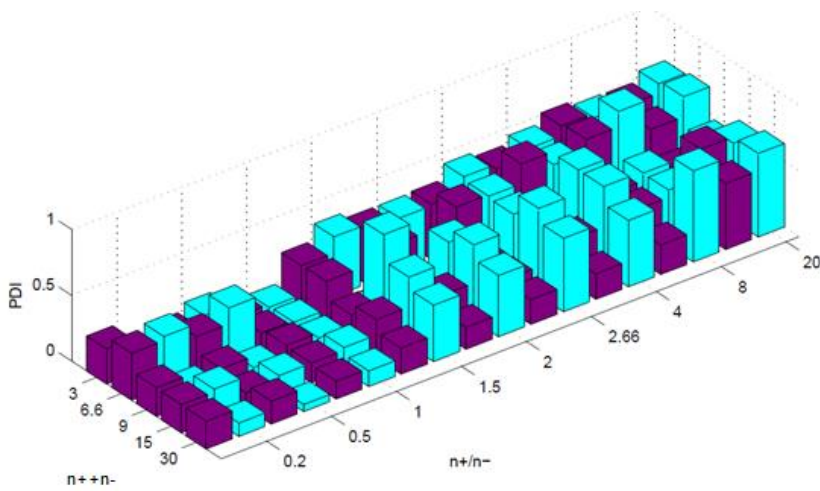


Fig 21. Influencia de la razón de carga (n+/n-) y número total de cargas (n+ + n-). ■ EE/alginate y ■ EE/sulfobutil-β-ciclodextrina sobre PDI.

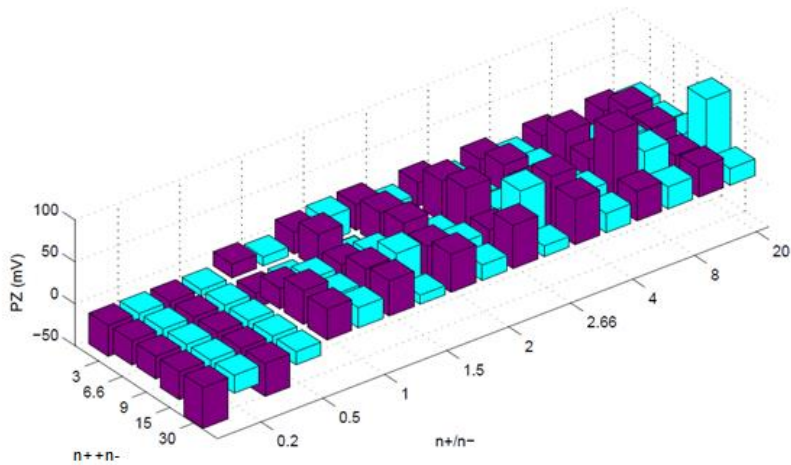


Fig 22. Influencia de la razón de carga ($n+/n-$) y número total de cargas ($n+ + n-$). ■ EE/alginato y ■ EE/sulfobutil- β - ciclodextrina sobre potencial zeta.

8.3 SEM de pNPs de EE/alginato y EE/sulfobutil- β - ciclodextrina

Para esta caracterización se escogió una formulación de pNPs de EE/alginato y EE/sulfobutil- β - ciclodextrina lo que puede apreciarse en la **Figura 23**.

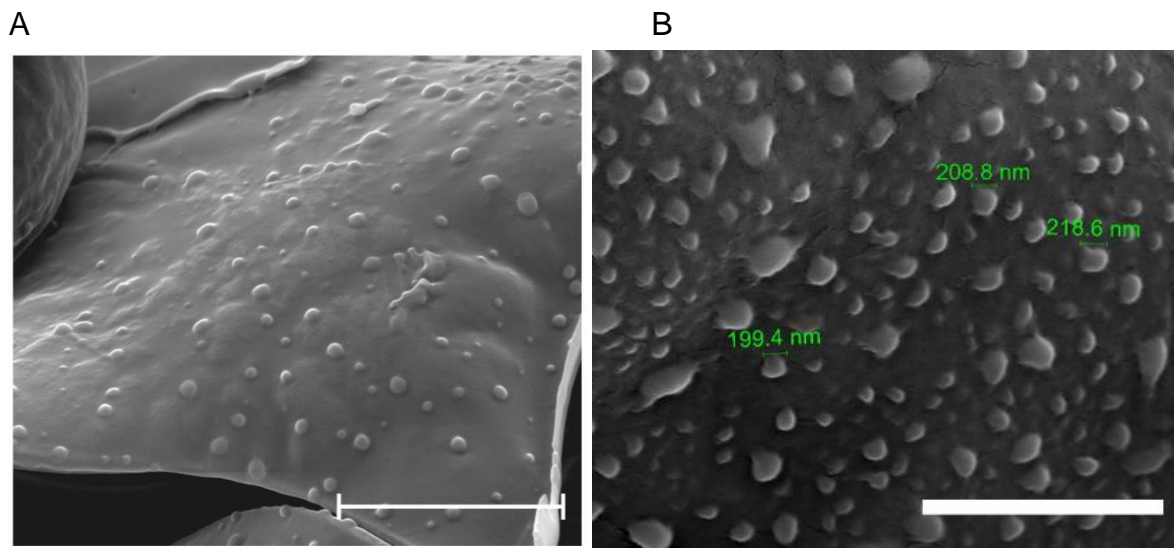


Fig 23. Imágenes por SEM de formulaciones: A) EE/Alg (barra representa 4 μ m); y B) EE/ sulfobutil- β -ciclodextrina (barra representa 2 μ m).

De las correspondientes micrografías, se ve que en ambas formulaciones se obtuvieron partículas esféricas. Al comparar el tamaño por microscopía óptica y difracción láser, se evidencia que las pNPs no presentan diferencias estadísticamente importantes en cuanto a tamaño en la caracterización por ambas técnicas.

Muestra	Tamaño mediante SEM	Tamaño por dispersión de la luz
EE/alginato	290,7±5,8	294,6 ± 5,6
EE/sulfobutil-β-ciclodextrina	208,9±9,6	272,5 ± 85,8

Tabla 3. Análisis de tamaño de las nanopartículas EE/alginato y EE/sulfobutil-β-ciclodextrina. Las Mediciones mediante SEM corresponden al promedio± DS (n=3).

8.4 Síntesis de nanoesferas de oro (AuNE)

Se obtuvieron de forma exitosa como una solución rojiza oscura característica, indicando la formación de las AuNE.

8.5 Caracterización de las AuNE de oro por absorción atómica

Las AuNE obtenidas, presentaron un máximo de absorción cercano a los 519 nm correspondiente a la banda del plasmón de resonancia característico para AuNE con tamaños de entre 10 y 20 nm (**Figura 24**).

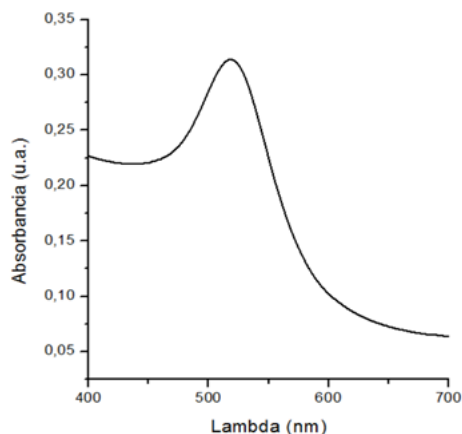


Fig 24. Espectro de absorción UV-Vis de AuNE. Se aprecia la absorbancia característica de las AuNE de un tamaño cercano a 12 nm.

8.6 Caracterización fisicoquímica de las AuNE: tamaño, PZ y PDI

Se determinó que las AuNE poseen un tamaño promedio de 12.4 ± 1.7 nm (**Tabla 4**). En cuanto al índice de polidispersión fue de 0.213 lo que indica un tipo de distribución polidispersa moderada [112] y un valor de PZ obtenido de -46.2 ± 2.4 mV.

AuNE	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)
	$12,4 \pm 1,7$	$0,213 \pm 0,015$	$-46,2 \pm 2,4$

Tabla 4. Tamaños en diámetro de AuNE, PDI y potencial zeta. Datos expresados como promedio \pm DS (n=3).

8.7 Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)

Para determinar el tamaño de las AuNE, se realizaron observaciones por TEM a partir de un estudio poblacional de 300 partículas. Se determinó que poseen un tamaño promedio de 12 ± 1 nm y con una la distribución de tamaños como se aprecia en el inserto de la imagen (**Figura 25**).

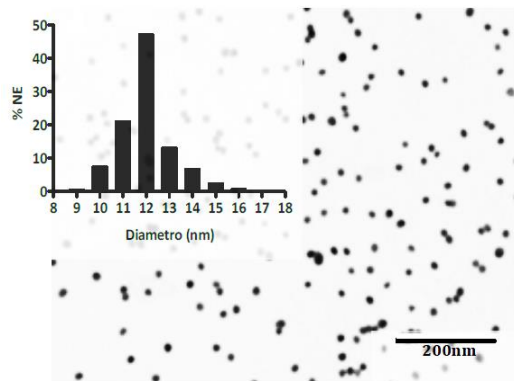


Fig 25. Microfotografía TEM de AuNE. En el inserto se muestra la distribución de tamaños.

Estos resultados junto con los obtenidos mediante DLS, corroboraron la existencia de AuNE homogéneas en tamaño, forma y con un bajo grado de agregación.

8.8 Encapsulación de AuNE y Angiotensina-(1-9) en pNPs EE/Alg

8.8.1- Encapsulación de AuNE en pNPs de EE/Alg

Como etapa intermedia, se procedió a la incorporación de AuNE en pNPs de EE/Alg por medio de la técnica de coacervación compleja, lo cual resultó exitoso. Se decidió continuar el estudio con la formulación EE/Alg ya que la mayoría de las formulaciones ensayadas para estos polímeros demostraron menor tamaño de pNPs y menores valores de polidispersión en comparación a EE/ sulfobutil- β -ciclodextrina.

8.8.2 Caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con AuNE por tamaño, PZ y

PDI

Para esto se evaluaron pNPs de EE/Alg vacías y con inclusión de AuNE a distintas razones de carga (n+/n-) y número total de cargas (n+ + n-), obtenidos de experimentos anteriores. Estas corresponden a AuNE que presentan un tamaño (~12 nm) y exhiben carga negativa. Los sistemas fueron caracterizados por DLS, PDI y PZ que se muestran en la **Tabla 5**.

Formulación		Tamaño (nm)		PDI		PZ (mV)	
CT	RC	EE/Alg vacía	EE/Alg AuNE	EE/Alg vacía	EE/Alg AuNE	EE/Alg vacía	EE/Alg AuNE
10	0.25	137.6±3.0	119.0±0.6	0.112±0.001	0.155±0.013	-33.2±2.4	-35.6±1.2
10	0.5	119.5±2.0	301.8±11.0	0.149±0.008	0.325±0.014	40.0±1.2	22.3±1.5
10	0.75	140.9±3.4	140.9±0.5	0.291±0.034	0.160±0.009	37.8±2.6	32.8±6.1
10	1.0	56.8±1.1	132.1±3.0	0.283±0.023	0.233±0.013	36.1±3.0	41.1±1.4
10	1.33	59.1±0.8	116.4±1.7	0.216±0.007	0.196±0.021	27.5±3.6	35.2±3.2
10	2.0	57.8±7.0	110.3±0.8	0.330±0.075	0.154±0.012	22.6±6.7	34.0±4.3
10	4.0	99.3±3.0	101.5±0.9	0.366±0.012	0.233±0.044	27.6±7.5	34.3±1.0
10	10.0	92.9±19.5	117.2±9.4	0.639±0.046	0.391±0.015	20.9±4.7	23.0±4.3

Tabla 5. Sistemas de pNPs de EE/Alg vacía y con inclusión de AuNE y su influencia en tamaño, PDI y PZ. Datos expresados como promedio ± DS (n=3).

8.8.3 Caracterización de pNPs EE/Alg con AuNE por TEM

Para esto se seleccionó una de las formulaciones de pNPs EE/Alg con AuNE evaluadas anteriormente (Tabla 6). El criterio que se utilizó para su selección se basó en el tamaño en rango nanométrico obtenido y valor de polidispersión con distribución monodispersa [112].

Relación carga [EE /alginato]	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)
1.33	116.4 ± 1.7	0.196 ± 0.021	35.2 ± 3.2

Tabla 6. Sistema pNPs EE/Alg con AuNE. Resultados de tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta. Datos expresados como promedio ± DS (n=3).

La **Figura 26** muestra micrografías de trasmisión electrónica donde se observa la incorporación de AuNE en la matriz polimérica de pNPs de EE/Alg.

A

B

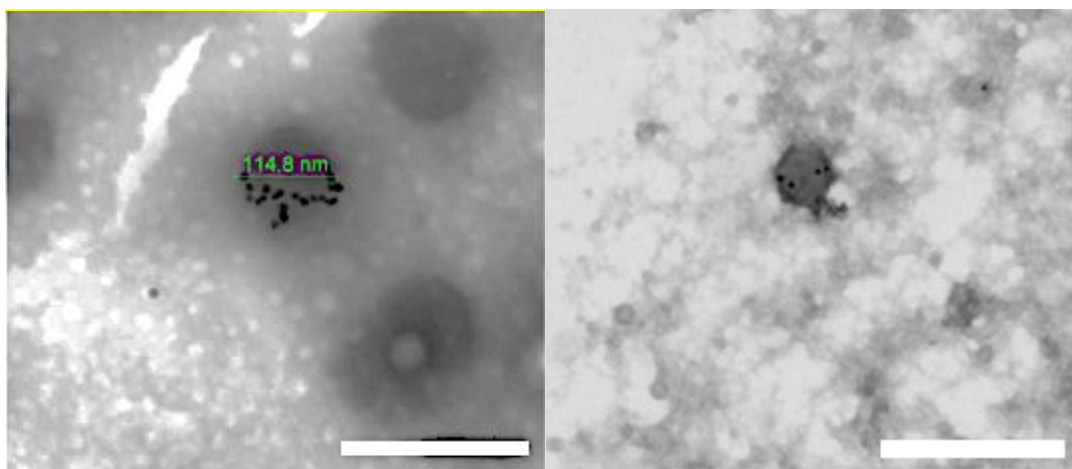


Fig 26. Imágenes por microscopía electrónica de transmisión de formulaciones EE/Alg cargadas con AuNE. Las barras representan 200nm (A) y 400nm (B).

8.8.4 Caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con angiotensina-(1-9) por tamaño, PZ y PDI

Se evaluaron pNPs de EE/Alg cargadas con Ang-(1-9) 2% a distintas razones de carga (n+/n-) y número total de cargas (n+ + n-) (**Tabla 7**).

Formulación		Tamaño (nm)		PDI		PZ (mV)		[] ug/uL Ang-(1-9)
CT	RC	EE/Alg vacía	EE/Alg/Ang-(1-9)	EE/Alg vacía	EE/Alg/Ang-(1-9)	EE/Alg vacía	EE/Alg/Ang-(1-9)	
15	0.25	150.1±0.9	107.0±5.7	0.112±0.001	0.172±0.021	-33.16±0.6	-36.0±1.9	0.0092
15	0.5	150.0±1.1	108.5±3.7	0.149±0.008	0.205±0.020	40.03±1.1	39.9±5.5	0.0096
15	0.75	107.8±0.3	116.3±7.6	0.291±0.034	0.186±0.015	37.8±2.6	38.2±0.2	0.0099
15	1.0	93.5±1.8	130.0±3.4	0.283±0.023	0.153±0.031	36.1±3.0	33.1±0.1	0.0102
15	1.33	95.9±1.1	142.2±1.1	0.216±0.007	0.130±0.021	27.5±13.6	39.0±0.3	0.0104
15	2.0	82.39±1.3	113.7±1.1	0.330±0.045	0.150±0.016	62.6±12.7	35.7±0.7	0.0107
15	4.0	71.5±0.9	101.5±0.9	0.366±0.012	0.178±0.012	87.6±9.5	30.7±0.9	0.0112
15	10.0	123.7±1.4	121.8±0.4	0.339±0.046	0.242±0.005	30.9±4.7	26.3±2.2	0.0116

Tabla 7. Sistemas de pNPs de EE/Alg vacía y cargadas con Ang-(1-9) y su influencia en tamaño, PDI y ZP. Datos expresados como promedio ± DS (n=3).

8.8.5 Caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con distintas concentraciones de angiotensina-(1-9) y AuNE por tamaño, PDI y PZ.

A partir del estudio de caracterización de pNPs EE/Alg cargadas con Ang-(1-9) y estudio con incorporación de AuNE, se seleccionó la pNPs de EE/Alg cargadas con Ang-(1-9) a 2% RC 0.5 y 10. Igualmente, se caracterizaron nanopartículas con porcentajes de incorporación de Ang-(1-9) de 20% y 40%, con carga negativa, carga positiva y número total de cargas (n+ + n-) de 15 (**Tabla 8**).

Formulación	RC	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)
EE/Alg/Ang-(1-9) 2% +AuNE 2%	0.5	108.1±2.4	0.203±0.0	-35.1±0.2
	10	98.0±1.1	0.231±3.7	38.0±0.008
EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2%	0.5	98.1±4.4	0.220±0.2	-34.8±0.700
	10	86.1±1.1	0.251±0.0	37.3±2.5
EE/Alg/Ang-(1-9) 40% +AuNE 2%	0.5	85.9±1.1	0.404±1.1	-39.4±2.5
	10	86.3±1.3	0.450±1.7	46.6±3.5

Tabla 8. Sistemas de pNPs de EE/Alg/Ang-(1-9) 2, 20 y 40% y 2% AuNE a RC: 0.5 y 10 CT: 15 y u influencia en tamaño, PDI y ZP. Datos expresados como promedio ± DS (n=3).

8.8.6 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Se seleccionó la pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2%, RC 0.5 y se evaluó la concentración y tamaño de distribución de las pNPs vacías y pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2% (**Figura 27**).

A

B

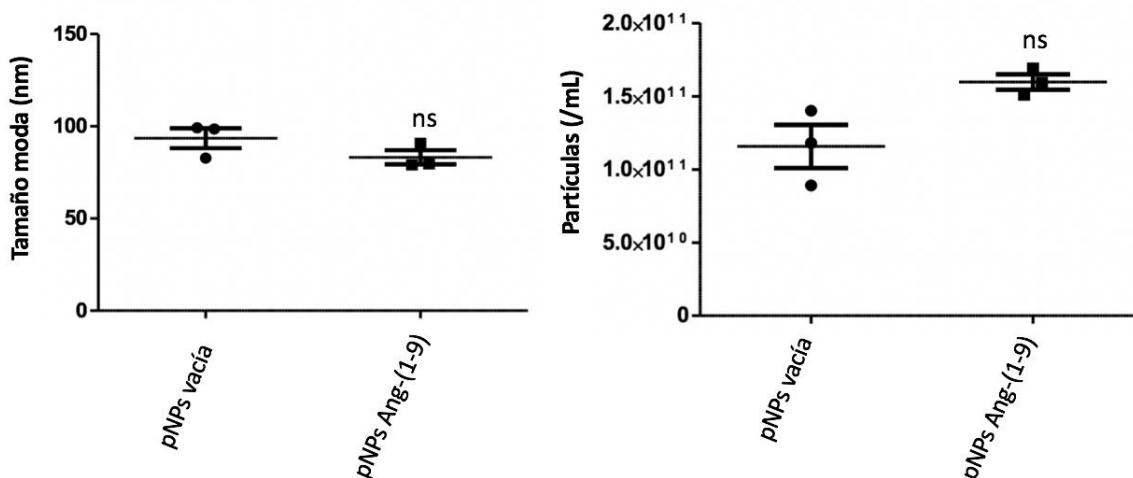


Fig 27. Tamaño (a) y concentración de las pNPs híbridas (partículas/mL) (b) pNPs vacías y pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20%+AuNE 2%. Los datos representan el promedio \pm SD (n= 3) post-prueba t-student ns = no estadísticamente significativo respecto a pNPs vacía.

8.8.7 Determinación del %EA de Angiotensina-(1-9) en la pNPs EE/Alg

La eficiencia de encapsulación del péptido Ang-(1-9) fue analizado indirectamente por la diferencia entre la cantidad total teórica de Ang-(1-9) cargada en las formulaciones de pNPs y el péptido libre Ang-(1-9) que se encuentra en el sobrenadante. Para ello la pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% se evaluaron a distintas razones de carga (n+/n-) y el número total de cargas (n+ + n-) se fijó en 15. Se seleccionó la formulación con alta eficiencia de asociación de Ang-(1-9) y a la vez con un PZ adecuado.

Se observa en la **Figura 28** todas las formulaciones presentan un alto porcentaje de eficiencia de encapsulación que va desde un 68-95%.

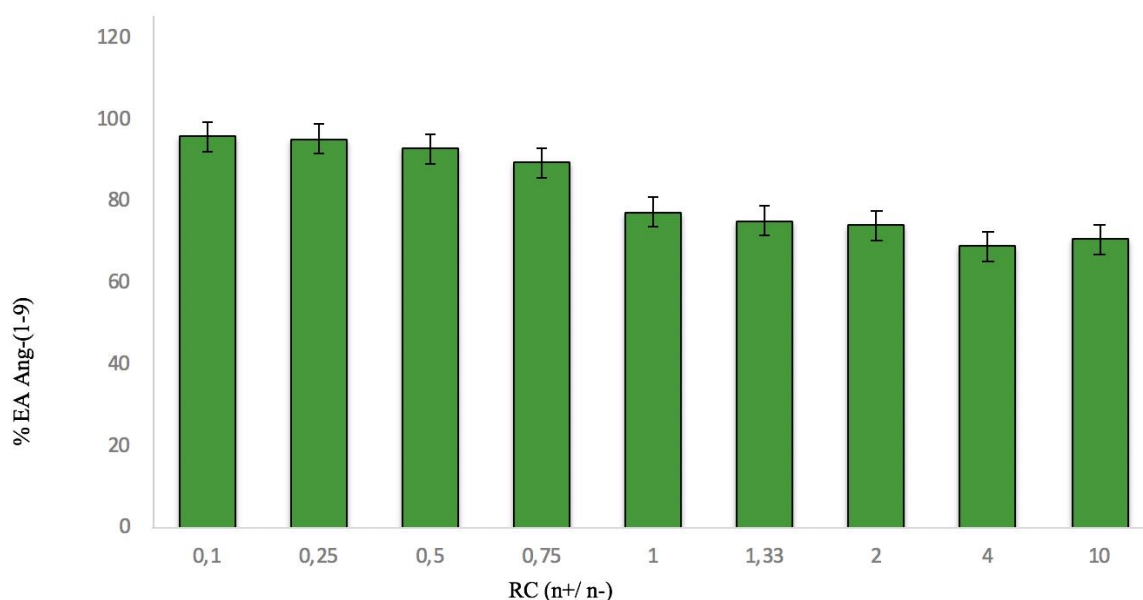


Fig 28. Eficiencia de encapsulación de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) a distintas RC. Se realizó un ANOVA-TUKEY para comparar el % EA de Ang-(1-9) de las distintas RC. Los resultados fueron expresados en % EA, representados como promedio \pm DS (n= 3). Grupo A: 0.1- 0.25- 0.5- 0.75 RC. Grupo B: 0.75 – 1.0 y 1.33. Grupo C: 1.0 – 1.33 – 2.0 – 4.0 y 10.0.

8.8.8 Evaluación del %EA de Angiotensina-(1-9) en las pNPs híbridas EE/Alg con AuNE

Se evaluó la eficiencia de encapsulación (%EA) de Ang-(1-9) en pNPs de EE/Alg cargadas con Ang-(1-9) 2, 10 y 20% m/m y 2% de AuNE (del contenido de polímeros sólidos (**Tabla 9**)).

Formulación	Eficiencia Asociación (%EA)
EE/Alg/Ang-(1-9) 2% + AuNE 2%	65.19 \pm 14.11
EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2%	68.39 \pm 4.13
EE/Alg/Ang-(1-9) 40% +AuNE 2%	63.71 \pm 0.55

Tabla 9. Eficiencia de encapsulación de Ang-(1-9) en pNPs híbridas. Ang-(1-9) fue cargada en diferentes % m/m del contenido de polímeros sólidos. Los valores son expresados como promedio \pm DS (n=3).

La eficiencia de asociación de las pNPs híbridas para las tres formulaciones evaluadas fue de 63-68 %.

8.8.97 Estudio de liberación *in vitro* de Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg

La liberación de Ang-(1-9) se evaluó a partir de pNPs de EE/Alg/Ang-(1-9) 2% y RC de 0.5 y 10 a intervalos de tiempo de 1-7 horas y posteriormente a las 24 y 48 horas. Como control se evaluó la liberación de Ang-(1-9) desde membrana de diálisis como se describe en métodos (**Figura 29**).

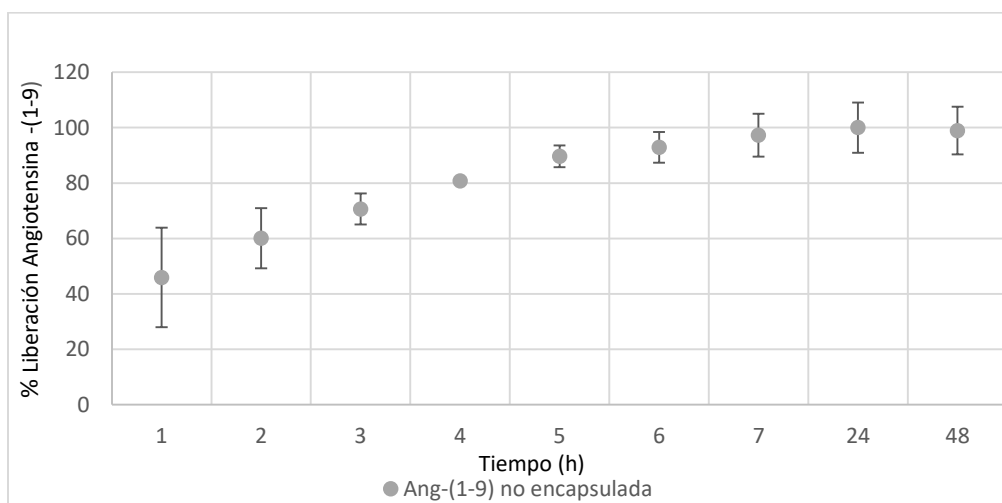


Fig 29. Perfil de liberación de Ang-(1-9) no encapsulada, (corresponde al control de liberación desde la membrana de diálisis), en un sistema de diálisis suspendida en PBS (pH 7.4) a 37°C por intervalos de tiempo. Los valores son expresados como promedio \pm DS (n=3).

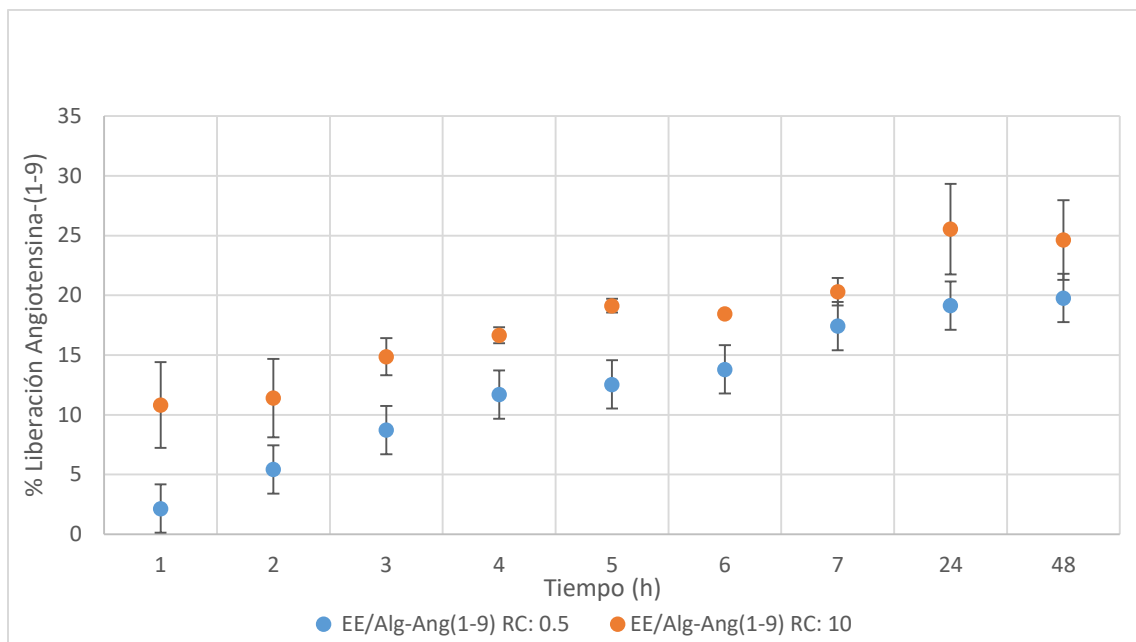


Fig 30. Perfil de liberación de Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg RC: 0.5 y 10, en un sistema de diálisis suspendido en PBS (pH 7.4) a 37°C por intervalos de tiempo. Los valores son expresados como promedio \pm DS (n=3).

La liberación de Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg a pH 7.4 en PBS y 37°C mostró ser para RC: 0.5 y 10 de 20 y 25%, respectivamente a las 48 horas, (**Figura 30**).

También se calculó el perfil de liberación a través del factor similitud para ambas formulaciones: pNPs EE/Alg RC: 0.5 y 10 (**Figura 31**), aplicando la prueba estadística factor similitud f_2 , el cual compara el porcentaje disuelto en función del tiempo; evidenciando si ambas formulaciones son o no capaces de aportar la misma cantidad de Ang-(1-9) bajo las mismas condiciones experimentales ensayadas. El valor f_2 obtenido para las formulaciones de pNPs EE/Alginato RC: 0.5 y 10 fue de 61.2 lo que indica que ambas curvas se consideran similares, esto ya que valores de f_2 mayor a 50 aseguran equivalencia de las curvas.

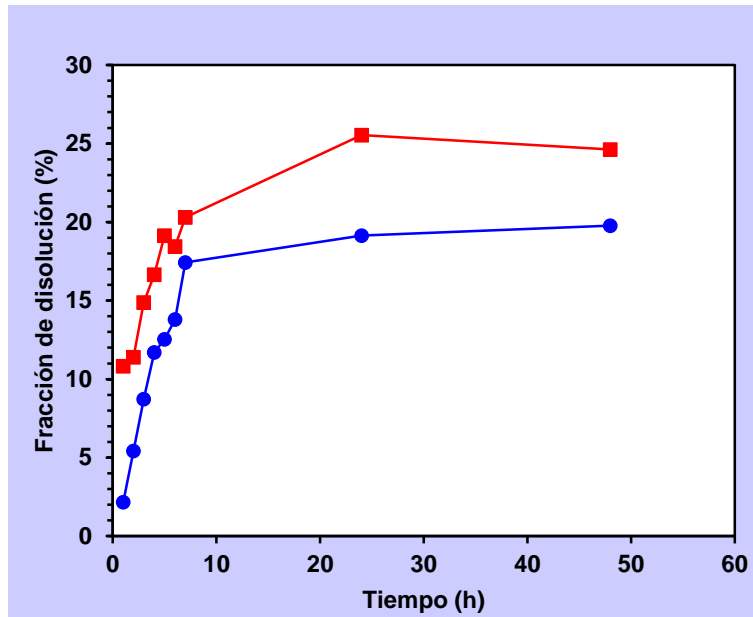


Fig 31. Gráfico del porcentaje factor similitud a tiempos 1-7, 24 y 48 horas. pNPs EE/alginate-Ang-(1-9) RC: 0.5 (azul) versus pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) RC: 10 (rojo).

8.8.10 Determinación *in vitro* de la seguridad de administración de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) y AuNE

Para sustentar el uso de nanopartículas en el campo de la biomedicina, como una posible herramienta terapéutica y/o de diagnóstico de ciertas patologías, es de gran importancia evaluar sus posibles efectos tóxicos.

8.8.10.1 Ensayos de viabilidad celular: MTS

Los ensayos de viabilidad celular de pNPs de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% con AuNE 2% sin aplicar estímulo de irradiación RC 0.5 y CT 15 no mostró diferencia significativa a las distintas concentraciones evaluadas de nanopartículas (**Figura 32**). La viabilidad de los cardiomiocitos, con pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% con AuNE 2% más aplicación de irradiación láser por 1 hora, mostró reducción significativa de su viabilidad a un 59.7%. (**Figura 32**).

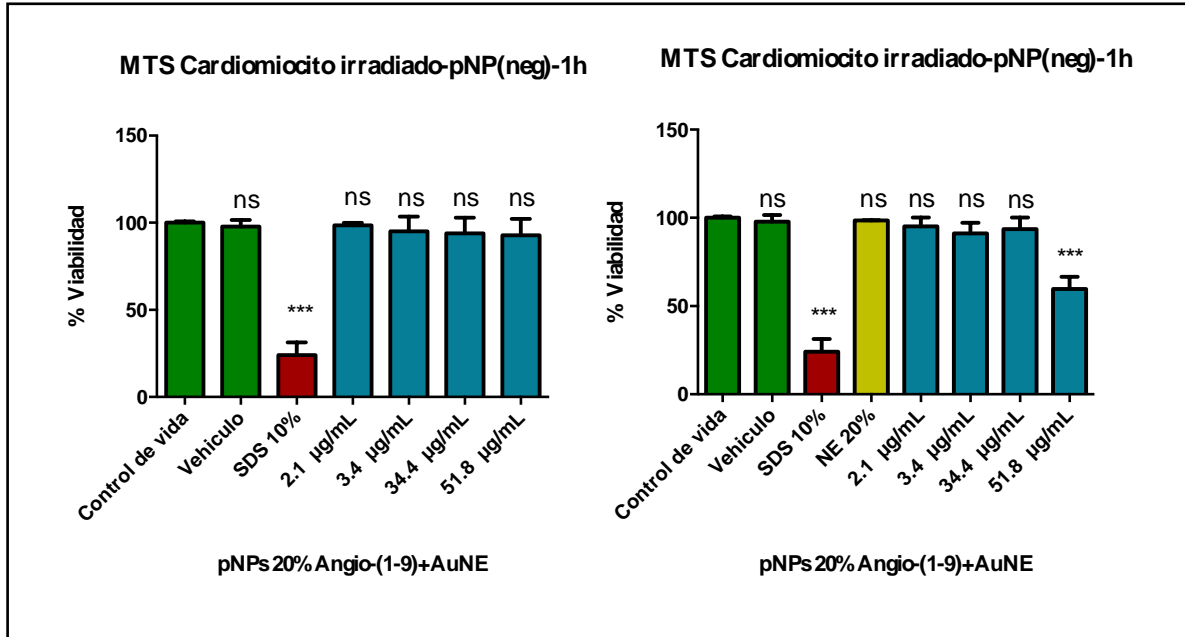


Fig 32. Viabilidad expresada como porcentaje de viabilidad celular de cardiomiocitos de rata neonata tratados con diferentes concentraciones de pNPs de EE/Alg en comparación con el control de medio de cultivo. Control de vida: DMEM/FBS al 10%, muerte celular: SDS al 10%, vehículo: agua mili-Q, nanoesferas de oro: AuNE 2% y mantenidos a 37°C y 5% CO₂ por 1 hora. Los datos representan valores promedios ± DS (n= 3), *** = P <0.001, ns = no estadísticamente significativo respecto del control de vida de ANOVA- Dunnett's

8.19.1 Evaluación del efecto de la irradiación en la viabilidad de los cardiomiocitos de rata neonata

Se evaluaron distintos tiempos de irradiación (0.5, 1 y 24 horas) sobre la viabilidad del cardiomiocito. Se encontró que a 24 horas de irradiación se redujo la viabilidad en un 89% (**Figura 33**).

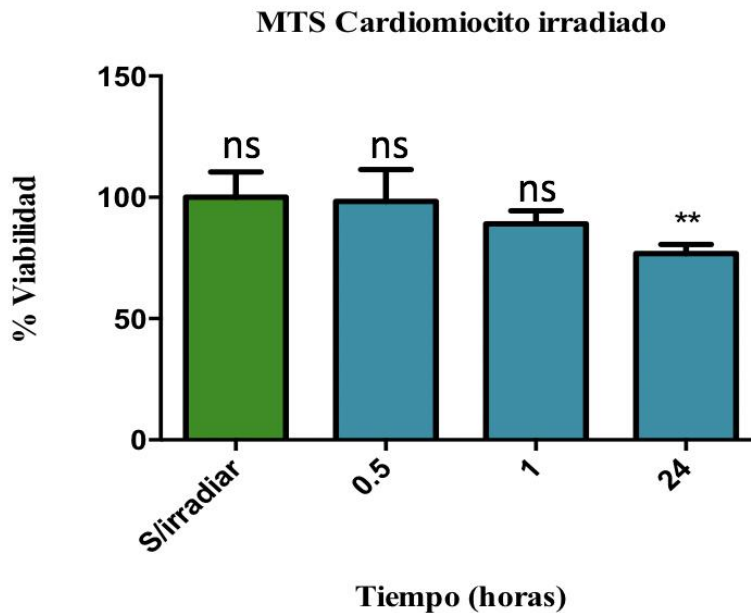


Fig 33. Viabilidad celular de cardiomiocitos de rata neonata sometidos a distintos tiempos de irradiación láser: 0.5, 1 y 24 horas. Los datos representan valores promedios \pm DS (n = 3), ** = p <0.01, ns = no estadísticamente significativo respecto al control sin irradiar de ANOVA- Dunnett's.

8.19.2 Citotoxicidad de Ang-(1-9) en cultivo primario de cardiomiocito por citometría de flujo

Estos resultados fueron generados previamente en el marco de un proyecto Fondef de I+D de la Dra. Ocaranza y son aportados con el objetivo de complementar los ensayos de seguridad de la nanoestructura y sus componentes. Ang-(1-9) no afecta la viabilidad de los cardiomiocitos tratados a distintos tiempos (24, 48 y 72h) con Ang-(1-9) a concentraciones de 1, 10, 100 nM y 1 μ M. Como control positivo de muerte se utilizó H₂O₂ 100 μ M por 24h.

En la **Figura 34** se muestran los histogramas representativos de la distribución de la población de células respecto a su fluorescencia por la incorporación de PI, determinada mediante citometría de flujo. En las figuras 1 B, C y D, se presenta la cuantificación del porcentaje de células que incorporaron PI. La exposición a Angiotensina-(1-9) no produce cambios en la viabilidad del cardiomiocito a ninguna de las concentraciones ni tiempos de exposición evaluadas.

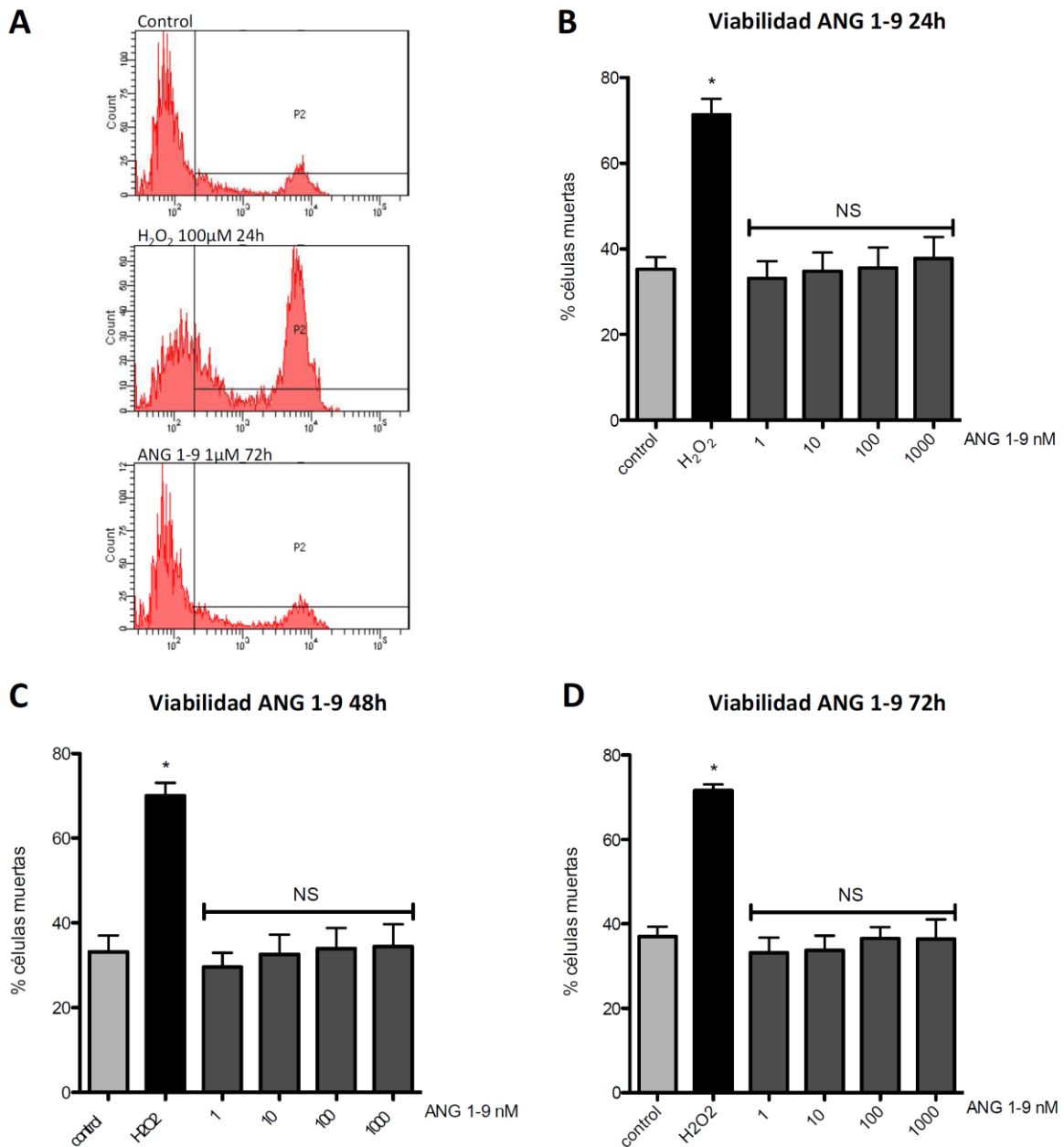


Fig 34. (A) Histogramas representativos de la medición de incorporación de PI por citometría de flujo. Se determinó la viabilidad de cardiomiocitos incubados con Ang-(1-9) a concentraciones 0, 1, 10, 100 nM y 1 μ M, durante (B) 24 h, (C) 48 h y (D) 72 h, Los datos corresponden al promedio \pm SEM de cinco experimentos independientes. Análisis mediante ANOVA de una vía, con post-test de Dunnett. * $p < 0,05$ ns= no significativo.

9. RESULTADOS CAPÍTULO II

OBJETIVO 2: Estabilidad y liberación *in vitro* de Angiotensina-(1-9) desde nanopartículas híbridas: con y sin irradiación laser:

9.1 Estabilidad coloidal de las pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE en diferentes medios de relevancia

Se caracterizaron a las pNPs híbridas midiendo el tamaño de partícula, PZ y PDI en diferentes medios, como: PBS, DMEM suplementado con 10% FBS y plasma, comparando con el control de pNPs híbridas en H₂O miliQ para estudiar así su estabilidad coloidal.

El diámetro hidrodinámico y el PZ de las pNPs híbridas fue medio (H₂O, PBS, DMEM y plasma), temperatura y tiempo dependiente (**Figura 35A**). Al compararse el control con todos los medios ensayados a tiempos 0, 15 y 60 minutos para ambas temperaturas de 25 y 37°C se evidenció un cambio significativo en el diámetro hidrodinámico de las pNPs híbridas. Además, puede observarse que los mayores diámetros hidrodinámicos se obtuvieron para el caso de pNPs híbridas incubadas con DMEM y plasma (**Figura 35A**).

Como se muestra en la **Figura 35B**, los valores de PDI fueron adecuados (cerca de 0.3) en H₂O miliQ, mientras que se obtuvieron valores de 0.4 o mayor para pNPs híbridas en algunos casos al ser incubadas con PBS y para todas las incubaciones

con DMEM y plasma lo que es indicativo de agregación y un alto grado de dispersión de las nanopartículas en suspensión.

Respecto del valor PZ, se observó una leve disminución en el valor (-23.0, -23.8, -20.8, y -26.0 mV) lo cual fue obtenido para pNPs híbridas en PBS, a 25°C y 37°C respectivamente, lo que de igual manera tuvo significancia estadística (**Figura 35C**). Mientras tanto, en medio DMEM suplementado con 10% FBS y plasma las pNPs híbridas mostraron una significativa disminución en el valor del PZ.

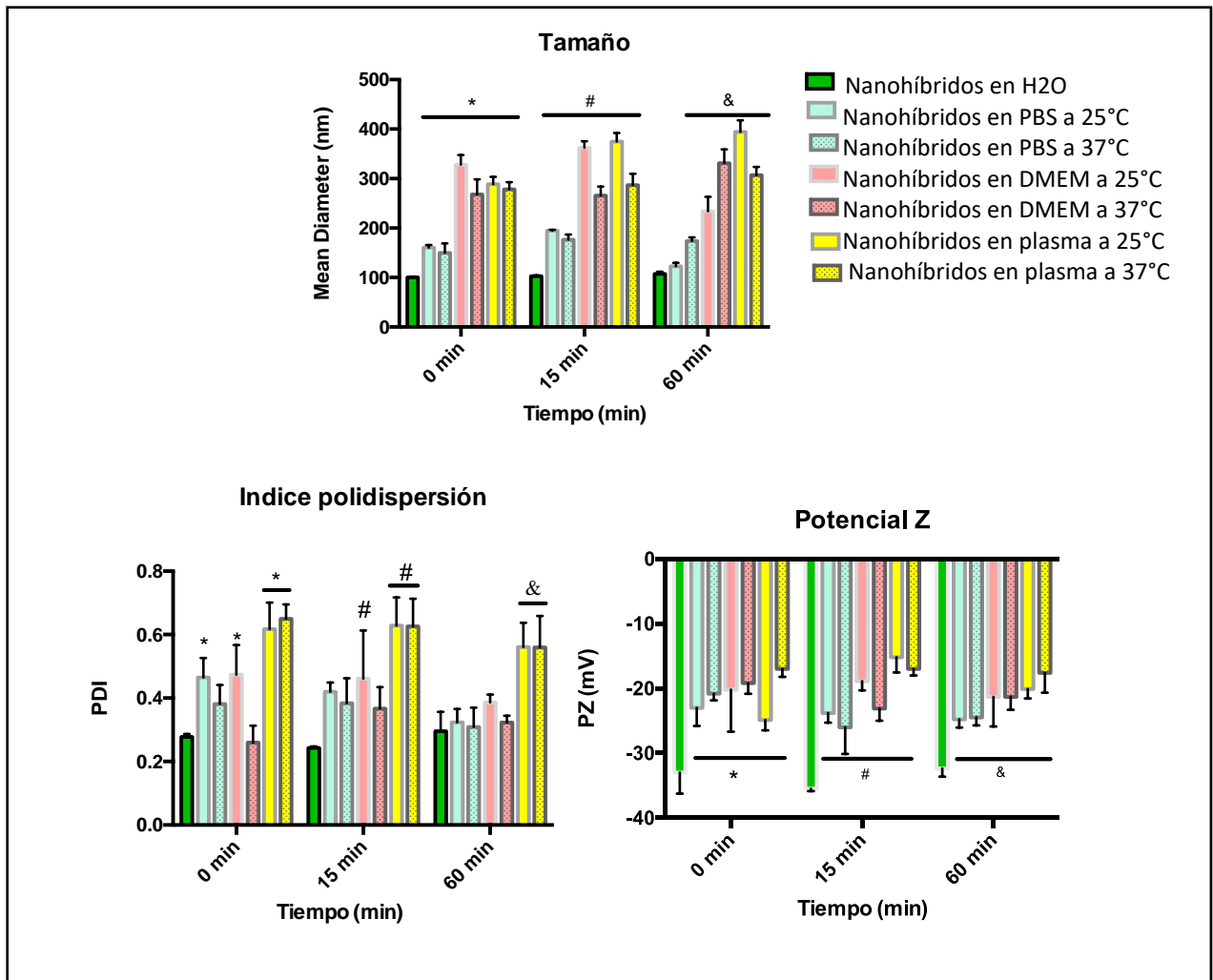


Fig 35. Parámetros de estabilidad de las pNPs híbridas a temperatura ambiente 25° C y a 37 ° C, medios (tampón fosfato pH 7.4 (PBS), DMEM suplementado con 10% FBS y plasma) y a 0, 15 y 60 minutos. Los valores corresponden al promedio \pm DS (n=3). Se utilizó H₂O miliQ como control. ANOVA doble vía, post test Bonferroni, * p <0.05 v/s nanohíbridos en H₂O miliQ a los 0 min, #p <0.05 nanohíbridos en H₂O miliQ a los 15 min y &p <0.05 nanohíbridos en H₂O miliQ a los 60 min.

9.2 Liberación de Ang-(1-9) desde las pNPs híbridas EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE mediada por irradiación láser

Al encapsular Ang-(1-9) y AuNE en pNPs EE/Alg, se buscó estudiar la liberación de Ang-(1-9) al medio de liberación. La utilización de las propiedades ópticas de las AuNE, conocida como resonancia de plasmón superficial, indica que al ser irradiadas con un láser a longitud de onda 532 nm y potencia de 2 mV (**Figura 36**), se produce aumento de temperatura y, eventualmente, permitiría la liberación de Ang-(1-9) desde el interior de la pNPs híbrida debido a un cambio en la estructura de la matriz polimérica.

Para ello se seleccionó la formulación de pNPs híbridas EE/Alg: 20% Ang-(1-9) y 2% de AuNE, obteniéndose un perfil de liberación con curvas similares entre sí, ya sea sin aplicación de radiación láser y con aplicación de irradiación (**Figura 37**). Además, a los 15 minutos para ambas condiciones se observa una liberación de estallido de Ang-(1-9) de 75.1 \pm 8.1% (sin láser) y 76.8 \pm 9.3% (con láser) respectivamente. Finalmente, transcurrida 1 hora se observa liberación de 91.4 \pm 8.2 % y 84.5 \pm 3.9 respectivamente. Esta liberación se mantiene sostenida en el tiempo hasta completarse el 100% de liberación a los 105 min sin láser versus 75 min con aplicación de láser.



Fig 36. Fotografía que da cuenta del proceso de irradiación de las pNPs híbridas EE/Alg/Ang-(1-9)/AuNE.

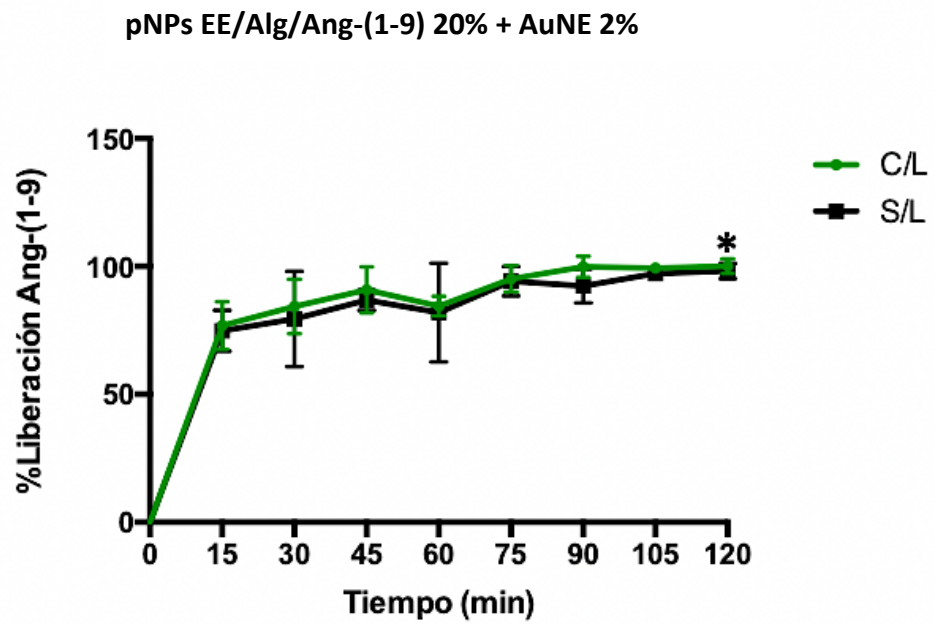


Fig 37. Gráfica de liberación de Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg con AuNE. C/L: liberación con irradiación láser, S/L: liberación sin aplicar irradiación láser. Los datos representan valores promedios \pm SD (n= 3) $p < 0,05$ de Bonferroni post-test. * ns: no se observaron diferencias significativas entre C/L y S/L durante todo el tiempo del estudio de liberación.

Además, se comparó el factor de similitud f_2 en ambas condiciones: sin irradiar y con irradiación láser. Las curvas se consideran similares ya que valores de f_2 mayor de 50 asegura similitud o equivalencia de ambas curvas.

9.3 Determinación de la liberación producida por irradiación de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) que contienen diferentes porcentajes de AuNE.

Para determinar si la concentración de las AuNE influye en el perfil de liberación de Ang-(1-9), se formularon sistemas de pNPs híbridas de EE/Alg con 20% de incorporación de Ang-(1-9) de forma fija y se varió el porcentajes de incorporación de las AuNE a un 20% de la masa de los sólidos. Además de tener como antecedente preliminar el estudio de liberación de Ang-(1-9) desde la pNPs EE/Alg sin AuNE y pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% del estudio anterior. Se irradiaron los montajes como se describió en métodos para un estudio de liberación hasta 90 min como tiempo final, muestreando a distintos tiempos. Como se puede observar, el perfil de liberación con láser no difiere del comportamiento de liberación mediado sin láser para todos los tiempos evaluados (**Figura 38**). Además, al comparar pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% versus EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 20% se obtienen perfiles de factor similitud f_2 : de 71.6 y 62.5 iguales, por lo tanto al ser el factor similitud (f_2) mayor a 50 indica equivalencia en el perfil de disolución.

pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + NE 20%

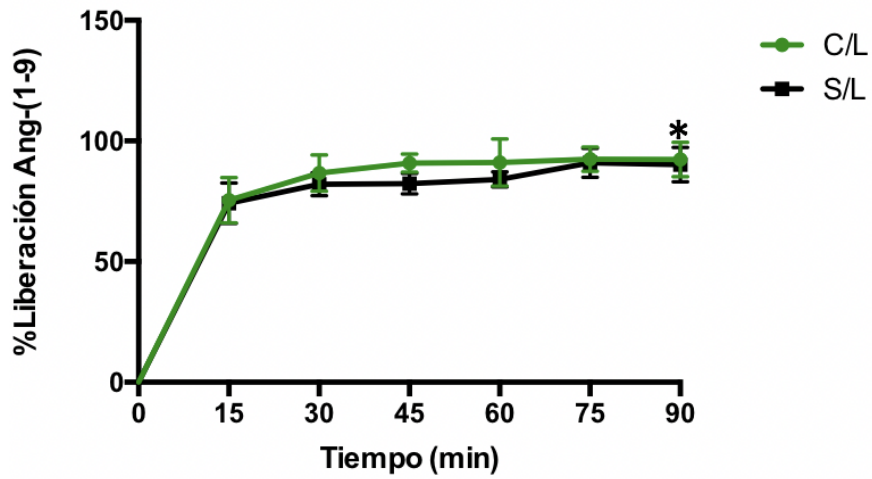


Fig 38. Gráfica de liberación de Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg con AuNE 20%. Los datos representan valores promedios \pm SD ($n=3$) de Bonferroni post-test. * ns: no se observaron diferencias significativas entre C/L y S/L durante todo el tiempo del estudio de liberación.

10. RESULTADOS CAPÍTULO III

OBJETIVO 3: Eficacia anti-hipertrófica *in vitro* de nanopartículas híbridas que contiene Angiotensina-(1-9) y AuNE en cultivo primario de cardiomiocito de rata neonata:

10.1 Eficacia anti-hipertrófica *in vitro* del sistema de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2% en cultivo primario de cardiomiocito de rata neonata sometido a estímulo con norepinefrina (NE)

La **Figura 39A** representa la gráfica de la cuantificación de área cardiomocitaria. Se puede observar que el tratamiento con norepinefrina CT24h+NE aumentó significativamente el área de los cardiomiocitos respecto a su control CT24h (2299.9 ± 349.5 v/s $1663.9 \pm 219.5 \mu\text{m}^2$ respectivamente (**Figura 39A**). El tratamiento con Ang-(1-9) redujo significativamente el área de los cardiomiocitos respecto al control (1040.6 ± 58.8 v/s $1663.9 \pm 219.5 \mu\text{m}^2$ respectivamente, **Figura 39A**). Los grupos experimentales corresponden a los estímulos con pNPs EE/Alg sin Ang-(1-9) RC: 0.5 y CT: 15 y pNPs EE/Alg con Ang-(1-9) 20% y AuNE 2% RC: 0.5 y CT: 15 sin irradiar, no mostraron diferencias significativas en el área cardiomocitaria respecto al control.

En la **Figura 39B** se muestra el perímetro de los cardiomiocitos y se puede observar que la norepinefrina aumentó significativamente el perímetro de los cardiomiocitos respecto a su control (255.3 ± 18.0 v/s $206.7 \pm 9.2 \mu\text{m}$, **Figura 39B**). En los grupos con tratamientos de: Ang-(1-9) 10 μM y pNPs EE/Alg con Ang-(1-9) 20% y AuNE 2% RC: 0.5 y CT: 15 sin irradiar disminuyó significativamente el perímetro de los cardiomiocitos respecto al grupo control (156.8 ± 9.2 ; 163.6 ± 5.7 v/s $206.7 \pm 9.2 \mu\text{m}$ respectivamente, **Figura 39B**)

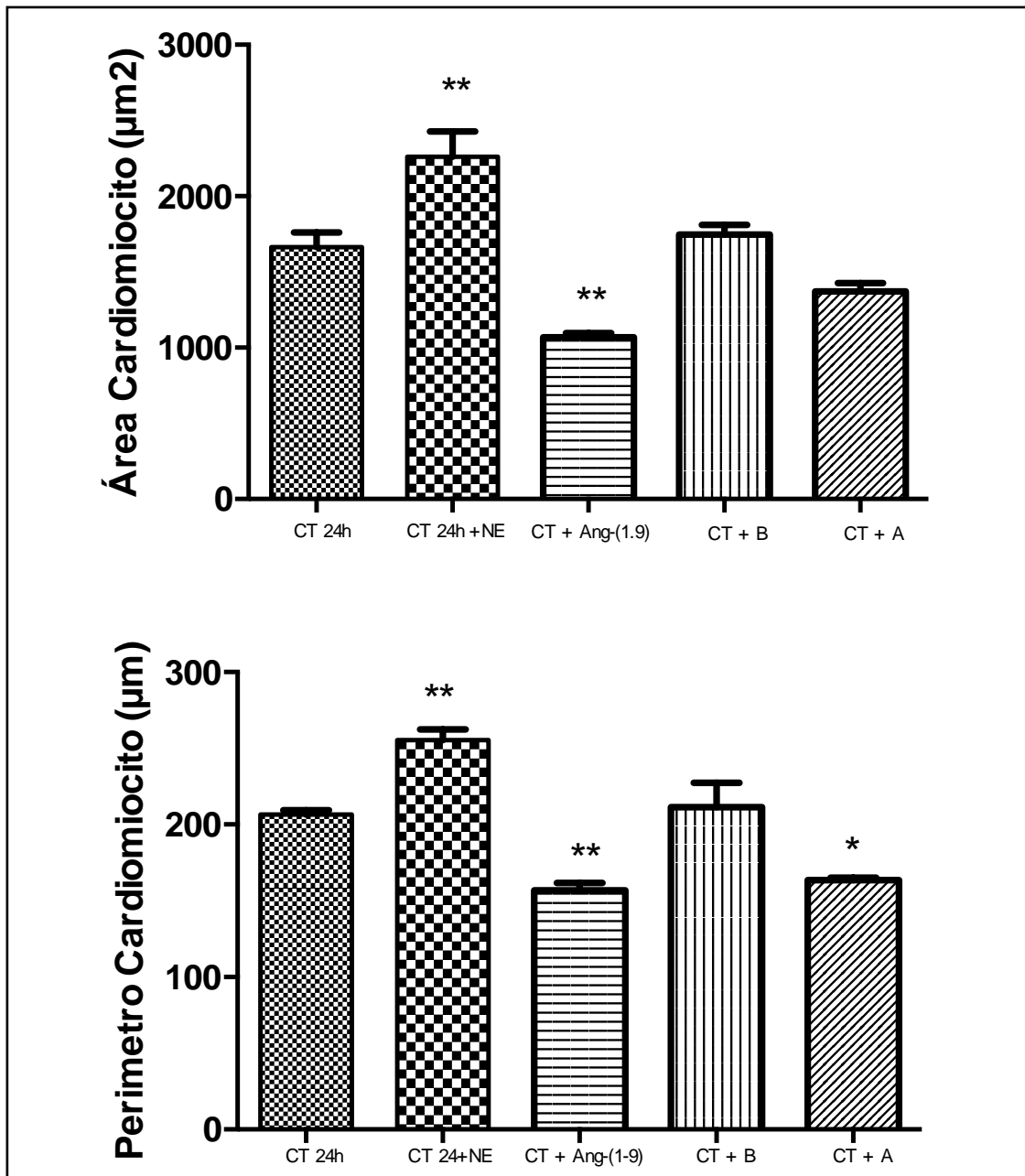


Figura 39. CT24h: Control cardiomiocitos en su medio de mantenimiento por 24 horas; **CT24h+NE:** cardiomiocito + norepinefrina 10 µM **CT+Ang-(1-9):** cardiomiocitos + Angiotensina-(1-9) 10 µM; **CT+B:** cardiomiocito + pNPs EE/alginato sin Ang-(1-9); **CT+A:** cardiomiocitos + pNPs EE/alginato+ Ang-(1-9) + AuNE sin irradiar. Los datos representan valores promedios ± SD (n= 3). Se realizó un ANOVA-Dunnett para comparar el control de 24h con los diferentes tratamientos control, PRISMA Graph *(p<0.05), ** (p<0.001).

En la **Figura 40A** se presenta el promedio de la cuantificación del área cardiomiocitaria con sus respectivos control y tratamientos bajo condición de hipertrofia cardiomiocitaria. Se repitió CT24h+NE en esta gráfica para poder hacer las comparaciones. Entonces, al comparar el control CT24h con los tratamientos: NE+Ang-(1-9), NE+A, NE+AL y CT24h+Ang1-9 se observó una disminución del área cardiomiocitaria que fue estadísticamente significativa (1146.4 ± 16.0 ; 1103.8 ± 13.9 ; 962.5 ± 19.8 ; 1068.2 ± 22.0 v/s $1716.0 \pm 34.7 \mu\text{m}^2$ respectivamente, **Figura 40A**)

Ahora bien, para corroborar la segunda parte de la hipótesis de la presente tesis, se debía demostrar el efecto cardioprotector del sistema polimérico nanoestructurado que contiene Ang-(1-9) y nanoesferas de oro en hipertrofia cardiomiocitaria. Para dar respuesta, se comparó el estímulo de los cardiomiocitos incubados con norepinefrina $10 \mu\text{M}$ (CT24h+NE) quiere decir; cardiomiocitos bajo condición de hipertrofia versus las distintas condiciones ensayadas, y se observó que para: CT+L, NE+Ang-1-9, NE+B, NE+A, NE+BL, NE+AL y CT24h+Ang1-9 disminuyeron el área cardiomiocitaria de forma estadísticamente significativa (1607.8 ± 28.1 ; 1146.4 ± 16.0 ; 1751.6 ± 41.1 ; 1103.8 ± 13.9 ; 1662.4 ± 28.6 ; 962.5 ± 19.8 ; 1068.2 ± 22.0 v/s $2170.8 \pm 21.4 \mu\text{m}^2$ respectivamente, **Figura 40A**).

En la **Figura 40B**, se presenta el promedio de la cuantificación del perímetro cardiomiocitario. Observamos que al comparar CT24h+NE versus su control CT24h el perímetro aumentó significativamente (248.8 ± 2.8 v/s $206.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$ respectivamente, **Figura 40B**). Al comparar los estímulos: NE+Ang-(1-9), NE+A, NE+AL, CT24h+Ang1-9 versus control CT24h se produjo una disminución del perímetro cardiomiocitario (156.7 ± 2.0 ; 154.6 ± 2.3 ; 155.0 ± 1.8 ; 165.5 ± 2.3 v/s $206.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$ respectivamente, **Figura 40B**).

Del mismo modo, en condición de hipertrofia cardiomiocitaria al comparar la condición de CT24h+NE versus: CT+L, NE+Ang-1-9, NE+B, NE+A, NE+AL y CT24h+Ang1-9 se observa una disminución del perímetro cardiomiocitario, que fue

estadísticamente significativo (205.0 ± 3.0 ; 156.7 ± 2.0 ; 166.1 ± 1.7 ; 154.6 ± 2.3 ; 155.0 ± 1.8 ; 165.5 ± 2.3 v/s 248.8 ± 2.8 μm respectivamente, **Figura 40B**).

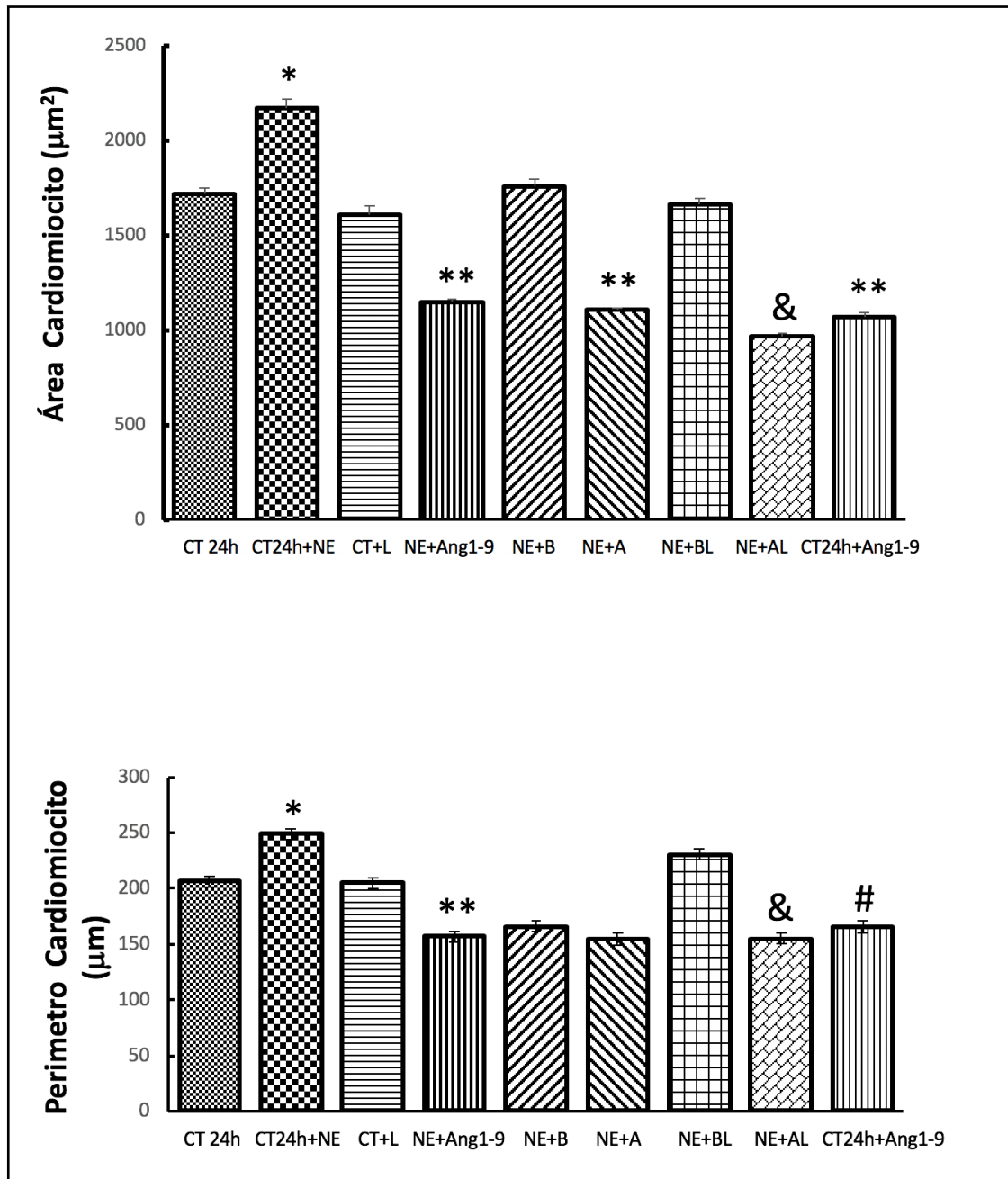
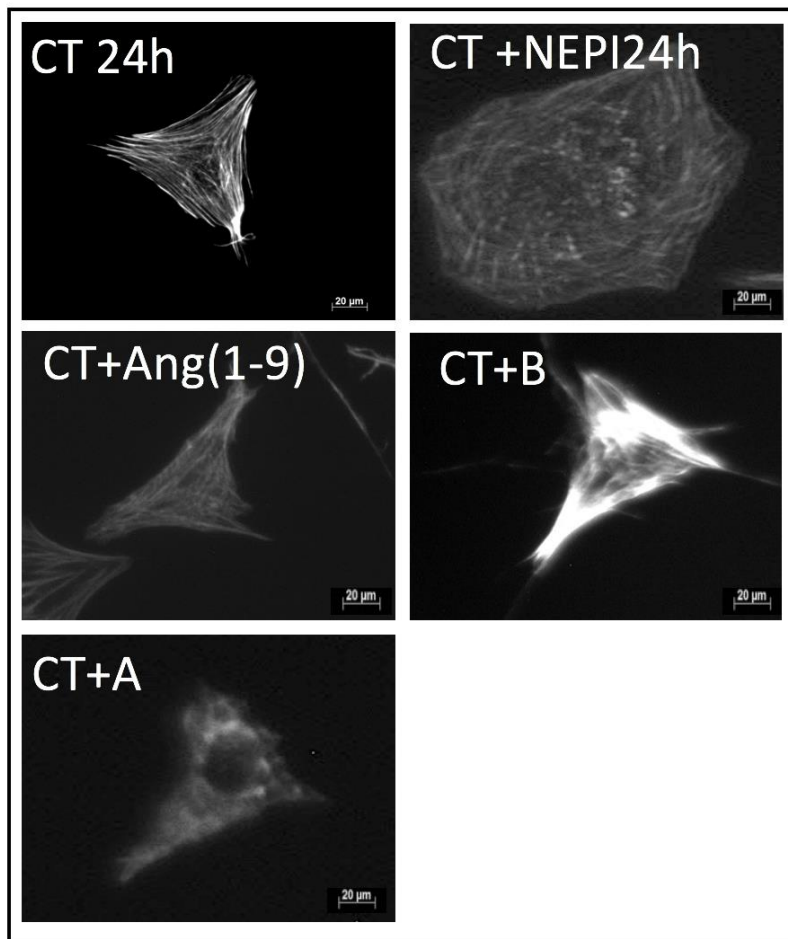


Fig 40. Efecto en al área y perímetro cardiomiocitario (μm^2), (μm) pre-incubación de distintos estímulos. **CT 24h**: control cardiomiocitos en MM (medio mantención) 24h; **CT 24h +NE**: cardiomiocitos 24h + norepinefrina $10 \mu\text{M}$; **CT +laser**: cardiomiocitos+ irradiación 30 min; **NE+Ang-(1-9)**: norepinefrina $10 \mu\text{M}$ +

angiotensina-(1-9) 10 μ M; **NE+B**: norepinefrina 10 μ M + pNPs EE/alginato/sin Ang-(1-9) sin irradiar; **NE + A**: norepinefrina 10 μ M + pNPs EE/alginato/Ang-(1-9)/AuNE sin irradiar; **NE+B L (laser)**: norepinefrina 10 μ M + pNPs EE/alginato sin Ang-(1-9) e irradiada; **NE + A L**: norepinefrina 10 μ M + pNPs EE/alginato+ Ang-(1-9) + AuNE con irradiación.

Los datos representan valores promedios \pm SEM (n= 3). Se realizó un ANOVA-Tukey's de comparación múltiple con una significancia estadística para área de la siguiente forma: * $p < 0.05$ vs todos los grupos tratados, ** $p < 0.05$ vs CT24h, CT+L, NE+B, NE+AL, & $p < 0.05$ vs todos los grupos. Para el caso de perímetro cardiomiocitario de la siguiente forma: * $p < 0.05$ vs todos los grupos, ** $p < 0.05$ vs CT24h, CT+L, NE+B, & $p < 0.05$ vs CT 24h, CT24h+NE, CT+L, NE+BL, # $p < 0.05$ vs CT 24h, CT24h+NE, CT+L con PRISMA Graph.



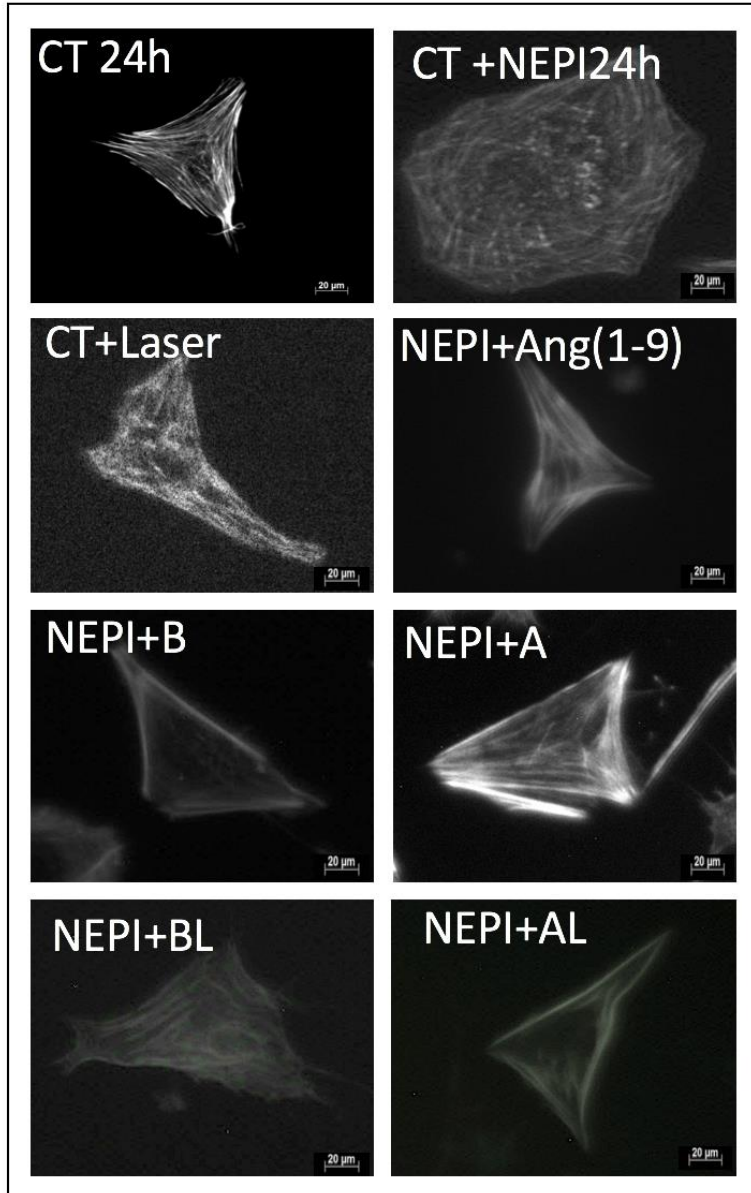


Fig 41. Caracterización de los cambios morfológicos que ocurren en el cardiomiocito de rata neonata sometido a los distintos estímulos. Regla de medición 20 μm .

6. DISCUSIÓN

OBJETIVO 1a

Obtención y caracterización de un nuevo vehículo de EE/alginate

Este estudio reporta un nuevo vehículo basado en coacervación compleja de Alg y EE para la entrega de lisozima como modelo de biológico, evidenciando que las nanoformulaciones variaron según la razón de carga (RC) y la carga total (CR) de los polímeros que participan en la reacción y la cantidad de lisozima (% p/v). Todas las nanopartículas vacías y cargadas con Lys resultaron en tamaños promedio similares y el PZ no se vió afectado por la presencia de lisozima (**Tabla 1**). Se encontró que los valores de potencial zeta dependían del tipo de polímero que predomina en la formulación. Estos resultados son consistentes con los de otros autores [92].

La mayoría de las nanopartículas son altamente estables ya que la mayoría de las formulaciones mostraron un $PZ > \pm 30$ mV (y solo dos formulaciones con valores en el rango de $\pm 20-30$) mV (**Tabla 1**). Estos datos concuerdan con las directrices que clasifican las dispersiones NP con valores de PZ de $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV y $\pm 20-30$ mV y $> \pm 30$ mV como altamente inestable, relativamente estable, moderadamente estable y altamente estable, respectivamente [93,94]. Además, los valores PDI que proporcionan información sobre la homogeneidad del tamaño de partícula, fue inferior a 0.35 para todas las preparaciones.

La caracterización de las nanoformulaciones utilizando SEM mostró una morfología esférica característica de los pNPs de EE/Alg formadas. Los espectros FTIR no mostraron evidencia de interacciones covalentes entre los materiales constituyentes y también sugirieron la ausencia de desnaturalización de Lys. Los polielectrolitos obtenidos electrostáticamente no se basan en nuevos enlaces covalentes que contribuyen a la estructura de la matriz, y como tal, los espectros FTIR se han utilizado en el pasado para mostrar que los grupos funcionales siguen siendo identificables en sistemas combinados [95]. Los espectros FTIR también sugieren

que la estructura secundaria de Lys se retiene después de la síntesis de las pNPs observándose el peak alrededor de 1630 cm^{-1} , en oposición a los cambios que podrían observarse durante la desnaturalización de Lys [96,97].

Para caracterizar el tamaño, el análisis de DLS mostró un tamaño de 106.8 nm y un PDI de 0.221 para las pNP de EE/Alg vacías, lo que indica una muestra de polidispersidad moderada. Esto fue confirmado por visualización de partículas en el NTA. Además, el tamaño promedio obtenido por NTA fue de 93.5 nm, que es aproximadamente 13.3 nm más pequeño que el tamaño dado por DLS, lo que indica un cierto grado de polidispersidad. Esto puede explicarse por el hecho de que las distribuciones de tamaño obtenidas por DLS son distribuciones de intensidad, mientras que NTA proporciona distribuciones numéricas, lo que resulta en una polidispersidad más alta. Otra explicación para el índice de polidispersidad puede deberse a la dificultad inherente para que DLS analice adecuadamente las muestras polidispersas [98]. El mismo fenómeno puede explicar los resultados obtenidos para las nanopartículas cargadas de EE/Alg Lys.

Relación eficiencia de asociación y potencial Z

La lisozima se incorporó a las pNPs de EE/Alg con alta eficacia de asociación (65-89%), lo que puede correlacionarse con la naturaleza anfotérica de Lys, una glicoproteína, que forma complejos con compuestos cargados positiva y negativamente, que favorecen la eficacia de la asociación [99].

Además, la alta eficiencia de asociación para formulaciones con potencial zeta negativo puede atribuirse al predominio del alginato en estas formulaciones. En este contexto, el alginato reduce la pérdida de Lys debido a su capacidad de flexibilidad intrínseca que le permite acomodar moléculas de lisozima, generando una matriz densa de interacción, fenómeno descrito por Saha, AK et al., y Fuenzalida, JP et al., [17, 100].

Relación entre el perfil de liberación y tamaño de la nanopartículas

La liberación de lisozima a partir de pNPs EE/Alg implica un "efecto de estallido" durante la primera etapa de liberación del fármaco, donde se liberó 12.4%, 9.4%, 8.7% y 5.2% de Lys desde las pNPs durante los primeros 30 minutos. La liberación del estallido inicial se atribuyó a la lisozima unida a la superficie en la formulación de nanopartículas [101]. Después de lo cual la liberación se hizo más gradual y el perfil de liberación de las cuatro formulaciones de nanopartículas fue similar después de 72 horas. Estas observaciones proporcionaron una clara evidencia de la capacidad de las pNPs para modular el perfil de liberación de lisozima (Fig. 6). Curiosamente, el estudio de liberación mostró que las pNPs más pequeñas en el tamaño CT 20 RC 1.33 fueron aquellas en las que se observó el efecto de estallido más rápido, seguido de las pNPs CR 30 RC 0.5 que corresponden a la segunda formulación más pequeña que también evidenció este fenómeno. Esto de acuerdo con lo descrito por Agnihotri et al., [102]. Además, la carga restante después de la liberación de estallido podría potencialmente liberarse intracelularmente para el efecto farmacológico de los productos biológicos, como se describió anteriormente [102].

Evaluación de la seguridad

Usando diferentes enfoques, demostramos que la disminución en la viabilidad celular de las células HeLa tratadas con nanopartículas de EE/Alg fue dependiente de la dosis, ya que el tratamiento con concentraciones altas (1.0 y 1.5 μM) de pNPs de EE/Alg inhibió la proliferación de células HeLa de 67.7 a 8.3% (**Figura 16**). Por otro lado, no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en las concentraciones más bajas probadas (0.06 y 0.1 μM) hasta 24 h de incubación, tanto con pNPs positiva como negativa. También se determinó la citotoxicidad de las nanopartículas de EE/Alg, y no se observó un aumento significativo de los niveles de citotoxicidad para concentraciones de pNPs que varían de 0.06 a 0.1 μM . Por otro lado, las concentraciones de pNPs más altas mostraron citotoxicidad significativa a la hora de incubación. El nivel de citotoxicidad obtenido con estas

concentraciones de pNPs de EE/Alg es similar a lo que suele observarse para este tipo de tratamientos con otros modelos celulares [103-105].

Tanto en los ensayos de MTS y LDH, la citotoxicidad de las nanopartículas de EE/Alg fue dependiente de la dosis como de la carga y observamos el mismo comportamiento dependiente de la carga superficial de la nanopartícula (**Figuras 16 y 17**). Esto es, las nanopartículas positivas fueron más citotóxicas para las células HeLa en todas las condiciones probadas. Este resultado puede atribuirse a las diferencias en las interacciones de pNPs con la célula. Otros estudios han demostrado que las pNPs con carga altamente positiva tienen más probabilidades de tener mayores interacciones con la membrana celular, lo que lleva a una mayor citotoxicidad [106-108]. Como ambos tipos de pNPs se obtuvieron utilizando el mismo polímero y tenían tamaños similares, la diferencia en los potenciales zeta es el factor que explica sus diferencias en las fuerzas de interacción. Por lo tanto, es posible que las fuerzas de interacción más fuertes resulten en una mayor citotoxicidad de las pNPs cargadas positivamente.

La morfología celular solo se vió afectada en la concentración más alta probada (1.5 μM), después de 24 h de exposición para pNPs tanto positivas como negativas. En estos casos, observamos constricción y redondeo en la morfología celular de las células HeLa expuestas al tratamiento. Esta reducción en el volumen celular corresponde a un evento único que ocurre en la muerte celular por apoptosis y permite diferenciarla de la muerte celular por necrosis caracterizada por la pérdida de integridad de la membrana y la inflamación irreversible del citoplasma. Se ha descrito que las nanopartículas cargadas inducen la muerte celular por apoptosis, mientras que las nanopartículas neutras inducen necrosis [107].

Las células HeLa, una línea celular de carcinoma epitelial humano, se han utilizado para evaluar la toxicidad de diferentes tipos de nanopartículas, aunque los resultados son contradictorios. Esto se debe a varias razones, incluida la forma en que se analizan y muestran los resultados. En particular, es difícil determinar un

consenso de la concentración de nanopartículas y su efecto en la viabilidad y morfología celular [109,110]. Por lo tanto, la concentración *in vitro* debe evaluarse individualmente para cada nanopartícula. Además, la toxicidad comparativa de las nanopartículas no se puede determinar sin una comprensión clara de las características físicas y fisicoquímicas de estos materiales [111]. En este trabajo, utilizamos diferentes concentraciones fisiológicas y varios enfoques experimentales para evaluar su citocompatibilidad en células HeLa.

CAPITULO I

Objetivo 1b

Caracterización fisicoquímica de pNPs EE/alginate y EE/ sulfobutil- β -ciclodextrina

Todas las formulaciones evaluadas muestran un tamaño aceptable y adecuado PDI. La **Figura 4** muestra que todos los sistemas propuestos son vehículos con un tamaño promedio en el rango nanométrico. Los sistemas EE/alginate resultaron en nanoestructuras de menor tamaño en la mayoría de las relaciones de carga y suma de carga en comparación a EE/sulfobutil- β -ciclodextrina. Esto se condice con el menor peso molecular que presentan los polímeros que intervienen en la primera formulación (EE/alginate) a diferencia del alto peso molecular que presenta la segunda formulación (EE/sulfobutil- β -ciclodextrina) dado fundamentalmente por la contribución de sulfobutil- β -ciclodextrina. En este sentido, el tamaño es un factor crucial que determina absorción, distribución y el comportamiento de nanopartículas *in vivo* [113].

La **Figura 5** muestra rangos de polidispersión aceptables para sistemas propuestos. Valores de PDI cercanos a cero confieren sistemas más homogéneos mientras que valores entre 0,1 y 0,4 para nanopartículas esféricas indican que las partículas poseen distribución polidispersa moderada. Adicionalmente se observa que al aumentar la razón de carga (n+/n-) y número total de cargas (n+ + n-) tanto en EE/alginate y EE/sulfobutil- β - ciclodextrina resultan en mayores valores de

polidispersión, lo que podría estar asociado al incremento en aporte de EE en las formulaciones, que conlleva a la formación de agregados y con ello aumento del valor. Además, se hace relevante el estudio de la polidispersión ya que partículas heterogéneas pueden causar irregularidades en los parámetros farmacocinéticos afectando así la eficacia terapéutica de una formulación farmacéutica [114].

La **Figura 6** muestra que la mayoría de las formulaciones presentaron PZ positivo. Sin embargo, se observa que se produce una inversión en el PZ cuando la razón de cargas ($n+/n-$) está entre 0.5 y 1 para ambos sistemas, debido al aumento del polímero EE Eudragit en las formulaciones. Esto tiene relación con el material polimérico en exceso y cómo éste le confiere la carga superficial positiva a la partícula. De forma general, la carga superficial de los complejos polielectrolitos puede ser fácilmente manipulables por cambios en la mezcla de razón de cargas de los polímeros [115,116].

Los sistemas EE/alginato presentaron un mayor valor absoluto de PZ lo que estaría indicando mayor estabilidad debido a repulsión eléctrica en comparación con un PZ con valor absoluto más bajo que se aprecia para sistemas EE/ sulfobutil- β -ciclodextrina. Este a su vez, condiciona las interacciones entre nanopartículas y las membranas celulares. En este mismo sentido, el PZ describe la estabilidad de las dispersiones coloidales, así cuando el PZ fluctúa entre ± 30 mV, la dispersión coloidal es estable [117,118].

La caracterización de ambas nanoformulaciones utilizando SEM mostró una morfología esférica y excelente correlación del tamaño entre las lecturas por microscopia electrónica de barrido y dispersión dinámica de la luz.

Caracterización fisicoquímica de NE de oro (AuNE)

La caracterización de las AuNE por absorción atómica y su máxima absorción a 519 nm es indicativo de una correcta síntesis de las nanopartículas de oro, según la banda de plasmón superficial obtenida característico para AuNE de tamaños entre 10 y 20nm [119].

El valor de PZ obtenido de las AuNE fue -46.2 ± 2.4 mV y se puede explicar por la adición de citrato como agente reductor del oro en el proceso de elaboración, ya que estas moléculas quedan adsorbidas en la superficie de la nanopartícula, contrarrestando las cargas superficiales positivas de los átomos de oro presentes [120]. Estas moléculas de citrato poseen 3 grupos carboxílicos cargados negativamente a pH 7.4, las cuales estarían contribuyendo a este potencial [119]. Es importante resaltar que, en estos sistemas de coloides dispersos, se requiere que las AuNE posean una carga superficial alejada de la neutralidad (distinta de cero), para favorecer la repulsión electrostática entre ellas y así mejorar los parámetros de estabilidad de la dispersión.

El valor obtenido de tamaño por DLS fue ligeramente superior al observado por microscopía electrónica de transmisión, debido a que por esta técnica se observa la estructura metálica del conjugado y por DLS se determina el radio hidrodinámico que involucra la esfera de hidratación y la capa difusa de la nanoestructura.

Caracterización fisicoquímica de las pNPs EE/Alg cargadas con AuNE

Se seleccionó la formulación de pNPs EE/Alg ya que resultó en menor tamaño. Las nanopartículas en literatura abarcan tamaños desde 10 nm a <1000 nm, sin embargo para aplicaciones biomédicas el tamaño de preferencia debe ser menor a 200 nm. Esto ya que el primer objetivo es evitar la eliminación por el sistema reticuloendotelial, prolongando así el tiempo de circulación en la sangre y aumentando la biodisponibilidad en el sitio objetivo. Y a su vez EE/Alg fue de menor polidispersión en comparación a EE/ sulfobutil- β - ciclodextrina y tal como se describió anteriormente esto determina absorción, distribución y el comportamiento de las nanopartículas *in vivo*, además un PDI menor hace que las pNPs sean más estables.

Una vez seleccionada la formulación de pNPs EE/Alg se evaluó la incorporación de AuNE. Los resultados de la **Tabla 5** reflejan un aumento del diámetro hidrodinámico promedio desde el sistema de nanopartícula polimérica vacía al sistema pNPs EE/Alg con AuNE. La mayoría de las formulaciones presentan PZ positivo. Esto podría deberse a la eficiente encapsulación por parte del material polimérico el cual

predomina por sobre la cantidad de NE oro, así la carga positiva enmascara el potencial Z negativo de las nanoesferas de oro.

La caracterización por TEM de las pNPs EE/Alg cargadas con 2% AuNE, no mostró cambios en la morfología esférica de las nanopartículas. Además se aprecia la eficiente incorporación de las AuNE dentro de la nanoestructura polimérica.

Caracterización fisicoquímica de pNPs de EE/Alg cargadas con Ang-(1-9)

La caracterización por DLS muestra que la incorporación de Ang-(1-9) no afecta sustancialmente el diámetro de la pNPs. El incremento en el contenido de sólidos desde RC: 0.1 a 10 no resulta en aumento del tamaño de la partícula, la cual fue menor a 168.9 ± 2 nm y 142.2 ± 1.1 nm para EE/Alg vacía y EE/Alg/Ang-(1-9), respectivamente. Además, entre las distintas razones de carga, se observa que las pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) en las cuales predomina el polímero alginato (que aporta carga negativa) con RC: 0.1 y 0.25 presentan hasta < 55 nm de diferencia para las mismas razones de carga versus pNPs EE/Alg vacía. Esto se puede explicar en la carga estimada de Ang-(1-9) a pH 4.7 de reacción el cual es de +2.3 unidades de carga estimadas por software ProteinCalculator v3.4, valor de carga positivo que estaría sumándose a las cargas positivas aportadas por el polication EE. Con esto se generaría un mayor acercamiento entre Ang-(1-9) y la cadena polimérica en el proceso de formación y así en nanoestructuras de menor tamaño. La polidispersión no evidencia diferencias entre EE/Alg vacía y EE/Alg/Ang-(1-9), ambas presentan polidispersión adecuada (< 0.4).

Finalmente, el PZ muestra valores negativos en ambas pNPs EE/Alg vacía y EE/Alg/Ang-(1-9) a RC: 0.1 y 0.25 en las cuales predomina el polímero alginato, esto se explica por el aporte de carga eléctrica negativa, generando PZ negativo y enmascarando el aporte de carga positiva de EE. En contraste se observa la inversión a un potencial zeta positivo desde RC: 0.5 a 10 en las cuales es mayor el aporte del polímero positivo EE en relación con alginato, por consecuente a modo general potencial zeta negativo o positivo es dependiente de cuando predominan las cargas negativas o positivas en las nanopartículas desarrolladas.

Presencia Ang-(1-9) en las pNPs EE/alginate con AuNE y su impacto en las propiedades fisicoquímicas

Las 3 formulaciones de pNPs EE/Alg con 2, 20 y 40% de incorporación de Ang-(1-9) y 2% fijo de incorporación de nanoesferas de oro (**Tabla 8**), presentaron tamaños en el rango nanométrico. Contrario a lo reportado por Umerska et al [121], el incremento del péptido Ang-(1-9) no aumentó el tamaño de la nanopartícula. Esto puede deberse a las fuerzas de atracción establecidas entre el péptido y su polimerización-polimerización, como al hecho de que ambos Eudragit y alginato no exhiben una fuerte carga catiónica-aniónica.

Respecto del PZ, este fue positivo o negativo dependiendo de la RC. Así para RC 0.5 siempre se obtuvo un PZ negativo ya que predomina el polielectrolito de carga negativa (Alg), mientras que para RC 10.0 el PZ fue positivo por la predominancia del polielectrolito de carga positiva (EE).

La polidispersión se mantuvo en rangos aceptables para las formulaciones de pNPs EE/Alg con 2 y 20% ang-(1-9) mas 2% de AuNE. Mientras que, para pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 40% y 2% AuNE se obtuvieron rangos de polidispersión de 0.4 clasificada como moderada.

NTA pNPs EE/Alg cargadas con Ang-(1-9) y AuNE

Las pNPs híbridas fueron estables en términos de promedio de diámetro. También la concentración de las nanopartículas fue proporcional al factor de dilución aplicado en las mediciones.

Eficiencia de asociación de Ang-(1-9) en la pNPs EE/Alg

Se obtuvieron resultados de eficiencia de asociación que van desde un (68%-95%) para todas las formulaciones evaluadas (**Figura 28**). Además, el %EA es afectado por la cantidad del polimerización alginato, así el máximo incremento en eficiencia de asociación se observa dentro de las primeras cuatro RC evaluadas en las cuales predomina alginato que por tener carga opuesta estaría permitiendo una mayor

encapsulación de Ang-(1-9). Cuando se considera la carga neta de la superficie de Ang-(1-9) bajo las condiciones de trabajo de pH 4.7 obtenemos una carga neta positiva de 2.3. Por tanto, la carga neta positiva sería atraída por el polianión alginato, causando el alto %EA demostrado para las cuatro primeras formulaciones. Por otro lado, la carga neta positiva de Ang-(1-9) sería rechazada por igualdad de cargas en las RC 1 a 10 en las cuales predomina el polianión Eudragit, disminuyendo el %EA. Este mismo efecto de carga neta superficial y eficiencia de encapsulación fue reportado para otros sistemas nanoparticulados [122].

El incremento del %EA de Ang-(1-9) versus la disminución de alginato desde RC 0.1 a 10 mostró una disminución en el %EA (**Figura 28**) y un incremento en el tamaño de partícula (**Tabla 7**). El %EA de las cuatro primeras RC (0.1, 0.25, 0.5 y 0.75) ensayadas no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0.05$). El mismo comportamiento con similar eficiencia de encapsulación se observa para RC 2.0- 4.0 y 10. Por último se observa que las tres primeras RC ensayadas son estadísticamente diferentes con las otras RC ($p < 0.05$). Por tanto, en base a %EA se seleccionarán para continuar cualquiera de las cuatro primeras formulaciones que evidencian una alta eficiencia de encapsulación de Ang-(1-9).

Eficiencia de asociación de Ang-(1-9) en las pNPs híbridas EE/Alg con AuNE

Las pNPs híbridas mostraron un promedio de %EA de 63%, lo que evidencia la alta afinidad del nanovehículo por encapsular Ang-(1-9) (**Tabla 9**.) Otros autores [123], también lograron altos %EA ~ 60% de heparina en polielectrolitos de quitosano/ácido hialurónico. Esta característica es clave y le confiere ventaja a los complejos polielectrolitos, ya que no será necesario usar altas concentraciones de polímero para que de forma exitosa encapsule el principio activo [121].

Además, se encontró que la eficiencia de asociación de las pNPs EE/Alg por Ang-(1-9) disminuye con el aumento de la concentración de Ang-(1-9) incorporada en las formulaciones. Así, al observar el %EA de Ang-(1-9) y sin considerar el % de incorporación de AuNE que fue determinado a un valor fijo para este estudio, se observa que las pNPs EE/alginato/Ang-(1-9) 2%, 20% y 40% demuestran %EA

mayor cuando disminuye la concentración de Ang-(1-9) incorporada. Este mismo comportamiento fue reportado para otros sistemas de nanopartículas que encapsulan proteínas [122,124].

Perfil de liberación de Ang-(1-9) desde pNPs EE/alginate y su relación fisicoquímica

La liberación *in vitro* desde pNPs EE/Alg a pH 7.4 en PBS y 37°C no logra liberar bajo las condiciones estudiadas para RC: 0.5 y 10 respectivamente a las 48 horas, de realizado el ensayo (**Figura 30**). Para comprender el patrón de liberación se deben considerar varios factores, tales como la cantidad de Ang-(1-9) cargada, la relación de los polímeros EE/alginate en las RC evaluadas, las propiedades de los polímeros utilizados (tamaño de cadena polimérica, flexibilidad, movilidad, adsorción de agua) como de las interacciones entre los polímeros y Ang-(1-9) encapsulada.

Ang-(1-9) desde pNPs EE/Alg para ambas RC ensayadas no evidencio liberación de lo encapsulado bajo las condiciones estudiadas ya que se ve un perfil de liberación de 12% a la primera hora y se observa un máximo de 20-25% de liberación transcurridas 24 horas para RC: 0.5 y 10 respectivamente (**Figura 29 y 30**). Este perfil da cuenta de que para el tiempo final de estudio de liberación que fue de 48 horas no se logro evidenciar la liberación de lo que estaba eficientemente asociado (%EA) a la nanopartícula que es de ~85% para nanopartícula de RC: 0.5 y de ~75% para RC: 10, solo observamos en todo el tiempo evaluado la liberación de lo no eficientemente asociado que estaba en el orden de 15- 25% respectivamente para ambas razones de carga.

El hecho de no lograr ver la liberación del péptido que se encuentra eficientemente asociado a la nanopartícula en el tiempo total de estudio de 48 horas puede sustentarse con lo reportado por Balmert et al., [125] quienes demostraron que entre un péptido con carga positiva se establecen interacciones electrostáticas que reaccionan con el polímero de carga negativa y de esta manera restringen la difusión del péptido a través de la matriz. Con esto se genera una cinética de liberación lenta desde la nanopartícula.

Tanto, Eudragit E y alginato son polímeros que presentan alto peso molecular [126] y sus soluciones en agua son viscosas. Esta alta viscosidad podría estar favoreciendo el proceso de encapsulación del péptido y con ello una liberación mucho más sostenida en el tiempo. En línea con esto, ha sido demostrado que la viscosidad de la solución de alginato, aumenta a medida que disminuye el pH [127], el cual para efectos de este ensayo fue de 4.7. Esto resulta en una alta viscosidad de la solución lo que estaría formando una fuerte pared de contención en las nanopartículas que encapsulan Ang-(1-9) y por tanto una menor capacidad de hidratación de la nanoestructura polimérica y con ello un perfil de liberación más lento.

Junto con lo anterior, el estudio de factor similitud obtuvo un f_2 de 61.22 lo cual indica similitud entre ambos patrones de liberación.

La cinética de liberación lenta obtenida desde pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) RC: 0.5 y 10 justifica la utilización de estrategias que permitan desarrollar un sistema controlado de liberación. De esta manera se sustentó la idea de formular sistemas de nanopartículas híbridas haciendo uso de AuNE incluidas en nanopartículas poliméricas. Todo esto con la finalidad de mejorar la eficacia de entrega controlada del péptido Ang-(1-9), estrategia que ha sido ampliamente utilizada por otros autores para la entrega de activos de interés [128-130].

Evaluación de la seguridad

La citotoxicidad de Ang-(1-9) y pNP híbridas se examinó en células de cardiomiocito de rata neonata para evaluar cualquier posible interacción tóxica con las células. Como se mencionó anteriormente, Ang-(1-9) no fue tóxico para las células de cardiomiocito de rata neonata para ningún tiempo y concentración ensayada.

El porcentaje de viabilidad de los cardiomiocitos por ensayo MTS tras la exposición a pNPs híbridas a concentraciones de 2.1-51.8 $\mu\text{g/mL}$ no tuvo diferencias significativas respecto al control. Para el ensayo MTS tras la exposición a pNPs híbridas y aplicación de radiación láser, solo a la máxima concentración ensayada de 51.8 $\mu\text{g/mL}$ se observó diferencia significativa respecto el control, lo cual podría

deberse a la combinación de la concentración de pNPs híbridas y el efecto de la irradiación.

La viabilidad celular se evaluó seleccionando la formulación de pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% con AuNE 2% RC: 0.5 y CT:15, precisamente ya que exhibe PZ negativo al predominar en esta formulación el polímero alginato. Considerando de esta forma una característica clave que contribuye a la toxicidad de las nanopartículas, el PZ positivo descrito por Loretz y Bernkop-Schnurch [131]. Así lo han demostrado también varios autores, por mencionar Umerska et al., [121] quienes sugieren que ácido hialurónico (carga negativa) presente en las NPs ejerce un efecto protector contra la influencia de protamina, como también previamente descrito para ácido hialurónico versus quitosano (carga positiva) por el mismo grupo. El efecto protector de ácido hialurónico contra la toxicidad de otras policonjugaciones como por ejemplo poliarginina ha sido demostrado también por Kim et al [132]. Además, la carga positiva demostrada por un PZ positivo de las nanopartículas ha sido reportada con alta citotoxicidad, ya que causa alteración de la integridad de la membrana plasmática y daño mitocondrial, lisosomal [133].

De acuerdo a lo anterior se escogió la formulación de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% con AuNE 2% de PZ negativo. Esto es importante ya que se espera que la pNPs híbrida una vez administrada no sea internalizada sino que interactúe con su receptor de membrana para ejercer el efecto deseado.

Ahora bien, respecto del ensayo de MTS en cardiomiocito de rata neonata a distintos tiempos de aplicación de irradiación, vemos que a tiempo 0.5 y 1 hora de irradiación a 532nm y 2 mW la viabilidad celular no se vio reducida. Esto puede explicarse por el breve periodo de irradiación láser y por el hecho de la longitud de onda de 532nm ya que coincide con el peak de resonancia de plasmón superficial (RPS) de las nanoesferas de oro, donde exhiben la absorción máxima [134].

Lopez J.P. 2018., observó también que a un muy breve tiempo de exposición de irradiación a 532nm y 20 mW de las células de osteoblastos durante 90 segundos no se vio afectada la población celular de forma significativa. Y solo se observó una

reducción del 89% en la viabilidad de cardiomiocito de rata neonata a tiempo de 24 horas de irradiación, por lo que suponemos que el láser por sí solo durante 24 horas de irradiación continua está produciendo daño significativo en las células [135].

CAPITULO II

Para comprender los efectos de las nanoformulaciones *in vitro*, se deben considerar los parámetros fisicoquímicos cuando estas interactúan con sistemas biológicos de manera de evitar problemas con la reproducibilidad y escalamiento relacionados con una insuficiente caracterización de las formulaciones [136,137].

Como era de esperar, el tamaño, PDI y PZ de las pNPs híbridas fueron medio dependiente y no necesariamente tiempo dependiente. En cuanto al tamaño y a diferencia de lo observado por Umerska, et al., [121] para sistemas polielectrolitos HA/PROT (ácido hialurónico/protamina), no se observó un incremento gradual del tamaño de las nanopartículas durante el primer periodo de almacenamiento, sino más bien se observa que el incremento de tamaño de las pNPs híbridas fue dependiente del medio de incubación, donde DMEM con 10% FBS muestran mayores tamaños de pNPs híbridas (**Figura 35A**). Probablemente atribuible a la formación de la corona de proteínas, definida como la adsorción de proteínas sobre la superficie de las nanopartículas [138-142]. Esto se ha demostrado en otros estudios con diferentes NPs, medios y líneas celulares [143-146]. Es precisamente es la corona de proteínas que incrementa el diámetro hidrodinámico de las pNPs híbridas en medio con FBS y plasma, resultado acorde a lo reportado por Strojan et al [147].

Adicionalmente el cambio de tamaño de las pNPs híbridas en medio DMEM con 10% de FBS, puede atribuirse al hecho que los medios de cultivos poseen cloruro de sodio (a concentración 6 g/L) y al ser incubados con nanopartículas se ha descrito un intercambio iónico entre iones Ca^{2+} y los iones Na^{+} presentes en el

medio, afectando el entrecruzamiento de las cadenas de polímero, con evidente aumento del su tamaño [148].

La polidispersión de las pNPs híbridas aumentó de forma significativa para los medios en 10% FBS y plasma, consecuencia de la agregación que estas experimentan en medios biológicos debido a la neutralización de la carga superficial por las especies iónicas presentes en los medios [149].

Dependiente de los medios ensayados: PBS, 10% FBS y plasma, el PZ convergió a un menor valor, lo que puede ser explicado para el medio de plasma a partir de su composición, la que consiste fundamentalmente de 90% de H₂O y 7% de proteínas de las cuales las más abundantes son albumina 45-55% y globulinas 5-25% que presentan carga negativa dependiente del pH del medio en que se encuentren [150]. La carga neta de la albumina a pH 7 es de -19. Entonces a pH experimental de 4.9 y al ser este un ambiente ácido condiciona a que más grupos protonables estén disponibles y por lo tanto la carga se vuelve menos negativa, lo que explicaría el PZ de las pNPs híbridas en plasma. Adicionalmente, es el mismo PZ de las nanopartículas el que tiende a adsorber proteínas de los medios FBS y plasma a través de interacciones electrostáticas lo que conlleva a un PZ menos negativo.

Liberación Ang-(1-9) desde pNPs híbridas mediado por irradiación láser

Luego de evaluar el perfil de liberación de pNPs híbridas de EE/alginato/Ang-(1-9) 20% y 2% AuNE ya sea con o sin aplicación de irradiación láser, se demuestra una cinética de liberación de estallido a los primeros 15 minutos. Entendiéndose por “liberación estallido”, la liberación de un gran porcentaje inicial del encapsulado, inmediatamente después de dispuestas las nanopartículas en su medio de liberación, fenómeno que ocurre y ha sido descrito en muchas de las formulaciones de liberación controlada [151-154].

Ahora bien, la liberación estallido se puede ver desde dos perspectivas: a menudo se considera como una consecuencia negativa de la creación de sistemas de

liberación controlada a largo plazo o, en ciertas situaciones, puede ser conveniente una liberación rápida o alta tasa inicial de administración [151]. Respecto de la causa que genera esta liberación estallido, se ha atribuido a una variedad de parámetros físicos, químicos, de formulación, características de la superficie, gatilladores, por mencionar algunos [151]. Sin embargo, para este ensayo se cree que podría deberse a la contribución por una parte de la Ang-(1-9) libre y unida a la superficie de la pNPs híbrida la cual se libera rápidamente una vez en medio de liberación, fenómeno que ha sido observado y descrito por otros autores. Además también contribuye el aumento de temperatura que experimentaron las pNPs híbridas, desde 25°C a 37°C. Un ejemplo de esto son los estudios de Gutowska et al., que desarrollaron hidrogeles de N-isopropilacrilamida para la liberación de heparina, evidenciando que una vez en el medio de liberación a 37°C se produjo la liberación estallido, seguida por una liberación más lenta que la inicial [155]. Después de transcurrida la liberación estallido se observa una cinética de liberación gradual y muy similar hasta completado el 100% de liberación.

A discutir, es el hecho de que nosotros incorporamos en el sistema de pNPs de EE/Alg las AuNE con el objetivo de obtener un perfil de liberación más rápido versus sin la incorporación de AuNE en sistemas de nanopartículas poliméricas que demuestran un perfil de liberación más lento [39]. Por ejemplo, Campardelli et al., desarrollaron NPs de PLGA-AuNps utilizando rodamina B como modelo de fármaco. Lo que obtuvieron fue una liberación de rodamina B en 10 días sin aplicación de irradiación láser y sin la presencia de AuNPs, mientras que con la aplicación de irradiación y diferentes porcentajes de incorporación de AuNPs la liberación de rodamina B se redujo de 10 días a 5 min [156].

Por tanto un segundo punto importante a discutir, es el hecho de que no observamos diferencias estadísticas en los perfiles de liberación de la pNPs híbridas EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% con y sin aplicación de irradiación. Para dar explicación a esto, tenemos que mencionar que previamente en nuestro laboratorio Vivanco A., 2017, demostró que la irradiación láser (longitud de onda 532 nm, 2 mV) por sí sola no posee la capacidad de aumentar la temperatura, en experimentos de irradiación

de microgeles sin AuNE. Además Vivanco A., 2017 demostró que la irradiación láser solo es capaz de aumentar la temperatura de sistemas de microgeles con AuNE en 2-3°C de temperatura durante los primeros 10 minutos de irradiación. A partir de estos antecedentes es que se decide realizar los ensayos de liberación desde nuestras pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% mantenidas a 37°C y con o sin aplicación láser [157].

Por otro lado, el mismo grupo de investigación de nuestro laboratorio, evaluó la liberación desde microgeles cargados con curcumina y AuNE de oro, con y sin aplicación de irradiación durante 60 min, manteniendo siempre la temperatura de los sistemas constante en 20°C. Ellos vieron un aumento de la liberación de curcumina, pero está fue insignificante cuando se comparó con la cantidad encapsulada ($1.5 \pm 1.1\%$) del total cargado. Volvieron a repetir este experimento, pero manteniendo los sistemas a 37°C, obteniendo el mismo resultado anterior. Por lo tanto, concluyen que no existen diferencias significativas en la liberación de curcumina con o sin aplicación de irradiación láser [157].

Precisamente nuestros resultados están en línea con lo anteriormente descrito, sin embargo no hay que dejar de mencionar factores como lo son la longitud de onda y potencia del láser de 2 mV la cual podría ser muy baja para lograr ver cambios en el perfil de liberación consecuencia del efecto de plasmón superficial. Así lo reporta el estudio de Honda et al., quienes compararon dos láser uno de 532nm con potencia ~ 1 mV y 488nm con potencia ~ 3 mV al irradiar una sola AuNP. Los datos mostraron que el láser de 488nm con potencia ~ 3 mV no fue suficiente para generar calentamiento de la AuNP basado en la resonancia de plasmón superficial, comparado con el láser de 532nm y potencia de ~ 1 mV que demostró un incremento de 10 grados Celsius de la temperatura original, longitud de onda que coincide con la máxima absorción de las AuNP [158]. Ahora bien, nuestros experimentos fueron llevados a cabo con irradiación del sistema de nanopartículas híbridas EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% y ha sido reportado que cuando la absorción del material circundante en este caso la matriz polimérica absorben luz, especialmente cerca de 540nm, la absorción relativa de las AuNE se reducirá [158]. Esto podría respaldar

el hecho de no ver diferencias en la liberación gatillada por el efecto de resonancia de plasmón superficial en los sistemas de pNPs híbridas EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% con y sin aplicación de irradiación. Del mismo modo, se calculo la dosis de radiación expresada en joules aplicada al sistema de irradiación durante 1 hora de aplicación de radiación continua, la que fue de 7,2 joules.

Liberación de Ang-(1-9) desde pNPs híbridas mediado por concentración de AuNE e irradiación láser

Una segunda aproximación, fue ver si al aumentar la concentración de AuNE en las pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) de 2 a 20% de AuNE se vería algún cambio en su perfil de liberación. La gráfica y análisis estadístico dan cuenta de que no existen diferencias significativas en el perfil de liberación de Ang-(1-9) basado en una mayor concentración de AuNE presente en el sistema. Esto podría deberse a una encapsulación al azar de las AuNE en la matriz polimérica, durante el proceso de formación por coacervación de las NPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) de 2 o 20% de AuNE. Por lo tanto, podríamos tener pNPs híbridas encapsulando 1 AuNE, pNPs híbridas encapsulando más de 1 AuNE y otras pNPs híbridas sin AuNE, lo cual se corrobora al observar las imágenes de TEM (**Figura. 26**) en la que se puede apreciar pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-1(1-9) encapsulando > de 10 AuNE, mientras otras con no > 4 AuNE, por lo que a pesar de incrementar de 2% a 20% de AuNE, vemos una limitante en el proceso de preparación de las pNPs híbridas que nos impide asegurar una encapsulación de AuNE controlada.

Resultados similares son los obtenidos por Luque-Michel, E. et al., quienes a través de la caracterización por TEM mostraron un mal control de eficiencia de encapsulación de AuNPs, lo que dió como resultado la presencia de numerosas NPs de PLGA sin AuNPs y otras con AuNPs [159]. El mismo grupo, como estrategia para mejorar la encapsulación, modificó la concentración de AuNPs lo que mejoró la encapsulación a medida que se incrementó la concentración de AuNPs, obteniendo una eficiencia de encapsulación que finalmente resultó indistintamente limitada. Una forma de mejorar esto es mediante la utilización de estabilizantes de AuNPs en la matriz polimérica para lograr así una selectividad del 100% en la

encapsulación y lograr de esta forma ver diferencias en la liberación desde pNPs híbridas.

CAPÍTULO III

El tratamiento con norepinefrina a concentración 10 μ M induce un significativo aumento del área y perímetro cardiomiocitario respecto de su control, lo que demuestra el desarrollo de la hipertrofia cardiomiocitaria. Resultado que es consistente con lo reportado [74]. El tratamiento con Ang-(1-9) 10 μ M por sí solo redujo el área y perímetro cardiomiocitario. Además, para el caso de perímetro cardiomiocitario se evidencia una disminución con el tratamiento de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% sin irradiar.

Angiotensina-(1-9) a 10 μ M como pre-tratamiento de incubación en los cardiomiocitos de rata neonata fue capaz de prevenir el aumento del área y perímetro cardiomiocitario. De hecho se pudo ver que redujo ambos parámetros a valores menores que el control CT24h, manteniendo aun así dentro de valores normales de área y perímetro cardiomiocitario. Esto podría explicarse por la concentración de Ang-(1-9) utilizada de 10 μ M, que no es la mínima concentración con la que se ha visto efecto en reversión de la hipertrofia [74].

Nuestro estudio muestra que el pre-tratamiento con pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% con y sin aplicación de radiación láser, fue capaz de prevenir la hipertrofia cardiomiocitaria. Por lo tanto con o sin la aplicación de irradiación, las pNPs híbridas al ser pre-incubadas con los cardiomiocitos de rata neonata y mantenidas a 37°C del ensayo experimental, liberan el péptido angiotensina-(1-9) (comentado también en los resultados de liberación *in vitro*) mediando su efecto a través de la disminución de área y perímetro cardiomiocitario.

Del mismo modo se cálculo la osmolaridad de las soluciones de nanopartículas EE/Alg/ y EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2% y medio de mantención de los cultivos primarios de cardiomiocito obteniendose una osmolaridad de \sim 300 Mosmol/L para todos los casos, por lo tanto las células cardíacas no estuvieron expuestas fisiológicamente a grandes fluctuaciones en la osmolaridad externa.

CONCLUSIONES FINALES

1. En base a lo descrito se puede concluir que se logró generar un nuevo vehículo basado en la coacervación compleja de alginato y un polimetacrilato catiónico (EE) para el suministro de la proteína modelo lisozima. Al controlar la CT y la RC, hemos demostrado que es posible controlar el tamaño y las propiedades de la superficie, lo que da como resultado pNPs que tienen una polidispersidad moderada y pueden incorporar la lisozima de manera eficiente. Además, la caracterización de la citocompatibilidad mostró resultados prometedores en la viabilidad celular y la citotoxicidad, mientras que solo las concentraciones más altas de pNPs tienen un efecto perjudicial en las células HeLa. En general, nuestros resultados muestran el potencial de estas nuevas nanopartículas poliméricas Eudragit EE/Alg para su uso en aplicaciones biomédicas y puedan liderar el camino en el futuro desarrollo de nanovehículos desarrollados por coacervación para la entrega de biológicos.
2. La incubación de las pNPs híbridas en diferentes medios cambia los parámetros fisicoquímicos de las nanopartículas. Además, los resultados revelan que la incubación de las pNPs híbridas en medios biológicos como FBS y plasma causa la adsorción de proteínas del medio sobre la superficie de las nanopartículas, lo que determina la formación de la corona de proteínas.
3. De acuerdo a los estudios de liberación, hemos podido demostrar que para pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% + AuNE 2 o 20% con o sin irradiación láser y mantenidas a 37°C durante el estudio de liberación, logran un máximo del 100% de liberación del péptido Ang-(1-9) transcurrido 75 minutos del ensayo.
4. El estudio de eficacia, demuestra que las pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2% con aplicación de irradiación láser y pre-tratamiento en cardiomiocito de rata neonata que posteriormente es incubado con NE, fue

capaz de prevenir el desarrollo de HC. La HC que es un proceso crónico y que por tanto puede requerir altas concentraciones y una exposición constante al péptido Ang-(1-9) para contrarrestar las señales pro-crecimiento, por lo que un tratamiento convencional con Ang-(1-9) se hace difícil, debido a su reducida vida media, al ser degradada por la ECA. Dicho sea esto, este nuevo sistema de entrega para Ang-(1-9) promete ser un enfoque eficaz para prevenir el desarrollo de HC.

El presente trabajo de tesis reporta. Primero, se formulo de forma exitosa un vehículo de nanopartículas poliméricas y nanopartículas híbridas para vehiculizar dos péptidos biológicos de interés: lisozima y Ang-(1-9).

En segundo lugar, se obtuvieron perfiles de liberación para Ang-(1-9) cargada en la nanopartícula híbrida con un cinética estallido inicialmente seguida de una liberación gradual. De manera que futuras investigaciones podrían plantearse como objetivo el desarrollo de nanopartículas híbridas que tengan como blanco dirigirse directo al corazón de manera de liberar la Ang-(1-9) en el organo blanco de interés. Respecto de la liberación gatillada por irradiación láser, no vimos cambios en el perfil de liberación con y sin láser, lo que se podría atribuir a la potencia del láser y la absorción por parte de la nanoestructura polimérica de parte de la radiación.

En tercer lugar, se comprobó que las nanopartículas seleccionadas resultaron seguras al evaluar en línea celular y cultivo primario.

En cuarto lugar, al evaluar la eficacia de las pNPs híbridas de EE/Alg/Ang-(1-9) 20% +AuNE 2% con aplicación de irradiación láser y pre-tratamiento en cardiomiocito de rata neonata que posteriormente es incubado con NE, se evidencio que fueron capaz de prevenir el desarrollo de HC y remodelado cardiovascular patológico del corazón, por tanto su potencial como nueva forma terapéutica para prevención de la HC.

LIMITACIONES DE LA PRESENTE TESIS

1.- Estudios de liberación del vehículo nanoparticulado EE/Alg/Ang-(1-9) 2% RC: 0.5 y 10.0 se realizó hasta un tiempo de 48 horas, lo que no permitió visualizar la liberación del péptido eficientemente asociado a la nanopartícula, por tanto idealmente se debió haber realizado hasta un tiempo finito donde lográramos observar el 100% de liberación de lo encapsulado.

2.- No se llevo a cabo procedimiento de purificación/aislamiento de la alicuota tomada para estudios de liberación de la nanopartícula EE/Alg/Ang-(1-9), esto por ser un procedimiento difícil de ejecutar para sistemas de polielectrolitos complejos. Por este motivo vemos en los estudios de liberación inicialmente la liberación de lo no eficientemente asociado a la nanopartícula o dicho de otra forma lo libre del péptido.

3.- No logramos ver diferencias en el perfil de liberación de pNPs EE/Alg/Ang-(1-9) 20%+AuNe 2 o 20% con y sin aplicación láser, esto puede ser explicado por: a) La inclusión al azar del número de AuNE en las nanopartículas poliméricas, esto es; en algunas nanopartículas poliméricas observamos por TEM 9 AuNE, mientras en otras 1 o 5 AuNE, por lo que el efecto de resonancia de plasmón superficial podría tener mayor o menor incidencia basado en la distribución no homogénea de las AuNE. Ahora bien una forma de solucionar esto para futuros estudios, es llevar a cabo la estandarización del número de AuNE a incorporar en las nanopartículas poliméricas por microfluídica, b) potencia del láser, la cual fue de 2mV, que es el láser con que contabamos en el laboratorio y es de potencia menor a la reportada por otros otros que si han visto cambios en el perfil de liberación frente la aplicación de irradiación.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Recio, C., Maione, F., Iqbal, A. J., Mascolo, N., De Feo, V. The Potential Therapeutic Application of Peptides and Peptidomimetics in Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology*. **2017**, 7, 526.
2. Lax R., Meenan C. Challenges for therapeutic peptides part 1: on the inside, looking out. *Innov. Pharm. Technol.* **2012**, 42 54–56.
3. Uhlig T., Kyprianou T., Martinelli F. G., Oppici C. A., Heiligers D., Hills D., et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: from exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*. **2014**, 4 58–69.
4. Bruno, B.J., Miller, G.D., Lim, C.S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Ther. Deliv.* **2013**, 4, 1443–1467.
5. Richardson, P., Murphy, W.L., Mooney, D.J. Polymeric delivery of proteins and plasmid DNA for tissue engineering and gene therapy. *Crit. Rev. Eukaryot.* **2001**, 11, 47–58.
6. Thakker SP, Rokhade AP, Abbigerimath SS, Iliger SR, Kulkarni VH, More UA, et al. Inter-polymer complex microspheres of chitosan and cellulose acetate phthalate for oral delivery of 5-fluorouracil. *Polym. Bull.* **2014**, 71, 2113–2131.
7. Philipp B, Dautzenberg H, Linow K, Kotz J. Polyelectrolyte complexes - Recent Developments and Open Problems. *Prog. Polym. Sci.* **1989**, 14, 91–172.
8. Kabanov VA, Zezin AB, Rogacheva VB, Grishina NV, Goethals EJ, Vandeveldel M. Properties of Polyelectrolyte Complexes Containing Poly(N-Tert-Butylaziridine). *Makromol. Chemie-Macromolecular Chem. Phys.* **1986**, 187, 1151–1158.
9. Kazemzadeh -Narbat M, Reid M, Brooks MSL, Ghanem A. Chitosan nanoparticles as adenosine carriers. *J. Microencapsul.* **2015**, 32, 460–466.

10. Park JH, Lee S, Kim JH, Park K, Kim K, Kwon IC. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 113–137.
11. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and *in vitro* characterisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68(3), 513–525.
12. Bulmer C, Margaritis A, Xenocostas A. Encapsulation and Controlled Release of Recombinant Human Erythropoietin from Chitosan-Carrageenan Nanoparticles. *Curr. Drug Deliv.* **2012**, 9(5), 527–537.
13. Prusty AK, Sahu SK. Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnol.* **2013**, 1–6.
14. Hartig SM, Greene RR, Dikov MM, Prokop A, Davidson JM. Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm. Res.* **2007**, 24(12), 2353–2369.
15. Krone V, Magerstadt M, Walch A, Groner A, Hoffmann D. Pharmacological composition containing polyelectrolyte complexes in microparticulate form and at least on active agent. *United States patent.* **1997**, 23, 5,700,459.
16. Schmitt C, Sanchez C, Despond S, Renard D, Thomas F, Hardy J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4. *Food Hyd.* **2000**, 14, 403–413.
17. Saha AK, Ray SD. Effect of cross-linked biodegradable polymers on sustained release of sodium diclofenac-loaded microspheres. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2013**, 49(4), 873–888.
18. Rasente RY, Imperiale JC, Lázaro-Martínez JM, Gualco L, Oberkersch R, Sosnik A, et al. Dermatan sulfate/chitosan polyelectrolyte complex with potential application in the treatment and diagnosis of vascular disease. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 144, 362–370.

19. Jelvehgari M, Zakeri-Milani P, Siahi-Shadbad MR, Loveymi BD, Nokhodchi A, Azari A, et al. Development of pH-sensitive Insulin Nanoparticles using Eudragit L100-55 and Chitosan with Different Molecular Weights. *AAPS PharmSciTech*. **2010**, 11,1237–1242.
20. Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll*. **2011**, 25, 251–256.
21. Downs EC, Robertson NE, Riss TL, Plunkett ML. Calcium alginate beads as a slow-release system for delivering angiogenic molecules In Vivo and In Vitro. *J. Cell. Physiol*. **1992**, 152(2), 422–429.
22. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm*. **2005**;289:1–30.
23. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev*. **2005**;4:298–306.
24. Wang W. Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. **1999**,185:129–88.
25. Tianshun Lian, Rodney J.Y. HO. Trends and Developments in liposome Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutics Sciences*. **2001**,90, 667-680.
26. Saltzman, W. M. Drug delivery: engineering principles for drug therapy. *Oxford University Press*. **2001**.
27. Silva, GA. Nanotechnology approaches to crossing the blood-brain barrier and drug delivery to the CNS. *BMC Neuroscience*. **2008**,9: Supl 3-4.
28. Hillaireau, H., & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2009**, 66(17), 2873-2896.
29. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. **2006**; 2, 8-21.

30. Xu, J.P., Ji, J., Chen, W.D., Shen, J.C. Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery. *J. Control. Release.* **2005**;107, 502–512.
31. Ahmed, F., Pakunlu, R.I., Brannan, A., Bates, F., Minko, T., Discher, D.E. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J. Control. Release.* **2006**;116, 150–158.
32. Ahmed, F., Discher, D.E. Self-porating polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *J. Control. Release.* **2004**; 96,37–53.
33. Zheng, C., Qiu, L., Zhu, K. Novel polymersomes based on amphiphilic graft polyphosphazenes and their encapsulation of water-soluble anticancer drugs. *Polymer.* **2009**, 50, 1173–1177.
34. Christian, D.A., Cai, S., Bowen, D.M., Kim, Y., Pajerowski, J.D., Discher, D.E. Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and proteins therapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 71, 463–474.
35. Kim, Y., Tewari, M., Pajerowski, J.D., Cai, S., Sen, S., Williams, J., Sirsi, S., Lutz, G., Discher, D.E. Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *J. Control. Release.* **2009**; 134, 132–140.
36. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2008**, 60(11):1307-1315.
37. Meier SA: Plasmonics: Fundamentals and Applications. (1st). *Springer Science, New York, NY.* **2007**,234.
38. Adura, C, Guerrero, S, Salas, E, Medel, L, Riveros, A, Mena, J, Arbiol, J, Albericio, F, Giralt, E, Kogan, MJ. Stable Conjugates of Peptides with Gold

- Nanorods for Biomedical Applications with Reduced Effects on Cell Viability. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2013**,5 (10), 4076–4085.
39. Guerrero, AR, Hassan N, Escobar CA, Albericio F; Kogan, MJ; Araya, E. Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine*. **2014**, 9(13), 2023-2039.
40. A. Mukerjee, A. P. Ranjan and J. K. Vishwanatha. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 3714–3721.
41. Huang X, Neretina S, El-Sayed MA: Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, 21(48), 4880-4910.
42. Liu J, Detrembleur C, De Pauw-Gillet M-C, Mornet S, Duguet E, Jerome C: Gold nanorods coated with a thermo responsive poly(ethylene glycol)-b-poly(N-vinylcaprolactam) corona as drug delivery systems for remotely near infrared triggered release. *Polym. Chem.* **2014**, 5(3), 799-813.
43. Who, international cardiovascular diseases, **2014**.
44. Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF- κ B–dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. **1999**,104(11):1603-12.
45. Heineke J, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2006**;7(8):589-600.
46. Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annual review of physiology*. **1993**,55:55-75.
47. Cooper IVMDG. Basic determinants of myocardial hypertrophy: A Review of Molecular Mechanisms. *Annual Review of Medicine*. **1997**,48(1):13.

48. Molkenkin JD, Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* **2001**,63:391-426.
49. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* 1999, 21;341(17):1276-83.
50. Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* **2005**,289(1):8-16.
51. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *Journal of the American College of Cardiology.* **1998**,32(5):1454-9.
52. McKinsey TA, Olson EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Current opinion in genetics & development.* **1999**,9(3):267-74.
53. Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE. Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Revista espanola de cardiologia.* **2006**, 59(5):473-86.
54. Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Japanese circulation journal.* **2001**, 65(5):353-8.
55. Bader M, Bohnemeier H, Zollmann FS, Lockley-Jones OE, Ganten D. Transgenic animals in cardiovascular disease research. *Experimental physiology.* **2000**, 85(6):713-731.
56. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany). **2001**,79(2-3):76-102.
57. Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *The Lancet.* **2007**, 370(9587):591-603.

58. Okunishi H, Oka Y, Shiota N, Kawamoto T, Song K, Miyazaki M. Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents. *Japanese journal of pharmacology*. **1993**, 62(2):207-210.
59. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*. 2008, 264(3):224-236.
60. Giles TD. Renin-angiotensin system modulation for treatment and prevention of cardiovascular diseases: toward an optimal therapeutic strategy. *Reviews in cardiovascular medicine*. **2007**, 8 Suppl 2:14-21.
61. Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Experimental physiology*. **2005**, 90(4):449-55.
62. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. **2000**, 275(43):33238-33243.
63. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. **2000**, 87(5):1-9.
64. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. **2006**, 47(3):515-521.
65. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, et al. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. **1994**, 35:293-298.

66. Krakoff LR. Diuretics for Hypertension. *Circulation*. **2005**, 112: e127-e129.
67. Shah SU, Anjum S, Littler WA. Use of diuretics in cardiovascular disease: (2) hypertension. *Postgrad Med J*. **2004**, 80: 271-276.
68. José López-Sendón, Karl Swedberg, John McMurray, Juan Tamargo, et al. Documento de consenso de expertos sobre el uso de inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina en la enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. **2004**, 57:1213-32. - Vol. 57 Núm.12.
69. Klingbeil, Arnfried U et al. A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med*. **2003**;115(1):41-6.
70. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al., for the LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet*. **2002**;359:995–1003.
71. Chen Z, Tan F, Erdos EG, Deddish PA. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension*. **2005**, 46(6):1368-1373.
72. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*. **2006**,48(4):572-578.
73. Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension*. **1993**, 22(4):513-522.
74. Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, et al. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *Journal of hypertension*. **2010**, 28(5):1054-1064.
75. Reddy R, Asante I, Liu S, Parikh P, Liebler J, et al. Circulating angiotensin peptides levels in Acute Respiratory Distress Syndrome correlate with clinical outcomes: A pilot study. *PLOS ONE*. **2019**, 14(3): e0213096.

76. Ocaranza MP, Moya J, Pinto M, Escudero N, Valenzuela F, Varas M, et al. Menores niveles tisulares de la enzima convertidora de angiotensina I homologa (ECA-2) y angiotensina-(1-9) están asociados a mayor remodelamiento de la pared aórtica de ratas hipertensas. *Revista chilena de cardiología*. **2010**, 29:69-82.
77. Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. **2002**,34(11):1435-1442.
78. Turkevitch J., Stevenson P. & Hillier J. Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55-75.
79. Sepúlveda-Rivas S, Fritz HF, Valenzuela C, Santiviago CA, Morales JO. Development of Novel EE/Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lysozyme Delivery: Physicochemical Properties and In Vitro Safety. *Pharmaceutics*. **2019**,1;11(3).
80. Arvizu-Higuera DL, Hernández-Carmona G, Rodríguez-Montesinos YE, de Ciencias Marinas CI. Parámetros que afectan la conversión del ácido algínico en alginato de sodio Parameters affecting the conversion of alginic acid to sodium alginate. *Cienc Mar*. **2002**, 28:27–36.
81. Vroman I, Tighzert L. Biodegradable Polymers. *Materials*. **2009**, 2:307–44.
82. EUDRAGIT® E PO - EUDRAGIT® - Targeted Drug Release and Tailored Service n.d.
83. Leopold CS, Eikeler D. Eudragit E as coating material for the pH-controlled drug release in the topical treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *J Drug Target*. **1998**, 6(2):85-94.
84. Bera, H.; Kandukuri, S.G.; Nayak, A.K.; Boddupalli, S. Alginate-sterculia Gum Gel-Coated Oil Entrapped Alginate Beads for Gastroretentive Risperidone Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 120, 74–84.
85. Moustafine, R.I.; Bukhovets, A.V.; Sitenkov, A.Y.; Kemenova, V.A.; Rombaut, P.; Van den Mooter, G. Eudragit E PO as a Complementary Material for Designing Oral Drug Delivery Systems with Controlled Release Properties:

- Comparative Evaluation of New Interpolyelectrolyte Complexes with Countercharged Eudragit L100 Copolymers. *Mol. Pharm.* **2013**, 10, 2630–2641. [CrossRef] [PubMed]
86. Obeidat, W.M.; Abuznait, A.H.; Sallam, A.S. Sustained Release Tablets Containing Soluble Polymethacrylates: Comparison with Tableted Polymethacrylate IPEC Polymers. *AAPS PharmSciTech.* **2010**, 11, 54–63. [CrossRef] [PubMed]
87. Yingsukwattana, K.; Puttipipatkachorn, S.; Ruktanonchai, U.; Sarisuta, N. Enhanced permeability across Caco-2 cell monolayers by specific mannosylating ligand of buserelin acetate proliposomes. *J. Liposome Res.* **2016**, 26, 69–79. [CrossRef] [PubMed]
88. Malzert, A.; Boury, F.; Renard, D.; Robert, P.; Proust, J.E.; Benoît, J.O. Influence of some formulation parameters on lysozyme adsorption and on its stability in solution. *Int. J. Pharm.* **2002**, 242, 405–409. [CrossRef]
89. Van De Weert, M.; Van Dijkhuizen-Radersma, R.; Bezemer, J.M.; Hennink, W.E.; Crommelin, D.J. Reversible aggregation of lysozyme in a biodegradable amphiphilic multiblock copolymer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, 54, 89–93. [CrossRef]
90. Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*; Courier Dover Publications: Mineola, NY, USA, **2000**.
91. Applications of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in Nanoparticle Research. Available online: <http://www.nanosight.co.uk> (accessed on 17 December **2018**).
92. Aksungur, P.; Demirbilek, M.; Denkbaz, E.B.; Vandervoort, J.; Ludwig, A.; Ünlü, N. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *J. Control. Release.* **2011**, 151, 286–294. [CrossRef] [PubMed]
93. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *J. Control. Release.* **2016**, 235, 337–351. [CrossRef] [PubMed]

94. Patel, V.R.; Agrawal, Y.K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2011**, *2*, 81. [PubMed]
95. Tziveleka, L.A.; Pippa, N.; Georgantea, P.; Ioannou, E.; Demetzos, C.; Roussis, V. Marine Sulfated Polysaccharides as Versatile Polyelectrolytes for the Development of Drug Delivery Nanoplatfoms: Complexation of Ulvan with Lysozyme. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 69–75. [CrossRef] [PubMed]
96. Smeller, L.; Meersman, F.; Heremans, K. Refolding Studies Using Pressure: The Folding Landscape of Lysozyme in the Pressure–temperature Plane. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, *1764*, 497–505. [CrossRef] [PubMed]
97. Lad, M.D.; Ledger, V.M.; Briggs, B.; Green, R.J.; Frazier, R.A. Analysis of the SDS–Lysozyme Binding Isotherm. *Langmuir.* **2003**, *19*, 5098–5103. [CrossRef]
98. Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 796–810. [CrossRef] [PubMed]
99. Presas, E.; McCartney, F.; Sultan, E.; Hunger, C.; Nellen, S.; Alvarez, C.V.; Werner, U.; Bazile, D.; Brayden, D.J.; O’Driscoll, C.M. Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of amphiphilic cyclodextrin-based nanoparticles designed to enhance intestinal delivery of insulin. *J. Control. Release.* **2018**, *286*, 402–414. [CrossRef] [PubMed]
100. Fuenzalida, J.P.; Nareddy, P.; Moreno-Villoslada, I.; Moerschbacher, B.; Swamy, M.; Goycoolea, F. Lysozyme–alginate nanocomplex: Effect of alginate composition. *Nanotechnology.* **2013**, *3*, 331–334.
101. Susanto, E.; Rosyidi, D.; Radiati, L.E.; Manab, A. Improved antibacterial spectrum of hen egg white lysozyme with thermal modified. *RRBS.* **2014**, *8*, 437–442.
102. Agnihotri, S.A.; Mallikarjuna, N.N.; Aminabhavi, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release.* **2004**, *100*, 5–28. [CrossRef] [PubMed]
103. Zare Mirakabadi, A.; Moradhaseli, S. Comparative cytotoxic evaluation of free and sodium alginate nanoparticle-encapsulated ICD-85 on primary lamb kidney cells. *Iran. J. Cancer Prev.* **2013**, *6*, 151–159.

104. Pissuwan, D.; Boyer, C.; Gunasekaran, K.; Davis, T.P.; Bulmus, V. In vitro cytotoxicity of RAFT polymers. *Biomacromolecules*. **2010**, 11, 412–420. [CrossRef] [PubMed]
105. Kaba, S.I.; Egorova, E.M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2015**, 8, 19–29. [CrossRef] [PubMed]
106. Shao, X.R.; Wei, X.Q.; Song, X.; Hao, L.Y.; Cai, X.X.; Zhang, Z.R.; Peng, Q.; Lin, Y.F. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Prolif.* **2015**, 48, 465–474. [CrossRef] [PubMed]
107. Schaeublin, N.M.; Braydich-Stolle, L.K.; Schrand, A.M.; Miller, J.M.; Hutchison, J.; Schlager, J.J.; Hussain, S.M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*. **2011**, 3, 410–420. [CrossRef] [PubMed]
108. Liu, X.; Huang, N.; Li, H.; Jin, Q.; Ji, J. Surface and size effects on Cell interaction of gold nanoparticles with both phagocytic and nonphagocytic cells. *Langmuir*. **2013**, 29, 9138–9148. [CrossRef] [PubMed]
109. Fratoddi, I.; Venditti, I.; Cametti, C.; Russo, M.V. The puzzle of toxicity of gold nanoparticles. The case-study of HeLa cells. *Toxicol. Res.* **2015**, 4, 796–800. [CrossRef]
110. Blechinger, J.; Bauer, A.T.; Torrano, A.A.; Gorzelanny, C.; Bräuchle, C.; Schneider, S.W. Uptake kinetics and nanotoxicity of silica nanoparticles are cell type dependent. *Small*. **2013**, 9, 3970–3980. [CrossRef] [PubMed]
111. Teeguarden, J.G.; Hinderliter, P.M.; Orr, G.; Thrall, B.D.; Pounds, J.G. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol. Sci.* **2007**, 95, 300–312. [CrossRef] [PubMed]
112. Ulf Nobbmann. Polydispersity-What does it mean for DLS and chromatography?. Malvern Instruments: Malvern, U.K., **2014**.
113. Bian X, Liang S, John J, Hsiao CH, Wei X, Liang D, Xie H. Development of PLGA-based itraconazole injectable nanospheres for sustained release. *Int J Nanomedicine*. **2013**; 8:4521-31.

114. Ekwall, B, Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., Zucco, F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures, in short-Term Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects, Bourdeau. **1990**; 75-80.
115. Umerska A, Paluch KJ, Inkielewicz-Stepniak I, Santos-Martinez MJ, Corrigan OI, Medina C, Tajber L. Exploring the assembly process and properties of novel crosslinker-free hyaluronate-based polyelectrolyte complex nanocarriers. *Int J Pharm.* **2012**, 436: 75-87.
116. Umerska A, Corrigan OI, Tajber L. Intermolecular interactions between salmon calcitonin, hyaluronate, and chitosan and their impact on the process of formation and properties of peptide-loaded nanoparticles. *Int J Pharm.* **2014**, 477: 102-112.
117. Shi, P.; Luo, S.; Voit, B.; Appelhans, D.; Zan, X. A Facile and Efficient Strategy to Encapsulate the Model Basic Protein Lysozyme into the Porous CaCO₃. *J. Mater. Chem. B.* **2018**, 6, 4205–4215. [CrossRef]
118. Aghili, Z.; Taheri, S.; Zeinabad, H.A.; Pishkar, L.; Saboury, A.A.; Rahimi, A.; Falahati, M. Investigating the Interaction of Fe Nanoparticles with Lysozyme by Biophysical and Molecular Docking Studies. *PLoS ONE.* **2016**, 11, e0164878. [CrossRef] [PubMed]
119. Guerrero S., Araya E., Fiedler J., Arias J., Adura C., Albericio F., Giralt E., Arias J., Fernández M. & Kogan M. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomed.* **2010**, 5(6), 897–913 (2010).
120. Li, G. et al. Spherical and Planar Gold(0) Nanoparticles with a Rigid Gold(I)–Anion or a Fluid Gold(0)–Acetone Surface. *Langmuir.* **2003**, 19, 6483– 6491.
121. Umerska A, Paluch KJ, Martinez MJ, Corrigan OI, Medina C, Tajber L. Self-assembled hyaluronate/protamine polyelectrolyte nanoplexes: synthesis, stability, biocompatibility and potential use as peptide carriers. *J Biomed Nanotechnol.* **2014**, 10: 3658-3673

122. Somnuk J, Anupap T, Virote B. Preparation of chitosan nanoparticles for encapsulation and release of protein. *Korean J Chem Eng.* **2011**, 28(5):1247-51
123. F. A. Oyarzun-Ampuero, J. Brea, M. I. Loza, D. Torres, M. J. Alonso, Chitosan- hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *Int. J. Pharm.* **2009**, 381, 122-129.
124. Y. Xu and y. Du, *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 215.
125. Balmert, S.C., Zmolek, A.C., Glowacki, A.J., Knab, T.D., Rothstein, S.N., Wokpetah, J.M., Fedorchak, M.V., & Little, S.R. Positive Charge of "Sticky" Peptides and Proteins Impedes Release From Negatively Charged PLGA Matrices. *Journal of materials chemistry. B.* **2015**, 3 23, 4723-4734.
126. Yusif, R.M.; Abu Hashim, I.I.; El-Dahan, M.S. Some variables affecting the characteristics of Eudragit E-sodium alginate polyelectrolyte complex as a tablet matrix for diltiazem hydrochloride. *Acta Pharm.* **2014**, 64, 89–104.
127. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science.* **2012**, 37(1), 106-126.
128. Rehman M, Asadullah Madni AI, Khan WS, Khan MI, Mahmood MA, Ashfaq M, et al. Solid and liquid lipid-based binary solid lipid nanoparticles of diacerein: in vitro evaluation of sustained release, simultaneous loading of gold nanoparticles, and potential thermoresponsive behavior. *International Journal of Nanomedicine.* **2015**,10:2805.
129. Hao, Y., Zhang, B., Zheng, C., Ji, R., Ren, X., Guo, F., et al. The tumor-targeting core–shell structured DTX-loaded PLGA@Au nanoparticles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging. *J. Control. Release.* **2015**, 220, 545–555.
130. H. Park, J. Yang, J. Lee, S. Haam, I. Choi, K. Yoo, Multifunctional nanoparticles for combined doxorubicin and photothermal treatments, *ACS Nano* **3**. **2009**, (10) 2919–2926.
131. Loretz, B., Bernkop-Schnürch, A. In vitro cytotoxicity testing of non-thiolated and thiolated chitosan nanoparticles for oral gene delivery. *Nanotoxicology.* **2007**, 1, 139–148.

132. E.-J. Kim, G. Shim, K. Kim, I. C. Kwon, Y.-K. Oh, C.-K. Shim, Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs, *J. Gene Med.* **2009**, 11, 791-803.
133. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine.* **2012**, 7, 5577-91.
134. Khosroshahi ME, Ghazanfari L, Hassannejad Z. Effect of laser wavelegths on drug release with and without gold nanoshells and magnetic guidance on uptake by cancer cells. *J. Nanomed.* 2017,6(2):00152
135. Lopez J.P. 2018. Diseño de compositos multifuncionales basado en nanopartículas de oro y lantánidos para aplicaciones biológicas y biomédicas. Memoria Doctor en Ciencias Aplicadas. Universidad Autónoma de San Luís Potosí-UASLP. p81. (Tesis)
136. Fadeel B, Fornara A, Toprak MS, Bhattacharya K. Keeping it real: The importance of material character- ization in nanotoxicology. *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 468: 498–503.
137. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J Am Chem Soc.* **2010**, 132: 5761–5768.
138. Lundqvist M, Sethson I, Jonsson B-H. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles’ Curvature and the Protein Stability. *Langmuir.* **2004**; 20: 10639– 10647.
139. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, et al. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano.* **2011**, 5: 7503–7509.
140. Treuel L, Docter D, Maskos M, Stauber RH. Protein corona—from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J Nanotechnol.* **2015**, 6: 857–873. doi: 10.3762/bjnano.6.88 PMID: 25977856
141. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma pro- tein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol.* **2013**, 8: 772–781.

142. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**, 104: 2050–2055.
143. Dominguez-Medina S, Kisley L, Tauzin LJ, Hoggard A, Shuang B, D S, Indrasekara AS, et al. Adsorption and Unfolding of a Single Protein Triggers Nanoparticle Aggregation. *ACS Nano*. **2016**, 10: 2103– 2112.
144. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J Am Chem Soc*. **2012**; 134: 2139–2147.
145. Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen DWH, et al. Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. *ACS Nano*. **2014**; 8: 2439–2455.
146. Schöttler S, Becker G, Winzen S, Steinbach T, Mohr K, Landfester K, et al. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol*. **2016**.
147. Strojjan K, Leonardi A, Bregar VB, Križaj I, Svete J, et al. Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PLOS ONE*. **2017**, 12(1): e0169552.
148. Moya, M. L., Morley, M., Khanna, O., Opara, E. C. & Brey, E. M. Stability of alginate microbead properties in vitro. *Journal of materials science. Materials in medicine*. **2012**, 23.
149. Fang, C., Bhattarai, N., Sun, C., & Zhang, M. Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). **2009**, 5(14), 1637-41.
150. A. Krebs. Chemical composition of blood plasma and serum. *Annu. Rev. Biochem.* **1950**, 19: 409-430
151. Huang, X. and C.S. Brazel, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. Official Journal of the Controlled Release Society. **2001**, 73(2):121-136.

152. T.W. Atkins, R.L. McCallion, B.J. Tighe, Incorporation and release of fluorescein isothiocyanate-linked dextrans from a bead-formed macroporous hydrophilic matrix with potential for sustained release. *Biomaterials*. **1993**, 14: 16–20.
153. Kishida, K. Murakami, H. Goto, M. Akashi, H. Kubita, T. Endo, Polymer drugs and polymeric drugs X: slow release of 5-fluorouracil from biodegradable poly(g-glutamic acid) and its benzyl ester matrices. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1998**, 13; 270–278.
154. S.C. Vasudev, T. Chandy, C.P. Sharma, Development of chitosan / polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis. *Biomaterials*. **1997**, 18: 375–381.
155. A. Gutowska, Y.H. Bae, H. Jacobs, F. Mohammad, D. Mix, J. Feijen, S.W. Kim, Heparin release from thermosensitive polymer coatings: In vivo studies, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, 29: 811–821.
156. Campardelli R, Della Porta G, Gomez L, Irusta S, Reverchon E, Santamaria J. Au–PLA nanocomposites for photothermally controlled drug delivery. *J. Mater. Chem. B*. **2014**.2(4), 409–417.
157. Vivanco A., 2017. Evaluación *in vitro* de un nuevo sistema de liberación controlada de curcumina, promovida por el efecto plasmón desde nanopartículas de oro, desde microgeles. Memoria de magíster en ciencias farmacéuticas. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
158. Honda M, Saito Y, Smith N I, Fujita K and Kawata S. Nanoscale heating of laser irradiated single gold nanoparticles in liquid Opt. *Express*. **2011**.19 12375–83.
159. Luque-Michel, E., Larrea, A., Lahuerta, C., Sebastian, V., Imbuluzqueta, E., Arruebo, M., Santamaría, J. Un enfoque simple para obtener nanopartículas poliméricas híbridas cargadas con Au con una carga de metal ajustable. *Nanoescala*. **2016**.8 (12), 6495–6506.

