

## TRABAJO FIN DE GRADO

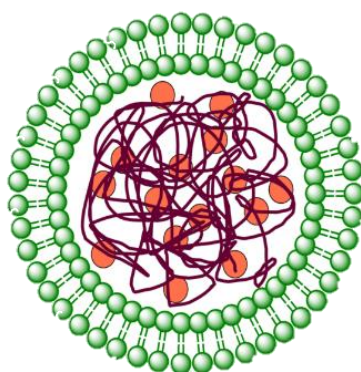
Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna

Curso 2019-2020

---

# Nanopartículas híbridas para administración local

---



*Alumna:* Sara Gálvez Rodríguez

*Tutor:* Edgar Pérez Herrero

*Cotutora:* Patricia Díaz Rodríguez

*Departamento:* Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

# Índice

1. Abstract .....	1
2. Resumen .....	2
3. Introducción .....	3
3.1. Tratamientos convencionales del mioma uterino .....	3
3.2. Desarrollo de nuevos tratamientos.....	4
3.2.1. Tipos de nanotransportadores .....	4
3.2.2. Funcionalización de nanopartículas .....	6
4. Objetivos .....	8
5. Materiales y métodos .....	9
5.1. Materiales.....	9
5.2. Elaboración de las nanopartículas híbridas.....	9
5.3. Caracterización de las nanopartículas híbridas .....	11
5.4. Cuantificación del anticuerpo anti-CD24 por fluorimetría.....	11
6. Resultados y discusión .....	12
6.1. Influencia de la relación lípido catiónico:lípido neutro en las características físico-químicas de las nanopartículas híbridas .....	12
6.2. Cuantificación del anticuerpo anti-CD24 por fluorimetría.....	14
6.3. Diseño de un protocolo de funcionalización de nanopartículas con anticuerpo anti-CD24.....	15
7. Conclusiones .....	18
8. Bibliografía.....	19

## **1. Abstract**

Gene therapy shows promising outcomes for the local treatment of several tumors as uterine fibroids. Therefore, novel new non-viral gene vectors have been developed recently, including nanoparticles. This work aims to analyze the influence of nanoparticles surface components on their physicochemical characteristics. These characteristics should be controlled to allow subsequent functionalization processes for the vectorization of oligonucleotides towards tumor cells.

Hybrid nanoparticles were prepared using a modified nanoprecipitation technique. Experimentally, we have proved the modification of lipid components ratio (DOTAP:lecithin) affected nanoparticles  $Z$  potential. However, diameter and polydispersity index remain unchanged, obtaining acceptable values for all the formulations tested.

Finally, based on a bibliographic review of the strategies currently used to functionalize nanoparticles with antibodies and considering the key parameters that condition them, a protocol was proposed to functionalize the nanoparticles with anti-CD24 antibody. This antibody has been chosen because CD24 protein is overexpressed on uterine fibroids cells surface. Thus, these functionalized nanoparticles could be used for oligonucleotides specific vectorization to tumor cells present on uterine fibroids.

## 2. Resumen

La terapia génica presenta interesantes ventajas para el tratamiento local de diversos tumores como los miomas uterinos. Por ello, en los últimos años se están desarrollando nuevos vectores génicos no virales, tales como las nanopartículas. En el presente trabajo se estudia la influencia de los componentes de la superficie de las nanopartículas sobre sus características físico-químicas. El control de dichas características es determinante para los posteriores procesos de funcionalización, los cuales permiten la vectorización de oligonucleótidos de interés hacia las células tumorales.

Se han elaborado nanopartículas híbridas mediante el método de nanoprecipitación modificada. Experimentalmente, se ha observado cómo modificando la relación de los componentes lipídicos de las nanopartículas (DOTAP:lecitina) se producen variaciones en el potencial Z de las mismas. Sin embargo, el diámetro e índice de polidispersidad se mantienen inalterados, obteniéndose unos valores adecuados para todas las formulaciones analizadas.

Por último, en base a una revisión bibliográfica de las estrategias empleadas en la actualidad para la funcionalización de nanopartículas con anticuerpos y teniendo en cuenta los parámetros clave que las condicionan, se diseñó un protocolo para funcionalizar las nanopartículas con anticuerpo anti-CD24. La elección de este anticuerpo se justifica por la sobreexpresión de la proteína CD24 en la superficie de las células de los miomas uterinos. De esta manera, las nanopartículas funcionalizadas estarían diseñadas para la vectorización específica de oligonucleótidos a las células tumorales del mioma.

### **3. Introducción**

El mioma uterino es una tumoración del músculo liso del útero. Constituye la neoplasia sólida benigna más común del aparato genital femenino y se estima que aproximadamente un 70% de las mujeres desarrollarán algún mioma uterino en su vida, aumentado su prevalencia con la edad y siendo mayor durante la etapa fértil [1].

Los miomas uterinos pueden ser individuales, pero en la mayoría de los casos se presentan como múltiples tumoraciones [1]. Por lo general, reducen la capacidad reproductiva y, aunque normalmente no cursan con síntomas, pueden causar sangrado menstrual excesivo, dolor pélvico y otras manifestaciones que afectan negativamente a la calidad de vida. Además, los miomas uterinos suponen un gran gasto económico para las pacientes, así como para los sistemas sanitarios [2].

#### **3.1. Tratamientos convencionales del mioma uterino**

En la actualidad existen diversas estrategias terapéuticas empleadas en el tratamiento del mioma uterino, siendo las intervenciones quirúrgicas (histerectomía, miomectomía, ablación del endometrio y embolización de la arteria uterina) las más utilizadas. También han sido desarrollados tratamientos farmacológicos con una doble finalidad: 1) paliar los principales síntomas (dolor y sangrado) y 2) reducir el tamaño de las tumoraciones. Dentro del primer grupo, destacan fármacos como los anticonceptivos hormonales (orales o administrados mediante dispositivos intrauterinos), antiinflamatorios no esteroideos y antifibrinolíticos como el ácido tranexámico. Por otra parte, para la segunda estrategia se dispone de dos grupos de fármacos, los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina y los moduladores selectivos del receptor de progesterona, con los que se consigue reducir significativamente el tamaño de las masas tumorales uterinas [3, 4].

Sin embargo, estas estrategias terapéuticas presentan diversos inconvenientes; por un lado, los procedimientos quirúrgicos constituyen técnicas invasivas y conllevan riesgos, y, por otro lado, la mayoría de los tratamientos farmacológicos presentan efectos adversos no deseables y, además, algunos de ellos resultan no ser suficientemente efectivos [3, 4].

### **3.2. Desarrollo de nuevos tratamientos**

Las desventajas que presentan los tratamientos convencionales del mioma uterino han impulsado la investigación hacia nuevos campos como el de la nanotecnología o la terapia génica [5].

La terapia génica emplea oligonucleótidos para restaurar la función normal de los genes supresores de tumores o bloquear la actividad oncogénica de las células tumorales. Sin embargo, el desarrollo de sistemas eficientes capaces de cargar y liberar el material génico de una manera adecuada es un factor crítico para asegurar el éxito de la terapia génica [6].

En este sentido, los nanotransportadores constituyen una buena estrategia al permitir dirigir las moléculas terapéuticas específicamente hacia las células tumorales, mejorando con ello su eficacia y reduciendo sus efectos adversos y toxicidad [5, 7]. Estos sistemas se presentan como una alternativa a los vectores virales porque éstos, a pesar de su elevada eficiencia de transfección, poseen una mayor citotoxicidad e inmunogenicidad [8, 9].

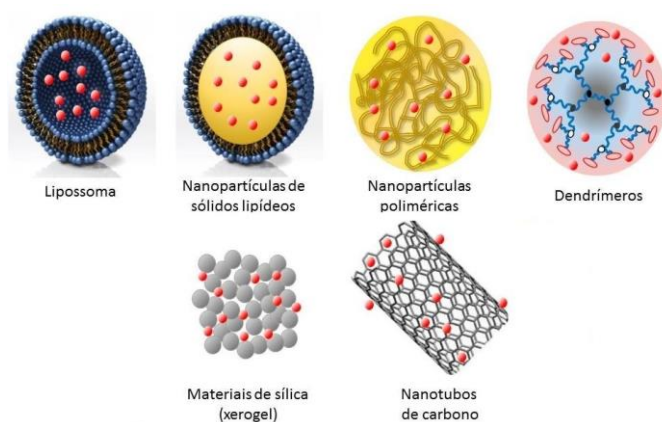
Además, los nanotransportadores, a diferencia de los tratamientos convencionales del mioma uterino, facilitan la administración local de moléculas terapéuticas. El desarrollo de sistemas de terapia génica para aplicación local mediante inyección intratumoral, electroporación o implantes, ofrece una eficiencia de transfección significativamente mejorada y reduce la toxicidad en comparación con la administración sistémica [10].

En el diseño de sistemas para la encapsulación de oligonucleótidos en la escala nanométrica, es común incluir en su composición moléculas catiónicas como el sulfato de protamina, que faciliten la condensación de los oligonucleótidos para asegurar una adecuada incorporación del material génico [11].

#### **3.2.1. Tipos de nanotransportadores**

En los últimos años, especialmente para aplicaciones relacionadas con la oncología, se han desarrollado diversos tipos de nanotransportadores. Atendiendo a su composición, se pueden clasificar en orgánicos (nanopartículas lipídicas y nanopartículas poliméricas, entre otros tipos) e inorgánicos (nanotubos de carbono y nanopartículas de sílice mesoporosa, entre otros) [12].

Las nanopartículas poliméricas y lipídicas son los nanotransportadores más utilizados para el tratamiento del cáncer [13].



**Figura 1.-** Representación esquemática de algunos tipos de nanotransportadores.

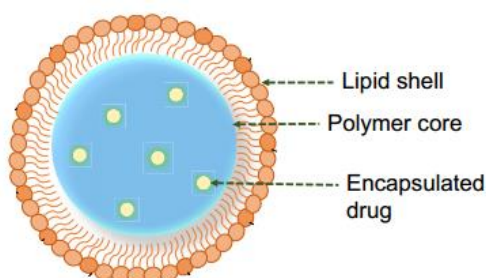
*Reproducida con permiso de Carlos-Salazar MJ (2015).*

Las nanopartículas poliméricas son sistemas coloidales sólidos en los que la molécula terapéutica se disuelve, atrapa, encapsula o adsorbe en una matriz polimérica [7]. La ventaja más destacable de estas nanopartículas es el control de su estructura y tamaño, así como la estabilidad del sistema [13, 14]. Sin embargo, en comparación con otros tipos de nanotransportadores, las nanopartículas poliméricas presentan una menor tasa de captación celular y no son tan biocompatibles [13, 15].

En los últimos años se han empleado diferentes tipos de nanopartículas lipídicas para la liberación de oligonucleótidos, tales como liposomas y lípidos ionizables. Los liposomas se encuentran entre los primeros sistemas utilizados para la administración de ADN y son los más avanzados en desarrollo clínico. Estos sistemas están compuestos de lípidos anfifílicos que se autoensamblan espontáneamente en vesículas. Los lípidos catiónicos, como el cloruro de DOTAP, se usan comúnmente para formar liposomas catiónicos, los cuales poseen elevada afinidad por los oligonucleótidos. Sin embargo, el uso de liposomas catiónicos está limitado por su toxicidad, inmunogeneicidad y la formación de coágulos [16, 17].

Con el fin de aprovechar los beneficios que ofrecen los dos anteriores tipos de nanopartículas y superar las limitaciones que presentan, se han desarrollado nanopartículas híbridas formadas por un núcleo polimérico y una cubierta lipídica, combinando así la integridad estructural de los polímeros con la elevada internalización

de los lípidos que, además, podrían facilitar la localización de las nanopartículas en un lugar específico dentro de las células [13, 14].



**Figura 2.-** Representación esquemática de una nanopartícula híbrida.

*Reproducida con permiso de Mukherjee et al. (2019).*

Una de las técnicas más empleadas para la preparación de nanopartículas híbridas es el llamado método de dos pasos, en el cual nanopartículas poliméricas preformadas son mezcladas con vesículas lipídicas preformadas. La necesidad de elaborar previamente y por separado nanopartículas poliméricas y vesículas lipídicas hace que el método de dos pasos sea ineficiente. Por ello, se ha desarrollado el método de un paso, en el que se mezclan disoluciones de polímeros y lípidos, los cuales después se autoensamblarán para formar las nanopartículas híbridas por nanoprecipitación o emulsión/evaporación del disolvente [18].

### **3.2.2. Funcionalización de nanopartículas**

La modificación de la superficie de las nanopartículas es una de las estrategias utilizadas para la vectorización de moléculas terapéuticas hacia las células tumorales. El método más común se basa en conjugar en la cubierta de las nanopartículas un ligando que, posteriormente, se unirá a un receptor que se encuentra sobreexpresado en la superficie de las células tumorales. Estos ligandos suelen ser anticuerpos, debido a su alta especificidad y adecuadas propiedades *in vivo* [19, 20].

En el caso de los miomas uterinos, recientemente se ha demostrado que existe una población de células que sobreexpresa en su superficie la proteína CD24. Esta población de células presenta una menor diferenciación y sus mecanismos de control celular están alterados, por ello juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad [21].



La unión de ligandos a la superficie de las nanopartículas es lo que se conoce como funcionalización. Las nanopartículas pueden ser funcionalizadas a través de diversos métodos, dentro de los cuales destacan la adsorción física y la conjugación química. En el método de adsorción física los ligandos se unen a la superficie de las nanopartículas a través de interacciones débiles. Es de vital importancia controlar y mantener constantes las características superficiales de las nanopartículas, ya que modifican el proceso de adsorción física. Por otro lado, el método de conjugación química establece enlaces covalentes entre los ligandos y la superficie de las nanopartículas [20].

## 4. Objetivos

Este trabajo tiene un doble objetivo:

1. Determinar la influencia de los componentes lipídicos de nanopartículas híbridas formuladas mediante la técnica de nanoprecipitación modificada en las características físico-químicas de las mismas.
2. Diseñar un protocolo de funcionalización de nanopartículas con anticuerpo anti-CD24, de tal forma que puedan servir como vector para la administración local de oligonucleótidos en el tratamiento de miomas uterinos.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Materiales

Se utilizaron los siguientes reactivos y disolventes: anticuerpo anti-CD24 (SN3) marcado con fluoróforo (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594), suministrado por Santa Cruz Biotechnology (Estados Unidos); poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Resomer<sup>®</sup> RG 502; 50:50 0,22 g/dL viscosidad intrínseca), suministrado por Evonik Industries AG (Alemania); cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (cloruro de DOTAP) y sulfato de protamina, suministrados por Sigma-Aldrich Corporation (Estados Unidos); L- $\alpha$ -fosfatidilcolina 95% (lecitina de soja), suministrada por Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids (Estados Unidos); acetona para análisis EMSURE<sup>®</sup>, suministrada por Sigma-Aldrich (Alemania); etanol, suministrado por Scharlab (España) y agua desionizada.

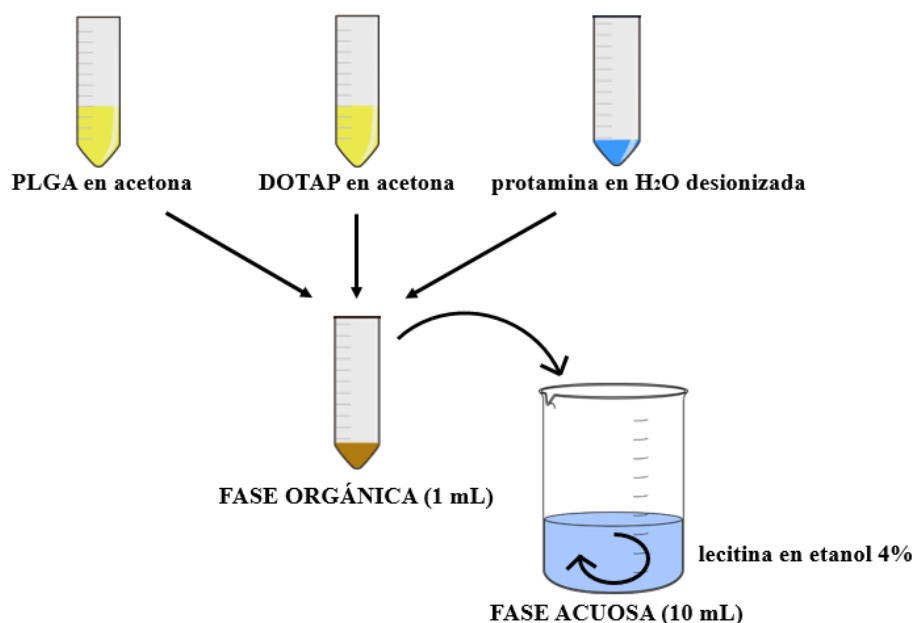
### 5.2. Elaboración de las nanopartículas híbridas

Las nanopartículas híbridas se elaboraron por nanoprecipitación modificada en un único paso (*Figura 3*).

En esta técnica, el polímero (PLGA) se disolvió en un disolvente orgánico miscible en agua (acetona). También se preparó una disolución de cloruro de DOTAP en acetona y una disolución de sulfato de protamina en agua desionizada. La mezcla de estas tres disoluciones en diferentes proporciones constituyó la fase orgánica, teniendo en cuenta que cada mililitro de volumen final contiene 50  $\mu$ L de solución de sulfato de protamina.

De forma paralela, la lecitina de soja se disolvió en una solución acuosa (etanol al 4%). La mezcla se sometió a agitación y calentamiento a 65°C para favorecer la solubilización de la lecitina de soja. Esta disolución constituyó la fase acuosa.

A continuación, la fase orgánica se añadió sobre la fase acuosa bajo agitación. La mezcla se dejó en agitación durante una hora en campana extractora, para evaporar el disolvente.



**Figura 3.-** Método de nanoprecipitación modificada en un único paso.

Se elaboraron 8 lotes de nanopartículas híbridas manteniendo constantes las cantidades de PLGA (5 mg) y sulfato de protamina (45  $\mu$ g), pero variando las cantidades de lípido catiónico (cloruro de DOTAP) y lípido neutro (lecitina de soja), tal y como se muestra en la **Tabla 1**. Los volúmenes de las fases orgánica y acuosa fueron 1 mL y 10 mL, respectivamente.

<b>Lote</b>	<b>DOTAP (mg)</b>	<b>Lecitina (mg)</b>
<b>1</b>	0,4	—
<b>2</b>	0,2	0,3
<b>3</b>	0,2	0,4
<b>4</b>	0,2	0,4
<b>5</b>	0,1	0,3
<b>6</b>	0,1	0,3
<b>7</b>	0,1	0,4
<b>8</b>	0,1	0,4

**Tabla 1.-** Composición de los lotes de nanopartículas híbridas elaborados.

### **5.3. Caracterización de las nanopartículas híbridas**

Se realizó la caracterización de las nanopartículas en cuanto a su diámetro, índice de polidispersidad y potencial Z. Estos parámetros fueron determinados usando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Inglaterra), que utiliza la técnica de la dispersión dinámica de la luz para la determinación del diámetro e índice de polidispersidad, y la técnica de velocimetría láser de efecto Doppler para la determinación del potencial Z.

### **5.4. Cuantificación del anticuerpo anti-CD24 por fluorimetría**

El anticuerpo anti-CD24 se comercializa marcado con un fluoróforo (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594), por lo que su cuantificación se puede realizar mediante fluorimetría. Para ello, se prepararon 9 diluciones seriadas del mismo (estándares) en tampón fosfato a pH 7,48 y un blanco de tampón fosfato. Utilizando una placa de pocillos negra, se realizaron, por duplicado, medidas de los estándares y blanco haciendo uso del lector de placas Gen5 1.08 (BioTek Instruments, Estados Unidos). En el equipo se fijaron los parámetros de excitación a  $590 \pm 20$  nm y emisión a  $645 \pm 40$  nm, ya que el pico de excitación del fluoróforo utilizado (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594) se encuentra a 590 nm y el pico de emisión a 617 nm.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Influencia de la relación lípido catiónico:lípido neutro en las características físico-químicas de las nanopartículas híbridas

En este trabajo se ha utilizado el método de nanoprecipitación en un único paso para la elaboración de nanopartículas híbridas, donde el intercambio entre el solvente y el no solvente produce, de forma simultánea, la precipitación del polímero y el autoensamblaje del lípido a su alrededor [14, 18].

Para la elaboración de las nanopartículas híbridas las cantidades de PLGA y protamina fueron mantenidas constantes (5 mg de PLGA y 45 µg de protamina) al haber sido optimizadas previamente por el grupo de investigación. Sin embargo, las cantidades de DOTAP (⊕) y lecitina (⊙), componentes que forman parte de la cubierta, se variaron entre lotes para conocer su efecto en las características físico-químicas de las nanopartículas híbridas elaboradas.

En la **Tabla 2** se recoge la caracterización de los 8 lotes de nanopartículas elaborados. No obstante, se obtuvieron otros lotes en los que no se utilizó el lípido catiónico, pero que no se han incluido en el trabajo al dar lugar a sistemas físicamente inestables (formación de agregados visibles).

LOTE	Relación ⊕:⊙	Z-Ave (nm)	PdI	ZP (mV)
1	0,4:0	167,40	0,06	49,43
2	0,2:0,3	178,07	0,10	51,07
3	0,2:0,4	187,90	0,08	45,17
4	0,2:0,4	180,13	0,09	44,27
5	0,1:0,3	184,43	0,08	35,53
6	0,1:0,3	168,47	0,09	21,09
7	0,1:0,4	176,30	0,09	33,73
8	0,1:0,4	176,13	0,15	30,73

**Tabla 2.-** Caracterización físico-química de los lotes de nanopartículas elaborados.

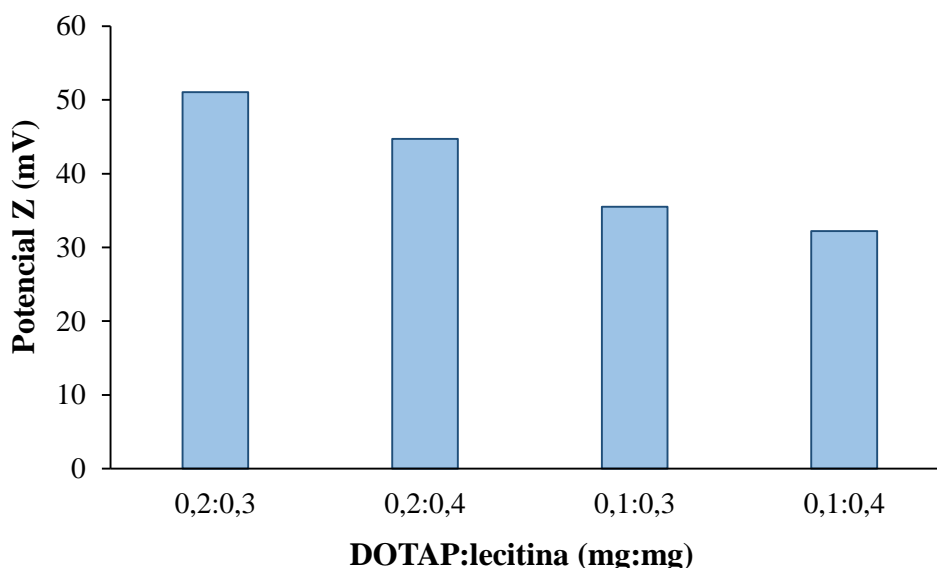
Atendiendo a las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, se buscan sistemas con un diámetro de partícula (Z-Ave) no superior a 200-250 nm. No obstante, aún está por establecer el diámetro óptimo y, además, es probable que sea específico para cada

aplicación. El diámetro óptimo de las nanopartículas depende de la localización del tumor, su permeabilidad y el tipo de células que lo constituyen, influyendo fuertemente en el mecanismo mediante el cual se internalizan en las células tumorales [22].

El índice de polidispersidad (PDI) debe tomar valores inferiores a 0,20 ya que esto indica que la distribución de tamaños es suficientemente estrecha y por tanto existe homogeneidad de tamaños [23].

Las variaciones de la relación DOTAP:lecitina evaluadas no mostraron efectos relevantes sobre el diámetro e índice de polidispersidad de los sistemas, ya que todos los lotes presentan diámetros en el rango de 167 a 188 nm con índices de polidispersidad de 0,06-0,15, tal y como se muestra en la **Tabla 2**. Además, todos los sistemas mostraron valores de diámetro e índice de polidispersidad adecuados de acuerdo con lo descrito en los párrafos anteriores.

Por último, la estabilidad física de los sistemas está altamente condicionada por el potencial Z (ZP), que debe mantenerse fuera del intervalo [-20,00 mV, +20,00 mV]. Cuanto más elevado sea el potencial Z (en valor absoluto), mayor será la repulsión entre las nanopartículas, evitándose así la formación de agregados y por tanto favoreciéndose la estabilidad del sistema [24].



**Figura 4.-** Dependencia del potencial Z con la variación de la relación DOTAP:lecitina. Para las relaciones 0,2:0,4 y 0,1:0,4 se han representado valores medios.

Analizando el efecto de la relación DOTAP:lecitina sobre el potencial Z, se observa que, a medida que disminuye dicha relación, el potencial Z de las nanopartículas se va haciendo menos positivo, tal y como se muestra en la **Figura 4**. Los resultados obtenidos son los esperados ya que, al aumentar la proporción de lípido neutro frente al lípido con carga positiva, debe disminuir el valor del potencial Z.

## 6.2. Cuantificación del anticuerpo anti-CD24 por fluorimetría

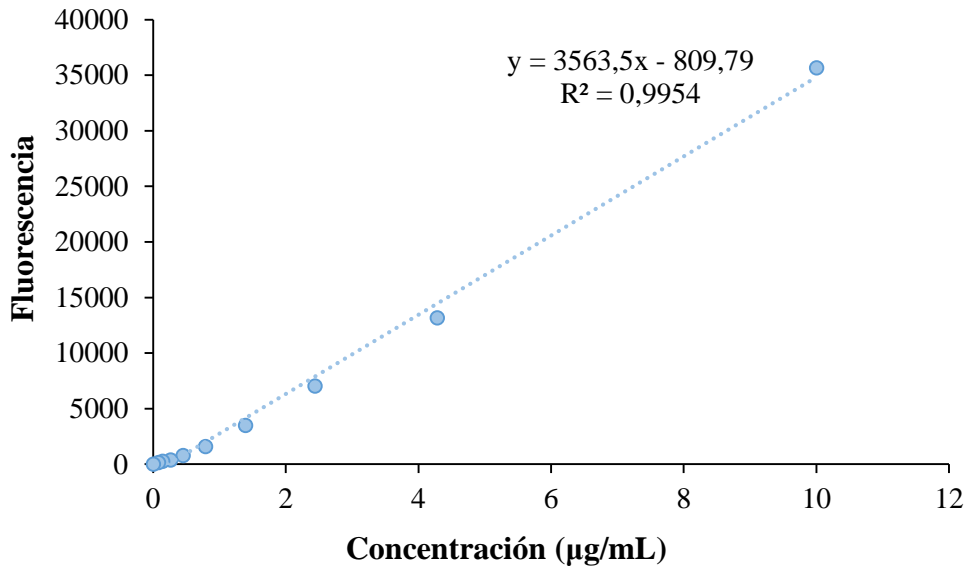
Se preparó una recta de calibrado del anticuerpo anti-CD24 para comprobar que la respuesta del equipo (fluorescencia) aumenta de manera lineal a medida que la concentración de anticuerpo se va haciendo mayor y establecer el rango de concentraciones con comportamiento lineal. En la **Tabla 3** se recogen las medidas de fluorescencia de 9 estándares del anticuerpo anti-CD24 preparados con concentraciones en el intervalo de 0,08 a 10 µg/mL.

Estándar	Concentración (µg/mL)	Fluorescencia	
<b>1</b>	10,00	34.554	37.085
<b>2</b>	4,28	13.063	13.599
<b>3</b>	2,44	7.261	7.131
<b>4</b>	1,39	3.652	3.629
<b>5</b>	0,79	1.795	1.673
<b>6</b>	0,45	921	951
<b>7</b>	0,26	522	520
<b>8</b>	0,14	404	421
<b>9</b>	0,08	301	307
<b>Blanco</b>	0,00	149	146

**Tabla 3.-** Fluorescencia de los estándares de anticuerpo anti-CD24.

Con estos valores de fluorescencia se construyó la recta fluorescencia-concentración de anticuerpo, tal y como se muestra en la **Figura 5**.





**Figura 5.-** Recta fluorescencia vs concentración de anticuerpo anti-CD24.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) presenta un valor muy próximo a 1, indicando que los datos se ajustan a una recta.

### 6.3. Diseño de un protocolo de funcionalización de nanopartículas con anticuerpo anti-CD24

Con el fin de diseñar un protocolo de funcionalización para las nanopartículas híbridas elaboradas, se consultó bibliografía sobre la funcionalización de diversos tipos de nanopartículas con anticuerpos monoclonales.

La adsorción física de anticuerpos monoclonales en la superficie de las nanopartículas generalmente se basa en fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de atracción de van der Waals. Esta estrategia de funcionalización es la más sencilla y una de las más empleadas, ya que no implica la modificación química ni del anticuerpo ni de las nanopartículas [25].

Así, Ciaurriz et al. (2017) funcionalizaron por adsorción física nanopartículas de oro con anticuerpos de cabra para ser empleadas con fines diagnósticos en inmunoensayos. Para ello, la suspensión de nanopartículas fue incubada con el anticuerpo durante 1 hora añadiendo sacarosa al medio. Posteriormente, las nanopartículas fueron purificadas mediante centrifugación. Además, estos autores compararon el método de adsorción

física con la funcionalización por conjugación química y observaron que el primer método era la mejor opción, ya que presentaba un mayor rendimiento [26].

Empleando una estrategia similar, Ruiz et al. (2019) funcionalizaron nanopartículas de oro con concentraciones variables de un anticuerpo modelo mediante su incubación directa durante 1 hora a temperatura ambiente. Observaron que el pH del medio modifica la carga del anticuerpo y condiciona su disposición en la superficie de las nanopartículas. De esta manera, una disminución de pH de 8,5 a 7,5 dio lugar a una mayor funcionalización [27].

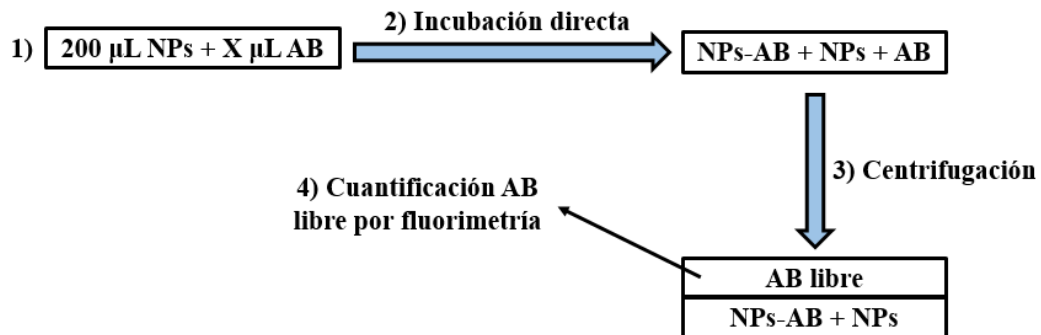
Por otro lado, Choi et al. (2018) funcionalizaron nanopartículas poliméricas de PLGA (14 mg) mediante adsorción física del anticuerpo monoclonal trastuzumab (1 mg) por incubación directa durante 1 hora. Las nanopartículas así funcionalizadas, diseñadas para el tratamiento del cáncer de mama, fueron separadas mediante centrifugación y el anticuerpo unido se evaluó utilizando un kit de ensayo de ácido bicinonínico (ensayo BCA) [28].

De manera similar, Jahan et al. (2018) funcionalizaron nanopartículas poliméricas de PLGA con anticuerpo anti-CD205 mediante incubación directa a 4°C durante 4 horas en tampón fosfato pH 7,2. Las nanopartículas fueron purificadas y la cantidad de anticuerpo no unido fue evaluada por ensayo BCA. Así, estas nanopartículas diseñadas como vacunas para el tratamiento del cáncer mostraron una capacidad adecuada para vectorizarse hacia células CD205 positivas [29].

Teniendo en cuenta los estudios descritos, se propone emplear una relación nanopartícula:anticuerpo 14:1. La funcionalización de las nanopartículas se podría realizar por incubación directa de las suspensiones de nanopartículas con el anticuerpo seleccionado (anticuerpo anti-CD24). La eficiencia de adsorción podría ser evaluada mediante la cuantificación por fluorimetría del anticuerpo no incorporado. De esta manera, el protocolo de funcionalización que se propone es el siguiente (**Figura 6**):

1. Calcular el volumen de anticuerpo anti-CD24 (200 µg/mL) necesario para funcionalizar 200 µL de suspensión de nanopartículas, empleando una relación nanopartícula:anticuerpo 14:1.
2. Incubación directa de ambos componentes en tampón fosfato pH 7,48 bajo dos condiciones: a) 1 hora a temperatura ambiente y b) 4 horas a 4°C.

3. Trascurrido el periodo de incubación, separar las nanopartículas por centrifugación (16.000 xg durante 30 minutos).
4. Mediante fluorimetría, determinar en el sobrenadante la cantidad de anticuerpo no incorporado. De esta manera, se evalúa la eficiencia de adsorción.



**Figura 6.-** Protocolo de funcionalización diseñado.

*NPs: nanopartículas; AB: anticuerpo.*

## 7. Conclusiones

El trabajo desarrollado permite obtener las siguientes conclusiones:

1. Las variaciones de la relación DOTAP:lecitina evaluadas no mostraron efectos relevantes sobre el diámetro e índice de polidispersidad, obteniéndose en todos los casos sistemas que presentan valores adecuados de ambos parámetros.
2. La variación en la composición de la cubierta lipídica de las nanopartículas híbridas permite obtener nanopartículas con potencial Z variable.
3. Es necesario incluir en la composición de las nanopartículas híbridas un lípido catiónico para conseguir obtener sistemas estables.
4. La cantidad de anticuerpo anti-CD24 en solución puede cuantificarse de manera adecuada mediante fluorimetría.
5. La revisión bibliográfica realizada ha permitido proponer un protocolo de funcionalización de nanopartículas híbridas que podría ser empleado en futuros ensayos.

## 8. Bibliografía

1. Sparic R, Mirkovic L, Malvasi A, Tinelli A. Epidemiology of Uterine Myomas: A Review. *International Journal of Fertility and Sterility*. 2016;9(4):424-435.
2. Elsaied HE, Eldin SAN, Gad AH, Mohamed HA-K. Effect of Uterine Fibroid on Women's Health Related Quality of Life. *Assiut Scientific Nursing Journal*. 2020;8:1-11.
3. Jeréz-Corrales AC, Chils-Vargas JK, de Quesada-Arceo S, Guerra-Osorio JM, Arceo-Espinosa M, Fernández-Leiva R. Mioma Uterino: un Trastorno Frecuente en Mujeres en Edad Fértil. 16 de Abril. 2015;54(257):59-70.
4. Mas A, Tarazona M, Carrasco JD, Estaca G, Cristóbal I, Monleón J. Updated Approaches for Management of Uterine Fibroids. *International Journal of Women's Health*. 2017;9:607-617.
5. Lungu II, Grumezescu AM, Volceanov A, Andronescu E. Nanobiomaterials Used in Cancer Therapy: An Up-To-Date Overview. *Molecules*. 2019;24(19):3547.
6. Al-Hendy A, Salama S. Gene Therapy and Uterine Leiomyoma: A Review. *Human Reproduction Update*. 2006;12(4):385-400.
7. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric Nanoparticles for Targeted Treatment in Oncology: Current Insights. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10:1001-1018.
8. Kafshdooz T, Kafshdooz L, Akbarzadeh A, Hanifehpour Y, Joo SW. Applications of Nanoparticle Systems in Gene Delivery and Gene Therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016;44(2):581-587.
9. Roacho-Perez JA, Gallardo-Blanco HL, Sanchez-Dominguez M, Garcia-Casillas PE, Chapa-Gonzalez C, Sanchez-Dominguez CN. Nanoparticles for death-induced Gene Therapy in Cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(1):1413-1420.
10. Zhao L, Wu J, Zhou H, Yuan A, Zhang X, Xu F, Hu Y. Local Gene Delivery for Cancer Therapy. *Current Gene Therapy*. 2011;11(5):423-432.
11. Scheicher B, Schachner-Nedherer AL, Zimmer A. Protamine-oligonucleotide-nanoparticles: Recent Advances in Drug Delivery and Drug Targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;75:54-59.

12. Misra C, Gaur M, Gupta LN. Nanotechnology: Emerging Platform for Drug Based Delivery System in Cancer. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 2019;9(4):744-749.
13. Yuan Y, Chiba P, Cai T, Callaghan R, Bai L, Cole SPC, Cai Y. Fabrication of Psoralen-Loaded Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles and Their Reversal Effect on Drug Resistance of Cancer Cells. *Oncology Reports*. 2018;40(2):1055-1063.
14. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer Hybrid Nanoparticles as a Next-Generation Drug Delivery Platform: State of the Art, Emerging Technologies, and Perspectives. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:1937-1952.
15. Raman S, Mahmood S, Rahman A. A Review on Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles and Preparation with Recent Update. *Materials Science Forum*. 2020;981:322-327.
16. Riley MK, Vermerris W. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review. *Nanomaterials (Basel)*. 2017;7(5):94.
17. Mukalel AJ, Riley RS, Zhang R, Mitchell MJ. Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Applications in Cancer Immunotherapy. *Cancer Letters*. 2019;458:102-112.
18. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles as a New Generation Therapeutic Delivery Platform: A Review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;85(3 Pt A):427-443.
19. De la Puente P, Azab AK. Nanoparticle Delivery Systems, General Approaches, and Their Implementation in Multiple Myeloma. *European Journal of Haematology*. 2017;98(6):529-541.
20. Marques AC, Costa PJ, Velho S, Amaral MH. Functionalizing Nanoparticles With Cancer-Targeting Antibodies: A Comparison of Strategies. *Journal of Controlled Release*. 2020;320:180-200.
21. Drosch M, Schmidt N, Markowski DN, Zollner TM, Koch M, Bullerdiek J. The CD24hi Smooth Muscle Subpopulation Is the Predominant Fraction in Uterine Fibroids. *Molecular Human Reproduction*. 2014;20(7):664-76.
22. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(6):673-692.
23. Zetasizer Nano Series User Manual.

24. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical Stability of Colloidal Lipid Particles. *Biomaterials*. 2003;24(23):4283-4300.
25. Polo E, Puertas S, Moros M, Batalla P, Guisán JM, de la Fuente JM, Grazú V. Tips for the Functionalization of Nanoparticles with Antibodies. En: Guisán JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Tercera Edición. Nueva York: Springer Science+Business Media; 2013. p. 149-163.
26. Ciaurriz P, Fernández F, Tellechea E, Moran JF, Asensio AC. Comparison of Four Functionalization Methods of Gold Nanoparticles for Enhancing the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2017;8:244-253.
27. Ruiz G, Tripathi K, Okyem S, Driskell JD. pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed Onto Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*. 2019;30(4):1182-1191.
28. Choi JS, Jang WS, Park JS. Comparison of Adsorption and Conjugation of Herceptin on Poly(lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles - Effect on Cell Internalization in Breast Cancer Cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;92:496-507.
29. Jahan ST, Sadat SM, Haddadi A. Design and Immunological Evaluation of anti-CD205-tailored PLGA-based Nanoparticulate Cancer Vaccine. *International Journal of Nanomedicine*. 2018;13:367-386.

**Figura portada:** Sharma et al. Morphology of Lipid Polymer hybrid nanoparticles (LNPs) [Internet]. 2018 [citado el 2 de julio de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30033877/>

**Figura 1:** Carlos-Salazar MJ. Nanotransportadores usados em liberação de fármacos [Internet]. 2015 [citado el 27 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://docplayer.com.br/80587566-Desenvolvimento-de-nanoparticulas-de-quitosana-gelatina-e-quitosana-colageno-visando-a-liberacao-de-farmacos.html>

**Figura 2:** Mukherjee et al. Structure of a lipid-polymer hybrid nanoparticle (LPHNP) comprises of a polymer core encapsulating a pay load, a lipid shell, and an outer lipid-PEG layer [Internet]. 2019 [citado el 27 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6430183/>

