



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FÁRMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA

DESARROLLO DE MICELAS DE NÚCLEO LIPÍDICO FUNCIONALIZADAS CON  
UNA CADENA PEPTÍDICA TRIFUNCIONAL COMO SISTEMA DE ENTREGA DE  
MOLÉCULAS DE BAJA SOLUBILIDAD ACUOSA HACIA CARDIOMIOCITOS

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

WAI-HOUNG FRANCISCO CHOU KAM

Directores:  
Dr. Javier O. Morales Montecinos  
Dra. Lorena García Nannig

Santiago de Chile  
2022

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está pensado y dedicado a cada persona que ha sido un aporte en mi quehacer personal y profesional, y que han contribuido a mi crecimiento intelectual, emocional y espiritual, en lo que llevo recorrido de este viaje llamado vida.

## AGRADECIMIENTOS

A los profesores Dr. Javier O. Morales y Dra. Lorena García Nannig, por sus conocimientos, paciencia y constancia en este trabajo, que no hubiera sido fácil sin el apoyo de ustedes. Sin duda, ustedes han sido importantes en aquellos momentos más difíciles y confusos en donde, al parecer, no había alternativa, mas siempre se abría un haz de luz de esperanza con sus sabios consejos. También agradezco el apoyo de los profesores Lorenz Meinel y Tessa Lühmann, como de Björn ter Mors, del Centro de Formulación y Entrega de Medicamentos de la Universidad Julius Maximilians de Wurzburg, Alemania, durante el transcurso de la pasantía doctoral.

A todos los docentes y funcionarios del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Católica del Norte (mi *alma mater*), del Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Chile, y a los miembros de la Comisión Evaluadora del presente trabajo doctoral, que han sido testigos de mi evolución como estudiante de pre y posgrado, y ahora investigador y que, varias veces, han sido de gran ayuda para poder concretar estos desafíos personales.

A mis padres y familia en general, que siempre han sido un apoyo fundamental en esta expedición que decidí tomar hace varios años atrás, con el fin de conseguir mis objetivos. Sin su apoyo y aliento, esta travesía hubiera sido más tortuosa y mucho más difícil de alcanzar.

A mis amigos de la infancia, de la universidad y del doctorado y laboratorio, y a las personas que de una u otra forma han formado y forman parte de mi vida personal actual, que siempre han estado apoyándome en los mejores momentos, como también en los otros más agrios y lúgubres, aportando con su amistad y comprensión, siendo mi segunda familia en este camino.

Simplemente, ¡gracias a todos por estar siempre allí!

## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Sistema de clasificación biofarmacéutica .....	1
1.2 Nanopartículas como sistema de transporte y entrega de principios activos .....	2
1.2.1 Micelas de núcleo lipídico .....	5
1.3 Vía de administración bucal.....	8
1.4 Potenciación de la absorción de principios activos.....	11
1.5 Enfermedades cardiovasculares .....	14
1.5.1 Estrategias para potenciar la orientación de sistemas de entrega de principios activos hacia el sistema cardiovascular.....	15
1.6 Sistemas de entrega bioactivables.....	17
1.6.1 Metaloproteinasas de la matriz.....	18
1.6.2 Péptidos con selectividad por metaloproteinasas de la matriz-9.....	20
1.7 Propuesta de investigación.....	22
1.8 Hipótesis.....	23
1.9 Objetivos .....	24
1.9.1 Objetivo general .....	24
1.9.2 Objetivos específicos .....	24
2. METODOLOGÍA.....	25
2.1 Reactivos y materiales.....	25
2.2 Síntesis, purificación, identificación y caracterización de la estructura secundaria de péptidos .....	26
2.2.1 Síntesis de péptidos .....	26
2.2.2 Purificación del péptido crudo .....	29
2.2.3 Identificación, determinación de pureza y liofilización del péptido .....	30
2.2.4 Determinación de la estructura secundaria de péptidos .....	31
2.3 Síntesis y funcionalización de micelas de núcleo lipídico .....	32
2.3.1 Síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo.....	32
2.3.2 Síntesis de Gelucire 44/14 <sup>®</sup> -maleimida .....	33
2.3.3 Funcionalización del lípido con péptido .....	34
2.3.4 Identificación de los productos sintetizados .....	36
2.3.5 Síntesis de micelas de núcleo lipídico.....	36

2.3.6	Caracterización fisicoquímica de micelas de núcleo lipídico .....	37
2.3.7	Determinación de eficiencia de asociación y carga de fármaco .....	38
2.3.8	Estabilidad de micelas de núcleo lipídico .....	38
2.3.9	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de rodamina 123 contenida en micelas de núcleo lipídico .....	39
2.4	Permeación bucal <i>ex vivo</i> de micelas de núcleo lipídico .....	40
2.5	Escisión <i>in vitro</i> de la secuencia sensible a metaloproteinasa de la matriz-9 ..	41
2.6	Ensayo <i>in vitro</i> de unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con péptido .....	42
2.7	Análisis estadístico .....	45
3.	RESULTADOS .....	47
3.1	Síntesis, purificación, identificación y caracterización de la estructura secundaria de péptidos .....	47
3.1.1	Síntesis, purificación e identificación de péptidos .....	47
3.1.2	Caracterización de estructura secundaria de péptidos .....	49
3.2	Síntesis y funcionalización de micelas de núcleo lipídico .....	50
3.2.1	Síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo .....	50
3.2.2	Síntesis de Gelucire 44/14 <sup>®</sup> -maleimida .....	52
3.2.3	Funcionalización del lípido con péptido .....	55
3.2.4	Síntesis y caracterización fisicoquímica de micelas de núcleo lipídico ..	57
3.2.5	Perfil de estabilidad de micelas de núcleo lipídico .....	59
3.2.6	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de rodamina contenidas en micelas de núcleo lipídico 62	
3.3	Permeación bucal <i>ex vivo</i> de micelas de núcleo lipídico .....	66
3.4	Escisión <i>in vitro</i> de secuencia sensible a metaloproteinasa de la matriz-9 .....	67
3.5	Ensayo <i>in vitro</i> de unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con péptido .....	70
4.	DISCUSIÓN .....	71
4.1	Síntesis, purificación, identificación y caracterización de la estructura secundaria de péptidos .....	74
4.1.1	Síntesis, purificación e identificación de péptidos .....	74
4.1.2	Caracterización de estructura secundaria de péptidos .....	76
4.2	Síntesis y funcionalización de micelas de núcleo lipídico .....	79
4.2.1	Síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo .....	79

4.2.2	Síntesis de Gelucire 44/14 <sup>®</sup> -maleimida .....	80
4.2.3	Funcionalización del lípido con péptido .....	82
4.2.4	Síntesis y caracterización fisicoquímica de micelas de núcleo lipídico...86	
4.2.5	Perfil de estabilidad de micelas de núcleo lipídico .....	89
4.2.6	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de rodamina contenidas en micelas de núcleo lipídico 95	
4.3	Permeación bucal <i>ex vivo</i> de micelas de núcleo lipídico .....	99
4.4	Escisión <i>in vitro</i> de secuencia sensible a metaloproteinasa de la matriz-9 ....	108
4.5	Ensayo <i>in vitro</i> de unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con péptido .....	114
5.	CONCLUSIONES.....	121
6.	RECOMENDACIONES.....	123
7.	REFERENCIAS.....	126
8.	ANEXOS.....	142

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de una micela de núcleo lipídico.....	5
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del epitelio bucal. ....	10
<b>Figura 3.</b> Secreción de metaloproteinasas de la matriz frente a un estímulo inflamatorio a nivel cardíaco .....	20
<b>Figura 4.</b> Esquema de la propuesta de investigación .....	23
<b>Figura 5.</b> Estructura química de rodamina 123. ....	23
<b>Figura 6.</b> Esquema de la síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo. ....	33
<b>Figura 7.</b> Esquema de obtención de Gelucire 44/14®-maleimida .....	34
<b>Figura 8.</b> Estructura del lípido sintético adquirido comercialmente compuesto por ácido esteárico, polietilenglicol y maleimida terminal. ....	34
<b>Figura 9.</b> Esquema resumen de la metodología propuesta para la investigación.....	46
<b>Figura 10.</b> Espectros de dicroísmo circular de los péptidos sintetizados. ....	49
<b>Figura 11.</b> Espectro infrarrojo del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo. ....	51
<b>Figura 12.</b> Espectro de resonancia magnética nuclear de protones del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo .....	52
<b>Figura 13.</b> Espectros infrarrojos de Gelucire 44/14® previo y posterior a la reacción de conjugación .....	53
<b>Figura 14.</b> Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de Gelucire 44/14® previo y posterior a la reacción de conjugación.....	53
<b>Figura 15.</b> Caracterización de Gelucire 44/14® previo y posterior a la reacción de conjugación .....	54
<b>Figura 16.</b> Espectros infrarrojos del péptido D-PEP, lípido SP-Mal y del producto SP-Mal-D-PEP .....	56
<b>Figura 17.</b> Espectros infrarrojos del lípido SP-Mal y los productos funcionalizados SP-Mal-PEP, SP-Mal-CAR y SP-Mal-CLV.....	57
<b>Figura 18.</b> Micrografías de las micelas de núcleo lipídico elaboradas. ....	59
<b>Figura 19.</b> Estabilidad a 48 h de micelas de núcleo lipídico no funcionalizadas vacías y asociadas con rodamina 123.....	60
<b>Figura 20.</b> Estabilidad a 48 h de micelas de núcleo lipídico asociadas con rodamina y funcionalizadas.....	61
<b>Figura 21.</b> Estabilidad de micelas de núcleo lipídico.....	62
<b>Figura 22.</b> Perfil de difusión acumulada in vitro de rodamina 123 en PBS pH 7,4 a 37 °C .....	63

<b>Figura 23.</b> Perfil de liberación acumulada in vitro de rodamina 123 en PBS pH 7,4 y a 37 °C, a partir de micelas de núcleo lipídico sin funcionalizar y funcionalizadas con el péptido CLV.....	64
<b>Figura 24.</b> Perfil de permeación acumulada ex vivo de rodamina 123 (Rho) libre en solución, en micelas de núcleo lipídico (LCM) no funcionalizadas y funcionalizadas con el péptido PEP, en buffer fosfato pH 6,8 a 37 °C.....	67
<b>Figura 25.</b> Escisión in vitro a 24 h del péptido PEP libre en solución expuesto a distintas concentraciones de metaloproteinasa de la matriz-9.....	68
<b>Figura 26.</b> Cinética de escisión de los péptidos PEP y D-PEP expuestos a 450 ng/mL de metaloproteinasa de la matriz-9 .....	69
<b>Figura 27.</b> Cinética de escisión del péptido PEP funcionalizado sobre las micelas de núcleo lipídico expuestos a 450 ng/mL de metaloproteinasa de la matriz-9 .....	69
<b>Figura 28.</b> Unión de los péptidos fluorescentes conjugados con 5(6)-carboxifluoresceína (CF) a 10 µM a cardiomiocitos de ratas neonatas. ....	71
<b>Figura 29.</b> Unión a cardiomiocitos de ratas neonatas a diferentes concentraciones de péptidos fluorescentes conjugados con 5(6)-carboxifluoresceína.....	72
<b>Figura 30.</b> Unión de las micelas de núcleo lipídico (LCM) asociadas con rodamina 123 (Rho) con o sin funcionalización del péptido CAR o CLV a cardiomiocitos de ratas neonatas .....	73
<b>Figura 31.</b> Esquema de la reacción maleimida-tiol.....	85
<b>Figura 32.</b> Esquema de reacción de reducción de grupos tioles .....	86
<b>Figura 33.</b> Mecanismos de inestabilidad en sistemas micelares .....	92
<b>Figura 34.</b> Perfil de comportamiento bifásico in vitro. ....	97
<b>Figura 35.</b> Estructura del aminoácido L-valina.....	102
<b>Figura 36.</b> Esquema general del mecanismo de escisión catalizada por metaloproteinasas de la matriz.....	109
<b>Figura 37.</b> Esquema representativo de los tres estados conformacionales de los receptores de integrina, con sus subunidades $\alpha$ y $\beta$ , y sus respectivos dominios.. ....	120



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias peptídicas de los péptidos propuestos y sintetizados..	27
<b>Tabla 2.</b> Secuencias peptídicas de los péptidos conjugados con 5(6)-carboxifluoresceína. .....	28
<b>Tabla 3.</b> Gradiente de fase móvil utilizada para la determinación de pureza de los péptidos..	31
<b>Tabla 4.</b> Identidad de los péptidos obtenidos a través de distintos fragmentos m/z por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas y porcentaje de pureza de las fracciones recolectadas. ....	47
<b>Tabla 5.</b> Predicciones de características fisicoquímicas de los péptidos sintetizados, en términos de punto isoeléctrico (pI), índice de alifaticidad y valor promedio de hidropatía (GRAVY). ....	48
<b>Tabla 6.</b> Identidad de los péptidos conjugados con carboxifluoresceína obtenidos a través de distintos fragmentos m/z y porcentaje de pureza de las fracciones recolectadas. ....	48
<b>Tabla 7.</b> Masa de los péptidos puros y liofilizados. ....	48
<b>Tabla 8.</b> Estimaciones del porcentaje de estructura secundaria organizada de los péptidos, expresados en porcentaje (%). ....	50
<b>Tabla 9.</b> Predicciones de estructura secundaria general y conformación particular de residuos de los péptidos. ....	50
<b>Tabla 10.</b> Cantidad y porcentaje de sólidos recuperados y rendimiento de la reacción de funcionalización del lípido SP-Mal con los péptidos de interés. ....	55
<b>Tabla 11.</b> Propiedades fisicoquímicas de las micelas de núcleo lipídico (LCM) elaboradas .....	58
<b>Tabla 12.</b> Parámetros cinéticos ajustados a los distintos modelos de los perfiles de liberación de rodamina 123 (Rho) desde micelas de núcleo lipídico (LCM) sin funcionalizar y funcionalizada con el péptido CLV .....	65
<b>Tabla 13.</b> Parámetros de flujo de difusión en estado estacionario ( $J_{ss}$ ) y permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) de los perfiles de permeación de solución de rodamina 123 (Rho) libre, micelas de núcleo lipídico (LCM) no funcionalizadas y funcionalizadas con PEP y asociadas con Rho. ....	67

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Ecuación de Noyes-Whitney..	4
<b>Ecuación 2.</b> Cálculo del porcentaje de recuperación de sólidos de la conjugación	33
<b>Ecuación 3.</b> Cálculo del porcentaje de funcionalización del péptido al lípido	35
<b>Ecuación 4.</b> Cálculo de eficiencia de asociación.....	38
<b>Ecuación 5.</b> Cálculo de carga de fármaco. ....	38
<b>Ecuación 6.</b> Cálculo del factor de similitud. ....	40
<b>Ecuación 7.</b> Cálculo del flujo de difusión en estado estacionario.....	41
<b>Ecuación 8.</b> Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente.....	41

## GLOSARIO

5-BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina.

ACN: acetonitrilo.

ANOVA: análisis de varianza.

ATR-FTIR: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier mediante reflexión total atenuada.

BCS: sistema de clasificación biofarmacéutica.

CDCl<sub>3</sub>: cloroformo deuterado.

CF: 5(6)-carboxifluoresceína.

CMC: concentración micelar crítica.

CMT: temperatura micelar crítica.

CPP: péptido de penetración celular.

DCM: diclorometano.

DE: desviación estándar.

DIC: *N,N*- diisopropilcarbodiimida.

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina.

DLS: dispersión dinámica de luz.

DMAP: 4-dimetilaminopiridina.

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco.

DMF: *N,N*-dimetilformamida.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DMSO-d<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DODT: 3,6-dioxa-1,8-octanditiol.

DSC: calorimetría diferencial de barrido.

DTT: 1,4-ditiotreitól.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

ENT: enfermedad no transmisible.

EPR: retención y permeación potenciada.  
EtOH: etanol.  
FBS: suero fetal bovino.  
FCS: suero fetal de ternero.  
FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos.  
Fmoc: fluorenilmetiloxycarbonilo.  
FNIII: fibronectina tipo III.  
FPLC: cromatografía líquida rápida de proteína.  
HD: diámetro hidrodinámico.  
HIC: cromatografía por interacción hidrofóbica.  
HOBt: hidrato de 1-hidroxibenzotriazol.  
 $J_{ss}$ : flujo de difusión en estado estacionario.  
LCM: micela de núcleo lipídico.  
LCMS: cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.  
LDV: velocimetría de láser Doppler.  
M199: medio 199.  
MeOH: metanol.  
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.  
MMP: metaloproteinasa de la matriz.  
NIH: Institutos Nacionales de Salud.  
NMR: resonancia magnética nuclear.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
OPS: Organización Panamericana de la Salud.  
 $P_{app}$ : coeficiente de permeabilidad aparente.  
PBS: buffer fosfato salino.  
PCM: secuencia orientadora primaria a cardiomiocitos.  
PDI: índice de polidispersión.  
PEG: polietilenglicol.  
PFA: paraformaldehído.

pI: punto isoeléctrico.  
PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico).  
PS: tamaño de partícula.  
Rho: rodamina 123.  
RP-HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa.  
SIB: Instituto Suizo de Bioinformática.  
siRNA: ácido ribonucleico de interferencia de pequeño tamaño.  
TEA: trietilamina.  
TFA: ácido trifluoroacético.  
THF: tetrahidrofurano.  
TIS: triisopropilsilano.  
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano.  
UA: unidad arbitraria o de absorbancia.  
UV: ultravioleta.  
 $\bar{X}$ : promedio  
XRC: cristalografía de rayos X.  
ZP: potencial  $\zeta$ .

## RESUMEN

El principal objetivo de la presente investigación doctoral fue el desarrollar micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con una secuencia peptídica trifuncional, capaz de potenciar la absorción de moléculas de baja solubilidad acuosa a través de la vía bucal, seguida de activación biosensible por metaloproteinasa de la matriz y con direccionalización hacia cardiomiocitos. Para ello, los péptidos de interés fueron obtenidos eficientemente a través de la síntesis en fase sólida, con una pureza superior al 90%. Con ello, se procedió a conjugar los distintos péptidos elaborados con un lípido personalizado, a través de la estrategia química maleimida-tiol, obteniéndose derivados con un porcentaje de funcionalización casi total. Posteriormente, se procedió a elaborar las micelas con la matriz lipídica y el lípido funcionalizado, obteniéndose diámetros a escala nanométrica, con una alta capacidad de asociación con rodamina 123, como molécula modelo. Estas micelas demostraron mantenerse estables por al menos 6 h a una temperatura de almacenamiento 4 y 25 °C, presentando inestabilidad rápidamente a los 37 °C. Además, mostraron un perfil de liberación inicial explosiva de rodamina 123 permitiendo liberar en alta cantidad la molécula contenida durante las primeras horas, de acuerdo con un modelo cinético difusional de Peppas-Sahlin. A nivel de permeación, se logró determinar que las micelas funcionalizadas pudieron atravesar en mayor cuantía el epitelio bucal en comparación con las micelas no funcionalizadas y rodamina 123 en solución como controles. En términos de sensibilidad a metaloproteinasa, la secuencia peptídica conjugada sobre la superficie de las micelas mantiene sus características sensibles a esta enzima. Finalmente, las micelas de núcleo lipídico conjugadas con el péptido residual tras el corte biosensible demostraron tener una menor unión a cardiomiocitos en comparación con las micelas conjugadas con el péptido control orientador a cardiomiocito; sin embargo, fue significativamente mayor en comparación con micelas no funcionalizadas, que podría estar relacionado con la presencia de receptores de integrina ubicados en la superficie de cardiomiocitos.

## ABSTRACT

The main objective of this research was to develop lipid-core micelles functionalized with a trifunctional peptide sequence, capable of enhancing the absorption of poorly water-soluble drugs through the buccal route, followed by bioresponsive activation by matrix metalloproteinase and targeting to cardiomyocytes. For this, the peptides of interest were efficiently obtained using solid phase synthesis, with a purity greater than 90%. Then, the different synthesized peptides were conjugated with a customized lipid, through the maleimide-thiol chemistry, obtaining derivatives with an almost total percentage of functionalization. Subsequently, lipid-core micelles were obtained from the lipid matrix and the functionalized lipid, yielding diameters at the nanometric scale, with high entrapment efficiency of rhodamine 123, as a model molecule. Furthermore, these micelles proved to be stable for at least 6 h at a storage temperature of 4 and 25 °C, eliciting rapid instability at 37 °C. In addition, the release of rhodamine 123 showed an initial burst release profile, allowing the entrapped molecule to be released in high amount during the first hours, following a Peppas-Sahlin diffusional kinetic model. In terms of permeation, functionalized lipid-core micelles showed higher permeation through buccal epithelium compared to the non-functionalized micelles and rhodamine 123 in solution as controls. Regarding to the sensitivity to matrix metalloproteinase, the conjugated peptide sequence on the surface of the micelles maintains the bioresponsive cleavage. Finally, the lipid-core micelles conjugated with the residual peptide after bioresponsive cleavage showed less binding to cardiomyocytes compared to the micelles conjugated with the peptide targeting cardiomyocytes as control; however, it was significantly higher compared to non-functionalized micelles, and might be related to the presence of integrin receptors located on the surface of cardiomyocytes.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema de clasificación biofarmacéutica

La industria farmacéutica ha experimentado un auge y crecimiento sostenidos en las últimas décadas, gracias al desarrollo de nuevos productos de uso farmacéutico para distintas patologías. Esto con el fin de poder tratarlas y curarlas, prevenir el desarrollo de estas, contribuir a su diagnóstico, o bien contener o limitar los síntomas para aumentar las expectativas de vida de las personas. De acuerdo con las estadísticas disponibles, los ingresos de la industria farmacéutica mundial se han triplicado en un margen de solo 20 años, desde los \$390,2 mil millones de dólares en el año 2001 hasta los \$1,27 billones de dólares al año 2020 (1).

En este contexto, la industria farmacéutica ha centrado su investigación en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y de nuevas moléculas biológicamente activas como candidatos para nuevos principios activos, en paralelo con el avance tecnológico y científico y el desarrollo de nuevas herramientas de diseño y dinámica molecular. En base a esto, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) establece el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, del inglés *Biopharmaceutics Classification System*), que permite categorizar los principios activos en base a su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, siendo conceptos ampliamente utilizados en los ensayos de bioexención para demostrar equivalencia terapéutica (2,3). El sistema BCS organiza a los principios activos en cuatro grupos (2,4):

- Clase 1: agrupa a moléculas con alta solubilidad acuosa y alta permeabilidad, por lo que son generalmente bien absorbidos (por ejemplo: clorfenamina, digoxina, paracetamol).
- Clase 2: comprende principios activos de baja solubilidad acuosa y alta permeabilidad, por lo que la etapa limitante de su absorción es su velocidad de disolución (por ejemplo: carvedilol, fenitoína, nifedipino).



- Clase 3: abarca sustancias de alta solubilidad acuosa y baja permeabilidad, por lo que la absorción está limitada por el proceso de permeación a través de las barreras biológicas (por ejemplo: atenolol, minociclina, ranitidina).
- Clase 4: incluye compuestos de baja solubilidad acuosa y baja permeabilidad, por lo que usualmente se traduce en baja biodisponibilidad (por ejemplo: ciprofloxacino, furosemida, ritonavir).

Por consiguiente, este sistema de clasificación requiere de establecer definiciones claras con respecto a solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. Para ello, la FDA define estos parámetros con criterios concretos. Un principio activo de alta solubilidad acuosa es aquel que en su máxima potencia o dosificación sea capaz de solubilizarse en un volumen menor o igual a 250 mL de medio acuoso en un rango de pH de 1 a 6,8, incluyendo valores de pH igual al o los  $pK_a$  del principio activo y valores con una unidad por sobre y debajo del  $pK_a$ , determinado a  $37 \pm 1$  °C. Por otra parte, una sustancia con permeabilidad alta es aquella en donde el grado de absorción en humanos es mayor o igual a 85% de una dosis administrada basada en una determinación por balance de masas o bien en comparación con una dosis de referencia administrada por vía intravenosa, siempre y cuando el principio activo demuestre estabilidad a lo largo del tracto gastrointestinal (3). Teniendo en consideración estas definiciones, aproximadamente el 40% de nuevos productos farmacéuticos aprobados por las distintas entidades regulatorias mundiales y el 90% de los compuestos candidatos con actividad biológica corresponden a moléculas clasificadas como de clase 2 o 4, revelando problemas en la solubilidad acuosa y, algunas de ellas, también en la permeabilidad a través de barreras biológicas (5,6). En vista de ello, se pueden predecir desafíos importantes asociados a estos principios activos de clases 2 y 4, y comprenderían problemas tanto a nivel biofarmacéutico (liberación y disolución de la molécula en medios acuosos) y farmacocinético (perfil de absorción), lo que se traduciría en un impacto en sus efectos terapéuticos.

## **1.2 Nanopartículas como sistemas de transporte y entrega de principios activos**

En las últimas décadas, la investigación en las ciencias farmacéuticas se ha enfocado en mejorar la solubilidad acuosa y permeabilidad a través de barreras biológicas de

sustancias biológicamente activas. Uno de los polos de desarrollo ha sido la nanotecnología aplicada a la medicina, consistiendo en el desarrollo de nanopartículas de distinto tipo como sistemas de transporte y entrega de principios activos para el avance en nuevas terapias. Además, también se ha visto el uso de diversos tipos de nanomateriales para el diagnóstico, monitoreo, control, y prevención de múltiples patologías (7).

Una nanopartícula puede ser definida como una molécula individual o un colectivo de muchas moléculas cuyo tamaño fluctúa dentro de la escala nanométrica, es decir, entre uno o pocos nanómetros hasta cientos de nanómetros (8). Sin embargo, una definición más acuciosa es que al menos una de las dimensiones de estas partículas debe estar en el rango nanométrico, específicamente, entre 1 a 100 nm para al menos un 50% de la población total de partículas; además, si el área superficial del total de partículas es mayor a  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ , también serían consideradas como nanomateriales (7). En base a estas características, las nanopartículas pueden mejorar la solubilidad acuosa de principios activos de clase 2 y 4. De acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney (Ecuación 1), la velocidad de disolución de una partícula es proporcional con el área superficial que se encuentra en contacto con el medio de disolución. Por tanto, una disminución en el tamaño de estas partículas resultaría en un aumento en el área superficial en relación con su volumen (9,10). Esto se fundamenta que, a partir de una masa total de partículas, mientras más pequeñas sean estas y, por tanto, más numerosas, presentarán una mayor área total de contacto con el solvente en comparación con partículas más grandes y menos numerosas (11). Por ejemplo: la reducción del tamaño de partícula de  $1 \mu\text{m}$  a  $100 \text{ nm}$  significaría un aumento en 10 veces el área superficial, generando una mejora de hasta 10 veces la velocidad de disolución, siempre y cuando las partículas puedan humectarse apropiadamente con el solvente (9,11). Para aumentar el grado de humectación de las partículas se puede utilizar agentes que modifiquen la tensión superficial o tensoactivos, lo que se traduciría en una mayor solubilidad y, por tanto, disolución de las partículas más pequeñas (11).

**Ecuación 1.** Ecuación de Noyes-Whitney.  $dm/dt$  corresponde a la velocidad del transporte de masa de moléculas a través de una capa de difusión;  $D$  es el coeficiente de difusión de la molécula;  $A$  es el área superficial disponible para el proceso;  $C_s$  es la concentración de saturación de la molécula;  $C_t$  corresponde a la concentración de la molécula disuelta; y  $h$  es el espesor de la capa de difusión.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DA(C_s - C_t)}{h}$$

Por otra parte, la reducción del tamaño de partícula permitiría también mejorar la permeabilidad a través de barreras biológicas, en donde se han descrito que nanopartículas de hasta 200 nm presentan una mayor velocidad de internalización celular en comparación con partículas más grandes, tanto en modelos intestinales *in vitro* como *in vivo* (12). Además, el tamaño puede influir en el mecanismo de internalización, en donde partículas más pequeñas son más susceptibles al transporte paracelular y transcelular mediada por clatrina o caveolina, mientras que partículas más grandes se internalizarían mediante pinocitosis o fagocitosis (13,14). Por lo tanto, el aumento en la velocidad de disolución como también una mayor permeabilidad a través de membranas biológicas por reducción del tamaño de partícula permitirían mejorar la biodisponibilidad del principio activo en circulación y, con ello, generar un efecto terapéutico óptimo.

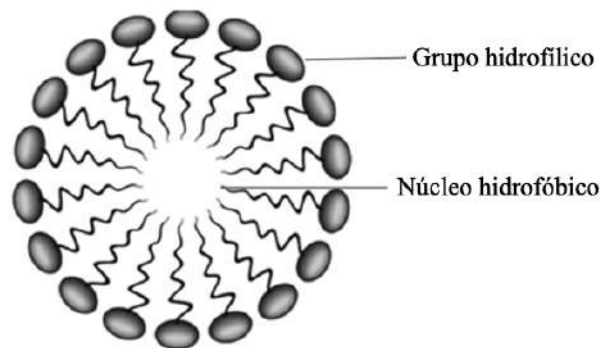
A grandes rasgos y dependiendo del tipo de material utilizado en la elaboración de las nanopartículas, es que se pueden clasificar en tres grandes categorías (15–19):

1. Inorgánicas: agrupan a aquellas estructuras sintetizadas a base de materiales inorgánicos, principalmente de metales como el oro, plata y cobre, o de óxidos de hierro (magnetita [ $Fe_3O_4$ ] o maghemita [ $Fe_2O_3$ ]), de titanio ( $TiO_2$ ) o de silicio ( $SiO_2$ ), otorgándoles propiedades plasmónicas, magnéticas y radiactivas que pueden ser de utilidad en técnicas de diagnóstico e imagenología.
2. Poliméricas: abarcan partículas cuya estructura está constituida principalmente por macromoléculas anfífilas naturales o sintéticas, que generalmente tienen la característica de ser biocompatibles y biodegradables, por lo que son ampliamente utilizados tanto para el diagnóstico y tratamiento de distintas patologías, como también para transportar principios activos y como agentes nutracéuticos.
3. Lipídicas: engloban estructuras cuya base está principalmente conformada por lípidos, siendo estos vehículos los más biocompatibles con componentes orgánicos, de los

cuales, se pueden destacar los liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas, transportadores lipídicos nanoestructurados, nanoemulsiones y sistemas micelares.

### 1.2.1 Micelas de núcleo lipídico

Los sistemas micelares representan dispersiones coloidales en donde el material particulado o fase dispersa se encuentra distribuido dentro de un medio dispersante o fase continua, comúnmente agua (20). Las micelas de núcleo lipídico (LCMs, del inglés *lipid-core micelles*) están formadas a partir de moléculas con características anfipáticas. Estas moléculas contienen dos regiones claramente diferenciadas con afinidades opuestas hacia un determinado solvente: una porción hidrofóbica compuesta principalmente por cadenas de ácidos grasos de distinta longitud y que tienden a organizarse formando un centro de núcleo lipídico; y una porción hidrofílica que rodea este núcleo y está en contacto directo con la fase continua, dada por la presencia de grupos polares del mismo lípido o bien de polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) (Figura 1) (8,20,21).



**Figura 1.** Representación gráfica de una micela de núcleo lipídico. Adaptado de Wakaskar (22).

La formación de estos sistemas micelares está dada por una disminución de la energía libre del sistema, permitiendo un reordenamiento entre las moléculas anfipáticas, estableciendo enlaces tipo puentes de hidrógeno entre los grupos polares y la fase continua acuosa, como la formación de uniones tipo van der Waals y otras interacciones hidrofóbicas entre las porciones lipídicas de estas moléculas (20,23). La ocurrencia de estas interacciones está relacionada directamente con la concentración del compuesto anfipático en la fase continua y la temperatura de formación de micelas, conocidas como concentración micelar crítica (CMC, del inglés *critical micellar concentration*) y

temperatura micelar crítica (CMT, del inglés *critical micellar temperature*), respectivamente. La CMC se define como la concentración mínima del compuesto anfipático capaz de inducir la formación espontánea de micelas al contacto con la fase continua. Por otro lado, la CMT corresponde a la temperatura mínima capaz de inducir la formación espontánea de micelas en el medio a una determinada concentración (20).

Dentro de las ventajas de utilizar LCMs como sistemas de transporte y entrega de principios activos incluyen (8,21):

- Rango de tamaño entre 5 a 100 nm, facilitando el cruce a través de membranas biológicas y permitiendo ser internalizadas por las células.
- Biocompatibilidad y biodegradabilidad de los lípidos utilizados, generando un menor riesgo de toxicidad y depuración por parte del sistema retículo-endotelial.
- Transporte de principios activos de baja solubilidad acuosa principalmente en el núcleo lipídico, y de sustancias más solubles en la porción más hidrofílica en contacto con el medio.
- Protección del principio activo frente a condiciones fisiológicas que alterarían su biodisponibilidad (por ejemplo: enzimas, pH), aumentando, por tanto, su estabilidad.
- Modular el proceso y cinética de liberación del principio activo, contribuyendo a una optimización de su efecto terapéutico como también a la reducción de su toxicidad y posibles efectos adversos.
- Posibilidad de conjugación con ligandos para dirigir la entrega del principio activo contenido al tejido deseado, potenciando la interacción entre el sistema y el receptor para dicho ligando (direccionalización activa o *targeting* activo).

En base a estos antecedentes, se han elaborado LCMs capaces de transportar tanto fármacos de baja solubilidad acuosa como moléculas más hidrofílicas. Uno de los primeros trabajos reportados, fue el desarrollo de micelas a partir de copolímeros de PEG y fosfatidiletanolamina para la entrega de principios activos antineoplásicos de baja solubilidad acuosa, entre ellos el tamoxifeno y paclitaxel, formándose nanopartículas con tamaños menores a 50 nm, que serían favorables para la internalización en los tejidos cancerígenos dado por el efecto de permeación y retención potenciada (EPR, del inglés

*enhanced permeation and retention*) (24). Además, se demostró una retención del principio activo dentro de estas micelas superior al 75% después de 48 horas de administrado por vía intravenosa en modelos de ratones, lo que indica su alta estabilidad (24). Otros estudios, utilizando este copolímero o derivados, también han demostrado la posibilidad de almacenar y entregar principios activos con actividad anticancerígena como la vitamina K3 (25) y camptotecina (26), ambos con problema en solubilidad en medios acuosos, e incluso aprovechar sus ventajas para la entrega de sustancias con fines diagnósticos de tumores, como el ácido dietilentriaminapentacético (27). En otro estudio, se desarrolló un sistema innovador de LCMs que demostraron ser sensibles a pH, utilizando como copolímero sensible un derivado de PEG y ácido esteárico conjugado con metacrilato de polisulfametoxina para la entrega de paclitaxel, demostrando mayor efectividad en la internalización y efecto citotóxico *in vitro* en células cancerígenas MCF-7 humanas a pH 6,5 que en condiciones fisiológicas, lo que demuestra un control óptimo en la liberación del principio activo mediada por estímulo, en este caso, el pH del tejido canceroso (28).

Por otra parte, Fritz y cols. (29) desarrollaron una formulación para la obtención de LCMs a partir de Gelucire 44/14<sup>®</sup>, una mezcla de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de ácidos grasos, glicerol y PEG (30), mediante la técnica de emulsificación en caliente de baja energía, para la asociación con nifedipino, un principio activo de baja solubilidad acuosa utilizado como tratamiento de la hipertensión arterial y angina, obteniendo un aumento significativo en la cantidad de principio activo dispersa en agua, en comparación con el principio activo sin asociar. A partir de este último estudio, se adaptó la elaboración de este sistema para transportar fármacos más hidrofílicos de origen biológico de estructura pequeña, utilizando como modelo la hormona peptídica insulina humana (31). Se demostró que la insulina tuvo una alta asociación, principalmente en la superficie hidrofílica de las LCMs y, a partir de ahí, una liberación acumulada de aproximadamente un 60% tras 24 h. Además, otro punto de interés en este estudio es que se logró demostrar la capacidad que tienen estas micelas de ser formuladas en películas mucoadhesivas de administración bucal, mediante la técnica de impresión por inyección

de tinta, mostrando, por tanto, la versatilidad de estos sistemas micelares en transportar fármacos hidrofílicos y su posibilidad de uso para la obtención de una forma farmacéutica final (31). Asimismo, en otro estudio se logró funcionalizar en forma eficiente la superficie de LCMs con aptámeros capaces de reconocer la proteína nucleolina, sobreexpresadas en tejidos cancerígenos a nivel endotelial, pudiendo ser utilizadas como vehículos para la administración de complejos metálicos con potencial uso en técnicas diagnósticas capaces de dirigirse activa y específicamente a estos tipos de tejidos (32). Por lo tanto, las LCMs constituirían una alternativa para poder mejorar la solubilidad acuosa y permeabilidad a través de barreras biológicas de principios activos de clase 2 y 4, mejorando su biodisponibilidad y lograr un efecto terapéutico en el tejido deseado.

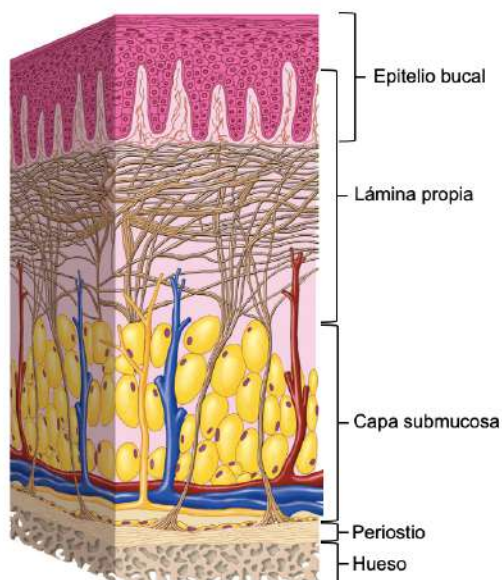
### **1.3 Vía de administración bucal**

Para la administración de principios activos, existen múltiples vías o rutas de acceso, de acuerdo con el sitio de acción y la temporalidad del efecto farmacológico que se requiera lograr (33). En base a ello, la vía oral es la ruta clásica más utilizada, conveniente y ampliamente tolerada por los pacientes, dado principalmente por su seguridad, comodidad y de no requerir personal adiestrado, como en el caso de las rutas parenterales. Sin embargo, esta vía presenta dificultades y desafíos que deben ser superados para la administración de principios activos de clases 2 y 4, específicamente a nivel de la formulación del producto final (34,35). La vía oral posee múltiples condiciones fisiológicas que deben ser consideradas para el desarrollo de cualquier sistema de entrega de principios activos, incluyendo los cambios en los valores de pH entre una zona y otra a lo largo del tracto gastrointestinal, la presencia de enzimas capaces de metabolizar principios activos y de transportadores capaces de expulsarlos, conformación histológica del epitelio relacionado con el proceso de absorción de sustancias, la microbiota residente principalmente en la porción inferior de la vía gastrointestinal, y el efecto de primer paso hepático que se produce tras la absorción intestinal, lo que se traduce en un mayor metabolismo y depuración del principio activo antes de que alcance la circulación sistémica y, por ende, un menor efecto terapéutico (36). Considerando estos desafíos, es que surgen vías de administración alternativas o no convencionales, los cuales permiten

superar algunas limitaciones propias de la vía de administración oral y que han atraído el interés de las ciencias farmacéuticas para la investigación y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas utilizando estas rutas.

Dentro de las vías no convencionales, se encuentra la vía de administración bucal, que ha concitado el interés en las últimas décadas (37,38). Esta ruta comprende la utilización de la cavidad oral, específicamente la mucosa absorptiva presente en la zona interior de las mejillas y tejidos circundantes entre las encías y labios (39). Esta mucosa bucal se divide en tres zonas: la membrana de mucosa que reviste el exterior del vestíbulo oral, la región sublingual o masticatoria, y la mucosa especializada, conformando todas ellas un 60%, 25% y 15% de la superficie total de la mucosa bucal en el adulto humano, respectivamente (39). El epitelio bucal está constituido por 40 a 50 capas de células epiteliales escamosas y estratificadas no queratinizadas, formando una barrera de entre 100 a 800  $\mu\text{m}$  de espesor, dependiendo de la zona anatómica (Figura 2). Este epitelio está dispuesto sobre células continuas no estratificadas y tejido conectivo, en lo que se conoce como láminas basal y propia, respectivamente, seguida de un lecho altamente vascularizado de células musculares lisas en la capa submucosa (39–41). Por otra parte, la superficie más externa de este epitelio se encuentra cubierta por un revestimiento de saliva de un espesor descrito entre 70 a 100  $\mu\text{m}$ , compuesto mayormente por mucus y algunas proteínas y minerales. Este mucus está formado principalmente por agua y glicoproteínas, denominadas como mucinas, que presentan carga negativa dado por la presencia de grupos funcionales ácidos, los que a pH de la cavidad oral se encuentran ionizados en forma de aniones. Son justamente estas cargas negativas de las mucinas las que permiten que estas glicoproteínas se adhieran al epitelio bucal, formando una capa coloidal, estabilizadas por puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares y puentes disulfuros, que cumplen una función relevante en la interacción con los sistemas de entrega y los principios activos transportados para su administración (40,41).





**Figura 2.** Representación esquemática del epitelio bucal. Adaptado de Nanci (42).

Dentro de las ventajas propias de la administración bucal, se encuentran la tasa lenta de renovación y recambio celular del epitelio bucal que fluctúa entre 5 a 7 días; ser una zona con menor flujo y, por tanto, lavado salival; y de menor cizalla ejercida por los procesos de masticación, en comparación con otras zonas de la boca. Esto permite la formulación y administración de sistemas con una liberación controlada de principio activo. Sin embargo, una de las principales desventajas es que la permeabilidad del epitelio bucal es menor que otras zonas de la cavidad oral, como la sublingual, siendo necesaria la elaboración de formas farmacéuticas y el uso de excipientes que permitan potenciar la absorción de principios activos a través de este epitelio (39,41). Dentro de los productos actualmente comercializados y aprobados por la FDA que utilizan la vía bucal de administración se pueden encontrar tabletas de aciclovir, fentanilo y miconazol; películas y parches mucoadhesivos de diazepam, fentanilo, lidocaína y buprenorfina sola o asociada con naloxona; y goma de mascar de nicotina (43). Además, diversas investigaciones han llevado a la elaboración de diferentes y potenciales formas farmacéuticas incluyendo obleas bucodispersables (44), esponjas (45), hidrogeles mucoadhesivos (46), películas mucoadhesivas compuestas por polímeros de injerto (47), spray (48) y nanopartículas (49). Por lo tanto, la ruta bucal de administración sería una

alternativa a la vía oral para la administración de principios activos de baja solubilidad acuosa, aprovechando las ventajas de este epitelio y mediante el conocimiento de sus principales desventajas, conducir a la elaboración de formas farmacéuticas capaces de sobrepasar estos desafíos.

#### **1.4 Potenciación de la absorción de principios activos**

La elaboración de formas farmacéuticas como sistemas de entrega de principios activos de clases 2 y 4, teniendo en cuenta la anatomía y factibilidad de la vía bucal como ruta de administración, ha concitado el interés de muchos investigadores a nivel mundial. Una de las estrategias utilizadas para potenciar la absorción de estos principios activos es el uso e incorporación de potenciadores de la permeación bucal (50,51). Los potenciadores de la permeación son compuestos químicos de distinta naturaleza y origen, que se adicionan a la forma farmacéutica con el fin de incrementar el paso a través de la membrana o aumentar la velocidad de absorción de un principio activo de interés, sin dañar la constitución de la barrera biológica ni causar toxicidad. En general, estos compuestos potenciadores pueden actuar mediante diversos mecanismos, tales como aumentando la distribución y partición del principio activo en el tejido; interactuando con dominios proteicos de las células epiteliales, alterando la fluidez y la composición de la barrera; o incrementando el tiempo de retención del principio activo en la superficie del epitelio (52).

En cuanto a potenciadores de la permeación bucal, se han descrito la utilización de múltiples tipos de compuestos, incluyendo tensoactivos, polímeros catiónicos, sales biliares, agentes quelantes, complejos poliméricos derivados de sacáridos y algunos ácidos grasos (50,52). Además, existen evidencias de la capacidad de algunos aminoácidos de potenciar la permeación de principios activos a través de epitelios. A finales de la década de los 80, Sarpotdar y cols., lograron patentar la utilización de *L*- $\alpha$ -aminoácidos como potenciadores de la permeación para la ruta transdérmica, incluyendo los aminoácidos triptófano, prolina, alanina, serina, arginina, isoleucina y valina (53). La principal ventaja de utilizar aminoácidos como potenciadores de la permeación es que son

compuestos biocompatibles, por lo que presentan baja toxicidad, además de alta actividad con buena reversibilidad de efectos (54).

Pese a las diferencias histológicas entre la piel y la mucosa bucal, es de interés la posibilidad de utilizar ciertos aminoácidos como potenciadores de la permeación bucal. En este contexto, se logró demostrar que la adición de aminoácidos de arginina a un complejo de ciclodextrina para la administración de omeprazol ayudó a aumentar la permeación del complejo a través de un modelo de mucosa bucal porcina, en comparación con el complejo ciclodextrina-omeprazol y omeprazol libre como controles (55). Esta permeación potenciada se basa en que la arginina puede establecer interacciones electrostáticas gracias al grupo guanidina protonada de su cadena lateral con la superficie negativa de las mucinas, aumentando el tiempo de contacto entre el complejo omeprazol-ciclodextrina y el epitelio bucal (56). Por otra parte, el desarrollo de nanopartículas de valina dispuestas en películas mucoadhesivas ha demostrado potenciar la permeación de insulina en un modelo *in vitro* de células bucales humanas, en comparación con una solución del péptido libre, atribuyéndose este efecto potenciador no solo a la presencia de valina, sino que a la generación de un gradiente de concentración de nanopartículas dispuestas en la película, favoreciendo el paso desde la forma farmacéutica hacia las células; otro efecto que pudo contribuir a esta permeación potenciada es el aumento en el tiempo de contacto de la película en el epitelio por sus características mucoadhesivas (57). Asimismo, se obtuvo que la utilización de aminoácidos básicos como lisina e histidina ayudaron a incrementar la solubilidad de insulina, potenciando su permeación en un modelo *in vitro* de células bucales, asociado principalmente a la formación de pares iónicos estables, permitiendo que el complejo insulina-aminoácido penetre la barrera como una sola entidad y en forma más eficiente que la insulina libre (58).

Sin embargo, el uso de aminoácidos se asocia principalmente con la elaboración de estructuras más grandes, tales como péptidos, o bien transformarlos en derivados de tipo anfifílicos, ya que de por sí muestran un bajo coeficiente de permeación y, por tanto, no podrían administrarse en cantidades suficientes para producir un efecto en la potenciación de la absorción (54). En base a esto, se ha propuesto el diseño y utilización

de péptidos de penetración celular (CPP, del inglés *cell penetrating peptide*). Estos CPPs consisten en péptidos cuyas secuencias no exceden usualmente de los 30 aminoácidos y tienen la capacidad de cruzar barreras biológicas, ya sea en forma activa o pasiva y sin la necesidad de un reconocimiento espacial por un receptor específico (59,60). De acuerdo con su origen, estos CPPs pueden ser clasificados en dos grandes grupos (60,61):

1. Derivados de proteínas naturales: provienen de múltiples fuentes como proteínas de unión a ácidos nucleicos, de la envoltura viral y péptidos con función antimicrobiana, entre otras (por ejemplo: TAT, VP22 y Antp).
2. Derivados artificiales: están diseñados y sintetizados en función de los CPPs derivados de proteínas naturales, utilizando técnicas como el reemplazo de ciertos aminoácidos y delección de secuencias.

En base a esta estrategia, Hingorani y cols. han diseñado un sistema de detección temprana de cánceres de células escamosas de cabeza y cuello, incluyendo el cáncer de la cavidad oral, mediante la utilización de un CPP radiométrico. Este péptido fue diseñado artificialmente, presentando un motivo activable por proteasas, específicamente las isoformas 2 y 9 de la metaloproteinasa de la matriz (MMPs, del inglés *matrix metalloproteinases*), que se encuentran ampliamente sobreexpresadas en estos tipos de tumores. Este tipo de CPP radiométrico tiene la capacidad de atravesar estas células cancerígenas y ser activado mediante escisión mediada por dichas MMPs, generando secuencias remanentes que fluorescen, siendo, por tanto, útil para el diagnóstico de estos tipos de neoplasias (62). En otro estudio, se logró purificar y obtener varios péptidos antimicrobianos de origen vegetal, entre ellos la retrociclina, caracterizándose por ser altamente estable a pH ácido y neutro y a temperaturas entre 25 y 37 °C. En ese sentido, se demostró que la retrociclina conjugada con una molécula fluorescente presenta un mejor perfil de permeación que otras moléculas que actúan como CPPs utilizadas como control, incluyendo la subunidad B de la toxina del cólera y el dominio de transducción de proteínas virales, en diversos tipos celulares ubicados en la cavidad oral, incluyendo las células madres mesenquimales del maxilar y del ligamento periodontal y células estromales gingivales, teniendo como finalidad su utilización como potenciadores de la

permeación (63). Otro CPP que ha sido estudiado es la penetratina, compuesta por 16 aminoácidos y aislada a partir del tercer hélice del dominio de unión a ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés *desoxirribonucleic acid*) de la proteína antenapedia (Antp) de *Drosophila* sp. (64). En ese sentido, se elaboraron liposomas conjugados con penetratina para el transporte de calcitonina, mediante la estrategia química de maleimidatiol, obteniéndose un aumento significativo en la permeación a través del epitelio bucal porcino en comparación con liposomas sin conjugar y una solución de calcitonina (65). Por lo tanto, la utilización de péptidos podría ayudar a mejorar la permeación de principios activos como nanopartículas a través del epitelio bucal.

### **1.5 Enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades de origen cardiovascular están clasificadas como enfermedades no transmisibles (ENTs) de tipo crónicas, siendo las más importantes los ataques al corazón, arritmias, enfermedades isquémicas cardíacas o coronarias (por ejemplo: aterosclerosis), fallas cardíacas, enfermedades valvulares, y patologías venosas y arteriales periféricas (66). A nivel mundial, se sabe que, en tan solo 30 años, la prevalencia de pacientes con ENTs de tipo cardiovascular se ha incrementado en un 92%, pasando de 271 millones en 1990 a 523 millones al 2019 (67). A nivel nacional y de acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2016/2017 elaborado por el Ministerio de Salud, el 27,6% de la población ha presentado sospecha de hipertensión arterial y el 3,3% ha reportado haber sufrido al menos un episodio de infarto agudo al miocardio (68). En ese sentido, se han asociado múltiples factores de riesgo con el desarrollo y evolución de las ENTs cardiovasculares, incluyendo factores biológicos (por ejemplo: edad, género, etnia), patológicos (por ejemplo: obesidad, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia), conductuales (por ejemplo: consumo de tabaco y alcohol, alimentación, falta de actividad física) y sociales (por ejemplo: componentes socioeconómicos y culturales) (69). A raíz de esto, los gastos en el sistema de salud asociados a ENTs cardiovasculares suelen comprender entre un 7,6 y 21% del presupuesto de un país, asociados principalmente a la atención hospitalaria y al gasto en tratamiento farmacológico (70). Así, tanto la industria farmacéutica como grupos de investigación han puesto el enfoque y esfuerzo en

desarrollar sistemas de entrega de principios activos dirigidos específicamente hacia el sistema cardiovascular.

### **1.5.1 Estrategias para potenciar la orientación de sistemas de entrega de principios activos hacia el sistema cardiovascular**

La permeación a través de membranas biológicas no es el único desafío que deben superar las nanopartículas como sistemas de entrega de principios activos, sino que también su correcta orientación hacia los tejidos y células de interés (direccionalización o *targeting*). Para lograr esto, la principal estrategia utilizada es la inclusión de moléculas o entidades químicas que sirvan como ligandos y que posean la capacidad inherente de unirse en forma selectiva al tejido o células blanco, e incluso poder selectivamente unirse a células con cierto grado de anormalidad o patología, mediante la sobreexpresión de algún receptor en especial, en lo que se conoce como direccionalización activa (71). Dentro de las entidades químicas utilizadas como ligandos, se pueden encontrar moléculas de estructura compleja como aptámeros, anticuerpos y otras proteínas, y otras más sencillas, tales como algunas vitaminas, carbohidratos, péptidos y partículas derivadas de patógenos (72).

Dada la prevalencia de ENTs de origen cardiovascular, la comunidad científica ha centrado su interés en elaborar estrategias para la entrega selectiva de principios activos hacia este sistema. El corazón es un componente fundamental del sistema cardiovascular y dentro de su constitución se encuentran los cardiomiocitos, que corresponden a células musculares estriadas, siendo de especial interés como células blanco para la entrega de principios activos para mejorar su función a nivel cardíaco (73). Una estrategia descrita para una orientación selectiva hacia este tipo de células cardíacas fue descrita por McGuire y cols., los cuales aislaron una secuencia peptídica compuesta por 20 aminoácidos (WLSEAGPVVTVRALRGTGSW), denominada como PCM-1 (del inglés, *primary cardiomyocytes* 1), mediante la tecnología de presentación sobre fagos. Este péptido comparte una secuencia en común con la tenascina X (VTVRALRGTGSW), que es una glicoproteína que se expresa ampliamente en el tejido conectivo, muscular y matriz extracelular del corazón. Este estudio logró demostrar la alta selectividad y acumulación

de este péptido en cardiomiocitos, en comparación a otras células que componen el tejido cardíaco (74).

En base al péptido PCM-1, se han conducido múltiples investigaciones para poder incluir esta secuencia dentro de la formulación de sistemas de entrega de principios activos con el fin de orientarlas hacia los cardiomiocitos. El primer estudio en donde se utilizó este péptido específico para cardiomiocitos fue el realizado por Nam y cols., desarrollando un polímero de policistamina bisacrilamida-diaminohexano conjugado con PCM-1. Este polímero conjugado sirvió de base para la elaboración de complejos con ácido ribonucleico de interferencia de pequeño tamaño (siRNA, del inglés *small interfering ribonucleic acid*) como terapia génica para inhibir la apoptosis de cardiomiocitos. Los complejos formados demostraron presentar una mayor tasa de internalización celular en comparación con complejos utilizando un polímero no conjugado con PCM-1, en un modelo *in vitro* de origen cardíaco a partir de células H9C2. Además de ser internalizados, estos complejos conjugados demostraron ser efectivos, ya que la actividad antiapoptótica en este modelo celular fue significativamente mayor en comparación con las células no transfectadas con este complejo. Estas observaciones confirman la viabilidad de esta formulación para lograr inhibir la muerte celular de los cardiomiocitos gracias a la orientación selectiva y efectiva de los complejos conjugados con la secuencia PCM-1 (75).

En otra investigación, se obtuvo resultados similares asociados con la regresión de la hipertrofia cardíaca por modulación de la apoptosis de cardiomiocitos utilizando curcumina, una sustancia polifenólica obtenida de la raíz de cúrcuma (*Curcuma longa*) con potencial antihipertrófica. La curcumina fue encapsulada en nanopartículas de quitosano carboximetilado conjugadas con ácido esteárico funcionalizado con PCM-1. En ese sentido, se determinó que el mecanismo antiapoptótico se relacionó con una disminución en la síntesis de marcadores y mediadores proapoptóticos como la caspasa 3 y la proteína Bax asociada con la curcumina, teniendo una mejor actividad en comparación con los vehículos control, por una mayor direccionalización hacia el tejido cardíaco (76).

Otra plataforma que ha utilizado la secuencia PCM-1 fue la desarrollada por Zhao y cols. En este estudio, se logró obtener sondas acústicas a escala nanométrica de

perfluorocarbono conjugadas con la secuencia peptídica y cargadas con  $17\beta$ -estradiol como potencial herramienta para el diagnóstico y tratamiento de la hipertrofia cardíaca. Estas nanosondas demostraron presentar una mayor direccionalización hacia cardiomiocitos y, mediante estímulos focalizados de ultrasonido de baja intensidad, se logró determinar su utilidad como medio de contraste imagenológico amplificable. Además, estos sistemas estimulados con ultrasonido permitieron suprimir la hipertrofia cardíaca (77).

Por otra parte, Mentkowski y Lang lograron diseñar y elaborar vesículas exocíticas o exosomas que expresaran la proteína de membrana Lamp2b fusionado con PCM-1 para la inhibición de la apoptosis cardíaca. Estos exosomas demostraron tener una mayor tasa de internalización en cardiomiocitos en comparación con exosomas que no expresaban esta secuencia orientadora. Asimismo, con el aumento en la internalización de estos exosomas, se observó una disminución en la apoptosis de los cardiomiocitos (78).

Un aspecto interesante fue el desarrollado por Wang y cols. En esta investigación, se elaboraron liposomas formulados con 1,2-diestearoil-glicero-3-fosfoetanolamin-*N*-(amino-PEG)-2000 conjugadas con dos secuencias peptídicas funcionales: la orientadora PCM-1 y el péptido de permeación TAT (secuencia peptídica YGRKKRRQRRR). Estos liposomas conjugados demostraron presentar un mayor grado de internalización a través de los cardiomiocitos, en comparación con liposomas sin conjugar y liposomas conjugadas con PCM-1 y TAT por separado (79). Por lo tanto, con estas evidencias se demuestra que la secuencia PCM-1 es capaz de tener una mayor selectividad por los cardiomiocitos, pudiendo ser utilizada como ligando para la direccionalización activa a estas células, sin perjuicio de poder ser conjugada con otros péptidos o secuencias de interés en un mismo sistema de entrega.

## **1.6 Sistemas de entrega bioactivables**

La selectividad de los sistemas de entrega no solo se alcanza con su correcta direccionalización hacia el tejido blanco de interés, sino también en la elaboración de formulados que sean sensibles y activables frente a ciertos estímulos, en los que se conocen como sistemas de entrega bioactivables (del inglés *bioresponsive delivery*



*system*). La característica principal de estos sistemas de entrega bioactivables es que están diseñados para mantenerse inactivos durante la circulación y ser selectivamente activados mediante estímulos endógenos específicos en el tejido blanco. Dentro de estos estímulos se encuentran condiciones características o fisiopatológicas diferenciadoras entre distintas zonas del organismo, tales como pH, actividad enzimática o presencia de especies reactivas (13,80). Para lograr esta selectividad, usualmente se incorporan un pequeño fragmento o motivo peptídico como secuencia enlazadora o *linker* capaz de responder frente al estímulo específico (13).

### **1.6.1 Metaloproteinasas de la matriz**

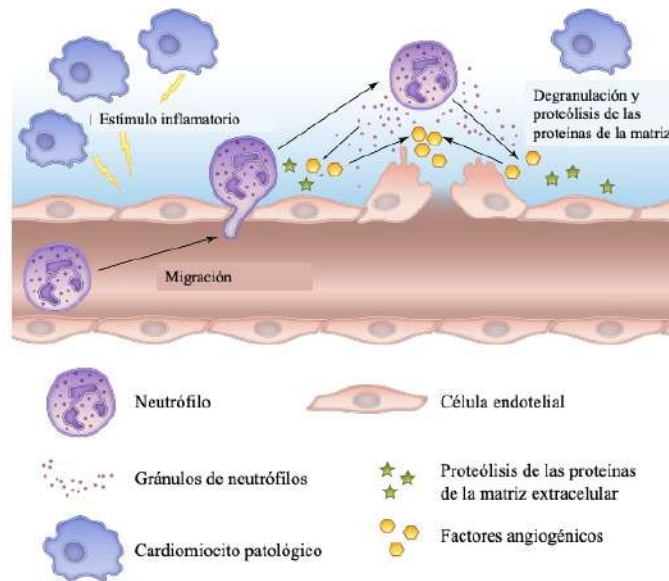
Entre las enzimas de interés que se pueden utilizar como estímulo para la activación de estas secuencias enlazadoras se encuentran las MMPs. Estas enzimas pertenecen a una familia de endopeptidasas extracelulares dependientes de zinc, que están involucradas en el procesamiento de proteínas estructurales, moléculas de señalización celular y factores de crecimiento. Actualmente, se han logrado identificar 28 isoformas distintas, de los cuales, 23 se expresan en humanos y 14, específicamente, en el sistema cardiovascular (81–84). Las MMPs poseen una estructura altamente conservada, compuesta por cuatro zonas. El dominio catalítico está formado por 170 aminoácidos e incluye el motivo de coordinación con el átomo de zinc, siendo este dominio el responsable de la actividad endopeptidasa de estas enzimas. El dominio propéptido está constituido por aproximadamente 80 aminoácidos, presentando un residuo de cisteína altamente conservado entre las distintas isoformas, ya que está relacionado con la mantención de su forma inactiva (efecto autoinhibitorio) y, por tanto, la escisión de este dominio sería necesaria para la formación del estado activo de la enzima. El dominio hemopexina está conformado por 200 aminoácidos y es importante para establecer interacciones proteína-proteína con el sustrato. Finalmente, el dominio enlazador es de longitud variable y, tal como su nombre lo indica, permite conectar los dominios catalítico y hemopexina (82,85).

Los principales sustratos para estas enzimas son principalmente proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno, elastina, fibronectina, laminina y tenascina (82).

A nivel fisiológico, la expresión y actividad de MMPs se relacionan con procesos de remodelamiento tisular, migración y proliferación celular, angiogénesis, inmunidad y cicatrización de heridas (86). Cuando existe una sobreexpresión de estas enzimas y, por tanto, aumento de la actividad endopeptidasa, se conduce a la generación de estados patológicos, tales como inflamación aguda y crónica, neoplasias e hipertrofia tisular (81,86). A nivel cardiovascular, las MMPs cumplen diversas funciones, contribuyendo a la integridad estructural del corazón y vasos sanguíneos, la adhesión y comunicación intercelular, modulación de la supervivencia y apoptosis celular, y la regulación de los procesos de inflamación, herida o alteración en el tamaño del corazón (87). Específicamente, se ha demostrado una expresión aumentada de las isoformas MMP-2, MMP-3 y MMP-9, que están asociadas a los eventos proinflamatorios subyacentes en los procesos ateroscleróticos y la ruptura de placas de ateroma, y del remodelamiento cardíaco tras un infarto al miocardio (87,88). Por otra parte, se ha visto un aumento en la actividad de las enzimas MMP-2 y MMP-9 en los procesos asociados a síndromes coronarios agudos e isquémicos, importantes en los sucesos de infartos al miocardio, que como se describió anteriormente, forman parte de las principales ENTs de origen cardiovascular que afectan a la población en general (87,89).

La actividad de MMP-9, también conocida como gelatinasa B, se ha relacionado con el remodelado tisular en estados patológicos, involucrando un proceso inflamatorio inicial, seguido de fibrosis y migración de fibroblastos cardíacos. Además, su actividad aumentada en plasma está relacionada con un mal pronóstico a nivel cardiovascular (83,90). Dentro de las células responsables de la síntesis y liberación de MMP-9 se pueden encontrar los fibroblastos, neutrófilos y macrófagos, cuya actividad conllevaría a la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, activación de factores proangiogénicos, citoquinas y quimioquinas, generando un proceso inflamatorio (Figura 3) (90). En ese sentido, múltiples estudios han logrado relacionar a la MMP-9 como biomarcador para complicaciones cardiovasculares, en donde los niveles plasmáticos de esta enzima puede fluctuar entre 40 a 500 ng/mL, en pacientes con enfermedades cardiovasculares (91–95). Por lo tanto, la expresión y actividad aumentada de la MMP-9

podría ser un punto en consideración para generar sistemas selectivos para la entrega de principios activos en ENTs de origen cardiovascular.



**Figura 3.** Secreción de metaloproteinasas de la matriz frente a un estímulo inflamatorio a nivel cardíaco. Adaptado de Yabluchanskiy y cols. (90).

### 1.6.2 Péptidos con selectividad por metaloproteinasas de la matriz-9

Se ha reportado diversos péptidos capaces de reconocer y ser activados por la actividad endopeptidasa de la MMP-9. Uno de ellos es el oligopéptido GK8, compuesto por 8 aminoácidos (GPVGLIGK). Este fragmento tiene la característica de poder ser escindido tanto por las isoformas MMP-2 y MMP-9. En ese sentido, se logró conjugar este fragmento peptídico con PEG metoxilado en un extremo y succinato de  $\alpha$ -tocoferol en el otro extremo del péptido (96). Este nuevo material fue utilizado para la elaboración de micelas poliméricas como sistemas de entrega bioactivable por MMP-2/9 en células tumorales HT1080, utilizando docetaxel como principio activo modelo. Los resultados demostraron una mayor internalización y acumulación de estos en las células tumorales y, por tanto, una mayor actividad antineoplásica, en comparación con micelas no conjugadas con este oligopéptido. Incluso, se demostró que estas micelas tenían una mayor acumulación en células HT1080 con sobreexpresión de MMP-2 y MMP-9 que las mismas

células con una expresión reducida de ambas isoformas, lo que demuestra la alta selectividad de este fragmento por la actividad proteolítica de ambas MMPs (96).

El oligopéptido compuesto por 8 aminoácidos, GPQGIAGQ, fue propuesto como una secuencia activable específicamente por MMP-9. Este péptido fue utilizado como secuencia enlazante para la formación de sistemas de entrega bioactivables para la administración de péptidos como inhibidores de la miostatina, útiles en patologías inflamatorias y distróficas musculares. En ese sentido, se logró demostrar que esta secuencia de 8 aminoácidos es escindida eficientemente por la MMP-9, en comparación con otras isoformas como la MMP-1 y MMP-8 (97).

Otra secuencia específica para la MMP-9 es el tetrapéptido HWGF. Este péptido puede autoensamblarse para la formación de vesículas esféricas y, por tanto, constituir de por sí un sistema de transporte de principios activos (98). A partir de ello, se demostró que este péptido fue capaz de generar vesículas y transportar efectivamente doxorubicina a células MCF7 de cáncer mamario con una alta expresión de MMP-9, inhibiendo el proceso de crecimiento y migración de estas células y estimular la apoptosis. Estos resultados se deben principalmente a la alta afinidad de este tetrapéptido por la enzima, en donde, a través de estudios de modelamiento molecular, se logró establecer la formación de puentes de hidrógeno con los residuos de asparagina, ácido glutámico, metionina, lisina y ácido aspártico de la MMP-9 (98).

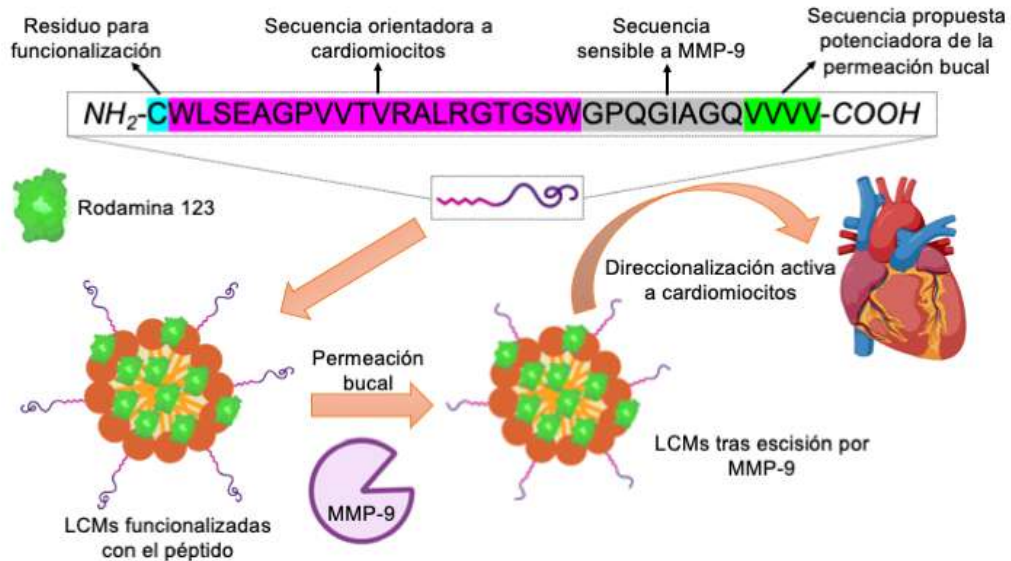
Por otra parte, el pentapéptido AGLDD también ha demostrado tener capacidad de ser activado por la MMP-9. En ese sentido, se utilizó este péptido como parte de una estrategia para la elaboración de nanopartículas de estructura transformable continua y secuencialmente activable para la administración de principios activos en células tumorales (99). El péptido sintetizado contenía tres motivos: el dominio externo RGD de reconocimiento y unión al receptor de vitronectina de tipo integrina  $\alpha_v\beta_3$  ampliamente sobreexpresado en la superficie de células tumorales (99,100); el dominio intermedio AGLDD activable por MMP-9; y un dominio interno de FFK con un extremo de ácido 2-naftilacético conjugado químicamente con doxorubicina, como fármaco antineoplásico modelo, permitiendo autoensamblarse formando nanopartículas esféricas. Estas

nanopartículas demostraron una mayor distribución e internalización en células tumorales, teniendo la particularidad de generar la liberación del principio activo antineoplásico conjugado gracias a la presencia de la secuencia activable AGLDD, que es específicamente escindida en el enlace peptídico que une los residuos de G y L por la MMP-9. Por otra parte, el fragmento residual de FFKAG tiene la particularidad de autoensamblarse en nanopartículas en forma de fibrilla, teniendo la capacidad de formar un entramado con las proteínas de la matriz extracelular del tejido neoplásico, resultando en la inhibición del crecimiento y migración celular, disminuyendo el riesgo de metástasis (99). Por lo tanto, con las estrategias antes mencionadas, se podría utilizar péptidos que serían activados por la enzima MMP-9, logrando así una mayor selectividad de los sistemas de entrega por tejidos que sobreexpresan esta endopeptidasa, principalmente en estados patológicos, como las ENTs de origen cardiovascular.

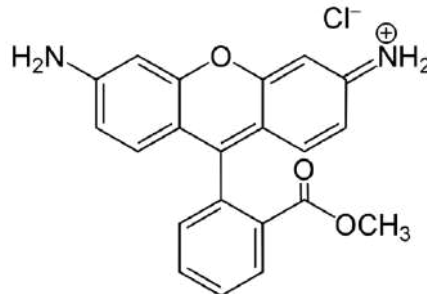
### **1.7 Propuesta de investigación**

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, el diseño de formulaciones como vehículos para la entrega de principios activos de clases 2 y 4 es una estrategia ampliamente estudiada en las últimas décadas. Estas formulaciones no están carentes de dificultades ni desafíos, relacionados principalmente con la vía de administración, la complejidad del medio biológico y la efectiva orientación y selectividad de estos sistemas hacia los tejidos y células de interés. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue poder desarrollar una formulación que sirva como sistema de transporte y entrega de moléculas de baja solubilidad acuosa hacia cardiomiocitos, a través de la absorción bucal, seguido de activación por MMP-9 para la exposición del fragmento orientador a dichas células (Figura 4). Para ello, se utilizó como molécula modelo la rodamina 123 (Rho, Figura 5), de característica fluorescente, mediante su incorporación y asociación a LCMs funcionalizadas con una cadena peptídica trifuncional, que consta de un fragmento en el extremo carboxilo terminal cuya función es como potenciador de la permeación bucal (VVVV), una secuencia intermedia activable por MMP-9 (GPQGIAGQ) y un motivo orientador a cardiomiocitos PCM-1 con un residuo de cisteína adicional en el extremo *N*-terminal para la funcionalización con la estrategia maleimida-tiol

(CWLSEAGPVVTVRALRGTGSW), siendo la estructura de la secuencia peptídica completa:  $NH_2$ -CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV- $COOH$ .



**Figura 4.** Esquema de la propuesta de investigación. LCM: micela de núcleo lipídico; MMP-9: metaloproteínasa de la matriz-9.



**Figura 5.** Estructura química de rodamina 123.

## 1.8 Hipótesis

Micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con la secuencia peptídica CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV presentan capacidad de transportar y entregar moléculas de baja solubilidad acuosa, a través de la absorción por vía bucal, activable por metaloproteínasa de la matriz-9 y con unión hacia cardiomiocitos.

## **1.9 Objetivos**

### **1.9.1 Objetivo general**

Desarrollar una formulación de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con la secuencia peptídica CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV para el transporte y entrega de moléculas de baja solubilidad acuosa por medio de la vía de absorción bucal, seguido de exposición del fragmento orientador a cardiomiocitos por escisión activada por metaloproteinasa de la matriz-9.

### **1.9.2 Objetivos específicos**

- OE1. Elaborar, purificar y caracterizar la secuencia peptídica CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV y otras de interés para la investigación.
- OE2. Elaborar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con la secuencia peptídica CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV y sus respectivos controles.
- OE3. Establecer la capacidad del fragmento potenciador de la permeación de favorecer la absorción bucal de las micelas de núcleo lipídico.
- OE4. Evaluar la capacidad de activación del segmento peptídico intermedio en la secuencia peptídica íntegra y funcionalizada sobre las micelas de núcleo lipídico mediada por exposición a MMP-9.
- OE5. Determinar la unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con el fragmento orientador.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Reactivos y materiales

Los aminoácidos utilizados para la síntesis de los péptidos de interés fueron adquiridos de la filial europea de Sigma Aldrich (Schnelldorf, Alemania). Cabe destacar que todos los aminoácidos corresponden a isómeros *L*, cuyo extremo *N*-terminal se encuentran protegidos con el grupo fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Además, algunos de estos aminoácidos contaban con grupos protectores adicionales en grupos reactivos presentes en sus cadenas laterales (anexo 1). La resina Wang precargada con el primer aminoácido de las secuencias de interés, hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 3,6-dioxa-1,8-octanditiol (DODT), triisopropilsilano (TIS) y 5(6)-carboxifluoresceína (CF) también fueron adquiridos de la filial europea de Sigma Aldrich. La matriz lipídica Gelucire 44/14<sup>®</sup> provino de Gattefossé (Saint-Priest, Francia). Los tensoactivos Tween 20<sup>®</sup> y Span 80<sup>®</sup>, la Rho y las tabletas de buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) pH 7,4 fueron comprados de la filial estadounidense de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). El dimetilsulfóxido (DMSO-*d*<sub>6</sub>) y cloroformo (CDCl<sub>3</sub>) deuterados, el ácido trifluoroacético (TFA, del inglés *trifluoroacetic acid*), el 1,4-ditiotreitol (DTT), colagenasa, pancreatina, la MMP-9 humana, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*), medio 199 (M199), suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*), suero fetal de ternero (FCS, del inglés *fetal calf serum*), penicilina, estreptomina, 5-bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdU), paraformaldehído (PFA) y solución de tinción Hoechst 33342 fueron adquiridos de Millipore Sigma (Burlington, MA, Estados Unidos). El medio de montaje fluorescente DAKO<sup>®</sup> fue comprado a Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, Estados Unidos). Los anticuerpos primario contra la troponina T cardíaca (MA5-12960) de origen murino y secundario AlexaFluor<sup>™</sup> 568 (AF568) antimurino fueron adquiridos a Invitrogen Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos). La β-alanina, anhídrido maleico, cloruro de tionilo (SOCl<sub>2</sub>), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), el ácido



fosfotúngstico, las sales de cloruro de zinc ( $ZnCl_2$ ), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ), fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ) e hidróxido de sodio (NaOH), el ácido etilendiaminatetracético (EDTA, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*) y el acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico fueron adquiridos a través de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). El tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) fue comprado a Winkler Ltda. (Santiago, Chile). Los solventes de grado analítico, incluyendo piridina, piperidina, diclorometano (DCM), *N,N*-dimetilformamida (DMF), éter etílico, etanol (EtOH), metanol (MeOH), trietilamina (TEA), tetrahidrofurano (THF) y DMSO no deuterado fueron adquiridos de Merck Millipore.

Dentro de los materiales más importantes, los reactores en jeringa de polipropileno con filtro de polietileno y tope de plástico fueron adquiridos de MultiSynTech (Witten, Alemania); la membrana de diálisis de celulosa con corte por tamaño molecular (MWCO, del inglés *molecular weight cutoff*) 10 kDa fue adquirida en Thermo Fisher Scientific; las puntas ZipTip con 0,6  $\mu$ L de resina  $C_{18}$  de 10  $\mu$ L de capacidad y los tubos de ultrafiltración Amicon<sup>®</sup> Ultra 15 mL de MWCO 5 y 10 kDa fueron comprados a Merck Millipore; y las grillas de cobre para microscopía electrónica fueron adquiridas a Business Electronics Int Spa (Santiago, Chile).

## **2.2 Síntesis, purificación, identificación y caracterización de la estructura secundaria de péptidos**

### **2.2.1 Síntesis de péptidos**

Junto con la síntesis del péptido trifuncional de interés (PEP, CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV), se elaboraron otras 3 secuencias peptídicas de interés para la presente investigación, tal y como se muestran en la Tabla 1, con sus respectivas masas moleculares y función.

**Tabla 1.** Secuencias peptídicas de los péptidos propuestos y sintetizados. Da: dalton; MMP-9: metaloproteínasa de la matriz-9.

Secuencia peptídica (de <i>N</i> - a <i>C</i> -terminal)	Nombre	Masa molecular (Da)	Función
CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV	PEP	3.350,87	Potenciación de la permeación bucal, activable por MMP-9 y orientador a cardiomiocitos
CWLSEAGPVVTVRALRGTGSW	CAR	2.245,61	Orientador a cardiomiocitos
CTWGEVPVARLTRLAGWSGSV	SCR	2.245,61	Control <i>scramble</i> del péptido CAR
CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQG	CLV	2.584,92	Orientación a cardiomiocitos más fragmento residual de secuencia activable por MMP-9

Todos los péptidos fueron elaborados a través de la técnica de síntesis en fase sólida, mediante el sintetizador de microondas automatizado marca CEM modelo Liberty Blue™ (Charlotte, NC, Estados Unidos). El proceso de síntesis se llevó a cabo en sentido *C*-terminal hacia *N*-terminal de cada secuencia peptídica. Para ello, se dispuso 100  $\mu$ mol de resina Wang precargada con el primer Fmoc-*L*-aminoácido de cada secuencia (V para PEP y SCR, W para CAR y G para CLV) en el reactor en jeringa; mientras que los Fmoc-*L*-aminoácidos restantes fueron mezclados con una cantidad suficiente de una solución 500 mM de HOBt en DMF para alcanzar 100  $\mu$ mol de cada aminoácido en 2 mL de solvente por cada reacción de acoplamiento, y colocados separadamente en tubos de centrifuga de 50 mL en cada uno de los reservorios dispuestos por el equipo para cada aminoácido. La reacción de acoplamiento se efectuó a temperatura ambiente, utilizando 100  $\mu$ L de DIC y 100  $\mu$ L de DIPEA por cada incorporación de aminoácidos. Una vez

finalizada la secuencia de acoplamiento del último aminoácido, la resina conjugada con la secuencia peptídica de interés fue lavada al vacío con DCM, seguida de éter etílico frío. Posterior a ello, se adicionó 2 mL de una solución de piperidina en DMF al 20% v/v al reactor, manteniendo en agitación constante por 2 horas, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Para la separación de los grupos protectores de los aminoácidos, se lavó la resina con tres porciones de DMF bajo vacío y se incorporó 2 mL de una solución de desprotección compuesta por 92,5% de TFA, 2,5% de DODT, 2,5% de TIS y 2,5% de agua ultrapura, incubándose bajo agitación por 3 horas, a temperatura ambiente y protegido de la luz. La mezcla fue filtrada en el mismo reactor y recolectada bajo 30 mL de éter etílico frío dispuesto en tubos de centrifuga, para ser centrifugada a 4.000 rpm, por 5 minutos y a 4 °C. El sólido residual fue resuspendido nuevamente en 30 mL de éter etílico frío y sometido nuevamente a centrifugación, totalizando 3 períodos de lavado. Finalmente, el péptido crudo fue recolectado y secado bajo campana en el tubo hasta la obtención de un sólido. Todos los péptidos propuestos fueron teóricamente analizados para la determinación del punto isoeléctrico (pI), índice de alifaticidad y el valor promedio de hidropatía GRAVY (del inglés, *grand average of hydropathicity*), a través de sus respectivas secuencias de aminoácidos, utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy desarrollada por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB, del inglés *Swiss Institute of Bioinformatics*) y disponible en línea en forma gratuita en la página <https://web.expasy.org/protparam/> (101).

Además de los péptidos anteriormente sintetizados, se realizó la elaboración de 3 secuencias peptídicas conjugadas con la molécula fluorescente CF, tal y como se muestran en la Tabla 2, con sus respectivas masas moleculares.

**Tabla 2.** Secuencias peptídicas de los péptidos conjugados con 5(6)-carboxifluoresceína (CF). Da: dalton.

Secuencia peptídica (de N- a C-terminal)	Nombre	Masa molecular (Da)
CF-CWLSEAGPVVTVRALRGTGSW	CF-CAR	2.603,89
CF-CTWGEVPVARLTRLAGWSGSV	CF-SCR	2.603,89
CF-CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQG	CF-CLV	2.943,24

Para el proceso de obtención de los péptidos fluorescentes, se siguió el mismo protocolo anterior, adicionando una etapa intermedia de acoplamiento. Tras la incorporación del último aminoácido de cada secuencia, se adicionó 500  $\mu\text{mol}$  de CF y 2 mmol de HOBt en 2 mL de DMF, junto con 100  $\mu\text{L}$  de DIC y 100  $\mu\text{L}$  de DIPEA. Esta mezcla se dejó incubar por 16 h, bajo agitación a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posterior a ello, se procedió con la técnica de lavado, desprotección de grupos protectores y recolección del péptido crudo siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente.

### **2.2.2 Purificación del péptido crudo**

La purificación del péptido crudo para la separación del péptido de interés se realizó a través de la técnica de cromatografía líquida rápida de proteína (FPLC, del inglés *fast protein liquid chromatography*). Para ello, los péptidos crudos fueron resuspendidos en una mezcla de ACN + 0,1% de TFA y agua ultrapura + 0,1% de TFA a una razón de 1:1, en un volumen suficiente para disolver completamente el sólido. Esta solución fue filtrada utilizando una jeringa acoplada a un filtro hidrofílico con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . La solución filtrada fue recolectada y dispuesta en un contenedor de vidrio borosilicado para ser acoplado al sistema cromatográfico FPLC marca General Electric modelo ÄKTA Explorer 100 (Friburgo de Brisgovia, Alemania).

La separación se llevó a cabo utilizando una columna cromatográfica de 250 mm de longitud  $\times$  21,2 mm de diámetro interno  $\times$  15  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula con poros de 100 Å, con relleno de  $\text{C}_{18}$ , marca Phenomenex modelo Luna (Torrance, CA, Estados Unidos). Para la fase móvil, se utilizaron dos mezclas: fase A (agua ultrapura + 0,1% de TFA) y fase B (ACN + 0,1% de TFA), los cuales fueron desgasificadas previo a su uso. La separación se realizó a través de una gradiente de fase móvil a un flujo de 2 mL/min, partiendo por 50% de B hasta los 40 minutos, para luego incrementar la proporción de la fase B a una velocidad de 1%/min hasta alcanzar el 100% de fase B y se mantuvo esta proporción por 30 minutos. El seguimiento de la separación se realizó a tres longitudes de onda: 214, 254 y 280 nm. Finalmente, fracciones de 2 mL fueron recolectadas tras el

proceso de separación y las de interés, fueron reservadas para su identificación y determinación de pureza.

### **2.2.3 Identificación, determinación de pureza y liofilización del péptido**

Las fracciones de interés recolectadas después del proceso de separación fueron evaluadas a través de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LCMS, del inglés *liquid chromatography-mass spectrometry*). En ese sentido, las muestras a medir debieron ser procesadas para eliminar las sales. Para ello, se utilizaron las puntas ZipTip de 10  $\mu\text{L}$  de capacidad con 0,6  $\mu\text{L}$  de resina  $\text{C}_{18}$  de acuerdo con el protocolo del fabricante (102). Brevemente, se humedeció la punta con 10  $\mu\text{L}$  de una solución compuesta por una mezcla acuosa de ACN al 50% con 0,1% de TFA, descartando el volumen para ser repetido una vez más; posterior a ello, se cebó dos veces la punta con el mismo volumen de una solución de equilibrio compuesta por agua ultrapura con 0,1% de TFA; luego, se aspiraron las fracciones de interés y se resuspendieron 10 veces, para que el péptido pueda entrar en contacto con la resina; y finalmente, se aspiró 10  $\mu\text{L}$  de la solución de lavado compuesta por una mezcla acuosa de ACN al 5% con 0,1% de TFA y se dispuso dentro de un vial cromatográfico con inserto de vidrio borosilicado, para su análisis a través del equipo LCMS marca Shimadzu modelo LCMS2020 (Kioto, Japón), con una columna marca Phenomenex modelo Synergy Fusion RP-80, con relleno de  $\text{C}_{18}$  de 150 mm de longitud  $\times$  4,6 mm de diámetro interno  $\times$  4  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, utilizando MeOH como fase móvil. Los espectros de masas fueron adquiridos en modo positivo entre los rangos  $m/z$  200 a 2000.

Una vez confirmada la identidad de los péptidos separados en los fragmentos de interés, se les determinó la pureza. Para ello, se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC, del inglés *reversed-phase high performance liquid chromatography*) marca Agilent modelo 1260 Infinity II (Santa Clara, CA, Estados Unidos), constituido por una bomba cuaternaria G7104A, un muestreador de viales G7129C, un termostato multicolumna G7166A y un detector ultravioleta (UV) G7114A. La columna elegida fue una con relleno de  $\text{C}_{18}$  marca Agilent modelo Zorbax Eclipse XDB de 150 mm de longitud  $\times$  4,6 mm de diámetro interno  $\times$  5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

El flujo fue configurado a 1 mL/min, utilizando como fase móvil las mismas utilizadas en la fase de purificación, en una proporción que se detalla en la Tabla 3. El volumen de inyección fue de 10 µL de cada fracción recolectada del proceso de purificación, en donde la detección fue programada a 214 nm. Se estableció que el límite mínimo de pureza requerida para los péptidos fue de 95%, por lo tanto, todas aquellas fracciones que no cumplieran con este porcentaje fueron nuevamente purificadas siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

**Tabla 3.** Gradiente de fase móvil utilizada para la determinación de pureza de los péptidos. Fase A: agua + ácido trifluoroacético al 0,1%; y fase B: acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1%.

Tiempo (min)	Porcentaje de fase A (%)	Porcentaje de fase B (%)
0 – 3	90	10
3 – 7	60	40
7 – 12	60	40
12 – 15	40	60
15 – 17	40	60
17 – 20	90	10
20 – 25	90	10

Una vez determinadas las fracciones de péptidos de interés con una pureza mayor o igual al 95%, se procedió a liofilizarlas. Para ello, las fracciones que contenían el mismo péptido fueron juntadas y colocadas dentro de un evaporador con bombeo de nitrógeno marca Zymark modelo TurboVap LV (Hopkinton, MA, Estados Unidos), con el fin de eliminar el ACN. Posteriormente, los péptidos con el agua remanente fueron congelados a -80 °C y liofilizados utilizando el liofilizador marca Martin Christ GmbH modelo Alpha 1-4 (Osterode am Harz, Alemania), hasta la obtención de un sólido seco. El péptido fue pesado y almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

#### **2.2.4 Determinación de la estructura secundaria de péptidos**

Los péptidos PEP, CAR, SCR y CLV ya purificados fueron analizados mediante espectroscopía de dicroísmo circular para determinar su estructura secundaria. Para ello, las muestras fueron disueltas en buffer fosfato pH 7,4 hasta alcanzar una concentración final de 1 mg/mL y analizadas por triplicado a longitudes de onda del espectro UV lejano (190 a 260 nm) a 25 °C, a través del espectrofotómetro de dicroísmo circular marca Jasco

modelo J-1500 (Tokio, Japón), en cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria. Todos los resultados, expresados en elipticidad ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ ), fueron procesados a través del programa gratuito CD Tool, desarrollado por el Instituto de Biología Molecular y Estructural de la Birkbeck Universidad de Londres, Reino Unido (103). Para la determinación de los tipos de estructura secundaria presentes en los péptidos, se estimó el porcentaje a través del programa en línea gratuito K2D2, desarrollado por el Instituto de Investigación en Salud de Ottawa, Canadá, en colaboración con el Grupo de Biología Computacional y Procesamiento de Datos del Centro para la Medicina Molecular Max Delbrück de Berlín, Alemania, disponible en la página web <http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d2/>, utilizando para ello los resultados de elipticidad obtenidos (104). Además, los resultados obtenidos por dicroísmo circular fueron comparados con la estructura secundaria predicha a partir de la secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos a través del programa en línea gratuito YASPIN, desarrollado por la Universidad Libre de Ámsterdam, Países Bajos, disponible en la página web <http://zeus.few.vu.nl/programs/yaspinwww/> (105), con el fin de determinar la ubicación de posibles estructuras secundarias dentro de una secuencia de aminoácidos.

## **2.3 Síntesis y funcionalización de micelas de núcleo lipídico**

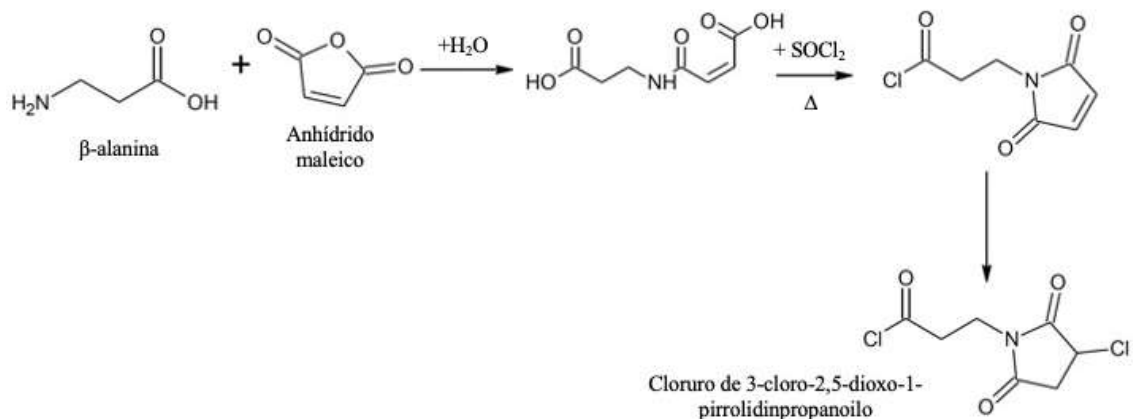
### **2.3.1 Síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo**

El cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo sirve como punto de partida para la obtención de un intermediario maleimida clave para la funcionalización del péptido con la matriz lipídica que constituye las LCMs. En ese sentido, para su obtención se realizó su síntesis química de acuerdo con lo descrito por Ji y cols. (106), tal como se indica en la Figura 6. Brevemente, se dispuso 8,9 g de  $\beta$ -alanina y 9,8 g de anhídrido maleico en un balón de vidrio de fondo redondo con 15 mL de agua destilada y se mantuvo la mezcla bajo agitación por 3 horas. Transcurrido el tiempo, se filtró la solución y el sólido residual se lavó con 3 porciones de 50 mL de agua destilada, etanol y finalmente éter etílico. Una vez seco, se dispuso el sólido residual con 30 mL de  $\text{SOCl}_2$  en un balón de vidrio bajo reflujo por 30 minutos y posterior a ello, se removió el  $\text{SOCl}_2$  en evaporador rotatorio a presión reducida hasta la obtención de un líquido amarillo viscoso, para dejarlo

secar bajo campana hasta la obtención del sólido de interés. El sólido fue pesado para la determinación del porcentaje de recuperación de sólidos, a través de la Ecuación 2.

**Ecuación 2.** Cálculo del porcentaje de recuperación de sólidos de la conjugación.  $m_{obtenida}$ : masa total obtenida tras la finalización del proceso;  $\Sigma m_{reactivos}$ : suma total de masas de sólidos utilizados durante el proceso.

$$Rendimiento (\%) = \frac{m_{obtenida}}{\Sigma m_{reactivos}} \times 100$$



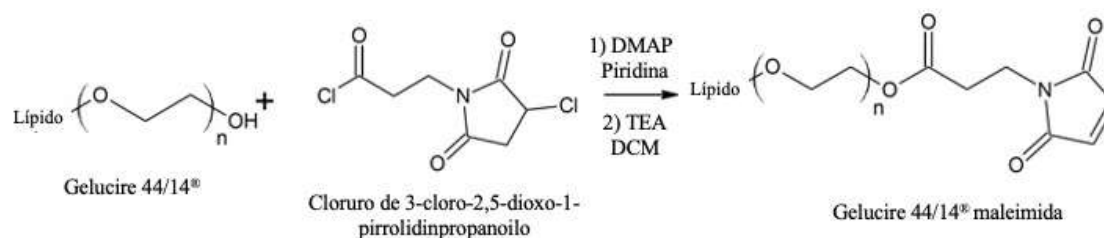
**Figura 6.** Esquema de la síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo.  $\Delta$ : calor;  $H_2O$ : agua;  $SOCl_2$ : cloruro de tionilo.

### 2.3.2 Síntesis de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida

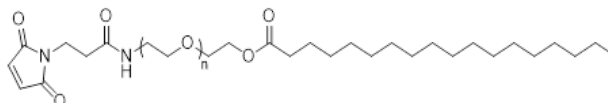
Una vez obtenido el cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo, se procedió a la conjugación con Gelucire 44/14<sup>®</sup> para la obtención del lípido con el grupo funcional maleimida, tal y como lo muestra la Figura 7. Para ello, la estrategia de conjugación fue en base a lo reportado por Ji y cols. (106), con modificaciones. En ese sentido, se dispuso 500 mg de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo, 1 g de Gelucire 44/14<sup>®</sup>, 5 mg de DMAP, 100  $\mu$ L de piridina y 10 mL de DCM en un balón de vidrio de fondo redondo para mezclarlos bajo agitación por al menos 12 h a temperatura ambiente. Luego, se removió el solvente con evaporador rotatorio a presión reducida, hasta la obtención de un líquido oleoso y se añadió 10 mL de MeOH, manteniendo la mezcla bajo agitación por una hora a temperatura ambiente. Posterior a ese tiempo, se almacenó la mezcla a  $-80^{\circ}C$  por al menos una hora, para ser centrifugada en frío a 7.000 rpm por 10 minutos; se conservó el sólido residual y se resuspendió en 10 mL de DCM y se añadió 2 mL de TEA, manteniendo en agitación por 4 h a temperatura ambiente.



Transcurrido el tiempo, el solvente se eliminó con evaporador rotatorio a presión reducida, en donde el líquido residual se resuspendió en 5 mL de THF, y se adicionó éter etílico frío para que precipitara el sólido. Esta mezcla fue centrifugada, descartándose el sobrenadante y conservando el sólido residual, que se dejó secar bajo campana y se pesó para la obtención del porcentaje de recuperación, a través de la Ecuación 2. Como alternativa a la generación de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida, se propuso la síntesis de un lípido personalizado (SP-Mal, MW = 1.965,66 g/mol), constituido por un fragmento de ácido esteárico, otro intermedio de PEG-1500 y un grupo funcional maleimida terminal (Figura 8), adquirido comercialmente de JenKem Technology USA Inc. (Plano, TX, Estados Unidos).



**Figura 7.** Esquema de obtención de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida. DCM: diclorometano; DMAP: 4-dimetilaminopiridina TEA: trietilamina.



**Figura 8.** Estructura del lípido personalizado adquirido comercialmente compuesto por ácido esteárico, polietilén glicol y maleimida terminal.

### 2.3.3 Funcionalización del lípido con péptido

La funcionalización de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida o del lípido personalizado adquirido comercialmente con el péptido se efectuó a través de la reacción química maleimida-tiol, en un protocolo adaptado de Wang y cols. (107), Tyagi y Lemke (108), y Gober y cols. (109). Como ensayo preliminar y en vista de la optimización en el uso de los péptidos de interés elaborados, se utilizó un péptido adquirido comercialmente (GL Biochem Shanghai Ltd., China), cuya secuencia es idéntica a PEP, en donde los isómeros *L* del fragmento activable por MMP-9 (GPQGIAGQ) fueron reemplazados por sus respectivos isómeros *D* (*D*-PEP, MW = 3.350,87 Da). Para ello, se pesó el péptido en un tubo de microcentrífuga y se suspendió en 1 mL de una solución acuosa de DTT 10 mM

y se agitó en un mezclador de vórtice por 1 minuto. Luego, se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm por 90 segundos, descartando el sobrenadante y conservando el sólido para ser nuevamente resuspendido en 1 mL de DTT 10 mM, totalizando 3 veces el procedimiento de suspensión y centrifugado. Este sólido residual fue lavado con 1 mL de agua ultrapura, agitado en mezclador de vórtice y centrifugado a las mismas condiciones anteriores, por triplicado. A este sólido residual, se incorporó 500  $\mu$ L del lípido-maleimida, previamente suspendido en 1 mL de agua ultrapura, y se mantuvo en agitación en mezclador de vórtice por 1 h, protegido de la luz. Transcurrido dicho tiempo, se adicionó los 500  $\mu$ L restantes del lípido suspendido y se mantuvo en agitación por 1 h más. Esta mezcla fue ultrafiltrada utilizando tubos Amicon® Ultra-15 de 5 kDa MWCO a 5.000 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron recolectados, lavando el filtro con porciones de agua ultrapura hasta recolectar todo el sólido posible y luego liofilizados hasta la obtención de un sólido seco, utilizando el liofilizador marca Labconco modelo FreeZone1 (Kansas City, MO, Estados Unidos) acoplado a una bomba de alto vacío de 50 mTorr de presión. Este sólido seco fue pesado para determinar el porcentaje de recuperación, de acuerdo con la Ecuación 2. Además, el porcentaje de funcionalización se obtuvo en forma indirecta, de acuerdo con la Ecuación 3. Para ello, los ultrafiltrados fueron recolectados y sus volúmenes, medidos en diluciones apropiadas con agua ultrapura a través de espectroscopía UV/visible, utilizando el espectrofotómetro marca Agilent modelo 8453, con detección a una longitud de onda de 220 nm. Los datos de absorbancia obtenidos fueron interpolados en la curva de calibrado de los respectivos péptidos, elaborados en un rango de concentraciones entre 5 a 50  $\mu$ g/mL.

**Ecuación 3.** Cálculo del porcentaje de funcionalización de péptido en el lípido. *mp*: masa del péptido.

$$\text{Funcionalización (\%)} = \frac{mp_{\text{inicial}} - mp_{\text{ultrafiltrado}}}{mp_{\text{inicial}}} \times 100$$

Una vez determinada la factibilidad del proceso, en términos de recuperación de sólido y porcentaje de funcionalización, se realizó el proceso con los péptidos de interés, PEP, CAR y CLV, de acuerdo con el mismo protocolo anterior.

### 2.3.4 Identificación de los productos sintetizados

La confirmación de la identidad química de los productos cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo, Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida y lípido funcionalizado con péptido y su comparación con los respectivos precursores se realizó a través de técnicas espectroscópicas y calorimétricas, incluyendo la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier mediante reflexión total atenuada (ATR-FTIR, del inglés *attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*), espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (<sup>1</sup>H-NMR, del inglés *nuclear magnetic spectroscopy*), cristalografía de rayos X (XRC, del inglés *X-ray crystallography*) y calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *differential scanning calorimetry*).

Para la ATR-FTIR, se dispuso de una cantidad suficiente de cada sólido para cubrir la superficie de análisis, acoplando el dispositivo ATR marca PIKE Technologies modelo MIRacle<sup>™</sup> (Fichburg, WI, Estados Unidos), en el equipo marca Interspectrum modelo 200-X (Tartu, Estonia), leyendo cada muestra en modo de transmitancia desde 400 a 4.000 cm<sup>-1</sup>. Por otra parte, las muestras que fueron analizadas por <sup>1</sup>H-NMR, debieron ser disueltas en DMSO-d<sup>6</sup> o CDCl<sub>3</sub> a una concentración de 10 mg/mL y dispuestas en tubos capilares especiales para el análisis a través del espectrómetro marca Bruker modelo Avance Neo Multinuclear 400 (Billerica, MA, Estados Unidos). Además, para determinar el punto de fusión de los productos obtenidos, se masaron entre 5 a 10 mg de cada sólido en forma independiente y dispuestas en cápsulas de aluminio que fueron sellados herméticamente; cada muestra fue analizada desde 20 °C hasta los 200 °C, con una rampa de 5 °C/min, a través del calorímetro marca Setaram modelo DSC131 evo (Caluire-et-Cuire, Francia).

### 2.3.5 Síntesis de micelas de núcleo lipídico

Las LCMs funcionalizadas con el péptido se elaboraron mediante la técnica de emulsificación en caliente de baja energía, descrita por Fritz y cols. (29), con pequeñas modificaciones. Para ello, se dispuso en un balón de vidrio de fondo redondo 1,196 g de Gelucire 44/14<sup>®</sup>, 4 mg de lípido funcionalizado con el péptido de interés, 187,7 mg de Tween 20<sup>®</sup> y 52,3 mg Span 80<sup>®</sup>, adicionando 500 µg de Rho como fármaco modelo. Se

determinó utilizar dicha cantidad de lípido funcionalizado, para poder optimizar el recurso disponible. Toda esta mezcla fue calentada en baño de agua a 60 °C por 10 minutos, bajo agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se adicionó 2,56 mL de agua ultrapura a 60 °C y se agitó por dos minutos. Posterior a ello, se retiró la emulsión del baño maría para adicionar 20 mL de agua ultrapura a 4 °C y se continuó agitando por 5 minutos. Esta suspensión sirvió como punto de partida para los ensayos de permeación, escisión biosensible y unión a cardiomiocitos posteriores. Como LCMs controles se elaboraron nanopartículas sin péptido funcionalizado, reemplazando la masa de lípido funcionalizado con péptido por el equivalente de Gelucire 44/14<sup>®</sup>, y LCMs no funcionalizadas ni cargadas con Rho.

### **2.3.6 Caracterización fisicoquímica de micelas de núcleo lipídico**

Dentro de las propiedades fisicoquímicas de LCMs medidas, se encuentran el diámetro hidrodinámico (HD, del inglés *hydrodynamic diameter*), índice de polidispersión (PdI, del inglés *polydispersity index*), potencial  $\zeta$  (ZP, del inglés *zeta potential*) y tamaño de partícula (PS, del inglés *particle size*). Para la determinación de HD, PdI y ZP se utilizó un mismo equipo, el zetasizer marca Malvern Panalytical modelo Nano ZS (Malvern, Reino Unido). La medición de HD y PdI se realizó a través la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *dynamic light scattering*), donde se midió cada suspensión de LCMs en una dilución de 1:10 en agua ultrapura, disponiéndolas en cubetas plásticas para su medición; mientras que la obtención del ZP se realizó a través de la técnica de velocimetría del láser Doppler (LDV, del inglés *laser Doppler velocimetry*), utilizando la misma dilución de las LCMs y dispuesta en celdas capilares electroforéticas plásticas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 25 °C.

Por otra parte, el PS y la morfología de las LCMs en seco fueron determinados a través de la microscopía electrónica de barrido por transmisión (STEM, del inglés *scanning transmission electron microscopy*). Para ello, se diluyó cada suspensión de LCMs en agua ultrapura a una razón de 1:10; de estas diluciones previamente homogeneizadas, se tomó una gota y se dispuso una grilla de cobre sobre ella dejándola en contacto por 2 minutos. Luego, cada grilla fue lavada con una gota de agua ultrapura

por 1 minuto repitiéndose 2 veces. Después, la grilla fue dispuesta sobre una solución de ácido fosfotúngstico al 1% por otros dos minutos. Finalmente, cada grilla fue secada a temperatura ambiente y vista en microscopio electrónico marca Inspect modelo F50 (Hillsboro, OR, Estados Unidos).

### 2.3.7 Determinación de eficiencia de asociación y carga de fármaco

La eficiencia de asociación (EE, del inglés *encapsulation efficiency*) y la carga de fármaco (DL, del inglés *drug loading*) de Rho en las LCMs fueron determinadas a través de la cuantificación de Rho no asociada ni retenida en las LCMs, en una medición de tipo indirecta, a través de las Ecuaciones 4 y 5, respectivamente. Para ello, se tomó 10 mL de las suspensiones de LCMs cargadas con Rho y se las dispuso en tubos Amicon® para ser centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos; se recolectó y se midió el volumen de los ultrafiltrados, que fueron cuantificados por triplicado a través de espectrofotometría de fluorescencia a través del espectrofotómetro marca Agilent modelo Cary Eclipse, en donde los datos de intensidad de fluorescencia se interpolaron en una curva de calibrado de Rho en un rango de concentraciones entre 0,01 a 2,50 µg/mL.

**Ecuación 4.** Cálculo de eficiencia de asociación (EE).  $mr$ : masa de rodamina 123.

$$EE(\%) = \frac{mr_{inicial} - mr_{ultrafiltrado}}{mr_{inicial}} \times 100$$

**Ecuación 5.** Cálculo de carga de fármaco (DL).  $mr$ : masa de rodamina 123;  $mt$ : masa total.

$$DL(\%) = \frac{mr_{inicial} - mr_{ultrafiltrado}}{mt_{sólidos}} \times 100$$

### 2.3.8 Estabilidad de micelas de núcleo lipídico

El perfil de estabilidad cinética de las LCMs en suspensión a 48 h fue evaluado en tres condiciones distintas: 4 °C, 25 °C y 37 °C, en base a las características fisicoquímicas de HD, PdI y ZP. Las LCMs evaluadas fueron las LCMs no funcionalizadas vacías y cargadas con Rho, como las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP y CLV cargadas con Rho, obtenidas cada una de tres lotes de síntesis distintos. Para ello, de un mismo lote de elaboración, se almacenó las LCMs en suspensión a las tres temperaturas señaladas y se tomó 100 µL de cada una y se llevó a 1 mL con agua ultrapura, teniendo como tiempos

de muestreo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 y 48 h. Estas muestras diluidas fueron analizadas por DLS y LDV, bajo las mismas condiciones descritas en la sección 2.3.6.

Por otra parte, también se determinó el perfil de estabilidad de las LCMs en un rango de temperatura. Para ello, las mismas LCMs del perfil de estabilidad a 48 h fueron utilizadas y la medición se llevó a cabo entre 20 a 50 °C, con incremento en 5 °C por cada medición a una velocidad de 1 °C/min, utilizando el mismo equipo zetasizer Nano ZS. Los parámetros medidos fueron HD, PdI y ZP y cada medición se efectuó por triplicado.

### **2.3.9 Perfil de liberación *in vitro* de rodamina 123 contenida en micelas de núcleo lipídico**

La liberación de Rho a partir de las LCMs fue determinada a través de un ensayo *in vitro* de diálisis a 37 °C y por triplicado. Para determinar la viabilidad de este sistema *in vitro*, en forma preliminar se determinó el perfil de difusión de Rho libre y en solución a través de la membrana de diálisis. Para ello, se dispuso de 4 mL de una solución de Rho 10 µg/mL en agua ultrapura en una bolsa de diálisis y suspendido en 30 mL de PBS pH 7,4, bajo agitación moderada. Una alícuota de 200 µL fue extraída a tiempos 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180 y 1440 min (24 h), y se adicionó el mismo volumen de medio fresco. La cuantificación de Rho se realizó a través de espectrofotometría de fluorescencia, tal y como lo descrito en la sección 2.3.7.

Una vez validada la capacidad de difusión de Rho a través de la membrana de diálisis, se determinó el perfil de liberación de este compuesto presentes en las LCMs sin funcionalizar y funcionalizadas con el péptido CLV. Para ello, se tomó 4 mL del sobrenadante de cada suspensión de LCMs, tras el proceso de ultrafiltración, en una bolsa de diálisis y suspendido en 30 mL de PBS pH 7,4, bajo agitación moderada. Se extrajo una alícuota de 1 mL a tiempos 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 24; 48 y 72 h, y se adicionó el mismo volumen de medio fresco. La cuantificación se realizó a través de espectrofotometría de fluorescencia, tal y como lo descrito en la sección 2.3.7. Para determinar la cinética de liberación y, por tanto, dilucidar el mecanismo, distintos modelos cinéticos fueron evaluados, incluyendo cinéticas de orden 0 y 1, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin, mediante el complemento DDSolver, desarrollado para

Microsoft Excel (110). Además, ambos perfiles de liberación fueron comparados a través del factor de similitud  $f_2$ , tal y como lo indica la Ecuación 6.

**Ecuación 6.** Cálculo del factor de similitud ( $f_2$ ).  $n$ : número total de muestras;  $R_t$ : porcentaje de liberación de un perfil a tiempo  $t$ ; y  $T_t$ : porcentaje de liberación del otro perfil a tiempo  $t$ .

$$f_2 = 50 \log \left( \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right)$$

#### 2.4 Permeación bucal *ex vivo* de micelas de núcleo lipídico

La permeación de las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP fue evaluada a través de un ensayo *ex vivo* utilizando mucosa bucal de origen porcino en un equipo de celdas de difusión vertical automatizada marca Teledyne Hanson Research modelo Phoenix (Chatsworth, CA, Estados Unidos). Para ello, las mejillas fueron obtenidas de cerdos sanos en un matadero en las afueras de Santiago, Chile y almacenadas en solución crioprotectora de sacarosa al 30% a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. Para el ensayo de permeación, las mejillas fueron descongeladas lentamente, separando el epitelio bucal del tejido muscular y conectivo, utilizando tijeras quirúrgicas y cuchillas de acero y carbono. Estos epitelios fueron cortados en un tamaño de  $2\text{ cm}^2$  aproximadamente y lavados tres veces en buffer fosfato pH 6,8 a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 minutos. Posterior a ello, se montó el epitelio bucal en cada celda de difusión, teniendo la precaución de que la superficie interna bucal de la mucosa esté en contacto con la cámara donante de la celda, mientras que en la cámara aceptora se dispuso de 10 mL de buffer fosfato pH 6,8. Una vez que el sistema fue montado en el equipo a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  y agitación a 400 rpm, se dispuso de 1 mL de suspensión de LCMs en la cámara donante y se extrajo 400  $\mu\text{L}$  de la cámara aceptora a tiempos 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 y 60 minutos, siendo reemplazado por el mismo volumen de buffer fosfato pH 6,8. Las muestras fueron analizadas y cuantificadas en términos de fluorescencia de Rho por espectrofotometría de fluorescencia, tal y como lo descrito en la sección 2.3.7. Cada ensayo se hizo por quintuplicado. Además, como controles se analizaron también 1 mL de solución de Rho libre y de suspensión de LCMs no funcionalizadas con péptido y asociadas con Rho. Para determinar el movimiento de las micelas a través de la mucosa bucal porcina, se calculó el flujo de difusión de Rho en estado estacionario ( $J_{ss}$ ) a través de la pendiente de la concentración acumulada en la cámara aceptora en el tiempo y la

concentración inicial de Rho (Ecuación 7) (111) y con ello, el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ , Ecuación 8) (112).

**Ecuación 7.** Cálculo del flujo de difusión en estado estacionario ( $J_{ss}$ ).  $C_0$ : concentración inicial del compuesto en la cámara donante de la celda de difusión;  $K$ : pendiente de la concentración acumulada en la cámara aceptora.

$$J_{ss} = K \times C_0$$

**Ecuación 8.** Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ).  $A$ : área transversal del epitelio bucal disponible para la permeación;  $C_0$ : concentración inicial del compuesto en la cámara donante de la celda de difusión;  $J_{ss}$ : flujo de difusión en estado estacionario;  $V_r$ : volumen de la cámara aceptora de la celda de difusión.

$$P_{app} = \frac{J_{ss} \times V_r}{A \times C_0}$$

## 2.5 Escisión *in vitro* de la secuencia sensible a metaloproteinasa de la matriz-9

La escisión de la secuencia GPQGIAGQ sensible a la actividad endopeptidasa de la isoforma MMP-9 y presente en el segmento intermedio de PEP fue evaluada a través de un ensayo *in vitro*. Para ello, se diseñó un protocolo en base a lo reportado por Braun y cols. (97), con pequeñas modificaciones. Primeramente, se determinó la concentración de enzima MMP-9 a utilizar. En ese sentido, se disolvió el péptido PEP en buffer MMP-9 (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) hasta obtener una solución de concentración 1 mM. De esta solución, se trasvasijó 45  $\mu$ L a un tubo de microcentrífuga y se adicionó 5  $\mu$ L de una solución MMP-9 en el mismo buffer usado para disolver el péptido; para ello, se utilizó una solución de enzima a concentraciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7  $\mu$ g/mL, en forma independiente, para obtener una mezcla con concentraciones finales de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 ng/mL de enzima. Las concentraciones finales fueron elegidas en base a las concentraciones plasmáticas de esta enzima en pacientes con enfermedades cardiovasculares reportadas en la sección 1.6.1. Cada una de estas mezclas fueron incubadas a 37 °C por 24 h, tras lo cual fueron centrifugadas a 12.000 rpm por 30 segundos y se adicionó 2,78  $\mu$ L de solución de EDTA 50 mM, para ser incubadas a 95 °C por 15 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto, recolectando el sobrenadante y trasvasados a viales con inserto de vidrio borosilicado, para ser analizados por RP-HPLC, bajo las mismas condiciones descritas para la determinación de la purificación de los péptidos en



la sección 2.2.3. Cada punto fue realizado en triplicado. Los resultados fueron medidos en base a la disminución del área bajo la curva de las distintas soluciones en comparación con una mezcla control, que no fue incubada con MMP-9, reemplazando dicho volumen por buffer MMP-9. A partir de estos resultados y estableciendo como objetivo óptimo una escisión del 60%, se determinó que la concentración final de MMP-9 para determinar la cinética de escisión fue de 450 ng/mL.

Para determinar la cinética de escisión del péptido PEP libre, se siguió el mismo protocolo anterior, en donde se trasvasó 45  $\mu$ L de una solución a 1 mM en buffer MMP-9 a un tubo de microcentrífuga y se adicionó 5  $\mu$ L de una solución de MMP-9 a 4,5  $\mu$ g/mL hasta alcanzar una concentración final de 450 ng/mL. Cada mezcla fue incubada a 37 °C a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 y 24 h, tras lo cual, se adicionó 2,78  $\mu$ L de solución EDTA 50 mM, para incubarse a 95 °C por 15 minutos. Posteriormente, cada muestra fue centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto y el sobrenadante, recolectado en viales con insertos de vidrio para ser analizados por RP-HPLC. Todos los puntos fueron evaluados por triplicado. En el caso del control, se reemplazó el volumen de solución de MMP-9 por buffer, siendo este resultado útil para comparar relativamente los resultados obtenidos para cada tiempo. Además, la cinética de digestión de PEP libre fue comparada con la cinética de digestión de la misma secuencia peptídica en donde la secuencia activable por MMP-9 fueron reemplazados por los isómeros *D* de los mismos aminoácidos (*D*-PEP) como control. Este ensayo se realizó para determinar si la enzima MMP-9 podría presentar estereoselectividad por sustrato en su actividad proteasa. Por otra parte, la cinética de escisión de PEP funcionalizadas en las LCMs también fue evaluada siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, donde el PEP libre fue reemplazado por el mismo volumen de suspensión de LCMs descrita en la sección 2.3.5.

## **2.6 Ensayo *in vitro* de unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con péptido**

La unión de los péptidos de interés a cardiomiocitos fue determinada a través de la técnica de inmunofluorescencia. Para ello, se utilizaron cardiomiocitos de ventrículos de ratas Sprague-Dawley neonatas de 1 a 3 días de vida. El protocolo para el trabajo con

animales fue aprobado por el Comité de Bioética Local de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (CBE2013-04) y manejado bajo los lineamientos exigidos y determinados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, del inglés *National Institutes of Health*) de Estados Unidos (113). Tal y como lo descrito por Foncea y cols. (114), las ratas neonatas fueron decapitadas rápidamente y sus corazones fueron inmediatamente separados del resto del animal. Los ventrículos fueron disociados en una solución de colagenasa 0,2 mg/mL y pancreatina 1,2 mg/mL, en donde los cardiomiocitos fueron recolectados, sembrados y cultivados por 24 h en placas plásticas cubiertas con gelatina con medio DMEM:M199 en una proporción 4:1 con 10% de FBS, 5% de FCS, penicilina (100 U/mL), estreptomycinina (100 µg/mL) y 5-BrdU (100 µM) mantenidos a 37 °C. Después de ello, los cardiomiocitos fueron pasados y sembrados a una placa plástica estéril de 12 pocillos, cada uno con su cubreobjeto de vidrio de 18 mm revestido con gelatina, con medio DMEM e incubados a 37 °C hasta alcanzar una confluencia de 150.000 células por pocillo determinado con un hemocitómetro.

Un primer paso fue determinar la unión a cardiomiocitos de los péptidos libres en solución, para lo cual se utilizaron como muestras los péptidos *CF-CAR*, *CF-SCR* y *CF-CLV*, todas asociadas con el marcador fluorescente CF. Cada uno de estos péptidos fueron disueltos en DMSO hasta obtener una concentración final de 1 mM. Los cardiomiocitos, previamente desprovistos de medio, fueron estimulados con 10 µL de cada péptido, el volumen fue completado a 1 mL con medio DMEM para alcanzar una concentración final de péptido de 10 µM, e incubados a 37 °C por 1 hora; en el caso de control, se reemplazó el volumen de muestra por el mismo volumen de DMSO. Transcurrido dicho tiempo, cada pocillo fue lavado 3 veces con PBS, para luego incorporar 400 µL de PFA al 4% diluido en PBS e incubar a 85 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Después, cada pocillo fue lavado con PBS por 3 minutos, totalizando 4 veces. Los cubreobjetos fueron cuidadosamente removidos de cada pocillo y dispuestos sobre 17 µL de una solución de Hoechst 33342 en medio de montaje DAKO (1:500) en un portaobjeto, para ser almacenados por al menos 12 h a 4 °C. Las muestras fueron observadas bajo microscopía de fluorescencia en un equipo marca Bio-Rad modelo ZOE (Hercules, CA,

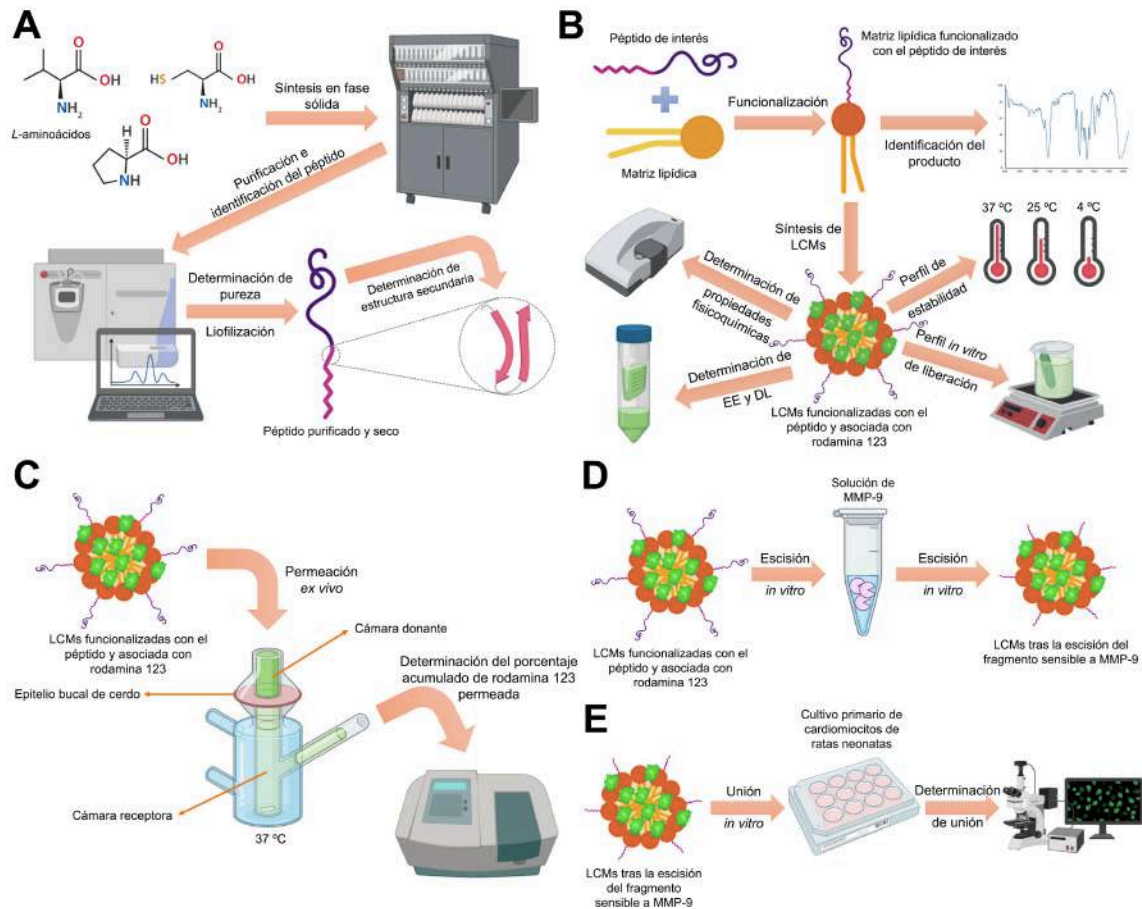
Estados Unidos). Todas las muestras fueron realizadas en cuadruplicado. Para determinar si la unión de los péptidos dependía de la concentración, se decidió evaluar la unión de *CF-SCR* y *CF-CLV* a 25 y 50  $\mu\text{M}$ . Para ello, se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente, modificando el volumen de solución del péptido 1 mM a 25 y 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

Por otra parte, se evaluó la unión a cardiomiocitos de las LCMs funcionalizadas con péptidos. En ese sentido, como muestras se utilizaron específicamente los sobrenadantes de suspensiones de LCMs funcionalizadas con los péptidos CAR y CLV tras la ultrafiltración, y como control positivo, LCMs sin péptido funcionalizado, todas asociadas con el marcador fluorescente Rho, que fueron elaboradas de acuerdo con lo descrito en las secciones 2.3.5 y 2.3.7. En un ensayo previo, se determinó que la viabilidad celular en cardiomiocitos estimulados con 40  $\mu\text{L}$  de suspensión de LCMs generaba una alta mortalidad (115). En base a este antecedente, los cardiomiocitos fueron estimulados con 20  $\mu\text{L}$  de suspensión de LCMs, siendo reemplazado por el mismo volumen de agua ultrapura para el control negativo, completando con medio DMEM hasta alcanzar 1 mL en total. Las células fueron incubadas a 37 °C por una hora. Posterior a ello, se lavó cada pocillo con PBS por triplicado y fueron fijados con una solución de PFA al 4% en PBS e incubados a 85 rpm por 15 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Luego, cada pocillo fue lavado con PBS por 3 minutos totalizando 4 veces, para luego ser incubados con 400  $\mu\text{L}$  de solución permeabilizante de Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 5 minutos y a temperatura ambiente. Tras esto, las células fueron lavadas 4 veces con PBS por 3 minutos cada lavado e incubadas con 500  $\mu\text{L}$  de solución bloqueante compuesta por BSA al 1% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo, se retiró la solución de BSA, se trasvasó cada cubreobjeto a una placa lisa con 23  $\mu\text{L}$  del anticuerpo primario MA5-12960 de origen murino para marcaje de troponina T diluida en BSA al 1% y se incubó en cámara húmeda por 12 horas a 4 °C. Posteriormente, se traspasó cada cubreobjeto a su pocillo para ser lavados con PBS por 5 minutos, totalizando 3 lavados, y se incubó con 23  $\mu\text{L}$  de anticuerpo secundario AF568 a una dilución de 1:200 en BSA al 1% por 2 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz. Luego, se lavó

con PBS por 5 minutos, totalizando 3 lavados y se incubó cada cubreobjeto en 20  $\mu\text{L}$  de solución Hoechst 33348 1:500 en BSA al 1%. El exceso fue retirado con 3 lavados de 5 minutos con PBS para que los cubreobjetos sean finalmente montados en un portaobjeto con 17  $\mu\text{L}$  de medio de montaje DAKO y secados por al menos 12 horas a 4 °C. Todas las muestras fueron realizadas por cuadruplicado y observadas bajo microscopía de fluorescencia. Todas las micrografías obtenidas fueron procesadas a través del programa disponible en línea y gratuita *ImageJ* y cuantificadas a través de la magnitud de intensidad de fluorescencia, para determinar cuantitativamente la unión a cardiomiocitos.

## **2.7 Análisis estadístico**

Todos los datos numéricos obtenidos fueron expresados en términos de promedio ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (DE). Además, para la comparación de resultados fueron utilizados los análisis estadísticos paramétricos de prueba *t* de Student para dos grupos, o análisis de varianza (ANOVA, del inglés *analysis of variance*) de una vía con pruebas *post-hoc* de Tukey para comparación de tres o más grupos. Estos análisis estadísticos fueron realizados a través del programa Minitab v17, considerando un nivel de significancia estadística del 5% ( $p < 0,05$ ). La Figura 9 muestra un resumen gráfico de las metodologías para dar cumplimiento con cada uno de los objetivos específicos trazados.



**Figura 9.** Esquema resumen de la metodología propuesta para la investigación, de acuerdo con los objetivos específicos trazados: (A) síntesis, purificación y caracterización de los péptidos de interés; (B) elaboración y caracterización de micelas de núcleo lipídico (LCMs) funcionalizadas con los péptidos de interés y asociadas con rodamina 123; (C) permeación *ex vivo* de LCMs funcionalizadas; (D) escisión *in vitro* de la secuencia sensible a MMP-9 del péptido sobre LCMs funcionalizadas; y (E) determinación *in vitro* de unión a cardiomiocitos de las LCMs funcionalizadas con el péptido de interés. DL: carga de fármaco; EE: eficiencia de asociación.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Síntesis, purificación, identificación y caracterización de la estructura secundaria de péptidos

##### 3.1.1 Síntesis, purificación e identificación de péptidos

La síntesis, purificación, identificación y determinación de pureza de los péptidos de interés fueron realizados durante una estancia de investigación en el Centro de Formulación y Entrega de Medicamentos del Instituto de Farmacia y Química de los Alimentos de la Universidad Julius Maximilians de Wurzburg, Alemania. Todos los péptidos propuestos en la Tabla 1 (PEP, CAR, SCR y CLV) fueron elaborados correctamente a través de la técnica de síntesis en fase sólida, confirmándose su identidad de acuerdo con los distintos fragmentos  $m/z$  obtenidos por LCMS, y purificados en forma eficiente a través de FPLC, obteniéndose una pureza mayor al 95%, en todos los casos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Identidad de los péptidos obtenidos a través de distintos fragmentos  $m/z$  por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas y porcentaje de pureza de las fracciones recolectadas.

Péptido	Fragmentos $m/z$ (Da)	Abundancia relativa	Pureza (%)
PEP	M+3H <sup>+</sup> (1.117,85)	1,00	97,2
	M+4H <sup>+</sup> (838,80)	0,22	
	M+2H <sup>+</sup> (1.678,00)	0,03	
CAR	M+3H <sup>+</sup> (749,50)	1,00	97,2
	M+2H <sup>+</sup> (1.123,40)	0,43	
SCR	M+3H <sup>+</sup> (749,50)	1,00	96,8
	M+2H <sup>+</sup> (1.123,90)	0,55	
CLV	M+3H <sup>+</sup> (862,65)	1,00	96,7
	M+2H <sup>+</sup> (1.293,50)	0,37	
	M+4H <sup>+</sup> (647,30)	0,14	

Para todos los péptidos anteriormente diseñados se estimaron el pI, índice de alifaticidad y valor GRAVY (Tabla 5). Estos parámetros fueron obtenidos a través del análisis de sus respectivas secuencias de aminoácidos, utilizando de la herramienta ProtParam de Expasy desarrollada por SIB (101). Todos los péptidos mostraron un pI teórico idéntico, mientras que los valores de grado de hidrofobicidad y el índice GRAVY presentaron variaciones entre ellos.

**Tabla 5.** Predicciones de características fisicoquímicas de los péptidos sintetizados, en términos de punto isoeléctrico (pI), índice de alifaticidad y valor promedio de hidropatía (GRAVY), obtenidas a través de la herramienta ProtParam de ExPASy (101).

Parámetro	PEP	CAR	SCR	CLV
pI	8,25	8,25	8,25	8,25
Índice de alifaticidad	106,06	88,10	88,10	74,00
GRAVY	0,59	0,30	0,30	0,01

Además, se pudo elaborar e identificar correctamente los tres péptidos conjugados con la molécula fluorescente CF, tal y como se muestra en la Tabla 6. Por otra parte, en términos de pureza, solo con dos de estos péptidos (*CF-CAR* y *CF-SCR*) se logró obtener un porcentaje mayor al 95%, mientras que el péptido *CF-CLV* solo alcanzó un 89,1% tras dos rondas de purificación. Cabe destacar que todos los péptidos puros fueron liofilizados y los sólidos secos fueron recolectados, pesados y almacenados en un recipiente hermético a -20°C hasta su posterior uso. Las masas registradas de cada péptido se pueden observar en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Identidad de los péptidos conjugados con carboxifluoresceína (*CF*) obtenidos a través de distintos fragmentos *m/z* y porcentaje de pureza de las fracciones recolectadas.

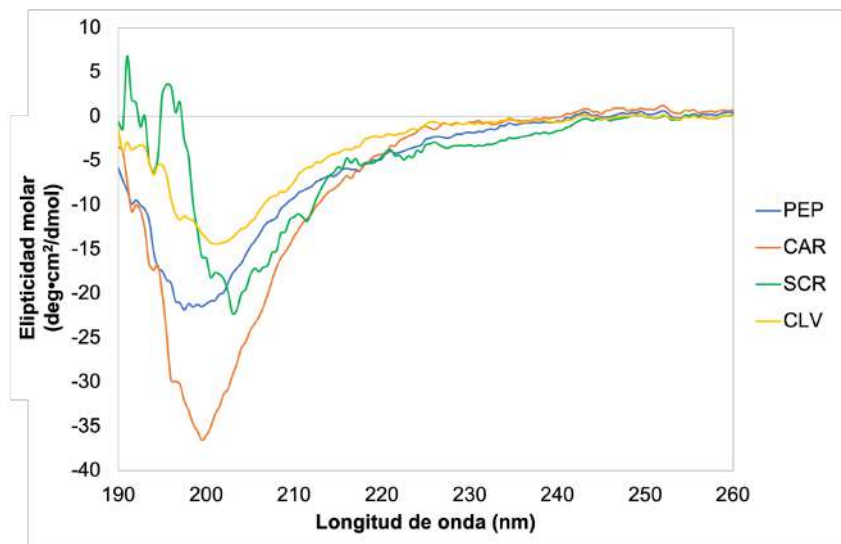
Péptido	Fragmentos <i>m/z</i> (Da)	Abundancia relativa	Pureza (%)
<i>CF-CAR</i>	M+2H <sup>+</sup> (1.303,10)	1,00	95,4
	M+3H <sup>+</sup> (869,00)	0,03	
	M+4H <sup>+</sup> (658,50)	0,03	
<i>CF-SCR</i>	M+3H <sup>+</sup> (868,95)	1,00	99,4
	M+2H <sup>+</sup> (1.302,80)	0,15	
<i>CF-CLV</i>	M+3H <sup>+</sup> (981,95)	1,00	89,1
	M+2H <sup>+</sup> (1.472,85)	0,30	
	M+4H <sup>+</sup> (736,85)	0,12	

**Tabla 7.** Masa de los péptidos puros y liofilizados. *CF*: carboxifluoresceína.

Péptido	Masa liofilizada (mg)
PEP	51
CAR	38
SCR	40
CLV	80
<i>CF-CAR</i>	9
<i>CF-SCR</i>	8
<i>CF-CLV</i>	5

### 3.1.2 Caracterización de estructura secundaria de péptidos

Tras la obtención de los péptidos puros, se procedió a determinar su estructura secundaria mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Como muestras, se utilizaron sólo los péptidos PEP, CAR, SCR y CLV sin conjugación con la molécula fluorescente CF. De acuerdo con los espectros obtenidos (Figura 10), los péptidos PEP, CAR y CLV presentaron valores negativos de elipticidad a 195 nm (entre -5 a -20  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ ) y 220 nm (-6 a -11  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ ); mientras que el péptido SCR mostró valores positivos a 193 nm (2  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ ) y negativos a 208 nm (-15  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ ) y 222 nm (-4  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ ).



**Figura 10.** Espectros de dicroísmo circular de los péptidos sintetizados.

Utilizando los datos de elipticidad obtenidos de cada uno de los espectros de dicroísmo circular, se estimó el porcentaje del tipo de estructura secundaria, utilizando el programa gratuito K2D2 (104). Tal y como se observa en la Tabla 8, todos los péptidos muestran principalmente una estructura secundaria aleatoria, desordenada u organizada al azar (entre 65,28 y 69,84%), en donde los péptidos PEP, CAR y CLV presentaron una región más organizada de tipo lámina  $\beta$  (22,14%) que de hélice  $\alpha$  (8,02%). Por otra parte, el péptido SCR demostró presentar una estructura mayoritariamente de tipo hélice  $\alpha$  (26,36%), por sobre la lámina  $\beta$  (8,36%). Todas estas mediciones se obtuvieron con un error máximo estimado  $\geq 0,32$ . Por otra parte, se determinó la ubicación de la estructura



secundaria en base a las secuencias de aminoácidos y se comparó con los resultados de dicroísmo circular obtenidos experimentalmente, a través de predicciones realizadas por el programa gratuito YASPIN desarrollado por la Universidad Vrije de Ámsterdam, Países Bajos (105), tal y como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 8.** Estimaciones del porcentaje de estructura secundaria organizada de los péptidos, expresados en porcentaje (%), a través del programa K2D2 (104).

Péptido	Predicción (%)			Error máximo
	Aleatoria	Hélice $\alpha$	Lámina $\beta$	
PEP	69,84	8,02	22,14	$\geq 0,32$
CAR	69,84	8,02	22,14	$\geq 0,32$
SCR	65,28	26,36	8,36	$\geq 0,32$
CLV	69,84	8,02	22,14	$\geq 0,32$

**Tabla 9.** Predicciones de estructura secundaria general y conformación particular de residuos de los péptidos obtenidas a través del programa YASPIN (105). Aminoácidos subrayados representan los residuos con una conformación secundaria particular.

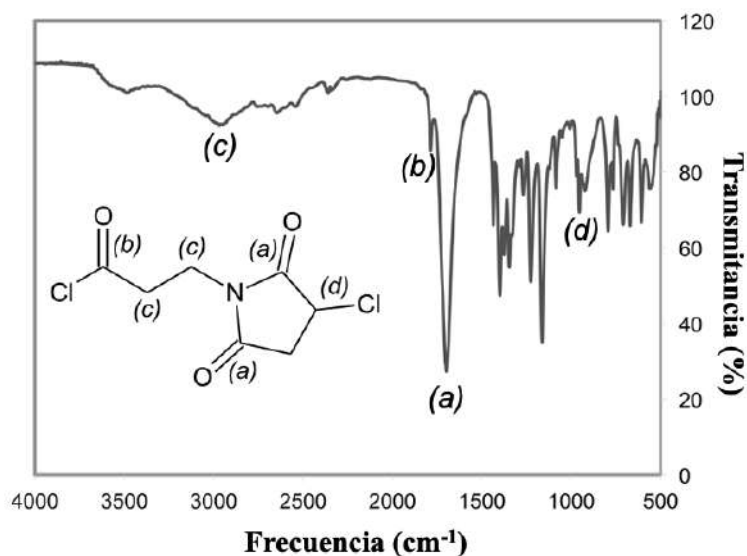
Péptido	Secuencia peptídica (de N- a C-terminal)	Conformación particular de residuos subrayados
PEP	CWLSEAGP <u>V</u> VTVRALRGTGSWGPQGIAGQ <u>VVVV</u>	Lámina $\beta$
CAR	CWLSEAGP <u>V</u> VTVRALRGTGSW	Lámina $\beta$
SCR	CTWGEVP <u>V</u> ARLTRLAGWGSV	Hélice $\alpha$
CLV	CWLSEAGP <u>V</u> VTVRALRGTGSWGPQG	Lámina $\beta$

## 3.2 Síntesis y funcionalización de micelas de núcleo lipídico

### 3.2.1 Síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo

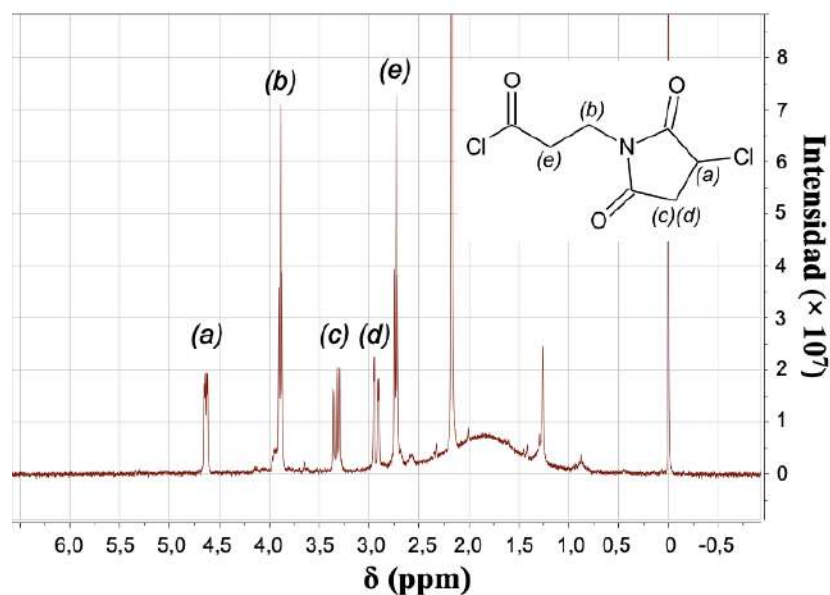
El cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo es estructuralmente un derivado succinimida y fue obtenido a través de la síntesis química teniendo como reactivos la  $\beta$ -alanina, anhídrido maleico y  $\text{SOCl}_2$  (106). Tras el proceso de síntesis, se obtuvo un sólido amarillo, en donde el porcentaje de recuperación de sólidos tras la reacción fue de 67,0%. Para la determinación de la identidad, este sólido fue caracterizado a través de las técnicas ATR-FTIR y  $^1\text{H-NMR}$ . Según el espectro de ATR-FTIR (Figura

11), se pudo observar la presencia de una banda intensa y definida de transmitancia a  $1698\text{ cm}^{-1}$  (señal *(a)*); y una banda de intensidad baja, pero definida a  $1786\text{ cm}^{-1}$  (señal *(b)*). Otras señales identificadas fueron bandas amplias de intensidad baja a  $2986\text{ cm}^{-1}$  (señal *(c)*), y una banda definida de intensidad media en la zona de la huella dactilar del compuesto a  $709\text{ cm}^{-1}$  (señal *(d)*).



**Figura 11.** Espectro infrarrojo del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo.

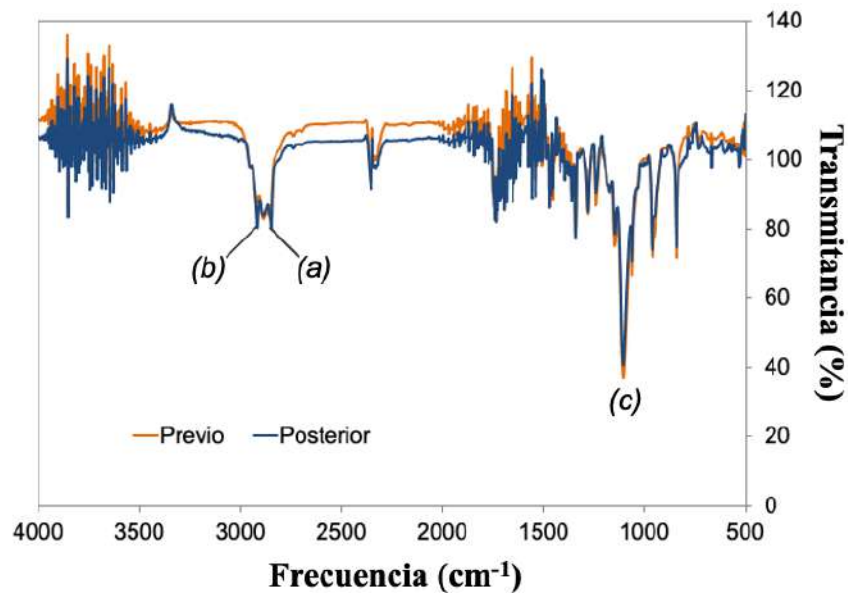
Por otro lado, el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (Figura 12) del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo se obtuvo a partir de la disolución del producto obtenido en  $\text{CDCl}_3$  y se confirmó la presencia de protones característicos, observando 5 señales distintivas. La señal a  $\delta\ 4,64\text{ ppm}$  ( $J = 8,7; 3,6\text{ Hz}$ , señal *(a)*) se representa con un doble doblete e integra para un protón; la señal a  $\delta\ 3,89\text{ ppm}$  ( $J = 7,1\text{ Hz}$ , señal *(b)*) se representa como un triplete, integrando un total de dos protones; las señales a  $\delta\ 3,33\text{ ppm}$  ( $J = 19,0; 8,5\text{ Hz}$ , señal *(c)* o *(d)*) como a  $\delta\ 2,93\text{ ppm}$  ( $J = 18,9; 3,7\text{ Hz}$ , señal *(c)* o *(d)*) se integran en forma de dobles dobletes para 1 protón cada uno; y la señal a  $\delta\ 2,73\text{ ppm}$  ( $J = 7,1\text{ Hz}$ , señal *(e)*) forma un triplete que integra para dos protones.



**Figura 12.** Espectro de resonancia magnética nuclear de protones del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo. Señal base a 0 ppm corresponde a tetrametilsilano.

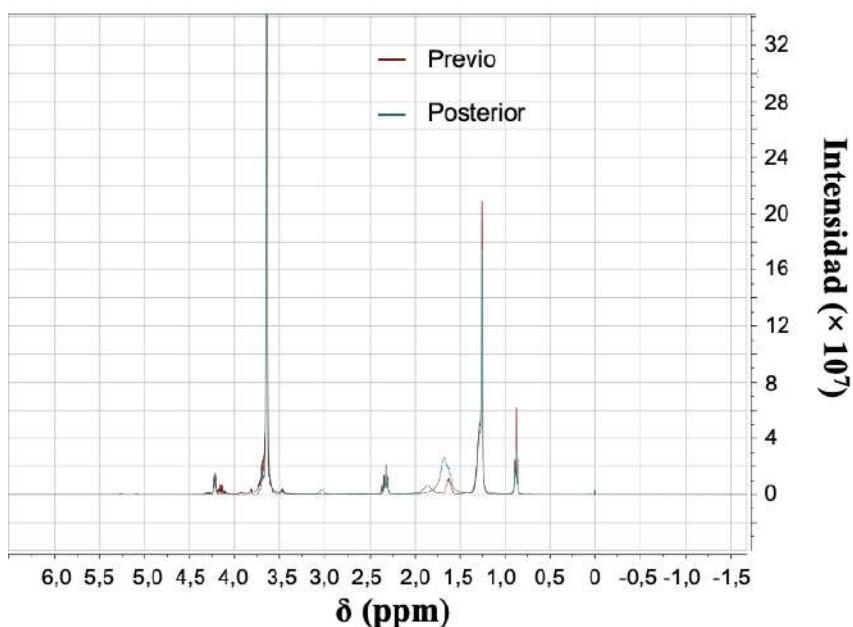
### 3.2.2 Síntesis de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida

Una vez obtenido y confirmado la identidad del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinopropanoilo, se procedió a conjugarlo con el lípido Gelucire 44/14<sup>®</sup> para la obtención final del lípido-maleimida (106). Tras la reacción, se pudo obtener un sólido de color naranja a rojo, con un porcentaje de recuperación entre 5 a 20%, respecto del total de sólidos adicionados inicialmente, de acuerdo con las distintas réplicas realizadas. Para su determinación de identidad, este sólido fue caracterizado a través de las mismas técnicas descritas anteriormente, procediendo a compararlo con los análisis de Gelucire 44/14<sup>®</sup> utilizado como reactivo. Al comparar los espectros de ATR-FTIR de Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo y posterior a la reacción (Figura 13), no se pudo observar diferencias apreciables entre ambos compuestos. En ese sentido, se identificaron bandas de intensidad media a 2857 y 2887  $\text{cm}^{-1}$  (señales (a) y (b), respectivamente) y otra banda de alta intensidad a 1106  $\text{cm}^{-1}$  (señal (c)).



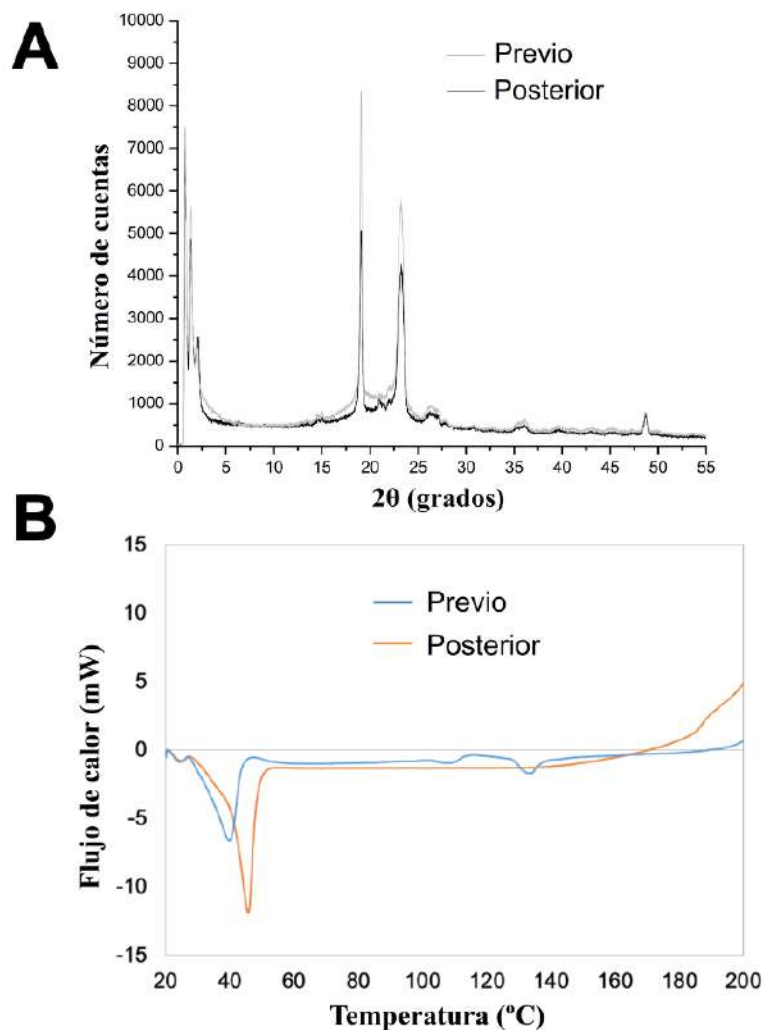
**Figura 13.** Espectros infrarrojos de Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo (naranja) y posterior (azul) a la reacción de conjugación. (a), (b) y (c) corresponden a bandas identificadas comunes a ambos compuestos.

Al igual que en ATR-FTIR, los espectros de H<sup>1</sup>-NMR no mostraron diferencias observables entre Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo y posterior a la reacción (Figura 14) y dada la complejidad de la composición del lípido Gelucire 44/14<sup>®</sup>, no ha sido posible integrar ninguna señal del espectro.



**Figura 14.** Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo (rojo) y posterior (azul) a la reacción de conjugación. Señal base a 0 ppm corresponde a tetrametilsilano.

Otros análisis ejecutados tanto al lípido previo y posterior a la reacción de conjugación fueron XRC y DSC (Figura 15). Los difractogramas de ambos productos reflejaron no mostrar diferencias evidentes en la estructura cristalina y, por tanto, tampoco diferencias estructurales a nivel molecular (Figura 15A). Los calorigramas mostraron diferencias en el punto de fusión de Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo y posterior a la reacción de conjugación, llegando a una temperatura de aproximadamente 40 °C y 45 °C, respectivamente (Figura 15B).



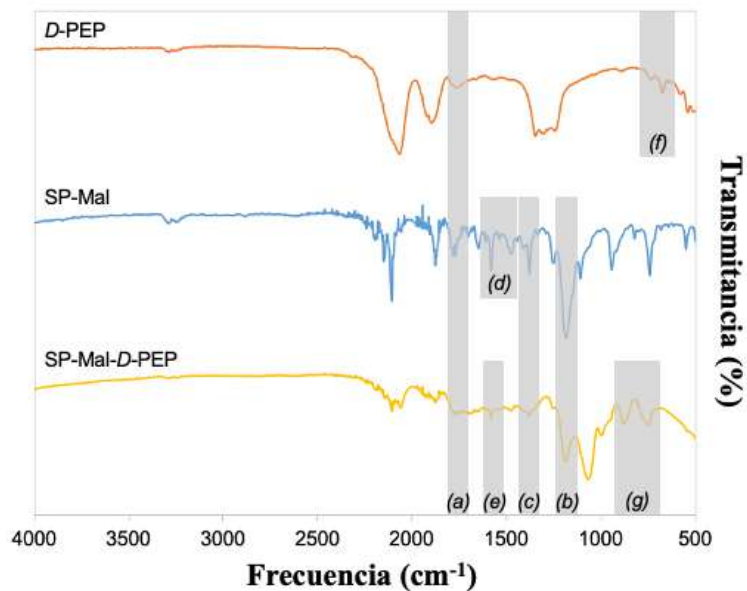
**Figura 15.** Caracterización de Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo y posterior a la reacción de conjugación: (A) difractogramas obtenidas por cristalografía de rayos X, y (B) calorigramas obtenidas por calorimetría diferencial de barrido.

### 3.2.3 Funcionalización del lípido con péptido

De acuerdo con los resultados anteriores en donde no se pudo obtener eficientemente el lípido Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida, se procedió a realizar la funcionalización de las secuencias peptídicas de interés con el lípido personalizado adquirido comercialmente, SP-Mal. Como ensayo preliminar, se seleccionó el péptido *D*-PEP para la funcionalización en una relación en número de moles de péptido y lípido de 1:1. En función de ello, se elaboró la respectiva curva de calibrado del péptido *D*-PEP a través de espectrofotometría UV/visible y se determinaron los porcentajes de recuperación de sólidos y de funcionalización, en base al método indirecto (Tabla 10). Además, tanto el lípido y péptido utilizados como materiales de partida y el producto final obtenido fueron analizados por ATR-FTIR (Figura 16).

**Tabla 10.** Cantidad y porcentaje de sólidos recuperados y rendimiento de la reacción de funcionalización del lípido SP-Mal con los péptidos de interés.

Lípido-Péptido	Ecuación de la recta (R <sup>2</sup> )	Recuperación		Funcionalización (%)
		Masa (mg)	Porcentaje (%)	
SP-Mal- <i>D</i> -PEP	$y = 0,02459x - 0,00922$ (0,99903)	18,32	91,21	99,45
SP-Mal-PEP	$y = 0,01741x - 0,00616$ (0,99911)	23,97	87,62	94,91
SP-Mal-CAR	$y = 0,02535x - 0,03590$ (0,99899)	27,31	89,11	99,77
SP-Mal-CLV	$y = 0,02165x - 0,00495$ (0,99917)	31,17	89,26	99,75

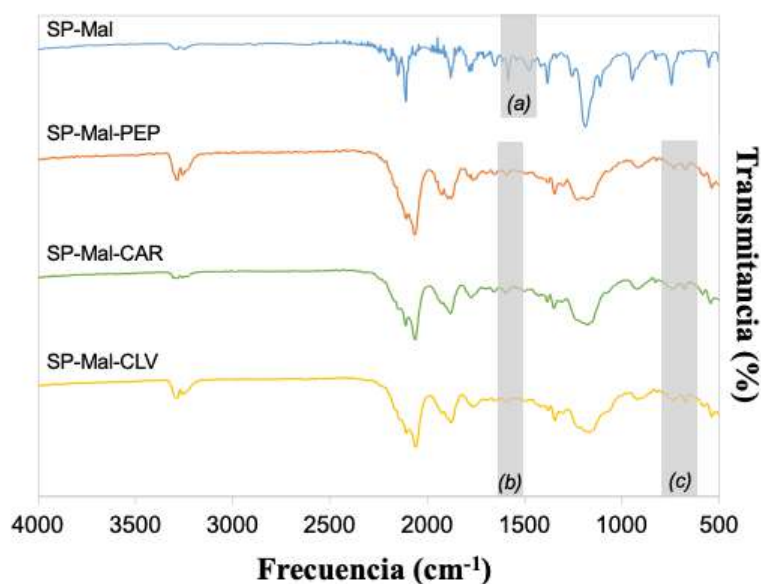


**Figura 16.** Espectros infrarrojos del péptido *D*-PEP (naranja), lípido SP-Mal (azul) y del producto SP-Mal-*D*-PEP (amarillo). Las letras del (a) al (g) corresponden a bandas identificadas en los distintos compuestos.

Tal y como se observa en la Tabla 9, la estrategia de funcionalización de *D*-PEP con el lípido SP-Mal adquirido logró generar un porcentaje de recuperación de sólidos del 91,21%, del cual casi todo el sólido se encontraba funcionalizado (99,45%), indicando que la reacción fue prácticamente completa. Con respecto a los espectros ATR-FTIR (Figura 16), se pudieron identificar bandas comunes de intensidad débil para todos los compuestos, específicamente, entre 1765 a 1770  $\text{cm}^{-1}$  (señal (a)), bandas de intensidad media entre 1183 y 1188  $\text{cm}^{-1}$  (señal (b)) y de intensidad débil entre 1377 y 1380  $\text{cm}^{-1}$  (señal (c)) presentes tanto en el lípido previo y posterior a la reacción de funcionalización. A nivel del lípido SP-Mal, se pudieron observar cuatro bandas de intensidad débil a media a 1471, 1498, 1582 y 1590  $\text{cm}^{-1}$  (señal (d)), que desaparecen en el lípido funcionalizado SP-Mal-*D*-PEP, observándose sólo una banda de intensidad débil a 1582  $\text{cm}^{-1}$  (señal (e)). En cuanto al péptido *D*-PEP, se observaron dos bandas de intensidad baja a media a 671 y 685  $\text{cm}^{-1}$  (señal (f)) que desaparecen en el lípido funcionalizado con la aparición de otras dos bandas de intensidad media a 744 y 879  $\text{cm}^{-1}$  (señal (g)), del péptido (116).

En base a los resultados anteriores, se prosiguió con la funcionalización del lípido adquirido con los péptidos de interés. Para ello, se seleccionaron los péptidos PEP, CAR

y CLV purificados y se funcionalizaron bajo el mismo protocolo que el descrito para el péptido *D*-PEP. Tal y como se muestra en la Tabla 9, todos los péptidos fueron funcionalizados óptimamente, obteniéndose un porcentaje de funcionalización cercano al 100% para los péptidos CAR y CLV, mientras que para el péptido PEP, este porcentaje fue cercano al 95%, con una recuperación de sólidos que fluctúa entre un 87 y 89%, para todos los casos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en la síntesis de SP-Mal-*D*-PEP. De acuerdo con los espectros ATR-FTIR de los sólidos obtenidos (Figura 17), se pudo observar las señales características observadas con el lípido SP-Mal-*D*-PEP, tales como una banda de intensidad débil a 1589-1590  $\text{cm}^{-1}$  (señal (b)), y dos bandas de intensidad baja a media entre 718 y 798  $\text{cm}^{-1}$  (señal (c)). Además, en cada lípido funcionalizado, existe la desaparición de 4 bandas características entre 1450 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ , que sí está presente en el lípido SP-Mal (señal (a)).



**Figura 17.** Espectros infrarrojos del lípido SP-Mal (azul) y los productos funcionalizados SP-Mal-PEP (naranja), SP-Mal-CAR (verde) y SP-Mal-CLV (amarillo). Las letras del (a) al (c) corresponden a bandas identificadas en los distintos compuestos.

### 3.2.4 Síntesis y caracterización fisicoquímica de micelas de núcleo lipídico

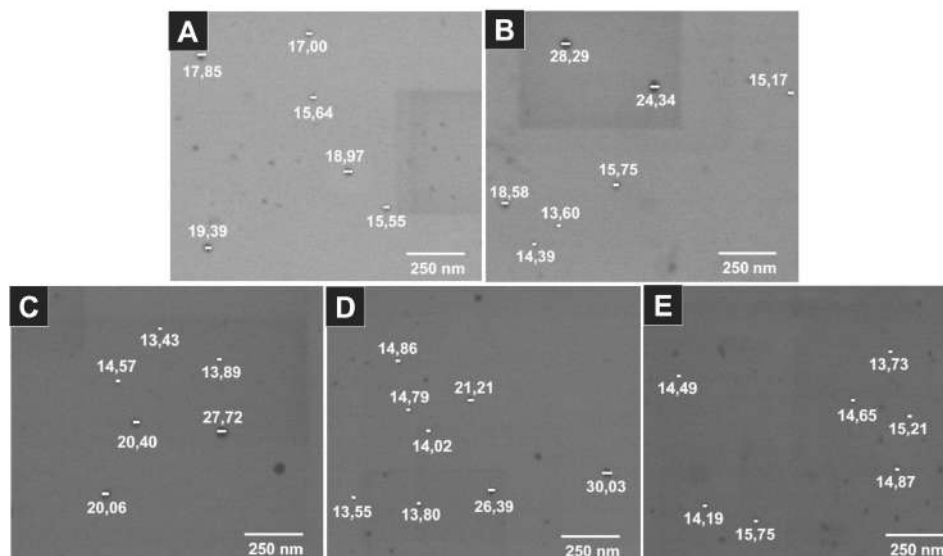
A partir del lípido personalizado funcionalizado con los péptidos de interés, se logró obtener LCMs a través de la técnica de emulsificación en caliente de baja energía. En la Tabla 11, se observan las características fisicoquímicas de HD, PdI y ZP de las



micelas funcionalizadas con los distintos péptidos y asociadas con Rho con respecto a las micelas no funcionalizadas vacías y asociadas con Rho como controles. Todas las LCMs elaboradas presentaron valores de HD dentro de la escala nanométrica, siendo las más grandes las micelas vacías ( $15,9 \pm 0,4$  nm) en comparación con las micelas funcionalizadas con el péptido CAR y asociadas con Rho ( $13,4 \pm 0,2$  nm). Las micrografías obtenidas por STEM demostraron que las LCMs presentaron una media de tamaños entre 14 y 19 nm y formas esféricas (Figura 18). Además, todas las suspensiones elaboradas demostraron ser de baja polidispersión, con valores de PDI menores a 0,3. A nivel del ZP (Tabla 11), las LCMs no asociadas con Rho ni funcionalizadas con péptido demostraron presentar un valor de carga superficial negativo ( $-13,9 \pm 1,0$  mV), siendo significativamente menor en comparación con las partículas no funcionalizadas y asociadas con Rho ( $-3,8 \pm 1,4$  mV). Este aumento en el valor de ZP se condice con la asociación de Rho a estas micelas (EE =  $80,6 \pm 0,4\%$ ). Por otra parte, las LCMs funcionalizadas con los distintos péptidos y asociadas con Rho mostraron valores pequeños de ZP neutros a positivos (PEP =  $1,0 \pm 1,4$  mV; CAR =  $2,6 \pm 0,5$  mV; CLV =  $1,2 \pm 0,5$  mV) sin diferencias entre ellas. Estos resultados difieren en forma significativa con respecto a las micelas no funcionalizadas, tanto vacías como asociadas con Rho

**Tabla 11.** Propiedades fisicoquímicas de las micelas de núcleo lipídico (LCM) elaboradas ( $n = 3$ ). Valores que no comparten la misma letra dentro de cada columna demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). DL: carga de fármaco; EE: eficiencia de asociación; HD: diámetro hidrodinámico; N/A: no aplica; PDI: índice de polidispersión; Rho: rodamina 123; y ZP: potencial zeta.

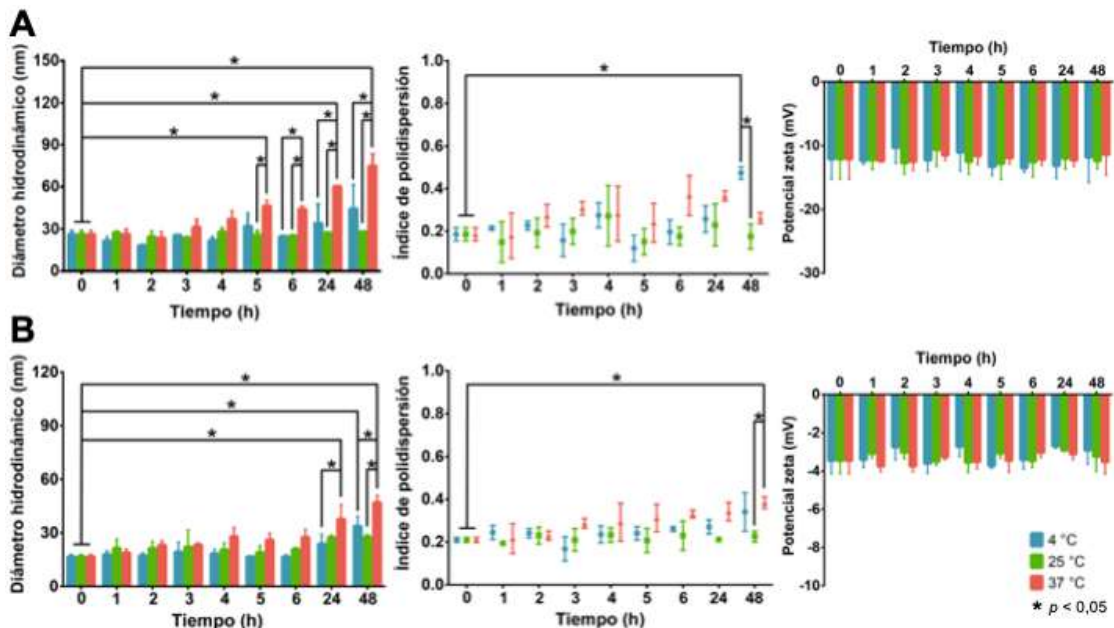
Micelas	HD (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	DL ( $\times 10^{-3}$ %)
LCM vacía	$15,9 \pm 0,4^a$	$0,170 \pm 0,006^a$	$-13,9 \pm 1,0^a$	N/A	N/A
LCM-Rho	$13,6 \pm 0,2^b$	$0,190 \pm 0,032^a$	$-3,8 \pm 1,4^b$	$80,6 \pm 0,4^a$	$21,8 \pm 0,4^a$
LCM-PEP-Rho	$14,4 \pm 0,6^{bc}$	$0,255 \pm 0,015^b$	$1,0 \pm 1,4^c$	$86,0 \pm 0,3^b$	$25,5 \pm 0,1^b$
LCM-CAR-Rho	$13,4 \pm 0,2^b$	$0,176 \pm 0,023^a$	$2,6 \pm 0,5^c$	$85,3 \pm 0,1^b$	$20,4 \pm 0,2^c$
LCM-CLV-Rho	$15,3 \pm 0,3^{ac}$	$0,230 \pm 0,029^{ab}$	$1,2 \pm 0,5^c$	$82,0 \pm 0,4^c$	$24,9 \pm 0,1^d$



**Figura 18.** Micrografías de las micelas de núcleo lipídico elaboradas: (A) no funcionalizadas y vacías; (B) no funcionalizadas y con rodamina 123; (C) funcionalizadas con PEP y asociadas con rodamina 123; (D) funcionalizadas con CAR y asociadas con rodamina 123; y (E) funcionalizadas con CLV y asociadas con rodamina 123.

### 3.2.5 Perfil de estabilidad de micelas de núcleo lipídico

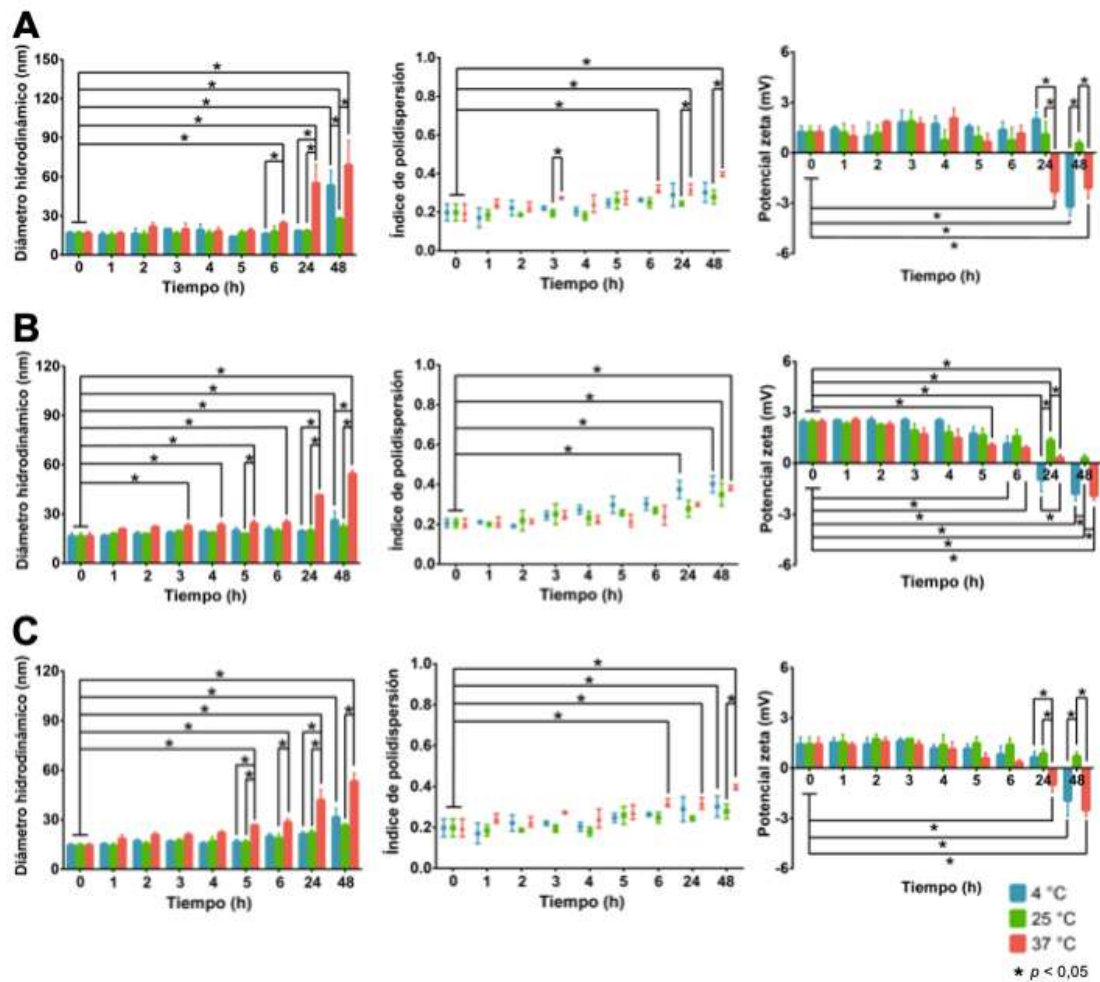
Tras la obtención de las LCMs de interés, se obtuvo el perfil de estabilidad de cada una de ellas. En términos de estabilidad cinética, todas las micelas fueron almacenadas por 48 h, a tres temperaturas distintas (4°C, 25 °C, y 37 °C), siendo los parámetros de seguimiento, la medición de HD, Pdl y ZP. Tal y como lo muestra la Figura 19, se observó un incremento significativo en el HD de las LCMs no funcionalizadas almacenadas a 37 °C a partir desde las 5 h ( $46,2 \pm 4,1$  nm, Figura 19A) y 24 h ( $37,7 \pm 8,3$  nm, Figura 19B) en micelas vacías y asociadas a Rho, respectivamente, en comparación con los valores obtenidos inmediatamente tras la síntesis y de aquellas almacenadas a temperaturas menores. Cabe destacar que también se observó un incremento en el HD de las micelas almacenadas a 4 °C en el tiempo en comparación con la medición tras su síntesis, observándose diferencias significativas para las LCMs asociadas con Rho a 48 h ( $33,7 \pm 5,5$  nm). Además, también se pudo observar una tendencia al aumento en los valores de Pdl en ambas LCMs, a lo largo del tiempo. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los valores de ZP respecto de los originales, a las tres temperaturas medidas.



**Figura 19.** Estabilidad a 48 h de micelas de núcleo lipídico no funcionalizadas vacías (A) y asociadas con rodamina 123 (B) expuestas a 4, 25 y 37 °C ( $n = 3$ ). \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la estabilidad cinética de las distintas LCMs funcionalizadas con los péptidos de interés y asociadas con Rho, se pudo observar un comportamiento similar a las LCMs no funcionalizadas (Figura 20). En términos de HD, todas las micelas funcionalizadas presentaron aumentos significativos a 37 °C, específicamente, a partir de las 6 h ( $27,4 \pm 4,5$  nm, Figura 20A), 3 h ( $22,6 \pm 1,4$  nm, Figura 20B) y 5 h ( $26,5 \pm 0,7$  nm, Figura 20C), para las LCMs funcionalizadas con PEP, CAR y CLV, respectivamente. Incluso, estos valores de HD aumentaron aún más tras 48 h de almacenamiento a 37 °C (LCMs-PEP =  $46,9 \pm 4,1$  nm; LCMs-CAR =  $54,3 \pm 2,3$  nm; LCMs-CLV =  $53,1 \pm 5,0$  nm). Cabe destacar que también se observó un aumento significativo de las LCMs almacenadas a 4 °C tras 48 h de su síntesis (LCMs-PEP =  $33,7 \pm 5,5$  nm; LCMs-CAR =  $26,1 \pm 5,7$  nm; LCMs-CLV =  $31,3 \pm 5,6$  nm), teniendo la particularidad de que son valores significativamente menores a los observados a 37 °C. Estos resultados son coherentes con la observación de cambios significativos en los valores de PDI de estas micelas. Una particularidad de las LCMs funcionalizadas y que no se observaron en las LCMs no

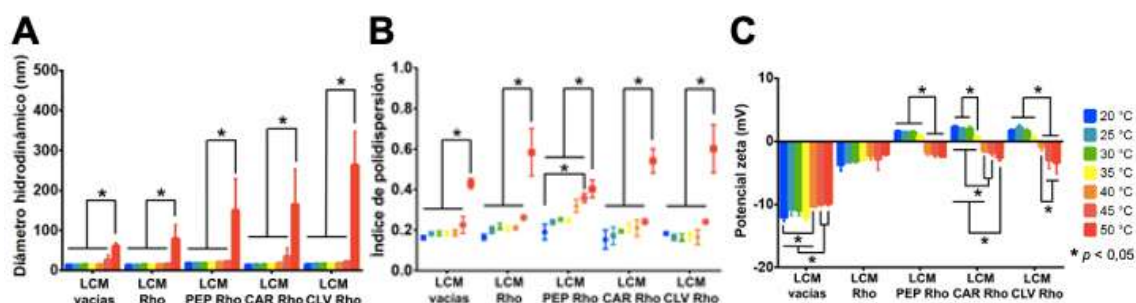
funcionalizadas, es la disminución significativa en los valores de ZP, a partir de las 24 h para las LCMs funcionalizadas con PEP ( $-1,7 \pm 0,9$  mV) y CLV ( $-1,8 \pm 1,2$  mV), y a las 5 h para las aquellas funcionalizadas con CAR ( $-1,9 \pm 0,3$  mV), todas almacenadas a 37 °C. También se pudo observar cambios significativos en micelas almacenadas a 4 °C a partir de las 48 h para las LCMs-PEP ( $-1,1 \pm 0,7$  mV) y LCMs-CLV ( $-1,2 \pm 0,9$  mV), y a las 6 h para LCMs-CAR ( $1,1 \pm 0,5$  mV), sin observar alteraciones a 25 °C.



**Figura 20.** Estabilidad a 48 h de micelas de núcleo lipídico asociadas con rodamina 123 y funcionalizadas con (A) PEP, (B) CAR, y (C) CLV, expuestas a 4, 25 y 37 °C ( $n = 3$ ). \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, también se determinó el perfil de estabilidad de todas las LCMs elaboradas expuestas a una rampa de temperatura, como prueba de estrés para estas

partículas (Figura 21). En ese sentido, todas las micelas mostraron diferencias significativas en el HD una vez que alcanzaron los 50 °C, en comparación con las otras temperaturas medidas (Figura 21A); en donde se obtuvieron valores desde aproximadamente los 60 nm para las LCMs no funcionalizadas y vacías hasta los 263 nm para las partículas funcionalizadas con el péptido CLV y asociadas con Rho. Estos resultados se condicen con valores significativamente mayores de PDI para las micelas expuestas a 50 °C, en comparación con las otras temperaturas (Figura 21B). A nivel del ZP de las partículas, se observaron diferencias significativas en aquellas partículas que alcanzaron los 45 y 50 °C en comparación con las mismas micelas sometidas a temperaturas más bajas, en todas las muestras, a excepción de LCMs no funcionalizadas y asociadas con Rho, que mostraron una tendencia al aumento en los valores, sin cambios estadísticamente significativos (Figura 21C). Cabe destacar que, al igual que la determinación del perfil de estabilidad cinética, se pudo observar cambios en los valores de ZP de LCMs funcionalizadas con péptidos, desde valores ligeramente positivos a ligeramente negativos, a medida que se aumenta la temperatura del sistema.

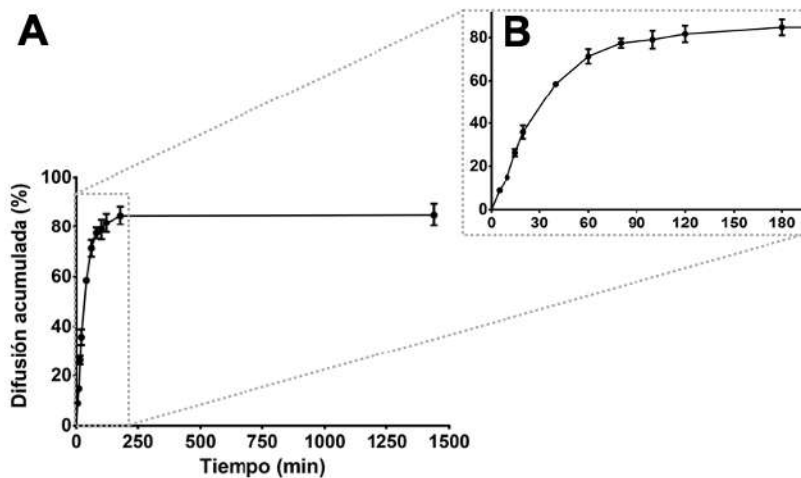


**Figura 21.** Estabilidad de micelas de núcleo lipídico (LCM) en términos de: (A) diámetro hidrodinámico, (B) índice de polidispersión, y (C) potencial zeta, expuestas a una rampa de temperatura de 20 a 50 °C ( $n = 3$ ). \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ). Rho: rodamina 123.

### 3.2.6 Perfil de liberación *in vitro* de rodamina contenidas en micelas de núcleo lipídico

Tras la asociación efectiva de Rho a las LCMs, se procedió a determinar el perfil de liberación de la molécula. Este experimento se realizó en condiciones *in vitro*

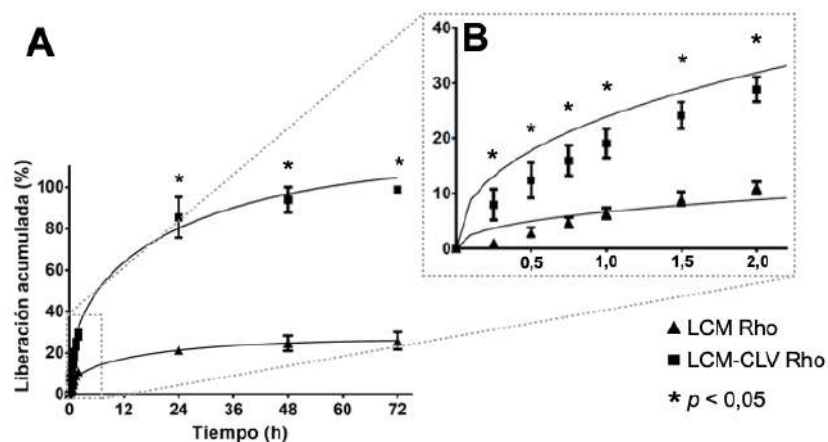
simulando un ambiente fisiológico con PBS pH 7,4 a 37 °C, mediante la técnica de diálisis. Como primera prueba control, se determinó el perfil de difusión de Rho libre a través de la membrana de diálisis. Tal y como se muestra en la Figura 22, la Rho es capaz de difundir libremente hacia el medio a través de los poros de la membrana, en donde la difusión de la molécula comienza rápidamente alcanzando  $8,9 \pm 0,4\%$  a los 5 minutos, aumentando a  $71,3 \pm 3,4\%$  y  $84,7 \pm 3,7\%$  tras 1 y 3 h, respectivamente, manteniéndose este nivel hasta las 24 h ( $85,5 \pm 4,5\%$ ), por lo que el proceso ha alcanzado el equilibrio.



**Figura 22.** Perfil de difusión acumulada *in vitro* de rodamina 123 en PBS pH 7,4 a 37 °C ( $n = 3$ ): (A) a 24 h (1440 min) y (B) ampliación a 3 h (180 min).

En base a los resultados de difusión, se procedió a determinar el perfil de liberación de Rho a partir de las LCMs funcionalizadas con CLV y, como control, a partir de partículas no funcionalizadas, en PBS pH 7,4 y a 37 °C. Cabe destacar que se eligieron estas micelas, debido a que el diseño teórico de la investigación busca que estos sistemas lleguen intactos a circulación sistémica tras la absorción bucal y posterior a la escisión del péptido PEP a CLV mediada por la enzima MMP-9, para exponer el fragmento orientador a cardiomiocitos. Los perfiles de liberación acumulada de Rho a partir de ambos sistemas se observan en la Figura 23. En ese sentido, se pudo observar un mayor porcentaje de liberación para las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV durante todo el transcurso del experimento, obteniéndose un valor acumulado de  $19,1 \pm 2,6\%$ ,  $85,5 \pm 9,8\%$  y  $98,9 \pm$

1,6% a 1, 24 y 72 h para las LCMs funcionalizadas, en comparación con  $6,4 \pm 1,0\%$ ,  $21,4 \pm 1,8\%$  y  $25,9 \pm 4,2\%$  para las LCMs no funcionalizadas como control y a los mismos tiempos. Además, el valor de factor de similitud  $f_2$  de ambos perfiles de liberación calculado fue de 18,7, indicando que ambos perfiles son diferentes ( $f_2 < 50$ ), confirmando los hallazgos previamente observados.



**Figura 23.** Perfil de liberación acumulada *in vitro* de rodamina 123 en PBS pH 7,4 y a 37 °C ( $n = 3$ ), a partir de micelas de núcleo lipídico sin funcionalizar y funcionalizadas con el péptido CLV: (A) a 72 h, y (B) ampliación a 2 h. Las líneas de tendencia de los perfiles de liberación se ajustaron de acuerdo con el modelo cinético de Peppas-Sahlin. \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ).

Desde el punto de vista cinético, los datos de liberación acumulada de Rho de ambos sistemas fueron ajustados de acuerdo con diferentes modelos cinéticos utilizando el complemento DDSolver para Microsoft Excel (Tabla 12) (110). Según los valores de coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$ ), se pudo observar que los mejores modelos cinéticos para la liberación de Rho son el de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin a partir de las LCMs no funcionalizadas, y primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin en las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV. A pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $R^2$  de estos modelos matemáticos, el modelo cinético que mejor se ajusta a ambos perfiles de liberación es el de Peppas-Sahlin ( $R^2 = 0,961 \pm 0,013$  para las LCM-Rho y  $R^2 = 0,977 \pm 0,005$  para las LCM-CLV Rho).

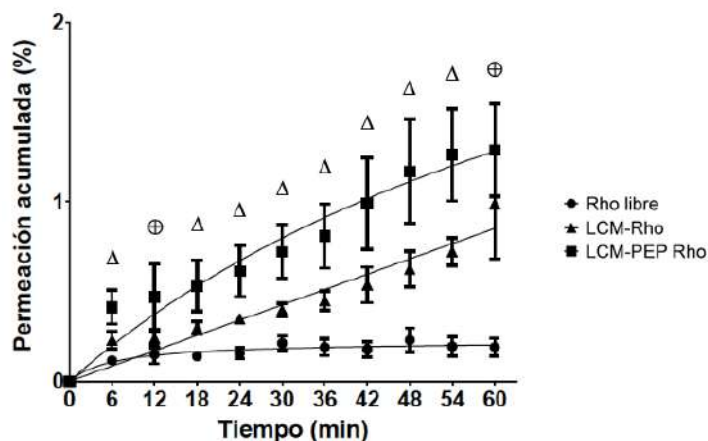
**Tabla 12.** Parámetros cinéticos ajustados a los distintos modelos de los perfiles de liberación de rodamina 123 (Rho) desde micelas de núcleo lipídico (LCM) sin funcionalizar y funcionalizada con el péptido CLV ( $n = 3$ ). Valores que no comparten la misma letra dentro de cada columna demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

<b>Modelo cinético</b>	<b>Parámetro</b>	<b>LCM-Rho</b>	<b>LCM-CLV Rho</b>
Orden cero $Q = kt + b$	$k$	$0,48 \pm 0,07$	$1,81 \pm 0,15$
	$R^2$	$0,449 \pm 0,115^a$	$0,446 \pm 0,045^a$
Primer orden $Q = 100 \times (1 - e^{-kt})$	$k$	$0,01 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,05$
	$R^2$	$0,503 \pm 0,116^a$	$0,944 \pm 0,039^b$
Higuchi $Q = kt^{0,5}$	$k$	$3,57 \pm 0,50$	$14,37 \pm 1,26$
	$R^2$	$0,851 \pm 0,056^b$	$0,894 \pm 0,016^b$
Korsmeyer-Peppas $Q = kt^n$	$k$	$5,33 \pm 1,42$	$19,88 \pm 5,14$
	$n$	$0,40 \pm 0,15$	$0,44 \pm 0,06$
	$R^2$	$0,772 \pm 0,089^b$	$0,892 \pm 0,052^b$
Peppas-Sahlin $Q = k_1t^m + k_2t^{2m}$	$k_1$	$7,11 \pm 0,66$	$25,34 \pm 2,82$
	$k_2$	$-0,49 \pm 0,06$	$-1,47 \pm 0,25$
	$m$	$0,45 \pm 0,00$	$0,45 \pm 0,00$
	$R^2$	$0,961 \pm 0,013^b$	$0,977 \pm 0,005^b$



### 3.3 Permeación bucal *ex vivo* de micelas de núcleo lipídico

La determinación de la permeación *ex vivo* de las LCMs se realizó a través de las celdas de difusión de Franz, utilizando mejillas de cerdo como modelo de epitelio bucal, en buffer fosfato pH 6,8 y a 37 °C. Se utilizaron las LCMs funcionalizadas con PEP, que contiene el fragmento potenciador de la permeación y LCMs no funcionalizadas como control, en donde la Rho sirvió como molécula modelo, gracias a su fluorescencia. Además, se comparó como control la permeación de esta molécula libre en solución. Tal y como se muestra en la Figura 24, la permeación acumulada de las LCMs es relativamente baja, alcanzando no más del 2% a 60 minutos. Pese a ello, se puede observar que, a los 6 minutos, las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP demostraron aumentar significativamente la permeación de Rho ( $0,41 \pm 0,09\%$ ), en casi dos y cuatro veces en comparación con las LCMs no funcionalizadas ( $0,23 \pm 0,05\%$ ) y Rho libre en solución ( $0,11 \pm 0,02\%$ ), respectivamente. Esta observación se mantiene relativamente constante en casi todos los puntos analizados. Al finalizar el experimento a los 60 minutos, se pudo observar que la permeación acumulada de Rho a partir de LCMs funcionalizadas con PEP alcanzó  $1,26 \pm 0,26\%$ , siendo casi dos veces más que las LCMs no funcionalizadas ( $0,72 \pm 0,08\%$ ) sin observar diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, si se compara con Rho libre en solución ( $0,19 \pm 0,05\%$ ), las LCMs funcionalizadas lograron aumentar significativamente en casi 7 veces la permeación de la molécula fluorescente a través del modelo de epitelio bucal. Además, se determinaron los parámetros de difusión  $J_{ss}$  y permeabilidad  $P_{app}$  a través del análisis de los perfiles de permeación acumulada *ex vivo* de las muestras estudiadas (Tabla 13). Las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP demostraron presentar significativamente una mayor difusión en estado estacionario a través de la mucosa bucal ( $0,468 \pm 0,180 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ), en comparación con las LCMs sin funcionalizar ( $0,018 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ) y Rho libre en solución ( $0,014 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ). Asimismo, estas micelas funcionalizadas fueron capaces de atravesar la mucosa bucal ( $70,30 \pm 27,30 \text{ cm/h}$ ), siendo 26 y 32 veces mayor en comparación con las micelas no funcionalizadas ( $2,65 \pm 0,36 \text{ cm/h}$ ) y Rho en solución ( $2,14 \pm 0,38 \text{ cm/h}$ ), respectivamente.



**Figura 24.** Perfil de permeación acumulada *ex vivo* de rodamina 123 (Rho) libre en solución, en micelas de núcleo lipídico (LCM) no funcionalizadas y funcionalizadas con el péptido PEP, en buffer fosfato pH 6,8 a 37 °C ( $n = 5$ ).  $\Delta$  indica diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos comparados y  $\oplus$  entre las micelas funcionalizadas o no funcionalizadas y rodamina libre ( $p < 0,05$ ).

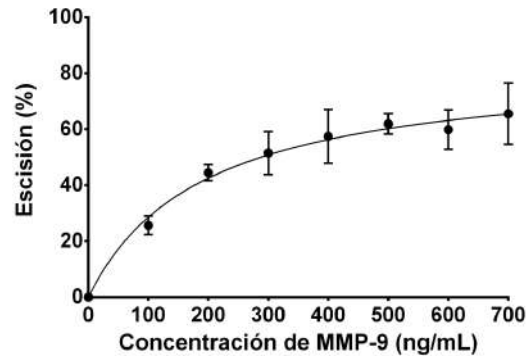
**Tabla 13.** Parámetros de flujo de difusión en estado estacionario ( $J_{ss}$ ) y permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) de los perfiles de permeación de solución de rodamina 123 (Rho) libre, micelas de núcleo lipídico (LCM) no funcionalizadas y funcionalizadas con PEP y asociadas con Rho ( $n = 5$ ). Valores que no comparten la misma letra dentro de cada columna demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Muestra	$J_{ss}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$P_{app}$ (cm/h)
Rho libre	$0,014 \pm 0,003^a$	$2,14 \pm 0,38^a$
LCM-Rho	$0,018 \pm 0,002^a$	$2,65 \pm 0,36^a$
LCM-PEP Rho	$0,468 \pm 0,180^b$	$70,30 \pm 27,30^b$

### 3.4 Escisión *in vitro* de secuencia sensible a metaloproteinasas de la matriz-9

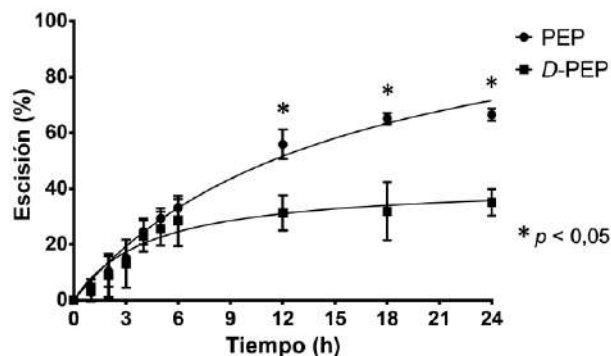
Una vez determinada la permeación bucal potenciada de Rho asociadas a las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP, se procedió a evaluar la escisión *in vitro* de la secuencia sensible y bioactivable por MMP-9 (GPQGIAGQ). Para ello, como primera prueba se procedió a determinar la concentración óptima de MMP-9 para posteriormente determinar la cinética de escisión del fragmento sensible. Este ensayo se llevó a cabo con la secuencia PEP libre en solución. Tal y como se muestra en la Figura 25, se pudo observar que el porcentaje de escisión del fragmento sensible contenido en el péptido PEP aumenta a medida que la concentración de la enzima también se incrementa. En ese

sentido, se obtuvo una escisión de  $25,7 \pm 2,7\%$  tras la exposición a 100 ng/mL de MMP-9, aumentando a más del doble ( $57,5 \pm 7,8\%$ ) a 400 ng/mL de enzima y, a partir de ahí, manteniéndose relativamente constante hasta alcanzar un  $65,5 \pm 8,9\%$  tras la exposición a 700 ng/mL de MMP-9.



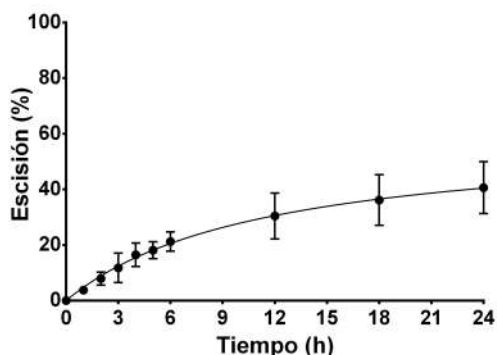
**Figura 25.** Escisión *in vitro* a 24 h del péptido PEP libre en solución expuesto a distintas concentraciones de metaloproteinasa de la matriz-9 (MMP-9) ( $n = 3$ ). La línea de tendencia de los perfiles de liberación se ajustó de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten.

Una vez fijada la concentración de trabajo para la enzima MMP-9, se procedió a evaluar la cinética del proceso de escisión del péptido PEP libre y en solución, en comparación con el péptido *D*-PEP, que presenta isómeros *D* en los aminoácidos que componen la secuencia activable por MMP-9, como control y para determinar si la enzima tendría estereoespecificidad en su actividad endopeptidasa. En la Figura 26, se puede observar la cinética de escisión de ambos péptidos en solución, sometidos a una concentración de 450 ng/mL de MMP-9, aumentando a medida que incrementa el tiempo de exposición. Tras 1 h, el porcentaje de escisión de PEP ( $3,2 \pm 2,8\%$ ) no difirió significativamente del *D*-PEP ( $4,7 \pm 2,8\%$ ), aumentando hasta  $33,2 \pm 3,2\%$  y  $28,4 \pm 9,0\%$ , respectivamente, tras 6 h, sin diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, a partir de 12 h se puede observar un porcentaje de escisión significativamente mayor del péptido PEP ( $55,9 \pm 5,3\%$ ) en comparación con *D*-PEP ( $31,3 \pm 6,3\%$ ). Esta tendencia significativamente mayor se mantiene tras 24 h, observándose un porcentaje de escisión de  $66,5 \pm 2,2\%$  y  $35,1 \pm 4,8\%$  para los péptidos PEP y *D*-PEP, respectivamente.



**Figura 26.** Cinética de escisión de los péptidos PEP y D-PEP expuestos a 450 ng/mL de metaloproteína de la matriz-9 ( $n = 3$ ). Las líneas de tendencia de los perfiles de escisión se ajustaron de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten. \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ).

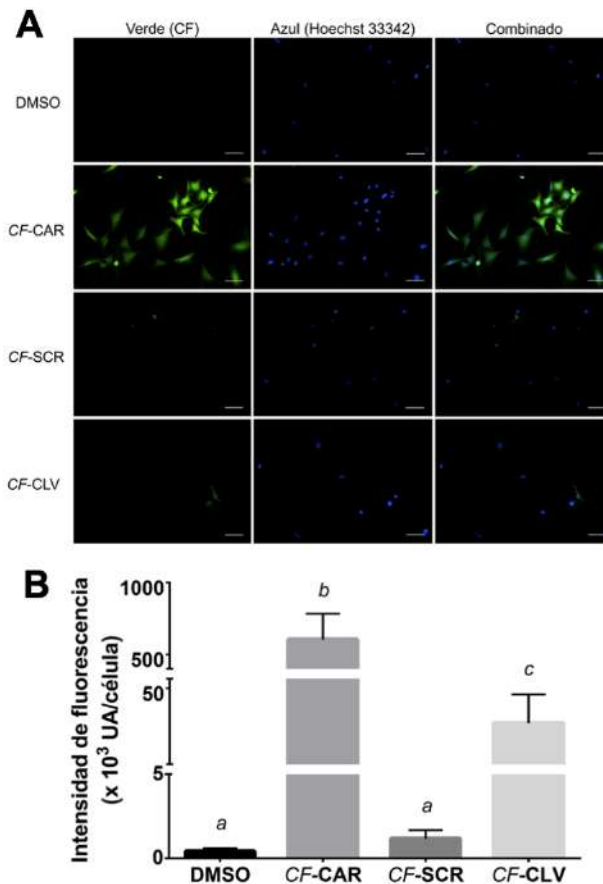
En base a la capacidad de MMP-9 de reconocer el fragmento sensible en el péptido PEP, se procedió a estudiar la cinética de escisión del péptido funcionalizado sobre la superficie de las LCMs. Es importante demostrar esta actividad catalítica sobre el péptido PEP funcionalizado en las LCMs, ya que simularía el proceso de activación posterior a la permeación bucal, para exponer el fragmento orientador a cardiomiocitos. Tal y como se muestra en la Figura 27, se observa una cinética de escisión creciente en el tiempo, alcanzando un  $3,8 \pm 1,2\%$  tras 1 h, y casi 6 veces más ( $21,2 \pm 3,5\%$ ) después de 6 h. A partir de ahí, el porcentaje de escisión muestra un aumento, aunque a menor ritmo, hasta alcanzar  $30,5 \pm 8,3\%$  y  $40,6 \pm 9,4\%$  tras 12 y 24 h de ensayo, respectivamente.



**Figura 27.** Cinética de escisión del péptido PEP funcionalizado sobre las micelas de núcleo lipídico expuestas a 450 ng/mL de metaloproteína de la matriz-9 ( $n = 3$ ). La línea de tendencia del perfil de escisión se ajustó de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten.

### 3.5 Ensayo *in vitro* de unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con péptido

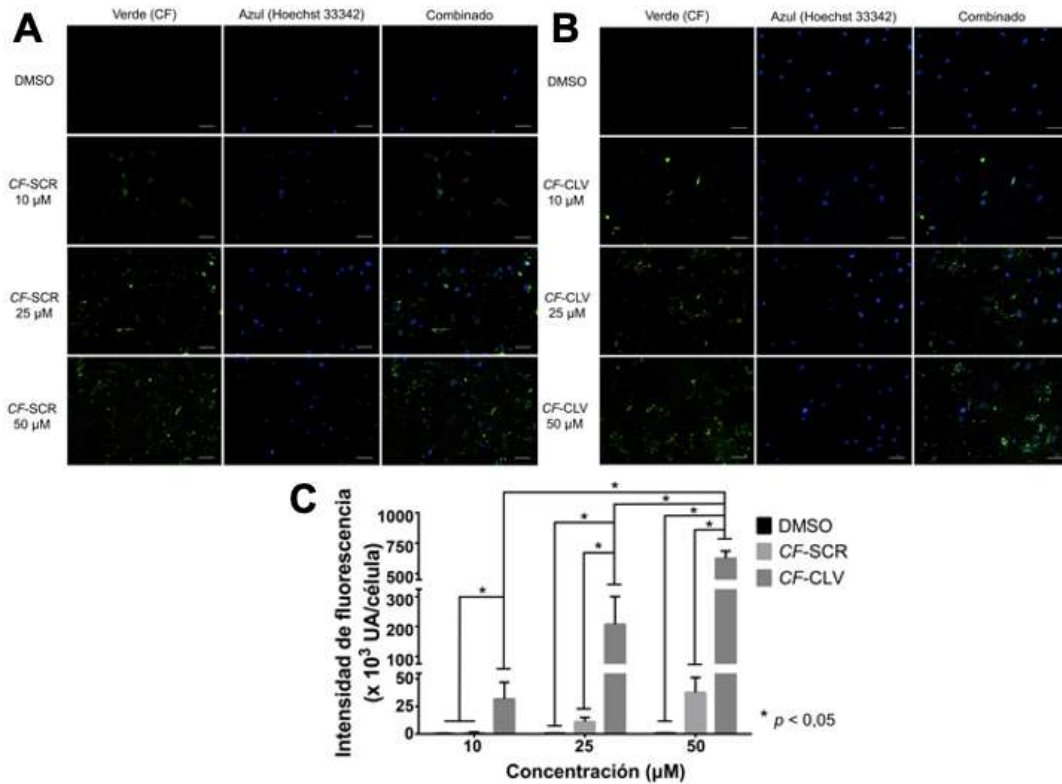
Una vez determinada la capacidad de mantener la sensibilidad a la actividad proteasa de la MMP-9 del fragmento GPQGIAGQ del péptido PEP en las LCMs funcionalizadas, se procedió a determinar la unión de la secuencia remanente presente en las LCMs a los cardiomiocitos. Cabe recordar que la escisión del fragmento sensible a MMP-9 es entre los residuos G e I de la secuencia, por lo tanto, la secuencia final del péptido remanente en las LCMs sería CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQG (CLV), que contiene la secuencia orientadora a cardiomiocitos (WLSEAGPVVTVRALRGTGSW) y los cuatro residuos remanentes (GPQG) producto de la escisión. En ese sentido, como primer ensayo se determinó la influencia de los cuatro residuos remanentes sobre la unión de la secuencia orientadora de cardiomiocitos, que corresponde a la secuencia CLV, en comparación con los péptidos controles, que contiene solo la secuencia orientadora (CAR) y otro *scramble* de la secuencia CAR (SCR), todos acoplados con un marcador fluorescente, la CF y disponibles en solución con DMSO (Figura 28). Tal y como se aprecia en las micrografías de fluorescencia a campo abierto (Figura 28A), se pudieron observar diferencias en el canal verde entre los distintos péptidos a una concentración de 10  $\mu$ M. En términos de intensidad de fluorescencia medidas en unidades arbitrarias (UA) por célula (Figura 28B), el péptido *CF-CLV* presenta una menor intensidad de fluorescencia ( $31,8 \times 10^3 \pm 15,1 \times 10^3$  UA/célula) en comparación con el péptido *CF-CAR* como control ( $603,2 \times 10^3 \pm 178,8 \times 10^3$  UA/célula), lo que se traduce en una unión a cardiomiocitos significativamente menor; sin embargo, el péptido *CF-CLV* muestra una unión a cardiomiocitos 27 veces mayor en términos de intensidad en comparación con el secuencia *scramble CF-SCR* ( $1,2 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$  UA/célula).



**Figura 28.** Unión de los péptidos fluorescentes conjugados con 5(6)-carboxifluoresceína (CF) a 10  $\mu$ M a cardiomiocitos de ratas neonatas: (A) micrografías de fluorescencia de campo abierto con filtro verde (CF), azul (Hoechst 33342 para tinción nuclear), y combinadas, la barra representa una escala de 55  $\mu$ m; y (B) intensidad de fluorescencia de CF de los distintos péptidos ( $n = 4$ ). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ). DMSO: dimetilsulfóxido.

Por otra parte, si se comparan la unión a cardiomiocitos a diferentes concentraciones de péptidos *CF-SCR* (Figura 29A) y *CF-CLV* (Figura 29B), se pudo observar que la unión a las células presenta un efecto dependiente de la concentración, en donde a 50  $\mu$ M de *CF-CLV* ( $625,9 \times 10^3 \pm 59,0 \times 10^3$  UA/célula) se obtuvo una intensidad de fluorescencia (Figura 29C) y, por tanto, de unión significativamente mayor en comparación con 10 y 25  $\mu$ M ( $207,9 \times 10^3 \pm 92,1 \times 10^3$  UA/célula), observándose el mismo comportamiento para el péptido *CF-SCR*. Cabe destacar, que no se estudió el efecto de la concentración del péptido control *CF-CAR*, debido a que ya mostraba una

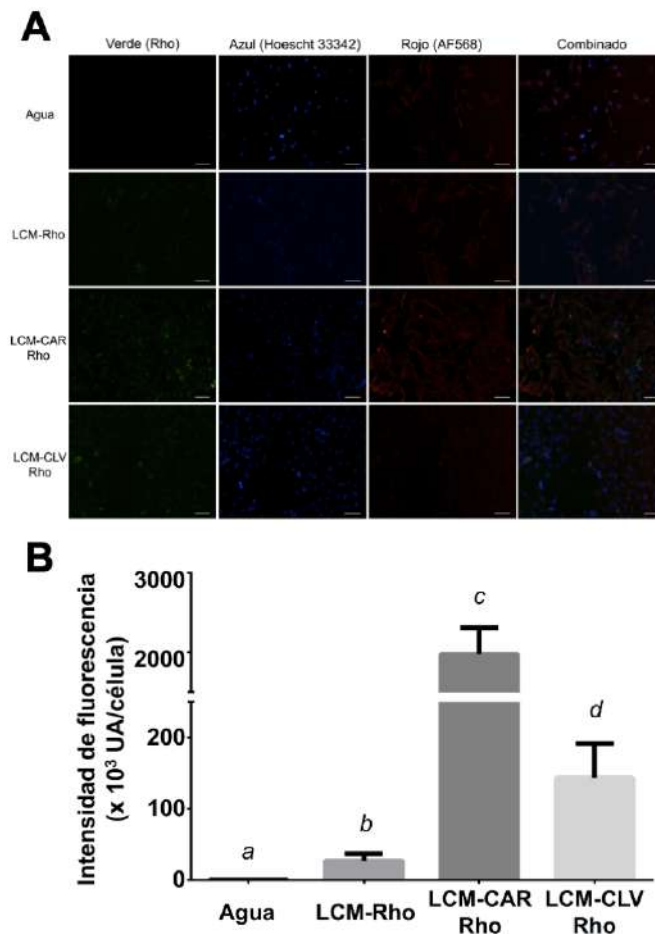
alta intensidad de fluorescencia a 10  $\mu\text{M}$  y, por tanto, su capacidad de unión a cardiomiocitos.



**Figura 29.** Unión a cardiomiocitos de ratas neonatas a diferentes concentraciones de péptidos fluorescentes conjugados con 5(6)-carboxifluoresceína (CF, verde) usando Hoechst 33342 (azul) como tinción nuclear: (A) micrografías de fluorescencia a campo abierto del péptido *scramble* CF-SCR; (B) micrografías de fluorescencia a campo abierto del péptido CF-CLV; y (C) intensidad de fluorescencia de CF de los distintos péptidos ( $n = 4$ ). La barra representa una escala de 55  $\mu\text{m}$ . \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ). DMSO: dimetilsulfóxido.

Posterior a los ensayos de unión de los péptidos libres a cardiomiocitos, se procedió a determinar la unión de las LCMs funcionalizadas con el péptido de interés CLV y asociadas con el marcador fluorescente Rho, en comparación con micelas sin funcionalizar y funcionalizadas con el péptido CAR, como controles (Figura 30). Tal y como se muestra en la Figura 30A, las micrografías de fluorescencia a campo abierto mostraron que las LCMs funcionazalizadas con el péptido CLV fueron capaces de unirse a los cardiomiocitos (canal verde), al igual que las LCMs sin funcionalizar y funcionalizadas con el péptido control CAR. En términos de intensidad de fluorescencia

(Figura 30B), se pudo corroborar que las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV presentaron una fluorescencia del fluoróforo Rho 14 veces menor ( $143,2 \times 10^3 \pm 48,8 \times 10^3$  UA/célula) en comparación con las LCMs funcionalizadas con el péptido control CAR ( $1971,3 \times 10^3 \pm 333,0 \times 10^3$  UA/célula). Sin embargo, las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV demostraron presentar una unión 5 veces mayor en comparación con las LCMs cuya estructura no contiene ningún péptido ( $26,6 \times 10^3 \pm 9,8 \times 10^3$  UA/célula). Con ello, los resultados obtenidos asociados con la unión a cardiomiocitos de las LCMs funcionalizadas muestran un comportamiento idéntico al observado con los péptidos libres en solución.



**Figura 30.** Unión de las micelas de núcleo lipídico (LCM) asociadas con rodamina 123 (Rho) con o sin funcionalización del péptido CAR o CLV a cardiomiocitos de ratas neonatas: (A) micrografías de fluorescencia de campo abierto con filtro verde (Rho), azul (Hoechst 33342 para tinción nuclear), rojo



(AlexaFluor™ 568 (AF568) como marcador de troponina T de cardiomiocitos) y combinadas, la barra representa una escala de 55  $\mu\text{m}$ ; y (B) intensidad de fluorescencia de Rho de las distintas muestras ( $n = 4$ ). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados ( $p < 0,05$ ).

## 4. Discusión

### 4.1 Síntesis, purificación, identificación y caracterización de la estructura secundaria de péptidos

#### 4.1.1 Síntesis, purificación e identificación de péptidos

Todos los péptidos sin el marcador fluorescente CF propuestos para el diseño fueron sintetizados y separados óptimamente a través de las técnicas de síntesis en fase sólida y FPLC, respectivamente, con una pureza mayor al 95%; además, la identidad de todos los péptidos fueron correctamente confirmados a través de LCMS (Tabla 4). Por otra parte, también se lograron sintetizar y purificar los péptidos conjugados con CF, obteniéndose valores de pureza sobre el 95%, a excepción del péptido *CF-CLV* (Tabla 6). Esto pudo estar relacionado con un proceso deficiente de separación de los grupos protectores en la fase de desprotección y posterior lavado para dicho péptido, o bien pudo haber requerido de otras estrategias de purificación dado el mayor peso molecular en comparación con los otros dos péptidos (*CF-CAR* y *CF-SCR*), como cromatografía por interacción hidrofóbica (HIC, del inglés *hydrophobic interaction chromatography*). La HIC es una técnica de fase reversa que se basa en la adsorción del analito a la fase estacionaria por interacciones hidrofóbicas, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, y a través de una gradiente de pH de soluciones buffer como fase móvil, estos analitos adsorbidos son capaces de ionizarse secuencialmente y eluir con la fase móvil para ser recolectados (117). Esta separación es ampliamente utilizada para remover las distintas impurezas como agregados dentro de una solución que contiene el péptido de interés (117,118). Por ende, esta técnica podría ser considerada como opción para futuras separaciones de péptidos similares a los propuestos. Pese a ello, todos los péptidos obtenidos fueron óptimamente liofilizados (Tabla 7) y almacenados hasta su uso.

En términos de las características fisicoquímicas de los péptidos sin marcador fluorescente predichos a través de sus respectivas secuencias peptídicas (Tabla 5), las

principales diferencias se pudieron observar en los parámetros de índice de alifaticidad y GRAVY. El índice de alifaticidad de un péptido o proteína se define como el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales de los aminoácidos alifáticos, específicamente alanina (A), valina (V), leucina (L) e isoleucina (I) (119). Para ello, se ha relacionado este índice con la estabilidad térmica de proteínas, en donde valores más altos de índice de alifaticidad se asocia con una mayor estabilidad de estas macromoléculas (120). Esto puede deberse principalmente a un incremento en la hidrofobicidad de los péptidos y proteínas, propiciando la formación de interacciones hidrofóbicas y asociándose con un cambio considerable en la energía libre de las moléculas, generando estructuras más termoestables (121). Por lo tanto, en términos de índice de alifaticidad, el péptido PEP es el que muestra el valor número más alto (106,06) en comparación con los péptidos CAR, SCR y CLV (88,10; 88,10; y 74,00; respectivamente), demostrando ser el más termoestable, debido a la mayor presencia de aminoácidos alifáticos, específicamente residuos de valina. Además, al comparar la estabilidad térmica con otras macromoléculas, incluyendo enzimas vegetales y proteínas y toxinas bacterianas, que mostraron valores de índice de alifaticidad en un rango entre 66 a 143 y reportadas como estables (119,120,122,123), todos los péptidos diseñados en el presente estudio se considerarían termoestables.

Por otra parte, el valor GRAVY es una medida del grado de hidrofobia o hidrofilia de un péptido o proteína. Este índice se obtiene a través de la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos dividida por la longitud de la secuencia, en términos de número de aminoácidos (124). Los valores de hidropatía de los aminoácidos se basa en la estructura de la cadena lateral de cada residuo, determinado por Kyte y Doolittle (125). En ese sentido, el rango de valores para la mayoría de las proteínas conocidas y estudiadas comprende entre -2 y 2, en donde valores negativos implica que la molécula es más hidrofílica, mientras que valores positivos se asocia con un mayor grado de hidrofobia (124). Por tanto, el péptido PEP es el que presentó mayor valor GRAVY (0,59) en comparación con los otros péptidos. Esto se debe a la mayor presencia de aminoácidos valina, asociados al fragmento potenciador de la permeación bucal, ya que corresponde a

un aminoácido con características alifáticas e hidrofóbicas (126), en comparación con los péptidos CAR y SCR (GRAVY = 0,30 para ambos). Estos resultados son concordantes con el índice de alifaticidad asociado principalmente a los residuos de valina de este péptido. Una particularidad se asocia con el péptido CLV, que presenta un valor GRAVY de 0,01, siendo, por tanto, el menos hidrofóbico de los cuatro péptidos diseñados. Esto puede deberse a la presencia en su extremo C-terminal de un residuo de glutamina, que se caracteriza por ser un aminoácido polar, lo que aportaría una mayor solubilidad acuosa o hidrofilia (126). En ese sentido, las características hidrofílicas o hidrofóbicas de un péptido o proteína pueden influir ampliamente en su estructura, propiedades fisicoquímicas y capacidad de agregación (127,128), que finalmente impactarían en la actividad biológica de interés que se pretende alcanzar con estas macromoléculas.

#### **4.1.2 Caracterización de estructura secundaria de péptidos**

Los resultados de la estructura secundaria de los péptidos sintetizados fueron determinados a través de espectroscopía de dicroísmo circular, tal y como se muestra en la Figura 10. Cabe destacar que esta técnica se basa en la excitación de las transiciones electrónicas de cromóforos, específicamente los enlaces peptídicos, utilizando la zona del espectro UV lejano (180 a 260 nm) de una luz circular polarizada. Dado que los aminoácidos presentan centros quirales o carbonos asimétricos (a excepción de glicina), los péptidos y proteínas pueden mostrar una absorción diferencial de luz polarizada y, por tanto, considerarse como moléculas ópticamente activas (129). En base a esta absorción diferencial, es que se pueden observar señales características en el espectro de dicroísmo circular para cada conformación de estructura secundaria de péptidos y proteínas, incluyendo hélice  $\alpha$ , láminas  $\beta$  (paralelas y antiparalelas), y otras conformaciones desordenadas u organizadas al azar que pueden consistir en giros y fragmentos extendidos o plegados en forma irregular con ángulos diedros  $\Phi$  y  $\Psi$  específicos, y que pueden ubicarse entre dos segmentos adyacentes con una conformación definida (129,130). En ese sentido, péptidos y proteínas con estructuras hélice  $\alpha$  presenta una banda positiva a 193 nm y bandas negativas tanto a 208 y 222 nm. Por otra parte, las estructuras láminas  $\beta$  tienden a presentar una banda positiva a 195 nm y negativa a 218 nm. En cambio, las

proteínas con estructuras ordenadas al azar presentan bandas negativas a 195 nm y muy baja elipticidad a 210 nm (131). En ese sentido, los péptidos PEP, CAR y CLV demostraron presentar una estructura mayormente desordenada u organizada al azar, ya que se obtuvieron valores negativos de elipticidad a 195 nm (entre -5 a -20 deg·cm<sup>2</sup>/dmol) y 220 nm (-6 a -11 deg·cm<sup>2</sup>/dmol); mientras que el péptido SCR mostró una conformación secundaria más estructurada de tipo hélice  $\alpha$ , con valores positivos a 193 nm (2 deg·cm<sup>2</sup>/dmol) y negativos a 208 nm (-15 deg·cm<sup>2</sup>/dmol) y 222 nm (-4 deg·cm<sup>2</sup>/dmol).

Tal y como se observa en la Tabla 8 y en concordancia con los resultados obtenidos a través de espectroscopía de dicroísmo circular, todos los péptidos sintetizados mostraron una estructura secundaria predicha principalmente aleatoria, desordenada u organizada al azar (mayor al 65%). Además, se estimaron que los péptidos PEP, CAR y CLV presentaron ciertas regiones en donde la estructura secundaria adoptaron una conformación de tipo lámina  $\beta$ . Los valores idénticos obtenidos para los tres péptidos se deben probablemente a que presentan una secuencia peptídica en común asociada a los primeros 21 aminoácidos, en donde se podría prever la presencia de estructuras secundarias organizadas de tipo hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$ . Por otra parte, el péptido SCR demostró presentar una estructura mayoritariamente de tipo hélice  $\alpha$  por sobre la lámina  $\beta$ , en concordancia con el análisis realizado anteriormente. Una medida de la precisión de la estimación realizada es la magnitud del error máximo estimado, que considera la suma total de las predicciones de error entre el valor experimental y el valor predicho de elipticidad de las estructuras hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$ . Por lo tanto, a mayor valor de este error, menor será la precisión de los resultados estimados (104). Un valor por sobre 0,32, tal y como lo reflejado en la Tabla 8, es un valor considerado alto, por lo que la estimación puede no ser precisa, sin embargo, con estos resultados se puede observar una tendencia de estructura general de los péptidos sintetizados.

Por otra parte, tal y como se observa en la Tabla 9, se confirma la estructura mayormente organizada al azar de los péptidos PEP, CAR y CLV, con un fragmento intermedio en común dentro de la secuencia orientadora a cardiomiocitos (VVTVRAL) que podría adoptar una conformación tipo lámina  $\beta$ ; además, en el caso de PEP, también

se puede observar una estructura lámina  $\beta$  cercano al extremo C-terminal (QVVV). En el caso del péptido SCR, se observa la presencia de estructura hélice  $\alpha$  en el segmento intermedio compuesto por los aminoácidos VARLTRL. Cabe destacar que este programa está validado como un método simple y rápido para la predicción de la estructura secundaria de péptidos y proteínas sólo a partir de la introducción de la secuencia de aminoácidos, utilizando algoritmos específicos y variables estadísticas demostrando ser unos de los programas con más alta precisión y correlación para 188 secuencias distintas en cuanto a la predicción de sus estructuras secundarias, en comparación con las reportadas en la base de datos del Archivo Europeo de Variaciones (EVA, del inglés *European Variation Archive*) (132,133).

La estructura secundaria de un péptido o proteína es un aspecto importante que se relaciona con la dinámica y la función de la misma (134). Cabe destacar que la estructura secundaria de un péptido y proteína se mantiene gracias a la presencia de interacciones intramoleculares, principalmente por puentes de hidrógeno entre el hidrógeno de la amida de un enlace peptídico y el oxígeno carbonílico de otro enlace peptídico. Estos enlaces también pueden establecerse con los distintos grupos funcionales presentes en la cadena lateral, que dependerá de cada aminoácido. En ese sentido, la adopción de una estructura secundaria definida puede estar influenciada por la tendencia intrínseca de cada aminoácido a adoptar una cierta conformación, la interacción entre las cadenas laterales de los aminoácidos de una misma secuencia, el volumen de dichas cadenas laterales e incluso, el pI de los aminoácidos y el pH con que se solubiliza el péptido para los experimentos (130,135). En ese sentido, la estructura secundaria es la base para que proteínas puedan adoptar una estructura más ordenada y compleja (estructura terciaria y, hasta, cuaternaria), siendo relevante para la generación de interacciones con las moléculas diana en el organismo, a través de la unión proteína-blanco (134,136). Asimismo, se ha reportado que algunas modificaciones en la estructura secundaria de proteínas están relacionadas con la aparición y desarrollo de algunas enfermedades, incluyendo las encefalopatías espongiiformes, amiloidosis y la enfermedad de células falciformes (137). Cabe destacar que una estructura secundaria aleatoria, desordenada u organizada al azar

de una proteína fue asociada con una baja viabilidad y una mayor toxicidad celular en comparación con estructuras más ordenadas; sin embargo, Tretyachenko y cols. han demostrado que muchas proteínas con una estructura secundaria mayoritariamente desordenada mostraron una menor propensión a la agregación y mayor tolerancia *in vivo*, pudiendo representar puntos de origen ventajosos para una mayor evolución hacia proteínas funcionales solubles, en comparación con secuencias con orden estructural (138). Por consiguiente, los distintos péptidos elaborados mostraron una estructura secundaria principalmente desordenada u organizada al azar, con ciertas regiones más ordenadas, pudiendo ser relevante e importante para ejercer las funciones para las cuales fueron diseñadas.

## **4.2 Síntesis y funcionalización de micelas de núcleo lipídico**

### **4.2.1 Síntesis de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo**

A través de la síntesis química a partir de los reactivos  $\beta$ -alanina, anhídrido maleico y  $\text{SOCl}_2$  se logró la obtención del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo. A nivel de espectro de ATR-FTIR (Figura 11), la señal (*a*) identificada puede corresponder al estiramiento asociado al doble enlace entre los átomos de carbono y oxígeno de los grupos carbonilos presentes en el anillo succinimida. Por otra parte, la señal (*b*) podría estar asociada con el estiramiento entre los átomos de carbono y oxígeno del grupo carbonilo asociado al cloruro de ácido. En ese sentido, el desplazamiento diferencial en la frecuencia de la señal del grupo carbonilo del cloruro de ácido de los grupos carbonilos asociados al núcleo de succinimida se debe a la electronegatividad del átomo cloro. Los átomos de halógeno son capaces de quitar densidad electrónica al carbonilo por efecto inductivo atractor, convirtiendo el enlace  $\sigma$  del carbonilo en uno mucho más polar con una carga positiva parcial (116). Las señales (*c*) y (*d*) identificadas pueden ser relacionadas con las vibraciones del enlace carbono  $\text{sp}^3$  e hidrógeno de los grupos metilenos presentes en la cadena alifática hidrocarbonada del cloruro de ácido y al estiramiento del enlace entre los átomos de carbono y cloro del anillo succinimida, respectivamente.

De acuerdo con los resultados de  $^1\text{H-NMR}$  del cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo (Figura 12), la señal (*a*) que integra para un protón está relacionada al único protón del carbono quiral de la molécula y se encuentra a campo alto producto del efecto de la electronegatividad del átomo de cloro. La señal (*b*), que integra para dos protones, se asocia con los protones pertenecientes al grupo metileno de la cadena hidrocarbonada inmediatamente vecino al nitrógeno del anillo succinimida. Tanto las señales (*c*) y (*d*), que integran para 1 protón cada una, corresponden a los protones presentes en el carbono no quiral del grupo succinimida y que al encontrarse en la proximidad a un carbono quiral unido a un halógeno, las señales de dichos protones se tienden a separar de acuerdo con la orientación espacial que adoptaría en un momento determinado. Por último, la señal (*e*), que integra para dos protones, fue asignada a los protones presentes en el grupo metileno en posición  $\alpha$  al carbonilo del cloruro de ácido. Estos resultados obtenidos fueron similares a lo reportado para el mismo material obtenido por Ji y cols. (106). Por lo tanto, dados los resultados de ATR-FTIR y  $^1\text{H-NMR}$ , se puede confirmar que el producto sólido obtenido tras la reacción de síntesis entre  $\beta$ -alanina y anhídrido maleico corresponde al derivado succinimida, cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo, sirviendo como reactivo para la reacción de síntesis del lípido-maleimida.

#### 4.2.2 Síntesis de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida

La síntesis de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida implica la utilización de la reacción propuesta por Ji y cols. (106). Esta reacción se basa en la presencia del grupo hidroxilo libre que presenta la fracción de PEG que contiene Gelucire 44/14<sup>®</sup> con el halógeno del cloruro de ácido, en presencia de DMAP, como catalizador. Además, la adición de sustancias básicas como piridina y TEA permitiría la conversión del grupo succinimida a maleimida. De acuerdo con los espectros de ATR-FTIR (Figura 13), las señales (*a*) y (*b*) identificadas se pueden asociar con el estiramiento generado por el enlace entre los átomos de carbono e hidrógeno de la cadena hidrocarbonada del ácido graso del lípido, mientras que la señal (*c*) estaría principalmente relacionada con el estiramiento entre el átomo de carbono y oxígeno presente en los grupos alcoholes del glicerol sustituido y del fragmento

de PEG del polímero lipídico (139). Por lo tanto, todas estas bandas identificadas coinciden con la identificación de Gelucire 44/14<sup>®</sup>, describiéndose como una mezcla de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de ácidos grasos, glicerol y PEG (30), y que estarían presentes también en el producto deseado Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida. Los cambios esperados que no fueron observados, siendo características diferenciales entre el material de partida y el producto final, fueron la aparición en el espectro del sólido obtenido de una banda de mediana intensidad asociada con las vibraciones del enlace carbono  $sp^2$  e hidrógeno del núcleo maleimida, a una frecuencia de 3020 a 3100  $cm^{-1}$ , y una banda asociada al estiramiento del enlace  $\sigma$  entre los dos carbonos  $sp^2$  de la maleimida entre 1640 a 1680  $cm^{-1}$ . Estos resultados fueron confirmados con los resultados de los espectros de  $H^1$ -NMR (Figura 14), los difractogramas de XRC (Figura 15A) y calorigramas de DSC (Figura 15B). En ese sentido, la característica diferencial que se podría haber observado en el espectro de  $H^1$ -NMR de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida es la aparición de una señal característica a campo alto, tal y como lo reportado por Ji y cols. ( $\delta$  6,89 ppm) (106), integrando para dos protones correspondientes a los carbonos simétricos del grupo maleimida, formado por la eliminación de HCl del derivado succinimida. En el caso de los calorigramas, pese a que se mostraron diferencias en el punto de fusión de Gelucire 44/14<sup>®</sup> previo y posterior a la reacción de conjugación, estos resultados no serían suficientes para indicar que sí existen diferencias estructurales entre ambos sólidos.

La baja recuperación de sólidos tras la reacción de conjugación entre Gelucire 44/14<sup>®</sup> y el cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo para la obtención de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida, puede deberse a la baja eficiencia en el proceso de separación de ambos productos, en donde el lípido conjugado podría haberse arrastrado en los lavados. Además, la incapacidad de determinar diferencias en la estructura química entre el material de partida y el producto obtenido podría estar relacionado con dos posibles causas: el rendimiento de la reacción fue efectivamente bajo dado por la cantidad de cloruro de 3-cloro-2,5-dioxo-1-pirrolidinpropanoilo usada en relación al lípido y, por tanto, los métodos de caracterización propuestos no fueron lo suficientemente sensibles para



distinguir el material funcionalizado del no funcionalizado; o bien, la reacción de conjugación se ve estéricamente dificultada, en donde el grupo hidroxilo del PEG presente en la matriz lipídica se ve espacialmente impedido, dada su composición, haciendo que este grupo no reaccione de forma óptima con el derivado succinimida. Independiente de la causa de la baja recuperación y en vista de estos resultados, se procedió a diseñar el lípido-maleimida deseado SP-Mal (Figura 8) para ser enviado a una empresa externa para su síntesis y adquisición. Este lípido personalizado tiene la característica de presentar en su estructura un ácido esteárico simulando la parte lipídica de Gelucire 44/14<sup>®</sup> y su longitud espacial, un segmento interno de PEG con un MW de 1.500 Da idéntico al reportado para el polímero lipídico, y un extremo propanamida conjugado con el grupo maleimida, siendo este último grupo, importante para la reacción de funcionalización con los péptidos deseados a través de la estrategia química maleimida-tiol.

#### **4.2.3 Funcionalización del lípido con péptido**

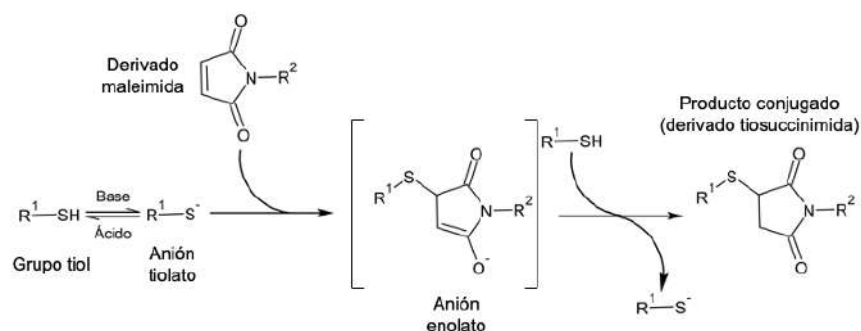
La utilización del lípido comercial adquirido SP-Mal para la funcionalización con el péptido surgió de la problemática en la síntesis de Gelucire 44/14<sup>®</sup>-maleimida. Todos los lípidos funcionalizados con los péptidos obtuvieron un porcentaje de funcionalización entorno o superior al 95% con un porcentaje de recuperación cercano al 90% (Tabla 10), siendo, por tanto, reacciones altamente óptimas. Con respecto a la identificación del producto obtenido del ensayo preliminar de funcionalización entre el lípido SP-Mal y el péptido *D*-PEP, los espectros ATR-FTIR (Figura 16) mostraron señales características. En ese sentido, la señal (*a*), común para todos los compuestos evaluados, fue asociada con el estiramiento entre los átomos de carbono y oxígeno del grupo carbonilo de tipo éster presente en la unión entre el ácido graso y PEG del fragmento lipídico y los carbonilos de tipo amida de los enlaces peptídicos. Las señales (*b*) y (*c*) presentes en los lípidos previo y posterior a la funcionalización se relacionan con el estiramiento del enlace entre el carbono y oxígeno alcoxilo del éster y del enlace entre el carbono y nitrógeno del grupo maleimida, respectivamente (116). A nivel del lípido SP-Mal no funcionalizado, las cuatro bandas identificadas (señal (*d*)) corresponden a la vibración y estiramiento del enlace  $\pi$  entre los átomos de carbono  $sp^2$  de la maleimida, que desaparecen tras la funcionalización

en el lípido funcionalizado SP-Mal-*D*-PEP, en conjunto con la aparición de la señal (*e*), característica del estiramiento del enlace entre el carbono  $sp^2$  carbonílico y  $sp^3$  de la maleimida tras la reacción de funcionalización. La señal (*f*) del péptido *D*-PEP previo al tratamiento con DTT se asocia al estiramiento del enlace entre átomos de azufre que forman puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de dos moléculas de péptido, que desaparecen en el lípido funcionalizado y se asocian con la aparición de la señal (*g*), relacionada con el estiramiento y vibración del enlace entre el carbono de la maleimida y el azufre del residuo de cisteína del péptido (116). A raíz de ello, se puede afirmar que la reacción de funcionalización ha sido exitosa para la obtención de SP-Mal-*D*-PEP.

Por otra parte, los espectros (Figura 17) obtenidos tras la funcionalización del lípido SP-Mal con los péptidos de interés PEP, CAR y CLV indicaron señales características similares a los obtenidos con el péptido *D*-PEP. La señal (*b*) presente en todos los lípidos funcionalizados se asoció con el estiramiento del enlace entre el carbono  $sp^2$  carbonílico y  $sp^3$  de la maleimida, mientras que la señal (*c*) es característica del estiramiento y vibración del enlace entre el carbono de la maleimida y el azufre del residuo de cisteína presente en cada uno de los péptidos. Asimismo, también se observaron la desaparición de las señales características del lípido SP-Mal, específicamente con la vibración y estiramiento del enlace  $\pi$  entre los átomos de carbono  $sp^2$  de la maleimida (señal (*a*)). Con estas señales, se logró determinar la funcionalización correcta entre los péptidos y el lípido SP-Mal.

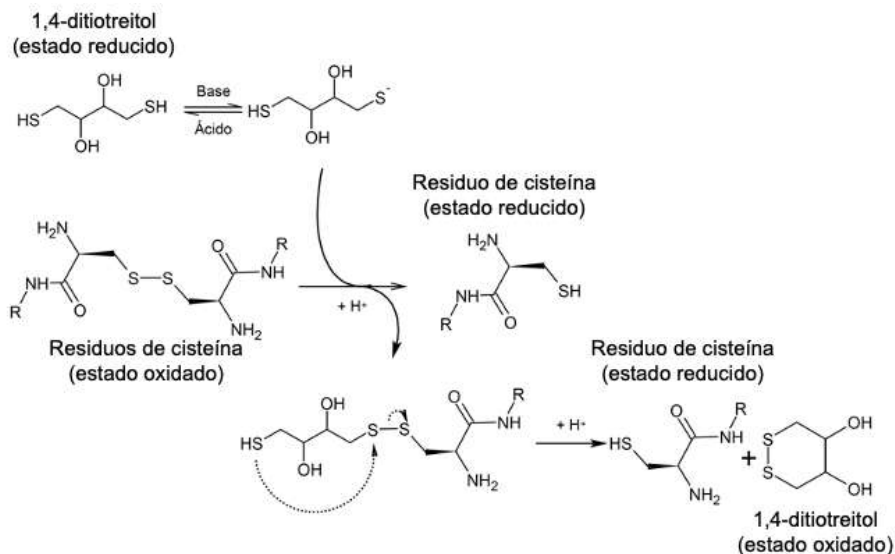
Cabe destacar que la estrategia química de funcionalización utilizando un grupo maleimida y un grupo tiol (por ejemplo, disponible en la cadena lateral del aminoácido cisteína), es una reacción ampliamente descrita y utilizada. La reacción maleimida-tiol se basa en una reacción de adición de Michael, que tiene como característica la adición de un grupo nucleofílico a un compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado de característica electrofílica (140). El grupo maleimida presenta una insaturación en posición  $\alpha$  a los dos grupos carbonilos que tienen características electroattractores, volviendo este doble enlace en uno mucho más electrofílico y, por tanto, más susceptible al ataque de un nucleófilo, en este caso, el grupo tiol (141,142). Tal y como se observa en la Figura 31, este grupo

tiol, específicamente en su forma de anión tiolato, es capaz atacar el enlace  $\pi$  del doble enlace electrofílico, formando un intermediario de tipo enolato. Este anión enolato es el responsable de desprotonar otro grupo tiol y generar el producto deseado, un derivado de tipo tiosuccinimida, además de un anión tiolato como subproducto (141). A raíz de la reactividad y facilidad de conjugación de estos grupos, es que este tipo de reacción sirve para la síntesis y conjugación de macromoléculas, incluyendo péptidos, proteínas, anticuerpos y oligonucleótidos, y moléculas fluorescentes como biosensores (143–145). Además, ha concitado el interés para la funcionalización de distintas moléculas sobre la superficie de nuevos materiales, incluyendo nanopartículas. Lu y cols. demostraron la factibilidad de conjugar un anticuerpo que reconoce los receptores del factor de crecimiento de hepatocito c-Met, ampliamente sobreexpresados en el cáncer de pulmón, sobre la superficie de liposomas a través de la incorporación de un lípido modificado con PEG y maleimida, generando que estos sistemas sean eficientemente entregados en el pulmón y permitir que el fármaco antineoplásico doxorubicina, contenido en estos liposomas, ejerza su acción citotóxica (146). Además, se ha logrado optimizar el proceso de funcionalización de nanopartículas poliméricas basadas en el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, del inglés *poly(lactic-co-glycolic acid)*) con la secuencia peptídica cíclica cRGDfK y la molécula 11A4, que reconoce los receptores de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y HER-2, respectivamente, ampliamente sobreexpresados en cáncer de mama (147). Recientemente, Lee y cols. lograron aprovechar la reactividad del grupo maleimida con los tioles y pudieron desarrollar nanopartículas de oro modificadas con grupos maleimidados como plataforma para la conjugación con distintas moléculas para controlar las interacciones celulares en distintos modelos de cáncer *in vitro* (148).



**Figura 31.** Esquema de la reacción maleimida-tiol. Adaptado de Northrop y cols. (141).

Por lo tanto, una etapa importante para la formación del producto conjugado es la presencia del grupo tiol libre (estado reducido), permitiendo la generación del anión tiolato. A nivel de los péptidos utilizados para la funcionalización, este grupo tiol se encuentra disponible específicamente en la cadena lateral del residuo de cisteína, ubicado en el extremo *N*-terminal de todas las secuencias. Tal y como se demuestra en el espectro ATR-FTIR (Figura 16), se pueden observar que estos grupos tioles se encuentran formando puentes disulfuros (estado oxidado) entre dos moléculas de péptido, por lo que no podrían reaccionar con el grupo electrofílico de la maleimida. A raíz de ello, previo a la reacción de funcionalización se requirió del uso de un agente reductor, el DTT, para la regeneración de los grupos tioles libres. El DTT, también conocido como el reactivo de Cleland, es un agente reductor potente de estructura pequeña capaz de reducir puentes disulfuros en una reacción de dos pasos, generando por una parte los grupos tioles libres y DTT en su estado oxidado, tal y como se muestra en la Figura 32 (149). Una vez realizada esta reacción de reducción y para evitar la interferencia de DTT no oxidado en la funcionalización con la maleimida, el agente reductor debe ser removido a través de lavados con agua (108). Por lo tanto, dado estos resultados, la reacción de funcionalización entre el lípido personalizado y los péptidos de interés fue óptima, permitiendo la generación del derivado posteriormente utilizado en la síntesis de LCMs, logrando una tasa de recuperación de sólidos cercano al 90% y un porcentaje de funcionalización mayor a 95%, e incluso, a 99%, gracias a la reactividad del grupo electrofílico de la maleimida con el grupo nucleofílico tiol del aminoácido cisteína, reducido previamente con DTT.



**Figura 32.** Esquema de reacción de reducción de grupos tioles. Adaptado de Bhasin y cols. (149).

#### 4.2.4 Síntesis y caracterización fisicoquímica de micelas de núcleo lipídico

Tras la funcionalización del lípido SP-Mal con los péptidos de interés y la elaboración de LCMs con este producto, se obtuvieron sus características fisicoquímicas en términos de HD, PdI y ZP (Tabla 11). En relación con el HD y PdI, los resultados obtenidos son comparables a los valores reportados en estudios previos elaborando estos mismos sistemas sin grupos funcionalizados en su superficie y asociados con nifedipino (HD =  $11,5 \pm 2,0$  nm y PdI =  $0,228 \pm 0,024$ ) (150) e insulina (HD =  $16,6 \pm 1,0$  nm y PdI =  $0,202 \pm 0,049$ ) (31). Cabe destacar que no existen antecedentes respecto de estos mismos vehículos funcionalizados con péptidos, pero sí con otras moléculas como aptámeros, en donde se lograron obtener micelas con HD de  $18,0 \pm 1,6$  nm y PdI de  $0,250 \pm 0,031$  (32). Pese a existir diferencias estadísticamente significativas entre valores de HD y PdI entre algunas muestras obtenidas, es esperable que estas diferencias no generen un impacto relevante en términos de permeación a través de mucosas e internalización celular. En ese sentido, un tamaño de partícula más pequeño es una característica relevante y deseable para mejorar el efecto biológico de las nanopartículas, incluyendo procesos de permeación a través de barreras celulares, velocidad y mecanismo de internalización celular, disminución de la captura por células del sistema retículo endotelial y, por tanto, aumento en la vida media de circulación de las nanopartículas (13,14,151). Con los valores

obtenidos de HD, tamaño de partícula y PDI se demuestra que la técnica de emulsificación en caliente de baja energía fue capaz de generar nanopartículas lipídicas esféricas de pequeño tamaño y homogéneas. En ese sentido, esta técnica de elaboración, a diferencia de métodos convencionales de síntesis de nanopartículas lipídicas, tales como la homogenización de alta cizalla, en caliente de alta presión o en frío de alta presión, muestra una mayor eficacia en la obtención de partículas homogéneas de pequeño tamaño, con un menor consumo de energía y tiempo (152).

En términos de valores de ZP (Tabla 11), se observaron valores significativamente menos negativos para las LCMs no funcionalizadas y asociadas con Rho en comparación con partículas no asociadas con la molécula. En ese sentido y tal y como se muestra en la Figura 5, la Rho presenta un núcleo xanteno sustituido con un grupo benzoato, de características lipofílicas, permitiendo que genere interacciones hidrofóbicas con el núcleo lipídico de las micelas, y posicionando los grupos polares catiónicos amina e iminio en la parte más externa LCMs e interaccionando electrostáticamente con los grupos hidroxilos libres de características aniónicas del fragmento de PEG de Gelucire 44/14®. Precisamente, son estos grupos hidroxilos libres del lípido los responsables de que las LCMs vacías y no funcionalizadas presenten valores de ZP más negativos que aquellas asociadas con Rho, debido a que corresponden a grupos ácidos débiles. Por otra parte, las LCMs con el lípido funcionalizado con los péptidos de interés mostraron valores positivos de ZP y esto se debe principalmente a la presencia de los distintos péptidos en su superficie. Cabe destacar que todos los péptidos utilizados presentan pI teóricos de 8,25, obtenidos a partir de su secuencia de aminoácidos y analizados a través de una herramienta predictiva disponible en línea y en forma gratuita (101). Por lo tanto, estos péptidos presentan carga positiva a valores de pH menores a su pI, tal y como sucede en el medio acuoso de síntesis de LCMs; estas cargas positivas están asociadas al grupo guanidino de la cadena lateral del aminoácido básico arginina, que son capaces de interaccionar con los grupos hidroxilos libres del lípido presente en la parte más externa de las micelas, a través de interacciones electrostáticas, que justamente causan un aumento en los valores de ZP, hasta valores neutros a positivos, tales y como los observados.

Estos valores ligeramente negativos y neutros a ligeramente positivos observados para las distintas LCMs elaboradas podrían relacionarse con una mayor inestabilidad de estos sistemas coloidales en suspensión. La influencia del ZP sobre la estabilidad se discutirá en la siguiente sección; sin embargo, en forma breve, se puede decir que este parámetro se relaciona con el potencial eléctrico de la superficie de las partículas, que dependerá netamente de su composición (153). Para ello, se ha visto que valores absolutos de ZP mayores a 30 mV podrían aumentar la estabilidad de estos sistemas coloidales, evitando que las partículas colisionen y se agreguen (153,154). Por otra parte, valores absolutos de ZP bajo los 30 mV podrían presentar distintos beneficios. En ese sentido, se ha reportado que sistemas que presenten valores de ZP en torno a valores neutros muestran ventajas en comparación con partículas fuertemente positivas, ya que evita la adsorción de proteínas plasmáticas negativas y el consiguiente reconocimiento y captura por parte de macrófagos, extendiendo, por tanto, la vida media de circulación (155). Por otra parte, se sabe que sistemas con carga fuertemente negativa son capaces de unirse a sitios catiónicos específicos de receptores superficiales de los macrófagos y, por tanto, ser reconocidos e internalizados por estas células (156). Con estos resultados, por consiguiente, se demuestra la correcta incorporación del lípido funcionalizado con los péptidos de interés en las LCMs y que estos péptidos están orientados hacia la parte más externa de estos sistemas, en contacto con el medio acuoso, permitiendo que interaccionen con los sitios de interés para los cuales fueron diseñados.

En términos de EE (Tabla 11), todas las micelas elaboradas presentaron una asociación promedio de rodamina mayor al 80%. Tal y como lo discutido anteriormente, la Rho es capaz de interactuar con el núcleo lipídico de las LCMs debido al anillo hidrofóbico xanteno sustituido. Aunque presenten diferencias estadísticamente significativas entre las distintas LCMs elaboradas, los valores de EE son similares a los reportados para nanopartículas basadas en plásmidos de DNA obtenidos por coprecipitación (74 a 81%) (157); mientras que son menores en comparación con nanopartículas biodegradables de albúmina conjugadas superficialmente con ácido gadolinio dietilentriaminopentacético (95,1%) (158), debido a que este último compuesto

presenta características ácidas más fuertes que los hidroxilos libres del PEG de Gelucire 44/14<sup>®</sup>, permitiendo que los grupos polares de la Rho interactúen con mayor afinidad y fuerza con las cargas negativas de las nanopartículas de albúmina conjugadas. Por otra parte, los valores de DL para las distintas LCMs fluctuaron entre 20,4 a  $25,5 \times 10^{-3}$  %. Dado que el objetivo del presente estudio fue la formulación de LCMs funcionalizadas con péptidos de interés, es que la pequeña cantidad añadida de Rho se utilizó como molécula trazadora y como prueba de concepto para la generación de estos sistemas, teniendo en cuenta que la respuesta en fluorescencia para los siguientes experimentos se puede lograr con cantidades pequeñas de este fluoróforo. Por lo tanto, con los presentes resultados se puede demostrar que el lípido funcionalizado con los péptidos de interés fueron óptimamente incorporados en las LCMs elaboradas a través de la técnica de emulsificación en caliente de baja energía, manteniendo las características de tamaño de partícula y distribución de tamaño óptimos, sugiriendo una alta capacidad de asociación con moléculas de baja solubilidad acuosa de clase 2 en su núcleo lipídico que podría ser visualizado, en la práctica, con la asociación de principios activos, convirtiéndolos en potenciales sistemas de transporte para estas moléculas hacia órganos y células de interés. Como una prueba adicional, se recomienda la evaluación de la estructura secundaria de los péptidos funcionalizados sobre la superficie de las LCMs, a través de la técnica de espectroscopía de dicroísmo circular, con el fin de determinar posibles variaciones en la estructura secundaria de estos péptidos tras el proceso de funcionalización y formación de las nanopartículas, que podrían generar un impacto en la actividad y función para lo cual fueron diseñados.

#### **4.2.5 Perfil de estabilidad de micelas de núcleo lipídico**

Los resultados del estudio de estabilidad de las LCMs no funcionalizadas con el péptido (Figura 19) evidencian la estabilidad cinética o coloidal de las LCMs. Este parámetro describe el comportamiento de partículas suspendidas en medio acuoso a lo largo del tiempo, influenciado por la dinámica entre las partículas individuales y la relación con su entorno acuoso (159,160). Una característica importante que contribuye a la estabilidad cinética de un sistema coloidal es la carga superficial, reflejada en los valores



de ZP. En ese sentido, idealmente se deben alcanzar y mantener valores absolutos superiores a 30 mV (es decir,  $ZP \leq -30 \text{ mV}$  o  $\geq 30 \text{ mV}$ ), para asegurar la obtención y conservación de una suspensión estable en el tiempo, en lo que se conoce como estabilidad electrostática (161). Esta estabilidad electrostática, tal y como se describió anteriormente, se basa en que con valores absolutos superiores a 30 mV en las partículas se manifiestan fuerzas predominantemente repulsivas entre ellas, disminuyendo la probabilidad de colisión y, por tanto, la formación de agregados (153,154). Pese a ello, tal y como se puede observar en la Figura 21, las micelas se mantienen relativamente estables, sin aumentos significativos en el HD ni Pdl por al menos las primeras 6 h, debiéndose principalmente al efecto de la estabilidad estérica. Esta estabilidad estérica se relaciona con la presencia de polímeros hidrofílicos de alto peso molecular en la superficie de las partículas, permitiendo generar una barrera estérica por extensión y proyección de su estructura en el medio dispersante (162,163). En el caso específico de las LCMs sintetizadas, Gelucire 44/14<sup>®</sup> presenta en su estructura PEG lo que podría contribuir a mantener la estabilidad en el rango de tiempo observado para estos sistemas.

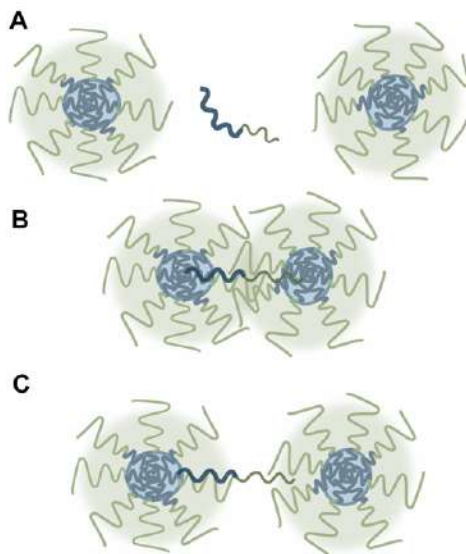
Por otra parte, los sistemas micelares están constantemente expuestos a cambios bruscos y agudos de su entorno. Así, tras la formación de las LCMs, las cadenas poliméricas permanecen dinámicas, es decir, se encuentran siempre en transición y en equilibrio entre los sistemas particulados y los suspendidos en el medio en forma monomérica (159). En ese sentido, otro factor importante que podría influir en la estabilidad cinética de estos sistemas es la temperatura de almacenamiento. Dependiendo de la matriz polimérica como del principio activo contenido en el sistema de vehiculización, una temperatura de almacenamiento más alta podría inducir a la degradación o ruptura de estos constituyentes, generando sistemas menos estables (164). Además, una mayor temperatura incidiría en un aumento en la energía cinética en las partículas suspendidas, por sobre la energía potencial, favoreciendo el movimiento de estas y, por tanto, mayor probabilidad de colisión entre ellas, generando la aparición de agregados (floculación) e incluso la separación de las fases, en donde el material suspendido puede precipitar, dominando las fuerzas gravitacionales por sobre las fuerzas

de difusión o brownianas, claves para mantener la estabilidad de estos sistemas coloidales (165). Asimismo, Silva y Grigera reportaron que las micelas de dodecilsulfato de sodio pueden formar agregados tanto a temperaturas muy altas como muy bajas (0 y -20 °C), este último caso debido a que la entropía del sistema no se ve incrementada, por lo que la formación de interacciones hidrofóbicas que permitan la reorganización en estructuras más pequeñas y estables no se ve favorecida y, por tanto, impactaría con una disminución en la estabilidad de estos sistemas (166).

Además, otro factor que podría estar afectando a la estabilidad de las LCMs elaboradas tiene relación con la hidrofobicidad del polímero lipídico usado. Se ha reportado que cadenas hidrofóbicas más largas contribuyen a una mayor estabilidad de los sistemas micelares, por aumento en la cohesión de los monómeros por interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals (167). En ese sentido, las cadenas que forman el núcleo lipídico de las LCMs de Gelucire 44/14<sup>®</sup> son básicamente derivados del ácido láurico, un ácido graso saturado de cadena media con 12 carbonos de extensión, por lo que podría no ser lo suficientemente hidrofóbico para mantener cohesionado el núcleo lipídico, en comparación con otros polímeros lipídicos que contienen ácidos grasos de mayor extensión.

En base a lo anteriormente discutido, la inestabilidad cinética en sistemas micelares puede describirse en base a tres mecanismos (Figura 33) (159):

- a) Inserción/expulsión de monómeros: las cadenas que forman el núcleo hidrofóbico de las micelas pueden sufrir la expulsión de un monómero de una micela y la inserción de este en otra (Figura 33A).
- b) Fusión: las micelas pueden fusionarse temporalmente, donde ambos núcleos lipídicos entran en contacto, favoreciendo la transferencia de unidades monoméricas entre ellas (Figura 33B).
- c) Extensión: las cadenas monoméricas pueden expulsarse parcialmente del núcleo hidrofóbico y unirse a un sistema micelar cercano, conectando ambas partículas mediante este “puente monomérico” sin lograr la completa fusión de los núcleos (Figura 33C).



**Figura 33.** Mecanismos de inestabilidad en sistemas micelares: (A) inserción/expulsión de monómeros, (B) fusión, y (C) extensión (159).

Por lo tanto, con estos resultados se puede evidenciar un incremento en el tamaño de las micelas en suspensión sin cambios significativos en el ZP, sugiriendo la aparición de agregados en el tiempo principalmente a 37 °C y, en menor medida, a 4 °C, pudiendo deberse a un fenómeno asociado con los tres mecanismos de inestabilidad discutidos (inserción/expulsión de monómeros, fusión y extensión), ya sea en forma independiente o sinérgica.

Los cambios vistos en los valores de ZP de las LCMs funcionalizadas con el péptido en su superficie (Figura 20) podrían relacionarse con la inestabilidad propia del péptido como del lípido funcionalizado con el péptido. En el primer caso, es ampliamente conocido que los péptidos y proteínas son susceptibles a sufrir cambios en sus estructuras secundarias, terciarias e incluso cuaternarias, en un proceso denominado como desnaturalización, gatillado por enzimas, pH o temperatura, generando impacto a nivel de la actividad y función de estas macromoléculas (130,168). Graff y cols. determinaron el efecto de la temperatura en el grado de desnaturalización de la estructura secundaria de la secuencia W(EAAAR)<sub>n</sub>A, donde *n* es la repetición del motivo EAAAR con estructura secundaria de tipo hélice  $\alpha$  ( $n = 1, 3, 5$  o  $7$ ), a través de un análisis por FTIR de dos dimensiones. Los resultados mostraron una pérdida significativa de la estructura

secundaria del motivo EAAAR, a medida que aumenta la temperatura y en forma transversal, independiente de la cantidad de repeticiones en la secuencia final (169). Específicamente, la desnaturalización inducida por temperatura afecta las interacciones no covalentes más débiles de estas macromoléculas, tales como los puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, manteniéndose prácticamente intactos los enlaces peptídicos (130). Por lo tanto, la exposición a temperaturas altas por un período largo de tiempo podría favorecer la pérdida de la estructura funcional de los péptidos de interés funcionalizados en las micelas. Por otra parte, se sabe que temperaturas bajas pueden generar desestabilización de interacciones de tipo hidrofóbicas presentes en los péptidos y proteínas, debido a que corresponden a enlaces con características endotérmicas (130), por lo que una disminución en la temperatura podría afectar a los residuos hidrofóbicos presentes en las secuencias peptídicas y proteicas, resultando en la pérdida de su estructura, estabilidad y, por tanto, funcionalidad. En ese sentido, se puede observar que las LCMs funcionalizadas con el péptido CAR presentan una menor estabilidad tanto a 4 °C como a 37 °C en comparación con las otras micelas funcionalizadas, pudiendo deberse a que al presentar una secuencia aminoacídica más corta que CLV y PEP y menor proporción de interacciones hidrofóbicas y no covalentes débiles serían más propensas a desestabilizarse en ambas condiciones.

Además, otro mecanismo posible de inestabilidad para las LCMs funcionalizadas sería lo explicado anteriormente para los sistemas no funcionalizados, en donde monómeros de la matriz lipídica podría sufrir inserción/expulsión, fusión y extensión. Una explicación alternativa fue la realizada por Utterström y cols. En su investigación, se demostró que vesículas unilamerales ricas en colesterol y conjugadas en su superficie con un polipéptido de 42 aminoácidos de longitud y carga positiva fueron inestables, perdiendo la integridad de la bicapa lipídica. Esto pudo deberse a la separación de los constituyentes lipídicos de la vesícula, favorecida por la presencia de interacciones electrostáticas con el péptido conjugado (170). En base a ello, las LCMs podrían sufrir un fenómeno de disrupción similar al observado en las vesículas unilamelares, e incluso podría ser que los monómeros lipídicos conjugados con el péptido sean expulsados desde

el sistema lipídico, tal y como lo planteado para las LCMs no funcionalizadas y, dado que están conjugados con una secuencia peptídica, estos monómeros finalmente no puedan ser incorporados en otra partícula, generando que a nivel del ZP se observe una reducción en su valor en el tiempo. Por lo tanto, con estos resultados se puede evidenciar un incremento en el tamaño de las micelas en suspensión con cambios significativos en los valores de ZP, sugiriendo la formación de agregados en el tiempo principalmente a 37 °C y, en menor medida, a 4 °C, y a la separación de fases y expulsión del lípido funcionalizado con el péptido de las LCMs.

Con respecto al perfil de estabilidad de todas las LCMs elaboradas y expuestas a una rampa de temperatura como prueba de estrés para estos sistemas (Figura 21), se obtuvo diferencias significativas a nivel de HD, PdI y ZP a temperatura entre 45 y 50 °C. Tal y como lo expuesto anteriormente, estos cambios en las características fisicoquímicas de las micelas evaluadas podrían explicarse porque estos sistemas micelares pueden sufrir la aparición de agregados, separación de fases y expulsión de monómeros de lípidos, incluido el lípido funcionalizado con péptido inducidos por temperatura. De hecho, Gelucire 44/14<sup>®</sup> se caracteriza por presentar una temperatura de fusión de entre 42,5 a 47,5 °C (media de 44 °C) (30), por lo que se esperaría que estos sistemas sufran ruptura de su conformación micelar a temperaturas mayores a la temperatura de fusión, tal y como se aprecia con los valores de HD y PdI a 50 °C. Por lo tanto, con estos resultados se demuestra que las LCMs son estables a temperaturas menores a 40 °C, sin cambios significativos en sus parámetros fisicoquímicos medidos.

Un aspecto importante es la estabilidad de los sistemas coloidales en medios con distinta fuerza iónica. La presencia de sales en sistemas biológicos permite la mantención de la homeostasis. En ese sentido, las concentraciones intra y extracelulares de especies iónicas, tales como cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$ ) y aniones ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ ), pueden fluctuar entre 1 a 200 nM, dependiendo del organismo y del tejido. Por tanto, a tales concentraciones de sales pueden generar un impacto en la estabilidad de macromoléculas, incluyendo ácidos nucleicos y proteínas (171). Además, el desempeño de las nanopartículas en estos medios biológicos con altas concentraciones de sales debe ser

evaluado como una medición directa de su estabilidad. En ese sentido, las distintas concentraciones de sales pueden afectar significativamente en los valores de CMC, dependientes del polímero lipídico utilizado, y, por tanto, en la formación de estos mismos sistemas, impactando en su estabilidad coloidal (172–174). Por tanto, es recomendable poder determinar la estabilidad de las LCMs funcionalizadas con el péptido trifuncional ante distintas soluciones con distinta fuerza iónica, a través de la medición en los cambios de HD, PdI y ZP.

#### **4.2.6 Perfil de liberación *in vitro* de rodamina contenidas en micelas de núcleo lipídico**

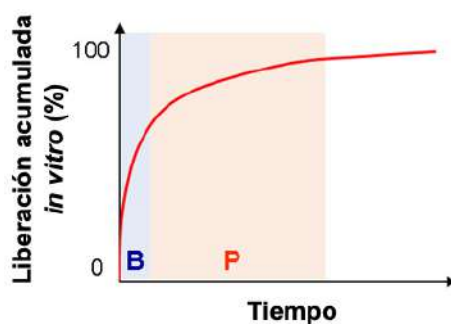
Con los resultados del ensayo preliminar de difusión *in vitro* de Rho libre y en solución a 37 °C y simulando un ambiente fisiológico con PBS pH 7,4 (Figura 22) permitió determinar la validación de la técnica de diálisis para la obtención del perfil de liberación de esta molécula contenida en las distintas micelas evaluadas. En este sentido, el perfil de difusión de rodamina 123 libre obtenido por Tosi y cols. (175) fue de aproximadamente 90% después de 1 h de experimento, en las mismas condiciones, lo que es relativamente mayor a lo obtenido en este estudio al mismo tiempo debido posiblemente a que dicho grupo reportó el uso de una membrana de diálisis con un MWCO mayor que el usado en el presente experimento. El MWCO se define como el promedio de masa molecular más pequeña de una molécula que no es capaz de difundir a través del poro de una membrana y es considerado como una característica de separación. En términos operacionales, el MWCO corresponde al peso molecular en el cual, al menos, un 90% de las partículas son retenidas por la membrana (176). Por tanto, la difusión de las moléculas con una masa molecular cercana al MWCO de la membrana sería más lenta en comparación con moléculas significativamente menores al MWCO, por lo que actuaría como una barrera difusional (176), siendo esta la posible explicación mecánica de la diferencia entre la difusión acumulada de Rho de este estudio con el de Tosi y cols.

Por otra parte, el método de diálisis a través de membranas semipermeables es una técnica ampliamente utilizada para los estudios de liberación *in vitro* de sustancias desde distintas formas farmacéuticas, incluidas nanopartículas, dada su versatilidad y

simplicidad. Se ha reportado distintas variantes de esta metodología: convencional (la sustancia de interés se encuentra dentro de una bolsa de diálisis y está en contacto con el medio externo, permitiendo su paso a través de los poros de la membrana), inversa (la sustancia de interés se ubica en el compartimento externo en donde la molécula liberada pasa hacia un compartimento interno separado por una membrana semipermeable), y lado a lado (tanto el compartimento donante como receptora contienen un mismo volumen de medio, separados por la membrana) (177). Independiente de la variante, hay que tener presente que la factibilidad de este método está condicionada a que la partícula de interés no interactúe con los componentes de la membrana y que el tiempo en que alcance el equilibrio del proceso de liberación no sea demasiado largo. Sin embargo, esta última limitante podría ser aprovechada como una herramienta discriminatoria para distinguir el comportamiento de las formas farmacéuticas de liberación rápida y modificada (177,178). Por lo tanto, con estos resultados se puede concluir que la Rho puede difundir libremente a través de la membrana semipermeable utilizada, alcanzando un equilibrio de difusión en forma rápida (desde 60 minutos) en torno al 80%, demostrando la factibilidad de la técnica para los ensayos de liberación de la sustancia desde las LCMs.

Tras la validación de la técnica de diálisis, se procedió a determinar el perfil de liberación de Rho a partir de las LCMs funcionalizadas con CLV y, como control, a partir de sistemas no funcionalizados (Figura 23). La liberación de Rho a partir de estos vehículos puede deberse a cambios fisicoquímicos en el estado del lípido inducido por temperatura, pasando desde estados de transición más compactos a otros más laxos y fluidos, favoreciendo, por tanto, la liberación de las moléculas contenidas en el núcleo lipídico de estas micelas (30). Por otra parte, las diferencias observadas en el porcentaje de liberación acumulada de Rho y la diferencia entre ambos perfiles de liberación, pueden deberse a un fenómeno de liberación rápida o explosiva (en inglés, *burst release*) observado en las LCMs funcionalizadas con CLV, en comparación con una liberación más lenta o sostenida a partir de micelas no funcionalizadas. Este fenómeno fue descrito por primera vez en algunos sistemas de liberación controlada, en donde se observaron una liberación abrupta y cuantiosa inicial en un período corto de tiempo antes de que la

velocidad de liberación alcance un perfil estable, siendo éste un proceso indeseable para estos sistemas, tal y como se muestra en la Figura 34, denominándose como un perfil de comportamiento bifásico (179,180). Se ha reportado que péptidos de carga positiva conjugados sobre la superficie de vesículas unilamerales ricas en colesterol favorecería la separación de la fase lipídica de estos sistemas, pudiendo deberse a que los residuos básicos del péptido interactuarían con los grupos polares negativos de la matriz lipídica. Estas interacciones generarían cambios en la estructura del péptido forzando a su inserción en la bicapa lipídica de las vesículas y la formación de estructuras similares a poros, lo que generaría una liberación rápida del contenido hacia el medio (170). En ese sentido, la observación de una liberación rápida inicial de Rho a partir de las LCMs funcionalizadas con CLV podría deberse a la presencia y características del péptido, que al presentar una carga positiva, podría interactuar con las cargas negativas asociadas a los grupos hidroxilos de Gelucire 44/14<sup>®</sup> y generar un fenómeno similar al descrito en las vesículas unilamelares de disrupción de la fase lipídica. La liberación explosiva inicial también ha sido reportada para nanopartículas de PLGA conjugadas con un péptido para dirigir estos vehículos al sistema nervioso central, utilizando como modelo, también la Rho, obteniéndose aproximadamente un 10%, 35% y 70% de liberación acumulada en 1, 32 y 72 h, respectivamente, manteniéndose estable hasta las 192 h (175). Por lo tanto, las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV podrían ser potenciales sistemas de liberación para aquellas moléculas de baja solubilidad acuosa que requieran alcanzar valores de concentraciones plasmáticas óptimas en un período corto de tiempo.



**Figura 34.** Perfil de comportamiento bifásico *in vitro*, con liberación explosiva inicial (B) hasta alcanzar el equilibrio de liberación (P). Adaptado de Yoo y Won (180).



Desde el punto de vista de la cinética de liberación de Rho, tal y como se observa en la Tabla 12, el modelo cinético que mejor se ajusta a ambos perfiles de liberación es el de Peppas-Sahlin. En este tipo de modelo, se considera que el proceso de liberación de una sustancia sigue un comportamiento anómalo, donde la difusión y relajación de las cadenas poliméricas del sistema pueden ser consideradas como procesos aditivos y sinérgicos (181). El proceso de difusión sigue un comportamiento gobernado por la ley de Fick, es decir, que el flujo de las partículas en un sistema está regido por la gradiente de concentración (182). Por otra parte, el proceso de relajación es un comportamiento no fickiano, en donde la penetración de moléculas de solvente al sistema polimérico causa su deformación e induce erosión, estrés e hinchazón de la matriz, el cual puede interactuar con el movimiento browniano de las moléculas contenidas y promover su liberación desde el sistema particulado hacia el medio (183–185). En ese sentido, el coeficiente  $m$  está definido como el exponente que se relaciona solamente con el proceso de difusión fickiana para un sistema polimérico de cualquier forma geométrica que muestra un comportamiento de liberación modificada y se puede relacionar con el coeficiente  $n$  del exponente de liberación para el modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (186). Cuando el valor de  $m$  y  $n$  coinciden ( $m = n$ ) se dice que el proceso de liberación está gobernado principalmente por un mecanismo de difusión, siendo la relajación minoritaria y hasta despreciable; mientras que una diferencia entre  $m$  y  $n$  ( $m \neq n$ ) indicaría que tanto el proceso de difusión y relajación serían los mecanismos relacionados con el proceso de liberación de una sustancia en una matriz polimérica (181,186,187). En ese sentido, tal y como se muestran en la Tabla 12, si se comparan los valores de  $m$  y  $n$  para ambos perfiles de liberación, se puede observar que los valores son más cercanos para las LCMs funcionalizadas ( $m = 0,45 \pm 0,00$  y  $n = 0,44 \pm 0,06$ ), determinando que el mecanismo específico que contribuye a la liberación de Rho es la difusión, explicados por los cambios en los estados de transición en los sistemas coloidales; mientras que para las LCMs no funcionalizadas ( $m = 0,45 \pm 0,00$  y  $n = 0,40 \pm 0,15$ ), el proceso de relajación podría contribuir, aunque en forma mínima, con la liberación de Rho, en conjunto con el mecanismo principal de difusión.

En nanopartículas poliméricas, incluidas las LCMs, el mecanismo de liberación de la molécula contenida puede relacionarse con las propiedades particulares de las mismas moléculas, del polímero, de la proporción y grado de interacción fisicoquímica de los componentes, y del proceso de elaboración (188). En ese sentido, el polímero lipídico Gelucire 44/14<sup>®</sup> puede actuar como un agente tensoactivo dispersable en agua, disminuyendo la tensión superficial entre las micelas y el medio dispersante acuoso. Esta disminución en la tensión superficial favorecería la disolución de moléculas de baja solubilidad acuosa (189). Además, tanto la transferencia y distribución interfacial del polímero puede afectar el proceso de disolución y liberación del principio activo hacia el medio, es decir, el tipo de componente de las nanopartículas determinaría la afinidad y, por tanto, la partición del principio activo entre los sistemas y la fase dispersante (190). Por lo tanto, las LCMs de núcleo lipídico constituidos por Gelucire 44/14<sup>®</sup> serían un potencial sistema de vehiculización de moléculas de baja solubilidad acuosa, en donde la conjugación en su superficie con péptidos de interés podría generar un impacto en el perfil de liberación, favoreciendo un aumento inicial y rápido de principio activo liberado, siendo útil en casos en donde se requieran alcanzar ciertos niveles plasmáticos de fármaco en un período corto de tiempo.

#### **4.3 Permeación bucal *ex vivo* de micelas de núcleo lipídico**

Los resultados obtenidos tras la determinación de la permeación *ex vivo* de las LCMs en mejillas de cerdo como modelo de epitelio bucal se reflejan en la Figura 24 y la Tabla 13. En ese sentido, se pudo observar que el péptido PEP fue capaz de aumentar la permeación de las LCMs y, por tanto, de Rho a través de la mucosa bucal, lo que se tradujo en una permeación acumulada mayor que las micelas no funcionalizadas y la Rho libre en solución, traduciéndose en valores significativamente más altos de  $J_{ss}$  y  $P_{app}$ . Cabe destacar que el  $J_{ss}$  se define como la cantidad de molécula capaz de moverse a través de una determinada superficie durante un período de tiempo, después de alcanzar el estado estacionario, mediante los fenómenos de migración o difusión, de acuerdo con la ley de Fick (191). Por consiguiente, mientras mayor sea el valor de  $J_{ss}$ , el movimiento de partículas de una zona a otra será mayor. Por otro lado, la  $P_{app}$  es un parámetro que permite

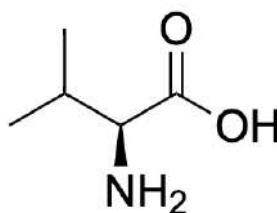
estimar la permeabilidad de una molécula, describiendo cómo las moléculas pueden fluir a través de una barrera. Por lo tanto, es una medida física que representa la velocidad de penetración que adquiere la molécula estudiada a través de una barrera y depende del tamaño, forma y distribución de las partículas en el medio o sistema (191–193).

Tal y como se describió anteriormente, el péptido PEP fue diseñado con 4 residuos de *L*-valina en el extremo *C*-terminal cuya racional fue el de potenciar la permeación de moléculas a través del epitelio bucal. El uso de este aminoácido como potenciador de la permeación se ha reportado principalmente para la administración transdérmica de principios activos, en donde se demostró un aumento significativo en la permeación de levonorgestrel coformulado en solución con este aminoácido, a través de un ensayo *in vitro* en un modelo de piel de ratón sin vellos, en comparación con el control e incluso con otros aminoácidos, tales como triptófano, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y glicina (53). Además, en el mismo estudio se pudo demostrar la permeación potenciada de este principio activo asociado con valina en un rango amplio de pH (2,4 a 9,6), teniendo la mayor eficacia, en términos de  $J_{ss}$ , a pH 5,9 (53), que se encuentra incluido dentro del rango de pH de la superficie de la piel (194). Un posible mecanismo que podría explicar estas observaciones es que el aminoácido *L*-valina podría desestabilizar la matriz lipídica intercelular de los corneocitos de la epidermis, aumentando la permeabilidad de sustancias a través de ella (54). Por otra parte, es de amplio conocimiento que el aminoácido *L*-valina es utilizado para el desarrollo de profármacos en forma de ésteres para potenciar la permeación a través de barreras biológicas, principalmente a nivel del tracto gastrointestinal, en comparación con ésteres de otros aminoácidos como glicina o glutamina, permitiendo que mediante enzimas estererasas se genere el metabolito activo como tal, aumentando sus concentraciones plasmáticas y, por tanto, su biodisponibilidad (195). Esta estrategia ha sido particularmente útil en la mejora de las características farmacocinéticas y, por tanto, farmacodinámicas de antivirales como el aciclovir, ganciclovir y ciclopropavir, a través de sus respectivos ésteres de valina, valaciclovir (196), valganciclovir (197) y valciclopropavir (198). Cabe destacar que hasta la fecha no se ha evidenciado el uso de *L*-valina como potenciadores de la permeación a nivel bucal, por lo

que la presente investigación sería pionera en demostrar el efecto potenciador de la permeación del péptido PEP con sus cuatro residuos de valina.

Pese a las diferencias histológicas entre el tejido transdérmico, el epitelio intestinal y la mucosa bucal, en todas se pueden observar ciertas limitaciones propias para la absorción de principios activos, tales como los descritos en la sección 1.3. Por lo tanto, una estrategia utilizada para poder potenciar la permeación de sustancias, específicamente a través del epitelio bucal, es aumentar el tiempo de contacto o de residencia entre el principio activo o la forma farmacéutica que lo contenga con la mucosa propiamente tal, mediante el proceso de adhesión (199). La adhesión se puede entender como un fenómeno que se observa entre dos sustratos o materiales, en donde son capaces de interactuar entre ellos cuando están en contacto y mantenerse juntos por un período de tiempo (200,201). Cuando uno de los sustratos corresponde a una superficie epitelial, es lo que generalmente se conoce como bioadhesión; mientras que, si fuera una capa mucosa, se conoce como mucoadhesión. Pese a esta sutil diferencia, generalmente ambos términos pueden ser utilizados en forma indistinta e intercambiables (201). La teoría de la bioadhesión o mucoadhesión se enmarca en tres procesos: el establecimiento del contacto entre el sistema y el sustrato biológico, la difusión del sistema en el entramado que conforma el sustrato, y la consolidación de la adhesión por formación de interacciones mecánicas y químicas interfaciales (199,200). Dentro de este último punto, las interacciones interfaciales están dadas principalmente por fuerzas intermoleculares entre los distintos componentes del sistema y sustrato, incluyendo las interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (200,201). En ese sentido, el aminoácido *L*-valina es estructuralmente considerado como un aminoácido no polar e hidrofóbico, dada la presencia de una cadena lateral de tipo isopropilo (Figura 35) (126). Con ello, los residuos de valina podrían formar interacciones hidrofóbicas con componentes de la mucosa bucal, favoreciendo la adhesión de las LCMs, aumentando el tiempo de residencia y, por tanto, promoverían la permeación a través del tejido (201). Específicamente, la superficie de las células que conforman el epitelio bucal están cubiertas por gránulos que recubren la membrana celular, compuestos principalmente por

lípidos polares, pero neutros, principalmente glucosilceramidas y colesterol, que se proyectan hacia el espacio intercelular como estructuras esféricas u ovals, con un diámetro de 100 a 300 nm (51,202). Estas estructuras intercelulares se encuentran organizadas en un estado más laxo y amorfo que mucosas queratinizadas de otras zonas de la cavidad oral (51). Con ello, estaría favorecida la formación de interacciones hidrofóbicas entre las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP, a través de los cuatro residuos de *L*-valina terminales, con estos lípidos neutros y poco organizados, promoviendo, por tanto, una mayor permeación, en comparación con las LCMs no funcionalizadas. Debido a estas interacciones y a la organización más laxa de lípidos del espacio intercelular, es que el mecanismo más probable de permeación de estas LCMs funcionalizadas es a través del transporte paracelular, por sobre el transporte intracelular o transcelular (51). Además, la formación de las interacciones hidrofóbicas entre los residuos de *L*-valina y los lípidos del epitelio bucal, favorecería un aumento en la concentración local de fármaco en este epitelio. Dada esta gradiente de concentración generada, es que la difusión de las partículas a través del epitelio bucal se vería favorecida en un proceso gobernado por la primera ley de Fick, en donde el exceso de partículas en el tejido actuaría como reservorio y permitiría mantener un flujo constante de las mismas por un período más prolongado, hasta que se alcance el equilibrio (203,204). Por lo tanto, el péptido PEP, específicamente sus 4 residuos terminales de *L*-valina, podría potenciar la permeación de Rho asociadas a las LCMs conjugadas a través de un mecanismo de interacción con los lípidos neutros de los espacios intercelulares, aumentando el tiempo de residencia y la gradiente de concentración de los sistemas en el epitelio y, con ello, favorecer el proceso de permeación bucal.



**Figura 35.** Estructura del aminoácido *L*-valina.

Por otra parte, tal y como se ve en la Figura 28, y pese a que las LCMs no funcionalizadas presentaron una menor tasa de permeación bucal acumulada en comparación con los sistemas funcionalizados con PEP, esta permeación fue significativamente mayor en comparación con Rho libre en solución. En este sentido, diversos factores relacionados con la constitución propia de las LCMs podrían contribuir al fenómeno observado. Uno de ellos, es el uso de ácidos grasos, que ha reportado la capacidad de potenciar la permeación de sustancias a través del epitelio bucal (50,205). Entre estos ácidos grasos, los ácidos grasos saturados cáprico y láurico (éste último forma parte de los componentes presentes en la matriz de Gelucire 44/14<sup>®</sup>) han demostrado presentar propiedades potenciadoras de la permeación y dependientes de la concentración utilizada (206). El mecanismo se basa en que estos ácidos grasos saturados, dado su lipofilia, son capaces de interactuar con los lípidos presentes en los espacios intercelulares del epitelio bucal, cambiando su estructura a una menos organizada y más laxa, y, por tanto, volviéndolo más permeable a sustancias (51,205–207). Además, se ha reportado que algunos tipos de tensoactivos también muestran efectos potenciadores de la permeación bucal. Entre estos tensoactivos, se pueden encontrar los polisorbatos, tales como Tween<sup>®</sup> 20 o Tween<sup>®</sup> 80 (51,208), siendo el primero uno de los componentes constituyentes de las LCMs elaboradas. El mecanismo de potenciación de la permeación de los tensoactivos se basa en su capacidad de solubilizar los lípidos intercelulares del epitelio bucal, perturbando su organización y, por tanto, favorecer el transporte paracelular de moléculas (51). Además, se ha descrito que cuando se utilizan concentraciones altas de tensoactivos (desde 1% de la formulación), estos son capaces de interactuar con lípidos y ciertos dominios proteicos presentes en la membrana celular de las células del epitelio bucal, favoreciendo su extracción y solubilización, lo que permitiría aumentar el transporte transcelular (51,52,209). En ese sentido, la composición de las LCMs conlleva el uso de dos tensoactivos distintos: Tween 20<sup>®</sup> y Span 80<sup>®</sup>, cuya cantidad total equivale a 16,7% del total de reactivos utilizados para la formulación de estas micelas, por lo que podría contribuir a un efecto solubilizante de lípidos y, aumentar el transporte de estos vehículos por vía transcelular. Asimismo, se ha descrito al PEG como un potenciador de

la permeación a través de la piel, ya que es capaz de alterar las propiedades de los lípidos intercelulares de los corneocitos, disminuyendo el efecto barrera de esta zona y, en consecuencia, potenciando la permeación a través del tejido (210). A pesar de la diferencia histológica entre la piel y la mucosa bucal, no se puede descartar que el PEG presente en la matriz lipídica de Gelucire 44/14<sup>®</sup> podría ejercer un efecto potenciador de la permeación mediante un mecanismo similar. Por lo tanto, las LCMs podría potenciar la permeación de moléculas de baja solubilidad acuosa a través del epitelio bucal, mediante el transporte paracelular, principalmente por la interacción de sus componentes, como ácidos grasos, la composición de tensoactivos y PEG, con los lípidos de los espacios intercelulares y la disrupción de este efecto barrera del propio epitelio. Este posible mecanismo no se limitaría sólo a las LCMs no funcionalizadas, ya que también podría contribuir a la potenciación en la permeación observada para las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP, pudiendo ser un mecanismo complementario y sinérgico al efecto de los residuos de *L*-valina.

A pesar de que las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP sí demuestran potenciar la permeación bucal de Rho en comparación con los controles, la permeación acumulada a 60 minutos no alcanzó el 2% del total. Esto puede deberse a las propiedades fisicoquímicas propias de las LCMs, tales como el tamaño y la carga superficial (211). En ese sentido, se ha demostrado que nanopartículas de poliestireno de 200 nm de tamaño y en suspensión lograron permear más profundamente tras 4 h, a través de la mucosa bucal porcina, que partículas de 20 nm de diámetro (212). Teubl y cols. obtuvieron resultados similares para nanopartículas similares de aproximadamente 200 nm y en suspensión, en comparación con partículas de 25 y 50 nm (213). Esto podría deberse a la presencia de ciertas estructuras porosas en la capa de mucus, denominadas bolsillos, en donde sólo son accesibles por partículas pequeñas menores a 100 nm, por lo que quedarían atrapadas e inmovilizadas en esta capa, evitando el avance y la permeación más profunda en el epitelio (213,214). Esta inmovilización de las partículas pequeñas en los bolsillos impacta significativamente en la velocidad de permeación de las nanopartículas de poliestireno de 25 y 50 nm y, en consecuencia, en la profundidad de permeación en el epitelio, en

comparación con las partículas de 200 nm, que son menos retenidas en estos bolsillos (213). Por otra parte, la carga superficial también podría influir en la permeación de nanopartículas a través del epitelio bucal. Roblegg y cols. demostraron que las nanopartículas de poliestireno modificadas con grupos amina y, por tanto, cargadas en forma positiva, de 200 nm lograron permear más profundamente por el epitelio bucal en comparación con las nanopartículas de poliestireno del mismo tamaño, pero modificadas con grupos ácidos y, por tanto, con carga negativa (212). Un resultado similar se obtuvo con la permeación sublingual de carvedilol transportado en nanocápsulas de Eudragit® RS100 con carga positiva en comparación con nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolatona) de carga negativa (215). Estos resultados pueden estar relacionados a la formación de interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de las nanopartículas con las cargas negativas de la mucina presentes en el mucus del epitelio bucal, tal y como se ha descrito en partículas que utilizan el quitosano, un polisacárido natural y de características catiónicas. Estas interacciones con las mucinas, por tanto, generaría un aumento en el tiempo de residencia de estos sistemas a través del fenómeno de mucoadhesión (51,212). En la misma línea, sistemas con cargas positivas más altas, generaría un aumento en la interacción con las mucinas y, por tanto, podría ser incluso desventajosa para la permeación, siendo estos sistemas ampliamente retenidos en el mucus, evitando su avance hacia el epitelio absorptivo (216). Por lo tanto, la baja permeación de las LCMs podría estar influenciada por estos parámetros, en donde las micelas podrían estar siendo retenidas en los bolsillos de mucus evitando que llegue a zonas más profundas del epitelio bucal dado su tamaño promedio de 15 nm. Además, una menor permeación de las LCMs no funcionalizadas respecto de las funcionalizadas también podría relacionarse a la diferencia entre los valores de ZP, en donde la presencia del péptido PEP permitiría que las LCMs adquieran una carga neutra a ligeramente positiva, siendo favorables para la generación de interacciones electrostáticas débiles con las mucinas y, por tanto, favorecer una mayor adhesión a la superficie de la mucosa, con bajo riesgo de retención prolongada en esta zona en comparación con partículas con cargas positivas más altas.



Una estrategia que podría ser utilizada para aumentar en mayor grado la permeación de las LCMs es el reemplazo del fragmento potenciador de la permeación propuesto por el presente estudio por otros péptidos que ya han sido descritos y han demostrado actuar como potenciadores de la permeación bucal, para diversas moléculas como insulina y calcitonina, incluyendo el tetrapéptido LMWP (217) y la penetratina (218), respectivamente. Por otra parte, las LCMs funcionalizadas con PEP podrían ser incluidas en formas farmacéuticas bucales mucoadhesivas. Las formas farmacéuticas mucoadhesivas se caracterizan por estar constituidas por polímeros que puedan interactuar con las mucinas, fijándolas directamente en la mucosa absorbente, aumentando el tiempo de residencia y, por tanto, el tiempo de contacto entre el sistema que contiene el principio activo con el epitelio bucal, favoreciendo la permeación a través de ella (201). Entre los distintos sistemas propuestos, las películas mucoadhesivas de hidroxipropilmetilcelulosa podrían ser útiles como posible solución para incrementar la permeación de estos sistemas. Estas películas mucoadhesivas lograron potenciar la permeación bucal de LCMs no funcionalizadas y cargadas con Rho e insulina, que fueron depositadas en la superficie de la película a través de la técnica de impresión por inyección de tinta, en comparación con LCMs en suspensión y las moléculas en solución (31). Otros polímeros mucoadhesivos que también podrían ser utilizados como material para la generación de películas de administración bucal y que permitan ser sustratos para la permeación de nanopartículas, son el Eudragit® RLPO (219) y quitosano (220), que se encuentran ampliamente descritas en revisiones bibliográficas (201,221).

Cabe destacar que la gran dispersión de los datos observados en los perfiles de permeación bucal puede deberse a la variabilidad intrínseca del modelo de permeación utilizado, específicamente, el modelo de permeación *ex vivo* con epitelio bucal de origen porcino. El epitelio bucal de origen porcino es una barrera no queratinizada, que presenta características histológicas y enzimáticas similares al epitelio bucal humano, a diferencia de los epitelios de ratas y ratones que son queratinizados, o los epitelios bucales de perros y primates, que no son queratinizados, pero presentan un menor grosor (202,222). Los ensayos de permeación bucal que utilicen mucosa de origen porcino deben ser meticulosos,

en donde el epitelio bucal debe ser cuidadosa y correctamente separado del tejido muscular y adiposo circundante. Además, estos epitelios deben ser transportados y conservados óptimamente en soluciones isotónicas con crioprotectores como azúcares o glicerol, y almacenados idealmente a -80 °C, para conservar la viabilidad y reducir al máximo la variabilidad (112,223). A pesar de controlar estas condiciones, se han obtenido coeficientes de variación de hasta un 100% en ensayos de permeación utilizando este modelo *ex vivo* de epitelio bucal (112,222). En base a esta alta variabilidad, se han planteado diversas alternativas, como estudios *in vitro* utilizando cultivos de células epiteliales bucales como la línea TR146, obtenidas a partir del carcinoma de células escamosas a nivel bucal, o de queratinocitos humanos bucales normales (EpiOral™). Ambos modelos han demostrado presentar menor variabilidad en los resultados, aunque su principal desventaja es que son modelos menos representativos de las condiciones fisiológicas normales (223). Por otra parte, los modelos *in vivo* son los modelos que presentan las condiciones más representativas del funcionamiento y mecanismo fisiológico de permeación bucal. Estos modelos *in vivo* consisten en la medición de permeación de una sustancia en sujetos, por lo que involucra aspectos éticos que son fundamentales. Una gran desventaja de estos modelos *in vivo* es la complejidad en el control de variables que podría afectar la correcta interpretación de los resultados de permeación, tales como la absorción de la sustancia administrada en otras zonas de la cavidad oral y la eliminación de esta a través del proceso de deglución (223). Por lo tanto, pese a la alta variabilidad en los resultados, que pueden ser contrarrestados con un aumento en el número de réplicas, el modelo *ex vivo* de mucosa bucal de origen porcino sigue siendo un modelo conveniente, factible y representativo para la determinación de la permeación de sustancias a través del epitelio bucal.

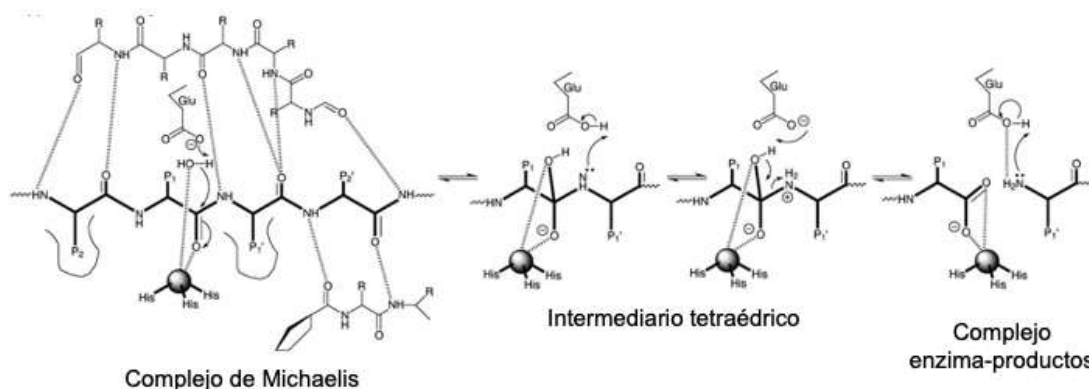
En síntesis, las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP demostraron lograr una mayor permeación acumulada de Rho, como modelo de principio activo de baja solubilidad acuosa, a través de un modelo *ex vivo* de epitelio bucal de origen porcino, en comparación con las LCMs no funcionalizadas y solución de Rho libre, como controles. Esto puede deberse a las interacciones hidrofóbicas generadas entre los residuos de L-

valina presentes en el fragmento potenciador de la permeación bucal dentro del péptido PEP propuesto y los lípidos de los espacios intercelulares de la mucosa. Además, como mecanismo sinérgico, la presencia de algunos constituyentes que forman parte de las LCMs podría contribuir a la permeación potenciada de Rho, tales como el ácido láurico, Tween<sup>®</sup> 20 y PEG. Sin embargo, dado estos hallazgos, la permeación acumulada a 60 minutos no supera el 2%, por lo que se podría proponer la inclusión de las LCMs funcionalizadas con PEP dentro de formas farmacéuticas que puedan contribuir a potenciar su permeación a través del epitelio absortivo bucal, tales como películas mucoadhesivas.

#### **4.4 Escisión *in vitro* de secuencia sensible a metaloproteinasa de la matriz-9**

Los resultados tras los ensayos de determinación de la concentración óptima de MMP-9 y la cinética de escisión *in vitro* de la secuencia sensible y bioactivable GPQGIAGQ, se muestran en las Figuras 25 y 26, respectivamente. Esta secuencia es específicamente sensible a la actividad endopeptidasa de la enzima MMP-9. Esto se basa en que el sitio activo y catalítico de la enzima tiene mayor preferencia y selectividad por aminoácidos con cadenas alquílicas laterales pequeñas, como G, A y S, en desmedro de aquellos aminoácidos con cadenas laterales alquílicas largas o aromáticas (224). En ese sentido, se ha establecido que la MMP-9 es capaz de catalizar la escisión del enlace peptídico entre los residuos de G e I de la secuencia GPQGIAGQ, guiado por la presencia del aminoácido A, generando el corte proteolítico y específico en dicho enlace peptídico, con la consecuente generación de dos fragmentos: GPQG y IAGQ (225,226). El mecanismo de escisión del enlace peptídico está esquematizado en la Figura 36. La catálisis mediada por MMP-9 requiere de una molécula de agua, como nucleófilo, formando un complejo con el sustrato, conocido como complejo de Michaelis. Primeramente, la molécula de agua interactúa con un residuo de glutamato presente en el dominio catalítico de la enzima, siendo capaz de extraer el protón del solvente; mientras que el átomo de oxígeno del agua interactúa con el átomo de zinc de la enzima a través de enlaces de coordinación. A su vez, el cofactor es necesario para potenciar las características electrofílicas del carbono carbonílico del enlace peptídico lábil. Tras la

extracción del protón del agua, el grupo hidroxilo remanente es capaz de atacar nucleofílicamente el carbono del grupo carbonilo del enlace peptídico lábil, formando un intermediario híbrido tetraédrico. Este intermediario tetraédrico está compuesto por el péptido y tres componentes de la enzima: el átomo de zinc, el residuo de ácido glutámico y el grupo sulfhidrido del residuo de cisteína en posición 92. Dada las características básicas del nitrógeno que forma el enlace peptídico, éste es capaz de sustraer el protón del ácido glutámico, formando un grupo amonio secundario y glutamato. Este glutamato es capaz de extraer un protón del intermediario, ocurriendo una reacción rápida de reordenamiento en donde se escinde el enlace peptídico y se genera los dos productos, unidos aún a la enzima. La separación final de estos productos ocurre a través de moléculas de agua del medio capaz de catalizar la liberación de estos, siendo esta etapa la limitante de toda la reacción de escisión (227–230). En base a estos resultados, se demuestra que la secuencia peptídica PEP, que presenta el fragmento intermedio GPQGIAGQ, mantendría la sensibilidad a la escisión *in vitro* mediada por MMP-9. Por tanto, dado el perfil de escisión obtenido a distintas concentraciones de MMP-9 y para la optimización en el uso de esta enzima en los ensayos posteriores, es que se fijó una concentración de trabajo óptimo de dicha enzima de 450 ng/mL con un porcentaje de escisión aproximadamente del 60%.



**Figura 36.** Esquema general del mecanismo de escisión catalizada por metaloproteinasas de la matriz.

Adaptado de Tallant y cols. (228).

Los resultados de cinética de escisión (Figura 26) demostraron que el péptido *D*-PEP alcanzaba un menor porcentaje de corte a partir de 12 h de incubación, en

comparación con la secuencia PEP. Esto podría deberse a que la actividad enzimática de la MMP-9 podría presentar estereoselectividad. En ese sentido y a nivel estereoquímico, todos los aminoácidos, a excepción de glicina, presentan al menos un carbono asimétrico o centro quiral, en donde los isómeros *L* conforman casi todos los péptidos y proteínas biológicamente activos; mientras que los isómeros *D* se pueden encontrar principalmente en la síntesis de péptidos pequeños relacionados con la pared celular bacteriana y algunos antibióticos (126). A diferencia de los *L*-aminoácidos, los isómeros *D* no suelen ser sustratos para enzimas humanas endógenas (231). Esto se debe a que el sitio activo y catalítico de las enzimas es asimétrico, es decir, es capaz de reconocer específicamente los isómeros *L*- por sobre los isómeros *D*- (estereoselectividad), generando que las reacciones catalizadas por estas enzimas sean estereoespecíficas y, por tanto, los péptidos y proteínas con isómeros *D* sean más resistentes a estas reacciones (126,231). En el estudio *in silico* de Aschi y cols., se demostró que el sitio catalítico de la MMP-8 mostró una mayor afinidad al enantiómero *R* del compuesto fosfonato de 1-(4'-metoxibifenil-4-sulfonilamino)-2-metilpropilo, administrado como un inhibidor de la actividad de la MMP-8, en comparación con su isómero *S* (232). Esta mayor afinidad del enantiómero *R* se tradujo en un mayor efecto inhibitorio de la MMP-8, en comparación con su isómero *S*. Esto se debe a que el enantiómero *R* fue capaz de inhibir la formación de un puente de hidrógeno entre el agua (como agente catalítico) y un grupo sulfonamida del sitio catalítico de la enzima, además de favorecer la generación de interacciones aromáticas-aromáticas entre el anillo bencénico del enantiómero *R* y la enzima, que no se observa con el enantiómero *S* (232). Cabe destacar que la formación de enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno o interacciones aromáticas-aromáticas entre el sustrato y una enzima para la formación del complejo sustrato-enzima genera la liberación de una pequeña cantidad de energía libre que provee un grado de estabilidad a este complejo, conocido como energía de unión. Esta energía de unión es la que contribuye a que una enzima sea específica por un sustrato, e incluso, por un isómero en particular, y, por tanto, gatillar la catálisis propiamente tal (233). En base a los resultados obtenidos, se puede observar que la enzima MMP-9 podría presentar una mayor selectividad y especificidad por el péptido

PEP, que contiene el fragmento sensible compuesto por *L*-aminoácidos, ya que es capaz de reconocerlo, generar el complejo enzima-sustrato y generar la catálisis del enlace peptídico entre los residuos de G e I. En contraparte, la enzima muestra una menor actividad catalítica hacia el péptido *D*-PEP, posiblemente por la menor capacidad del MMP-9 en reconocer y establecer enlaces con los isómeros *D*, y generar, por tanto, la energía de unión necesaria para la actividad catalítica, o incluso, generar un complejo enzima-sustrato más afín, enlenteciendo la etapa limitante de las reacciones catalíticas mediada por MMP-9, correspondiente a la separación de los productos tras la reacción, impidiendo que más moléculas puedan ser escindidas. Teniendo en consideración estos antecedentes y resultados, una posibilidad es determinar la escisión de otro péptido íntegro similar a PEP, que contenga una secuencia *scrambled* del fragmento sensible a la actividad por MMP-9, como un ensayo control adicional para los experimentos de escisión *in vitro*.

En términos de escisión del péptido funcionalizado sobre la superficie de las LCMs, el porcentaje alcanzado tras 24 h es menor que cuando el péptido se encuentra en solución. Esto podría deberse a que las LCMs podría interferir en el reconocimiento y unión de la secuencia biosensible con la enzima MMP-9. En ese sentido, se sabe que el dominio catalítico del sitio activo de las MMPs presenta tres zonas helicoidales  $\alpha$  y 5 porciones en forma de láminas  $\beta$  paralelas, interconectadas por ocho bucles (229). Además, este dominio catalítico presenta una forma esférica, con un diámetro de aproximadamente 40 Å o 4 nm (228,229). Asimismo, se sabe que existe una hendidura en el sitio activo que se ubica principalmente en la superficie de la enzima que permite que los sustratos se unan, siempre y cuando adopte una conformación extendida o plana en el espacio (228). Por ende, dado el tamaño del sitio catalítico y la disposición espacial del sitio activo, puede existir una restricción espacial o impedimento estérico asociado con el diámetro de las LCMs propiamente tal ( $15,9 \pm 0,4$  nm para las micelas vacías, Tabla 11), superando ampliamente el diámetro del dominio catalítico de las enzima, por lo que el péptido conjugado, específicamente, la secuencia biosensible no sea capaz de entrar en forma adecuada a este sitio catalítico más plano y, por tanto, alcanzar el dominio catalítico, para

ser reconocida óptimamente por los residuos del sitio activo, para generar la reacción catalítica, en forma eficiente, tal y como se observó con el péptido libre.

Otra posible causa se podría atribuir a un efecto adsorción superficial de las enzimas en la superficie de las nanopartículas, impactando en su actividad. En ese sentido, la actividad de las enzimas y otras proteínas dependen de su estructura terciaria y cuando se adsorben sobre la superficie de las nanopartículas, se podría generar cambios estructurales importantes y afectar la exposición del sitio de unión con el ligando y sitio catalítico de la enzima, ocultándolos y, en consecuencia, disminuyendo o hasta perdiendo completamente la actividad enzimática original (234). Este fenómeno se encuentra ampliamente reportado para la enzima anhidrasa carbónica humana, que cataliza la reacción de interconversión de dióxido de carbono y bicarbonato, clave para la regulación del equilibrio ácido-base del organismo (234). Se ha demostrado que nanopartículas de poliestireno modificadas con grupos carboxilo en su superficie fueron capaces de promover la adsorción de moléculas de anhidrasa carbónica, a diferencia de las mismas nanopartículas de poliestireno con grupos amina. Esto se debe a que el proceso de adsorción se efectuó, principalmente, a través de interacciones electrostáticas con sus residuos básicos por sobre interacciones hidrofóbicas. Producto de esta adsorción, la enzima perdió su actividad catalítica, debido a que sufrió cambios conformacionales a nivel intramolecular (235). Este fenómeno también se ha observado para nanopartículas de sílice, en un mecanismo similar, debido a los valores negativos de ZP de estas partículas (236). Por otra parte, el tamaño de las nanopartículas también influye en el proceso de adsorción de enzimas. Se ha reportado que nanopartículas de poliestireno de 25 y 41 nm son capaces de adsorber más enzimas por área superficial, en comparación con tamaños más grandes (92 y 114 nm). Esto puede ser explicado debido a que partículas más pequeñas muestran una curvatura superficial mayor, impidiendo que las proteínas adsorbidas generen repulsión entre ellas y, por tanto, facilitar un mayor grado de empaquetamiento, en comparación con partículas más grandes con una curvatura superficial menor (237). Por tanto, dado estos antecedentes y teniendo en consideración las diferencias en la naturaleza de las enzimas y las propiedades fisicoquímicas de las

nanopartículas, no se descarta que moléculas de MMP-9 una vez expuestas a las LCMs funcionalizadas con PEP puedan adsorberse a la superficie de estas partículas, aunque sea en forma mínima. Con esta adsorción, podría gatillar cambios conformacionales, posiblemente por un mecanismo más hidrofóbico que electrostático, disminuyendo la actividad proteasa de estas enzimas, tal y como se observa con el porcentaje de escisión de péptido funcionalizado sobre las LCMs en comparación con el péptido libre, que no se observaría adsorción.

Por otra parte, se ha reportado el uso de la secuencia sensible a MMP-9 para diversos propósitos. Banerjee y cols. lograron sintetizar liposomas a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina y un lipopéptido sintético, conjugando ácido esteárico con la secuencia sensible a MMP-9 como sistema para la entrega de fármacos en cáncer. Los resultados de este estudio demostraron la capacidad de MMP-9 de gatillar la escisión de la secuencia biosensible presente en el lipopéptido y, por tanto, generar la ruptura del liposoma, favoreciendo la liberación específica en modelos celulares de cáncer de las moléculas contenidas (225). Por otra parte, Kulkarni y cols. también utilizaron un lipopéptido conjugado con el fragmento sensible a MMP-9 para la elaboración de nanovesículas, con el fin de transportar y entregar en forma selectiva el fármaco antineoplásico gemcitabina en un modelo de cáncer pancreático. Estas nanovesículas fueron además recubiertas con PEG para disminuir su inmunogenicidad y prolongar la vida media de circulación de estos sistemas. Los resultados indicaron que se logró una liberación del fármaco contenido en forma específica, al someterse a proteólisis por MMP-9, indicando, por tanto, que las nanovesículas se desorganizan por escisión del fragmento peptídico del lipopéptido. Además, la liberación del gemcitabina fue mayor cuando se coadministró MMP-9 con glutatión, ya que este último es capaz de degradar las cadenas de PEG, favoreciendo una mayor exposición del lipopéptido a la MMP-9. Cabe destacar que en tejidos cancerosos se ha reportado también una sobreexpresión de glutatión por aumento del estrés oxidativo en estos tejidos (226). Asimismo, se ha descrito el uso de esta secuencia conjugada con otros péptidos como inhibidores de la miostatina y decorados sobre la superficie de partículas de poli(metil metacrilato), para las patologías



inflamatorias y distróficas musculares como la miositis. Los resultados demostraron que la escisión por MMP-9 y, por tanto, de la liberación de los inhibidores de la miostatina a partir de la superficie de estas partículas fue efectiva y en forma dependiente de la concentración de enzima (97). Un uso particular de esta secuencia sensible fue propuesto por Zhu y cols. En este estudio, se elaboraron hidrogeles de monoacrilato con PEG y funcionalizados con la secuencia GPQGIAGQ y RGD de unión a integrinas. Estos hidrogeles, al ser expuestos en modelos celulares endoteliales humanos demostraron inducir y potenciar la adhesión endotelial y la formación de redes similares a capilares, mediado por la escisión de MMP-9 y la exposición del motivo de unión a integrinas. Con ello, podría ser potencialmente útil para la cicatrización y regeneración de tejidos epiteliales (238). Por lo tanto, con estos antecedentes y dado los resultados obtenidos en el presente estudio, se demuestra que la secuencia intermedia GPQGIAGQ del péptido PEP funcionalizada sobre las LCMs mantiene su sensibilidad a la escisión por la enzima MMP-9 y, por tanto, podrían ser utilizadas como sistemas de entrega biosensibles a esta enzima para el transporte y entrega dirigida de moléculas de clase 2.

#### **4.5 Ensayo *in vitro* de unión a cardiomiocitos de micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con péptido**

Todos los ensayos *in vitro* de unión a cardiomiocitos de los péptidos libres en solución (Figuras 28 y 29) y como funcionalizados sobre las LCMs (Figura 30), mostraron que el péptido CAR, que contiene la secuencia orientadora a cardiomiocito PCM-1, funcionalizado sobre las LCMs presentaron una mayor unión a cardiomiocitos, en comparación con la secuencia CLV que contiene además los cuatro residuos remanentes de la escisión por MMP-9. De hecho, se ha demostrado que la secuencia PCM-1 fue efectivamente capaz de aumentar la unión a cardiomiocitos de distintos sistemas de vehiculización elaborados, incluyendo poliplejos para la entrega de siRNA (75), nanopartículas con curcumina (76) y nanosondas con 17 $\beta$ -estradiol (77), con una alta selectividad hacia este tipo celular por sobre otros, como fibroblastos. Cabe destacar que el presente estudio es el primero que utiliza y determina la influencia de los residuos GPQG en la unión a cardiomiocitos de la secuencia orientadora.

Los cardiomiocitos de ratas neonatas han sido ampliamente utilizados como modelo para estudiar las funciones propias del tejido como la dilucidación de la fisiopatología de diversas enfermedades que afectan al corazón, para poder diseñar y demostrar el efecto de moléculas biológicamente activas sobre dichas patologías (239). En ese sentido, las principales ventajas de la obtención y ensayo con cardiomiocitos neonatos por sobre ratas adultas incluyen su facilidad en el aislamiento, su menor costo, capacidad de división y, por tanto, también de diferenciación, hasta por 21 días después de aisladas (239,240). Dado ello, es que los ensayos con cardiomiocitos de ratas neonatas permiten predecir y determinar, con solidez, el desarrollo del tejido cardíaco, la regulación del ciclo celular y la fisiología y fisiopatología cardíaca *in vitro* (241).

Tal y como se mencionó anteriormente, la secuencia orientadora a cardiomiocitos PCM-1, incorporada en el péptido CAR, comparte una secuencia en común de 12 aminoácidos (VTVRALRGTSW) con la glicoproteína tenascina X. Esta secuencia CAR podría actuar imitando la secuencia propia de la tenascina X, teniendo la ventaja de ser más pequeña, fácilmente sintetizable en grandes cantidades y, además, fácilmente conjugable sobre la superficie de nanopartículas. En ese sentido, la tenascina X es la glicoproteína más grande (450 kDa) dentro de su familia que incluyen también las tenascinas C, R y W, cuyas estructuras se encuentran altamente conservadas entre las especies (242). Las tenascinas forman parte de la matriz extracelular de diversos tejidos, siendo clave no sólo para la mantención de su estructura, sino que también para orientar a las células hacia la generación de interacciones con componentes celulares específicos, que son importantes en procesos como la adhesión, proliferación y diferenciación celulares, y patrones de supervivencia (243,244). En el caso particular de la tenascina X, presenta un dominio hidrofóbico en su extremo *N*-terminal, un motivo compuesto por varios dominios o repeticiones de secuencias similares al factor de crecimiento epidérmico, un módulo formado por 30 a 32 repeticiones de un dominio de fibronectina tipo III (FNIII), y un dominio globular similar al fibrinógeno en el extremo *C*-terminal (242). Esta proteína se encuentra principalmente expresada en los tejidos musculares esqueléticos, en el corazón, glándulas suprarrenales y vasos sanguíneos (245,246). A nivel cardíaco, se ha

determinado que la tenascina X es capaz de actuar como un factor iniciador de los procesos de fibrosis cardíaca y remodelamiento cardíaco. El mecanismo de estos procesos radica en que la tenascina X es capaz de mediar la formación de fibrillas de colágeno a través de la vía del factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 y, por tanto, favorecer la interacción entre las células y los componentes de la matriz extracelular, claves en los procesos fibróticos y de remodelamiento tisular (247). Por otra parte, se ha reportado que la deficiencia en la tenascina X a nivel del tejido conectivo en diversos órganos estaría relacionada con la aparición de múltiples patologías, como el síndrome de Ehlers-Danlos e hiperplasia adrenal congénita (248–250).

En general, se ha descrito que las tenacinas tienen la capacidad de interactuar con múltiples moléculas, tales como receptores celulares superficiales de tipo integrinas y tipo toll, citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno o decorina (242,246,251,252). Específicamente, los receptores de integrina corresponden a proteínas superficiales heterodiméricas, compuestas por dos subunidades distintas:  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas en forma no covalente (253). Actualmente, se sabe que en vertebrados existen al menos 18 y 8 tipos distintos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, cuyo tamaño fluctúa entre los 80 a 180 kDa, permitiendo formar 24 tipos de receptores de integrina diferentes (253,254). Estos receptores de integrina juegan un papel fundamental en el proceso de adhesión celular, al ser capaces de reconocer las distintas proteínas de la matriz extracelular (253). Dentro de las secuencias de estas proteínas, los receptores de integrina reconocen ciertos motivos ácidos que permiten la formación de un enlace coordinado con un catión divalente ( $Mg^{+2}$ ), presente en el sitio de adhesión dependiente de iones metálicos en el dominio  $\alpha$  I de la subunidad  $\alpha$  (253,255). Entre estos motivos ácidos se encuentran: RGD, IGD, KGD, LDV, DGEA, REDV, FYFDLR, GFOGER, GLOGEN, GVOGEA, KQAGDV, KRLDGS, LRRWLEAK, YGYYGDALR y HHLGGAKQAGDV, donde la acidez se relaciona con la presencia de aminoácidos ácidos como D o E (256–260). A nivel de cardiomiocitos, se han reportado la expresión de varios tipos receptores de integrina, tales como  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  y  $\alpha_7\beta_1$ , siendo importantes para distintos procesos fisiológicos, incluyendo la adhesión celular, mecanotransducción,

protección isquémica y regulación de canales iónicos y crecimiento (254). Asimismo, en condiciones patológicas, como en la hipertrofia cardíaca, existe una sobreexpresión de los receptores  $\alpha_3\beta_1$  y  $\alpha_v\beta_3$  (261,262). En ese sentido, las tenascinas presentan al menos un motivo ácido dentro de una de las repeticiones del dominio de FNIII, específicamente en la repetición 11 de la tenascina X, encontrándose el motivo RGD (242,260).

La razón de la efectividad de la secuencia CAR por tener una mayor unión a cardiomiocitos, tanto como péptido libre y funcionalizada sobre las LCMs, no está del todo claro. Esto se debe a que la secuencia en común con la tenascina X (VTVRALRGTGSW) no presenta ningún motivo descrito para la unión al sitio de adhesión dependiente de iones metálicos del receptor de integrina. De hecho, se sabe que esta secuencia se encuentra específicamente en la repetición 1 del dominio de FNIII de la glicoproteína (74). El dominio de FNIII es una de las unidades de plegamiento proteico más comunes, presente en cerca del 2% de todas las proteínas animales y que fue caracterizado primeramente en la fibronectina, una proteína de la matriz extracelular (263). A nivel estructural, este dominio está compuesto por entre 90 a 100 aminoácidos, capaz de formar una estructura secundaria de tipo lámina  $\beta$ , muy similar a lo observado para las inmunoglobulinas (264). En ese sentido, se ha descrito el rol de ciertos aminoácidos en la promoción de la estabilidad de este dominio y capacidad de interacción con otras proteínas. Los residuos de valina, específicamente la cadena lateral hidrofóbica de tipo isopropilo, son capaces de generar interacciones hidrofóbicas con otros residuos de la misma naturaleza, tales como alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina e, incluso, otros residuos de valina. Asimismo, los residuos de arginina pueden generar enlaces de tipo puentes de hidrógeno, con distintos aminoácidos que tengan dentro de su estructura grupos aceptores de puentes de hidrógeno; esto se debe a que el aminoácido presenta un grupo guanidina en su cadena lateral, sirviendo como grupo funcional donante de puentes de hidrógeno (265,266). Por otra parte, los receptores de integrina también pueden presentar otros sitios de unión distintos al dominio  $\alpha$  I de la subunidad  $\alpha$ . Se ha descrito que la subunidad  $\beta$  de los receptores de integrina es otro punto de unión para distintas proteínas de la matriz extracelular, ya que contiene un dominio tipo I, similar al dominio  $\alpha$  I de la

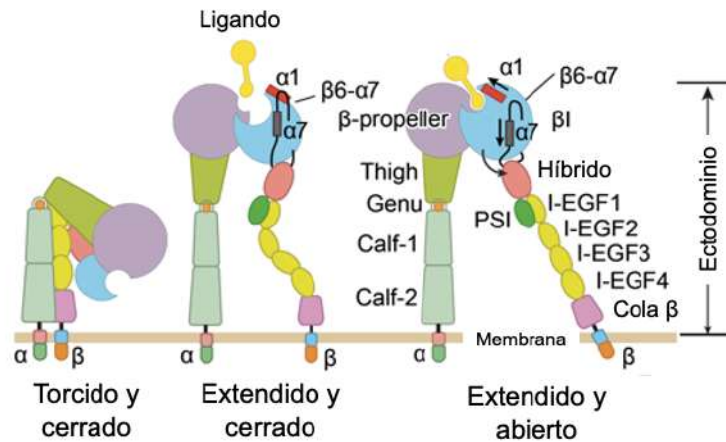
subunidad  $\alpha$ , presentando un motivo con unión a catión metálico, específicamente,  $\text{Ca}^{+2}$  (261,267). Este sitio de unión a proteínas de la matriz podría actuar como un sitio cooperativo de unión al dominio  $\alpha$  I en receptores de integrina, pero, por sobre todo, se vuelve más importante en aquellos receptores que carecen del dominio  $\alpha$  I en la subunidad  $\alpha$ , tal y como ocurre con el receptor  $\alpha_6\beta_1$  y su reconocimiento a la proteína laminina (267,268). También existen otros dominios extracelulares del receptor de integrina que podrían actuar como otros sitios de unión y de reconocimiento a distintas moléculas, incluyendo los dominios *calf-1* y *calf-2* de la subunidad  $\alpha$ , y los dominios similares al factor de crecimiento epidérmico de integrina y plexina/semaforina/integrina de la subunidad  $\beta$  (269). Dado estos antecedentes, la secuencia orientadora a cardiomiocitos CAR, ya sea en su forma de péptido libre como funcionalizada en la superficie de las LCMs, e incluso formando parte del péptido CLV, podría generar interacción con receptores de integrina en estas células, a través de algunos aminoácidos presentes en su secuencia, específicamente valina y arginina, siendo capaz de generar interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con algunos dominios de estos receptores, respectivamente. Pese a que presenta los mismos aminoácidos que la secuencia CAR, el péptido *scramble* SCR no se une en forma eficiente a los cardiomiocitos en comparación con los péptidos CAR y CLV. Esto puede deberse a que su secuencia de aminoácidos no presenta similitud ni el mismo ordenamiento en comparación con la tenascina X, lo que se tradujo, además, en una estructura secundaria distinta a los otros péptidos (Figura 10 y Tabla 8), pudiendo impactar en el reconocimiento y unión a los receptores de integrina en estas células.

Por otro lado, la menor unión a cardiomiocitos del péptido CLV, tanto como péptido libre o funcionalizada sobre las LCMs, en comparación con la secuencia CAR podría atribuirse a los cuatro aminoácidos adicionales (GPQG), remanentes de la escisión de la secuencia sensible a MMP-9. Pese a que estos cuatro residuos adicionales no generan diferencias en la estructura secundaria en ambos péptidos (Figura 10 y Tabla 8), sí podrían generar alguna modificación en la interacción entre la porción similar a la tenascina X con la unión a los receptores en los cardiomiocitos. En ese sentido, es sabido que para el

reconocimiento y la selectividad de un receptor por un ligando no requiere solamente de una secuencia a la que sea afín, sino que también, este reconocimiento y selectividad están influenciados por los aminoácidos que rodean esta secuencia, en lo que se entiende como contexto secuencial (255). Un ejemplo de ello es lo que ha demostrado la investigación de Ma y cols. En dicho estudio, se pudo observar que la presentación cruzada de antígenos de una secuencia determinante del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de tipo I compuesta por 8 aminoácidos (SIINFEKL) se vio alterada por una variación en la longitud de la secuencia tanto hacia el extremo *N*- como *C*-terminal (270). En una línea similar, otro estudio reportó la existencia de algunos aminoácidos, como la arginina, en las regiones que rodea un núcleo esencial de moléculas de tipo MHC-II, que serían claves en el reconocimiento y modulación de la actividad de los receptores CD4<sup>+</sup> en linfocitos T, en donde su reemplazo, podría generar una disminución en la respuesta inmune asociada con estos receptores (271). Por tanto, el péptido CLV, a través de la presencia adicional de los residuos GPQG, podría otorgar un contexto secuencial distinto a la secuencia orientadora a cardiomiocitos, pudiendo ser la causa de la disminución en la unión con los receptores de integrina presentes en dichas células observada tanto en el péptido libre como en las LCMs funcionalizadas con CLV.

Por otra parte, los receptores de integrina pueden presentarse en tres estados conformacionales distintos: torcido y cerrado, extendido y cerrado, y extendido y abierto. Cabe destacar que ambos estados cerrados presentan baja afinidad de unión a sustratos, mientras que la conformación abierta muestra una alta afinidad de unión (272,273). En ese sentido, el estado extendido y abierto, pese a que muestra unas 1.000 veces mayor afinidad de unión a sustrato, presenta un dominio de unión a ligando más estrecho y, por tanto, de acceso más restringido, en comparación con las conformaciones cerradas del receptor (Figura 37) (274). Tomando en consideración esto, es que la presencia de los cuatro residuos adicionales en CLV podría generar un mayor impedimento para que la secuencia de 12 aminoácidos similar a la tenascina X sea reconocida por el dominio de unión a ligando en la conformación extendida y abierta de los receptores de integrina en

los cardiomiocitos, lo que se traduciría, finalmente, en una menor unión en comparación con la secuencia CAR, ya sea como péptido libre o funcionalizada sobre las LCMs. En ese sentido, para confirmar esta hipótesis, se debería realizar ensayos de afinidad ligando-receptor, en donde se pueda establecer la capacidad de unión de estos péptidos que contienen la secuencia PCM-1 con los receptores de integrina propuestos, a través de ensayos de internalización o colocalización con técnicas de inmunofluorescencia.



**Figura 37.** Esquema representativo de los tres estados conformacionales de los receptores de integrina, con sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y sus respectivos dominios. I-EGF: dominio similar al factor de crecimiento epidérmico de integrina; PSI: dominio plexina/semaforina/integrina. Adaptado de Li y cols. (274).

Cabe destacar que hasta la fecha no existe evidencias de otros estudios que hayan determinado la influencia de estos residuos sobre el reconocimiento y unión de la secuencia original en los cardiomiocitos u otras células, por lo que, un campo a explorar sería determinar el mecanismo de unión y tipo de interacciones formadas entre estos péptidos y los receptores de integrina, a través del modelamiento molecular *in silico*. Por consiguiente, se ha demostrado que las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV mantiene un grado de unión a cardiomiocitos significativamente mayor que las LCMs no funcionalizadas, por lo que podrían ser utilizadas como potenciales sistemas de vehiculización y entrega dirigida de moléculas de baja solubilidad acuosa con acción sobre estas células.

## 5. CONCLUSIONES

Las micelas de núcleo lipídico (LCMs) funcionalizadas en su superficie con la secuencia peptídica CWLSEAGPVVTVRALRGTGSWGPQGIAGQVVVV (PEP) constituyen sistemas de vehiculización y entrega para moléculas de baja solubilidad acuosa, a través de la vía de administración bucal como alternativa a la vía oral, con posibilidad de ser activadas efectivamente por la enzima metaloproteinasa de la matriz-9 (MMP-9) y dirigidas en forma selectiva hacia cardiomiocitos.

En ese sentido, se logró sintetizar en forma eficiente los péptidos PEP, CLV, SCR y CAR, como de las secuencias CLV, SCR y CAR asociadas con el fluoróforo carboxifluoresceína (CF), a través de la síntesis en fase sólida. Todos los péptidos obtenidos alcanzaron una pureza superior al 95%, a excepción del péptido CF-CLV, cuya pureza fue cercana al 90%. Asimismo, se pudo dilucidar que los todos los péptidos mostraron una conformación principalmente aleatoria, con porción de lámina  $\beta$ , excepto el péptido SCR, que mostró una estructura helicoidal  $\alpha$ .

Tras ello, se procedió a funcionalizar la matriz lipídica con el péptido a través de la reacción clásica de Michael utilizando un grupo maleimida y el grupo tiol del residuo de cisteína de los péptidos sintetizados. Pese a que no fue posible realizar la funcionalización directa sobre Gelucire 44/14<sup>®</sup> dada su complejidad estructural, sí fue posible funcionalizar eficientemente el péptido sobre un lípido personalizado y adquirido en forma comercial, para luego ser incorporado con los otros reactivos necesarios para la síntesis de las LCMs a través de la técnica de emulsificación en caliente de baja energía. Las nanopartículas obtenidas mostraron ser de características nanométricas, esféricas y de baja polidispersión, con unidades de péptido integrados en la superficie de las partículas, corroborado por las diferencias observadas en los valores de potencial  $\zeta$  entre las LCMs funcionalizadas y no funcionalizadas. En términos de estabilidad, las LCMs se mantuvieron más estables a 4 y 25 °C que a 37 °C, sin observar cambios significativos en sus parámetros fisicoquímicos hasta al menos 6 h tras su síntesis. Además, se logró una alta asociación de rodamina 123 (> 80%) como molécula modelo de principios activos de



baja solubilidad acuosa, teniendo una liberación cercana al 85% a 24 h en LCMs funcionalizadas con CLV, siendo 4 veces mayor en comparación con LCMs no funcionalizadas, debido al fenómeno de liberación explosiva inicial, asociándose principalmente con modificaciones en el estado de transición de la matriz lipídica como mecanismo de liberación según el ajuste del modelo cinético de Peppas-Sahlin.

Las LCMs funcionalizadas con el péptido PEP demostraron una mayor capacidad de permeación a través del epitelio bucal, en un modelo *ex vivo*, en comparación con nanopartículas no funcionalizadas y una solución de rodamina 123 libre. Pese a ello, el porcentaje acumulado a 60 minutos es relativamente bajo (1,3%), por lo que se podría proponer la incorporación de estos sistemas dentro de otras formas farmacéuticas, incluidas las películas mucoadhesivas, que han demostrado ser eficientes en la potenciación en la permeación de sustancias a través del epitelio bucal.

Por otro lado, se comprobó que la secuencia bioactivable por MMP-9 dentro de la secuencia PEP funcionalizada sobre las LCMs mantiene la capacidad de ser reconocida por la enzima y, por tanto, ser escindida, una vez simulada la permeación bucal, para la exposición de la secuencia orientadora a cardiomiocitos.

Finalmente, las LCMs funcionalizadas con el péptido CLV, que presenta la secuencia orientadora a cardiomiocitos y cuatros aminoácidos residuales tras la escisión del fragmento bioactivable por MMP-9, es capaz de unirse a cardiomiocitos en forma significativamente mayor en comparación con las LCMs no funcionalizadas. Sin embargo, los cuatros aminoácidos residuales sí generan un impacto en la unión, en comparación con LCMs con la secuencia CAR de control, que demostraron presentar una mayor unión. Estos cuatros residuos podrían otorgarle un contexto secuencial distinto, por lo que interferiría en su posible reconocimiento por parte de los receptores superficiales en cardiomiocitos.

## 6. RECOMENDACIONES

La formulación de LCMs funcionalizadas con un péptido trifuncional para la entrega de moléculas de baja solubilidad acuosa, a través de la vía bucal, seguido de escisión sensible a MMP-9 y dirigidas a cardiomiocitos, conllevó la realización de múltiples experimentos y ensayos, permitiendo la obtención de los resultados ya expuestos y discutidos durante la sección anterior. En ese sentido y considerando la importancia y novedad de la presente investigación, se formulan algunas recomendaciones que fomentarán la profundización y discusión de algunos resultados obtenidos:

1. Evaluar la estructura secundaria de los péptidos tras el proceso de funcionalización del lípido SP-Mal y obtención de las respectivas LCMs, con el propósito de poder determinar si la estructura secundaria del péptido pudo haber sufrido o no cambios, en comparación con el péptido libre, teniendo un posible impacto en la estabilidad coloidal de estas partículas y actividad para el cual fue diseñado.
2. Determinar la estabilidad coloidal de las LCMs funcionalizadas con el péptido en soluciones con distinta fuerza iónica, como parte de la batería de ensayos de estabilidad, siendo un resultado complementario a los ya obtenidos, para la validación de estas nanopartículas como sistemas para el transporte de moléculas de baja solubilidad acuosa.
3. Formular LCMs con otro péptido potenciador de la permeación o incorporar las LCMs funcionalizadas con PEP en películas mucoadhesivas u otras formas farmacéuticas, que han demostrado aumentar el grado de permeación de partículas contenidas a través del epitelio bucal, favoreciendo, por tanto, una mayor biodisponibilidad de la molécula de interés.
4. Evaluar el diseño y sensibilidad *in vitro* a escisión por MMP-9 del péptido trifuncional PEP, que contenga una secuencia *scrambled* del fragmento sensible a la actividad proteasa, como ensayo control adicional para consolidar los resultados obtenidos en este punto.

5. Dilucidar el mecanismo de unión e internalización/colocalización de los péptidos CAR y CLV una vez unidos a cardiomiocitos, a través de ensayos *in vitro* de inmunofluorescencia.
6. Formular LCMs funcionalizadas con el péptido de interés con un principio activo de baja solubilidad acuosa clase 2, con el fin de demostrar la factibilidad de estos sistemas para el transporte y entrega de fármacos hacia cardiomiocitos.

## 7. REFERENCIAS

1. Mikulic M. Global pharmaceutical industry [Internet]. Statista. 2021 [citado 10 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.statista.com/topics/1764/global-pharmaceutical-industry/>
2. Chavda H, Patel C, Anand I. Biopharmaceutics classification system. *Syst Rev Pharm.* 2010;1(1):62-9.
3. Charalabidis A, Sfouni M, Bergström C, Macheras Panos. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *Int J Pharm.* 2019;566:264-81.
4. Papich MG, Martinez MN. Applying Biopharmaceutical Classification System (BCS) criteria to predict oral absorption of drugs in dogs: challenges and pitfalls. *AAPS J.* 2015;17(4):948-64.
5. Nikolakakis I, Partheniadis I. Self-Emulsifying Granules and Pellets: Composition and Formation Mechanisms for Instant or Controlled Release. *Pharmaceutics.* 3 de noviembre de 2017;9(4):50.
6. Vargason AM, Anselmo AC, Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nat Biomed Eng.* 2021;5(9):951-67.
7. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. *Front Chem.* 2018;6:1-15.
8. Hillery AM, Hoffman AS. Historical introduction to the field of controlled drug delivery. En: *Drug delivery: fundamentals & applications.* 2nd ed. Boca Raton, FL, EUA: Taylor & Francis Group; 2017. p. 1-21.
9. Kawakami K, Hillery AM. Improving the water solubility of poorly water soluble drugs. En: *Drug delivery: fundamentals & applications.* 2nd ed. Boca Raton, FL, EUA: Taylor & Francis Group; 2017. p. 47-70.
10. Dizaj SM, Vazifehasl Zh, Salatin S, Adibkia Kh, Javadzadeh Y. Nanosizing of drugs: Effect on dissolution rate. *Res Pharm Sci.* 2015;10(2):95-108.
11. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm.* 2006;321(1):1-11.
12. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J Controlled Release.* 2016;238:176-85.
13. Chou WH, Lühmann T, Meinel L, Morales JO. Nanoparticle design to improve transport across the intestinal barrier. En: Yata VK, Ranjan S, Dasgupta N, Lichtfouse E, editores. *Nanopharmaceuticals: Principles and Applications Vol 3* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 271-315. (Environmental Chemistry for a Sustainable World). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-47120-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-47120-0_9)
14. Prabha S, Arya G, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2016;44(1):83-91.
15. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.*

2021;20(2):101-24.

16. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres M del P, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018;16(1):71.
17. Giner-Casares JJ, Henriksen-Lacey M, Coronado-Puchau M, Liz-Marzán LM. Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. *Mater Today*. 2016;19(1):19-28.
18. Xu L, Wang X, Liu Y, Yang G, Falconer RJ, Zhao CX. Lipid nanoparticles for drug delivery. *Adv NanoBiomed Res*. 2022;2(2):2100109.
19. Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, Martínez G, Merinero M, Argüelles-Arias F, et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*. julio de 2020;10(7):1403.
20. Torchilin VP. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res*. 1 de enero de 2007;24(1):1.
21. Torchilin VP. Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Curr Drug Deliv*. octubre de 2005;2(4):319-27.
22. Wakaskar RR. General overview of lipid-polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *J Drug Target*. 2018;26(4):311-8.
23. Imran M, Shah MR, Shafiullah. Chapter 10 - Amphiphilic block copolymers-based micelles for drug delivery. En: Grumezescu AM, editor. *Design and Development of New Nanocarriers*. William Andrew Publishing; 2018. p. 365-400.
24. Gao Z, Lukyanov AN, Singhal A, Torchilin VP. Diacyllipid-Polymer Micelles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drugs. *Nano Lett*. 2002;2(9):979-82.
25. Wang J, Mongayt DA, Lukyanov AN, Levchenko TS, Torchilin VP. Preparation and in vitro synergistic anticancer effect of Vitamin K3 and 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene in poly(ethylene glycol)-diacyllipid micelles. *Int J Pharm*. 19 de marzo de 2004;272(1):129-35.
26. Mu L, Elbayoumi TA, Torchilin VP. Mixed Micelles made of Poly(ethylene glycol)-Phosphatidylethanolamine Conjugate and D- $\alpha$ -tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate as Pharmaceutical Nanocarriers for Camptothecin. *Int J Pharm*. 8 de diciembre de 2005;306(1-2):142-9.
27. Oda CMR, Fernandes RS, de Araújo Lopes SC, de Oliveira MC, Cardoso VN, Santos DM, et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nanomicelles as a platform for tumor delivering. *Biomed Pharmacother*. 1 de mayo de 2017;89:268-75.
28. Ravazzolo E, Salmaso S, Mastrotto F, Bersani S, Gallon E, Caliceti P. pH-responsive lipid core micelles for tumour targeting. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 de abril de 2013;83(3):346-57.
29. Fritz HF, Ortiz AC, Velaga SP, Morales JO. Preparation of a novel lipid-core micelle using a low-energy emulsification method. *Drug Deliv Transl Res*. 2018;
30. Svensson A, Neves C, Cabane B. Hydration of an amphiphilic excipient, Gelucire® 44/14. *Int J Pharm*. 20 de agosto de 2004;281(1):107-18.
31. Chou WH, Galaz A, Jara MO, Gamboa A, Morales JO. Drug-loaded lipid-core

- micelles in mucoadhesive films as a novel dosage form for buccal administration of poorly water-soluble and biological drugs. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1168.
32. Ortiz AC, Casas I, Mella P, Naranjo O, Pizarro N, Vega A, et al. Aptamer-functionalized lipid-core micelles loaded with rhenium tricarbonyl complex. *Polyhedron*. 2021;195:114963.
  33. Arivazhahan A. Principles and modes of drug administration. En: Raj GM, Raveendran R, editores. *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 1: General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action* [Internet]. Singapore: Springer; 2019. p. 69-79. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9779-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9779-1_4)
  34. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int J Pharm*. 25 de noviembre de 2011;420(1):1-10.
  35. Rabanel JM, Aoun V, Elkin I, Mokhtar M, Hildgen P. Drug-loaded nanocarriers: passive targeting and crossing of biological barriers. *Curr Med Chem*. 2012;19(19):3070-102.
  36. Gavhane YN, Yadav AV. Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharm J*. 1 de octubre de 2012;20(4):331-44.
  37. Kestenbaum MG, Vilches AO, Messersmith S, Connor SR, Fine PG, Murphy B, et al. Alternative routes to oral opioid administration in palliative care: a review and clinical summary. *Pain Med*. 1 de julio de 2014;15(7):1129-53.
  38. Caon T, Pan Y, Simões CMO, Nicolazzo JA. Exploiting the Buccal Mucosa as an Alternative Route for the Delivery of Donepezil Hydrochloride. *J Pharm Sci*. 1 de junio de 2014;103(6):1643-51.
  39. Brown MB, Patel VF. Buccal and sublingual drug delivery. En: *Drug Delivery: Fundamentals & Applications*. 2da Ed. Taylor & Francis Group; 2017. p. 201-14.
  40. Campanile GL, Lotti TM, Orlandini SZ. Macroscopic Anatomy, Histology and Electron Microscopy of the Oral Cavity and Normal Anatomic Variants. En: *Oral Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg; 1999. p. 1-5.
  41. Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. *Mater Sci Eng C*. 2018;86:129-43.
  42. Nanci A, editor. Chapter 12 - Oral mucosa. En: *Ten Cate's Oral Histology (Eighth Edition)* [Internet]. 8va ed. St. Louis (MO): Mosby; 2013 [citado 14 de julio de 2022]. p. 278-310. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323078467000124>
  43. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [Internet]. [citado 20 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>
  44. Costa JSR, de Oliveira Cruvinel K, Oliveira-Nascimento L. A mini-review on drug delivery through wafer technology: Formulation and manufacturing of buccal and oral lyophilizates. *J Adv Res*. 1 de noviembre de 2019;20:33-41.
  45. Portero A, Teijeiro-Osorio D, Alonso MJ, Remuñán-López C. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydr Polym*. 23 de abril de

2007;68(4):617-25.

46. Baus RA, Zahir-Jouzani F, Dünnhaupt S, Atyabi F, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery: In vitro-in vivo correlation study. *Eur J Pharm Biopharm.* 1 de septiembre de 2019;142:498-505.

47. Alopaeus JF, Hellfritsch M, Gutowski T, Scherließ R, Almeida A, Sarmiento B, et al. Mucoadhesive buccal films based on a graft co-polymer – A mucin-retentive hydrogel scaffold. *Eur J Pharm Sci.* 15 de enero de 2020;142:105142.

48. Pozzilli P, Manfrini S, Costanza F, Coppolino G, Cavallo MG, Fioriti E, et al. Biokinetics of buccal spray insulin in patients with type 1 diabetes. *Metabolism.* 1 de julio de 2005;54(7):930-4.

49. Rahbarian M, Mortazavian E, Dorkoosh FA, Rafiee Tehrani M. Preparation, evaluation and optimization of nanoparticles composed of thiolated triethyl chitosan: A potential approach for buccal delivery of insulin. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 de abril de 2018;44:254-63.

50. Hassan N, Ahad A, Ali M, Ali J. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 1 de enero de 2010;7(1):97-112.

51. Caon T, Jin L, Simões CMO, Norton RS, Nicolazzo JA. Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics. *Pharm Res.* 2015;32(1):1-21.

52. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. Buccal penetration enhancers—How do they really work? *J Controlled Release.* 20 de junio de 2005;105(1):1-15.

53. Sarpotdar PP, Gaskill JL, Giannini RP, Daniels CR. L- $\alpha$ -amino acids as transdermal penetration enhancers [Internet]. US4732892A, 1988 [citado 4 de julio de 2018]. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US4732892A/en>

54. Pereira R, Silva SG, Pinheiro M, Reis S, do Vale ML. Current status of amino acid-based permeation enhancers in transdermal drug delivery. *Membranes.* 2021;11(5):343.

55. Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnürch A. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 1 de febrero de 2009;71(2):339-45.

56. Di Colo G, Zambito Y, Zaino C. Polymeric Enhancers of Mucosal Epithelia Permeability: Synthesis, Transepithelial Penetration-Enhancing Properties, Mechanism of Action, Safety Issues. *J Pharm Sci.* 1 de mayo de 2008;97(5):1652-80.

57. Morales JO, Huang S, Williams RO, McConville JT. Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de octubre de 2014;122:38-45.

58. Iyire A, Alayedi M, Mohammed AR. Pre-formulation and systematic evaluation of amino acid assisted permeability of insulin across in vitro buccal cell layers. *Sci Rep* [Internet]. 1 de septiembre de 2016 [citado 14 de febrero de 2018];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5007592/>

59. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 19 de junio de 2013;587(12):1693-702.

60. Zhang D, Wang J, Xu D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *J Controlled Release.* 10 de mayo de 2016;229:130-9.

61. Bolhassani A, Jafarzade BS, Mardani G. In vitro and in vivo delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides. *Peptides*. 1 de enero de 2017;87:50-63.
62. Hingorani DV, Lemieux AJ, Acevedo JR, Glasgow HL, Kedarisetty S, Whitney MA, et al. Early detection of squamous cell carcinoma in carcinogen induced oral cancer rodent model by ratiometric activatable cell penetrating peptides. *Oral Oncol*. 1 de agosto de 2017;71:156-62.
63. Liu Y, Kamesh AC, Xiao Y, Sun V, Hayes M, Daniell H, et al. Topical delivery of low-cost protein drug candidates made in chloroplasts for biofilm disruption and uptake by oral epithelial cells. *Biomaterials*. 1 de octubre de 2016;105:156-66.
64. Jallouk AP, Palekar RU, Pan H, Schlesinger PH, Wickline SA. Chapter two: Modifications of natural peptides for nanoparticle and drug design. En: Donev R, editor. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [Internet]. Academic Press; 2015 [citado 13 de mayo de 2022]. p. 57-91. (Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery; vol. 98). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876162314000613>
65. Keum T, Noh G, Seo JE, Bashyal S, Sohn DH, Lee S. Examination of effective buccal absorption of salmon calcitonin using cell-penetrating peptide-conjugated liposomal drug delivery system. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:697-710.
66. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics—2021 update. *Circulation*. 2021;143(8):e254-743.
67. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: Update from the GBD 2019 study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021.
68. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Primeros resultados [Internet]. 2017 [citado 3 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.deis.cl/indicadores-basicos-de-salud/>
69. Budreviciute A, Damiati S, Sabir DK, Onder K, Schuller-Goetzburg P, Plakys G, et al. Management and prevention strategies for non-communicable diseases (NCDs) and their risk factors. *Front Public Health*. 2020;8:788.
70. Santos JV, Vandenberghe D, Lobo M, Freitas A. Cost of cardiovascular disease prevention: towards economic evaluations in prevention programs. *Ann Transl Med*. 2020;8(7):512-512.
71. Friedman AD, Claypool SE, Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr Pharm Des*. 2013;19(35):6315-29.
72. Dehaini D, Fang RH, Zhang L. Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery. *Bioeng Transl Med*. 1 de marzo de 2016;1(1):30-46.
73. Passaro F, Testa G, Ambrosone L, Costagliola C, Tocchetti CG, di Nezza F, et al. Nanotechnology-based cardiac targeting and direct cardiac reprogramming: The betrothed. *Stem Cells Int*. 2017;2017:e4940397.
74. McGuire MJ, Samli KN, Johnston SA, Brown KC. In vitro Selection of a Peptide with High Selectivity for Cardiomyocytes In vivo. *J Mol Biol*. 3 de septiembre de 2004;342(1):171-82.



75. Nam HY, McGinn A, Kim PH, Kim SW, Bull DA. Primary cardiomyocyte-targeted bioreducible polymer for efficient gene delivery to the myocardium. *Biomaterials*. 1 de noviembre de 2010;31(31):8081-7.
76. Ray A, Rana S, Banerjee D, Mitra A, Datta R, Naskar S, et al. Improved bioavailability of targeted Curcumin delivery efficiently regressed cardiac hypertrophy by modulating apoptotic load within cardiac microenvironment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 de enero de 2016;290:54-65.
77. Zhao X, Luo W, Hu J, Zuo L, Wang J, Hu R, et al. Cardiomyocyte-targeted and 17 $\beta$ -estradiol-loaded acoustic nanoprobes as a theranostic platform for cardiac hypertrophy. *J Nanobiotechnology*. 2018;16(1):36.
78. Mentkowski KI, Lang JK. Exosomes engineered to express a cardiomyocyte binding peptide demonstrate improved cardiac retention in vivo. *Sci Rep*. 2019;9(1):10041.
79. Wang X, Huang H, Zhang L, Bai Y, Chen H. PCM and TAT co-modified liposome with improved myocardium delivery: in vitro and in vivo evaluations. *Drug Deliv*. 1 de enero de 2017;24(1):339-45.
80. Lühmann T, Meinel L. Nanotransporters for drug delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 1 de junio de 2016;39:35-40.
81. Spinale FG, Koval C, Deschamps A, Stroud RE, Ikonomidis JS. Dynamic changes in matrix metalloproteinase activity within the human myocardial interstitium during myocardial arrest and reperfusion. *Circulation*. 30 de septiembre de 2008;118(14 Suppl):S16-23.
82. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.
83. Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix metalloproteinases as biomarkers of atherosclerotic plaque instability. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3946.
84. Parks WC. Matrix metalloproteinases. En: Janes SM, editor. *Encyclopedia of Respiratory Medicine (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2022 [citado 27 de diciembre de 2021]. p. 710-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081027233002444>
85. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):221-33.
86. Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 2011;38(1):191-208.
87. Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. febrero de 2006;22(Suppl B):25B-30B.
88. Papazafropoulou A, Tentolouris N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia*. 2009;13(2):76-82.
89. Papazafropoulou A, Tentolouris N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia*. 2009;13(2):76-82.
90. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology*. 2013;28(6):391-403.
91. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating matrix

- metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population. *PLOS ONE*. 2008;3(3):e1774.
92. Karapanagiotidis GT, Antonitsis P, Charokopos N, Foroulis CN, Anastasiadis K, Rouska E, et al. Serum levels of matrix metalloproteinases -1,-2,-3 and -9 in thoracic aortic diseases and acute myocardial ischemia. *J Cardiothorac Surg*. 2009;4:59.
  93. Šímová J, Škvor J, Slovák D, Mazura I, Zvárová J. Serum levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with acute myocardial infarction. *Folia Biol (Praha)*. 2013;59(5):181-7.
  94. Lahdentausta L, Leskelä J, Winkelmann A, Tervahartiala T, Sorsa T, Pesonen E, et al. Serum MMP-9 diagnostics, prognostics, and activation in acute coronary syndrome and its recurrence. *J Cardiovasc Transl Res*. 2018;11(3):210-20.
  95. Li T, Jiang B, Li X, Sun H yang, Li X tong, Jing J jing, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 is a valuable biomarker for identification of abdominal and thoracic aortic aneurysm: a case-control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2018;18:202.
  96. Zhang X, Wang X, Zhong W, Ren X, Sha X, Fang X. Matrix metalloproteinases-2/9-sensitive peptide-conjugated polymer micelles for site-specific release of drugs and enhancing tumor accumulation: preparation and in vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1643-61.
  97. Braun AC, Gutmann M, Ebert R, Jakob F, Gieseler H, Lühmann T, et al. Matrix metalloproteinase responsive delivery of myostatin inhibitors. *Pharm Res*. 2017;34(1):58-72.
  98. Bhunia D, Pradhan K, Das G, Ghosh S, Mondal P, Ghosh S. Matrix metalloproteinase targeted peptide vesicles for delivering anticancer drugs. *Chem Commun*. 2018;54(67):9309-12.
  99. Xu C, Sun Y, Yu Y, Hu M, Yang C, Zhang Z. A sequentially responsive and structure-transformable nanoparticle with a comprehensively improved 'CAPIR cascade' for enhanced antitumor effect. *Nanoscale*. 17 de enero de 2019;11(3):1177-94.
  100. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer*. 2004;90(3):561-5.
  101. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. ExpASy - ProtParam tool [Internet]. 2020 [citado 3 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://web.expasy.org/protparam/>
  102. Merck Millipore. Technical note. Darmstadt, Alemania; 2000 mar p. 3. Report No.: TN226.
  103. Miles AJ, Wallace BA. CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data. *Protein Sci*. 2018;27(9):1717-22.
  104. Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol*. 2008;8(1):25.
  105. Lin K, Simossis VA, Taylor WR, Heringa J. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*. 2005;21(2):152-9.
  106. Ji S, Zhu Z, Hoyer TR, Macosko CW. Maleimide functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) (PCL-PEG-MAL): Synthesis, nanoparticle formation, and thiol conjugation. *Macromol Chem Phys*. 2009;210(10):823.

107. Wang R, Xiao R, Zeng Z, Xu L, Wang J. Application of poly(ethylene glycol)–distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) block copolymers and their derivatives as nanomaterials in drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4185-98.
108. Tyagi S, Lemke EA. Chapter 9 - Genetically encoded click chemistry for single-molecule FRET of proteins. En: Conn PM, editor. *Methods in Cell Biology* [Internet]. Academic Press; 2013 [citado 24 de mayo de 2022]. p. 169-87. (Laboratory Methods in Cell Biology; vol. 113). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124072398000094>
109. Gober IN, Riemen AJ, Villain M. Sequence sensitivity and pH dependence of maleimide conjugated N-terminal cysteine peptides to thiazine rearrangement. *J Pept Sci*. 2021;27(7):e3323.
110. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, et al. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J*. 2010;12(3):263-71.
111. Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *Int J Cosmet Sci*. 2013;35(5):491-501.
112. Castro P, Madureira R, Sarmiento B, Pintado M. 4.1 - Tissue-based in vitro and ex vivo models for buccal permeability studies. En: Sarmiento B, editor. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* [Internet]. Woodhead Publishing; 2016 [citado 22 de julio de 2022]. p. 189-202. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000946000122>
113. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals* [Internet]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [citado 29 de diciembre de 2021]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
114. Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, et al. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes \*. *J Biol Chem*. 1997;272(31):19115-24.
115. Aguayo V. *Micelas de núcleo lipídico funcionalizadas con una secuencia de aminoácidos direccionada a células cardíacas, entrega el fármaco carvedilol en células cardíacas in vitro*. [Santiago]: Universidad de Chile; 2021.
116. McEvoy JP. Characterizing carbonyls with infrared spectroscopy: An introductory chemistry experiment in a molecular bioscience program. *J Chem Educ*. 13 de mayo de 2014;91(5):726-9.
117. McCue JT. Chapter 25 - Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. En: Burgess RR, Deutscher MP, editores. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2009 [citado 7 de junio de 2022]. p. 405-14. (Guide to Protein Purification, 2nd Edition; vol. 463). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909630251>
118. Giacometti J, Josić D. Chapter 7 - Protein and peptide separations. En: Fanali S, Haddad PR, Poole CF, Schoenmakers P, Lloyd D, editores. *Liquid Chromatography* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2013 [citado 7 de junio de 2022]. p. 149-84. Disponible

- en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158061000073>
119. Enany S. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. *J Infect Public Health*. 1 de julio de 2014;7(4):296-307.
  120. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem (Tokyo)*. 1980;88(6):1895-8.
  121. Haney P, Konisky J, Koretke KK, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG. Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus *Methanococcus*. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 1997;28(1):117-30.
  122. Panda S, Chandra G. Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of other chordates. *Bioinformatics*. 21 de septiembre de 2012;8(18):891-6.
  123. Sahay A, Piprodhe A, Pise M. In silico analysis and homology modeling of strictosidine synthase involved in alkaloid biosynthesis in *catharanthus roseus*. *J Genet Eng Biotechnol*. 28 de agosto de 2020;18:44.
  124. Chang KY, Yang JR. Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. *PLOS ONE*. 5 de agosto de 2013;8(8):e70166.
  125. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 5 de mayo de 1982;157(1):105-32.
  126. Nelson D, Cox M. 3. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: Lehninger: Principios de bioquímica. 4ta ed. Nueva York, Estados Unidos: Macmillan Higher Education; 2005. p. 75-115.
  127. Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. abril de 2007;51(4):1398-406.
  128. Allen J, Pellois JP. Hydrophobicity is a key determinant in the activity of arginine-rich cell penetrating peptides. *Sci Rep*. 25 de septiembre de 2022;12(1):15981.
  129. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 de junio de 2015;112(24):E3095-103.
  130. Nelson D, Cox M. Tridimensional structure of proteins. En: Lehninger: Principles of Biochemistry. 5th ed. Barcelona: W.H. Freeman; 2009. p. 111-52.
  131. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2876-90.
  132. Lin K, Simossis VA, Taylor WR, Heringa J. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*. 15 de enero de 2005;21(2):152-9.
  133. Bystroff C, Krogh A. Hidden Markov models for prediction of protein features. En: Zaki MJ, Bystroff C, editores. *Protein Structure Prediction [Internet]*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [citado 21 de enero de 2020]. p. 173-98. (Methods in Molecular Biology™). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-574-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-574-9_7)
  134. Chakravarty D, Janin J, Robert CH, Chakrabarti P. Changes in protein structure at the interface accompanying complex formation. *IUCrJ*. 16 de octubre de 2015;2(Pt 6):643-52.

135. Gromiha MM. Chapter 1 - Proteins. En: Gromiha MM, editor. *Protein Bioinformatics* [Internet]. Singapore: Academic Press; 2010 [citado 12 de junio de 2022]. p. 1-27. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9788131222973500011>
136. Booth SG, Felisilda BMB, Alvarez de Eulate E, Gustafsson OJR, Arooj M, Mancera RL, et al. Secondary structural changes in proteins as a result of electroadsorption at aqueous–organogel interfaces. *Langmuir*. 30 de abril de 2019;35(17):5821-9.
137. Rehman I, Farooq M, Botelho S. *Biochemistry, Secondary Protein Structure* [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021 [citado 5 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470235/>
138. Tretyachenko V, Vymětal J, Bednárová L, Kopecký V, Hofbauerová K, Jindrová H, et al. Random protein sequences can form defined secondary structures and are well-tolerated in vivo. *Sci Rep*. 13 de noviembre de 2017;7(1):15449.
139. Coates J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [Internet]. American Cancer Society; 2006 [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a5606>
140. Das S, Kashyap N, Kalita S, Bora DB, Borah R. Chapter One - A brief insight into the physicochemical properties of room-temperature acidic ionic liquids and their catalytic applications in CC bond formation reactions. En: Williams IH, Williams NH, editores. *Advances in Physical Organic Chemistry* [Internet]. Academic Press; 2020 [citado 24 de junio de 2022]. p. 1-98. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065316020300022>
141. Northrop BH, Frayne SH, Choudhary U. Thiol–maleimide “click” chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity. *Polym Chem*. 2015;6(18):3415-30.
142. Ravasco JMJM, Faustino H, Trindade A, Gois PMP. Bioconjugation with maleimides: A useful tool for chemical biology. *Chem – Eur J*. 2019;25(1):43-59.
143. Paris C, Brun O, Pedroso E, Grandas A. Exploiting protected maleimides to modify oligonucleotides, peptides and peptide nucleic acids. *Molecules*. 2015;20(4):6389-408.
144. Christie RJ, Fleming R, Bezabeh B, Woods R, Mao S, Harper J, et al. Stabilization of cysteine-linked antibody drug conjugates with N-aryl maleimides. *J Controlled Release*. 2015;220:660-70.
145. Renault K, Fredy JW, Renard PY, Sabot C. Covalent Modification of Biomolecules through Maleimide-Based Labeling Strategies. *Bioconjug Chem*. 15 de agosto de 2018;29(8):2497-513.
146. Lu RM, Chang YL, Chen MS, Wu HC. Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery. *Biomaterials*. 2011;32(12):3265-74.
147. Martínez-Jothar L, Doukeridou S, Schiffelers RM, Sastre Torano J, Oliveira S, van Nostrum CF, et al. Insights into maleimide-thiol conjugation chemistry: Conditions for efficient surface functionalization of nanoparticles for receptor targeting. *J*

Controlled Release. 2018;282:101-9.

148. Lee JC, Donahue ND, Mao AS, Karim A, Komarneni M, Thomas EE, et al. Exploring maleimide-based nanoparticle surface engineering to control cellular interactions. *ACS Appl Nano Mater.* 2020;3(3):2421-9.

149. Bhasin N, Carl P, Harper S, Feng G, Lu H, Speicher DW, et al. Chemistry on a single protein, vascular cell adhesion molecule-1, during forced unfolding. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45865-74.

150. Fritz HF, Ortiz AC, Velaga SP, Morales JO. Preparation of a novel lipid-core micelle using a low-energy emulsification method. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8(6):1807-14.

151. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941-51.

152. Ganesan P, Narayanasamy D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain Chem Pharm.* 2017;6:37-56.

153. Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK. Chapter 10 - Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. En: Tekade RK, editor. *Basic Fundamentals of Drug Delivery* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 8 de agosto de 2022]. p. 369-400. (Advances in Pharmaceutical Product Development and Research). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128179093000108>

154. Nutan MTH, Reddy IK. General principles of suspensions. En: Kulshreshtha AK, Singh ON, Wall GM, editores. *Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing* [Internet]. New York, NY: Springer; 2010 [citado 3 de julio de 2022]. p. 39-65. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1087-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1087-5_2)

155. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Trop J Pharm Res.* 2013;12(2):265-73.

156. Arnida, Janát-Amsbury MM, Ray A, Peterson CM, Ghandehari H. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(3):417-23.

157. Santos J, Sousa F, Queiroz J, Costa D. Rhodamine based plasmid DNA nanoparticles for mitochondrial gene therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;121:129-40.

158. Watcharin W, Schmithals C, Pleli T, Köberle V, Korkusuz H, Huebner F, et al. Biodegradable human serum albumin nanoparticles as contrast agents for the detection of hepatocellular carcinoma by magnetic resonance imaging. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(1):132-41.

159. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. Polymeric micelle stability. *Nano Today.* 2012;7(1):53-65.

160. Mateos H, Palazzo G. Chapter 3 - Colloidal stability. En: Berti D, Palazzo G, editores. *Colloidal Foundations of Nanoscience (Second Edition)* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2022 [citado 3 de julio de 2022]. p. 57-83. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128220894000015>

161. Gumustas M, Sengel-Turk CT, Gumustas A, Ozkan SA, Uslu B. Chapter 5 - Effect of polymer-based nanoparticles on the assay of antimicrobial drug delivery systems. En: Grumezescu AM, editor. Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 3 de julio de 2022]. p. 67-108. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323527255000058>
162. Doroszkowski A. 6 - The physical chemistry of dispersion. En: Lambourne R, Strivens TA, editores. Paint and Surface Coatings (Second Edition) [Internet]. Woodhead Publishing; 1999 [citado 3 de julio de 2022]. p. 198-242. (Woodhead Publishing Series in Metals and Surface Engineering). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855733480500112>
163. Shi J. Steric Stabilization [Internet]. 2002 [citado 25 de noviembre de 2020]. Disponible en: </paper/Steric-Stabilization-Shi/0455bb654b4d4cc40803ea39d48815a5dfa50035>
164. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 de diciembre de 2006;58(15):1688-713.
165. Phan HT, Haes AJ. What does nanoparticle stability mean? *J Phys Chem C Nanomater Interfaces.* 2019;123(27):16495-507.
166. Silva YRE, Grigera JR. Micelle stability in water under a range of pressures and temperatures; do both have a common mechanism? *RSC Adv.* 17 de agosto de 2015;5(86):70005-9.
167. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. Polymeric micelle stability. *Nano Today.* 1 de febrero de 2012;7(1):53-65.
168. Reubsæet JLE, Beijnen JH, Bult A, van Maanen RJ, Marchal JAD, Underberg WJM. Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: physical instability. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17(6):979-84.
169. Graff DK, Pastrana-Rios B, Venyaminov SYu, Prendergast FG. The effects of chain length and thermal denaturation on helix-forming peptides: A mode-specific analysis using 2D FT-IR. *J Am Chem Soc.* 1997;119(46):11282-94.
170. Utterström J, Barriga HMG, Holme MN, Selegård R, Stevens MM, Aili D. Peptide-folding triggered phase separation and lipid membrane destabilization in cholesterol-rich lipid vesicles. *Bioconjug Chem.* 2022;33(4):736-46.
171. Dominy BN, Perl D, Schmid FX, Brooks CL. The effects of ionic strength on protein stability: The cold shock protein family. *J Mol Biol.* 31 de mayo de 2002;319(2):541-54.
172. Emèrson MF, Holtzer A. On the Ionic Strength Dependence of Micelle Number1,2. *J Phys Chem.* 1 de noviembre de 1965;69(11):3718-21.
173. Maeda H. A simple thermodynamic analysis of the stability of ionic/nonionic mixed micelles. *J Colloid Interface Sci.* 1 de junio de 1995;172(1):98-105.
174. Okamoto H, Mori K, Ohtsuka K, Ohuchi H, Ishii H. Effect of ionic strength on solution stability of PNU-67590A, a micellar prodrug of methylprednisolone. *Pharm Res.* septiembre de 1997;14(9):1181-5.
175. Tosi G, Costantino L, Rivasi F, Ruozi B, Leo E, Vergoni AV, et al. Targeting the

- central nervous system: In vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J Controlled Release*. 11 de septiembre de 2007;122(1):1-9.
176. Singh R. Chapter 1 - Introduction to membrane technology. En: Singh R, editor. *Membrane Technology and Engineering for Water Purification (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2015 [citado 8 de agosto de 2022]. p. 1-80. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044463362000001X>
177. D'Souza S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Adv Pharm*. 2014;2014:e304757.
178. Hua S. Comparison of in vitro dialysis release methods of loperamide-encapsulated liposomal gel for topical drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):735-44.
179. Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Controlled Release*. 2001;73(2):121-36.
180. Yoo J, Won YY. Phenomenology of the initial burst release of drugs from PLGA microparticles. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(11):6053-62.
181. Bruschi ML, editor. 5 - Mathematical models of drug release. En: *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* [Internet]. Woodhead Publishing; 2015 [citado 25 de junio de 2018]. p. 63-86. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000922000059>
182. Paul A, Laurila T, Vuorinen V, Divinski SV. Fick's Laws of Diffusion. En: Paul A, Laurila T, Vuorinen V, Divinski SV, editores. *Thermodynamics, Diffusion and the Kirkendall Effect in Solids* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [citado 22 de enero de 2020]. p. 115-39. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07461-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07461-0_3)
183. Ferreira JA, Grassi M, Gudiño E, de Oliveira P. A new look to non-Fickian diffusion. *Appl Math Model*. 1 de enero de 2015;39(1):194-204.
184. Gouda R, Baishya H, Qing Z. Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. *J Dev Drugs*. 2017;6(2):1-8.
185. Miao J, Tsige M, Taylor PL. Generalized model for the diffusion of solvents in glassy polymers: From Fickian to super case II. *J Chem Phys*. 28 de julio de 2017;147(4):044904.
186. Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm*. 22 de diciembre de 1989;57(2):169-72.
187. Unagolla JM, Jayasuriya AC. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 1 de marzo de 2018;114:199-209.
188. Son GH, Lee BJ, Cho CW. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *J Pharm Investig*. 2017;47(4):287-96.
189. El-Say KM, Hosny KM. Optimization of carvedilol solid lipid nanoparticles: An



- approach to control the release and enhance the oral bioavailability on rabbits. *PLOS ONE*. 30 de agosto de 2018;13(8):e0203405.
190. Dungan SR. Interfacial science and the creation of nanoparticles. En: *Nanotechnology and Functional Foods* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [citado 7 de abril de 2020]. p. 52-68. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118462157.ch4>
191. Brodin B, Steffansen B, Nielsen CU. Passive diffusion of drug substances: The concepts of flux and permeability. En: *Molecular Biopharmaceutics: Aspects of drug characterisation, drug delivery and dosage form evaluation*. 1st Edi. Pharmaceutica Press; 2010. p. 135-52.
192. Fatahi B, Khabbaz H, Fatahi B. Chapter 8 - Improving Geotechnical Properties of Closed Landfills for Redevelopment Using Chemical Stabilization Techniques: A Case Study on Samples of a Landfill Site in Southwest of Sydney. En: Indraratna B, Chu J, Rujikiatkamjorn C, editores. *Ground Improvement Case Histories* [Internet]. Butterworth-Heinemann; 2015 [citado 8 de marzo de 2019]. p. 239-66. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081001912000083>
193. Kladt C, Dennerlein K, Göen T, Drexler H, Korinth G. Evaluation on the reliability of the permeability coefficient (Kp) to assess the percutaneous penetration property of chemicals on the basis of Flynn's dataset. *Int Arch Occup Environ Health*. 1 de mayo de 2018;91(4):467-77.
194. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28(5):359-70.
195. Vale N, Ferreira A, Matos J, Fresco P, Gouveia MJ. Amino acids in the development of prodrugs. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem*. 2018;23(9):2318.
196. Perry CM, Faulds D. Valaciclovir. *Drugs*. 1996;52(5):754-72.
197. Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, Paya CV, Pirsch J, Freeman RB, et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(10):2811-5.
198. Wu Z, Drach JC, Prichard MN, Yanachkova M, Yanachkov I, Bowlin TL, et al. L-valine ester of cyclopropavir - a new antiviral prodrug. *Antivir Chem Chemother*. 2009;20(1):37-46.
199. Subramanian P. Mucoadhesive delivery system: A smart way to improve bioavailability of nutraceuticals. *Foods*. 2021;10(6):1362.
200. Duchêne D, Ponchel G. Principle and investigation of the bioadhesion mechanism of solid dosage forms. *Biomaterials*. 1992;13(10):709-14.
201. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. *J Controlled Release*. 2006;114(1):15-40.
202. Colombo P, Cagnani S, Sonvico F, Santi P, Russo P, Colombo G. 5.12 - Biological in vitro models for absorption by nonoral routes. En: Taylor JB, Triggler DJ, editores. *Comprehensive Medicinal Chemistry II* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2007 [citado 22 de julio de 2022]. p. 279-99. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B008045044X001279>

203. Enderle JD. Chapter 7 - Compartmental modeling. En: Enderle JD, Bronzino JD, editores. *Introduction to Biomedical Engineering (Third Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2012 [citado 10 de septiembre de 2022]. p. 359-445. (Biomedical Engineering). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749796000071>
204. Bolla PK, Clark BA, Juluri A, Cheruvu HS, Renukuntla J. Evaluation of formulation parameters on permeation of ibuprofen from topical formulations using Strat-M® membrane. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):151.
205. Ganem-Quintanar A, Falson-Rieg F, Buri P. Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 de septiembre de 1997;44(2):107-20.
206. Padula C, Pescina S, Nicoli S, Santi P. New insights on the mechanism of fatty acids as buccal permeation enhancers. *Pharmaceutics* [Internet]. 24 de octubre de 2018 [citado 13 de febrero de 2019];10(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321376/>
207. Dawson DV, Drake DR, Hill JR, Brogden KA, Fischer CL, Wertz PW. Organization, barrier function and antimicrobial lipids of the oral mucosa. *Int J Cosmet Sci*. junio de 2013;35(3):220-3.
208. Hassan N, Ahad A, Ali M, Ali J. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(1):97-112.
209. Velmurugan S, Dodla S. Buccal penetration enhancers: An overview. *Asian J Pharm Clin Res*. 1 de julio de 2013;6(3):39-47.
210. Shah SNH, Tahir MA, Safdar A, Riaz R, Shahzad Y, Rabbani M, et al. Effect of permeation enhancers on the release behavior and permeation kinetics of novel tramadol lotions. *Trop J Pharm Res*. 1 de enero de 2013;12(1):27-32-32.
211. Hua S. Advances in nanoparticulate drug delivery approaches for sublingual and buccal administration. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019 [citado 12 de julio de 2022];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01328>
212. Roblegg E, Fröhlich E, Meindl C, Teubl B, Zaversky M, Zimmer A. Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology*. 2012;6(4):399-413.
213. Teubl BJ, Meindl C, Eitzlmayr A, Zimmer A, Fröhlich E, Roblegg E. In-vitro permeability of neutral polystyrene particles via buccal mucosa. *Small*. 2013;9(3):457-66.
214. Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang YY, Cone R, et al. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1482-7.
215. Chaves P dos S, Ourique AF, Frank LA, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;114:88-95.
216. Witten J, Samad T, Ribbeck K. Selective permeability of mucus barriers. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;52:124-33.
217. Xu Y, Zhang X, Wang N, Pei X, Guo Y, Wang J, et al. Cell-penetrating peptide enhanced insulin buccal absorption. *Int J Pharm*. 2020;584:119469.

218. Keum T, Noh G, Seo JE, Bashyal S, Lee S. In vitro and ex vivo evaluation of penetratin as a non-invasive permeation enhancer in the penetration of salmon calcitonin through TR146 buccal cells and porcine buccal tissues. *Pharmaceuticals*. 2020;13(11):408.
219. Morales JO, Huang S, Williams RO, McConville JT. Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;122:38-45.
220. Mazzarino L, Borsali R, Lemos-Senna E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. *J Pharm Sci*. 2014;103(11):3764-71.
221. Laffleur F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014;40(5):591-8.
222. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather SI, Li X, Jasti B. Porcine buccal mucosa as an in vitro model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *J Pharm Sci*. 2009;98(2):471-83.
223. Pinto S, Pintado ME, Sarmento B. In vivo, ex vivo and in vitro assessment of buccal permeation of drugs from delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2020;17(1):33-48.
224. Yao C, Chen B, Kang Z, Liu Y, Qi X, Wang Q. Binding, selectivity and sequence recognition of matrix metalloproteinase-2 to oligopeptides. *J Biomol Struct Dyn*. 2020;38(1):275-82.
225. Banerjee J, Hanson AJ, Gadam B, Elegbede AI, Tobwala S, Ganguly B, et al. Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9. *Bioconjug Chem*. 15 de julio de 2009;20(7):1332-9.
226. Kulkarni PS, Haldar MK, Nahire RR, Katti P, Ambre AH, Muhonen WW, et al. MMP-9 responsive PEG cleavable nanovesicles for efficient delivery of chemotherapeutics to pancreatic cancer. *Mol Pharm*. 7 de julio de 2014;11(7):2390-9.
227. Pelmeshnikov V, Siegbahn PEM. Catalytic mechanism of matrix metalloproteinases: Two-layered ONIOM study. *Inorg Chem*. 2002;41(22):5659-66.
228. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2010;1803(1):20-8.
229. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020;9(5):1076.
230. Almeida LGN de, Thode H, Eslambolchi Y, Chopra S, Young D, Gill S, et al. Matrix metalloproteinases: From molecular mechanisms to physiology, pathophysiology, and pharmacology. Schulte G, editor. *Pharmacol Rev*. 2022;74(3):712-68.
231. Feng Z, Xu B. Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches. *Biomol Concepts*. 2016;7(3):179-87.
232. Aschi M, Besker N, Re N, Pochetti G, Coletti C, Gallina C, et al. Stereoselectivity by enantiomeric inhibitors of matrix metalloproteinase-8: New insights from molecular dynamics simulations. *J Med Chem*. 2007;50(2):211-8.
233. Nelson D, Cox M. 6. Enzimas. En: Lehninger: Principios de bioquímica. 4ta ed.

- Nueva York, Estados Unidos: Macmillan Higher Education; 2005. p. 190-237.
234. Cabaleiro-Lago C, Lundqvist M. The effect of nanoparticles on the structure and enzymatic activity of human carbonic anhydrase I and II. *Molecules*. 2020;25(19):4405.
235. Assarsson A, Pastoriza-Santos I, Cabaleiro-Lago C. Inactivation and adsorption of human carbonic anhydrase II by nanoparticles. *Langmuir*. 2014;30(31):9448-56.
236. Nasir I, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C. Size and surface chemistry of nanoparticles lead to a variant behavior in the unfolding dynamics of human carbonic anhydrase. *Nanoscale*. 2015;7(41):17504-15.
237. Assarsson A, Nasir I, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C. Kinetic and thermodynamic study of the interactions between human carbonic anhydrase variants and polystyrene nanoparticles of different size. *RSC Adv*. 2016;6(42):35868-74.
238. Zhu J, He P, Lin L, Jones DR, Marchant RE. Biomimetic poly(ethylene glycol)-based hydrogels as scaffolds for inducing endothelial adhesion and capillary-like network formation. *Biomacromolecules*. 2012;13(3):706-13.
239. Ehler E, Moore-Morris T, Lange S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp JoVE*. 6 de septiembre de 2013;(79):50154.
240. Salameh A, Dhein S. Culture of Neonatal Cardiomyocytes. En: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, editores. *Practical Methods in Cardiovascular Research* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 [citado 5 de diciembre de 2022]. p. 568-76. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0\\_29](https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_29)
241. Pereira AHM, Cardoso AC, Franchini KG. Isolation, culture, and immunostaining of neonatal rat ventricular myocytes. *STAR Protoc*. 17 de diciembre de 2021;2(4):100950.
242. Valcourt U, Alcaraz LB, Exposito JY, Lethias C, Bartholin L. Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adhes Migr*. 2015;9(1-2):154-65.
243. Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: Multifunctional and mysterious. *J Biol Chem*. 2005;280(29):26641-4.
244. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol*. 2003;200(4):488-99.
245. Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K ichi, Hara M, Sakakura T, Yoshida T. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation*. 2003;71(4):291-8.
246. Matsumoto K ichi, Aoki H. The roles of tenascins in cardiovascular, inflammatory, and heritable connective tissue diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado 26 de julio de 2022];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.609752>
247. Jing L, Zhou L jun, Zhang F min, Li W min, Sang Y. Tenascin-X facilitates myocardial fibrosis and cardiac remodeling through transforming growth factor- $\beta$ 1 and peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  in alcoholic cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(3):390-5.
248. Petersen JW, Douglas JY. Tenascin-X, collagen, and Ehlers-Danlos syndrome: Tenascin-X gene defects can protect against adverse cardiovascular events. *Med Hypotheses*. 2013;81(3):443-7.
249. Zweers MC, van Vlijmen-Willems IM, van Kuppevelt TH, Mecham RP, Steijlen

- PM, Bristow J, et al. Deficiency of tenascin-X causes abnormalities in dermal elastic fiber morphology. *J Invest Dermatol*. 2004;122(4):885-91.
250. Miller WL, Merke DP. Tenascin-X, congenital adrenal hyperplasia, and the CAH-X syndrome. *Horm Res Paediatr*. 2018;89(5):352-61.
251. Bradshaw AD, Sage EH. Chapter 11 - Regulation of cell behavior by matricellular proteins. En: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, editores. *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2000 [citado 27 de julio de 2022]. p. 119-27. (Tissue Engineering Intelligence Unit). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124366305500155>
252. Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, et al. Tenascin-C is an endogenous activator of toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med*. 2009;15(7):774-80.
253. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(3):a004994.
254. Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res*. 2014;114(3):572-86.
255. Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Maltsev OV, Cavalcanti-Adam EA, Zarka R, et al. A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins. *Sci Rep*. 2017;7(1):39805.
256. Humphries MJ. Peptide recognition motifs involved in the binding of integrins to their ligands. *Kidney Int*. 1992;41(3):645-9.
257. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12(1):697-715.
258. Hamaia SW, Pugh N, Raynal N, Némoy B, Stone R, Gullberg D, et al. Mapping of potent and specific binding motifs, GLOGEN and GVOGEA, for integrin  $\alpha 1\beta 1$  using collagen toolkits II and III. *J Biol Chem*. 2012;287(31):26019-28.
259. Haglund L, Tillgren V, Addis L, Wenglén C, Recklies A, Heinegård D. Identification and characterization of the integrin  $\alpha 2\beta 1$  binding motif in chondroadherin mediating cell attachment. *J Biol Chem*. 2011;286(5):3925-34.
260. Adams JC, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. The evolution of tenascins and fibronectin. *Cell Adhes Migr*. 2015;9(1-2):22-33.
261. Ross RS. The extracellular connections: The role of integrins in myocardial remodeling. *J Card Fail*. 2002;8(6, Part B):S326-31.
262. Harston RK, Kuppaswamy D. Integrins are the necessary links to hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J Signal Transduct*. 2011;2011:521742.
263. Jee JG, Ikegami T, Hashimoto M, Kawabata T, Ikeguchi M, Watanabe T, et al. Solution structure of the fibronectin type III domain from *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J Biol Chem*. 2002;277(2):1388-97.
264. Porebski BT, Nickson AA, Hoke DE, Hunter MR, Zhu L, McGowan S, et al. Structural and dynamic properties that govern the stability of an engineered fibronectin type III domain. *Protein Eng Des Sel*. 2015;28(3):67-78.
265. Koide A, Bailey CW, Huang X, Koide S. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins | Edited by J. Wells. *J Mol Biol*. 1998;284(4):1141-51.

266. Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong N huu, Ruoslahti E, et al. Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *J Mol Biol.* 1994;236(4):1079-92.
267. Danen EHJ. Integrins: An overview of structural and functional aspects [Internet]. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [citado 7 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6259/>
268. Arimori T, Miyazaki N, Mihara E, Takizawa M, Taniguchi Y, Cabañas C, et al. Structural mechanism of laminin recognition by integrin. *Nat Commun.* 2021;12(1):4012.
269. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:619-47.
270. Ma X, Serna A, Xu RH, Sigal LJ. The amino acids sequences flanking an antigenic determinant can strongly affect MHC class I cross-presentation without altering direct-presentation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2009;182(8):4601-7.
271. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-directing CD4+ T cell responses with the flanking residues of MHC class II-bound peptides: The core is not enough. *Front Immunol [Internet].* 2013 [citado 7 de agosto de 2022];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00172>
272. Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci.* 2009;122(2):165-70.
273. Arnaout MA, Goodman S, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):495-507.
274. Li J, Yan J, Springer TA. Low-affinity integrin states have faster ligand-binding kinetics than the high-affinity state. Fässler R, Faraldo-Gómez JD, Fässler R, editores. *eLife.* 2021;10:e73359.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1: Tabla de aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos

Aminoácido	Código	Grupo protector de cadena lateral	Masa molecular (g/mol)
Ácido glutámico	E	<i>t</i> -butiloxilo	425,47
Alanina	A	Sin protección	311,33
Arginina	R	Pentaetildihidrobenzofuran-5-sulfonilo	648,77
Cisteína	C	Titrilo	585,71
Glicina	G	Sin protección	297,31
Glutamina	Q	Titrilo	610,70
Isoleucina	I	Sin protección	353,41
Leucina	L	Sin protección	353,41
Prolina	P	Sin protección	337,37
Serina	S	<i>t</i> -butilo	383,44
Treonina	T	<i>t</i> -butilo	397,46
Triptófano	W	<i>t</i> -butiloxicarbonilo	526,58
Valina	V	Sin protección	339,39