

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN NANOTECNOLOGÍA

**Síntesis de Nanopartículas de Albúmina Lactosilada con  
Potencial uso como Vector Tejido-Específico para Cáncer  
Hepático**



**TESIS**

Para obtener el Grado de

Maestría en Nanotecnología

Presenta

**Ing. Amed Gallegos Tabanico**

Hermosillo, Sonora

Marzo del 2017

# Universidad de Sonora

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 APROBATORIO**

**DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS**

**Coordinador de Posgrado en Nanotecnología**

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Maestría: **“Síntesis de Nanopartículas de Albúmina Lactosilada con Potencial uso como Vector Tejido-Específico para Cáncer Hepático”**, presentada por:

**AMED GALLEGOS TABANICO**

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Maestría en Nanotecnología:

---

DR. MARTÍN RAFAEL PEDROZA MONTERO

---

DR. JOSÉ ANDRE-I SARABIA SAINZ

---

DR. RICARDO RODRIGUEZ MIJANGOS

---

DR. JOSUE JUAREZ ONOFRE

---

DRA. MARICELA MONTALVO CORRAL

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a mi familia. A mis queridos padres por el apoyo que me han brindado desde que inicie mi educación. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, por su infinito amor, comprensión e inmenso apoyo en cada meta que me propongo. Gracias a ustedes por ser mi más grande motivación para seguir adelante y luchar por mis sueños. A mis hermanos, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles, por ser un apoyo en las buenas y en las malas, muchas gracias a los dos.

Al Dr. Martín Pedroza por ser parte importante de mi comité de tesis y un excelente profesor, gracias por haberme brindado siempre de su tiempo para hacer de este trabajo un producto de calidad.

Al Dr. Andre-i Sarabia por ser un excelente ser humano, maestro y sobre todo amigo. Gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo contribuyendo en mi crecimiento profesional, por sus enseñanzas, su tiempo, su entera confianza y sobre todo la paciencia, sus consejos y creer en mí.

A mi comité sinodal, por su importante colaboración en este trabajo, mostrando siempre disponibilidad, apoyo y sobre todo paciencia. Muchas gracias por todo.

A la Universidad de Sonora, a la División de Ciencias Exactas y Naturales, al Departamento de Física por los años de educación que me otorgaron y por brindarme el apoyo para realizar mi trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado en el financiamiento del proyecto y otorgarme una beca para realizar mis estudios.

Finalmente, mis queridos amigos. Muchas gracias por enseñarme tantas cosas, siempre me escucharon, comprendieron, tuvieron paciencia, y sobre todo por su ayuda en la elaboración de este trabajo y por hacer un lugar tan agradable para trabajar.

¡Muchas gracias a todos!

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción	1
1.2. Hipótesis	4
1.3. Objetivo General	4
1.4. Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Transporte de Principios Activos	5
2.2. Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos	6
2.3. Matrices Poliméricas para Transporte de Fármacos	8
2.4. Transporte de Forma Pasiva	9
2.4.1. Transporte Pasivo por Aumento de la Permeabilidad de la Zona Afectada (EPR)	11
2.5. Transporte de Forma Activa	13
2.5.1. Mecanismos de Transporte Activo	13
2.5.1.1. Receptor-Ligando	15
2.6. Gliconanotecnología	19
2.6.1. Glicomateriales	20
2.6.2. Glicoconjugados	21
2.6.3. Neoglicanos	21
2.7. Modificación de la Albúmina con Carbohidratos	22
2.8. Aplicaciones de la Gliconanotecnología en la Terapia contra el Cáncer	23
2.9. Cáncer Hepático	24

2.10. Receptor de Asialoglicoproteínas	26
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Materiales	28
3.2. Modificación de Albúmina	28
3.3. Caracterización de la Albúmina	29
3.3.1. Electroforesis SDS-PAGE	29
3.3.2. Espectroscopia de Fluorescencia Trp-IF	29
3.3.3. Espectroscopia Infrarroja FT-IR	30
3.4. Síntesis de Nanopartículas de Albúmina	30
3.5. Caracterización de Nanopartículas de Albúmina	31
3.5.1. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	31
3.5.2. Potencial Zeta	31
3.5.3. Espectroscopia Electrónica de Barrido SEM	33
3.6. Ensayos de Biorreconocimiento	33
3.6.1. Reconocimiento con Lectinas RCA 1	33
3.6.2. Reconocimiento con Bacteria <i>E. coli</i> K88 <sup>+</sup>	34
3.6.2.1. Análisis de interacción mediante microscopia de Fuerza Atómica AFM	34
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Caracterización de la Albúmina	36
4.1.1. Análisis de Peso Molecular por SDS-PAGE	37
4.1.2. Análisis de Modificación Estructural por Trp-IF	38
4.1.3. Análisis de Estructura Química por FT-IR	40
4.2. Morfología, Tamaño y Potencial Zeta de Nanopartículas de Albúmina	42
4.3. Ensayo de Biorreconocimiento de Nanopartículas de Albúmina con Lectinas RCA	44
4.4. Ensayo de Biorreconocimiento de Nanopartículas de Albúmina con Bacterias <i>E. coli</i> K88	46

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	49
5.1. Conclusiones	49
REFERENCIAS	50

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Principales biomateriales usados para la encapsulación de Fármacos.	8
<b>Tabla 2.</b>	Principales nanoestructuras para el transporte de fármacos a base de materiales poliméricos.	20



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco.	7
<b>Figura 2.</b>	Deposición de nanopartículas según el tamaño en los principales órganos del cuerpo humano.	10
<b>Figura 3.</b>	Efecto EPR. Acumulación de nanopartículas en células tumorales.	11
<b>Figura 4.</b>	Reconocimiento de un liposoma con residuos de galactosa en la superficie a nivel de hepatocitos.	14
<b>Figura 5.</b>	Relación que guarda un receptor-ligando respecto a su especificidad.	15
<b>Figura 6.</b>	Representación de la interacción antígeno-anticuerpo.	16
<b>Figura 7.</b>	Representación de un vector modificado con ácido fólico.	17
<b>Figura 8.</b>	Representación de la interacción lectina-carbohidrato.	18
<b>Figura 9.</b>	Representación de estructuras modificadas con carbohidratos.	19
<b>Figura 10.</b>	Representación de albúmina sérica bovina modificada con lactosa.	23
<b>Figura 11.</b>	Representación de las etapas de Carcinomas Hepatocelular.	24
<b>Figura 12.</b>	Representación del mecanismo de biorreconocimiento por receptores de asialoglicoproteínas hacia nanopartículas lactosiladas.	27

## RESUMEN

Las ciencias farmacéuticas, utilizan micro o nano transportadores para obtener un suministro controlado de fármaco, capaces de interactuar selectivamente con patógenos, células o tejidos. El suministro dirigido de fármacos, es uno de los principales objetivos y retos de la medicina para asegurar el éxito en los tratamientos de enfermedades, tales como el cáncer de hígado. En la estructura de la membrana plasmática de los hepatocitos, se encuentran receptores de asialoglicoproteínas, los cuales son específicos del hígado y presentan la capacidad de reconocimiento de hidratos de carbono, específicamente a la galactosa. En este trabajo, modificamos la albúmina de suero bovino (BSA) con lactosa, obteniendo un neoglicano (BSA-Lac). Posteriormente, se sintetizaron gliconanopartículas (NP-BSA-Lac), con la premisa de que serían reconocidas por lectinas microbianas específicas de galactosa. Se realizaron ensayos de biorreconocimiento de NP-BSA-Lac con adhesinas de *E. coli* K88 y *Ricinus communis aglutinina I* (RCA). La glicación de BSA con lactosa se analizó por electroforesis, espectroscopia infrarroja y fluorescencia. Se estimaron aproximadamente 41 lactosas por molécula de BSA. Utilizando el método de emulsión de agua en aceite se obtuvieron nanopartículas de BSA-Lac con morfología esferoide y tamaño promedio de 300-500 nm. El reconocimiento específico de NP-BSA-Lac con RCA y *E. coli* K88 se observó mediante una agregación de nanopartículas, y fueron analizadas por dispersión dinámica de luz. Los resultados indican que las nanopartículas lactosiladas podrían ser potencialmente utilizadas como vector en el transporte de fármaco antitumoral.

## ABSTRACT

The pharmaceutical sciences are using micro or nano carriers to obtain controlled delivery of drug, able to interact selectively with pathogen, cells or tissues. Targeted drug delivery is one of the major goals and challenges of medicine to ensure success in disease treatments, such as liver cancer. In the structure of the plasma membrane of hepatocytes, we find asialoglycoprotein receptors, which are liver specific and can recognize carbohydrates, specifically galactose. In this work, we modified bovine serum albumin (BSA) with lactose obtaining a neoglycan (BSA-Lac). Subsequently, synthesize glyconanoparticles (NP-BSA-Lac) with the premise that would be recognized by microbial galactose specific lectins. NP-BSA-Lac was tested for bio-recognition with adhesins of *E. coli* K88 and *Riccinus communis* agglutinin I (RCA). The glycation of BSA with lactose was analyzed by electrophoresis, infrared spectroscopy and fluorescence. Approximately 41 lactoses per BSA molecule were estimated. Using water in oil emulsion method was obtained BSA-Lac nanoparticles with spheroid morphology and average size of 300-500 nm. Specific recognition of NP-BSA-Lac by RCA and *E. coli* K88 was displayed by aggregation of nanoparticles analyzed by dynamic light scattering. These results indicate that lactosylated nanoparticles could be used as a potential targeted vector in anti-tumoral drug transport.

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

### **1.1. Introducción**

La nanotecnología es la ciencia que interviene en el diseño y manipulación de objetos que cuentan con al menos una de sus dimensiones en una escala de 0.1 milésimas de milímetro o menos. La nanotecnología abarca un campo muy amplio de diferentes disciplinas como la ciencia de superficies, la química orgánica, biología molecular, física de semiconductores, entre otro. Actualmente investigaciones se han enfocado en crear nuevos materiales y dispositivos con un amplio alcance de aplicaciones, tales como la medicina, electrónica, biomateriales y producción de energía. La nanomedicina como su nombre lo dice, es la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina, siendo su objetivo de estudio el diagnóstico y tratamiento de enfermedades a nivel nanométrico. El cáncer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS), tan solo en el 2012 un total de 8.2 millones de defunciones fueron atribuidas al cáncer. Siendo el cáncer de hígado (CH) el tercer y cuarto tipo de tumores malignos que más afectan a hombre y mujeres en México (INEGI, 2014), respectivamente. El índice de fatalidad de esta patología es del 0.99, eso quiere decir que la mayoría de las personas que enferman con CH mueren (Aldaco-Sarvide, 2012). No obstante, este índice de fatalidad se ve reducido cuando no existe un proceso cirrótico previo, en estos casos la sobrevivencia a 5 años se ve aumentada hasta un 75%. Por otra parte, cuando existe un proceso de cirrosis previa, este índice de sobrevivencia se ve disminuido hasta un 5%. Es importante mencionar que un total de 32 millones de personas en un rango de 12 a 65 años de edad de la población en México consumen alcohol, esto quiere decir que son más propensos a enfermar de una patología hepática como lo es la cirrosis, siendo así un mayor número de personas con riesgo de padecer cáncer de hígado.

Debido a la gran relevancia de esta patología, es necesario generar conocimientos y obtener nuevas y eficientes técnicas de diagnóstico y tratamiento. Las técnicas de tratamiento contra el cáncer involucran el uso de agentes activos que pueden resultar un tanto tóxicos para el organismo. Es por eso que recientemente se ha implementado el uso de estrategias que permitan reducir la dosis y evitar el esparcimiento de dichos agentes hacia

tejidos donde no se requieren, evitando así la generación de efectos secundarios. En la actualidad la nanotecnología se ha enfocado en el diseño y desarrollo de nuevos nanovehículos de fármacos (drug delivery, por su término en inglés), posibilitando así una terapia más específica y una liberación controlada de los mismos. Adicionalmente, se han desarrollado agentes que facilitan la detección de un tejido o un tumor maligno, y de esta manera dirigen un fármaco de manera específica (targeted drug delivery). Este tipo de implementación en terapias contra el cáncer, es una de las metas que se han establecido para el 2020 aumentar la supervivencia hasta un 31 % de pacientes que sufren esta patología (Mariotto, 2011). Una de las grandes limitantes en las actuales terapias contra el cáncer que utilizan quimioterapias, es el costo alto, sin embargo las terapias dirigidas podrán reducir los costos altos a mediano plazo así como también los efectos secundarios que pudiesen originar este tipo de terapias (Mariotto, 2011). Esto es de gran importancia ya que el padecimiento de esta patología genera un impacto económico muy elevado tanto a pacientes como a instituciones de salud pública.

En la actualidad, los vehículos de fármacos se basan principalmente en compuestos orgánicos e inorgánicos. Entre los más importantes se encuentra la albúmina, ya que presenta grandes ventajas: es un material fisiológico, biodegradable y de baja alergenicidad, lo que presenta una muy baja posibilidad de despertar una respuesta inmune por parte del organismo; la síntesis de nanopartículas resulta un tanto fácil y reproducible de realizar; los diversos grupos funcionales que presenta la albúmina, podrían ser utilizados para la unión de moléculas y de esta manera orientar específicamente un fármaco hacía un lugar de interés. Además, recientemente la Administración de Drogas y Alimentos, aprobó el uso de nanopartículas de albúmina para el transporte de fármacos en pacientes humanos.

En la actualidad se investigan cientos de agentes anticancerígenos que pueden ser incorporados a nanopartículas de albúmina, sin embargo, muy pocas investigaciones se han enfocado en la entrega de fármacos de una forma específica (Dandagi, 2006).

La vectorización de un fármaco hacia un sitio específico en el organismo, puede llevarse a cabo mediante la conjugación de ligandos de moléculas biológicas y receptores moleculares que se sobre expresen, como lo es en células cancerígenas. De esta manera, un transportador de fármaco con una orientación específica puede distinguir entre una célula

normal y una célula cancerígena, evitando efectos y daños secundarios asociados a los fármacos (Khanna, 2012).

Los hepatocitos se caracterizan por tener en su superficie un receptor conocido como receptor de asialoglicoproteínas (RAGP), el cual se sobre expresa hacia carbohidratos, específicamente a la galactosa. Una de las características que presentan las glicoproteínas es que después de un determinado tiempo de vida, desprenden residuos de ácido siálico terminal presente en sus oligosacáridos, donde posteriormente quedan expuestos residuos de galactosa donde finalmente estos interaccionan con la sobreexpresión específica de los RAGP's de células hepáticas. Por otra parte, una vez llevado a cabo este proceso de biorreconocimiento, el complejo formado entre los receptores y las glicoproteínas es introducido a la célula mediante endocitosis donde es degradado por acción de lisosomas. Se estima que en un hepatocito se encuentra una densidad de 500 000 RAGP's, donde, además la expresión de estos receptores se mantiene cuando se presentan hepatomas (Han, 1999).

Este proceso de biorreconocimiento específico puede ser aprovechado para vectorizar un fármaco, modificando la superficie de nanopartículas con un elemento de reconocimiento adecuado por los receptores de RAGP para poder ser endocitada y posteriormente ser degradada liberando el fármaco. De tal manera, la propuesta de este trabajo pretende aprovechar la interacción RAGP's-galactosa para sintetizar nanopartículas galactosiladas y cargadas con fármacos antitumorales a fin de dirigirlas a las células del hígado. Nuestro grupo de trabajo cuenta con una amplia experiencia en interacciones receptores-carbohidrato, siendo una de ellas la producción de neoglicanos a partir de lactosilación de la albúmina con la capacidad de reconocimiento por parte de lectinas vegetales y adhesinas bacterianas específicas para galactosas (A.I. Ledesma-Osuna, 2009; A.-i. Sarabia-Sainz, 2011). Por otra parte, se ha reportado el reconocimiento de RAGP hacia estructuras que contiene galactosa a partir de albúmina modificada (Choi, 2014). Es por ello que se pretende desarrollar sistemas nanoestructurados a partir de albúmina modificada con lactosa para el transporte de doxorubicina, el cual ha demostrado ser un eficiente antitumoral para cáncer hepático. De esta manera los residuos expuestos de galactosa presentes en nuestras nanopartículas de albúmina, podrían ser reconocidos por

medio de los receptores de asialoglicoproteínas llevando a cabo el transporte y liberación de doxorubicina, mediante una orientación específica hacia células de hígado, obteniendo así una terapia dirigida.

## **1.2. Hipótesis**

La albúmina modificada con lactosa puede ser utilizada como modelo para desarrollar nanovectores tejido-específico para el tratamiento de cáncer de hígado.

## **1.3. Objetivo General**

Desarrollar nanovectores de fármacos anti-tumorales tejido-específicos orientados hacia una terapia dirigida a cáncer de hígado.

## **1.4. Objetivos Específicos**

- Realizar la modificación de albúmina sérica bovina con lactosa.
- Sintetizar y caracterizar las nanopartículas de albúmina.
- Analizar el biorreconocimiento de nanopartículas de albúmina.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Transporte de Fármacos

En la actualidad, investigaciones de las áreas farmacológicas se han enfocado en el diseño de nuevos sistemas de transportes y liberación de fármacos. Un fármaco se define como el principio activo al cual se le debe el efecto farmacológico proveniente de alguna droga o medicamento (Talevi, 2016). Dentro de los aspectos que hay que evaluar para obtener una adecuada absorción del fármaco, es su correcta dosificación en el organismo. Es por esto que, para llevar a cabo una apropiada liberación y absorción de un 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 del mismo (Santa & López Osorio, 2013). Por otro lado, la falta de especificidad de un fármaco, puede ocasionar la liberación y absorción en tejidos donde no se requiere, además de la liberación de dosis elevadas de fármacos, lo que ocasionalmente se ve reflejado en una serie de efectos secundarios indeseables en el organismo.

El uso de sistemas de transporte que permita orientar a los fármacos, sea de forma pasiva o de forma activa, puede representar grandes ventajas comparado con los sistemas de transporte de liberación de fármacos convencionales (Bertrand, 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.

En las ciencias farmacéuticas, se define como vector o vectorización a un sistema estructurado que encapsula un principio activo a manera de obtener un mayor tiempo de vida media del fármaco, así como aumentar la eficiencia del mismo.



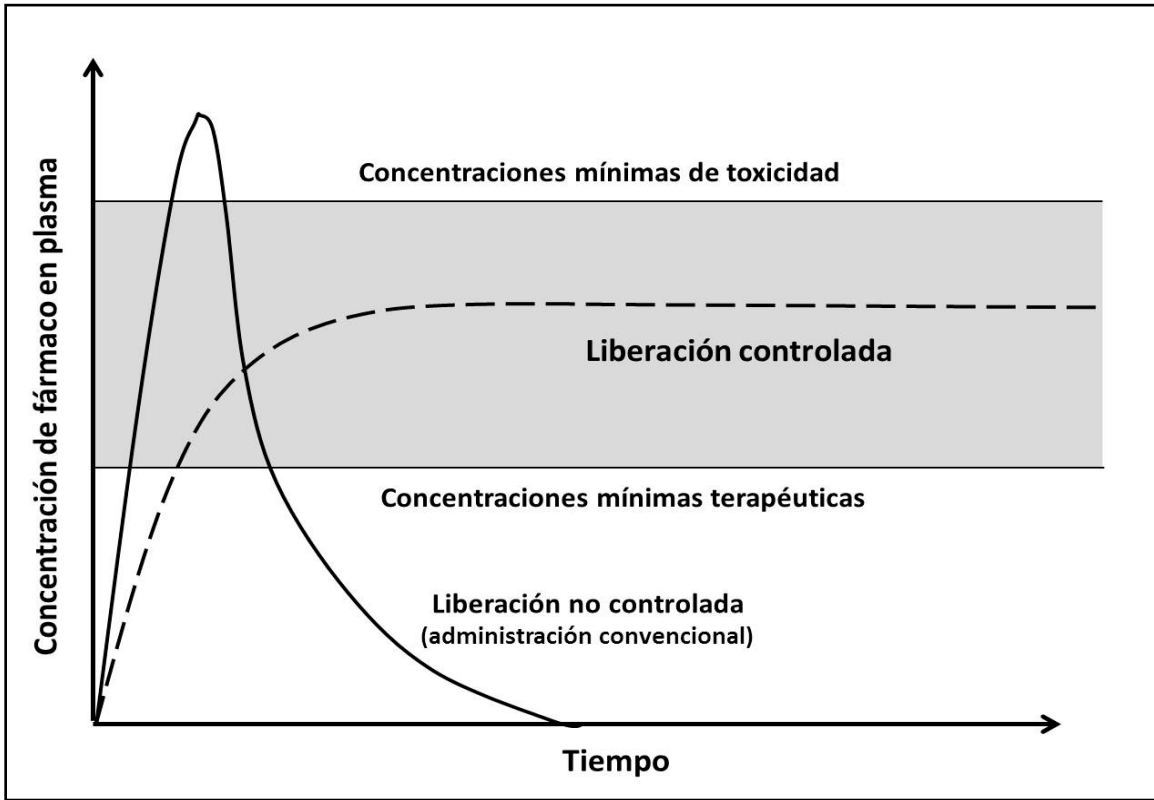
Dentro de las principales ventajas de vectorizar un fármaco tenemos:

- 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.

## **2.2. Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos**

En la actualidad la forma de administración de fármacos puede darse mediante tabletas, comprimidos y soluciones vía intravenosa. Sin embargo, este tipo de administración de fármacos se lleva a cabo de una manera en la cual la cantidad del fármaco en el lugar requerido no es controlada. La forma de asegurar concentraciones adecuadas del medicamento es mediante administraciones repetidas, lo que ocasionalmente lleva a fluctuaciones en la concentración del fármaco fuera de la ventana terapéutica necesaria. (Rojas-Aguirre, 2016). Asimismo, el fármaco está expuesto a los mecanismos de depuración del propio sistema, como por ejemplo formar complejos con proteínas residentes como la albúmina sérica, a la modificación química o enzimática, acumulación en tejidos sin interés para la terapia, etc.

Para obtener una eficiencia mayor del fármaco, se busca controlar la administración de éste, de tal forma, que la liberación del medicamento se mantenga durante períodos prolongados y de esta manera evitar en la medida de lo posible la necesidad de administrar dosis repetidas (Santa & López Osorio, 2013). La figura 1, 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 fármacos será de gran comodidad y seguridad para los pacientes, además que la eficiencia terapéutica podrá aumentar.



**Figura 1.** Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra la liberación libre de fármaco (Sarabia-Sainz, 2012).

### 2.3. Matrices Poliméricas para Transporte de Fármacos

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 ingles), poli- $\epsilon$ -caprolactosa (PCL por sus siglas en ingles), celulosas modificadas, poliacrilamidas, entre otros. Por otra parte, tenemos los polímeros naturales como: albúmina, gelatina, quitosano, ácido hialurónico y alginatos (Neira-Carrillo, 2013). En la tabla 1, tenemos una representación de los materiales poliméricos más utilizados para el transporte de fármacos.

**Tabla 1.** Principales biomateriales usados para la encapsulación de fármacos (Sarabia-Sainz, 2012).

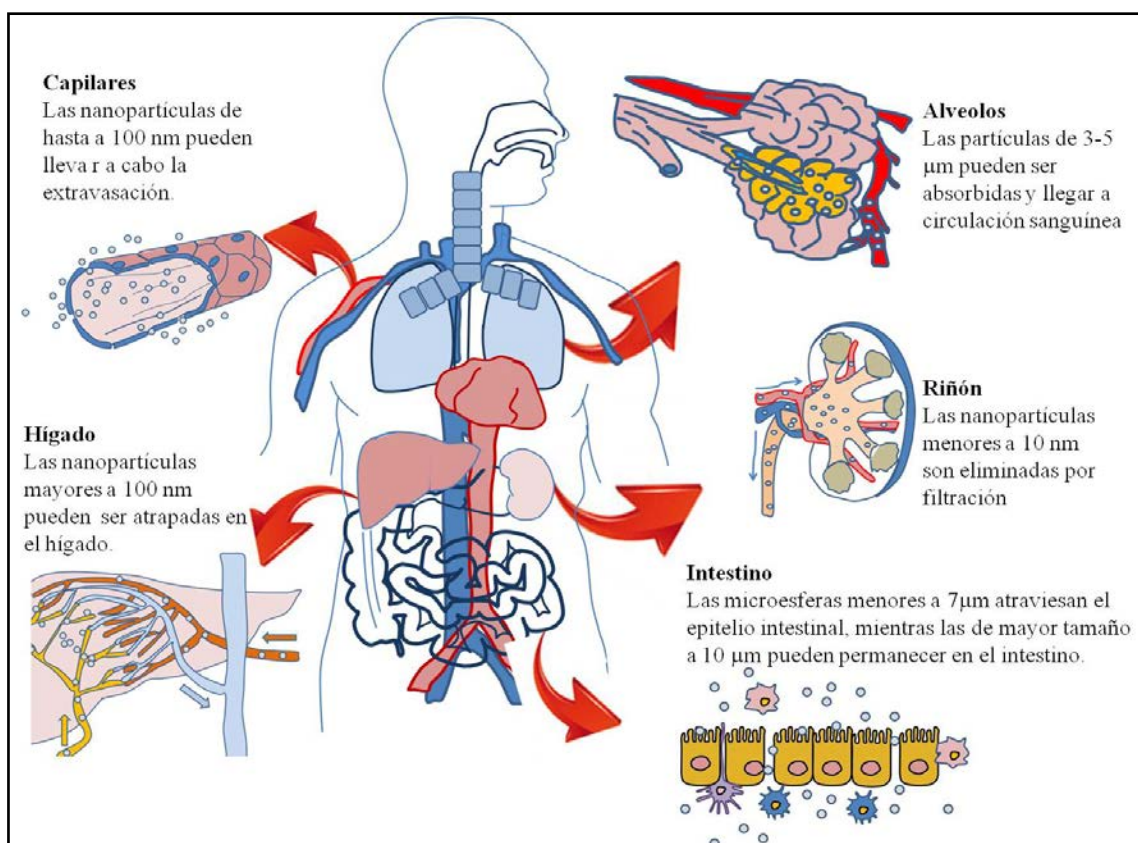
<b>Polímero</b>	<b>Fármaco</b>
Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)	Taxol, Paclitaxel, Estradiol
Ácido poliláctico (PLA)	Hemoglobina, Proteína C,
Poli- $\epsilon$ -caprolactosa (PCL)	Insulina, Taxol
Gelatina	Paclitaxel,
Quitosano	Ciclosporina A,
Alginato	Teofilina, diclofenaco
Carragenina	Alopurinol, alcohol deshidrogenasa
Pectinas	Metronidazol
Albúmina	Diclofenaco, Dexometasona

## 2.4. Transporte de Forma Pasiva

Los sistemas nanoestructurados para el transporte de fármacos, se caracterizan principalmente por el mecanismo en el que distribuyen dicho fármaco 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, 2013). Por otra parte, la vectorización también puede darse por convección, la cual, está directamente relacionado con los movimientos originados por fluidos dentro el organismo (Tykocki & Miękisiak, 2016). Sin embargo, 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 de fármaco por vía parenteral, cuando se administran nanopartículas con un tamaño menor a los 10 nm estas son filtradas y eliminadas por los riñones. Asimismo, nanopartículas con un tamaño de hasta 100 nm suelen por lo general salir del sistema sanguíneo atravesando capilares, además nanopartículas con tamaños mayores a los 100 nm, principalmente se caracterizan por alojarse en regiones del hígado (Martín, 2014). Nanopartículas con un tamaño superior a los 500 nm suelen ser más susceptibles a ser fagocitadas por células del sistema inmune (Shang, Nienhaus, & Nienhaus, 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.

La administración de fármacos por vía pulmonar ha sido muy atractiva, debido a que suele ser un tanto más cómodo para el paciente, así como también presenta una mayor absorción y distribución del fármaco. Investigaciones coinciden que tamaños alrededor de unas 3  $\mu\text{m}$  suelen ser más adecuados para este tipo de administración (Shang, Nienhaus, Jiang, et al., 2014).

Por otra parte la vía oral, suele ser otra ruta de administración de fármacos que presenta grandes ventajas, ya que por esta ruta la vectorización de fármacos puede alcanzar dosis más altas y generar una mejor distribución en el organismo (Mei, 2013). Sin embargo, la vía de administración por medio parenteral ha sido una de las más utilizadas en la vectorización de fármacos, debido a que presenta una ventaja fundamental sobre las otras vías de administración, ya que por este método el fármaco es administrado de forma directa a la circulación sistémica del paciente, por lo que es más fácil llegar al área afectada. En la figura 2 podemos observar el camino y deposición dentro del organismo de nanopartículas según su tamaño.



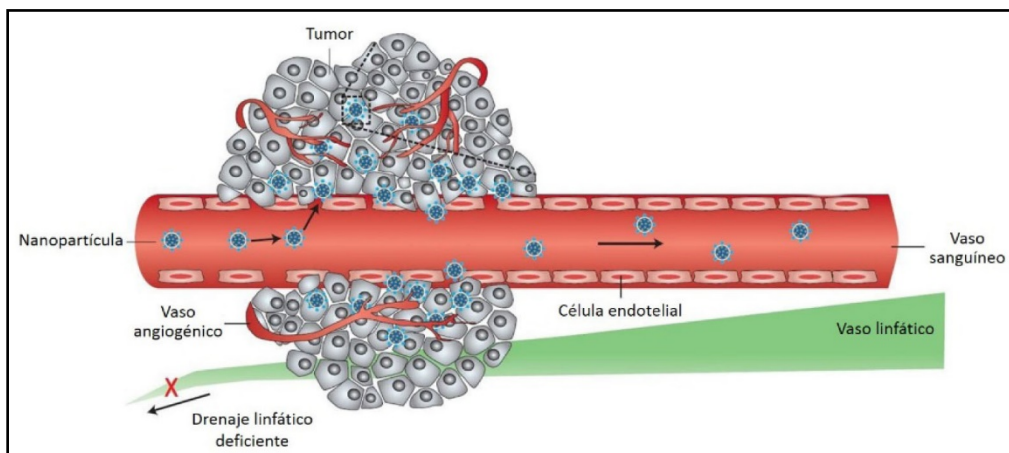
**Figura 2.** Deposición de nanopartículas según el tamaño en los principales órganos del cuerpo humano (Sarabia-Sainz, 2012).

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.

#### 2.4.1. 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 mayor de cierto número de moléculas endógenas (enzimas, vitaminas, aminoácidos, células, etc.) o exógenas (liposomas, nanopartículas, entre otros), comienza a ocurrir un proceso de angiogénesis para satisfacer la demanda de oxígeno y nutrientes requeridos, así como también los vasos sanguíneos comienzan a ser irregulares, dilatados o con poros, las células endoteliales empiezan a estar más separadas y el drenaje linfático comienza a ser más deficiente en comparación con los de tejidos normales (Prabhakar et al., 2013). Todos estos aspectos contribuyen en un transporte molecular con flujo anormal, el cual puede ser aprovechado para el transporte de fármacos. La figura 3, 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 3.** Efecto EPR. Acumulación de nanopartículas en células tumorales (Peer et al., 2007).

El efecto EPR ha sido aprovechado en el transporte de fármacos mediante nanoestructuras como nanopartículas y liposomas en tejidos cancerosos. Por otra parte, la combinación de esta terapia con otras técnicas como el direccionamiento de fármacos mediante vectorización activa, es decir, vectores capaces de inducir un biorreconocimiento, generan nuevos tratamientos contra el cáncer siendo así más eficientes en la distribución del fármaco en tejidos cancerosos (Maeda, 2013).

## **2.5. Transporte 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 biodistribución 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, se han publicado 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.

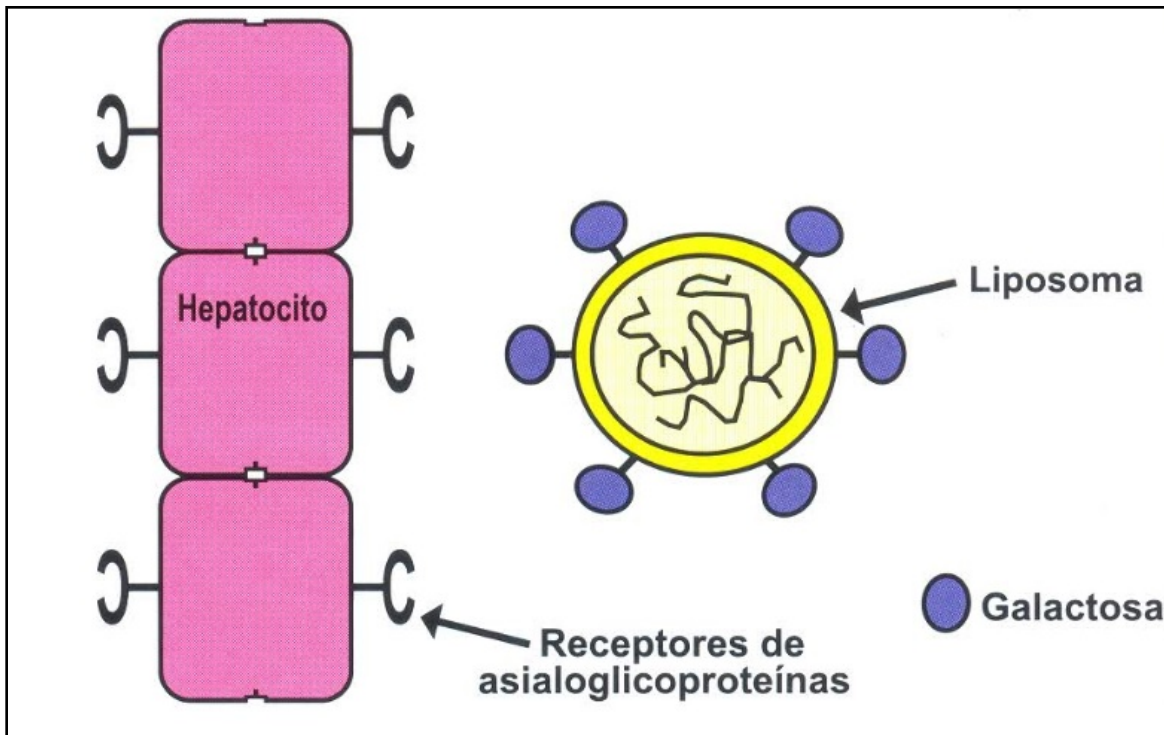
### **2.5.1. Mecanismos de Transporte Activo**

Los desarrollos de técnicas de interacción biológica han sido aprovechados extensamente para la identificación, aislamiento, purificación, cuantificación de biomoléculas, por ejemplo, las variantes de la técnica de ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), cromatografía de afinidad, ensayos con lectinas para identificación de carbohidratos, entre otras. Este tipo de técnicas de reconocimiento biológico son ideas trasladadas ahora en la vectorización activa de fármacos (Suárez, 2016; Tanaka K, 2014). De tal manera que el llevar un medicamento únicamente al lugar requerido, es decir el mecanismo que emplea un sistema de 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 (Suárez, 2016; Tanaka K, 2014).

Dentro de los principales ligandos más estudiados se encuentran, carbohidratos como la galactosa, manosa o ácido siálico, los cuales presentan la capacidad de



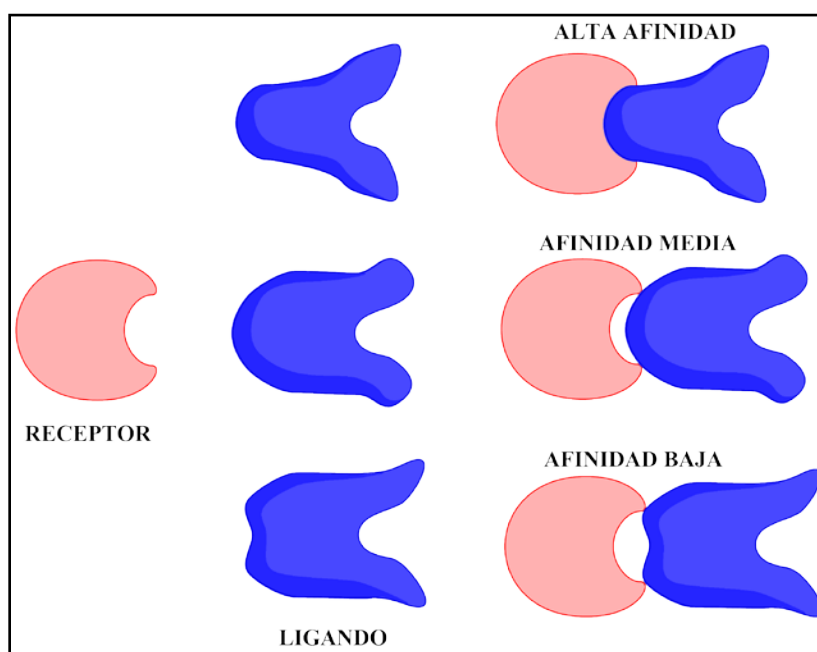
biorreconocimiento con receptores de asialoglicoproteínas presente en hepatocitos como se observa en la figura 4.



**Figura 4.** Reconocimiento de un liposoma con residuos de galactosa en la superficie a nivel de hepatocitos (Suárez, 2016).

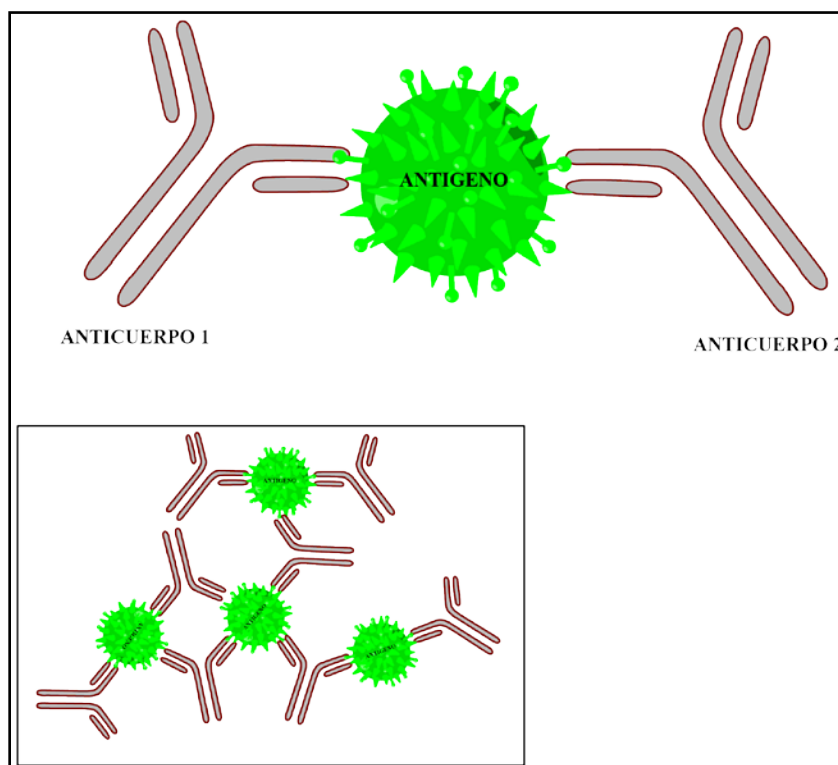
### 2.5.1.1. Receptor-Ligando

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 (Haburcak, Shi, Du, Yuan, & Xu, 2016) y de esta manera facilitar la función del vector como un transportador ideal (Haburcak et al., 2016). El ligando puede ser representado de varias formas como un anticuerpo, una lectina, una proteína específica, una hormona, ácido fólico, una molécula de bajo peso molecular, etc. Dichos ligandos son utilizados para dirigir el vector hacia un lugar de interés donde presente un receptor de alta, media o baja especificidad dependiendo la interacción ligando-receptor como se puede observar en la figura 5.



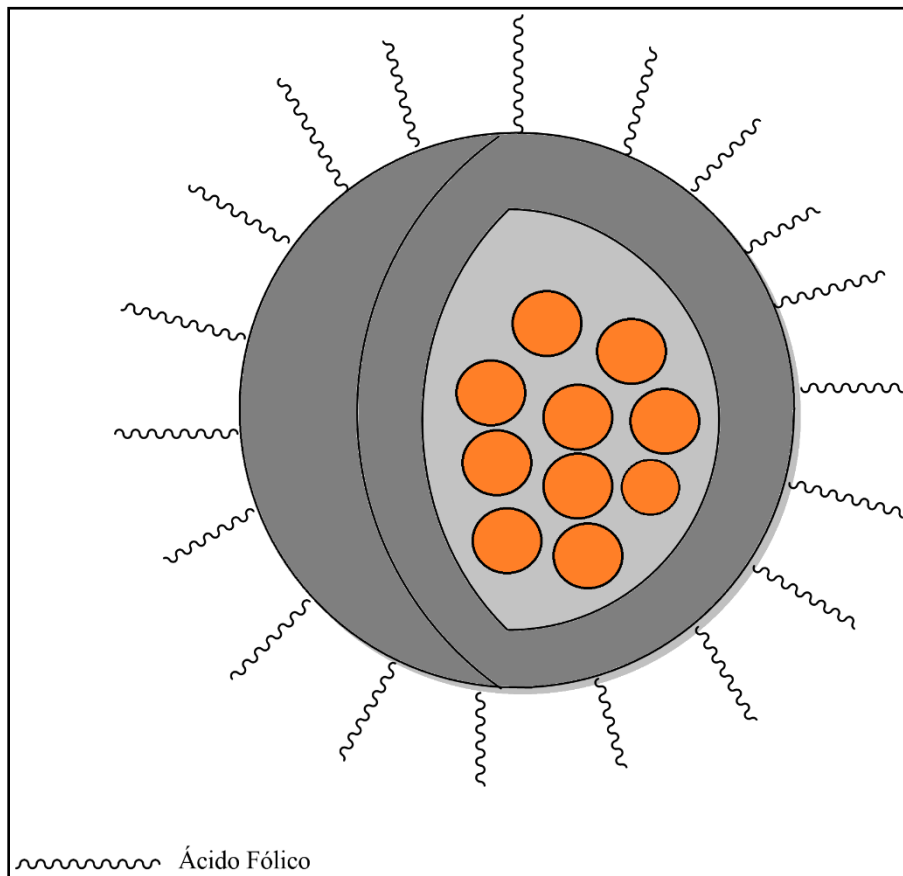
**Figura 5.** Relación que guarda un receptor-ligando respecto a su especificidad.

Existen otros tipos de ligandos como lo son los de terapia específica, este tipo de ligandos están asociados principalmente con anticuerpos monoclonales o fragmentos de estos, capaces de interactuar con antígenos asociados principalmente a tumores cancerígenos como se ilustra en la figura 6. Dentro de las funciones principales de estos tipos de ligandos se encuentra el biorreconocimiento de forma específica y con gran capacidad de afinidad a células tumorales para hacer más eficiente el transporte de fármacos y evitar efectos o daños secundarios asociados a este tipo de terapias (MacRaild, Richards, Anders, & Norton, 2016).



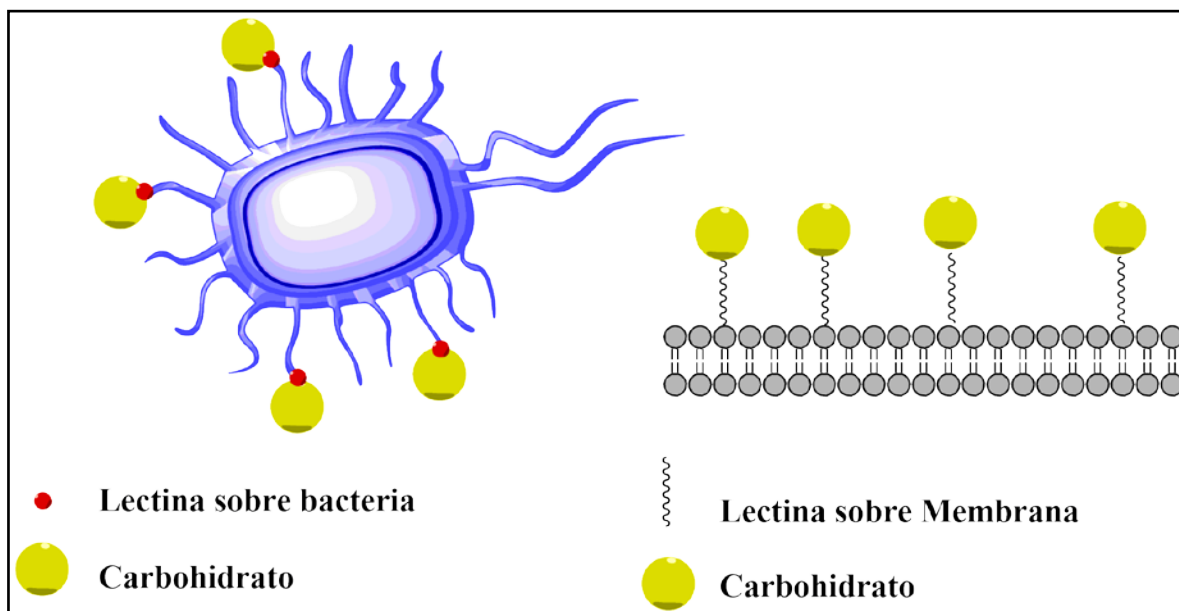
**Figura 6.** Representación de la interacción antígeno-anticuerpo.

El uso de vitaminas como el ácido fólico, 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 (Huang et al., 2016). La figura 7 es una representación de un vector modificado con ácido fólico, el cual presenta grandes ventajas en la distribución de fármacos, ya que interactúan con receptores de células con cáncer y son traducidos a generar un proceso de endocitosis y la posterior acumulación de estas moléculas en el citosol de las células.



**Figura 7.** Representación de un vector modificado con ácido fólico.

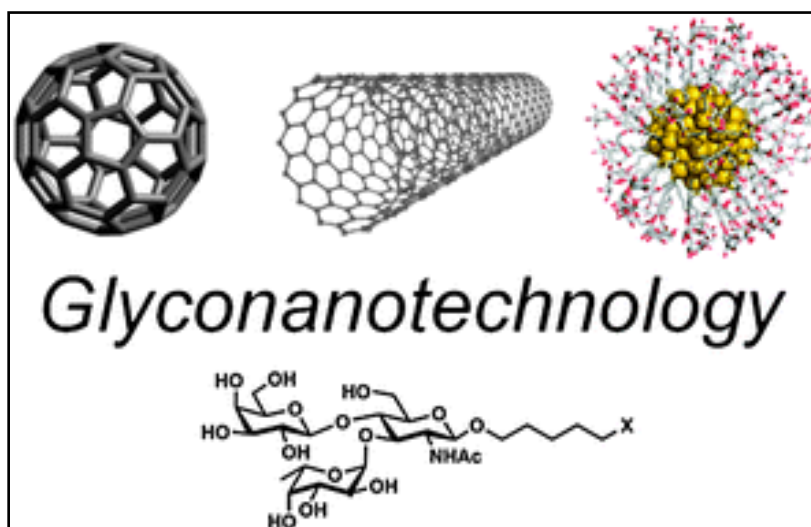
Recientemente se ha demostrado que carbohidratos como: galactosa, manosa, ácido siálico, entre otros, presentan la capacidad de interactuar con receptores específicos, como los receptores de asialoglicoproteínas presentes en células hepáticas (Xue et al., 2016). Investigaciones realizadas por (B. Wang et al., 2016), demostraron que la administración de nanopartículas conjugadas con lactosa presentan un claro biorreconocimiento en hepatocitos, dicho reconocimiento fue atribuido a receptores de asialoglicoproteínas en hepatocitos que reconocieron residuos de galactosa expuestos por la conjugación con lactosa en la superficie de la nanopartícula. La figura 8, muestra una representación de la interacción lectina-carbohidrato en adhesinas bacterianas, la cual se debe a la presencia de receptores que reconocen residuos de galactosa, además de la interacción lectina-carbohidrato en una pared celular.



**Figura 8.** Representación de la interacción lectina-carbohidrato.

## 2.6. Gliconanotecnología

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. 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 et al., 2016). El uso de carbohidratos en nanoestructuras proporciona habilidades para interactuar en sistemas biológicos, ya que presentan múltiples grupos funcionales y de gran variabilidad estructural. El uso de la gliconanotecnología, presenta grandes aplicaciones como biosensores de glicoproteínas, agentes de contraste molecular, inhibición de enzimas, etc. (Kaur & Mahajan, 2016). Este tipo de nanoestructuras modificadas podrían ayudar a detectar enfermedades en temprano desarrollo como lo es el caso del cáncer, es por esto que la gliconanotecnología, ha venido emergiendo como una nueva alternativa para el diseño de nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades.




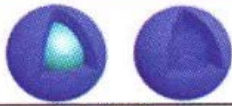

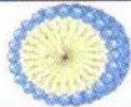



**Figura 9.** Representación de estructuras modificadas con carbohidratos.

### 2.6.1. Glicomateriales

Los glicomateriales, son materiales que se caracterizan por llevar carbohidratos inmovilizados en su superficie, la cual combina propiedades tanto del material como de glicanos, los cuales presentan múltiples ligandos que pueden ser de gran utilidad en sistemas de detección, imagenología y diagnóstico de cáncer (Restuccia, Fettis, & Hudalla, 2016).

Existe una gran variedad de materiales a base de polímeros tanto naturales como sintéticos que pueden ser utilizados para ser conjugados con carbohidratos. Posteriormente, a partir de este tipo de materiales poliméricos, podemos formar estructuras conjugados con carbohidratos tales como se muestran algunos casos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Principales nanoestructuras para el transporte de fármacos a base de materiales poliméricos (Suárez, 2016).

Principales nanosistemas transportadores de fármacos			
Liposomas		Nanopartículas poliméricas	
Nanopartículas lipídicas		Micelas poliméricas	
Dendrimeros		Nanotubos de carbono	
Conjugados con anticuerpos		Conjugados poliméricos	

### **2.6.3. Glicoconjugados**

Un glicoconjugado, consiste principalmente en la unión covalentemente de un carbohidrato con proteínas, lípidos, péptidos, sacáridos, entre otros. En base a esto, se derivan diferentes categorías tales como: glicoproteínas, glicolípidos, glicopéptidos, lipopolisacáridos y peptidoglicanos (Krasnova & Wong, 2016). El uso de la glicoconjugación de carbohidratos presenta grandes aplicaciones, relacionadas con la interacción o biorreconocimiento de células cancerígenas.

### **2.6.2. Neoglicanos**

Un glicano se caracteriza por la unión de uno o varios monosacáridos hasta formar una o más cadenas de carbohidratos. Un glicano también es conocido como la parte de hidrato de carbono de un glicoconjugado, donde un glicoconjugado se caracteriza por la unión de glicanos a proteínas o a lípidos mediante enlaces covalentes, para formar glicoproteínas o glicolípidos respectivamente (Böcker, Laaf, & Elling, 2015).

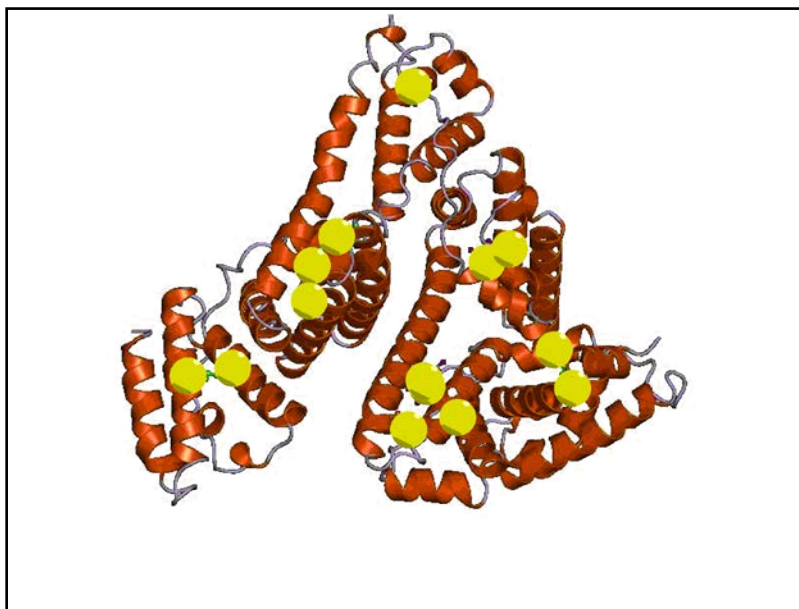
Los neoglicanos son sintetizados principalmente por la conjugación de glicanos y proteínas nativas como lo es la albúmina, que juega un papel como andamio para la presentación de ligandos, además pueden ser diseñados para ser reconocidos específicamente por lectinas y aprovechados en investigaciones relacionadas con el cáncer (Unverzagt et al., 2002).

Una de las grandes ventajas que presentan las glicoproteínas aparte de su función principal estructural, es la capacidad de biorreconocimiento celular cuando se encuentran sobre la superficie de una membrana, ya que pueden ser utilizadas como agentes de contraste para el biorreconocimiento de células cancerígenas y direccionamiento en el transporte de fármacos antitumorales.



## **2.7. Modificación de la Albúmina con Carbohidratos**

Recientes investigaciones se han enfocado en la conjugación de proteínas con hidratos de carbono, teniendo como resultado un producto de glicación (Rabbani & Thornalley, 2016). Actualmente, la albúmina ha sido de gran interés debido a las propiedades físico-químicas que presenta ya que es un material fisiológico, biodegradable y de baja alergenicidad por lo que recientemente la Administración de Drogas y Alimentos aprobó el uso de nanopartículas de albúmina para el transporte de fármacos es por ello que se ha utilizado como modelo en la glicoconjugación de proteínas. La glicación de la albúmina mediante un proceso de reacción no enzimático llamado reacción de Maillard, consiste en una reacción a temperatura de 100° C entre una azúcar reductora y un grupo amino de una proteína o aminoácido. Durante esta reacción se puede distinguir el proceso de glicación, el cual consiste de tres etapas: la primera etapa se caracteriza por la asociación de una azúcar con la proteína para formar una base de Schiff, el cual es estable por un período corto de tiempo, la siguiente etapa consta en el reordenamiento de los enlaces químicos a una forma más estable, comúnmente llamada producto de Amadori. La última etapa con lleva a la formación de compuestos fluorescentes, la cual está determinada por los enlaces aminos de la proteína y un aldehído de la adición con la azúcar reductora y por el tiempo de exposición de la proteína, para finalmente dar como resultado la modificación de la proteína o un glicoconjugado (Jian, He, Sun, & Pang, 2016).



**Figura 10.** Representación de albúmina sérica bovina modificada con lactosa.

## **2.8. Aplicaciones de la Gliconanotecnología en la Terapia Contra el Cáncer**

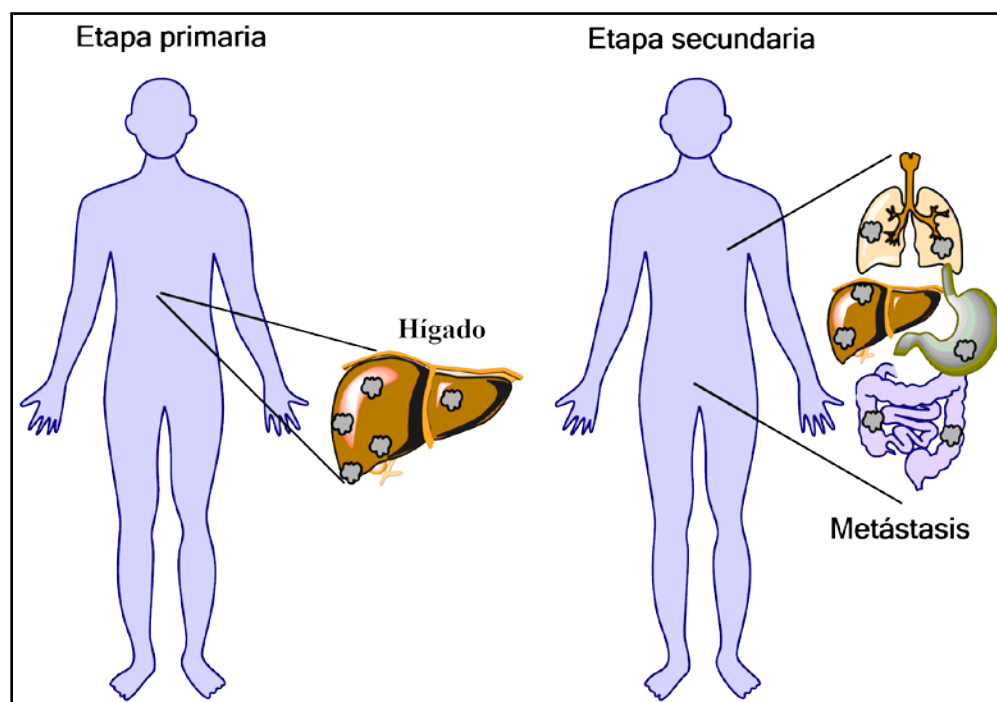
En la actualidad muchas investigaciones se basan en el diseño de nuevas nanoestructuras conjugadas con carbohidratos, proporcionando habilidades para interactuar con receptores específicos. El diseño de nanopartículas a base de materiales polímeros conjugados con carbohidratos, han venido emergiendo y generando grandes aplicaciones con campos como la biotecnología (Reichardt, Martín-Lomas, & Penadés, 2016). Además, el uso de esta tecnología se extiende en distintos campos debido a las propiedades que presentan estas nanoestructuras, ya que pueden ser utilizadas como transportadores de fármacos antitumorales con un biorreconocimiento específico y como agentes de contraste en terapias contra el cáncer.

La glicotecnología presenta la capacidad de integrar conocimientos del área de materiales y biotecnología para el desarrollo de aplicaciones en campos como la nanomedicina. La generación de nuevas y eficientes técnicas de diagnóstico y tratamiento contra el cáncer, como el diseño de nuevos nanovectores de fármacos antitumorales posibilita la liberación controlada y específica de los mismos en células tumorales.

## 2.9. Cáncer Hepático

El cáncer de hígado, también conocido como cáncer hepático, consiste en una serie de células tumorales de crecimiento descontrolado en el hígado. El tipo más común de cáncer de hígado es el carcinoma hepatocelular (hepatoma o HCC), siendo este uno de los principales tipos de tumores malignos que más afectan a hombres y mujeres (Mokdad, Singal, & Yopp, 2016) (Forner & Reig, 2016).

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 metastásico, 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 como se observa en la figura 11.



**Figura 11.** Representación de las etapas de Carcinomas Hepatocelular.

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).

El cáncer hepático o carcinoma hepatocelular se encuentra asociado a enfermedades como la cirrosis, la cual puede ser causada por: abuso excesivo de alcohol, inflamación del hígado, hepatitis B o C, enfermedades autoinmunes, exceso de hierro en el cuerpo, etc. (Aguilar-Olivos et al., 2016).

Los sistemas de diagnóstico de cáncer de hígado se basan principalmente en pruebas como:

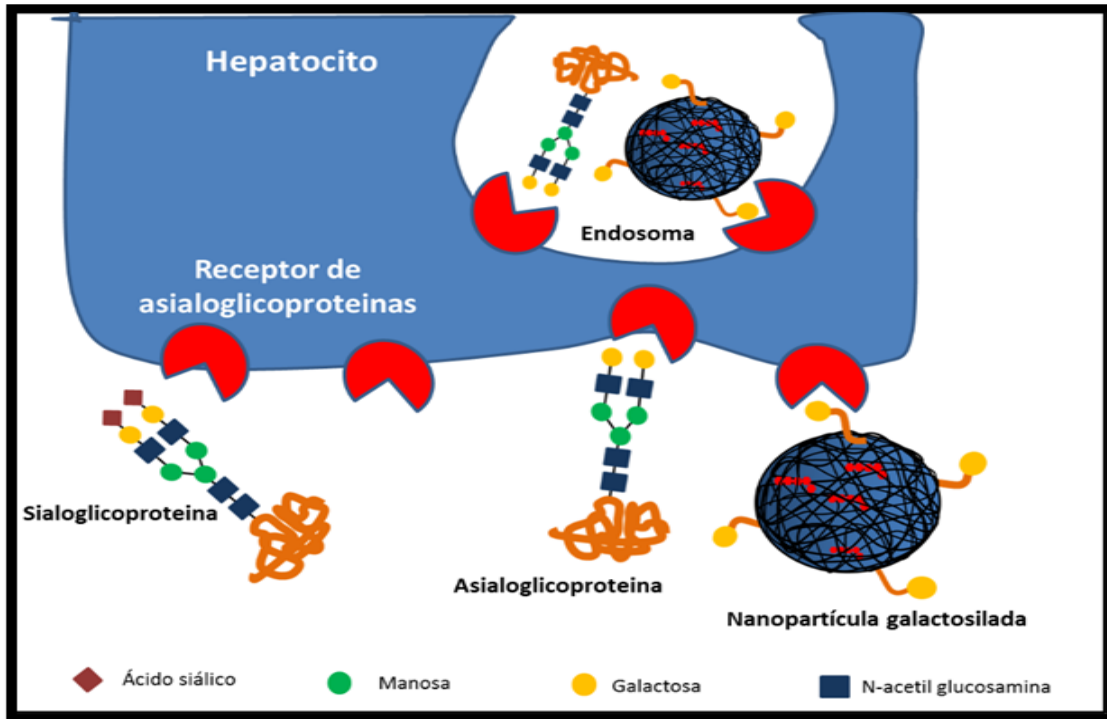
- Análisis de sangre (alfa-fetoproteína AFP), una proteína que es producida por tumores en el hígado.
- Estudios de imagen como resonancia magnética o tomografía computarizada.
- Biopsia de una pequeña muestra de tejido del tumor, el cual revela si el tumor es canceroso (maligno) o no canceroso (benigno).

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, se basan en radiación y ocasionalmente también a tejido sano, por lo que se buscan nuevas y eficientes técnicas de diagnóstico y tratamiento para este tipo de cáncer.

## **2.10. Receptor de Asialoglicoproteínas**

Los hepatocitos son un tipo de célula estructural específicamente del hígado. Dentro de las principales funciones que presentan los hepatocitos son la de transcripción de genes muy activa, ya que constantemente estas células se encuentran sintetizando nuevas proteínas. Dentro las principales proteínas que genera el hígado se encuentra la albúmina, siendo una de las proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el flujo sanguíneo (Rosenoer, Oratz, & Rothschild, 2014).

En la estructura de la membrana plasmática de los hepatocitos, tenemos presente a los receptores de asialoglicoproteínas, los cuales son específicos del hígado y presentan la capacidad de reconocimiento de hidratos de carbono, específicamente a la galactosa (Xue et al., 2016). Las glicoproteínas se caracterizan por desprender ácido siálico expuesto en la superficie terminal de oligosacáridos, donde posteriormente queda expuesta la galactosa, la cual es reconocida por este tipo de receptores induciendo un mecanismo de endocitosis de las mismas, y de esta manera realizar un proceso metabólico normal como se ilustra en la figura 12. Aproximadamente un total de 500.000 moléculas receptoras de asialoglicoproteínas se encuentran presentes en la superficie de los hepatocitos (Xue et al., 2016). La figura 12 muestra una representación del mecanismo de biorreconocimiento por parte de los receptores de asialoglicoproteínas presente en hepatocitos, donde reconocen residuos de galactosa expuesto en la superficie de nanopartículas.



**Figura 12.** Representación del mecanismo de biorreconocimiento por receptores de asialoglicoproteínas hacia nanopartículas lactosiladas.

Este tipo de mecanismo de biorreconocimiento por parte de los receptores de asialoglicoproteínas es aprovechado para el diseño de nuevos tratamientos de cáncer, que involucran el transporte de fármacos de manera controlada y específica hacia células tumorales del hígado.

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Albúmina sérica bovina (BSA), Lactosa (Lac), Glutaraldehído (25%) y Span® 80 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Aglutinina de *Ricinus communis* fue obtenida de Vector Lab, (Burlingame, CA, USA). *E. coli* K88 enterotoxigenica aislada de cerdos fue donada por el Dr. Carlos Eslava de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 3.2. Modificación de Albúmina

Una modificación en la proteína de albúmina sérica bovina fue realizada mediante un proceso de reacción entre la proteína y lactosa (Hidrato de Carbono) dando como resultado una glicación, como se describe en el trabajo de (A.-i. Sarabia-Sainz, 2011).

En este trabajo el proceso de glicación entre BSA y lactosa se realizó mediante una proporción molar de 1: 200 (BSA: lactosa) donde la muestra se congelo a  $-80^{\circ}$  C durante 24 hr, adicionalmente la muestra se liofilizo durante 40 hr aproximadamente para después someter a una temperatura de  $100^{\circ}$  C durante 30 minutos, posteriormente la muestra se somete a congelación a  $-80^{\circ}$  C durante 24 hr y finalmente la muestra se somete a liofilización durante 40 hr teniendo como resultado la albúmina modificada con lactosa. Las propiedades físico-químicas, como el cambio en la masa y la estructura molecular de los glicoconjugados se evaluaron por métodos de caracterización como: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato SDS-PAGE, Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier FT-IR y Fluorescencia Intrínseca de Triptófano Trp-IF (A.-i. Sarabia-Sainz, 2011).

### **3.3. Caracterización de la Albúmina**

#### **3.3.1. 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 10µg de proteína y fue teñido con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250. 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.

#### **3.3.2. Espectroscopia de Fluorescencia Trp-IF**

El análisis por Trp-IF de albúmina modificada con lactosa BSA-Lac, se realizó utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.) con una cubeta de cuarzo de 1cm de longitud a una temperatura de 25° C. Las soluciones de BSA-Lac fueron preparadas en 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.9% de NaCl (PBS) a un pH de 7.2 y fue ajustado a 0.01 unidades de absorbancia a 280 nm (Plotnikova, Mel'nikov, Mel'nikov, & Gubina, 2016). El ensayo se llevó a cabo con una excitación de 295 nm y una emisión de barrido en el intervalo de 300-400 nm. Trp-IF fue expresado como la fluorescencia relativa en unidades arbitrarias (AU). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



### **3.3.3. Espectroscopia Infrarroja FT-IR**

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

### **3.4. Síntesis de Nanopartículas de Albúmina**

La preparación de nanopartículas modificadas con lactosa NP-BSA-Lac fue preparada acorde a (Sarabia-Sainz, 2012) con unas ligeras modificaciones. Span® 80 y glutaraldehído saturado con tolueno (GST) fueron utilizados como agentes surfactante y entrecruzante respectivamente. Además, 1 mL de solución acuosa conteniendo 10% de BSA-Lac fue agregada gota a gota en 25 mL de aceite mineral conteniendo 100  $\mu\text{L}$  de Span® 80, Posteriormente, fue puesto en agitación constante a 8000 rpm utilizando un homogeneizador. Después de 30 minutos se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído saturado con tolueno (GST). El proceso de emulsión permaneció en agitación constante a 8000 rpm durante 2 horas, donde posteriormente, las nanopartículas fueron obtenidas por un proceso de centrifugación a  $1644 \times g$  durante 20 minutos. Finalmente, las nanopartículas lactosiladas (NP-BSA-Lac) fueron lavadas con hexano y secadas a temperatura ambiente. El mismo procedimiento fue utilizado para la síntesis de nanopartículas de albúmina sin modificar (NP-BSA) las cuales fueron utilizadas como control.

### **3.5. Caracterización de Nanopartículas de Albúmina**

#### **3.5.1. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)**

Dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). Las partículas que se encuentran en un líquido siempre están en movimiento, esto se debe al movimiento browniano, el cual describe el movimiento de las partículas ocasionadas por el choque con las moléculas del líquido que rodean a la partícula. La relación entre el tamaño de la partícula y su velocidad debido al movimiento browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein, donde  $D$  es el coeficiente de difusión y se relaciona al radio hidrodinámico  $R_h$  de las partículas,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin y  $\eta$  es la viscosidad dinámica (Dominguez-Medina et al., 2016).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

La distribución de tamaños de NP-BSA y NP-BSA-Lac fueron medidas utilizando el equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) (Thao le et al., 2016) Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) (Thao le et al., 2016). Las muestras fueron diluidas con PBS a una concentración de 1mg/mL a un pH de 7.2. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C utilizando un ángulo de medición de 90°. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado

#### **3.5.2. Potencial Zeta**

Para determinar el potencial zeta de una partícula se basa principalmente en la movilidad electroforética, donde se obtiene por medio de un experimento electroforético y midiendo la velocidad de las partículas utilizando Velocimetría de Láser Doppler (LDV, por sus siglas en inglés). Cuando se aplica un campo eléctrico a través de un electrolito, las partículas cargadas suspendidas en el electrolito son atraídas hacia el electrodo de carga

opuesta. La velocidad de una partícula en un campo eléctrico es comúnmente referida como su movilidad electroforética.

El potencial zeta de NP-BSA y NP-BSA-Lac fue determinado utilizando el equipo de Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) (Kim, Lee, Lee, Shin, & Youn, 2016). Las mediciones fueron realizadas a una temperatura de 25°C. Las nanopartículas fueron dispersadas en PBS a una concentración de 1mg/mL a un pH 7.2. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

### **3.5.3. Espectroscopia 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.

## **3.6. Ensayos de Biorreconocimiento**

### **3.6.1. Reconocimiento con Lectinas RCA 1**

Para el biorreconocimiento con lectinas, fueron suspendidos 1 mg de NP en 3 mL de PBS a un pH de 7.2. Posteriormente, fue mezclado con una solución de RCA a diferentes concentraciones (0.3, 1 y 3.5  $\mu\text{g/mL}$ ) y puestos en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La interacción fue medida por el incremento de tamaño de las NP's utilizando el equipo de (DLS) Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) como se describió anteriormente. El mismo procedimiento fue utilizado para las dos muestras de nanopartículas, tanto NP-BSA como NP-BSA-Lac.

### **3.6.2. Reconocimiento con Bacteria *E. coli* K88<sup>+</sup>**

La bacteria *E. coli* K88 enterotoxigenica, que expresa en sus fimbrias una adhesina con una especificidad a la galactosa, fue utilizada como célula modelo para evaluar el biorreconocimiento de NP-BSA-Lac (H. M. Sarabia-Sainz et al., 2013). La cepa de *E. coli* K88 fue cultivada en agar CFA a una temperatura de 37° durante 24h. Posteriormente fue preparada una suspensión de bacteria con PBS la cual fue ajustada a 0.2 unidades de densidad óptica a 660 nm (aproximadamente  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>).

El procedimiento general del ensayo de biorreconocimiento de NP-BSA y NP-BSA-Lac con bacteria *E. coli* K88 fue muy similar. Una suspensión de bacteria fue mezclada con una solución de NP's (0.4 mg/mL en PBS) como se muestra a continuación: 10 mL de la suspensión de nanopartículas fueron adicionadas a 5 mL de la suspensión de bacterias y por otra parte 10 mL de la suspensión de nanopartículas fueron adicionadas a 1 mL de la suspensión de bacterias. Adicionalmente las muestras fueron incubadas a 25° durante 30 minutos. Posteriormente, la interacción fue medida por DLS como se describe en ensayos anteriores.

#### **3.6.2.1. Análisis de interacción mediante microscopia de Fuerza Atómica AFM**

La morfología de la bacteria y su interacción con las NP-BSA-Lac fue visualizada mediante la técnica de microscopia de fuerza atómica (AFM). Para la preparación de la muestra analizada se utilizó 2 mL de la suspensión de bacteria mezclada con 50 µL de la suspensión de NP-BSA-Lac (1 mg/mL), donde posteriormente la muestra fue incubada a una temperatura de 25° C durante 30 minutos. Enseguida, 10 µL de la muestra fue inmovilizada para ser secada en un porta muestras durante 30 minutos a 25° C. Adicionalmente las muestras fueron lavadas con agua desionizada y puestas a secar a temperatura ambiente para posteriormente ser analizadas. Los análisis de las imágenes obtenidas se realizaron

mediante el equipo de AFM (XE-Bio system, Park Systems Corp, Suwon, Korea) donde, adicionalmente fue acoplado in microscopio invertido (Nikon Ti-E, Nikon Instrument Inc. USA). Las imágenes fueron obtenidas en modo no contacto utilizando el uso de cantilever NCHR (fuerza constante de 130 N/m). La forma del análisis se realizó mediante un escaneo de 50x50  $\mu\text{m}$  para cada muestra, posteriormente se realizaron escaneos de 35x35  $\mu\text{m}$  y finalmente de 10x10  $\mu\text{m}$  para cada muestra analizada. Por último, la estructura de la bacteria y la interacción de la nanopartícula, fueron analizadas mediante un escaneo de la imagen de 5x5  $\mu\text{m}$ . El número de puntos por escaneo fue de 256, mientras que los perfiles de la imagen fueron analizados en modo 2D y 3D utilizando un software XEI versión 1.8 de Park Systems.

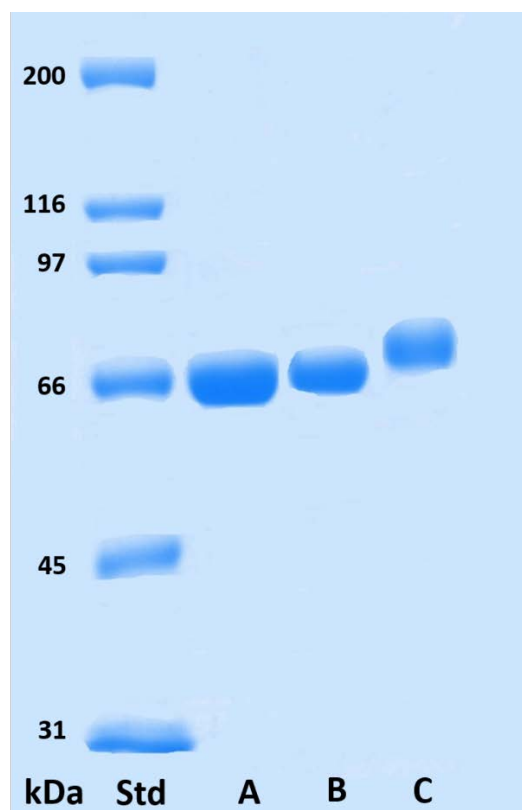
## CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de la Albúmina

El proceso de glicación, también llamado glicosilación no enzimática es una reacción entre los grupos aminos libres de la proteína y los grupos carbonil de una azúcar reductora a través de la reacción de Maillard (Singh, 2014). Este proceso de acoplamiento de proteína con azúcar produce neoglicanos. En reportes previos indican que la glicación es favorecida a una temperatura alrededor de 60° C, pH alcalino, la influencia por humedad y el tiempo de reacción (A. I. Ledesma-Osuna, Ramos-Clamont, & Vazquez-Moreno, 2009; A.-i. Sarabia-Sainz, 2011). Otros factores son la actividad del agua, propiedades intrínsecas de la proteína y azúcar y grupos amino de azúcar reductora son factores que influyen en la reacción de Maillard. En este trabajo, la glicación de BSA con lactosa fue llevada a cabo a una relación molar de 1:200 (BSA: lactosa) a una temperatura de 100° C por un tiempo de 30 minutos (Andre-i Sarabia-Sainz, Ramos-Clamont, Candia-Plata, & Vázquez-Moreno, 2009). Las propiedades fisicoquímicas, cambios de peso molecular y estructura de los glicoconjugados fueron evaluados por SDS-PAGE, FT-IR y Trp-IF.

#### 4.1.1. Análisis de Peso Molecular por SDS-PAGE

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. Se observaron diferencias en los patrones de migración electroforéticos de BSA-Lac con respecto a BSA. Se encontró un aumento en la migración de BSA-Lac comparada con BSA sin tratar. En la Fig. 1, línea B, se muestra la típica banda del peso molecular de 66 kDa correspondiente a BSA, mientras que BSA-Lac muestra un incremento del 22% en el peso molecular correspondiente a 81 kDa (Fig. 1, línea C). Estos resultados sugieren que la lactosilación, bajo estas condiciones, modifica el peso molecular de BSA, lo que podría deberse a la adición de 41 moléculas de lactosa aproximadamente, acorde a lo publicado previamente por otros autores (Ana Irene Ledesma-Osuna, Ramos-Clamont, & Vázquez-Moreno, 2008).

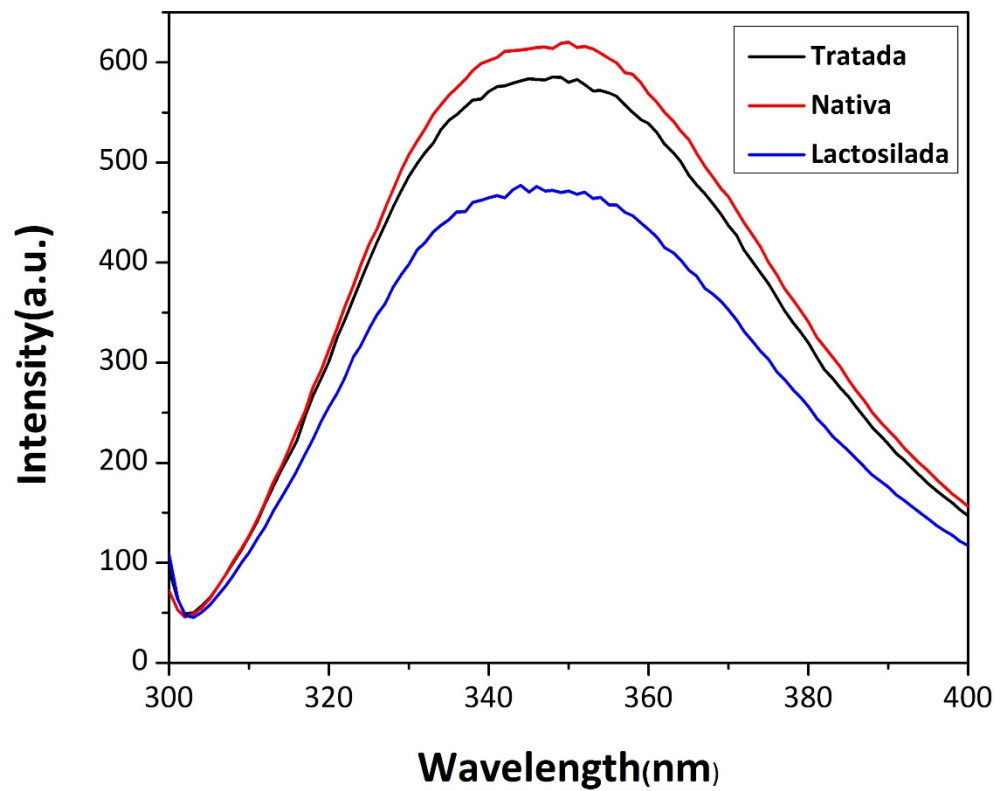


**Figura 13.** Electroforesis SDS-PAIGE al 10 %. Carril 1, Control estándar; Carril A, BSA-Nat; Carril B, BSA-Tratada; Carril C, BSA-Lac.



#### **4.1.2. Análisis de Modificación Estructural por Trp-IF**

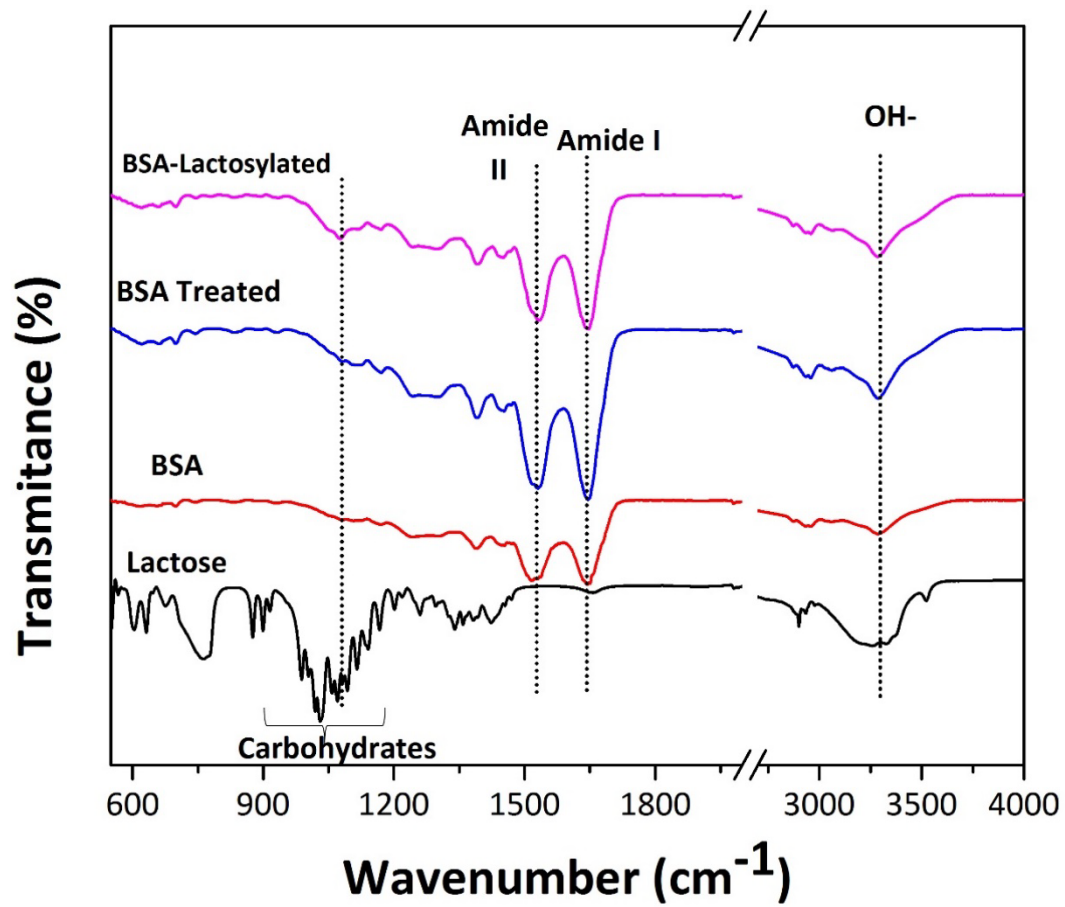
Para la caracterización de los cambios de BSA triptófano, se realizaron estudios de procesos fluorométricos de glicación. Los aminoácidos no polares alifáticos y aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano suelen encontrarse en el interior de la proteína y están involucrados en interacciones hidrofóbicas. Cuando el triptófano principalmente en el caso de la albúmina es sustituido desde el interior menos polar de la proteína este se convierte en una región expuesta, donde la emisión máxima de fluorescencia tiene una mayor intensidad en regiones de los 280 nm que los otros dos aminoácidos aromáticos. El rendimiento cuántico de fluorescencia en la proteína disminuye cuando los cromóforos interactúan con agentes de inhibición o moléculas del disolvente. El cambio en el espectro de emisión característico de la proteína proporciona información relacionada a la conformación de la estructura terciaria de la proteína (Tang, Wu, Le, & Shi, 2012). En la Figura 2, se muestra un alto índice de reducción en la intensidad de fluorescencia de BSA-Lac, el cual puede ser atribuido a las moléculas de lactosa adheridas a la proteína. Reportes previos indican que el decremento en la intensidad de fluorescencia después de la glicación es atribuido al efecto de blindaje de carbohidratos (Jimenez-Castano, 2007). También, (Jian et al., 2016), reportó que carbohidratos pueden ser agentes de inhibición los cuales pueden disminuir la emisión de fluorescencia de proteínas. Por otra parte, es importante considerar que la intensidad de fluorescencia de proteínas disminuyó durante el proceso de calentamiento (Duy, 2006). Es por esto, que la fuerte inhibición de fluorescencia de BSA-Lac podría ser atribuida por una combinación entre la glicación y la desnaturalización de la proteína.



**Figura 14.** Fluorescencia intrínseca del triptófano. BSA-Tratada (línea negra), BSA-Nat (línea roja), BSA-Lac (línea Azul).

### 4.1.3. Análisis de Estructura Química por FT-IR

El análisis de FT-IR es un efectivo método para obtener información relacionada a la composición y estructura química de materiales. La estructura secundaria de proteínas puede ser analizada por la absorción en longitudes de onda específicas. El espectro infrarrojo de BSA y su producto de glicación fueron analizados para confirmar la conjugación de lactosa. En la figura 3 se muestra el espectro FT-IR de BSA antes y después de la glicación. El espectro de BSA-Lac, presentó un incremento en las bandas vibracionales de la amida (amida I, II y A) características en los espectros infrarrojos de proteínas (Arrondo, 1993, 1999). El enlace C-N formado durante la glicación, contribuyó en el incremento de la intensidad en las bandas vibracionales de la amida I ( $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ ) y II ( $1510-1580\text{ cm}^{-1}$ ). El incremento de la banda en la amida I es también atribuido al fuerte enlace vibracional de C=O, el cual es una de las principales razones en las vibraciones de estiramiento (Jian et al., 2016). Adicionalmente, BSA-Lac muestra un incremento en intensidad de la banda, en amida A ( $3225$  y  $3280\text{ cm}^{-1}$ ), el cual puede ser atribuido al hidrogeno de la azúcar, debido a que esta banda es muy sensible a la formación de hidrogeno (Arrondo, 1993, 1999). También, en BSA-Lac emerge un nuevo pico en  $1000-1250\text{ cm}^{-1}$  el cual puede ser acreditado específicamente al enlace C-N (Jian et al., 2016). Basándonos en el incremento del peso molecular, en el efecto de inhibición y el incremento de la intensidad vibracional de las bandas asociadas a la glicación, nosotros podemos asumir que BSA fue conjugada satisfactoriamente con lactosa y de esta manera formar un nuevo producto de glicación.

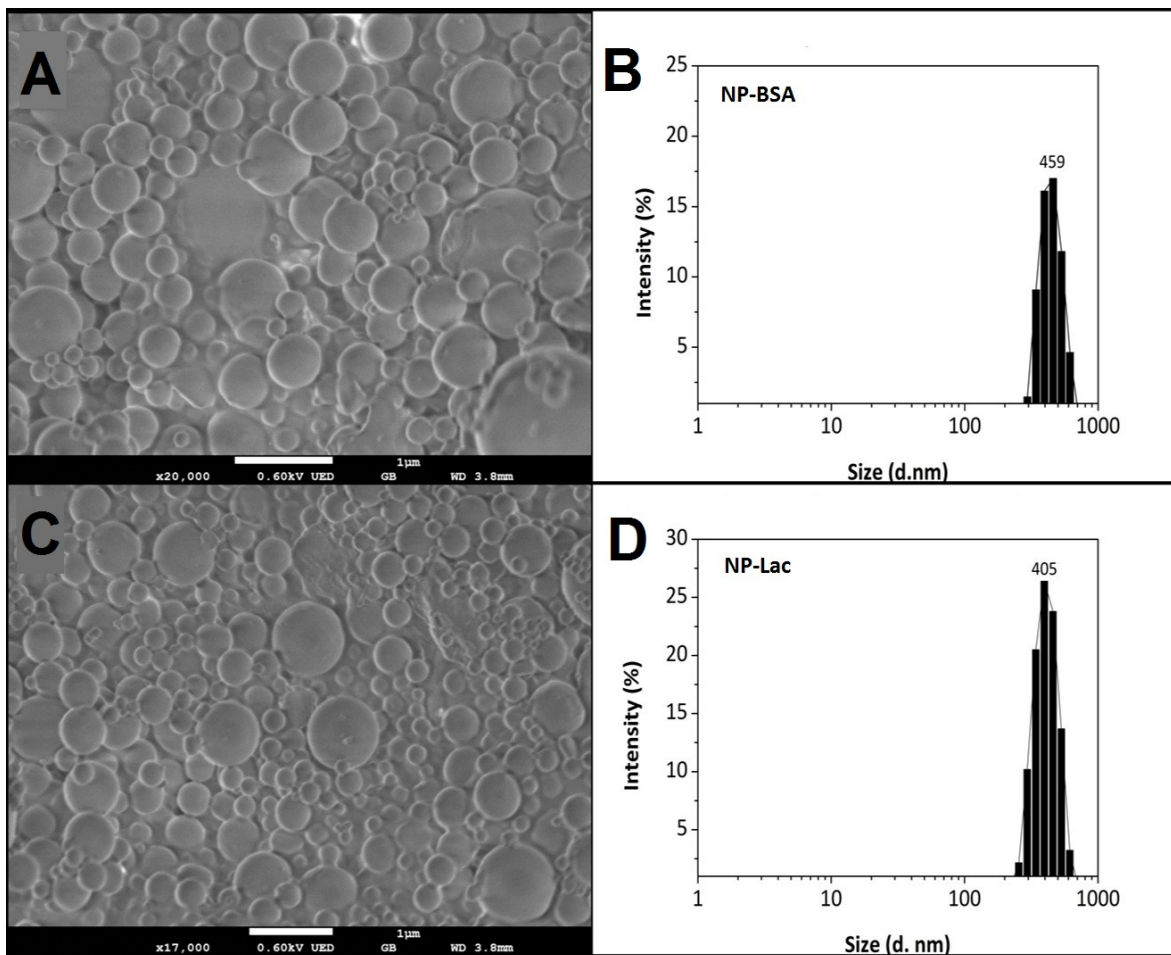


**Figura 15.** Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier FT-IR. BSA-Lac (línea rosa), BSA-Tratada (línea azul), BSA-Nat (línea roja) y Lactosa (línea negra).

## 4.2. Morfología, Tamaño y Potencial zeta de Nanopartículas de Albúmina

Una vez que se demostró la glico-conjugación, el siguiente paso fue la caracterización de la síntesis de NP-BSA y NP-BSA-Lac. Con el fin de lograr este propósito, nosotros determinamos la morfología y el tamaño por la técnica de SEM y DLS, respectivamente. En la figura 4A y 4C se muestra el análisis SEM de NP-BSA como control y NP-BSA-Lac respectivamente. Ambas muestras presentan forma esferoide con una superficie lisa. El tamaño promedio y la polidispersidad de las nanopartículas fueron confirmados por la técnica de DLS (Figuras 4B y 4D). Los rangos de tamaño fueron ligeramente más grandes para NP-BSA con un tamaño promedio de  $459 \pm 45.6$  nm y PI de 0.418, mientras que para NP-BSA-Lac presentaron un tamaño promedio de  $405 \pm 97.16$  nm y PI de 0.521.

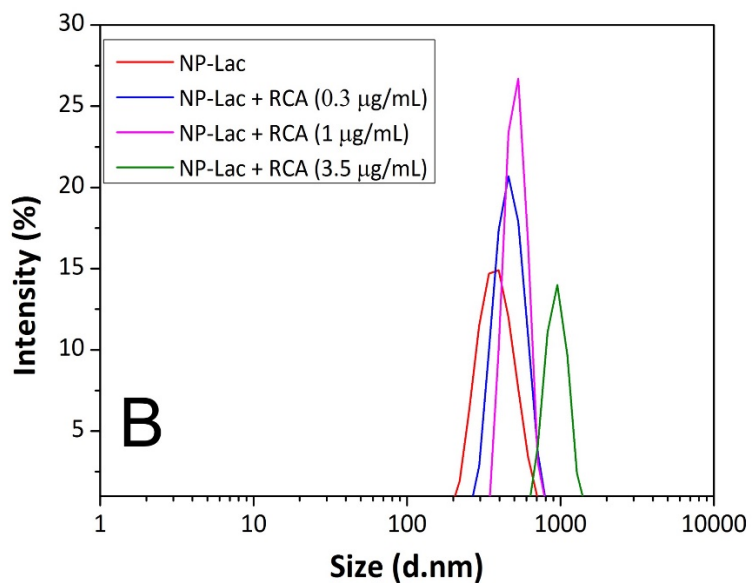
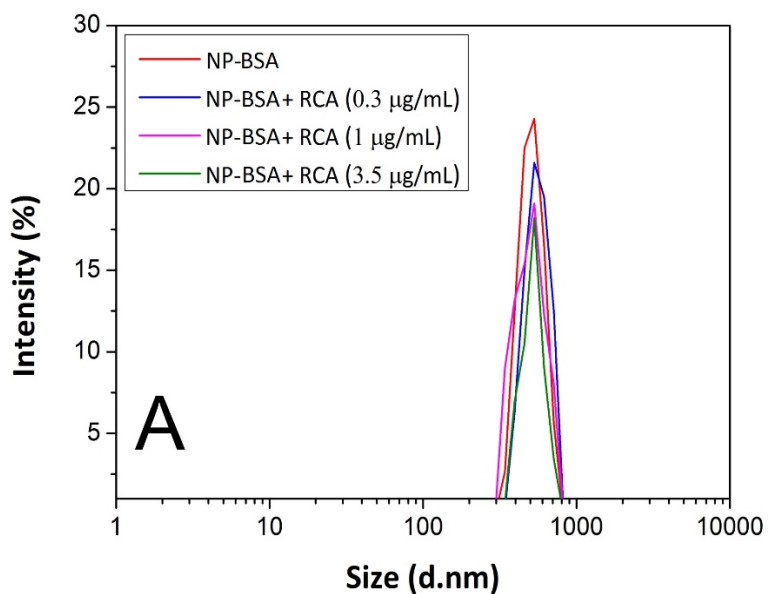
El potencial zeta de NP-BSA y NP-BSA-Lac fueron medidos para determinar la carga superficial, ya que juega un rol muy importante en la estabilidad de las nanopartículas en suspensión. En este estudio todas las síntesis de nanopartículas realizadas tuvieron un valor promedio alrededor de los -40 mV. Un alto valor negativo del potencial zeta, indica una alta estabilidad en sistemas y previene la formación de agregados en una solución coloidal (Patil, Sandberg, Heckert, Self, & Seal, 2007). Estos resultados indican una dispersión estable de las nanopartículas y fueron consistentes en todas las mediciones realizadas tanto en agua como en PBS.



**Figura 16.** Caracterización de NP's por SEM y DLS. Distribución de tamaño y morfología de nanopartículas de albúmina BSA (A y B, respectivamente). C y D muestran la morfología y distribución de tamaño de nanopartículas de albúmina modificada BSA-Lac, respectivamente.

### **4.3. Ensayo de Biorreconocimiento de Nanopartículas de Albúmina con Lectinas RCA**

El objetivo principal de este trabajo fue la síntesis de nanopartículas de albumina conjugadas a lactosa con la capacidad de adherirse a los receptores de lectinas RCA. Posteriormente ya una vez realizada las síntesis de NP-BSA-Lac, se llevaron a cabo ensayos de biorreconocimiento para verificar si los residuos expuestos de galactosa en la estructura de las nanopartículas eran capaces de inducir una interacción biológica. Las NP-BSA-Lac fueron incubadas para evaluar la interacción biológica de galactosa con lectina (RCA). El diámetro del complejo resultante de la interacción de lectinas con NP-BSA-Lac fue medido por DLS. En el caso de las NP-BSA incubadas con lectinas RC, no hubo cambio alguno en el diámetro de la nanopartícula (Figura 5A). Por otra parte, cuando NP-BSA-Lac fue incubada con RCA fue observado un incremento en el tamaño promedio del diámetro de las nanopartículas (Figura 5B). Cuando NP-BSA-Lac fue incubada con concentraciones mayores de RCA, se observó un gran incremento de agregados de nanopartículas (S. Wang et al., 2011). (Valtola, 2014) colaboradores reportaron una interacción similar cuando una solución de lectinas era incubada con nanopartículas glicosiladas. Entonces, los agregados observados, fueron debido a la interacción entre lectinas y residuos de galactosa expuestos en la superficie de las NP-BSA-Lac. Cuando la concentración de lectina se incrementó de 0.3  $\mu\text{g/mL}$  a 3.5  $\mu\text{g/mL}$ , se observó un incremento del tamaño del diámetro de NP-BSA-Lac de aproximadamente 500 nm.



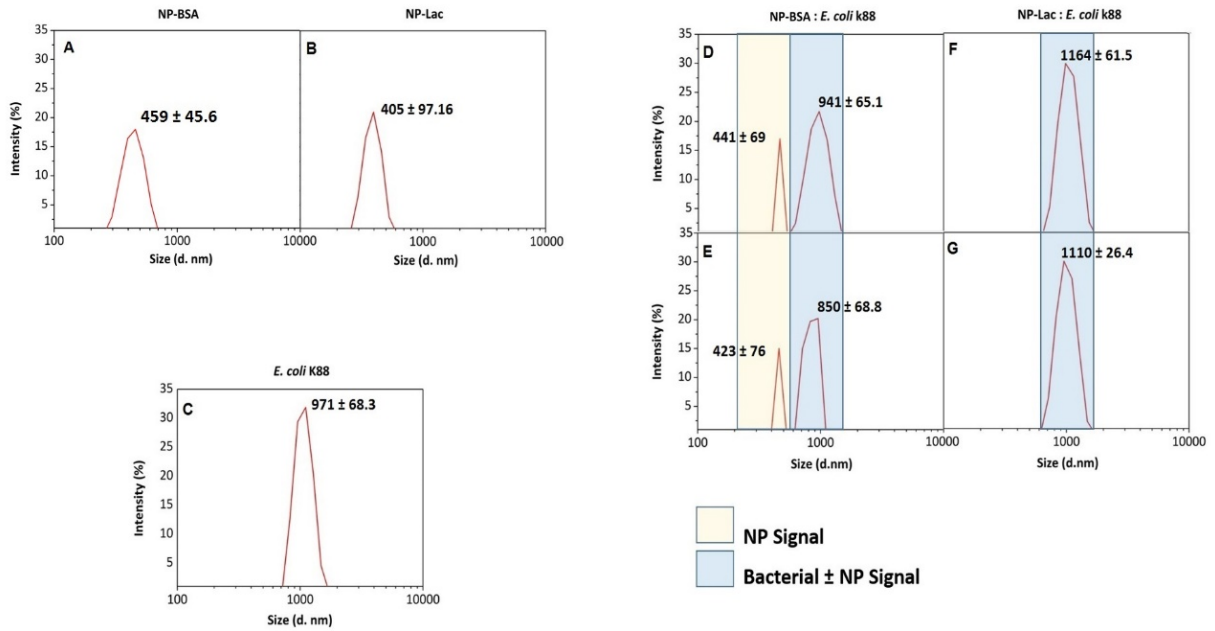
**Figura 17.** Distribución de tamaño por DLS de NP's incubadas con lectinas RCA a diferentes concentraciones. A) distribución de tamaños de NP-BSA incubada con lectinas. B) muestra el cambio en la distribución de tamaños de NP-BSA-Lac incubadas con lectinas RCA.



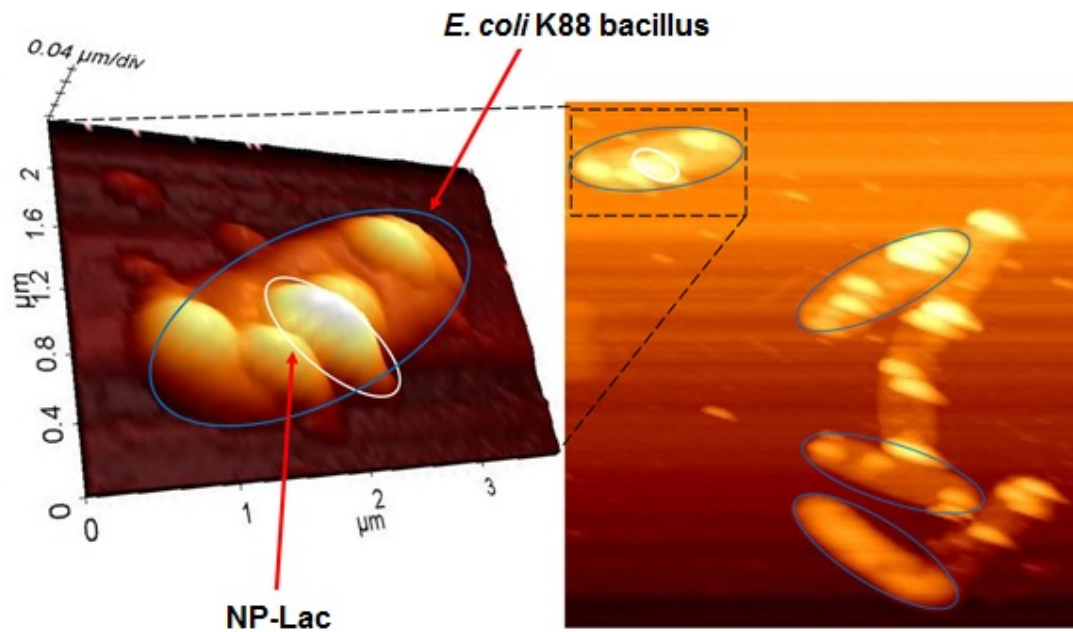
#### **4.4. Ensayo de Biorreconocimiento de Nanopartículas de Albúmina con Bacterias *E. coli* K88 por DLS y AFM.**

Anteriormente, se describió como las NP-BSA-Lac presentan en su superficie residuos expuestos de galactosa que mantienen una capacidad para interactuar biológicamente. El siguiente paso fue determinar el biorreconocimiento biológico de las NP-BSA y NP-BSA-Lac con bacterias *E. coli* K88 mediante la técnica de DLS. La figura 6 muestra la banda de distribución de tamaño promedio de NP-BSA y NP-BSA-Lac presentando  $459 \pm 45.6$  y  $405 \pm 97.16$  nm respectivamente, mientras que la bacteria *E. coli* muestra una distribución de tamaño de  $971 \pm 68.3$  nm (Figura 6, A-C). Cuando fueron mezcladas las suspensiones de NP-BSA con bacteria a diferentes cargas de bacteria, se observan dos señales con intensidades (%) similares para ambos ensayos (Figura 6, D-E), esto es atribuido a la nula interacción entre la bacteria y las nanopartículas. En caso contrario, cuando fue mezclada la suspensión de NP-BSA-Lac con la de bacterias, solo se observa una señal, la cual fue detectada en una rango de tamaño promedio de  $1164 \pm 61.5$  a  $1110 \pm 26$  con una mayor intensidad comparado con los controles de NP-BSA (Figura 6, F-G). , donde es importante mencionar que en este experimento la banda correspondiente a NP-BSA-Lac (tamaño promedio de 400 nm) no está presente, esto indica que las NP-BSA-Lac son atraídas al cuerpo de la bacteria debido a un biorreconocimiento por parte de adhesina-carbohidrato. (El-Boubbou, Gruden, & Huang, 2007) y colaboradores reportan que las gliconopartículas pueden establecer una interacción específica con cepas de *E. coli* K88 formando complejos, los cuales fueron observados por TEM en la superficie, en los extremos laterales y a lo largo de las células bacterianas. También, (Lin et al., 2002) y colaboradores reportaron la unión específica de nanopartículas de Au modificadas con manosa al cuerpo de bacterias *E. coli* K88.

La interacción específica entre NP-BSA-Lac con bacterias *E. coli* K88 fue verificada mediante la técnica de AFM. La figura 7, muestra nanopartículas con un rango de tamaño (300-500 nm) adheridas a los bacilos de la bacteria ( $1.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$  de tamaño). Estos resultados indican que NP-BSA-Lac son reconocidas por la bacteria, debido a la presencia de residuos de galactosa que interactúan con adhesinas bacterianas.



**Figura 18.** Distribución de tamaño por DLS de *E. coli* K88 con NP-BSA-Lac y NP-BSA. A, NP-BSA; B, NP-BSA-Lac; C, *E. coli* K88; D, NP-BSA(4mg) + *E. coli* K88 ( $5 \times 10^8$  CFU); E, NP-BSA(4mg) + *E. coli* K88 ( $1 \times 10^8$  CFU); F, NP-BSA-Lac(4mg) + *E. coli* K88 ( $5 \times 10^8$  CFU); G, NP-BSA-Lac(4mg) + *E. coli* K88 ( $1 \times 10^8$  CFU).



**Figura 19.** Microscopía de Fuerza Atómica de *Escherichia coli* K88 interaccionando con nanopartículas de albúmina lactosilada.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

### 5.1. Conclusiones

En el presente trabajo, se realizó la modificación de la albúmina sérica bovina BSA con la adición de aproximadamente 41 moléculas lactosa bajo estas condiciones y dando como resultado un nuevo producto de glicación BSA-Lac. Adicionalmente, se obtuvieron nanopartículas de BSA y BSA-Lac mediante la técnica de síntesis emulsión agua y aceite, dando como resultado nanopartículas con un tamaño promedio a 400 nm, con una morfología esférica y potencial z de aproximadamente -40 mV. Posteriormente se realizaron ensayos de biorreconocimiento de nanopartícula BSA y BSA-Lac con adhesinas bacterianas de *E. coli* k88 y lectinas de *Ricinus Communis* sirviendo como modelo de biorreconocimiento a receptores de RAGP's, dando como resultado un claro biorreconocimiento por parte de las nanopartículas lactosiladas. Esto se debe a la interacción que ocurre entre adhesina-carbohidrato, debido a los residuos de galactosa expuestos en la superficie de la nanopartícula modificada con lactosa. Los resultados obtenidos, indican que las nanopartículas lactosiladas podrían ser potencialmente utilizadas como vector en el transporte de fármacos antitumorales y orientados hacia una terapia dirigida de cáncer de hígado.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Olivos, N. E., Gutiérrez-Grobe, Y., Motola, M., Lavenant, I., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2016). Prevalencia del carcinoma hepatocelular en hígado no cirrótico. *MÉDICA SUR SOCIED A SUR SOCIED A SUR SOCIEDAD DE MÉDICOS, AC AD DE MÉDICOS, AC*, 124.
- Aldaco-Sarvide, F. (2012). Cancer mortality in Mexico 2000-2010: The counting of the damages. *Gaceta Mexicana de Oncologia*, 11(6), 371-379.
- Arellano, L. E. E. (2013). 7Capítul. *Farmacologia general: una guia de estudio*, 47.
- Arrondo, J. L. R. (1993). Quantitative studies of the structure of protein in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Progress in biophysics and molecular biology*, 59, 23-56.
- Arrondo, J. L. R. (1999). Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Progress in biophysics and molecular biology*, 72, 367-405.
- Bertrand, N. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
- Böcker, S., Laaf, D., & Elling, L. (2015). Galectin binding to neo-glycoproteins: LacDiNAc conjugated BSA as ligand for human galectin-3. *Biomolecules*, 5(3), 1671-1696.
- Choi, J. (2014). *Nuclear medicine and biology*.
- Dandagi, P. (2006). *International journal of pharmaceutics* 307, 83.
- Dominguez-Medina, S., Chen, S., Blankenburg, J., Swanglap, P., Landes, C. F., & Link, S. (2016). Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles Using Fluctuation Correlation Spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 67(1), 489-514. doi: doi:10.1146/annurev-physchem-040214-121510
- Duy, C. (2006). How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra. *Biophysical journal*, 90, 3704-3711.
- El-Boubbou, K., Gruden, C., & Huang, X. (2007). Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation. *Journal of the American Chemical Society*, 129(44), 13392-13393.

- Forner, A., & Reig, M. (2016). [Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH]. *Medicina clinica*, 146(11), 511. e511-511. e522.
- Guler, G., Vorob'ev, M. M., Vogel, V., & Mantele, W. (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. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 161, 8-18. doi: 10.1016/j.saa.2016.02.013
- Haburcak, R., Shi, J., Du, X., Yuan, D., & Xu, B. (2016). Ligand-Receptor Interaction Modulates the Energy Landscape of Enzyme-Instructed Self-Assembly of Small Molecules. *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/jacs.6b07677
- Han, J.-H. (1999). *International journal of pharmaceutics* 188, 39.
- Huang, S., Duan, S., Wang, J., Bao, S., Qiu, X., Li, C., . . . Hu, Y. (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, P. d. I. N. d. E. y. G. (2014).
- Jian, W., He, J., Sun, Y., & Pang, J. (2016). Comparative studies on physicochemical properties of bovine serum albumin-glucose and bovine serum albumin-mannose conjugates formed via Maillard reaction. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 358-364. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.061>
- Jimenez-Castano, L. (2007). Glycosilation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 21, 433.443.
- Kaur, V., & Mahajan, R. (2016). Synthesis of Glyconanamaterials.
- Khanna, V. K. (2012). *ISRN pharmacology*.
- Kim, B., Lee, C., Lee, E. S., Shin, B. S., & Youn, Y. S. (2016). Paclitaxel and curcumin co-bound albumin nanoparticles having antitumor potential to pancreatic cancer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-7. doi: 10.1016/j.ajps.2016.05.005
- Krasnova, L., & Wong, C.-H. (2016). Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 599-630. doi: doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034420

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Ledesma-Osuna, A. I. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9734.
- Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G., & Vazquez-Moreno, L. (2009). Biorecognition of chemically modified bovine serum albumin with lactose prepared under different conditions. *J Agric Food Chem*, 57(20), 9734-9739. doi: 10.1021/jf9020976
- Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G., & Vázquez-Moreno, L. (2008). Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochim Pol*, 55(3), 491-497.
- Lin, C.-C., Yeh, Y.-C., Yang, C.-Y., Chen, C.-L., Chen, G.-F., Chen, C.-C., & Wu, Y.-C. (2002). Selective binding of mannose-encapsulated gold nanoparticles to type 1 pili in Escherichia coli. *Journal of the American Chemical Society*, 124(14), 3508-3509.
- MacRaild, C. A., Richards, J. S., Anders, R. F., & Norton, R. S. (2016). Antibody Recognition of Disordered Antigens. *Structure*, 24(1), 148-157.
- Maeda, H. (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. (2011). Projections of the Cost of Cancer Care in the United States: 2010–2020. *J Natl Cancer Inst*, 103(2), 117-128. doi: 10.1093/jnci/djq495
- Martín, S. (2014). Strategies of drug targeting at the tumor mass level. *Clin Transl Oncol*, 16, 1-10.
- Mei, L. (2013). Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(6), 880-890. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.005>
- Mokdad, A. A., Singal, A. G., & Yopp, A. C. (2016). Treatment of Liver Cancer. *JAMA*, 315(1), 100-100.
- Neira-Carrillo, A. (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.
- Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., & Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential.

Peer et al. (2007).

Plotnikova, O. A., Mel'nikov, A. G., Mel'nikov, G. V., & Gubina, T. I. (2016). Quenching of tryptophan fluorescence of bovine serum albumin under the effect of ions of heavy metals. *Optics and Spectroscopy*, 120(1), 65-69. doi: 10.1134/s0030400x16010148

Prabhakar, U., Maeda, H., Jain, R. K., Sevick-Muraca, E. M., Zamboni, W., Farokhzad, O. C., . . . Blakey, D. C. (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer research*, 73(8), 2412-2417.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2016). Glycation of Proteins. *Analysis of Protein Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry*, 307.

Reichardt, N.-C., Martín-Lomas, M., & Penadés, S. (2016). Opportunities for glyconanomaterials in personalized medicine. *Chemical Communications*.

Restuccia, A., Fettis, M. M., & Hudalla, G. A. (2016). Glycomaterials for immunomodulation, immunotherapy, and infection prophylaxis. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(9), 1569-1585.

Rojas-Aguirre, Y. (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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>

Rosenoer, V. M., Oratz, M., & Rothschild, M. A. (2014). *Albumin: Structure, Function and Uses*: Elsevier.

Sangabathuni, S., Murthy, R. V., Chaudhary, P. M., Surve, M., Banerjee, A., & Kikkeri, R. (2016). Glyco-gold nanoparticle shapes enhance carbohydrate-protein interactions in mammalian cells. *Nanoscale*.

Santa, C. F., & López Osorio, B. L. (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. (2012). MICROESFERAS ACTIVAS DE ALBÚMINA GLICADA CON LACTOSA, TRANSPORTADORAS DE ANTIBIÓTICOS CON ORIENTACIÓN HACIA *Escherichia coli* K88.
- Sarabia-Sainz, A.-i. (2011). *Acta Biochimica Polonica*, 58, 95.
- Sarabia-Sainz, A.-i., Ramos-Clamont, G., Candia-Plata, M. M. d. C., & Vázquez-Moreno, L. (2009). Biorecognition of *Escherichia coli* K88 adhesin for glycated porcine albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(2), 175-181. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.11.009>
- Sarabia-Sainz, H. M., Armenta-Ruiz, C., Sarabia-Sainz, J. A.-i., Guzmán-Partida, A. M., Ledesma-Osuna, A. I., Vázquez-Moreno, L., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2013). Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to neoglycans synthesised with prebiotic galactooligosaccharides. *Food Chemistry*, 141(3), 2727-2734. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.040>
- Shang, L., Nienhaus, K., Jiang, X., Yang, L., Landfester, K., Mailänder, V., . . . Nienhaus, G. U. (2014). Nanoparticle interactions with live cells: quantitative fluorescence microscopy of nanoparticle size effects. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5(1), 2388-2397.
- Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1), 1.
- Singh, V. P. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complication. *The korean journal of Physiology & Pharmacology*, 18, 1-14.
- Suárez, A. I. T. (2016). a nanotecnología aplicada. *DIAGNOSTICO*, 55, 1.
- Talevi, A. (2016). Procesos biofarmacéuticos.
- Tanaka K, C. Y. (2014). Design of functionalized nanoparticles for the applications in nanobiotechnology. *Adv. Power. Tech.*, 25, 101-113.
- Tang, X., Wu, Q., Le, G., & Shi, Y. (2012). Effects of heat treatment on structural modification and in vivo antioxidant capacity of soy protein. *Nutrition*, 28(11), 1180-1185.
- Thao le, Q., Byeon, H. J., Lee, C., Lee, S., Lee, E. S., Choi, Y. W., . . . Youn, Y. S. (2016). Doxorubicin-Bound Albumin Nanoparticles Containing a TRAIL Protein for

- Targeted Treatment of Colon Cancer. *Pharm Res*, 33(3), 615-626. doi: 10.1007/s11095-015-1814-z
- Tykocki, T., & Miękisiak, G. (2016). Application of Convection-Enhanced Drug Delivery in the Treatment of Malignant Gliomas. *World Neurosurgery*, 90, 172-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2016.02.040>
- Unverzagt, C., André, S., Seifert, J., Kojima, S., Fink, C., Srikrishna, G., . . . Gabius, H.-J. (2002). Structure–Activity Profiles of Complex Biantennary Glycans with Core Fucosylation and with/without Additional  $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6 Sialylation: Synthesis of Neoglycoproteins and Their Properties in Lectin Assays, Cell Binding, and Organ Uptake. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), 478-491. doi: 10.1021/jm0110237
- Valtola, L. (2014). Synthesis and lectin recognition of glycosylated amphiphilic nanoparticles. *European Polymer Journal*, 59, 282-289.
- Wang, B., Hu, Q., Wan, T., Yang, F., Cui, L., Hu, S., . . . Zheng, Q. C. (2016). Porous lactose-modified chitosan scaffold for liver tissue engineering: Influence of galactose moieties on cell attachment and mechanical stability. *International Journal of Polymer Science*, 2016.
- Wang, S., Cesca, F., Loers, G., Schweizer, M., Buck, F., Benfenati, F., . . . Kleene, R. (2011). Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. *The Journal of Neuroscience*, 31(20), 7275-7290. doi: 10.1523/jneurosci.6476-10.2011
- Xue, W. J., Feng, Y., Wang, F., Guo, Y. B., Li, P., Wang, L., . . . Mao, Q. S. (2016). Asialoglycoprotein receptor-magnetic dual targeting nanoparticles for delivery of RASSF1A to hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 6. doi: 10.1038/srep22149