

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**DISEÑO DE VECTORES A BASE DE GLICOCONJUGADOS PARA EL
TRANSPORTE Y ENTREGA DE FÁRMACOS ANTITUMORALES
HACIA LINEAS CELULARES DE CÁNCER DE ORIGEN HEPÁTICO**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

María Elena Anguiano Lizárraga

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como
openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de María Elena Anguiano Lizárraga hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “DISEÑO DE VECTORES A BASE DE GLICOCONJUGADOS PARA EL TRANSPORTE Y ENTREGA DE FÁRMACOS ANTITUMORALES HACIA LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE ORIGEN HEPÁTICO” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dr. Jose Andre-i Sarabia Sainz

Presidente

Dra. Aracely Angulo Molina

Secretario

Dra. Luisa Alondra Rascón V.

Vocal

Dra. Olivia Valenzuela

Suplente

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado fue posible desarrollarlo gracias al esfuerzo de personas que colaboraron, apoyándome en todo momento y sabiéndome guiar por caminos que no conocía, debido a esto estoy profundamente agradecida por el tiempo, la paciencia, el apoyo y los buenos consejos que me brindaron.

Agradezco a Universidad De Sonora, mi alma mater por el apoyo brindado durante la estancia de mi formación académica.

Agradezco al Departamento de Investigación de Física de la Universidad de Sonora por haberme otorgado la oportunidad de colaborar en este trabajo, al igual por todo el apoyo recibido.

Con gran admiración agradezco profundamente al Dr. Jose Andre-i Sarabia Sainz por brindarme la oportunidad, por guiarme y ser un excelente director, además por sus consejos, su apoyo y por la confianza que depositó en mí, al igual, por ser una excelente persona y un gran ejemplo a seguir.

Agradezco al Centro de Investigación de Alimentos y Desarrollo A.C., en especial al área de Ciencias de los Alimentos por el apoyo brindado y la oportunidad de utilizar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a todo mi comité al Dr. Jose Andre-i Sarabia Sainz, a la Dra. Aracely Angulo Molina, a la Dra. Luisa Alondra Rascón Valenzuela, y a la Dra. Olivia Valenzuela Antelo, por su guía y apoyo brindado.

Agradezco por el apoyo técnico brindado al M. en C. Amed Gallegos, a la M. en C. Ana María Guzmán, al M. en C. Sergio Hernández, a la Dra. Erika Silva y al Dr. Alexel Burgara.

Dedicatoria

Dedico este trabajo con todo mi amor a mis padres de crianza Rafael Lizárraga Acosta y María Elena Martínez Herrera, agradezco su amor, su apoyo y el ejemplo que durante mi vida me han brindado, por enseñarme a ser humilde, honrada y siempre llevar la frente en alto. Por enseñarme que no hay recompensas sin sacrificio, logros sin trabajo, o metas cumplidas sin esfuerzo.

Agradezco a mis padres Miguel Anguiano Lozano y Josefita Lizárraga Martínez por su amor y su apoyo, a mi hermano Rafael Anguiano Lizárraga, a mi sobrina Evelyn Anguiano por llenarme de alegría con sus travesuras y brindándome su amor incondicional e inocente, al resto de mi familia a mis tíos María Dolores Lizarraga y Simón Zepeda, al igual que mis primos que considero mis hermanos Paola, Ana y Simón por todo el cariño sincero que me han brindado, y decirme todo el tiempo “tu puedes”.

Finalmente agradezco con todo mi amor a mi prometido Alberto Wilson por ser mi pilar, mi amigo, por darme la fuerza necesaria que hacía que siguiera avanzando día a día, por amarme incondicionalmente como yo a él, y apoyarme en todo momento, al igual por pasar a mi lado todas esas noches en vela que pase durante este tiempo, por no dejarme sola en ningún momento.

CONTENIDO

VOTOS APROBATORIOS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO PRINCIPAL.....	5
Objetivos Específicos	5
ANTECEDENTES.....	6
Nanotecnología.....	6
Aplicación de la Nanotecnología en el Área de la Farmacología	7
Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos.....	8
Matrices poliméricas para transporte de medicamentos	9
Transporte o Vectorización de Medicamentos de Forma Pasiva	10
Transporte pasivo por aumento de la permeabilidad y retención (EPR) de la zona afectada.....	11
Transporte o Vectorización de Forma Activa	13
Mecanismos de vectorización activa	13
Ligandos y Receptores	14
Ligando específicos.....	15
Gliconjugados.....	16
Gliconanotecnología	16
Glicoproteínas.....	17
Aplicaciones de la gliconanotecnología	19
Cáncer: Generalidades	19
Cáncer Hepático	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23

Materiales	23
Métodos.....	23
Glicación de la Albúmina.....	23
Caracterización de la Albúmina.....	24
Síntesis de Nanopartículas de Albúmina.....	25
Caracterización de las Nanopartículas	25
Observación morfológica mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	25
Ensayos de Bioreconocimiento de la Nanopartículas	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Caracterización de la albúmina glicada.....	27
Caracterización de las Gliconopartículas	30
.....	33
RESUMEN DE HALLAZGOS	35
CONCLUSIÓN	36
REFERENCIAS	37

LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
1. Principales biomateriales usados para la encapsulación de medicamentos.	9
2. Condiciones de glicación de la BSA	22

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1. Nanotubos de carbono, (A) nanotubos de pared simple y (B) nanotubos de doble pared	7
2. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco	9
3. Deposición de nanopartículas según el tamaño en los principales órganos del cuerpo humano	11
4. Efecto EPR. Acumulación de nanopartículas en células tumorales	12
5. Reconocimiento de un liposoma con residuos de galactosa en la superficie a nivel de hepatocitos	14
6. Ejemplos de ligando y receptores	14
7. La creciente área de la gliconanotecnología	16
8. Representación gráfica de las principales reacciones usadas para la modificación de macromoléculas con carbohidratos	18
9. Composición del hígado	21
10. Electroforesis SDS-PAGE (10 %), Carril A y G, estándares de masa molecular; Carril B y H, BSA sin tratar; Carril C, BSA@GOS; Carril D, BSA@Lactosa; Carril E, BSA@AcLac; Carril F, BSA@AcLacEDC; Carril I, BSA-Lac	27
11. FT-IR. Comparación del espectro FT-IR de los diferentes productos obtenidos en las reacciones de adición de carbohidratos. La franja azul, indica la región de $900-1199\text{ cm}^{-1}$, la cual es reconocida como huella dactilar para los carbohidratos. La BSA se usó como control negativo	28
12. Ensayos con lectinas ligadas a enzimas (ELLAs). La BSA sometida a modificación con carbohidratos, fueron inmovilizada en placas de ELISA y expuesta a las lectinas de RCA	29
13. Caracterización morfológica de las nanopartículas mediante Microscopía Electronica de Barrido. (A) Nanopartículas de BSA;(B) Nanopartículas de BSA-Lac (C) Amplificación ($\times 70,000$) de Nanopartículas de BSA-Lac	30
14. Estimación de tamaños (DLS, columna izquierda) y carga superficial (Potencial Z, columna derecha) de las nanopartículas obtenidas	32
15. Ensayo de bio-reconocimiento con células, en el lado izquierdo se muestra la interacción de las nanopartículas marcadas con FITC con las células Hep G2 a los 30 y 90 minutos. Del lado derecho se observa la interacción de las nanopartículas con las células HeLa en los mismos tiempos que en la anterior	34

RESUMEN

Hoy en día las terapias utilizadas contra el cáncer de hígado como la quimioterapia y radioterapia causan diversos efectos adversos para los pacientes, disminuyendo así su calidad de vida. La nanomedicina, es una ciencia emergente en la lucha contra el cáncer, y tiene como objetivo el aplicar nanoestructuras que ayuden al diagnóstico, tratamiento, monitoreo y control de la enfermedad. Recientemente se han enfocado los esfuerzos para la búsqueda y desarrollo de nano transportadores que brinden un sistema de liberación controlada del fármaco y además sea tejido-específico, para así, minimizar los efectos secundarios de la terapia en el paciente, y asegure el éxito de la terapia contra el cáncer. En el caso específico del cáncer de hígado o carcinoma hepatocelular, las células afectadas por este padecimiento son los hepatocitos, los cuales cuentan con ciertas características únicas como es la presencia en su membrana de un receptor de asialoglicoproteína, el cual reconoce hidratos de carbono en especial galactosa. En este trabajo, modificamos albúmina sérica bovina (BSA) lactosa, para obtener neoglicanos, se utilizaron diferentes métodos de modificación de la BSA, la glicación se evaluó por medio de electroforesis, espectroscopia de infrarrojo y fluorescencia, al igual se realizó ensayos de bio-reconocimiento con Ricinus comunis aglutinina I (RCA), obteniendo tres modificaciones que fueron altamente reconocidas por RCA I. Posteriormente se sintetizaron gliconanoparticulas, a las cuales fueron evaluadas por medio de dispersión dinámica de la luz (DLS), potencial Z y espectroscopia electrónica de barrido (SEM). Se realizaron ensayos de bio-reconocimiento con células HepG2 y HeLa que son líneas celulares cancerígenas de estirpe diferente, mediante microscopía Confocal. En este trabajo se obtuvo como resultado el reconocimiento de las nanopartículas por parte de las células HepG2 procedentes de carcinoma hepatocelular, demostrando así que podrían ser utilizadas como transporte para un fármaco antitumoral.

INTRODUCCIÓN

El cáncer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. Según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), en nuestro país, este padecimiento es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. Además, la Secretaría de Salud registró para el año 2010, 70 mil 445 defunciones por cáncer, siendo el cáncer de hígado (CH) el tercer y cuarto tipo de tumores malignos que más afecta a hombres y mujeres, respectivamente (INEGI (2014)). El índice de fatalidad del CH es de 0.99, es decir, casi el 100 % de las personas que enferman, muere (Aldaco-Sarvide 2012). Sin embargo, cuando no hay un proceso cirrótico subyacente, la sobrevivencia a 5 años de los pacientes con CH llega al 75 %. En cambio, en el 90 % de los casos de pacientes que presentan una cirrosis previa, la sobrevivencia a 5 años es del 5 al 15%. Lo anterior es importante si se considera que en México un poco más de 32 millones de personas de 12 a 65 años consumen alcohol y son proclives a enfermar de cirrosis, aumentando a la vez su riesgo al cáncer de hígado. Dada la gran relevancia de esta enfermedad, es necesario seguir trabajando para obtener nuevas y eficientes técnicas de diagnóstico y tratamiento.

El tratamiento de tumores cancerosos implica el uso de fármacos altamente tóxicos. Por lo que estrategias que permitan reducir las dosis y de preferencia que sean tejido-dirigidas serían de gran beneficio a los pacientes en la prevención de efectos secundarios. La nanotecnología interviene con el desarrollo y aplicación de nano-vehículos de fármacos (Drug Delivery, por su término en inglés), posibilitando la liberación controlada de los mismos. Más aún, permite la incorporación de elementos moleculares para localizar un tejido dañado o un tumor cancerígeno, y dirigir el fármaco de manera específica (Targeted Drug Delivery). Aunque actualmente, los costos por las nuevas terapias son altos, se plantea que la terapia dirigida del cáncer podrá reducir los costos en un mediano plazo (Mariotto, Yabroff et al. 2011).

A la fecha, los principales vehículos de fármacos se basan en compuestos inorgánicos y orgánicos. Entre éstos, la albúmina tiene varias ventajas: es un material fisiológico, biodegradable y de baja alergenicidad; la síntesis de partículas resulta fácil y reproducible; los diversos grupos funcionales que presenta esta proteína pueden ser utilizados para unir

moléculas de orientación específica de fármacos. Asimismo, la Administración de Drogas y Alimentos, aprobó el uso de nanopartículas de albúmina para el transporte de fármacos en pacientes humanos.

Actualmente se investigan más de 100 agentes terapéuticos y de diagnóstico incorporados en micro y nanopartículas de albúmina (Dandagi, Mastiholimath et al. 2006). Sin embargo, a pesar de las grandes ventajas de la albúmina para transportar medicamentos, la entrega de éstos sigue siendo inespecífica. Es decir, no son terapias dirigidas.

La dirección de un vector hacia un sitio localizado en el organismo puede conseguirse emulando a la naturaleza y aprovechando moléculas biológicas que sean reconocidas o que reconozcan a la célula cancerígena. Es decir, cualquier molécula implicada en fenómenos de bio-reconocimiento bioquímico, puede ser usada, incorporada a la superficie de una nanocápsula, para producir un transportador con orientación o especificidad (Kumar Khanna 2012). De esta manera, la función principal del transportador, será, distinguir entre una célula tumoral y una normal para eficientar así, la terapia y evitar los daños colaterales asociados a los medicamentos.

Aplicando este principio, en los hepatocitos se ha estudiado un receptor conocido como receptor de asialoglicoproteínas (RAGP), el cual reconoce carbohidratos, específicamente a la galactosa. El RAGP capta glicoproteínas al finalizar su vida media, retirándolas del torrente sanguíneo. Cuando estas glicoproteínas son sintetizadas, sus oligosacáridos contienen residuos de ácido siálico terminal. A medida que transcurre el tiempo el ácido siálico es eliminado y residuos de galactosa quedan expuestos; estos últimos son detectados por los RAGPs de las células hepáticas. Así, el complejo formado (RAGP-glicoproteína) se introduce en la célula hepática (endocitosis) para degradar a la proteína por acción de los lisosomas. Se estima que el RAGP se encuentra con una densidad de 500 000 moléculas por hepatocito y además su expresión persiste cuando se presentan los hepatomas (Han, Oh et al. 1999).

El mecanismo de bio-reconocimiento del receptor RAGP puede aprovecharse para dirigir nanopartículas hacia el hígado, si se coloca en la superficie de estos vehículos, un elemento de reconocimiento adecuado. A través de este último, la nanopartícula se uniría al receptor RAGP, para ser endocitada, posteriormente degradada, liberando el fármaco terapéutico. Por lo anterior, la presente propuesta pretende aprovechar la interacción RAGPs-galactosa para sintetizar nanopartículas galactosiladas y cargadas con fármacos antitumorales a fin de dirigirlas a las células del hígado. Parte de nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia en interacciones receptores-carbohidrato, demostrando recientemente que la lactosilación de albúmina (vía reacción de Schiff),

produce neoglicanos que son reconocidos por lectinas vegetales y adhesinas bacterianas específicas para galactosas (Ledesma-Osuna, Ramos-Clamont et al. 2009, Sarabia-Sainz, Ramos-Clamont et al. 2011). Asimismo, otros han reportado el reconocimiento de los RAGP hacia elementos que contienen galactosa por albuminas modificadas. Por ello planteamos desarrollar sistemas nanoestructurados a partir de albúmina galactosilada para el transporte de doxorubicina, el cual es un agente antitumoral eficiente para cáncer hepático. De esta forma, los residuos de galactosas podrían ser susceptibles de bio-reconocimiento por parte de los receptores de asialoglicoproteínas llevando a cabo un transporte y liberación de doxorubicina, orientados específicamente a las células hepáticas, es decir, se obtendrá una terapia dirigida.

OBJETIVO PRINCIPAL

Obtención de un glicoconjugado a partir de albumina y galactosa que sirvan para la síntesis de nanovectores tejido-específicos para entrega de fármacos antitumorales hacia líneas celulares de cáncer de origen hepático.

Objetivos Específicos

1. Modificar albúmina sérica bovina (BSA) con carbohidratos basados en galactosa.
2. Caracterización de la albúmina modificada, mediante electroforesis SDS-PAGE y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).
3. Síntesis de nanopartículas y evaluación de bio-reconocimiento por el receptor de asialoglicoproteínas presente en líneas celulares de cáncer de origen hepático.

ANTECEDENTES

Nanotecnología

Gracias a los avances científicos sobre la manipulación, preparación, modificación y caracterización de materiales a escala nanométrica, se ha obtenido el conocimiento de cómo es el comportamiento de la materia a nivel atómico o molecular. Lo anterior ha llevado a una nueva área del estudio denominada Nanotecnología. En la actualidad, la investigación en nanotecnología aplicada al área de la medicina es ampliamente reconocida como una de las principales promesas para el combate a diferentes tipos de patologías. La aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico, tratamiento, monitoreo y control de sistemas biológicos es denominada nanomedicina (Pimentel, Júnior et al. 2007). El reto de la nanomedicina es vigilar, controlar, construir, reparar y proteger todos los sistemas biológicos humanos mediante una intervención a escala molecular y nanométrica para beneficio de la salud de las personas (Boisseau and Loubaton 2011). De forma específica, este nuevo campo de estudio, abre un panorama alentador en cuestión de la investigación para la terapia del cáncer.

En la actualidad, en el área de la medicina se ha desarrollado nuevas investigaciones utilizando la nanotecnología. Su aplicación en el diagnóstico, tratamiento, monitoreo y control de sistemas biológicos es denominada nanomedicina. Esto abre un nuevo panorama en cuestión de la investigación en cáncer, ilustra muchas de las potencialidades de la nanobiotecnología a largo plazo ya que es de esperar que ayude a desarrollar una terapia anticáncer.

Diversos estudios que indican lo factible de la nanotecnología para los tratamientos personalizados y regenerativos. Por ejemplo, tenemos el trabajo realizado en la universidad de Stanford, donde científicos han utilizado nanotubos de carbono con capacidad de aumentar la temperatura cuando son expuestos a la luz de un láser (Figura 1). Esta propiedad es utilizada de forma experimental en ratones con linfoma inducido, observando la reducción de las células cancerosas mediante la simple exposición de la piel del ratón a la

luz láser. También se menciona la inyección directa en el tumor, que posteriormente será expuesto a la luz cercana al infrarrojo y que destruiría el tejido (Pimentel, Júnior et al. 2007).

Otro de los objetivos de la nanomedicina es transportar medicamento y liberarlo de forma controlada, obteniendo concentraciones sostenidas del fármaco durante un periodo prolongado y reduciendo la necesidad de administrar dosis repetidamente (Edlund and Albertsson 2002). Actualmente se trabaja en obtener un sistema de transporte de fármacos que reconozca la zona afectada y libere el medicamento selectivamente (*targeting therapy*) (Gerber 2008).

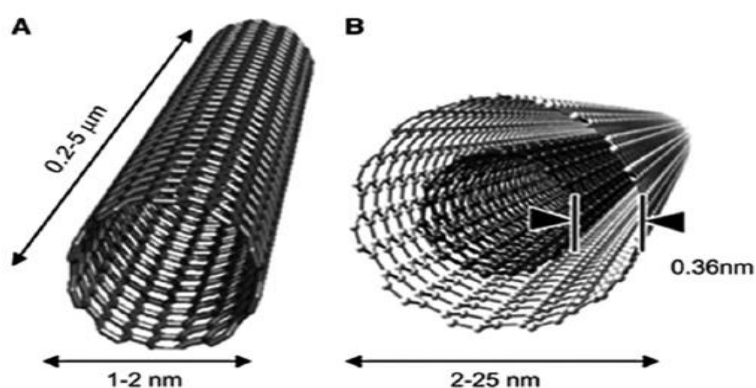


Figura 1. Nanotubos de carbono, (A) nanotubos de pared simple y (B) nanotubos de doble pared.

Aplicación de la Nanotecnología en el Área de la Farmacología

La farmacología puede definirse como el estudio de sustancias que interactúan con los sistemas vivos a través de procesos bioquímicos, para regular, activar o inhibir procesos corporales normales o anormales (Bertram and Katzung 2002). Un fármaco es cualquier sustancia que produzca un cambio en la función biológica a través de sus acciones químicas (Talevi, Quiroga et al. 2016). Para llevar a cabo una apropiada acción de dicho fármaco, es necesario tomar en cuenta diversos factores como el medio fisiológico en el que se encuentran, la vía de administración, las barreras fisiológicas a traspasar, las propiedades fisicoquímicas del propio fármaco y la especificidad de la misma (Santa and López Osorio 2013). Uno de los problemas de la bio-distribución de los fármacos es la falta de

especificidad, es decir acción se puede presentar en tejidos donde no se requiere, además de la posibilidad de alcanzar concentraciones que pudiera traer como resultado efectos secundarios indeseables en el organismo.

El uso de sistemas de transporte que permita orientar a los fármacos, sea de forma pasiva (biodistribución sistémica inespecífica) o de forma activa (biodistribución orientada a un sitio diana), puede representar grandes ventajas comparado con la administración de fármacos convencionales (Bertrand, Wu et al. 2014). En este sentido, un vector con capacidad de concentrar fármacos en el lugar requerido y en la forma adecuada será de gran relevancia en el tratamiento de patologías.

Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos

La forma clásica para administrar medicamentos se basa en el uso de tabletas, comprimidos, ungüentos tópicos y soluciones vía intravenosa. Estas formas de administrar los medicamentos presentan la limitante en cuanto al bajo control sobre la manera y cantidad de fármaco que llega al lugar deseado. Para asegurar concentraciones adecuadas del medicamento, normalmente se requieren administraciones repetidas, lo que ocasionalmente lleva a fluctuaciones en la concentración del fármaco fuera de la ventana terapéutica necesaria (Rojas-Aguirre, Aguado-Castrejón et al. 2016). Asimismo, el fármaco está expuesto a los mecanismos de depuración del propio sistema, a formar complejos con proteínas residentes, a la modificación química o enzimática, acumulación en tejidos sin interés para la terapia, etc. (Santa y López Osorio 2013).

Para lograr obtener un control sobre el transporte y liberación de los medicamentos, se requiere de un vector que de forma general englobe a los fármacos. En las ciencias farmacéuticas, se define como vector o vectorización a un sistema estructurado que encapsula un principio activo a manera de obtener mayor eficiencia de transporte y aumentar la eficacia del fármaco.

Dentro de las principales ventajas de vectorizar un principio activo tenemos:

- Aumento en la eficacia de transporte de fármacos en medios fisiológicos
- Transporte de fármaco hacia lugares fisiológicos difícil de penetrar.
- Aumento de especificidad hacia tejidos de interés.
- Aumento de la actividad prolongada de un fármaco.
- Reducción de la dosis de fármacos utilizados.
- Reducción del riesgo de despertar una respuesta inmune en el organismo.

- Aumento en el control de la liberación de un fármaco.

La Figura 2, muestra un gráfico teórico haciendo comparación de un sistema de liberación controlada de fármacos contra la liberación en forma libre. Es indudable que proporcionar dosis únicas de medicamentos será de gran comodidad y seguridad para los pacientes, además que la eficiencia terapéutica podrá aumentar.

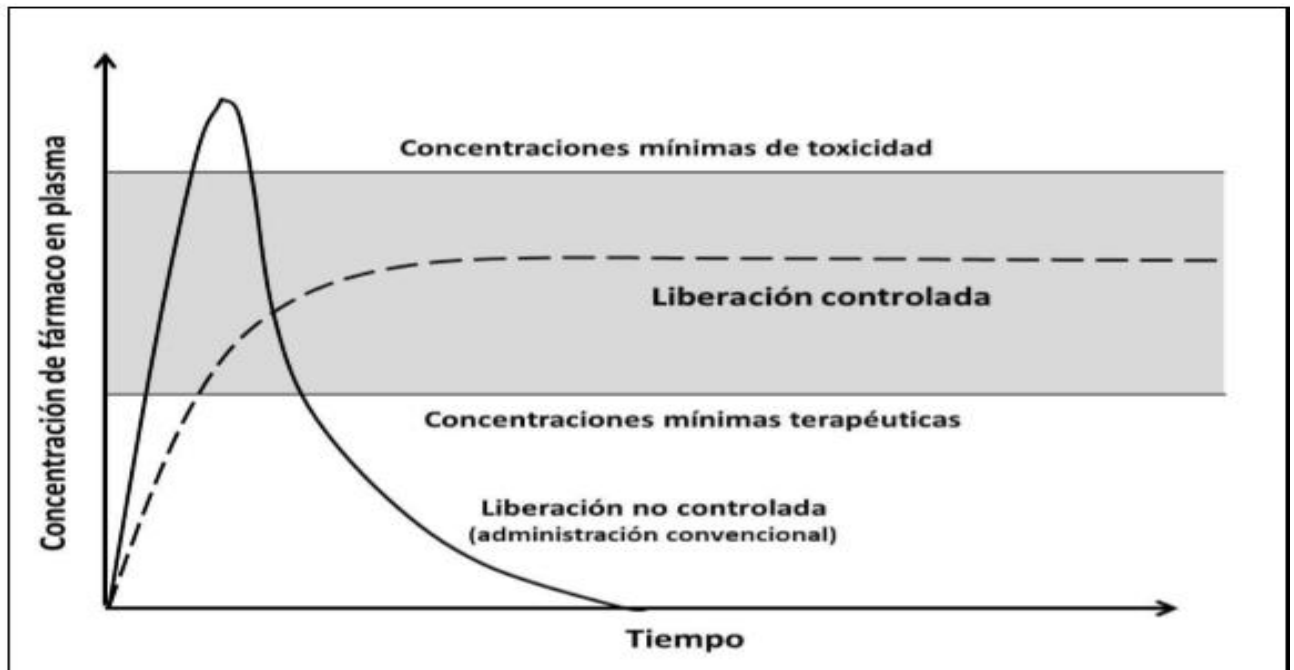


Figura 2. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco (Sarabia-Sainz, 2012).

Matrices poliméricas para transporte de medicamentos

Existe una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados como matrices poliméricas para el transporte de fármacos. Los materiales poliméricos se pueden clasificar en sintéticos y naturales, por ejemplo, polímeros sintéticos como: ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA por sus siglas en inglés), poli-ε-caprolactosa (PCL por sus siglas en inglés), celulosas modificadas, poliacrilamidas, entre otros. Así como polímeros naturales como: albúmina, gelatina, quitosano, ácido hialurónico y alginatos (Neira-Carrillo, Muñoz et al. 2013). En la Tabla 1, tenemos una representación de los materiales poliméricos más utilizados para el transporte de fármacos.

Tabla 1. Principales biomateriales utilizados para el encapsulamiento de fármacos (Sarabia-Sainz, 2012)

Polímeros	Fármacos
Ácido Poli-láctico-co-glicólico (PLGA)	Taxol, Paclitaxel, Estradiol
Ácido poliláctico (PLA)	Hemoglobina, Proteína C
Poli-ε-caprolactosa (PCL)	Insulina, Taxol
Gelatina	Paclitaxel
Quitano	Ciclosporina A, BSA
Alginato	Teofilina, Diclofenaco
Carragenina	Alopurinol, alcohol deshidrogenasa
Pectinas	Metronidazol
Albúmina	Diclofenaco, Dexametasona

Transporte o Vectorización de Medicamentos de Forma Pasiva

Los sistemas micro o nanoestructurados para el transporte de fármacos, se caracterizan principalmente por el mecanismo que utilizan para la distribución a través del organismo. Una manera de distribuir y entregar fármacos por parte de los vectores es denominada vía pasiva o inespecífica. Este tipo de vectorización, puede llevarse a cabo mediante procesos de difusión, basados principalmente en el transporte de moléculas a través de membranas celulares, lo que comúnmente es conocido como gradiente de concentración (Arellano and Vázquez 2013). Otra de las características importantes en la distribución de fármacos, se basa en el tamaño del vector utilizado, ya que de esto depende la ruta de administración del fármaco, así como la vía de eliminación del mismo. Por ejemplo, en una administración por vía parental, las nanopartículas con tamaño menor a los 10 nm pueden ser filtradas y eliminadas en los riñones. Asimismo, nanopartículas con un tamaño de hasta 100 nm suelen por lo general salir del sistema sanguíneo atravesando capilares. Nanopartículas con un tamaño superior a los 500 nm suelen ser más susceptibles a ser fagocitadas por células del sistema inmune (Shang, Nienhaus et al. 2014). El diámetro de los capilares varía según el órgano en el que se localice, sin embargo, el tamaño límite para que una nanopartícula

pueda circular por estas vías, es alrededor de unos cuantos micrómetros. En la figura 3 podemos observar el camino y deposición de nanopartículas según su tamaño dentro del organismo.

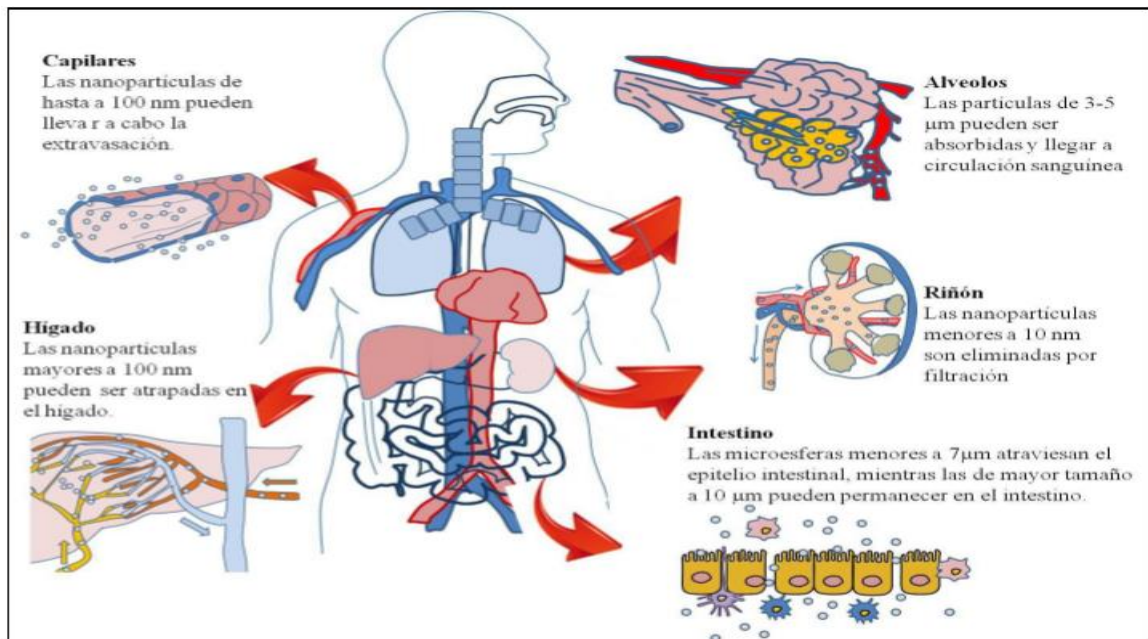


Figura 3. Deposición de nanopartículas según el tamaño en los principales órganos del cuerpo humano (Sarabia-Sainz, Ramos-Clamont et al. 2011)

Es importante señalar que la distribución de los vectores en un organismo en gran medida es influenciada por su tamaño. Sin embargo, son muy importantes las propiedades químicas y físicas del material que forma al vector, por ejemplo, la adhesividad, carga superficial, capacidad de deformación entre otros. Asimismo, en un proceso patológico la circulación normal de las biomoléculas sufre cambios, favoreciendo el intercambio de metabolitos en el lugar afectado y por lo cual, la vectorización pasiva puede ser favorecida.

Transporte pasivo por aumento de la permeabilidad y retención (EPR) de la zona afectada

El efecto de permeabilidad y retención (EPR), se caracteriza por presentar una acumulación en tejidos afectados por traumas o tumorales de cierto número de moléculas endógenas (enzimas, vitaminas, aminoácidos, células, etc) o exógenas (liposomas, nanopartículas, entre otros) de una manera mayor a la de tejidos normales. En el caso de tumores celulares, este efecto se promueve debido a que requieren de un mayor flujo de factores de crecimiento a través de los vasos sanguíneos (Prabhakar, Maeda et al. 2013).

Adicionalmente el tejido de las células tumorales carece de un buen funcionamiento en el drenaje linfático. Todos estos aspectos contribuyen en un transporte molecular con flujo anormal, el cual puede ser aprovechado para el transporte de fármacos. La Figura 4, muestra el flujo de nanopartículas a través de los vasos sanguíneos, el cual es mayor en las áreas donde existe células tumorales, debido a la separación o malformación entre células endoteliales lo que permite un mayor flujo hacia células tumorales, adicionalmente se ve una disminución en el drenaje linfático de las mismas.

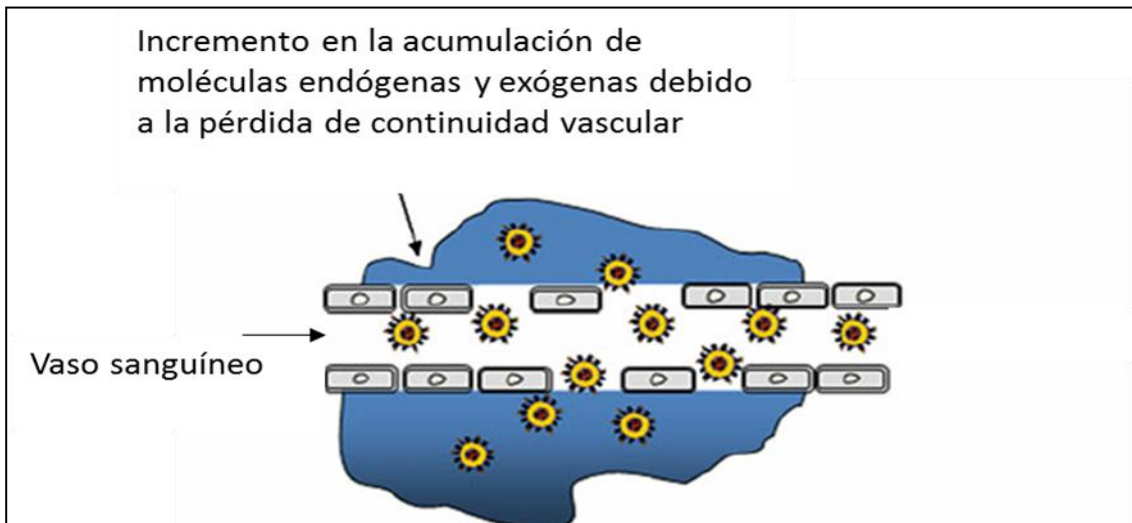


Figura 4. Efecto EPR. Acumulación de nanopartículas en células tumorales (Peer, Karp et al. 2007).

El efecto EPR ha venido tomando gran importancia en el transporte de fármacos usando nanoestructuras como nanopartículas y liposomas en tejidos cancerosos. La posibilidad de acumulación de los nanotransportadores en el lugar afectado resulta de gran relevancia para direccionar y liberar medicamentos en el área que se necesita.

Por otra parte, la conjugación del efecto EPR con otras técnicas como el direccionamiento de fármacos mediante vectorización activa es decir, vectores capaces de inducir un bio-reconocimiento, generan nuevas estrategias para los tratamientos contra el cáncer, siendo así más eficientes en la distribución del fármaco en tejidos cancerosos (Maeda, Nakamura et al. 2013).

Transporte o Vectorización de Forma Activa

Los sistemas de vectorización activa se desarrollaron principalmente para evitar las pérdidas de fármacos hacia otros lugares donde no se requiera, es decir, modificar la bio-distribución

de fármacos y dirigirlos hacia lugares específicos. Este tipo de vectorización se puede llevar a cabo mediante la conjugación de la superficie del vector con un ligando que posean un receptor en un sitio específico (Suárez 2016).

Recientemente, existe una gran variedad de trabajos en los que se basan principalmente en una terapia anticancerígena con la implementación de vectorización activa mediante el uso de diversos ligandos de manera específica, donde su función principal es la distinción entre células normales y tumorales.

Mecanismos de vectorización activa

Las técnicas de investigación donde se involucra lo relacionado con la interacción biológica han sido aprovechadas extensamente. Por ejemplo, para la identificación, aislamiento, purificación, cuantificación de biomoléculas, por ejemplo, las variantes de la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, por sus siglas en inglés), cromatografía de afinidad, ensayos con lectinas para identificación de carbohidratos, entre otras. Este tipo de técnicas de reconocimiento biológico son utilizadas ahora en la vectorización activa de medicamentos (Tanaka and Chujo 2014, Suárez 2016). La vectorización activa se basa principalmente en la conjugación de la superficie del vector con un ligando (antígenos, lectinas, adhesinas, etc.) que posea su receptor (anticuerpo, carbohidratos, péptidos, vitaminas, etc.) en un sitio diana (Tanaka and Chujo 2014, Suárez 2016). Una aplicación de la vectorización activa donde se utilice la afinidad biológica entre lectinas y carbohidratos, puede presentarse con las células hepáticas. Los hepatocitos presentan en su superficie un receptor de galactosas, conocido como receptor de asialoglicoproteínas de tal manera que en una patología de origen hepático, puede ser explotado la interacción ligando-receptor. Este mecanismo propuesto se representa en la Figura 5.

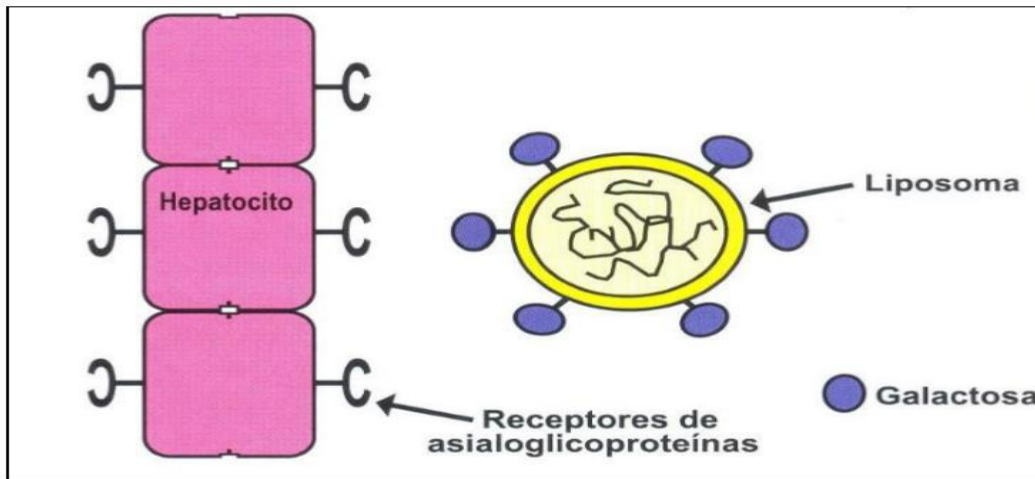


Figura 5. Reconocimiento de un liposoma con residuos de galactosa en la superficie a nivel de hepatocitos (Suárez 2016).

Ligandos y Receptores

Un ligando se define como cualquier molécula que pueda ser bio-reconocida dentro de un organismo y que puede o no enviar una señalización celular, y de esta manera facilitar la función del vector como un transportador ideal (Haburcak, Shi et al. 2016). El ligando se puede encontrar en diferentes formas como son los anticuerpos, lectinas, algunas proteínas, hormonas, entre otras. Dependiendo de la unión de ligando–receptor será su afinidad, puede llegar hacer de alta, media o baja especificidad.

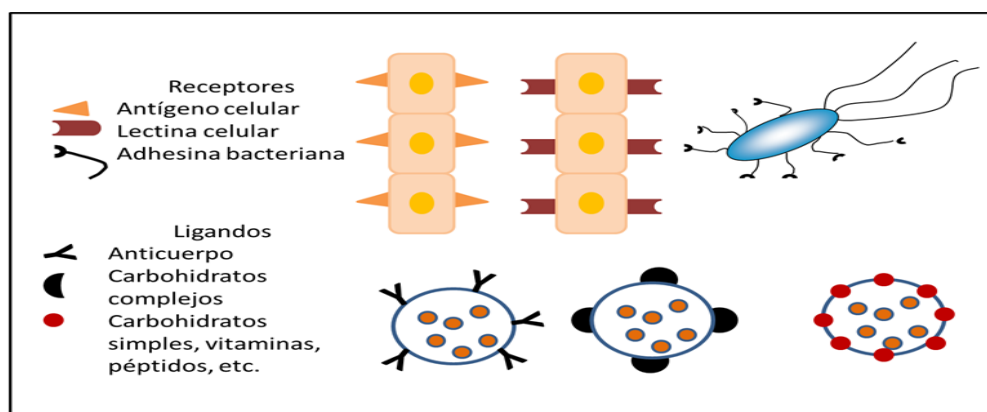


Figura 6. Ejemplos de ligando y receptores (Sarabia-Sainz, 2012).

Ligando específicos

Existen varias uniones ligando- receptor de alta especificidad como es el caso de:

- **Antígenos- Anticuerpos:** existen innumerables investigaciones con respecto al uso de anticuerpos monoclonales debido a la propiedad de los anticuerpos de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permitiendo su utilización como herramientas esenciales en investigación biomédica y clínica.
- **Vitaminas-receptores:** El uso de vitaminas como el ácido fólico, análogos de Vitamina E Vitamina D, y la biotina, son algunos de los ligandos más estudiados debido a la capacidad que poseen de interactuar con receptores específicos presentes en células tumorales. Los receptores de ácido fólico se caracterizan por estar presentes de forma muy abundante en células con cáncer, ya que son requeridas en la síntesis de ADN (Angulo et al, 2016; Huang, Duan et al. 2016).
- **Lectinas- carbohidratos:** Las lectinas son proteínas que poseen al menos un dominio con sitio de unión a carbohidratos, a través del cual interactúan en forma específica y reversible con glicoconjugados y la interacción es selectiva y puede ser de alta afinidad. Recientemente se ha demostrado que carbohidratos como: galactosa, manosa, ácido siálico, entre otros, presentan la capacidad de interactuar con receptores específicos, como los receptores de asialoglicoproteínas presentes en células hepáticas (Xue, Feng et al. 2016). Existe otra superfamilia de proteínas tipo lectinas denominadas galectinas, estas reconocen carbohidratos unidos a macromoléculas complejas y representan un potencial y prometedor agente terapéutico (Lin 2009). En este sentido para explotar las interacciones lectina-carbohidratos se requiere del estudio de la ingeniería de glicoconjugados.

Gliconjugados

Se define como carbohidratos enlazados covalentemente a una proteína, lípidos, péptidos entre otros. Esto le confiere a la proteína o lípido al que este unido ser reconocidos específicamente, ya que algunos receptores en célula son específicos para reconocen a estos carbohidratos, lo cual les permite ingresar o unirse a la célula (Sangabathuni, Murthy et al. 2016).

Gliconanotecnología

Como ya se abordó en este documento, el desarrollo de la ciencia a nivel nanoscópico, ha venido emergiendo y tomando un papel de gran importancia en áreas como la medicina y la biología. Aunado a esto, la gliconanotecnología se define como la síntesis de nuevas estructuras, modificadas superficialmente con carbohidratos, dando lugar a una disciplina importante dentro de las áreas químicas y biológicas (Sangabathuni, Murthy et al. 2016). El uso de carbohidratos en nanoestructuras proporciona habilidades para interactuar en sistemas biológicos. El uso de la gliconanotecnología, presenta grandes aplicaciones como biosensores de glicoproteínas, agentes de contraste molecular, inhibición de enzimas, y por supuesto, en la entrega selectiva de medicamentos (Kaur & Mahajan, 2016).

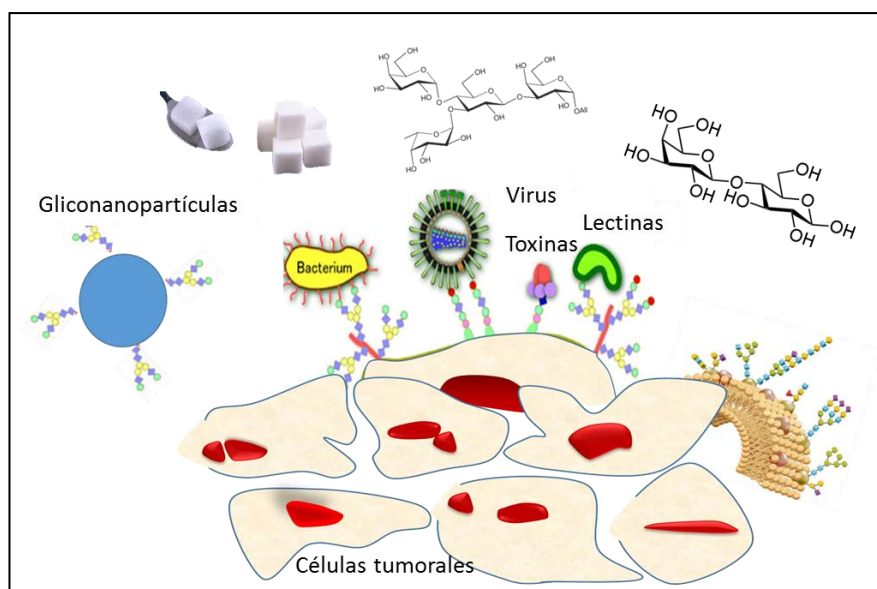


Figura 7. La creciente área de la gliconanotecnología.

Las nanopartículas glicosiladas son otra importante herramienta que han contribuido al conocimiento de las interacciones lectina-carbohidrato. Por un lado, permiten compensar la baja afinidad de este tipo de interacciones con una presentación multivalente de los ligandos (Jesús and Penadés 2006). A su vez, al tener un tamaño molecular la interacción con las lectinas es más eficaz. Por otro lado, es posible poder controlar y analizar la síntesis de glicoconjugados, lo cual permitiría poder diseñar una plataforma de interacción multivalente con una composición homogénea de carbohidratos (Barrientos, de la Fuente et al. 2003).

Durante los últimos años se han venido utilizando las nanopartículas para desarrollar biosensores utilizando anticuerpos o sondas de ADN como elementos de reconocimiento

biológico, sin embargo, son pocos los ejemplos de su uso como una herramienta útil en el ámbito de la Glicómica (De La Fuente and Penadés 2004). Es posible encontrar ejemplos donde se empleen nanopartículas funcionalizadas con carbohidratos para evaluar interacciones lectina-carbohidrato (Barrientos, de la Fuente et al. 2003, De La Fuente and Penadés 2004) (López-Cartes, Rojas et al. 2005) o para su uso en terapias antiadhesivas. En cuanto al uso de gliconanopartículas para el estudio de interacciones carbohidrato-lectina existen algunas publicaciones que utilizan carbohidratos conjugados con oro, moléculas fluorescentes (QDs) o magnéticas (Robinson, Fang et al. 2005, Sun, Weissleder et al. 2006).

Glicoproteínas

La glicoconjugación de proteínas, es un proceso complejo que se da naturalmente durante o al finalizar el proceso de síntesis de proteínas en las células. In vitro, la modificación de proteínas con carbohidratos puede ser dado por métodos enzimáticos denominados glicosilación. Así también es posible distinguir otro proceso denominado glicación, el cual consiste en una modificación química, exenta de enzimas glicosil transferasas.

En las patologías como la diabetes, la glicación se presenta por las elevadas y prolongadas concentraciones de glucosa o fructosa en sangre. Este proceso de glicación de proteínas se ha investigado de forma experimental para tratar de inducir una propiedad adicional a las proteínas de interés ya sea para su uso en ciencias de los alimentos o en el área de la bioquímica. Se ha reportado que el proceso de glicación depende del tipo de carbohidrato, la temperatura de reacción, el pH, la características propias de la proteínas, etc (Zhang, Ames et al. 2008). La reacción de glicación o reacción de Maillard, resulta interesante en el área de la glicobiología debido a que es un proceso de bajo costo, sin embargo, es poco controlado (Fenaille, Morgan et al. 2004).

Debido a que los gliconjugados se demandan como poderosas herramientas en la bioquímica, biotecnología o la misma nanotecnología, se han estudiado diversos procesos para genera neoglicanos. Por ejemplo, en la literatura, destacan la utilización de agentes como el EDC, NHS, NaBH_3CN para generar productos conjugados con carbohidratos (Farkaš, Čížová et al. 2013). Los grupos funcionales principalmente aprovechados para estas reacciones, son los grupos aminos de las proteínas y los grupos carboxilo de los carbohidratos. En la Figura 8 se muestra un esquema que representa los pasos principales

de las tres principales reacciones para obtener glicoconjugados. Asimismo, la relevancia de las reacciones mostradas en la Figura 8 es que son utilizadas en este trabajo para modificar BSA con derivados de lactosa.

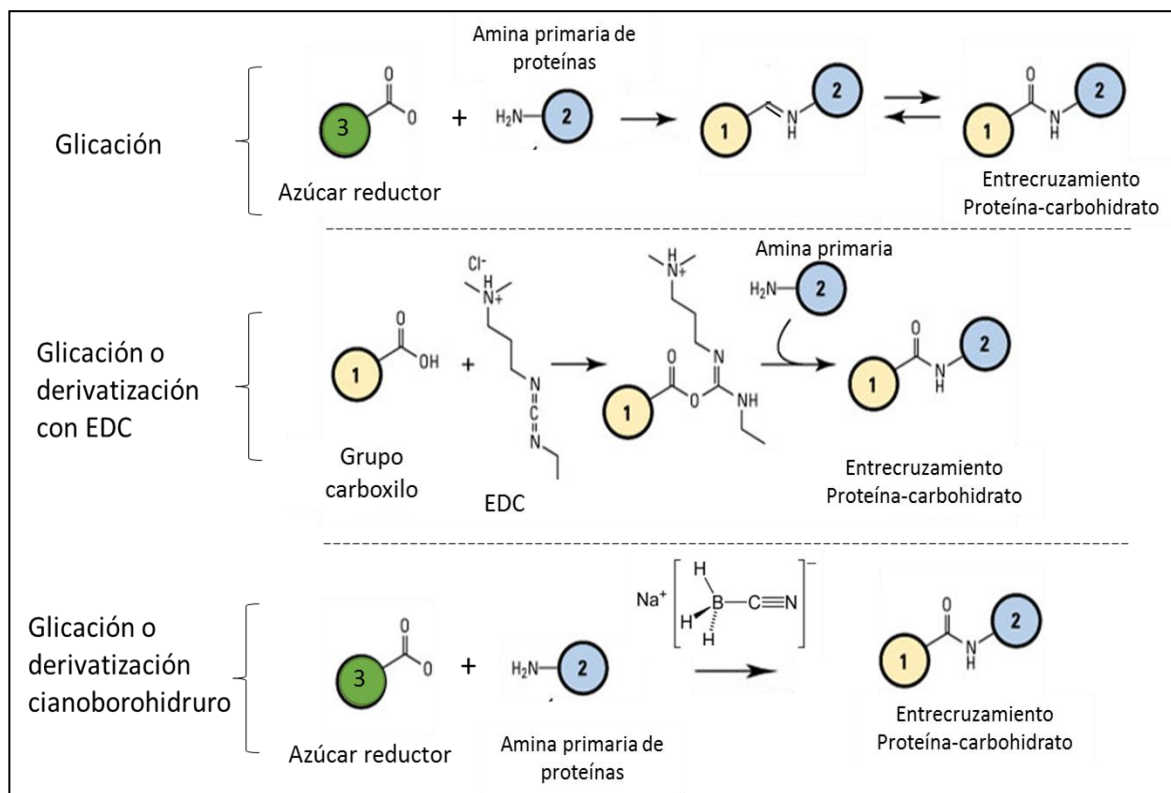


Figura 8. Representación gráfica de las principales reacciones usadas para la modificación de macromoléculas con carbohidratos.

La glicociencia ha recibido históricamente menos atención y menos financiamiento que la investigación de ácidos nucleicos o proteínas. Las herramientas específicas disponibles para el estudio de la función y estructura del glicano están mucho menos desarrolladas y han retrasado el progreso de este campo. Los trabajos pioneros en el área de la glicobiología y sobre todo en la nanotecnología fueron con nanopartículas de oro funcionalizadas con glicanos, empleadas por primera vez como templete para el estudio de interacciones de carbohidratos (Eissa, Abdulkarim et al. 2016). Durante la última década, se ha reportado que las nanopartículas funcionalizadas con carbohidratos en sus superficies presentan propiedades antibacterianas en Gram-positivas, Gram-negativas y micobacterias (Xue, Pasparakis et al. 2011). Además, una razón importante para el interés especial en estos materiales son sus potenciales aplicaciones como agentes o vectores terapéuticos.

Uno de los ejemplos más estudiados de vectorización mediada por carbohidratos con propiedades bacterioestáticas, se ha mostrado con nanopartículas metálicas, manosiladas. (Tseng, Chang et al. 2011). Con el mismo contexto, en este trabajo se plantea el diseño de nanovectores de medicamentos con capacidad para ser orientados hacia un tejido específico, que posea la capacidad de reconocer e interactuar con dichas gliconopartículas. De forma específica, se intenta aprovechar la especificidad del receptor de asialoglicoproteínas presentes en las células hepáticas. Este receptor es una proteína con característica de lectina debido a que reconoce galactosas presentes en las glicoproteínas sanguíneas. Se ha reportado en el cáncer hepático el receptor de asialoglicoproteínas continua presente, lo cual, representaría una ventaja para la vectorización activa de las gliconopartículas para la terapia del cáncer hepático.

Cáncer: Generalidades

El cáncer se origina por el crecimiento celular descontrolado en alguna parte del cuerpo. La transformación de las células normales en células cancerosas surge como consecuencia del daño del DNA, dando lugar a células incapaces de controlar su crecimiento y división. Esta división celular incontrolada puede formar masas o tumores visibles en los órganos donde se originan, y que denominamos tumor primario. Las células cancerosas tienen la capacidad de invadir órganos vecinos a su lugar de origen y la de diseminarse por la sangre o la linfa a zonas distantes y crecer en ellas, originando tumores secundarios que conocemos como metástasis (Siegel, Miller et al. 2016).

Los distintos tipos de cáncer se comportan de manera diferente (velocidad de crecimiento, tendencia a la diseminación, respuesta a los tratamientos, etc.) (Llovet, Ricci et al. 2008, Siegel, Miller et al. 2016). Las terapias convencionales como es la radioterapia y quimioterapia generan para el paciente diversos efectos adversos (DeSantis, Lin et al. 2014). Que lo condicionan a padecimientos agudos o crónicos algunos ejemplos son:

Efectos agudos:

1. Caída de cabello, anorexia.
2. Disminución de células sanguíneas.
3. Infecciones nosocomiales.
4. Irritación estomacal.
5. Rigidez de la piel.
6. Entre otros.

Efectos crónicos:

1. Riesgo coronario.
2. Enfermedades cardiovasculares.
3. Osteoporosis.
4. Disfunciones hormonales.
5. Entre otros.

Cáncer Hepático

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, y uno de los más importantes, debido a que realiza diferentes funciones como:

- Descomponer y almacenar nutrientes, existen diversos nutrientes que deben ser metabolizados en el hígado antes de ser absorbidos en el intestino.
- Produce la mayoría de los factores de coagulación.
- Segrega sales biliares que ayudan a la absorción de nutrientes.
- Descompone el alcohol, medicamentos y desechos tóxicos de la sangre, los cuales son secretados por la orina y heces fecales (Llovet, Ricci et al. 2008, Siegel, Miller et al. 2016).

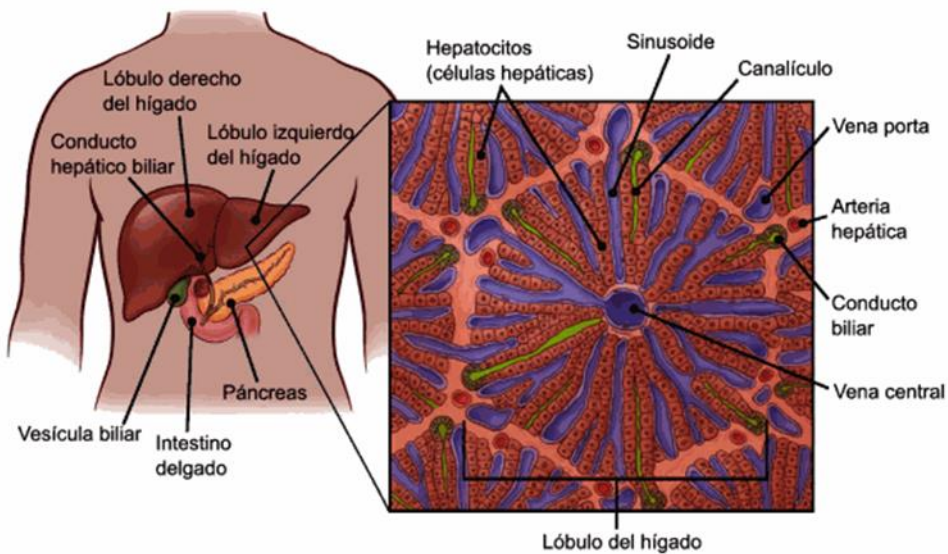


Figura 9. Ejemplificación de la composición del hígado (Siegel, Miller et al. 2016).

Cáncer hepático o cáncer de hígado, se denomina como un crecimiento anormal de las células hepáticas o también conocidas como hepatocitos. El carcinoma hepatocelular es la forma más común de cáncer de hígado en adultos, este tipo de afectación se encuentra predispuesta desde nacimiento, infecciones (hepatitis), abuso de alcohol, entre otras (Aldaco-Sarvide 2012). Este tipo de cáncer es de elevada incidencia y alta mortalidad, siendo este uno de los principales tipos de tumores malignos que más afectan a hombres y mujeres.

El cáncer de hígado se clasifica en dos etapas, la etapa primaria del carcinoma hepatocelular es una de ellas y se caracteriza por tener diversos patrones de crecimiento, en algunos casos estos comienzan con un tumor pequeño que va creciendo, sin embargo existe otro tipo en el cual aparecen varias manchas a través del hígado, este tipo de carcinomas está asociado con personas que presentan cirrosis hepática (Aguilar-Olivos et al., 2016). Otra etapa es el cáncer secundario de hígado o cáncer metastático, el cual consiste en el padecimiento de cáncer que se propaga por varias regiones del cuerpo, por ejemplo si se origina en otro órgano y se esparce hacia el hígado, se dice que es un cáncer de hígado secundario.

La organización mundial de la salud (OMS) estima una prevalencia de que por cada 100.000 personas en el mundo, 30 personas padecen de cáncer de hígado. El índice de

fatalidad de este tipo de cáncer es del 0.99, es decir, casi el 100% de las personas que lo padecen mueren (INEGI, 2014).

Los tratamientos contra el cáncer de hígado se caracterizan por frenar el avance del tumor y tratar los síntomas ocasionados por esta patología. Dentro de los tratamientos utilizados contra el cáncer de hígado, tenemos la terapia ablativa, terapia de radiación o radioterapia, quimioterapia, entre otros (Mokdad et al., 2016). Estos tipos de tratamiento contra el cáncer de hígado resultan un tanto agresivo para las personas que sufren esta patología, debido a que las terapias utilizadas, como la radiación frecuentemente daña tejido sano, es por eso que la aplicación de nuevas terapias tejido-específicas es de vital importancia en este tipo de padecimientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. La albúmina sérica bovina (BSA), lactosa, glutaraldehído (25%), Acido lactobionico, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS), cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, St Louis, Mo. USA. Los galactooligosacaridos (GOS) fueron donados por la Dra. Gabriela Ramos investigadora del Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo A.C.

Métodos

Glicación de la Albúmina

En este trabajo se realizaron diferentes tratamientos de glicación de la BSA. En la Tabla 2 se indican las condiciones de glicación usadas para este trabajo.

Tabla 2. Condiciones de glicación de BSA

Identificación de Muestra	BSA (mg)	Lactosa (mg)	Ac. Lacto-biónico (mg)	Galactoolig-osacaridos (mg)	*EDC/NHS (mg)	**NaBH ₃ CN (mg)
BSA@GOS	20	-	-	200	-	162
BSA@Lactosa	20	400	-	-	-	162
BSA@AcLac	20	-	400	-	-	162
BSA@AcLacEDC	20	-	20	-	155/115	-
***BSA-Lac	1000	1000	-	-	-	-

*Los tratamientos donde se utilizó EDC/NHS se realizaron en bufer MES 0.1 M, durante 5 días.

**La glicación donde se usó NaBH₃CN, se realizaron con PBS, pH 7.2, durante 5 días.

***La muestra BSA-LAC, se llevó a cabo en seco, a 100 °C, durante 30 min.

En todos los tratamientos, después del proceso de glicación, la BSA fue sometida a diálisis para eliminar residuos no unidos a las proteínas.

Las propiedades físico-químicas, cambio de masa y estructura molecular de los glicoconjugados obtenidos se evaluaron por métodos de caracterización como: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE), Espectrometría Infrarroja.

Caracterización de la Albúmina

Electroforesis SDS-PAGE

La masa molecular de la albúmina modificada con lactosa BSA-Lac se analizó mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras usando geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) de acuerdo a (Laemmli 1970). Las ranuras del Gel fueron cargadas con 10 µg de proteína y fue teñido con azul de Coomassie. La masa molecular relativa de la muestra se calculó por la comparación entre los marcadores de peso molecular. En este experimento la albúmina sin modificar se utilizó como control.

Espectroscopia Infrarroja FT-IR

El análisis de grupos funcionales presentes en la albúmina modificada con lactosa BSA-Lac fue realizado mediante FT-IR (Güler, Vorob'ev et al. 2016). Espectros de infrarrojo fueron obtenidos utilizando un espectrómetro FT-IR con un módulo UATR (Spectrum Two, Perkin Elmer, USA) a una resolución de 4 cm⁻¹ en un rango de 500-4000 cm⁻¹. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayos de Biorreconocimiento de la BSA modificada con RCA

La lectina de RCA es una proteína usada para determinar la presencia de galactosas en diferentes tipos de muestras. En este trabajo, la BSA sometida a glicación fue analizada con RCA mediante ensayos tipo ELISA o también conocidos como ensayos con lectinas ligadas a enzimas (ELLAs, por sus siglas en inglés). Los ELLAs se efectuaron siguiendo el procedimiento descrito por Sarabia-Sainz y colaboradores (Sarabia-Sainz, Ramos-Clamont et al. 2011) con ligeras modificaciones. La BSA sometida a glicación (20 µg/100 mL) fue inmovilización en placas de ELISA se realizó con solución amortiguadora de fosfatos (10 mM) salino (0.9%) a pH 7.4 (PBS). Las interacciones inespecíficas se bloquearon durante 1 h con PBS conteniendo BSA al 1.5%. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% (TPBS). Posteriormente se incubó durante 2 h con 100 µl de solución de RCA (5 µg/ml) Nuevamente se realizaron 3 lavados, seguidos de la incubación con estravidina-peroxidasa

(1:1000) durante 40 min. Finalmente se evidenció la interacción biológica usando OPD (σ -fenildiamina dihidroxilo) como sustrato, leyendo las placas en un lector de ELISA a 450 nm.

Síntesis de Nanopartículas de Albúmina

Las nanopartículas de albúmina fueron preparadas según el método descrito por Gallegos-Tabanico (Gallegos-Tabanico 2017). Primero 10 mg de BSA proveniente de los tratamientos de glicación, fue disuelta en 1 mL de agua desionizada. La desolvatación de la BSA y por lo tanto, la formación de nanopartículas, fue promovida por la adición de etanol gota a gota y manteniendo la solución en agitación. Después de la desolvatación, se adicionó 5 μ L de glutaraldehído al 8%, para inducir el entrecruzamiento de las moléculas de BSA y dar estabilidad a las nanopartículas formadas. La mezcla se dejó en agitación durante 5 horas y las nanopartículas fueron recuperadas y lavadas con agua desionizada mediante 3 centrifugaciones.

Caracterización de las Nanopartículas

Tamaño y Carga Superficial

La distribución de tamaños y la carga superficial (potencial Z) fueron medidas utilizando el equipo de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) (Thao, Byeon et al. 2016). Las muestras fueron diluidas con PBS a una concentración de 1mg/mL a un pH de 7.4. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C utilizando un ángulo de medición de 90°. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Observación morfológica mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM) fue utilizada para visualizar las características morfológicas de la superficie de las NP-BSA y BSA-Lac (Kim et al., 2016). Las muestras previamente liofilizadas fueron colocadas en una cinta carbón de la superficie del SEM para posteriormente ser incidido un haz de emisión sobre la muestra con un equipo SEM (JSM-7800F, JEOL, Japan) a 0.6 KV de voltaje de aceleración y una resolución de 20,000X. El mismo procedimiento fue utilizado para las dos muestras de nanopartículas, tanto NP-BSA como NP-BSA-Lac.

Ensayos de Bio-reconocimiento de la Nanopartículas

Cultivo de las líneas celulares Hep G2 y HeLa

Las líneas celulares Hep G2 (ATCC® HB-8065™) y HeLa (ATCC® CCL-2™) fueron adquiridas de ATCC (Manassas, VA, USA). Los cultivos de las dos líneas celulares se realizaron de forma similar. Las células fueron cultivadas en botellas de 25 cm² con 7 mL de Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, botella de 500 mL de Gibco™ GlutaMAX™ Supplement, HEPES, número de catálogo 10564-029 de ThermoFisher Scientific) y suplementado con penicilina 10 UI/mL, estreptomycin 0.5 mg/mL (10,000 unidades de penicilina y 10 mg estreptomycin por mL en 0.9% NaCl, y piruvato de sodio 1 mM, esterilizado por filtración. Para el mantenimiento del cultivo se utilizó 5% de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad.

Cada tercer día se retiró el medio del cultivo, se hizo un lavado con solución salina fisiológica estéril y se agregaron 7 mL de DMEM con 5% de SFB (Suero Fetal Bovino) y suplementado. Cuando se conseguía una confluencia superior al 90% en el cultivo se retiraba el medio, se hacía un lavado con solución salina fisiológica y se añadían 300 µL de Tripsina-EDTA, se incubaba por 5 minutos a 37°C y se añadían 2 mL de DMEM con 5% de SFB para inactivar la Tripsina. Se tomaba un 1 mL de la suspensión celular (pase) para colocarse en una nueva botella. Se añadían 6 mL de DMEM con 5% de SFB y suplementado a cada botella y se volvían a incubar a las condiciones antes descritas.

Ensayos de Interacción Células-Nanopartículas

Las células fueron expuestas a las nanopartículas a diferentes tiempos, con el fin de evaluar la internalización y el reconocimiento específico entre los receptores de asialoglicoproteínas de la línea Hep G2 y los carbohidratos presentes en la nanopartículas. Como controles se usaron células HeLa, las cuales no presentan receptores para galactosa, asimismo se usaron nanopartículas sin glicar. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: Las células se sembraron en placas de 96 pozos, hasta formar una monocapa confluyente, empleado las condiciones previamente establecidas. Las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se adicionaron las nanopartículas (1 µg/mL) previamente marcadas con fluoresceína (FITC). La interacción fue evaluada a los 30 y 90 minutos en un Microscopio Confocal Fluorescente (Nikon TiEclipse C2+).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la albúmina glicada

La adición de azúcares a la molécula de albúmina incrementa la masa molecular de las proteínas. La técnica de SDS-PAGE fue utilizada para evaluar el peso molecular de BSA-Lac, y con ello tener una medida indirecta del grado de glicación de BSA. En la figura 10 se muestra la electroforesis de los productos de glicación de la albúmina con lactosa en las diferentes condiciones usadas. Al comparar los patrones de migración de las proteínas sometidas a los diferentes tratamientos y la BSA sin modificar, solo se logra observar el incremento de la masa molecular de la BSA-Lac. Según la estimación de la masa obtenida para la BSA-Lac, representa un 22%, correspondiente a 81 kD. Este resultado concuerda con lo reportado previamente en el grupo de investigación de la Dra. Luz Vázquez (Laboratorio de bioquímica de proteínas y glicanos de CIAD). Los tratamientos de glicación donde se utilizó EDC/NHS o NaBH₃CN como activadores de la reacción, no mostraron cambios en la masa molecular de las proteínas. En trabajos previos se ha reportado que, en condiciones anhidras, la reacción con EDC/NHS o NaBH₃CN puede presentar mayor rendimiento (Hermanson 1996). Debido a que nuestras condiciones de reacción se llevaron a cabo en soluciones acuosas, solamente incrementos en la masa molecular de la albúmina por arriba del 5% serían perceptibles mediante electroforesis.

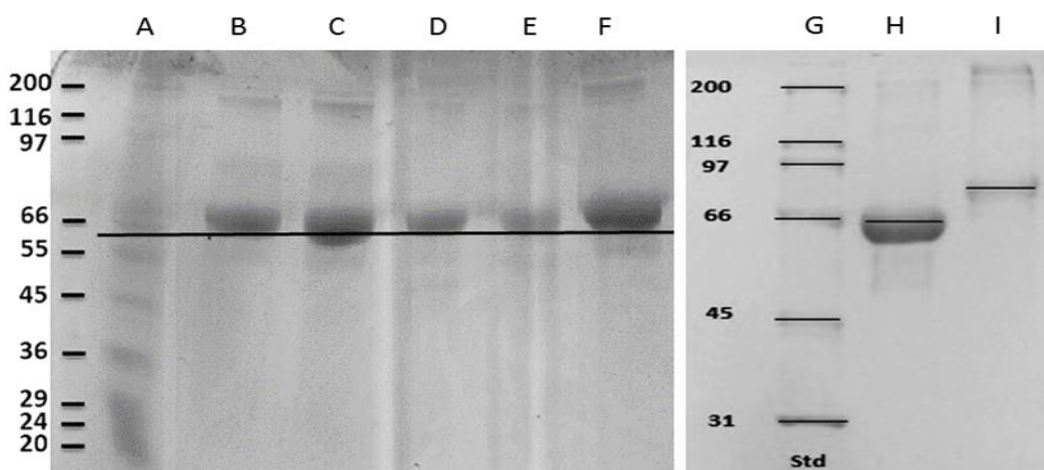


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE (10 %). Carril A y G, estándares de masa molecular; Carril B y H, BSA sin tratar; Carril C, BSA@GOS; Carril D, BSA@Lactosa; Carril E, BSA@AcLac; Carril F, BSA@AcLacEDC; Carril I, BSA-Lac. La migración electroforética de los productos obtenidos en la modificación de la BSA, son comparadas con la BSA sin tratar.

Otra herramienta útil para determinar la presencia de carbohidratos en la molécula de BSA es la espectroscopia de infrarrojo. El análisis por FT-IR es ampliamente usado para determinar enlaces moleculares representativos de un compuesto. En la Figura 11 se muestra los espectros FT-IR de la BSA sometida a la modificación con carbohidratos. Se ha reportado que los carbohidratos presentan una banda característica a 900-1199 cm^{-1} (Leopold, et al. 2011). Como se puede observar en la Figura 11, con todos los tratamientos se generó la banda conocida como huella molecular de los carbohidratos y que es atribuido a los enlaces C-O. Asimismo, es evidente la ausencia de la banda de los carbohidratos en el espectro de la BSA sin modificación, la cual fue usada como control negativo. Como podemos observar, en la electroforesis no fue posible apreciar los cambios en la masa molecular de la BSA (reacciones donde se utilizó EDC/NHS o NaBH_3CN), sin embargo, la espectroscopia FT-IR sugiere la presencia de carbohidratos en la proteína.

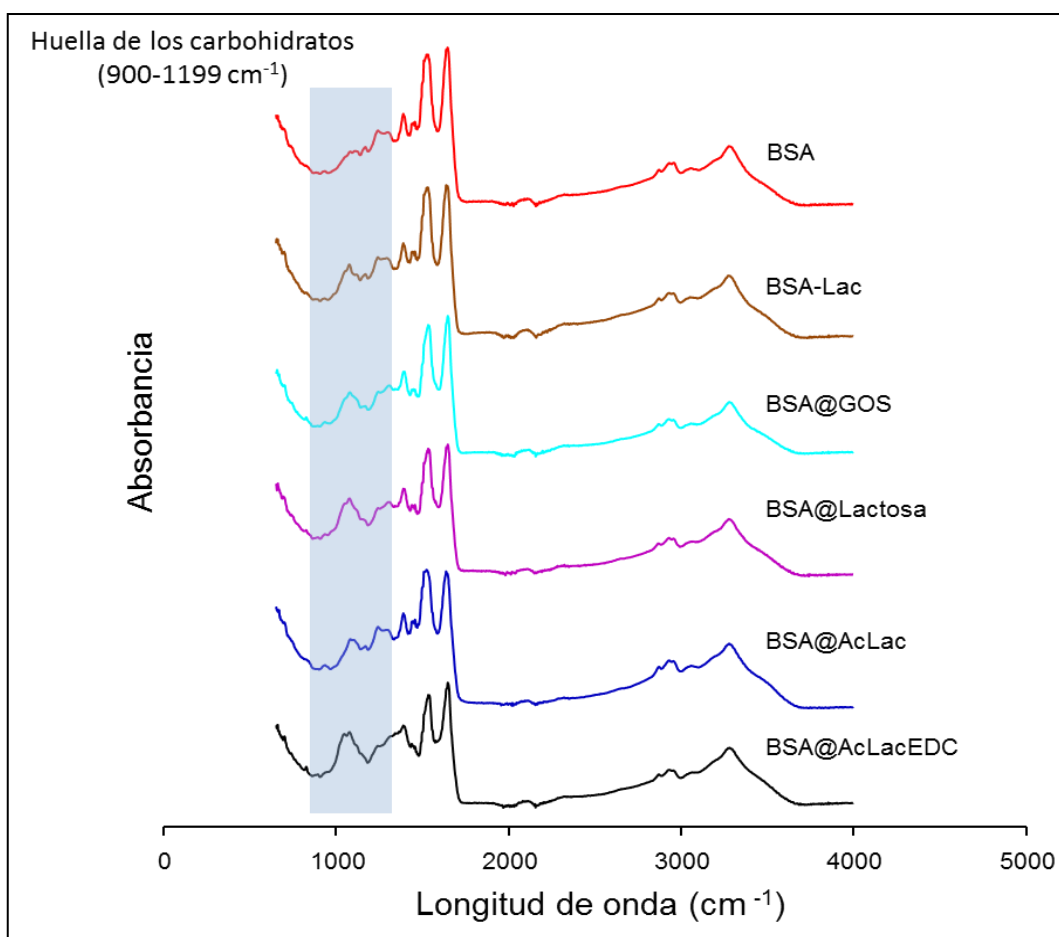


Figura 11. FT-IR. Comparación del espectro FT-IR de los diferentes productos obtenidos en las reacciones de adición de carbohidratos. La franja azul, indica la región de 900-1199 cm^{-1} , la cual es reconocida como huella dactilar para los carbohidratos. La BSA se usó como control negativo.

Ensayos de bio-reconocimiento con lectinas:

Al haber obtener los resultados anteriores y observar la presencia de carbohidratos en la BSA se realizó Ensayos con lectinas que son empleados para la caracterización de carbohidratos simples o complejos. Las lectinas son proteínas que se encuentran presentes en virus, bacterias, diferentes tipos de células y toxinas. En especial las lectinas obtenidas de plantas son una herramienta útil para caracterizar carbohidratos de superficie de células o glicoconjugados en general. En este trabajo se usó la lectina de RCA debido a que presenta especificidad por galactosa. En la figura 12, se muestra la interacción de la lectina de RCA con los diferentes tratamientos de glicación. Solo tres de los tratamientos (BSA-Lac, BSA@Lactosa y BSA@AcLacEDC) mostraron reconocimiento de la lectina de RCA, por encima de la BSA (control negativo), lo cual confirma la modificación de la proteína con lactosa. Los tratamientos BSA@GOS y BSA@AcLac no fueron reconocidos por la lectina de RCA, lo que puede indicar que no se adicionaron moléculas de lactosa a la BSA, la modificación se dio en muy baja proporción o los carbohidratos adicionados no se encuentran disponibles para interacción biológica. Debido a estos resultados, se seleccionaron las proteínas modificadas que presentaron reconocimiento de la lectinas de RCA, para ser usadas como matriz para la síntesis de gliconanopartículas.

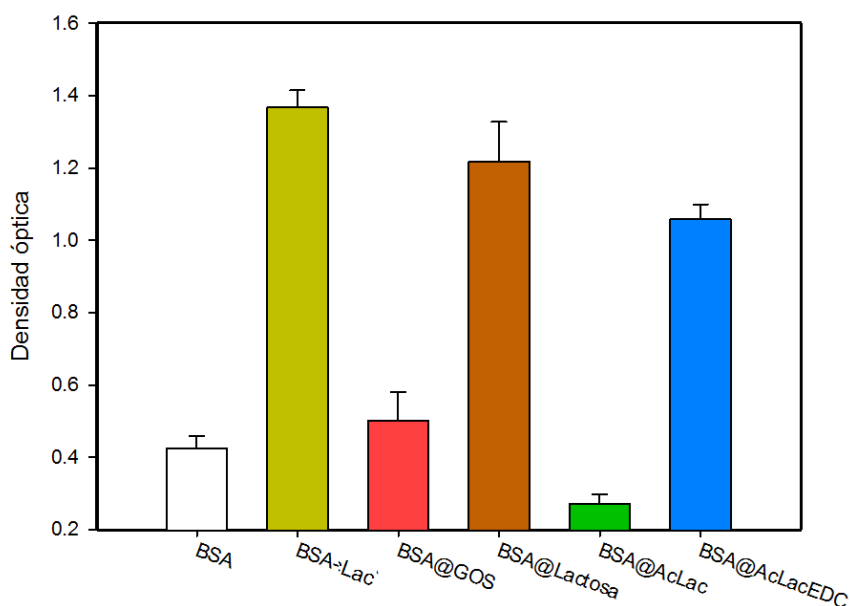


Figura 12. Ensayos con lectinas ligadas a enzimas (ELLAs). La BSA sometida a modificación con carbohidratos, fueron inmovilizada en placas de ELISA y expuesta a las lectinas de RCA.

Caracterización de las Gliconanopartículas

En la literatura científica se encuentran diversas técnicas para sintetizar micro y nanopartículas. La elección de una metodología dependerá de las características de la matriz con las que se sintetizaron las partículas y también las propiedades del fármaco que se plantea encapsular (Nagavarma, Yadav et al. 2012). En este trabajo se optó por la técnica de desolvatación o co-precipitación alcohólica, debido a que nuestra matriz es a base de BSA, la cual, ha sido ampliamente utilizada para la síntesis de nanopartículas por estos métodos. En la Figura 13 se muestra una micrografía electrónica de las nanopartículas obtenidas a partir de BSA y BSA-Lac. En general la técnica de desolvatación alcohólica permite obtener partículas estables, con morfología uniforme. Como se puede apreciar en la figura 13, las nanopartículas obtenidas muestran una morfología esférica, aparentemente con superficie lisa, asimismo, se puede observar un tamaño de partícula alrededor de los 150 nm. Las imágenes SEM obtenidas, son muy similar a lo que se ha reportado previamente para nanopartículas de BSA por la técnica de desolvatación (Yedomon, Fessi et al. 2013).

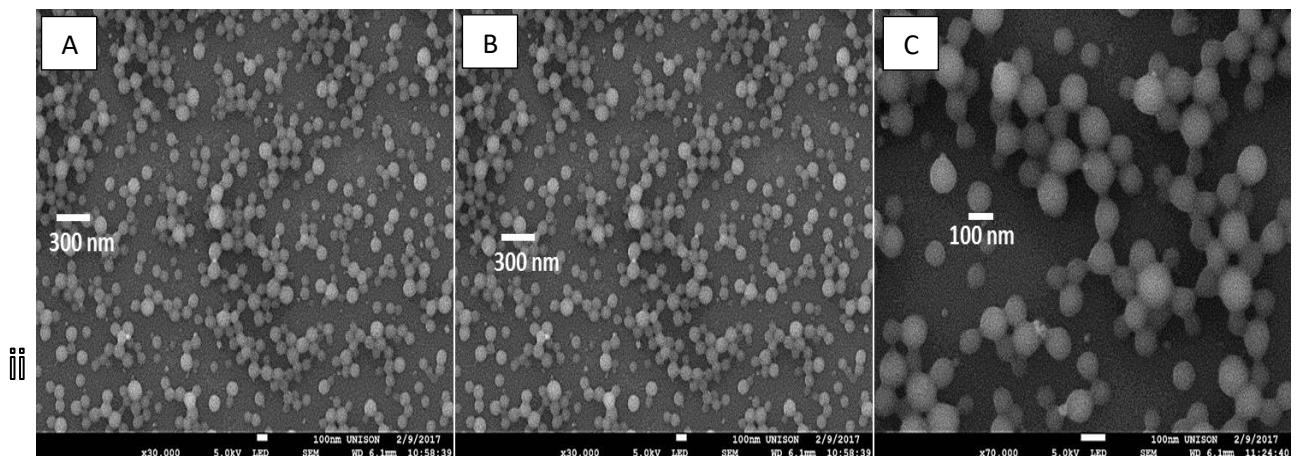


Figura 13. Caracterización morfológica de las nanopartículas mediante Microscopía Electronica de Barrido. (A) Nanopartículas de BSA; (B) Nanopartículas de BSA-Lac; (C) Amplificación (X70,000) de nanopartículas de BSA-Lac.

Para obtener un el tamaño de partícula más representativo, se realizó el análisis mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Asimismo, se obtuvo la carga superficial de las partículas obtenidas. En la figura 14, (columna izquierda) se muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas sintetizadas. En la Figura 13 se puede observar que para las nanopartículas sintetizadas con BSA (NP BSA), BSA-Lac (NP BSA-Lac) y BSA@Lactosa (NP BSA@Lactosa), la distribución de tamaños es de 80-400 nm, con un promedio alrededor de los 150 nm. Estos resultados concuerdan con las imágenes SEM mostradas en la figura 13. No fue posible obtener una lectura de las nanopartículas sintetizadas a partir de NP BSA@AcLacEDC debido a que presento una aglomeración impidiéndonos así poder observar definitivamente las nanopartículas. Adicionalmente, en la Figura 14 (columna derecha) se muestra la carga superficial de las nanopartículas, para las NP BSA, NP BSA-Lac, NP BSA@Lactosa el potencial Z se encuentra por encima de los -20 mV. Estos resultados indican que las partículas se pueden mantener en una suspensión acuosa estable. Por otra parte, las NP BSA@AcLacEDC, mostraron una carga superficial de -12.5 nV, lo que indicaría una tendencia a formar aglomerados y precipitar en solución acuosa. Este resultado explica por qué no fue posible determinar el tamaño mediante DLS ya que el equipo no pudo detectar nuestras nanopartículas. La estabilidad de las partículas con tamaños uniformes en suspensión acuosa es de gran importancia pensando en futuras aplicaciones terapéuticas. Los resultados obtenidos en mediante DLS y Potencial Z son similares con los reportados en el trabajo Síntesis de Nanopartículas de Albúmina Lactosilada con Potencial uso como vector tejido-específico para cáncer hepático (Gallegos-Tabanico, 2017)

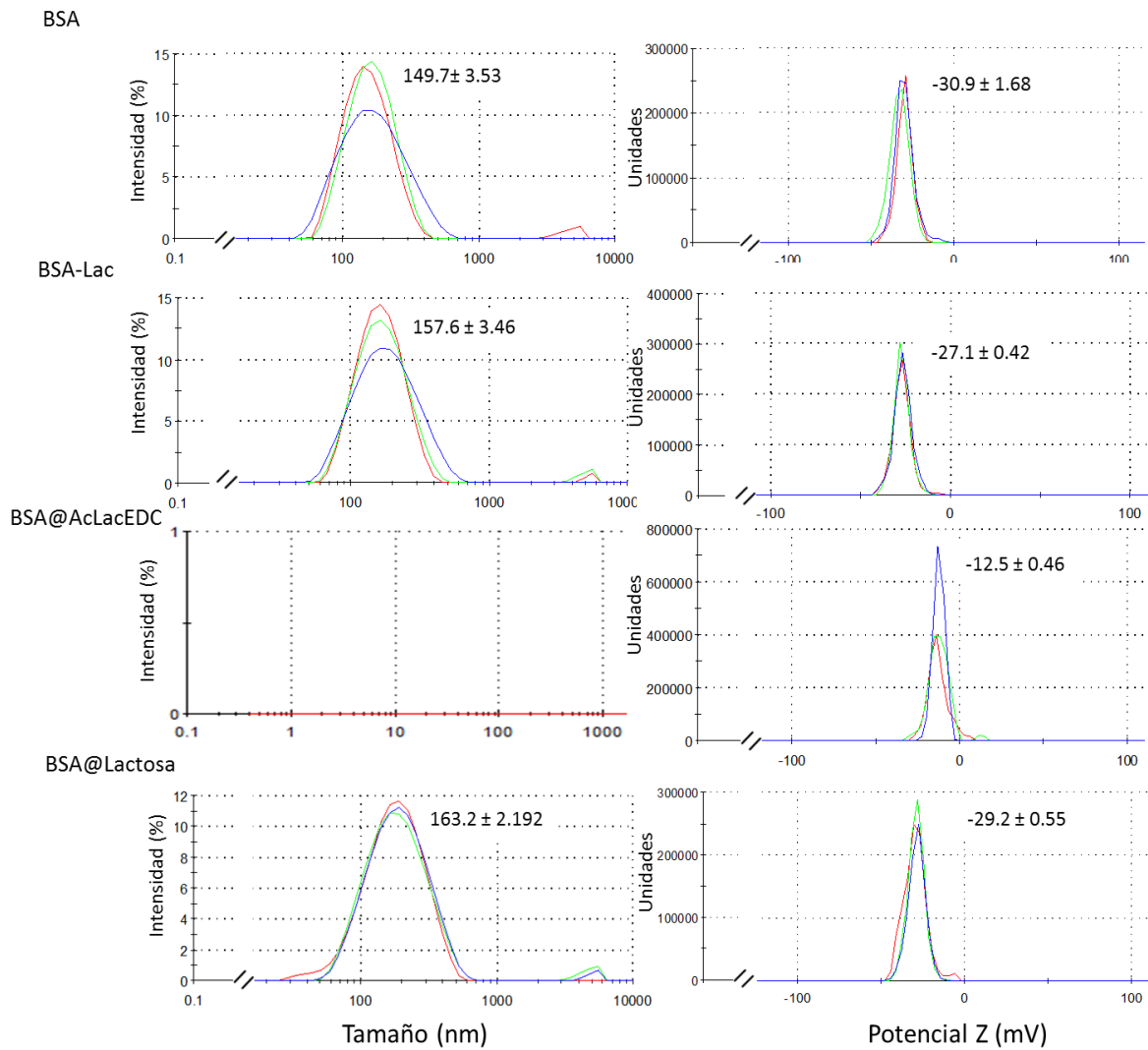


Figura 14. Estimación de tamaños (DLS, columna izquierda) y carga superficial (Potencial Z, columna derecha) de las nanopartículas obtenidas.

Ensayos de Interacción Células-Nanopartículas

Se realizaron ensayos de bio-reconocimiento con el objetivo de corroborar la presencia de galactosa en la superficie de nuestras nanopartículas y se utilizó de control negativo la NP BSA la cual se encuentra ausente de galactosa. Se emplearon dos líneas celulares de estirpe diferente, las primeras fueron las células Hep G2, procedentes de cáncer de hígado, las cuales poseen en membrana el receptor de asialoglicoproteínas, receptor que reconoce específicamente galactosa. Como control negativo fue usada la línea celular HeLa, procedentes de cáncer cervicouterino, en las cuales se encuentra ausente el receptor de asialoglicoproteínas. Para establecer si la internalización de las nanopartículas es favorecida mediante la interacción con el receptor de asialoglicoproteínas, se analizaron dos tiempos de exposición (30 y 90 min) de las nanopartículas a las células antes mencionadas.

La Figura 16 muestra la interacción que se presentó entre las líneas celulares expuestas a los diferentes BSA modificadas. Esto fue posible marcando previamente a las nanopartículas con fluoresceína, generando así señales fluorescentes según su ubicación en las células cuando ocurriera reconocimiento. Podemos observar que hubo un reconocimiento por parte de la línea células Hep G2, con NP BSA-LAC, NP BSA@AcLacEDC y NP BSA@Lactosa. Denotándose por una mayor intensidad de fluorescencia en los dos tiempos establecidos. Esto indica un bio-reconocimiento por parte del receptor de asialoglicoproteínas. Las NP BSA mostró una leve adherencia a la célula a los 30 minutos y aumentando la intensidad de la fluorescencia ligeramente a los 90 minutos. En el caso de las células HeLa, utilizada como control negativo, no se observó reconocimiento por parte de la célula con ninguna de nuestras nanopartículas. Estos resultados son congruentes con previos reportes, donde se han desarrollado nanopartículas de sílca lactosaminadas para evaluar al receptor de asialoglicoproteínas, utilizando la misma línea celular Hep G2 (Quan, 2015).

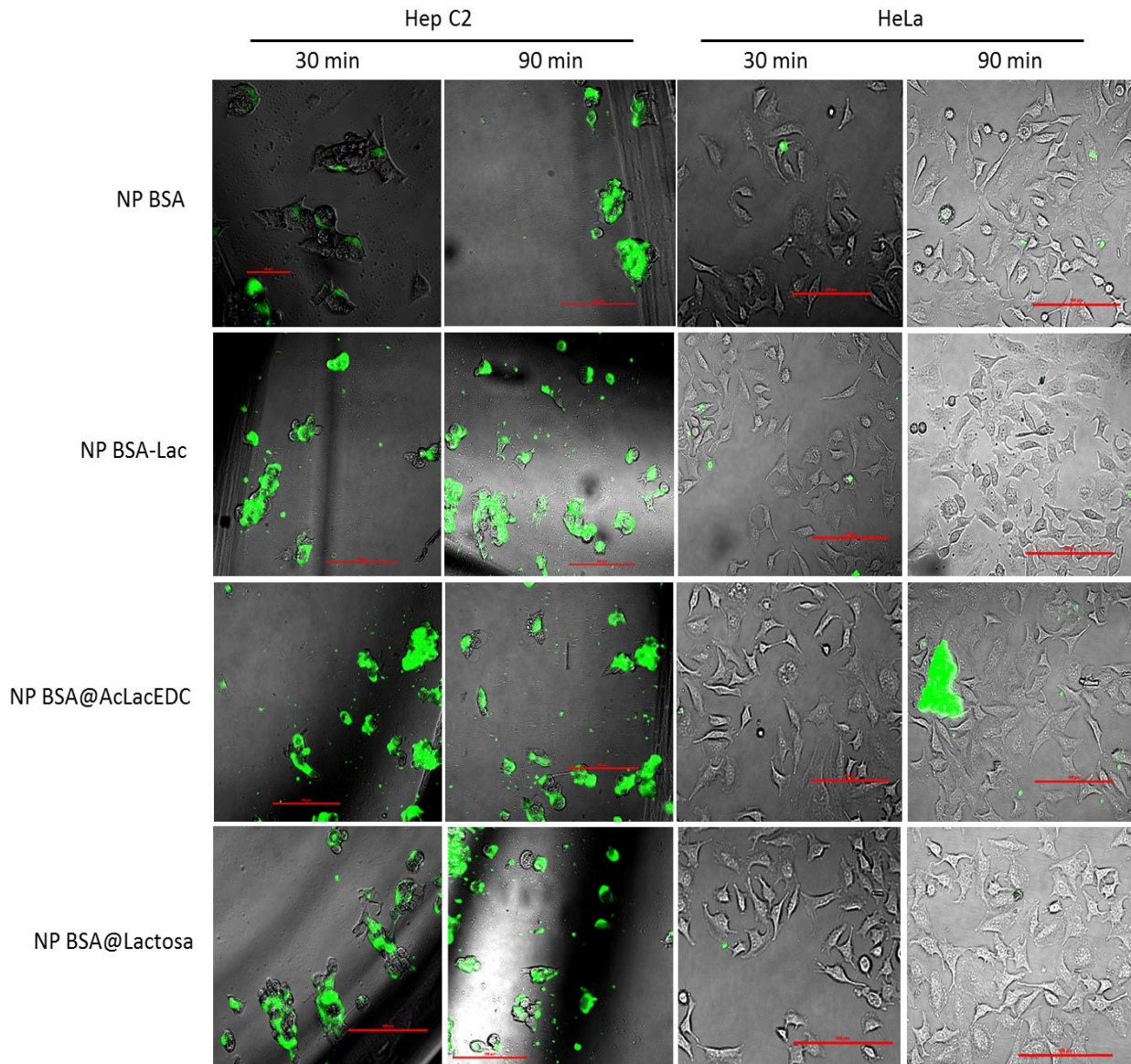


Figura 15. Ensayo de bio-reconocimiento con células, en el lado izquierdo se muestra la interacción de las nanopartículas marcadas con FITC con las células Hep G2 a los 30 y 90 minutos. Del lado derecho se observa la interacción de las nanopartículas con las células HeLa en los mismos tiempos que en la anterior.

RESUMEN DE HALLAZGOS

Se realizó la modificación química de la BSA con lactosa mediante 5 métodos diferentes. En el análisis electroforético solo se observó incremento en la masa molecular en uno de los tratamientos (glicación a 100°C durante 30 min, en condiciones libres de agua).

La espectroscopia FT-IR mostró la presencia de la banda de los carbohidratos (900-1199 cm⁻¹) en todos los tratamientos empleados para la adición de lactosa a la BSA.

Los ensayos de reconocimiento con la lectina de RCA, confirmó la presencia de lactosa disponible para interacción biológica en tres de los productos obtenidos.

Con los glicoconjugados reconocidos por RCA, se sintetizaron las nanopartículas por el método desolvatación, obteniendo nanopartículas de morfología esférica, lisa y con un promedio de tamaño de 150nm, Solo dos de estos tratamientos NP BSA-Lac y NP BSA@Lactosa presentaron un potencial Z mayor de -20mV.

Los ensayos de bioreconocimiento con la línea celular Hep G2, mostraron una favorable interacción) de las nanopartículas que presentan galactosa en su estructura.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos indica que las gliconanopartículas NP BSA@LACTOSA y NP BSA-Lac obtenidas podrían ser utilizadas como vectores para la entrega de un fármaco anti-tumoral, brindándonos una terapia tejido-específica en el caso de carcinoma hepatocelular.

REFERENCIAS

- Aldaco-Sarvide, F. (2012). "Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños." Gaceta Mex Onc **11**(6): 371-379.
- Arellano, L. E. E. and J. A. T. Vázquez (2013). "7Capítul." Farmacología general: una guía de estudio: 47.
- Barrientos, Á. G., et al. (2003). "Gold Glyconanoparticles: Synthetic Polyvalent Ligands Mimicking Glycocalyx-Like Surfaces as Tools for Glycobiological Studies." Chemistry–A European Journal **9**(9): 1909-1921.
- Bertram, G. K. and M. Katzung (2002). "Farmacología básica y clínica." Capítulos **15**: 41.
- Bertrand, N., et al. (2014). "Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology." Advanced drug delivery reviews **66**: 2-25.
- Boisseau, P. and B. Loubaton (2011). "Nanomedicine, nanotechnology in medicine." Comptes Rendus Physique **12**(7): 620-636.
- Dandagi, P., et al. (2006). "Biodegradable microparticulate system of captopril." International journal of pharmaceutics **307**(1): 83-88.
- De La Fuente, J. M. and S. Penadés (2004). "Understanding carbohydrate-carbohydrate interactions by means of glyconanotechnology." Glycoconjugate journal **21**(3): 149-163.
- DeSantis, C. E., et al. (2014). "Cancer treatment and survivorship statistics, 2014." CA: a cancer journal for clinicians **64**(4): 252-271.
- Edlund, U. and A.-C. Albertsson (2002). Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. Degradable aliphatic polyesters, Springer: 67-112.
- Eissa, A. M., et al. (2016). "Glycosylated nanoparticles as efficient antimicrobial delivery agents." Biomacromolecules **17**(8): 2672-2679.
- Farkaš, P., et al. (2013). "Comparison of EDC and DMTMM efficiency in glycoconjugate preparation." International journal of biological macromolecules **60**: 325-327.
- Fenaille, F., et al. (2004). "Solid-state glycation of β -lactoglobulin by lactose and galactose: localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques." Journal of Mass Spectrometry **39**(1): 16-28.
- Gallegos-Tabanico, A. (2017). "Síntesis de Nanopartículas de Albúmina Lactosilada con Potencial uso como vector tejido-específico para cáncer hepático ".

Gerber, D. E. (2008). "Targeted therapies: a new generation of cancer treatments." Am Fam Physician **77**(3): 311-319.

Güler, G., et al. (2016). "Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **161**: 8-18.

Haburcak, R., et al. (2016). "Ligand–Receptor Interaction Modulates the Energy Landscape of Enzyme-Instructed Self-Assembly of Small Molecules." Journal of the American Chemical Society **138**(47): 15397-15404.

Han, J.-H., et al. (1999). "Enhanced hepatocyte uptake and liver targeting of methotrexate using galactosylated albumin as a carrier." International journal of pharmaceutics **188**(1): 39-47.

Hermanson, G. (1996). Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego, CA.

Huang, S., et al. (2016). "Folic-Acid-Mediated Functionalized Gold Nanocages for Targeted Delivery of Anti-miR-181b in Combination of Gene Therapy and Photothermal Therapy against Hepatocellular Carcinoma." Advanced Functional Materials.

INEGI (2014). ""ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DE...DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)". DATOS NACIONALES." Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>.

Jesús, M. and S. Penadés (2006). "Glyconanoparticles: types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1760**(4): 636-651.

Kumar Khanna, V. (2012). "Targeted delivery of nanomedicines." ISRN pharmacology **2012**.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature **227**(5259): 680-685.

Ledesma-Osuna, A. I., et al. (2009). "Biorecognition of chemically modified bovine serum albumin with lactose prepared under different conditions." Journal of agricultural and food chemistry **57**(20): 9734-9739.

Leopold, L. F., et al. (2011). "Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis." Journal of Spectroscopy **26**(2): 93-104.

Lin, X. (2009). An essential glycobiology resource for developmental biologists, Oxford University Press for The Company of Biologists Limited.

López-Cartes, C., et al. (2005). "Gold nanoparticles with different capping systems: an electronic and structural XAS analysis." The Journal of Physical Chemistry B **109**(18): 8761-8766.

Llovet, J. M., et al. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." New England journal of medicine **359**(4): 378-390.

Maeda, H., et al. (2013). "The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo." Advanced drug delivery reviews **65**(1): 71-79.

Mariotto, A. B., et al. (2011). "Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010–2020." Journal of the National Cancer Institute.

Nagavarma, B., et al. (2012). "Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles—a review." Asian J. Pharm. Clin. Res **5**(3): 16-23.

Neira-Carrillo, A., et al. (2013). "Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: "un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina"." Avances en Ciencias Veterinarias **28**(2): Pág. 31-40.

Peer, D., et al. (2007). "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." Nature nanotechnology **2**(12): 751-760.

Pimentel, L. F., et al. (2007). "Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária."

Prabhakar, U., et al. (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology, AACR.

Quan, G., et al. (2015). "Lactosaminated mesoporous silica nanoparticles for asialoglycoprotein receptor targeted anticancer drug delivery." Journal of nanobiotechnology **13**(1): 7.

Robinson, A., et al. (2005). "Probing Lectin and Sperm with Carbohydrate-Modified Quantum Dots." ChemBioChem **6**(10): 1899-1905.

Rojas-Aguirre, Y., et al. (2016). "La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿ la (r) evolución de la terapia contra el cáncer?" Educación Química **27**(4): 286-291.

Sangabathuni, S., et al. (2016). "Glyco-gold nanoparticle shapes enhance carbohydrate-protein interactions in mammalian cells." Nanoscale **8**(25): 12729-12735.

Santa, C. F. and B. L. López Osorio (2013). "Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos." Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales **37**(142): 115-124.

Sarabia-Sainz, A. I., et al. (2011). "Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose." Acta Biochim. Pol **58**: 95-100.

Shang, L., et al. (2014). "Nanoparticle interactions with live cells: Quantitative fluorescence microscopy of nanoparticle size effects." Beilstein journal of nanotechnology **5**(1): 2388-2397.

Siegel, R. L., et al. (2016). "Cancer statistics, 2016." CA: a cancer journal for clinicians **66**(1): 7-30.

Suárez, A. I. T. (2016). "a nanotecnología aplicada." DIAGNOSTICO **55**: 1.

Sun, E. Y., et al. (2006). "Continuous analyte sensing with magnetic nanoswitches." Small **2**(10): 1144-1147.

Talevi, A., et al. (2016). "Procesos biofarmacéuticos."

Tanaka, K. and Y. Chujo (2014). "Design of functionalized nanoparticles for the applications in nanobiotechnology."

Thao, L., et al. (2016). "Doxorubicin-Bound Albumin Nanoparticles Containing a TRAIL Protein for Targeted Treatment of Colon Cancer." Pharmaceutical research **33**(3).

Tseng, Y.-T., et al. (2011). "Preparation of highly luminescent mannose–gold nanodots for detection and inhibition of growth of Escherichia coli." Biosensors and Bioelectronics **27**(1): 95-100.

Xue, W.-J., et al. (2016). "Asialoglycoprotein receptor-magnetic dual targeting nanoparticles for delivery of RASSF1A to hepatocellular carcinoma." Scientific reports **6**.

Xue, X., et al. (2011). "Synthetic polymers for simultaneous bacterial sequestration and quorum sense interference." Angewandte Chemie International Edition **50**(42): 9852-9856.

Yedomon, B., et al. (2013). "Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **85**(3): 398-405.

Zhang, Q., et al. (2008). "A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease." Journal of proteome research **8**(2): 754-769.