

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Evaluación de la actividad citotóxica en sangre
periférica humana de nanopolímeros inteligentes para
el transporte de fármacos**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Edgar Iván Hernández Ruiz

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Edgar Iván Hernández Ruiz
y aprobado por el siguiente Comité:

Dra. Amelia Olivas Sarabia
Directora de tesis

Dra. Yanis Toledano Magaña

Dr. J. Apolinar Reynoso Hernández

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de Tesis que presenta **Edgar Iván Hernández Ruiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Evaluación de la actividad citotóxica en sangre periférica humana de nanopolímeros inteligentes para el transporte de fármacos

Resumen aprobado por:

Dra. Amelia Olivas Sarabia
Director de Tesis

En la actualidad existen polímeros que han demostrado tener uso biológico benéfico. Así mismo, la síntesis de copolímeros como nanotransportadores es la nueva dirección para aplicación de fármacos, buscando que el agente activo tenga el mayor rendimiento posible, siendo esta herramienta en la búsqueda de tratamientos contra el cáncer. Como cada nuevo material que pretende ser propuesto para aplicaciones biológicas debe ir asociado a un estudio toxicológico propio, el objetivo de los nanotransportadores poliméricos a evaluar en este proyecto pretende determinar si su contacto con sistemas biológicos tiene alguna respuesta adversa. Por lo tanto, se planteó evaluar el efecto citotóxico de dos nuevos nanotransportadores poliméricos preparados y comparar estos resultados con un polímero base, Pluronic® P123. El propósito de realizar los ensayos en sangre periférica humana es a consecuencia de que las células en ella son la primera defensa con la que el agente introducido se encontrará. Por ello, los nanotransportadores poliméricos estuvieron en contacto con cultivos primarios de células mononucleares aisladas de sangre periférica humana por 24 horas para evaluar si esta línea de defensa del sistema inmune generaba algún tipo de respuesta citotóxica aguda. Estos nanopolímeros fueron preparados por medio de nanopartículas poliméricas de base Pluronic® P123 y mezclas de Pluronic® P123 con polivinilpirrolidona y con polietilenglicol. Se estudió la biocompatibilidad de los tres nanopolímeros realizando ensayos celulares con cultivos celulares primarios de linfocitos y monocitos aislados de sangre periférica humana de diferentes individuos. Se evaluó la viabilidad y actividad metabólica en cultivos de células mononucleares humanas, las cuales se expusieron a concentraciones de 1, 10 y 100 mg/ml de una solución con los nanotransportadores. Se reportó un efecto no-citotóxico agudo significativo en cultivos primarios de células mononucleares y se reportó una base de información para dirigir estudios posteriores en organismos vivos y el efecto sobre una determinada población.

Palabras claves: nanotoxicología, polímeros inteligentes, viabilidad celular, transporte de fármacos, citotoxicidad.

Abstract of the thesis presented by **Edgar Iván Hernández Ruiz** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Evaluation of the cytotoxic activity in human peripheral blood of smart nanopolymers for drug transport

Abstract approved by:

Dra. Amelia Olivas Sarabia
Thesis Director

Currently, some polymers have been shown to have beneficial biological use. Likewise, the synthesis of copolymers as nanocarriers is the new direction for drug application, seeking that the active agent has the highest possible performance, being this tool in the search for cancer treatments. As each new material that intends to be proposed for biological applications must be associated with its toxicological study, the objective of the polymeric nanocarriers to be evaluated in this project is to determine if their contact with biological systems has an adverse response. Therefore, it was proposed to evaluate the cytotoxic effect of two new polymeric nanocarriers prepared and to compare these results with a base polymer, Pluronic® P123. The purpose of testing human peripheral blood is a consequence of the cells in it being the first defense that the introduced agent will encounter. Therefore, the polymeric nanocarriers were in contact with primary cultures of mononuclear cells isolated from human peripheral blood for 24 hours to assess whether this line of defense of the immune system generated some type of acute cytotoxic response. These nanopolymers were prepared using Pluronic® P123 based polymeric nanoparticles and blends of Pluronic® P123 with polyvinylpyrrolidone and with polyethylene glycol. The three nanopolymers biocompatibility was studied on lymphocytes and monocytes primary cultures isolated from different individuals human peripheral blood. The viability and metabolic activity were evaluated in human mononuclear cell cultures exposed to concentrations of 1, 10, and 100 mg/ml of a solution with the nanocarriers. A significant acute non-cytotoxic effect was reported in primary mononuclear cell cultures, and a database was reported to direct subsequent studies in living organisms and the effect on a given population.

Key words: nanotoxicology, smart nanocarriers, cell viability, drug delivery, cytotoxicity.

Dedicatoria

A mi madre, Yolanda Ruiz Solorio

A mis tíos, María Antonia Rodríguez y Ramón Corona

A mi familia, Figueroa Márquez

“Estar preparado es importante, saber esperarlo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida”

Arthur Schnitzler

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNYN-UNAM), los más sinceros agradecimientos por brindarme las bases y las herramientas para mi formación académica como Maestro en Nanociencias.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante el tiempo que realicé mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Baja California por brindarme la oportunidad de realizar parte de mi trabajo experimental durante mi estancia como estudiante de posgrado.

A mi asesora la Dra. Amelia Olivas Sarabia, mi más sincero agradecimiento por la confianza y el apoyo tanto académico como personal para la realización este proyecto de maestría. Un estudiante no solo necesita ser apoyado académicamente sino en todos los aspectos y eso se mostró en todo momento.

A la Dra. Yanis Toledano Magaña por ser parte fundamental en mi proyecto de tesis y estar siempre disponible para instruirme de la manera más idónea, correcta y objetiva para contribuir a mi formación profesional.

A los miembros del comité el Dr. J. Apolinar Reynoso Hernández y el Dr. Priscy Alfredo Luque Morales por su tiempo, disponibilidad y asesoría durante el desarrollo del proyecto de tesis.

Al Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez por su apoyo en la parte experimental de mi proyecto de tesis y por su disposición a disipar mis dudas en el ámbito de la investigación, contribuyendo así a mi formación profesional.

A mis maestros de CNYN-UNAM y CICESE por impartir las enseñanzas y disciplina que consideran mejor para los alumnos bajo experiencias personales.

A mis compañeros, amigos y familia por asesorarme y acompañarme durante el desarrollo académico.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	4
1.1.1 Fundamentos de nanotoxicología.....	4
1.2 Respuesta biológica a nanomateriales.....	5
1.2.1 Interacción con la membrana celular.....	6
1.2.2 Citotoxicidad y muerte celular.....	7
1.2.3 Células del sistema inmune.....	8
1.3 Estudios toxicológicos con células del sistema inmune.....	11
1.3.1 Cultivo células mononucleares.....	11
1.3.2 Viabilidad, proliferación y toxicidad celular.....	11
1.4 Sistemas poliméricos para aplicaciones biológicas y su toxicidad asociada.....	12
1.4.1 Sistemas de liberación de fármacos.....	12
1.4.2 Sistema de liberación con polímeros Pluronic® P123.....	13
1.4.3 Polímeros Pluronic® P123 (P123).....	13
1.5 Nanotoxicología en la actualidad.....	14
1.6 Antecedentes toxicológicos y biológicos asociados a polímeros.....	15

1.6.1	Polímeros Pluronic® P123.....	15
1.6.2	Polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP).....	16
1.7	Justificación.....	16
1.8	Hipótesis.....	17
1.9	Objetivos.....	17
1.9.1	Objetivo general.....	17
1.9.2	Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2. Metodología.....		19
2.1	Polímeros para el transporte de fármacos.....	19
2.1.1	Polímeros P123, P123/PVP y P123/PVP/PEG.....	19
2.1.2	Preparación de disoluciones stock de nanotransportadores.....	20
2.2	Aislamiento y cultivo de células mononucleares.....	22
2.2.1	Extracción sanguínea por punción venosa.....	22
2.2.2	Aislamiento de linfocitos y monocitos por gradiente de densidades.....	23
2.2.3	Gradiente de densidades por Ficoll-Histopaque®.....	23
2.2.4	Separación de monocitos de células mononucleares por adherencia.....	25
2.2.5	Sembrado y mantenimiento de células aisladas.....	26
2.3	Viabilidad, proliferación y toxicidad celular.....	27
2.3.1	Viabilidad celular.....	27
2.3.2	Estudio de viabilidad en cultivos primarios de sangre periférica humana por azul tripano.....	27
2.3.3	Estudio de citotoxicidad en cultivos primarios de sangre periférica humana por ensayo MTT: proliferación y actividad metabólica celular.....	29

Capítulo 3. Resultados.....	34
3.1 Ensayos de toxicidad.....	34
3.1.1 Cuantificación de la viabilidad celular con la tinción de exclusión vital con azul tripano.....	34
3.1.2 Citotoxicidad celular y actividad metabólica por ensayo MTT.....	38
Capítulo 4. Discusión.....	44
Capítulo 5. Conclusiones.....	50
Literatura citada.....	52
Anexos.....	57
Literatura sugerida.....	83

Lista de figuras

1. Esquema de distribución de las barreras biológicas	1
2. Área superficial de una nanopartícula.....	2
3. Formación de una corona sobre una nanopartícula.....	5
4. Interacción de una nanopartícula con una célula.....	7
5. Clasificación y subdivisiones de las células del sistema inmune.....	9
6. Granulocitos y agranulocitos.....	10
7. Apariencia física de las muestras de nanopolímeros P1, P2 y P3.....	13
8. Estructura química del polímero Pluronic® P123.....	14
9. Micrografía de HRTEM de los nanopolímeros P1, P2 y P3.....	19
10. Proceso de dilución de las concentraciones de polímeros P1, P2 y P3.....	20
11. Proceso de colocación de la muestras de sangre sobre Ficoll-Histopaque®.....	24
12. Separación de células de sangre periférica humana por gradiente de densidades.....	25
13. Ejemplificación de la distribución del ensayo de citotoxicidad.....	28
14. Ejemplificación del resultado de un ensayo al usar el reactivo MTT.....	30
15. Fotografía de la separación de células en sangre por gradiente de densidades.....	31
16. Fotografía tomada para la ejemplificación de la distribución realizada en el ensayo MTT.....	32
17. Fotografía de los ensayos realizados por triplicado.....	33
18. Gráfica de resultados del ensayo con azul tripano para P1.....	34
19. Gráfica de resultados del ensayo con azul tripano para P2.....	35
20. Gráfica de resultados del ensayo con azul tripano para P3.....	36
21. Gráfica comparativa del ensayo con azul tripano para P1, P2 y P3 en linfocitos.....	36
22. Gráfica comparativa del ensayo con azul tripano para P1, P2 y P3 en monocitos.....	37
23. Gráfica de viabilidad celular general del ensayo con azul tripano.....	37

24. Gráfica de resultados del ensayo MTT por triplicado para P1.....	39
25. Gráfica de resultados del ensayo MTT por triplicado para P2.....	39
26. Gráfica de resultados del ensayo MTT por triplicado para P3.....	40
27. Gráfica comparativa del ensayo MTT para P1, P2 y P3 en linfocitos.....	41
28. Gráfica comparativa del ensayo MTT para P1, P2 y P3 en monocitos.....	41
29. Gráfica de viabilidad celular general del ensayo con MTT... ..	42
30. Micrografía de los residuos de formazán de uno de los pozos del ensayo	43
31. Conteo celular por azul tripano.....	57
32. Representación del promedio de células y totales.....	59
33. Células totales por pozo en la placa de 96 pocillos.....	60
34. Porcentaje de viabilidad por pozo en la placa de 96 pocillos.....	61

Lista de tablas

1. Preparación de las concentraciones a evaluar de cada una de las muestras.....	21
2. Lista de concentraciones a evaluar.....	21
3. Criterios de inclusión para donadores de sangre.....	22
4. Desviación estándar para los valores de viabilidad con azul tripano.....	62
5. Conjunto de valores de viabilidad celular general.....	63
6. Planteamiento del análisis estadístico.....	64
7. Distribución de valores para ANOVA de dos factores.....	64
8. Suma de cuadrados para determinar el valor de la varianza.....	65
9. Resultado estadístico Fratio.....	65
10. Resultado concluyente del análisis estadístico.....	66
11. Valores de densidad óptica para la muestra de sangre del individuo 1 analizada en ELISA.....	67
12. Distribución ordenada de datos correspondientes a densidad óptica registrada (1).....	68
13. Distribución ordenada de datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada (1)..	69
14. Distribución del contenido en la placa de 96 pocillos (1).....	70
15. Valores de densidad óptica para la muestra de sangre del individuo 2 analizada en ELISA.....	71
16. Distribución ordenada de datos correspondientes a densidad óptica registrada (2).....	72
17. Distribución ordenada de datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada (2)..	73
18. Distribución del contenido en la placa de 96 pocillos (2).....	74
19. Valores de densidad óptica para la muestra de sangre del individuo 3 analizada en ELISA.....	75
20. Distribución ordenada de datos correspondientes a densidad óptica registrada (3).....	76
21. Distribución ordenada de datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada (3)..	77
22. Distribución del contenido en la placa de 96 pocillos (3).....	78

23. Datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada para los resultados promediados del ensayo por triplicado representados en densidad óptica.....	79
24. Datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada para los resultados promediados del ensayo por triplicado.....	80
25. Estructura general de los datos del ensayo por triplicado MTT representado por los valores de densidad óptica obtenidos del equipo ELISA.....	81
26. Estructura general de los datos del ensayo por triplicado MTT representado por los valores de viabilidad celular.....	82

Capítulo 1. Introducción

El cáncer, entre otros padecimientos, es actualmente una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial. En 2018, según los últimos datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2015 se le atribuyó un aproximado de 8,8 millones de defunciones a los distintos tipos de cáncer conocidos. Esta alta incidencia de mortalidad se asocia con la falta de atención o diagnóstico temprano y la deficiente especificidad de los tratamientos convencionales, siendo este último como uno de los puntos potenciales de investigación y aplicación de la nanotecnología.

Los sistemas poliméricos a pequeña escala son una herramienta para solucionar la falta de especificidad de los fármacos comunes. En un sistema convencional, el fármaco actúa alcanzando un valor máximo de liberación en contacto con el ambiente biológico y después su efectividad disminuye (Sáez et al., 2004). Además, en ocasiones parte del medicamento se elimina antes de ejercer su efecto. A este mecanismo se le conoce como metabolismo de primer paso (Ver **figura 1**), así cuando atraviesan la pared intestinal o el hígado, los fármacos se metabolizan antes de llegar a circulación sistémica (Shakya et al., 2018). El viaje desde su sitio de administración por vía oral puede enfrentar disolución, permeación, transporte activo, flujo de salida activo y el antes mencionado, metabolismo de primer paso (Grumezescu, 2017). Este último ocurre en el hígado y es aquí donde la mayoría de los fármacos son metabolizados y pierden un alto grado de proporción disminuyendo su biodisponibilidad. El estómago por un lado puede retrasar la acción del fármaco y el paso por el intestino puede resultar en absorción de éste mientras que en sangre puede enfrentarse a degradación enzimática, en el riñón excreción o eliminación y ser limitado a la exposición del tejido cerebral por el transporte de eflujo en la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés). De esta manera, un sistema polimérico puede corregir estas deficiencias siendo capaz de liberar el fármaco de manera gradual en el entorno biológico requerido y protegerlo en su trayecto no solo de este sino de otras barreras biológicas.

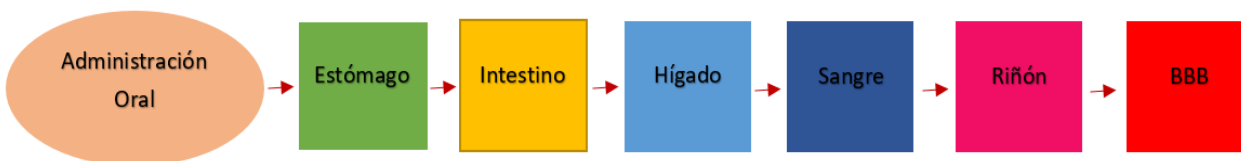


Figura 1: Esquema de distribución de las barreras biológicas que enfrenta un fármaco al ser introducido de manera oral (Grumezescu, 2017).

Como parte del desarrollo de nanomateriales, estos pueden variar sus características dependiendo del método de síntesis (Urrejola et al., 2018), de tal manera que también los polímeros a nanoescala se pueden modificar de forma que adquieran nuevas propiedades fisicoquímicas e incluso se pueden combinar entre ellos para generar estructuras con nuevas características. De esta forma, se pueden generar polímeros inteligentes que respondan a estímulos como cambios de temperatura, pH, incidiendo alguna determinada longitud de onda, entre otros parámetros. Debido a esto, el sistema al detectar variaciones en el ambiente cambia su conformación, lo que produce la liberación del contenido. Entre los sistemas poliméricos de administración de fármacos tenemos a los nanotransportadores. Los nanotransportadores son un tipo específico de sistema de administración cuyas ventajas han sido atribuidas al tamaño (ver **figura 2**) debido a que abarcan una mayor área superficial (Buzea, 2007), a su composición, estructura y capacidad de modificación. En este trabajo los polímeros evaluados están hechos a base de un copolímero tribloque conocido como Pluronic® P123 y una mezcla con polímeros de polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG).

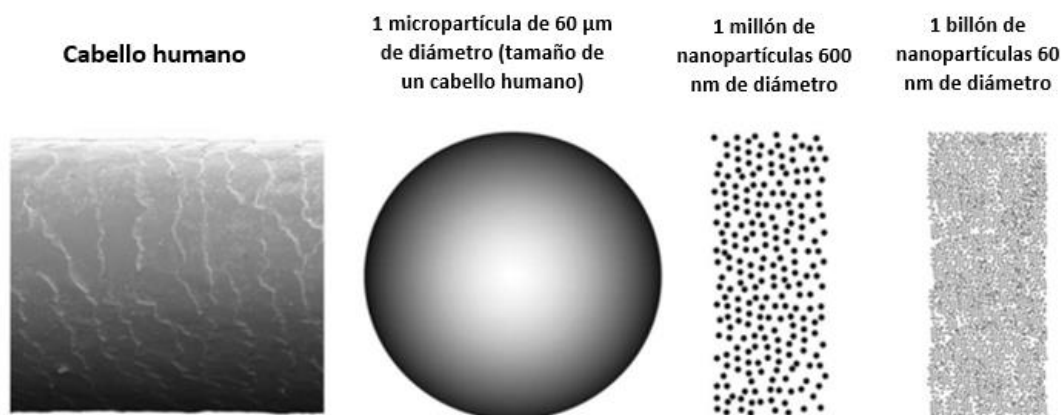


Figura 2: Ejemplificación de cómo una nanopartícula tiene una mayor área superficial y un alto número de partículas por unidad de masa en comparación con una micropartícula. De izquierda a derecha podemos observar una micropartícula de carbono con un diámetro de $60\ \mu\text{m}$ que tiene una masa de $0.3\ \mu\text{g}$ y una superficie de $0.01\ \text{mm}^2$. La misma masa de carbono en forma de nanopartículas, teniendo cada partícula un diámetro de $60\ \text{nm}$, tiene un área de superficie de $11.3\ \text{mm}^2$ y consta de un billón de nanopartículas (Buzea, 2007).

Pluronic® P123 es la marca comercial por la que se le conoce comúnmente un tipo de copolímero distribuido en bloques anfífilos que consiste en tribloques simétricos de polietilénóxido (PEO, hidrofílico) y polipropilénóxido (PPO, lipofílico), de estructura PEO-PPO-PEO. Debido a los grupos hidrofílicos que

poseen, estos polímeros pueden interactuar con membranas biológicas y pueden adoptar distintas formas cuando se dispersan en agua dependiendo de la proporción de los bloques en el polímero y su masa molecular relativa. Así mismo, la estructura química del polímero es la que determinará el proceso de vida desde la encapsulación del agente, transporte y liberación hasta su degradación. En el caso particular de los polímeros Pluronic® P123 el núcleo hidrofóbico es el que sirve como depósito del agente (Pasquali et al., 2005; Urrejola et al., 2018).

Debido a las potenciales aplicaciones biológicas de los nanotransportadores a base de polímeros, es necesario tener una eficiente biocompatibilidad para su aplicación *in vivo*. En ese sentido, la primera barrera de defensa del cuerpo humano está constituida por el sistema inmunológico, especialmente por células como linfocitos y monocitos que, de forma aislada, pueden contribuir identificando posibles efectos adversos al estar en contacto con estos agentes. La respuesta que se genere podrá demostrar si el agente produce o no un efecto citotóxico agudo y servirá como base para estudios posteriores.

La toxicidad es un parámetro que implica el conocer el efecto en el ambiente biológico frente a la introducción o contacto con cualquier agente externo. Este parámetro depende tanto de la dosis, tiempo de exposición, vía de administración, características fisicoquímicas del agente, así como las características del individuo (Kent, 1998). A pesar de que comparte el mismo fundamento, la toxicología a escala nanométrica adquiere su propio término (Nanotoxicología) debido a las diferencias de su estudio en estas dimensiones. La Nanotoxicología como disciplina permite conocer el efecto de todo aquel material a escala nanométrica que se introduce en el cuerpo. Debido a que el desarrollo de la nanotecnología es relativamente nuevo, es necesario que cada nuevo material esté acompañado de sus propios estudios toxicológicos para reducir riesgos y daños asociados a corto y largo plazo. Para esto, es fundamental considerar la estabilidad del material, su solubilidad, capacidad de aglomeración, su interacción con otras moléculas del microambiente y su degradabilidad (Hussain et al., 2015). Las características de los nanomateriales y sus propiedades finales se obtienen dependiendo del proceso de síntesis y parámetros iniciales, uno de ellos, la proporción de cada polímero en nanotransportadores resultado de mezclas poliméricas. Por tales motivos, cada nanomaterial que sea objeto de aplicaciones biológicas debe tener una evaluación toxicológica asociada que sirva como antecedente.

Durante este trabajo se estudiará la biocompatibilidad de tres nanopolímeros realizando ensayos celulares con cultivos primarios de sangre periférica humana. Se determinará la viabilidad celular en cultivos de células mononucleares humanas las cuales se expondrán a tres diferentes concentraciones de una solución

con los nanotransportadores realizando el estudio con el fin de comparar, analizar y reportar una base de información sustancial para su potencial aplicación como polímeros inteligentes.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Fundamentos de Nanotoxicología

Debido al desarrollo y gran interés de la nanotecnología y nanociencia a principios del siglo XXI. Según reportan Hulla et al., en Estados Unidos el concepto de Feynman sobre la manipulación de la materia a nivel atómico desempeñó un papel importante en la legislación convirtiendo la investigación en nanotecnología en una prioridad nacional y creó la Iniciativa Nacional de Tecnología (NNI). Así mismo, debido a la extensa exposición humana a las nanopartículas surgieron disciplinas como la nanomedicina y la nanotoxicología (Hulla et al., 2015). La nanotoxicología por una parte estudia los efectos adversos que se puedan producir en la salud por efecto de la interacción con nanopartículas. La NNI implementó en su momento la idea de que las técnicas conocidas para la evaluación de medicamentos o productos tóxicos de la industria química o farmacéutica lograrían describir la toxicidad de nanomateriales. Sin embargo, esto no ocurrió así. Walker y Bucher en 2009 describieron cuatro razones principales por las que la toxicología a escala nanométrica debía considerarse de manera diferente; (a) surgen nuevas rutas de exposición cuando el nanomaterial es lo suficientemente pequeño como para filtrarse al interior de la célula, (b) una vez internalizadas, las propiedades de la superficie pueden tener gran impacto en la cinética y la biodistribución de materiales de tamaño y forma similares, lo que lleva a diferencias en la dosimetría de órganos diana, (c) las nuevas propiedades que hacen que los nanomateriales sean atractivos para aplicaciones comerciales podrían dar lugar a nuevas interacciones biológicas que conducen a una toxicidad imprevista y, (d) para algunos nanomateriales, la "dosis" puede escalar en función de una propiedad dependiente del tamaño, como el área superficial. Por lo tanto, las evaluaciones del riesgo relativo pueden conducir a afirmaciones erróneas cuando se basan en las dosis (Walker y Bucher, 2009; Hulla et al., 2015).

La toxicidad asociada a una nanopartícula puede deberse a cinco factores principalmente; (a) el tamaño, entre más pequeña sea una partícula mayor será la toxicidad asociada y su captación celular, (b) la carga superficial, una carga superficial mayormente positiva de los nanomateriales se asocia a una mayor toxicidad, (c) revestimiento superficial, es conocido que induce una respuesta celular, (d) la composición y (e) la morfología, la figura o estructura física influye directamente a una mayor o menor citotoxicidad e

internalización celular (Blanco et al., 2015). Como se explicó anteriormente, el tamaño de una partícula influye en el área superficial, cuanto menor es el diámetro, más aumenta la relación superficie/volumen, este efecto se asocia principalmente con la unión de proteínas y moléculas presentes en el ambiente biológico alrededor de su superficie, al resultado de la capa formada se le conoce como "corona" (ver **figura 3**), esta propiedad es especialmente importante ya que no es solo la composición del nanomaterial sino la "corona" lo que define principalmente su comportamiento en el ambiente biológico (Elsaesser y Howard, 2012).

Además de los factores mencionados, la ruta de exposición y la exposición misma en el organismo son determinantes para la toxicidad asociada. La evaluación a la exposición de un agente describe como cierta cantidad de sustancia entra en contacto con un organismo. La exposición ocurre una vez que la sustancia o agente se dispersa en el microambiente y el nivel de exposición a este depende de la concentración de la sustancia, su biodisponibilidad, probabilidad y duración del contacto, entre otros factores.

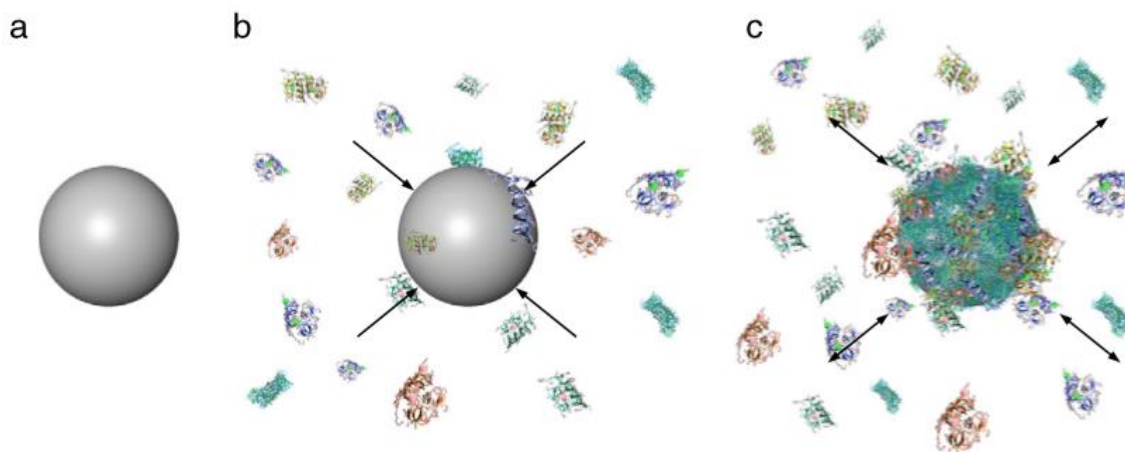


Figura 3: Formación de una "corona" sobre la superficie de una nanopartícula. a) Partícula no cubierta. b) Partícula en contacto con proteínas. c) Formación de la corona. La corona formada puede estar fuertemente enlazada con la superficie de la nanopartícula o interactuar débilmente formando una capa de equilibrio alrededor (Elsaesser y Howard, 2012).

1.2 Respuesta biológica a nanomateriales

Al principio, el uso de nanomateriales solo era de interés como portadores en aplicaciones biológicas creyendo que su participación se relacionaba únicamente de manera pasiva. Posteriormente se descubrió que estas nanopartículas participaban activamente en las funciones moleculares esenciales para las

regulaciones celulares. Actualmente se sabe que comportamientos celulares como el apego, propagación, proliferación, señalización celular y la diferenciación están relacionados a una respuesta dependiente de interacciones entre los nanomateriales y las células (Liu y Tang, 2017).

1.2.1 Interacción con la membrana celular

Como se mencionó previamente, existe un marco de barreras biológicas para la administración de fármacos a través de nanopartículas. Además de una administración oral, durante una administración intravenosa las nanopartículas también pueden toparse con una serie de obstáculos en su trayecto que impiden la entrega eficaz y específica. Para que los nanotransportadores puedan llevar el fármaco a su destino, dependen de la captación celular o endocitosis para poder atravesar el epitelio o endotelio y este proceso está fuertemente relacionado a la adsorción de proteínas alrededor del nanomaterial (Reinholz et. al., 2018). Las nanopartículas son marcadas por el sistema inmune para su eliminación y captadas por los macrófagos para su degradación. Esto da como resultado una alta acumulación de nanopartículas en órganos, como el bazo y el hígado, lo que contribuye a una distribución inespecífica en órganos sanos. De tal forma, cuando una célula está expuesta a un agente tóxico éste puede llegar a producir que muera ya sea por alguno de los mecanismos de muerte celular conocidos (necrosis, autofagia o apoptosis), pero también puede ocurrir que alguna estructura celular resulte dañada o de alguna manera alterada a consecuencia del agente con el que se tuvo el contacto (Elsaesser y Howard, 2012).

El diseño de una partícula también debe considerar su interacción con la membrana celular. Una membrana es permeable y selectiva a ciertas moléculas que deben entrar y salir de ella para realizar funciones específicas. Este sistema está muy bien regulado por las funciones celulares, sin embargo, la estabilidad de la membrana (ver **figura 4**) puede verse afectada al interactuar de manera directa con la partícula. Se ha demostrado científicamente que la integridad de la membrana celular y su estabilidad pueden verse afectadas y presentar daños generados por nanomateriales produciendo agujeros a escala nanométrica en la membrana (Elsaesser y Howard, 2012).

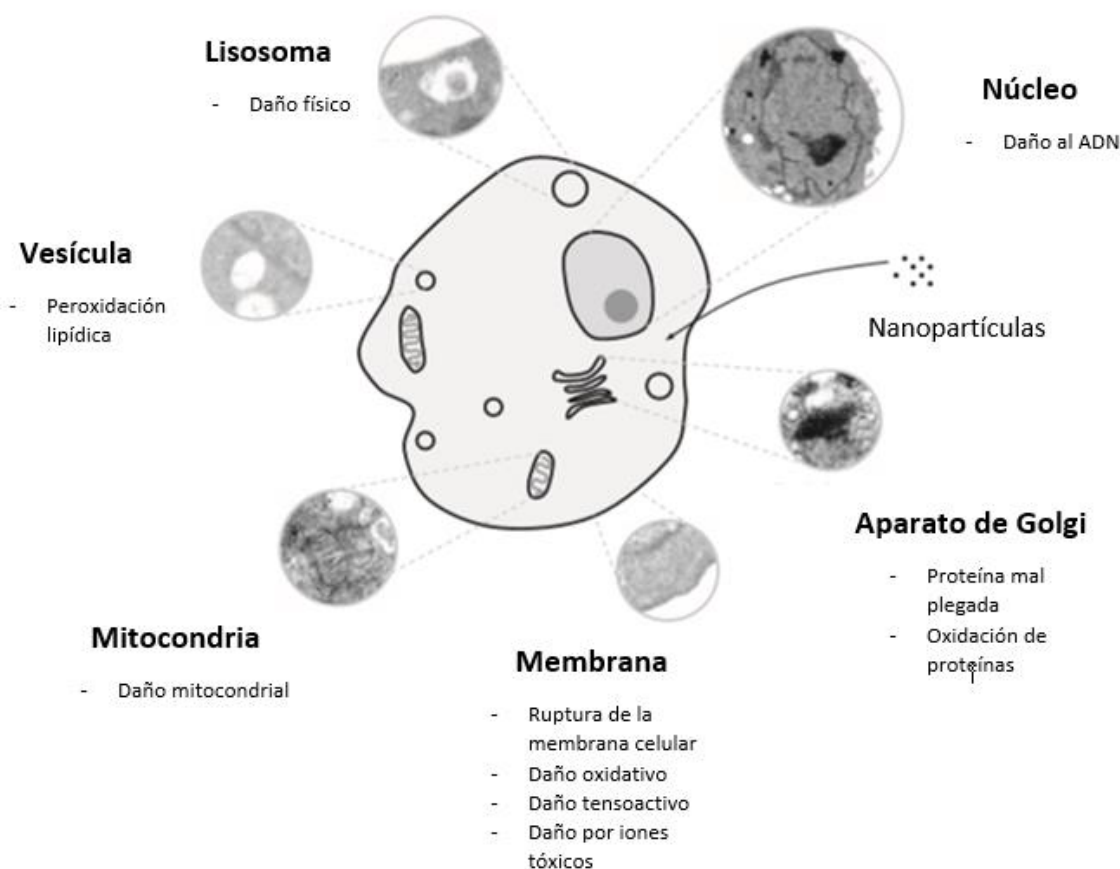


Figura 4. Objetivos intracelulares y mecanismos nanotoxicológicos resultantes de la interacción de una nanopartícula con una célula. (Elsaesser y Howard, 2012).

1.2.2 Citotoxicidad y muerte celular

La citotoxicidad se puede definirse como la capacidad de una sustancia o proceso que resulta en daño o muerte celular (Eldridge, 2020). Las investigaciones sobre citotoxicidad iniciaron como un esfuerzo por comprender porque existía un rechazo al injerto. Alrededor de los años 50's se realizaron las primeras investigaciones las cuales no mostraron indicios de citotoxicidad posiblemente a que se realizaron en tejidos separados de donantes en lugar de células aisladas. Fue hasta la década de los años 60's que se había demostrado cualitativamente que las células sensibilizadas del sistema inmune podían lisar a células diana (también llamadas células blanco o target en inglés) *in vitro*. Estudios posteriores demostraron que las células T producían un efecto citotóxico y no necesariamente estas mataban a las células, sino que la inducían en las células diana bajo su propia maquinaria por medio de señalización (Golstein y Griffiths, 2018).

Entre los procesos de muerte celular, la apoptosis por un lado es la forma más común y es un proceso programado de manera natural por las células, pero aun así puede desencadenarse por diversos estímulos. Por otra parte, la necrosis es un tipo de muerte celular catastrófico, esto es porque este tipo de muerte no es mediado por la acción regulada de enzimas, que en la apoptosis son las encargadas de llevar a cabo el proceso, a estas enzimas se le conocen como caspasas (Zhang et al., 2013). La autofagia en cambio, es un proceso de autodegradación el cual se genera para eliminar aberraciones intracelulares o patógenos encapsulándolos en vesículas y se relaciona a un tipo de muerte celular no apoptótica, su activación promueve la presencia de antígenos en la membrana celular (Glick et al., 2010).

1.2.3 Células del sistema inmune

El sistema inmune es conocido como una línea coordinada de células y moléculas en el cuerpo humano que actúan como respuesta a sustancias y agentes ajenos a su entorno natural, de esta manera la función principal es elaborar una red de protección en el cuerpo. Existen dos tipos de respuesta inmune conocidas como respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa, siendo la respuesta innata la primera línea de defensa ya que actúa de manera rápida eliminando agentes infecciosos mediante macrófagos y neutrófilos. Por otra parte, la respuesta inmune adaptativa actúa cuando la respuesta inmune innata es insuficiente. Este tipo de respuesta es más lenta, pero a la vez resulta más específica ya que se encarga de generar un sistema de reconocimiento, así una vez que el mismo patógeno ingrese se puede evitar una reinfección. Este tipo de respuesta está regulada por los linfocitos también conocidos como células T, células B y Natural Killers (NK) (Sollome y Fry, 2015).

Como se puede observar en la **figura 5**, las células madre dan origen a una célula bi-potencial capaz de producir los glóbulos blancos, de tal forma que puede diferenciarse en linfocitos (ya sean T, B o NK) y monocitos que a su vez se pueden subdividir en células dendríticas o macrófagos. Por otra parte, estas células precursoras pueden dar origen a neutrófilos, eosinófilos, basófilos, eritrocitos o mastocitos. Este último tipo de célula junto a eosinófilos y basófilos se relacionan principalmente a reacciones alérgicas y respuestas inflamatorias en el sistema inmune (Sompayrac, 2016).

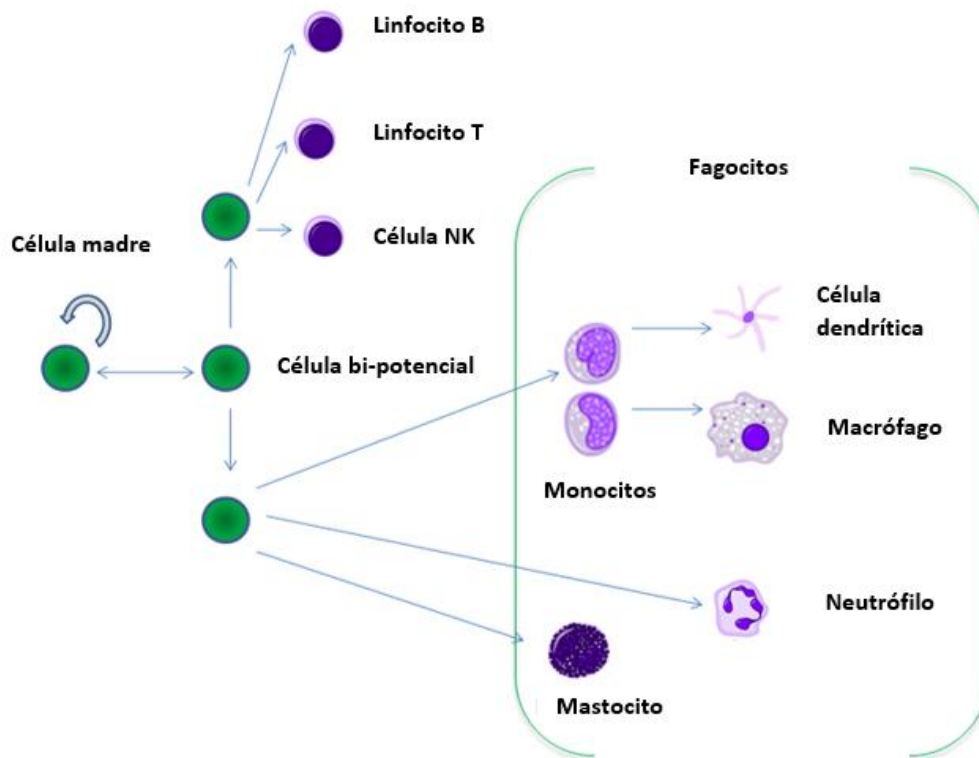


Figura 5: Divisiones y subdivisiones de las células del sistema inmune (Sompayrac, 2016). Imagen de Graham Colm, 2019 cuyo diseño se basa en la misma fuente consultada.

Los leucocitos o células leucocitarias que conforman al sistema inmune pueden clasificarse en cinco tipos principalmente (ver **figura 6**) donde cada una se caracteriza por funciones específicas y fenotipos únicos. Entre estos tipos de células, se pueden dividir en células que poseen o no gránulos en el citoplasma (lisosomas o vesículas). Las células con este contenido pueden ser neutrófilos, eosinófilos y basófilos y se conocen como granulocitos. Por un lado, los neutrófilos son los leucocitos más abundantes y los primeros en responder a una infección y son parte del sistema inmune innato mientras que los eosinófilos pertenecen a ambos sistemas siendo regularmente respuesta reacciones alérgicas. Los basófilos contribuyen a menos del 1% del total de granulocitos en circulación y una al igual que los eosinófilos, una vez madurados en la medula ósea migran al tejido donde realizarán su función, en este caso responsables de los efectos como hinchazón, enrojecimiento e inflamación. Por otra parte, los agranulocitos o células que carecen de estas estructuras en el citoplasma se les conocen como linfocitos y monocitos (Sollome y Fry, 2015).

Los monocitos representan del 3 a 7% de glóbulos blancos (de 1.5×10^8 a 7×10^8 por litro de sangre) en un adulto sano (Zhou et al., 2012). Estas células tienen dos funciones principales, reponer células dendríticas (encargadas de iniciar la respuesta inmune adaptativa) y macrófagos en tejidos periféricos que se encuentren en condiciones normales y realizar un monitoreo a través del endotelio a tejidos sanos. Durante una respuesta inflamatoria actúan fagocitando los agentes extraños y generan una rápida respuesta inmune reclutando otras células leucocitarias (Zhou et al., 2012). Por otra parte, los linfocitos poseen una mayor especificidad ya que al ser parte del sistema inmune adaptativo contribuyen a generar una herramienta de memoria que ayuda a que el sistema inmune tenga una respuesta aún más rápida y efectiva una vez que este agente vuelve a ingresar a circulación (Sollome y Fry, 2015).

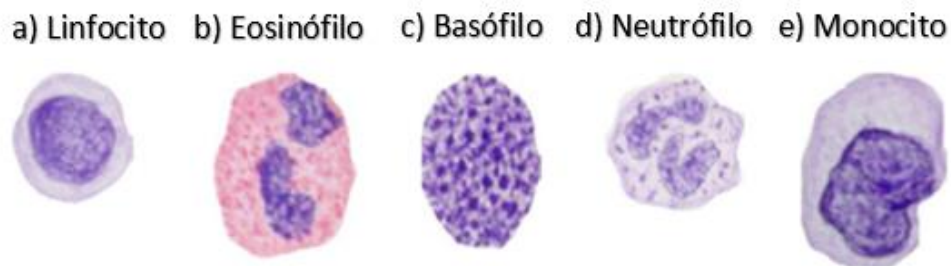


Figura 6: Tipos de leucocitos presentes en la sangre. Agranulocitos; a) y e) y granulocitos; b), c) y d) (Sollome y Fry, 2015).

Como se mencionó previamente, los linfocitos se dividen en tres clases de células; Células T, Células B y NK (Natural Killers). En primer lugar, las células T no reconocen directamente a los agentes patógenos o infecciosos, necesitan ser mostrados parcialmente por las células dendríticas del sistema inmune innato que le presentan los antígenos a las células T y así iniciando la respuesta del sistema inmune adaptativo. La activación genera una expresión de reconocimiento del antígeno en las células T y una vez que estas células son activadas se produce una diferenciación en células T citotóxicas y células T auxiliares, mientras que las primeras migran al lugar de acción contra el agente patógeno o externo, las células T auxiliares permanecen en el sistema linfático ayudando a las células B a responder a los antígenos. Las células B son células presentadoras de anticuerpos, las células T producen una expresión de citocinas llamadas linfocinas (mensajeros químicos) que generan una expresión de reconocimiento al antígeno en las células B activándolas, una vez que se activan generan una respuesta de anticuerpos que reconocen y recubren al antígeno para ser fagocitado y eliminado del cuerpo (Schultz y Grieder, 1987; Zhou et al., 2012).

Dado que las células T citotóxicas reconocerán a las células que estén infectadas o contengan el antígeno y las eliminarán impidiendo que el agente infeccioso se propague, las células NK tienen una función similar, pero a diferencia de las células T o B, estas se clasifican como parte del sistema inmune innato ya que carecen de receptores específicos de antígenos. Sin embargo, se sabe que producen la expresión de una alta cantidad de citocinas ocasionando una temprana respuesta inmune contra infecciones virales o células tumorales (Schultz y Grieder, 1987).

1.3 Estudios toxicológicos con células del sistema inmune

1.3.1 Cultivo células mononucleares

Trabajar con células de sangre periférica humana, principalmente con linfocitos y monocitos, es indispensable en diagnósticos en inmunología y su campo en la investigación. Su uso en el ámbito científico ayuda a entender el comportamiento de enfermedades y sirve como pauta para generar tratamientos. De esta manera, ya sea que se extraigan y aislen dichas células al momento de trabajar con ellas o hayan sido criopreservadas, el cultivo celular de células mononucleares son una herramienta importante cuando de realizar pruebas de citotoxicidad se trata (Riedhammer et al., 2014). Antes de analizar o trabajar con nanopartículas sobre líneas celulares, observar la respuesta de las células del sistema inmune es la manera de identificar que el material no genere una respuesta inmune que lo rechace en primera instancia. Así mismo, la respuesta que se observe en el cultivo celular debido al estímulo debe estar sujeta a un marco de referencia. Los controles positivos y negativos aportan esta información. Por una parte, el control positivo recibe algún estímulo cuya respuesta celular sea conocida mientras que, un control negativo presenta las condiciones normales dentro de un cultivo celular, es decir, sin ningún tipo de estímulo.

1.3.2 Viabilidad, proliferación y toxicidad celular

La viabilidad celular es definida como la cuantificación del número de células vivas y generalmente se expresa como un porcentaje respecto de un control, donde las células no han sido estimuladas con el material a evaluar. Los ensayos de viabilidad son importantes para estimar la citotoxicidad de las nanopartículas (Fang y Trewyn, 2012). Por otra parte, la proliferación celular es el aumento de células

resultantes de la división celular y es un proceso complejo, controlado y bien definido (Yang et. al, 2014). La producción de citocinas, que son proteínas que regulan las funciones de las células que las producen, se observaría en una respuesta normal después de 24 horas, que el número de Interleucina-2 (un tipo de citocina), aumenta considerablemente sirviendo como factor de crecimiento para los linfocitos T, los cuales generan las subdivisiones mencionadas anteriormente (Katial et al., 1998). Por otra parte, produce que los linfocitos B proliferen, eso ocurre si el linfocito B ha adquirido un antígeno correspondiente de manera que crece duplicando su tamaño y dividiéndose en dos células hijas. Este proceso de crecimiento y división celular en linfocitos B tiene una duración de 12 horas (Sompayrac, 2016). Por otro lado, los factores estimulantes en monocitos se conocen como M-CSF y GM-CSF e impulsan el desarrollo, diferenciación y proliferación en monocitos/macrófagos junto a la Interleucina-4 (IL-4), normalmente llevándose a cabo a partir de 24 a 48 horas (Italiani y Boraschi, 2014; Coillard y Segura, 2019).

1.4 Sistemas poliméricos para aplicaciones biológicas y su toxicidad asociada

1.4.1 Sistemas de liberación de fármacos

La administración controlada de fármacos por nanopolímeros ocurre cuando un polímero a nanoescala, natural o sintético, se combina con un agente activo, los cuales uno o más de ellos están covalentemente unidos a un grupo funcional o extremo del polímero directamente o a través de un espaciador. Ya sea un fármaco o alguna molécula bioactiva, éste agente se libera bajo un sistema de control prediseñado. La liberación de un agente farmacológico puede ser constante o cíclica por un periodo de tiempo prolongado, que puede ser provocado por su ambiente u otros eventos externos. En cualquiera de los casos, el propósito de estos es lograr librar las barreras biológicas de manera que el fármaco logre llegar a su objetivo de la forma más óptima posible (Wadhwa y Mumper, 2015).

Los diseños de estos sistemas de liberación se fundamentan en; la selección del agente farmacológico; selección del polímero y selección del sistema de entrega, así como sus características fisicoquímicas; la interacción entre ellos y el microambiente y; su aplicación final. Esto comprende la ideología base de la creación de un nanotransportador. En años recientes, la formulación de estos sistemas se ha vuelto aún más sofisticada llegando a comprender el término de sistemas inteligentes debido a que tienen una respuesta a estímulos y cambios en el entorno biológico.

1.4.2 Sistema de liberación con polímeros Pluronic® P123

En el trabajo de investigación de Arrollo (2017) se reportó la obtención de muestras (ver **figura 7**) de un sistema de liberación prolongada de fármacos por medio de nanopartículas poliméricas de base Pluronic® P123 mezclados con polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol probados *in vitro*, en condiciones que simulan piel, con diferentes ingredientes activos farmacéuticos como 5-fluoracilo (5-FU) e Imiquimod (agentes utilizados para el tratamiento del cáncer).

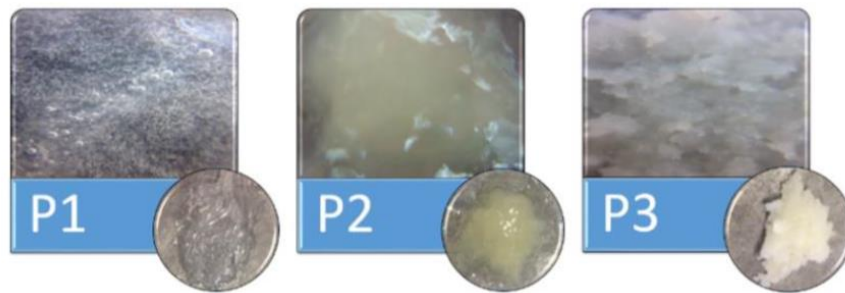


Figura 7: Apariencia de las muestras poliméricas obtenidas P1, P2 y P3 con coloraciones representativas de un gel transparente, apariencia ambarina y un gel blanco respectivamente (Arrollo, 2017).

Entre los resultados se presenta un sistema de liberación más sostenida y se muestra una estabilidad sobresaliente con lo que respecta a las pruebas de potencial Zeta realizadas obteniéndose valores mayores a -30 mV. Estos resultados indican estabilidad ya que valores de potencial Zeta de cero significa que las nanopartículas tienden a aglomerarse. Se demostró además que son componentes biológicamente no perjudiciales en las pruebas primarias de bioensayos realizados. Por otra parte, los nanopolímeros no cargados presentaron valores de potencial Zeta inferiores a -5 mV (cerca de 0).

1.4.3 Polímeros Pluronic® P123 (P123)

Los copolímeros Pluronic® P123 (P123) tienen un alto campo de investigación como liberadores de fármacos. Su composición tribloque de PEO₂₀- PPO₆₈- PEO₂₀ (ver **figura 8**) de carácter anfifílico a lo largo de la estructura permite utilizar estrategias de funcionalización con PEG o PVP que, en este caso se asocia con la sección hidrofílica del copolímero. Características como rigidez, longitud y proporción de los bloques a lo largo de la cadena polimérica controlan el tipo de ensamblaje que formará el nanotransportador y

junto al segmento hidrofílico contribuye al control de la biodistribución y el tiempo de circulación que tendrá (Santa et. al., 2013). Así mismo, las propiedades mencionadas en conjunto con los segmentos hidrofóbicos contribuirán a la encapsulación o liberación del fármaco (Santa y López Osorio, 2013; Zhao y Zhang, 2017).

El uso en conjunto con polímeros como PVP o PEG tiene una función de camuflaje lo cual impide que el nanotransportador sea reconocido por macrófagos y posteriormente fagocitado. Esto se debe a las características no-iónicas que posee de tal manera que evita ser marcado por ciertas proteínas que impulsarían su degradación y aunado a un peso molecular determinado y su capacidad hidrosoluble adquiere un mayor tiempo de vida en circulación sistémica propiciando que llegue al sitio de acción requerida (Santa & López Osorio, 2013).

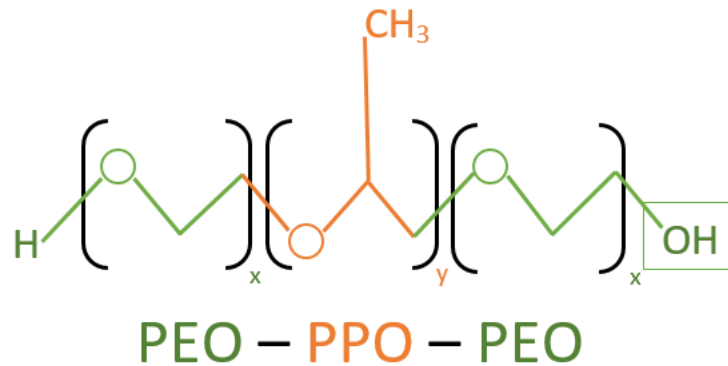


Figura 8: Estructura química del polímero Pluronic® P123 compuesto por tribloques de óxido de polietileno – óxido de propileno – óxido de polietileno (PEO-PPO-PEO).

1.5 Nanotoxicología en la actualidad

Con el impacto de la nanotecnología en la biomedicina se ha hecho cada vez más necesario realizar estudios de toxicidad asociados a las nanopartículas. Actualmente, una de las herramientas más utilizadas para el estudio de toxicidad de nanopartículas antes de su aplicación *in vivo*, son sus estudios en cultivos celulares (*in vitro*). Una de las preguntas se plantea en el área de la toxicología, que esta subdisciplina busca responder, es "¿por qué las nanopartículas pueden ser inherentemente más tóxicas que las sustancias que las componen?". El rápido crecimiento de los productos a nanoescala requiere de una amplia investigación y para ello se han propuesto una variedad de técnicas que ayuden a estudiar sus efectos. Así mismo existen agencias reguladoras como la Administración de Medicamentos y Alimentos de

los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea de Medicamentos que actualmente están familiarizadas con la incorporación de la nanotecnología en productos farmacéuticos y dispositivos médicos, así también, la evaluación de seguridad para cada producto que contiene nanomateriales se realiza caso por caso y, en general, se piensa que las regulaciones actuales para medicamentos y dispositivos médicos son lo suficientemente competentes en su alcance para cubrir los riesgos teóricos asociados a nanomateriales (Hobson et. al, 2016).

1.6 Antecedentes toxicológicos y biológicos asociados a polímeros

1.6.1 Polímeros Pluronic® P123

En los años recientes, la formación de micelas a base de polímeros Pluronic® P123 con mezclas de otros polímeros ha resultado en una mejora en la termodinámica del sistema, así como la estabilidad cinética, tiempo de carga del fármaco, control del tamaño para prevenir precipitación, entre otros debido a la adición de otros bloques poliméricos en la estructura base que proporciona nuevas propiedades al sistema inicial. En este caso, el polímero base Pluronic® P123, es utilizado principalmente a que ha resultado tener actividad biológica significativa, entre sus características destacadas inhibe una proteína de exclusión de fármacos conocida como P-gp, que dificulta la distribución a zonas como el cerebro, intestino y tumores multiresistentes. Se ha reportado actividad antimetastásica resultado de la combinación con clorhidrato de doxorrubicina (DOX) que propone que este tipo de polímeros con balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés) moderado, tiene capacidad para inhibir la metástasis en cáncer de mama, por ende, se entiende que sea foco de estudio para este y otro tipo de tratamientos de cáncer (Zhao y Zhang, 2017).

Es de esperar que debido a las aplicaciones potenciales de este polímero se realicen estudios de biocompatibilidad y toxicidad de tal manera que su aplicación farmacológica no tenga resultados adversos perjudiciales. Bhattacharjee y colaboradores (2013) reportan un estudio de viabilidad celular de 5 líneas de cáncer diferentes donde se concluye que la presencia de micelas Pluronic® P123 indica citotoxicidad insignificante del copolímero a concentraciones menores de 5 mg/ml. Por otra parte Guan y colaboradores (2011) realizan un estudio toxicológico en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) bajo el ensayo MTT donde se reportó una viabilidad del 100% en una proporción del polímero en un 5%.

1.6.2 Polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP)

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter compuesto por unidades repetidas de etilenglicol [$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$], inicialmente utilizado para lubricante de dispositivos médicos, vehículo para aplicaciones dermatológicas, entre otras, revolucionó la investigación cuando se supo que podía actuar como medio de camuflaje escapando al sistema de defensa inmune de un huésped alrededor de los años 70's. Se le atribuyó un concepto conocido como PEGilación, el cual consiste en agregar cadenas de este polímero a otras estructuras base. A este polímero se le atribuye una alta flexibilidad en su estructura, cualidad anfifílica, una alta capacidad de hidratación y sin impedimentos estéricos. Se han demostrado ser inertes en ambientes biológicos generando respuestas inflamatorias insignificantes y baja captación, adhesión y activación celular, una característica ideal para un transportador de fármacos que además, se ha demostrado que dentro de esta aplicación aumenta la biodisponibilidad del fármaco y aumenta la focalización del transportador (D'souza y Shegokar, 2016). Por otra parte, la polivinilpirrolidona (PVP), también denominada povidona, es un polímero sintético obtenido por polimerización radical del monómero, N-vinilpirrolidona. Se ha demostrado ser inerte y no tóxico, resistente a la temperatura, biocompatible y biodegradable. Resulta ser un buen agente transportador de fármacos y se ha visto que su absorción, distribución, metabolismo y excreción se relaciona con el peso molecular del polímero, frecuencia y ruta de administración. Las vías de administración intravenosa e intraperitoneal de este polímero de alto peso molecular muestran almacenamiento en tejidos del sistema reticuloendotelial (RES) pero su aplicación biológica no ha mostrado reacciones adversas ni resultados toxicológicos crónicos ni subcrónicos (Kurakula y Rao, 2020).

1.7 Justificación

Tanto polímeros PVP como PEG han demostrado tener uso biológico favorable. Así mismo, la síntesis de copolímeros es la nueva dirección para aplicación de fármacos y que el agente activo tenga el mayor rendimiento posible. Con base en tal fundamento, se prepararon dos nuevos polímeros utilizando Pluronic® P123 como polímero base y dando como resultado dos nuevos materiales poliméricos. Así, todo nuevo material que pretende ser propuesto para aplicaciones biológicas debe ir asociado a un estudio toxicológico propio. En este sentido, el fin de los nanotransportadores a evaluar en este proyecto busca direccionar fármacos de una manera más eficiente en distintos tratamientos, entre ellos el cáncer. Por lo tanto, se plantea iniciar evaluando el efecto citotóxico de los nuevos nanotransportadores y el polímero

base donde, tomando en cuenta las características descritas sobre las células mononucleares, se infiere que el propósito de realizar los ensayos en sangre periférica humana sea a consecuencia de que las células en ella son la primera defensa con la que el agente introducido se enfrentará. Por ello se pondrán en contacto con cultivos primarios de células mononucleares aisladas de sangre periférica humana para evaluar si esta línea de defensa del sistema inmune genera algún tipo de respuesta adversa aguda. De esta manera obtendríamos información que nos indicará si estos materiales tienen una potencial aplicación biológica sin producir una reacción en primera instancia, es decir, al primero contacto con las células del sistema inmune y así poder establecer qué estudios posteriores son necesarios para concluir si el uso de estos materiales es realmente seguro.

1.8 Hipótesis

Los polímeros Pluronic® P123 individuales y preparaciones de Pluronic® P123 con PVP y PEG, no presentarán actividad citotóxica aguda significativa en células mononucleares de sangre periférica humana.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Evaluar la citotoxicidad de muestras de polímeros Pluronic® P123 individuales y preparaciones de Pluronic® P123 con PVP y PEG en cultivos primarios de sangre periférica humana.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Extraer y aislar células mononucleares de sangre periférica humana para realizar cultivos primarios de linfocitos y monocitos.

2. Cuantificación de la viabilidad celular mediante exclusión por azul tripano de las muestras celulares obtenidas expuestas a Pluronic® P123 y preparaciones con PVP y PEG en linfocitos y monocitos.
3. Evaluar la actividad metabólica por medio del ensayo MTT para determinar viabilidad y proliferación celular como respuesta al estímulo inducido por los materiales poliméricos.
4. Determinar el efecto citotóxico de las muestras de polímeros Pluronic® P123 y preparaciones con PVP y PEG en linfocitos y monocitos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Polímeros para el transporte de fármacos

Los polímeros base fueron originalmente proporcionados por Sigma-Aldrich® (pureza del 98% o superior); PEG promedio Mn 10,000 Da Número CAS 25322-68-3, P123 promedio Mn 5,800 Da Número CAS 9003-11-6 y PVP promedio Mn 40,000 Da Número CAS 9003-39-8 (Arroyo, 2017).

2.1.1 Polímeros P123, P123/PVP y P123/PVP/PEG

De la Tesis para obtener el grado de Doctorado en Ciencia e Ingeniería de Materiales de la Dra. Eurydice Arroyo, se reportaron nuevos materiales poliméricos para desarrollar un sistema de liberación prolongada de fármacos. Se prepararon copolímeros con PVP y PEG utilizando Pluronic® P123 como polímero base para formar sistemas de transporte y cuyos principios activos probados (Indometacina, 5-Flouracilo e Imiquimod) tenían efecto sobre cáncer de piel como carcinoma basocelular. De estos sistemas, dos de los que obtuvieron mejores resultados de liberación y P123 fueron evaluados; los polímeros P123 (nombrados como P1), una combinación de P1 con PVP (nombrados como P2) y, por último, el resultado anterior (P2) con PEG (nombrado como P3). Estos polímeros pasaron por un proceso de preparación para este estudio y se guardaron en tubos falcon de 50 ml, los cuales fueron mantenidos en condiciones de refrigeración a

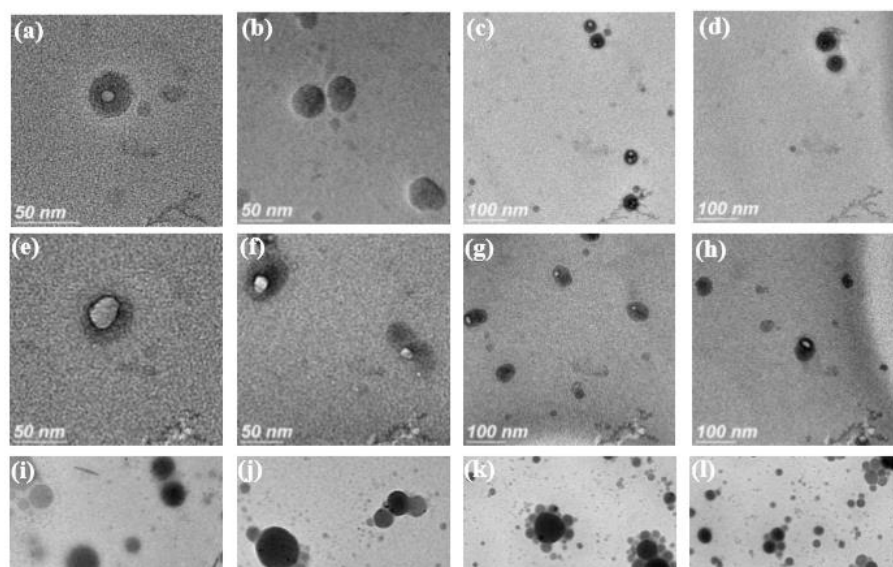


Figura 9: Micrografías de HRTEM a diferentes escalas donde podemos observar los sistemas de polímeros las muestras P1 (a-d), P2 (e-h) y P3 (i-l), (Arroyo, 2017).

12°C aproximadamente. Las micrografías (ver **figura 9**) que se obtuvieron de estos nanopolímeros presentan a P1 como partículas semiesféricas de <30 nm de diámetro, P2 como partículas semiesféricas un poco más irregulares, pero con un tamaño de <50 nm de diámetro y P3 nuevamente similitud en la morfología semiesférica con P1, pero con irregularidad en los tamaños mayormente con diámetros <100 nm.

2.1.2 Preparación de disoluciones stock de nanotransportadores

Se preparó una disolución stock (también conocida como solución madre) de cada nanomaterial en agua destilada. A partir de ahí se prepararon diluciones para obtener las concentraciones de cada muestra (ver **tabla 1**). Una vez suspendidas en agua se agitaron cerca de 2 horas para homogeneizar la muestra en un Vortex de laboratorio marca Scientific industries, modelo Vortex-genie 2.

Posteriormente, del volumen total se retiraron 10 μ l de cada muestra y se diluyeron con 90 μ l de agua destilada para obtener una concentración de 10 mg/ml. Este último paso se repitió tomando nuevamente 10 μ l de cada tubo (ya diluido a 10 mg/ml) + 90 μ l de agua para obtener la tercera concentración a evaluar (1 mg/ml). Las diluciones de las muestras se ejemplifican en la **figura 10**.

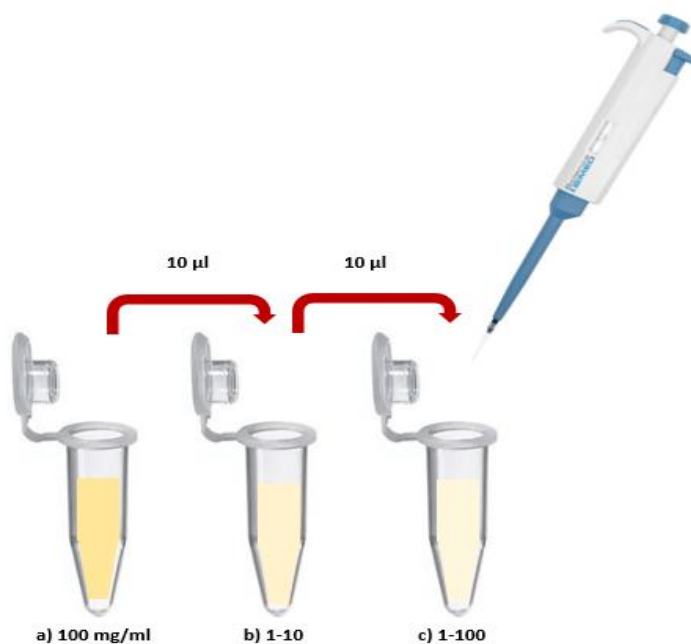


Figura 10. Esquemización de las diluciones con nanopolímeros partiendo de 100 mg/ml (a), diluyendo 1 a 10 (b) y 1 a 100 (c).

Tabla 1. Preparación de las concentraciones a evaluar de cada una de las muestras

Muestra	C1 [100 mg/ml]	C2 [10 mg/ml]	C3 [1 mg/ml]
P1	76.75 mg P1 + 767.5 μ l H ₂ O	10 μ l C1 + 90 μ l H ₂ O	10 μ l C2 + 90 μ l H ₂ O
P2	100 mg P2 + 1000 μ l H ₂ O	10 μ l C1 + 90 μ l H ₂ O	10 μ l C2 + 90 μ l H ₂ O
P3	79.75 mg P3 + 797.5 μ l H ₂ O	10 μ l C1 + 90 μ l H ₂ O	10 μ l C2 + 90 μ l H ₂ O

Cada muestra se trabajó en tubos eppendorf individuales de 2 ml y se transfirieron las cantidades con micropipetas de 10 μ l y 200 μ l resuspendiendo el volumen final para homogeneizar las muestras. El número de muestras a evaluar fue de un total de 9 (ver **tabla 2**) procedente a las tres concentraciones de cada uno de los tres polímeros.

Tabla 2. Resumen del número final de muestras y sus respectivas concentraciones.

Muestra	Concentración [mg/ml]	Polímero
M1	100	P1
M2	100	P2
M3	100	P3
M4	10	P1
M5	10	P2
M6	10	P3
M7	1	P1
M8	1	P2
M9	1	P3

2.2 Aislamiento y cultivo de células mononucleares

2.2.1 Extracción sanguínea por punción venosa

Se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa de un donante sano previo consentimiento informado. Los criterios de inclusión se resumen en la **tabla 3**.

Tabla 3. Características de inclusión para donantes de sangre.

Criterios considerados de inclusión:
Entre 20 y 45 años de edad
Hombres, no mujeres para evitar alteraciones de la respuesta celular por cambios hormonales
No fumadores
Que no hayan consumido bebidas alcohólicas o algún tipo de estupefaciente en las últimas 48 horas
Que no padezcan enfermedades crónicas ni ETS
No deben tomar ningún tipo de medicamento de forma regular
Sin tatuajes o perforaciones realizadas en los últimos seis meses
No haber padecido hepatitis

Para la extracción sanguínea se utilizaron tubos Vacutainer™ con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, sustancia anticoagulante). Una extracción de 20 ml de sangre provee un aproximado de $2-3 \times 10^7$ células (Raulf, 2019). Por lo tanto, para los fines del ensayo, se obtuvieron 2 tubos con 6 ml cada uno de la muestra de sangre del donante y se agitaron suavemente mezclando por inversión para evitar la coagulación de la sangre dentro del tubo. Inmediatamente se procedió a separar las células mononucleares utilizando un gradiente de densidades.

2.2.2 Aislamiento de linfocitos y monocitos por gradiente de densidades

Se aislaron células mononucleares por medio de separación por gradiente de densidades con el uso de Ficoll – Histopaque® (Ficoll). El Ficoll (un polímero de sacarosa de alto peso molecular) es una solución altamente viscosa que provoca la acumulación de células, así junto a la adición de diatrizoato de sodio forman este compuesto que facilita la recuperación rápida de células mononucleares viables (English y Andersen, 1974; Sigma-Aldrich, 2020). Por ello es uno de los procedimientos más utilizado para aislar células mononucleares de sangre periférica humana.

2.2.3 Gradiente de densidades por Ficoll-Histopaque®

El gradiente de densidades con Ficoll fue instaurado por Bøyum en 1968 (Ficoll – Isopaque inicialmente) modificado poco después a Ficoll – Histopaque® (Kay, 1980) para simplificar el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana. Sin embargo, los procedimientos descritos inicialmente por distintos científicos detallaban una metodología con un mayor número de pasos aumentando el riesgo de contaminación por manipulación. Por ello, para esta técnica años después se instauró un nuevo procedimiento para verter la muestra de sangre sobre la solución de Ficoll - Histopaque® (Kay, 1980) el cual fue puesto en práctica en el desarrollo experimental de este trabajo.

El aislamiento de células mononucleares por gradiente de densidades fue llevado a cabo por centrifugación. Se agregaron 4 ml de sangre heparinizada (adición de un anticoagulante) a cada tubo falcon estéril de centrífuga cónico de 15 ml (3 en total) y se diluyó agregando 8 ml de solución salina (Solución CS PiSA® al 0.9% de NaCl) con una pipeta estéril de 1000 µl. El uso de solución salina proporciona un medio isotónico para mantener la integridad y viabilidad de las células. Además, proporciona un valor de pH fisiológico (de 6.8 a 7.4) importante para mantener la viabilidad. Posteriormente se depositó el volumen final mezclado por inversión en otro tubo falcon de 15 ml con 2 ml de Ficoll previamente agregados. Se colocaron cara a cara ambos tubos, se vertió con cuidado directamente de un tubo a otro realizando una inclinación de aproximadamente 30° del tubo con Ficoll y directamente del tubo con sangre y solución salina se fue agregando desde la pared inicial hacia la siguiente (ver **figura 11**) subiendo la inclinación de ambos tubos conforme el volumen se transfería evitando realizar movimientos violentos ya que la sangre terminaría por mezclarse con el Ficoll, lo que estropearía la técnica.

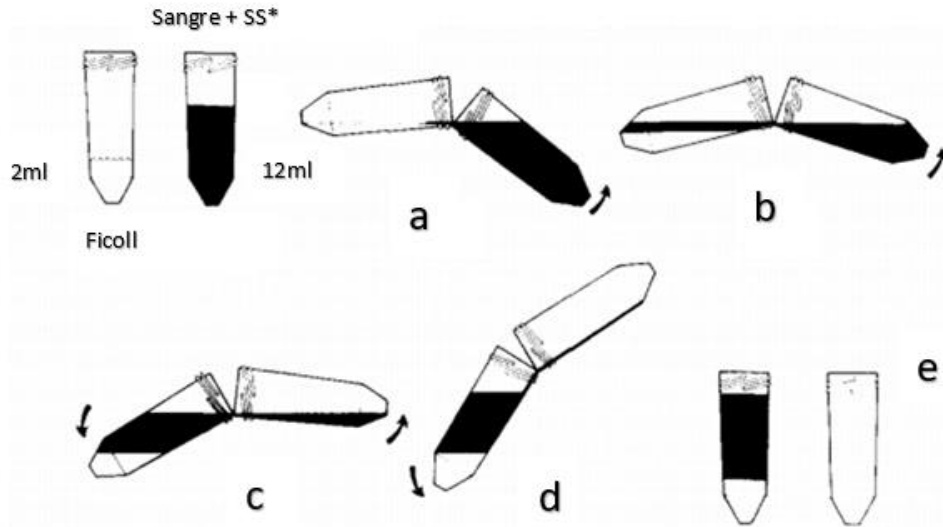


Figura 11. Representación esquemática del procedimiento para depositar la sangre con solución salina sobre el Ficoll – Histopaque. a) Inicio del proceso liberando lentamente el contenido del tubo con la muestra de sangre sobre la pared del que contiene el Ficoll –Histopaque®. b) Conforme va cubriendo el Ficoll – Histopaque se comienza a elevar lentamente el otro para no generar que caiga bruscamente. c) Cuando se comienza a llenar, el tubo debe inclinarse de tal forma que no vayamos a derramar el contenido, mientras tanto seguimos depositando la muestra con sangre manteniendo inclinado el tubo correspondiente. d) Se eleva el tubo con la muestra de sangre para dejar caer el resto de su contenido. e) Por último podemos observar que la muestra de sangre se deposita sobre el Ficoll-Histopaque® sin haberse mezclado entre sí (Kay, 1980).

Posteriormente se separó la fracción leucocitaria/eritrocítica a temperatura ambiente mediante centrifugación durante 25 minutos a 400 x g. Como resultado, se obtuvo la separación de grupos celulares a causa de la diferencia de densidades como se puede ver en la **figura 12**. En la capa inferior se encontraron los eritrocitos (ver **figura 12b**) seguidos por una capa delgada de granulocitos, por encima, el volumen de Ficoll-Histopaque separando la fracción de células plaquetarias, linfocitos, monocitos y por último el plasma (Osinski, 2019).

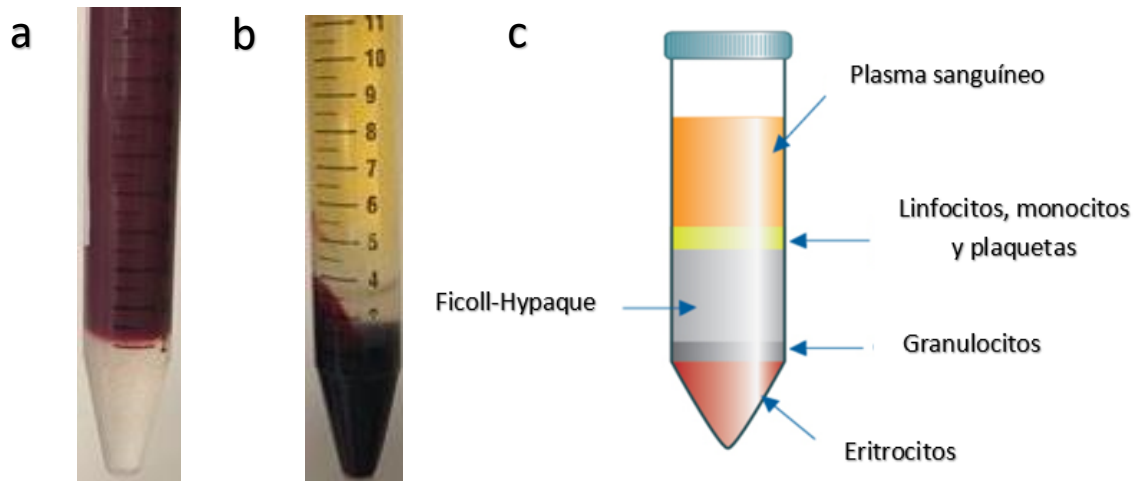


Figura 12. Ejemplificación de la técnica de separación de células por gradiente de densidades. a) Se observa el estado de las sustancias antes de iniciar la centrifugación. b) Se observa el resultado de la separación de las células por densidades después de centrifugar. c) Esquematiza teóricamente la división de las sustancias separadas por sus densidades. Al tener una mayor densidad, los eritrocitos y granulocitos logran desplazarse debajo de la capa de Ficoll – Histopaque®, por lo tanto, al ser menos densas, las células mononucleares (linfocitos, monocitos y plaquetas) se depositan justo por encima y el resto, correspondiente a la menor densidad en la sustancia se le atribuye al plasma sanguíneo (Osinski, 2019).

Para poder extraer el paquete de células mononucleares (Ver **figura 12c**) se retiró la capa superior con el plasma y la mayor parte de la fracción plaquetaria celular restante con una micropipeta estéril de 1000 μ l, se transfirió a otro tubo falcon estéril de centrifuga cónico de 15 ml. Se retiró la capa mononuclear, la cual se distingue como una banda blanca y difusa entre el plasma y la capa de Ficoll-Histopaque® y se transfirió a otro tubo falcon. Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución salina, centrifugando durante 15 min a $400 \times g$ a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células mononucleares en 5 ml de medio RPMI-1640 suplementando con 10% de suero autólogo y 0.01% de antibiótico. Por último, se depositaron sobre una caja Petri y se dejó incubar por 2 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO_2 y 80% de humedad.

2.2.4 Separación de monocitos de células mononucleares por adherencia

Debido a que los monocitos y linfocitos comparten el mismo medio, es necesario separarlas en dos nuevos cultivos, esto se debe a que los polímeros deben ser evaluados en cultivos axénicos para evitar que las

interacciones celulares influyan en el estudio. Las células monocíticas tienen la peculiaridad de adherirse a la base de la caja Petri mientras que los linfocitos se mantienen en suspensión en el medio de cultivo. Por esta razón, se retiró el medio con los linfocitos en suspensión y se colocó en otra caja Petri estéril de 10 ml añadiendo rápidamente 5 ml de medio RPMI 1640 a la caja Petri inicial.

Para la obtención de los monocitos se realizó un raspado de la base de la caja Petri con un raspador celular estéril. El paquete celular se resuspendió con una micropeta de 1000 μ l y se añadieron 10% de suero autólogo y 0.01% de antibiótico al medio. Se tomaron muestras de los cultivos de linfocitos y monocitos y se contaron en un hematocitómetro para conocer el total de células obtenidas en el cultivo de linfocitos:

$$\text{concentración celular} = \left(\frac{\text{células vivas}}{4}\right)(\text{factor de dilución})(10,000) \quad (1)$$

cuyo resultado corresponde al número de células en 1 ml de cultivo

$$\text{concentración celular inicial} = (\text{concentración celular})(\text{volumen total}) \quad (2)$$

Células totales obtenidas del primer ensayo:

$$\text{concentración celular} = \left(\frac{135}{4}\right)(10,000) = 337,500 \text{ células/ml}$$

$$\text{concentración celular inicial} = (337,500 \text{ células/ml})(5.5 \text{ ml}) = 1,856,250 \text{ células}$$

Una vez teniendo el total de células disponibles se realizó un sembrado de células para poder realizar las pruebas de citotoxicidad con las muestras de polímeros. Para los monocitos se obtuvieron un total de 1,416,250 células.

2.2.5 Sembrado y mantenimiento de las células aisladas.

Las células aisladas de sangre periférica humana se sembraron en medio de cultivo RPMI 1640. Este medio es un sistema de doble tampón que contiene bicarbonato (24 mM) y HEPES (50 mM) (ácido N-2-hidroietilpiperazina N-2-etanosulfónico) tamponado con CO₂ en el aire, ya que se asemeja a las condiciones fisiológicas en condiciones de cultivo cerrado (5% de CO₂ en aire en una incubadora con gas) (Raulf, 2019).

Por otra parte, para mantener el medio libre de contaminación bacteriana se implementó el uso de antibiótico de penicilina-estreptomicina, solución estabilizada, con 10.000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/ml proporcionado por Sigma-Aldrich®.

Además de lo ya mencionado, los cultivos celulares requieren de una mezcla de nutrientes y otros componentes esenciales. Normalmente ese complemento lo cubre el uso de suero fetal bovino (FCS, por sus siglas en inglés), sin embargo, en este caso sólo se implementó el uso de suero autólogo (AS, por sus siglas en inglés). El uso de suero autólogo se debe principalmente a que no genera respuesta inmune a las células, además, en ensayos más prolongados se omite el uso de FCS debido a que este estimula la proliferación celular que, en el caso de linfocitos estimula su transformación en linfoblastos indiferenciados capaces de dividirse (Sanz y Repetto, 1993; Raulf-Heimsoth, 2008).

2.3 Viabilidad, proliferación y toxicidad celular

2.3.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular se refiere al número de células vivas en una muestra, en cultivos celulares se puede utilizar la técnica de exclusión vital con azul tripano para determinar la viabilidad celular. Este colorante tiñe las células cuya membrana se ha desestabilizado permitiendo el paso de las moléculas y tiñendo a las células de color azul oscuro mientras que las células vivas que permanecen con una membrana celular intacta excluyen el colorante (Stoddart, 2011). Este método se utilizó en suspensión celular para ser evaluado bajo microscopio con la ayuda de un hemocitómetro.

2.3.2 Estudio de viabilidad en cultivos primarios de sangre periférica humana con azul tripano

Para evaluar la exposición a las muestras de polímeros se sembraron células mononucleares en pozos de una placa de 96 pocillos. La placa se dividió en dos secciones (ver **figura 13**), la primera para evaluar los nanomateriales a la exposición en linfocitos y la segunda para ser evaluados en monocitos. En cada sección se utilizaron 8 pozos de cada cultivo primario para los controles, de los cuales 4 fueron para controles positivos y 4 para controles negativos. Los controles dentro de un experimento son segmentos paralelos

al experimento evaluados en poblaciones diferentes. Dentro de ellos, los controles negativos son poblaciones de células cuyo tratamiento utilizado no tiene efecto en los resultados mientras que, los controles positivos utilizan un tratamiento que se sabe cómo influye en ellos (Spacey, 2018). Para el resto de la placa, se dividió en 3 filas de 9 pocillos para cada polímero y a su vez estos nueve en secciones de 3 para evaluar por triplicado cada una de las concentraciones de polímeros, de manera que, se añadieron 10 μl de cada una de las concentraciones ubicadas de menor a mayor concentración en la distribución de la placa. Se realizaron ensayos por triplicado para observar la reproducibilidad de cada muestra.

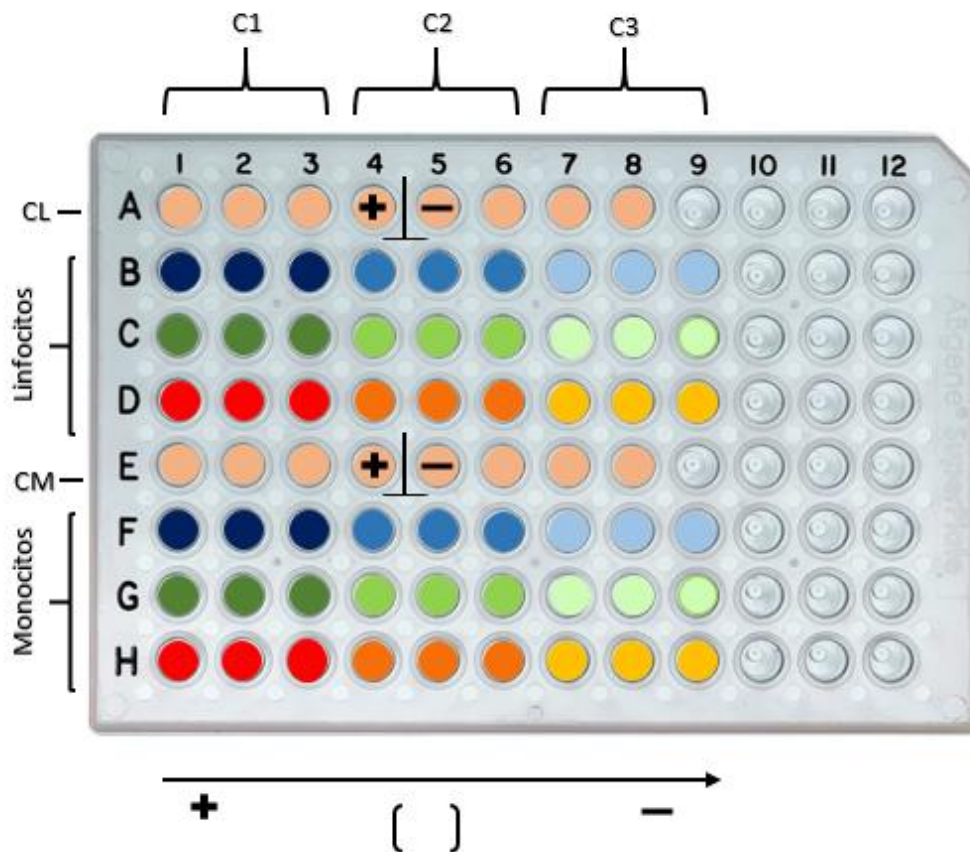


Figura 13. Representación de la placa de 96 pocillos utilizada para el estudio de viabilidad por exclusión de azul tripiano. A-D representan el estudio hecho con linfocitos, A1-A4 para controles positivos y A5-A8 para controles negativos. B, C y D corresponde al tratamiento con los polímeros P1, P2 y P3 respectivamente. E-H representan el estudio hecho para monocitos, E1-E4 para controles positivos y E5-E8 para controles negativos. De igual forma F, G y H corresponde al tratamiento con los polímeros P1, P2 y P3 respectivamente. La flecha indica que las concentraciones para cada una de las diluciones de las muestras fueron colocadas de mayor a menor concentración y cada concentración se realizó por triplicado. CL y CM representa el grupo control para linfocitos y monocitos respectivamente.

Para sembrar 50,000 células en 34 pozos de linfocitos en una placa de 96 pocillos se utilizaron 148 μ l de medio celular para cada pozo llevándolos hasta 200 μ l con su respectivo complemento: 52 μ l de agua inyectable para controles positivos; 52 μ l de medio RPMI-1640 para controles negativos y; 10 μ l de la solución con polímeros para cada concentración y 42 μ l de medio RPMI-1640. Se realizó el mismo procedimiento de sembrado para el cultivo celular de monocitos para un sembrado de 40,000 células por pozo: 155 μ l de medio de cultivo celular por pozo completando a 200 μ l con cada respectivo complemento; 45 μ l de agua inyectable para controles positivos; 45 μ l de medio RPMI-1640 para controles negativos y; 10 μ l de la solución con polímeros y 35 μ l de medio RPMI-1640. Se evaluó la viabilidad celular utilizando el colorante de exclusión vital azul tripano. Se agregó 1 μ l de azul tripano a cada pozo para teñir y se fijó con 20 μ l de formaldehído al 3.7%. Una vez fijadas las células se realizó un conteo celular pozo por pozo de todo el contenido de la placa.

2.3.3 Estudio de citotoxicidad en cultivos primarios de sangre periférica humana por ensayo MTT: proliferación y actividad metabólica celular

Para continuar con los ensayos en sangre periférica humana se implementó el ensayo MTT para evaluar principalmente proliferación y citotoxicidad. El ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, por sus siglas en inglés), utilizado para medir viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular, es un ensayo colorimétrico cuantitativo que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (MTT) a cristales de formazán de color púrpura (ver **figura 14**) por medio de células metabólicamente activas. Este principio se lleva a cabo debido a que las células viables contienen enzimas oxidoreductasas dependientes de NADPH que convierten el MTT a formazán. Los cristales de formazán insolubles se disuelven con una solución disolvente que colorea el medio cuyo análisis se cuantifica midiendo la absorbancia a 500-600 nm utilizando un espectrofotómetro de pozos múltiples (Sigma Aldrich, 2012).

Para el estudio con el método MTT fue necesario aislar nuevamente células mononucleares de sangre periférica humana. Considerando nuevamente los criterios de inclusión para la toma de muestras de sangre, se obtuvieron muestras de 4 ml de sangre de tres diferentes donantes y se procedió a realizar el gradiente de densidades con el uso de Ficoll para aislar las células mononucleares.

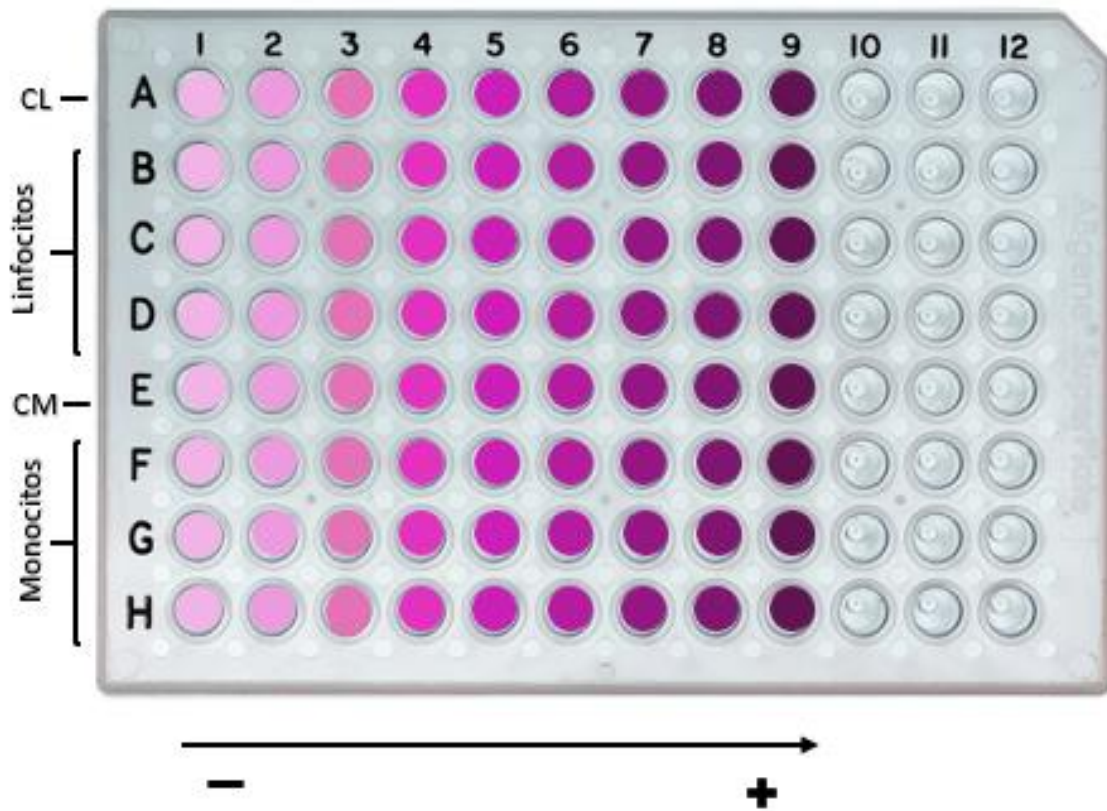


Figura 14. Representación teórica de cómo luce un ensayo MTT después de la reducción de la sal de tetrazolio a cristales de formazán. La intensidad del color púrpura es directamente proporcional a la reducción del reactivo de MTT y se interpreta como la viabilidad celular en función de la actividad metabólica.

Para la manipulación de los cultivos celulares, en esta ocasión se trabajó dentro de una cámara de seguridad biológica Lumistell clase II. Para la dilución de las muestras de sangre en este caso se utilizaron 8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). El PBS está formulado sin calcio ni magnesio principalmente para eliminar los quelantes en cultivos celulares, pero tiene la misma función que la Solución CS al 0.9% utilizada en los ensayos previos (Phillips y Cadwallader, 1971; ThermoFisher, 2020). Se mezcló por inversión y colocó sobre 3 ml de Ficoll en un tubo falcon cónico de 15 ml. Se centrifugó por 25 minutos a 400 x g (un equivalente de aproximadamente 1000 rpm según las especificaciones del equipo) y se obtuvo nuevamente la división por densidades debido al gradiente (ver **figura 15**). Se retiró el paquete de células mononucleares colocándolo en otro tubo falcon cónico de 15 ml, se llevó al límite con PBS y se centrifugó ahora por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de medio RPMI-1640, se resuspendió lo suficiente para despegar las células del fondo del tubo y posteriormente se agregaron a una caja Petri suplementando con 10% de suero autólogo y 0.01%

de antibiótico. Por último, se dejó incubar por 2 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 80% de humedad en una incubadora de CO₂ Thermo Scientific™ Midi 40.

Después de las dos horas se pasó el medio con el grupo de células a otra caja de Petri mientras que a la anterior se le agregó 1 ml de medio RPMI-1640 y se realizó la extracción de monocitos, una vez despegadas las células de la base de la placa se complementó con 4 ml más de medio, 10% de suero autólogo y 0.1% de antibiótico. Se montó el ensayo en un hemocitómetro para observar las células a microscopio tanto linfocitos como monocitos y hacer el cálculo de células totales (ver en anexos).

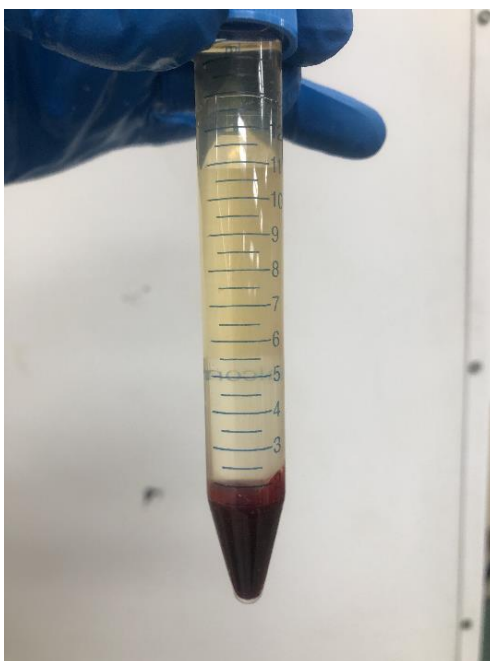


Figura 15. Gradiente de densidades realizado con las variaciones indicadas en la metodología sobre el ensayo MTT con respecto al protocolo inicial.

Para sembrar 100,000 células de linfocitos por pozo en 36 pozos en una placa de 96 pocillos se utilizaron 138.8 µl de medio celular para cada pozo llevándolos hasta 200 µl con su respectivo complemento: 60.2 µl de agua inyectable para controles positivos; 60.2 µl de medio RPMI-1640 para controles negativos y; 10 µl de la solución con polímeros para cada concentración según su distribución (ver **figura 16**) + 50.2 µl de medio RPMI-1640. Se realizó el mismo procedimiento de sembrado para el cultivo celular de monocitos

para un total de 80,000 células por pozo aproximadamente. Se incubó la placa a 24 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 80% de humedad.

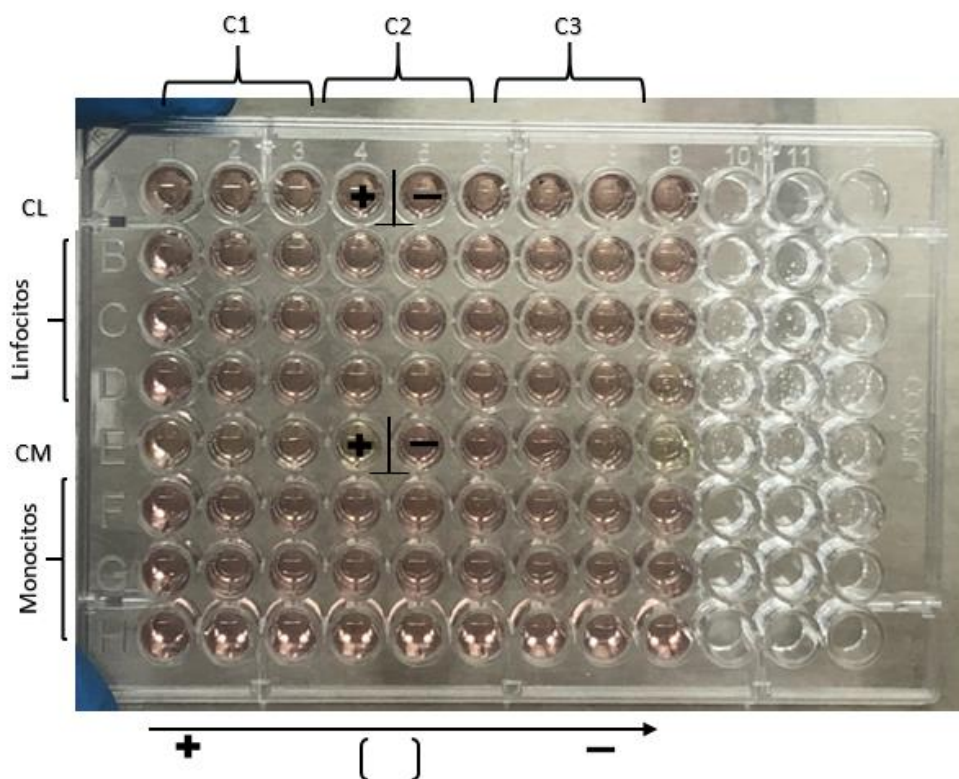


Figura 16. Representación de la placa de 96 pozos utilizada para el ensayo toxicológico por MTT. La distribución al igual que para el ensayo con azul tripano, A-D representan el estudio hecho con linfocitos, A1-A4 para controles positivos y A5-A8 para controles negativos. B, C y D corresponde al tratamiento con los polímeros P1, P2 y P3 respectivamente. E-H representan el estudio hecho para monocitos, E1-E4 para controles positivos y H5-H8 para controles negativos. De igual forma F, G y H corresponde al tratamiento con los polímeros P1, P2 y P3 respectivamente. La flecha indica que las concentraciones para cada una de las diluciones de las muestras fueron colocadas de mayor a menor concentración y cada concentración se realizó por triplicado.

Una vez transcurridas las 24 horas de incubación, se utilizó el Kit para ensayo MTT Cell Proliferation Kit I agregando 10 µl de la solución de marcaje MTT en cada pocillo y se dejó incubar por 4 horas. Posteriormente se agregaron 100 µl de una solución de solubilización (HCl 0,04 N en isopropanol) a cada pocillo y se dejó reposar por toda la noche. Esta solución reacciona con el formazán produciendo coloreando el medio y a su vez realiza una fijación preservando la estructura celular. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a leer la placa en un lector de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer de Thermo Fisher Scientific.

Este ensayo se realizó por triplicado (ver **figura 17**). Los cálculos, concentraciones y datos correspondientes se encuentran en la sección de anexos de este documento.



Figura 17. Ensayos independientes realizados por triplicado cada uno obtenido de muestras de sangre de un donante sano diferente tomando en cuenta las consideraciones de inclusión mencionadas al inicio del protocolo de obtención de las células mononucleares.

Capítulo 3. Resultados

3. Ensayos de citotoxicidad

3.1 Cuantificación de la viabilidad celular con la tinción de exclusión vital con azul tripano

Debido a la exposición a los nanopolímeros P1, P2 y P3 en sus diferentes concentraciones sobre los cultivos de linfocitos y monocitos después de 24 horas, se obtuvieron los siguientes resultados con base en los conteos realizados bajo microscopio después de la tinción con azul tripano. Como resultado del estudio de viabilidad realizado por el método de exclusión por azul tripano podemos observar en relación a los polímeros Pluronic® P123 individuales (ver **figura 18**), una disminución de la viabilidad celular del 9.3% con el incremento de la concentración de 1 a 10 mg/ml representando una viabilidad del 80.6% y manteniendo el mismo valor a 100 mg/ml. En el caso de los monocitos la variación es menor reduciéndose un 3.6% de 1 a 10 mg/ml y disminuyendo en la misma cantidad (-3.6% de porcentaje de viabilidad) de 10 a 100 mg/ml.

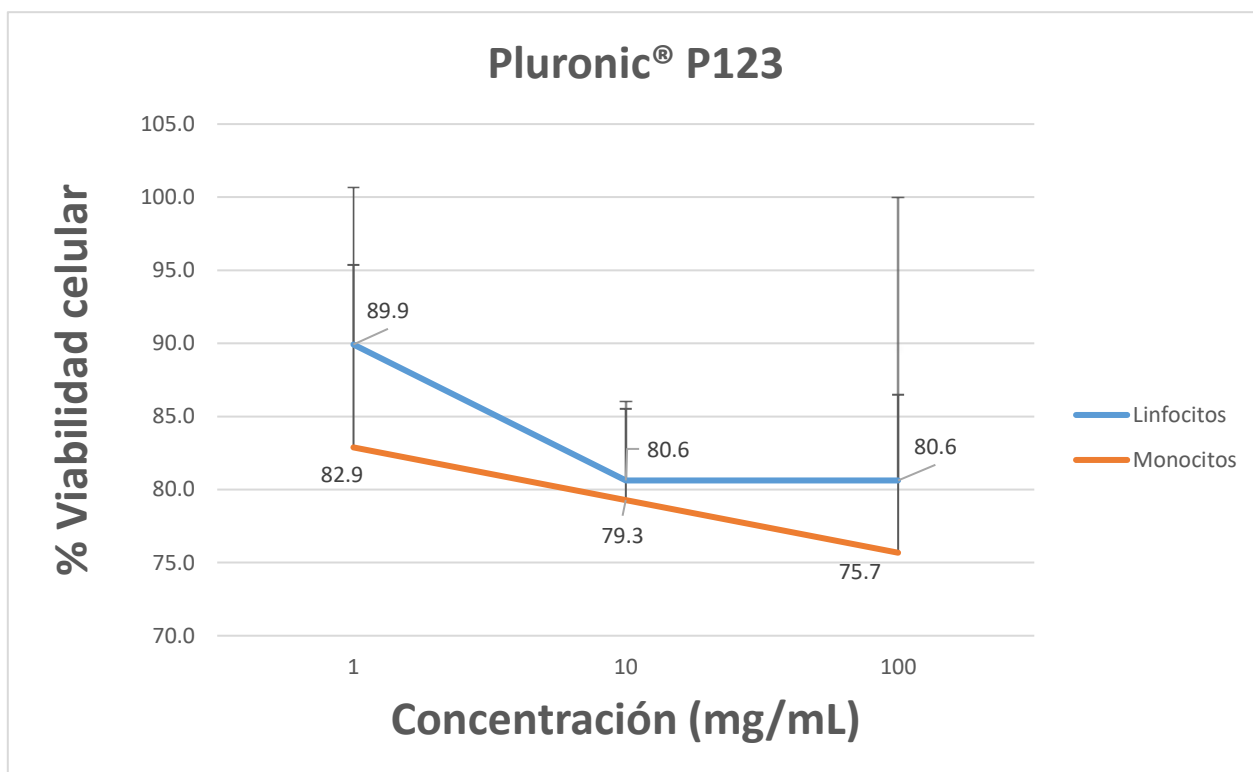


Figura 18: Gráfica de viabilidad celular para Pluronic® P123 evaluado con colorante azul tripano. *Desviación estándar en linfocitos: 10.7, 5.4 y 19.4 para concentraciones de 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente. **Desviación estándar en monocitos: 12.5, 6.2, 10.8 respectivamente.

Para los resultados obtenidos de los cultivos expuestos a las concentraciones de poliméricos P123-PVP, partiendo de una viabilidad del 93% a una concentración de 1 mg/ml, se presentó un decremento del 3.1% a 10 mg/ml y posteriormente un decremento mayor de un 6.2% de 10 a 100 mg/ml en linfocitos. Para monocitos se obtuvo una viabilidad del 82.9% a 1 mg/ml incrementando en un 3.6 % y disminuyendo en la misma proporción (3.6% de viabilidad) a 10 y 100 mg/ml respectivamente (ver **figura 19**).

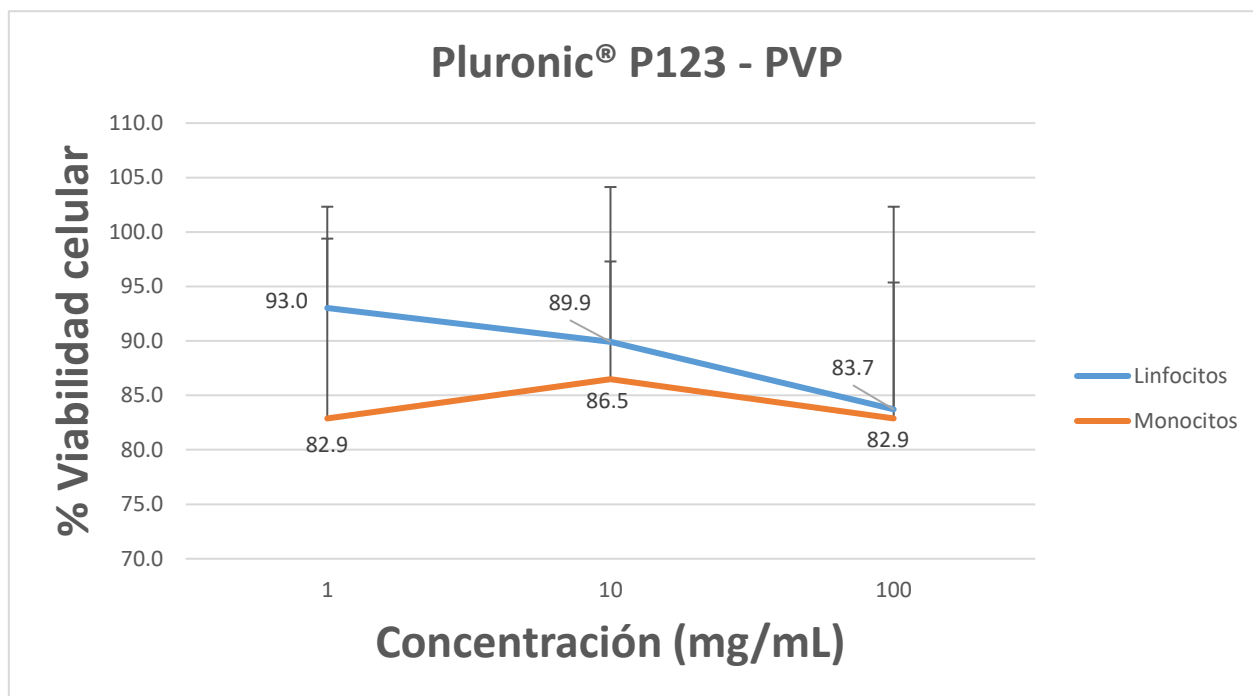


Figura 19: Gráfica de viabilidad celular para Pluronic® P123-PVP evaluado con colorante azul tripano. *Desviación estándar en linfocitos: 9.3, 14.2 y 18.6 para concentraciones de 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente. **Desviación estándar en monocitos: 16.5, 10.8 y 12.5 respectivamente.

Para la tercera evaluación, polímeros P123-PVP-PEG, se presentó una viabilidad del 93% para 1 y 10 mg/ml, mientras que en 100 mg/ml se observa una disminución en un 9.3% en linfocitos. En cuanto a la viabilidad en monocitos, la variación resultó en un decremento de la viabilidad en un 3.6% de una concentración de 1 a 10 y de 10 a 100 mg/ml respectivamente (ver **figura 20**). En cada resultado los linfocitos parecen mostrar una mayor viabilidad celular con respecto a los monocitos con una diferencia de hasta un 10% a excepción de los estímulos P123 y P123-PVP que muestran menos del 1.5% en 10 y 100 mg/ml respectivamente. Si agrupamos los resultados de las tres muestras poliméricas evaluadas en linfocitos (ver **figura 21**) y de la misma manera para las evaluadas en monocitos (ver **figura 22**), subdividiendo en sus respectivas concentraciones, podemos observar que cada concentración de cada muestra polimérica presenta una viabilidad igual o mayor a un 80% en linfocitos y mayor a un 70% en monocitos. Así mismo,

se puede observar que los materiales poliméricos P123-PVP y P123-PVP-PEG en ambas gráficas presentan un resultado de viabilidad mayor con respecto a los valores obtenidos con el polímero base P123.

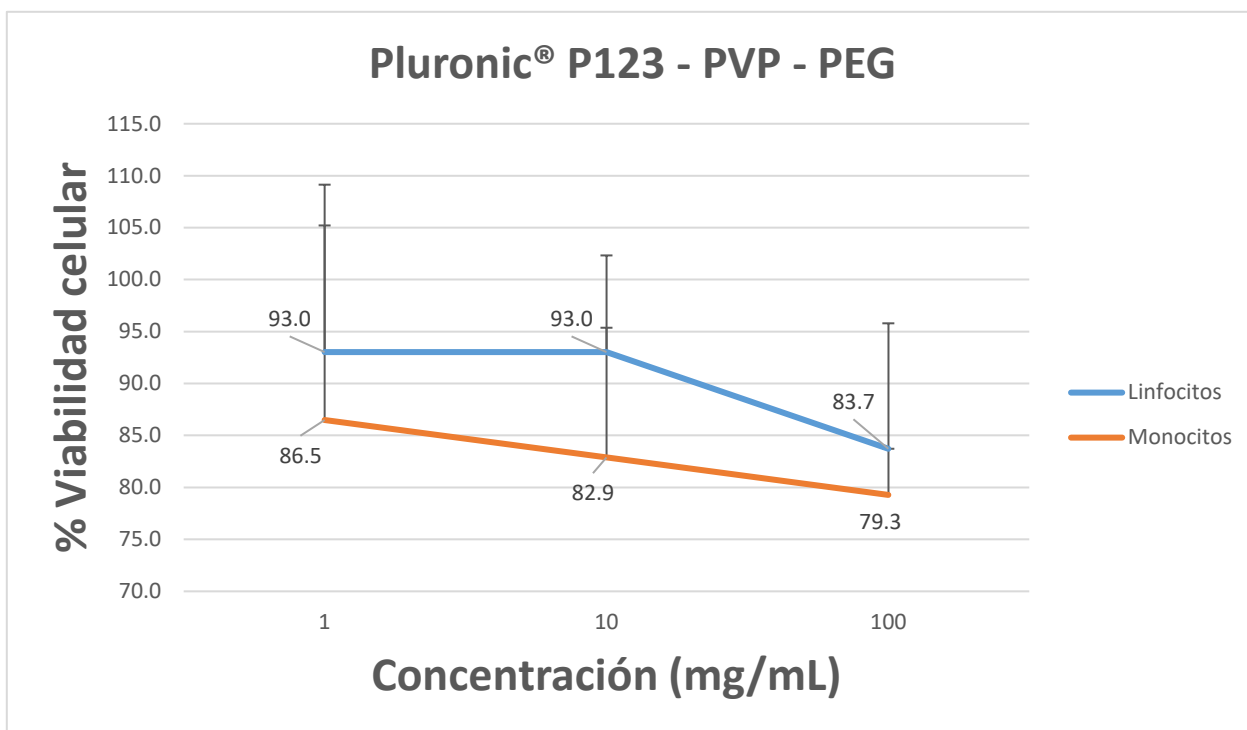


Figura 20: Gráfica de viabilidad celular para Pluronic® P123-PVP-PEG evaluado con colorante azul tripano.
 *Desviación estándar en linfocitos: 16.1, 9.3 y 0 para concentraciones de 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente.
 **Desviación estándar en monocitos: 18.7, 12.5 y 16.5 respectivamente.

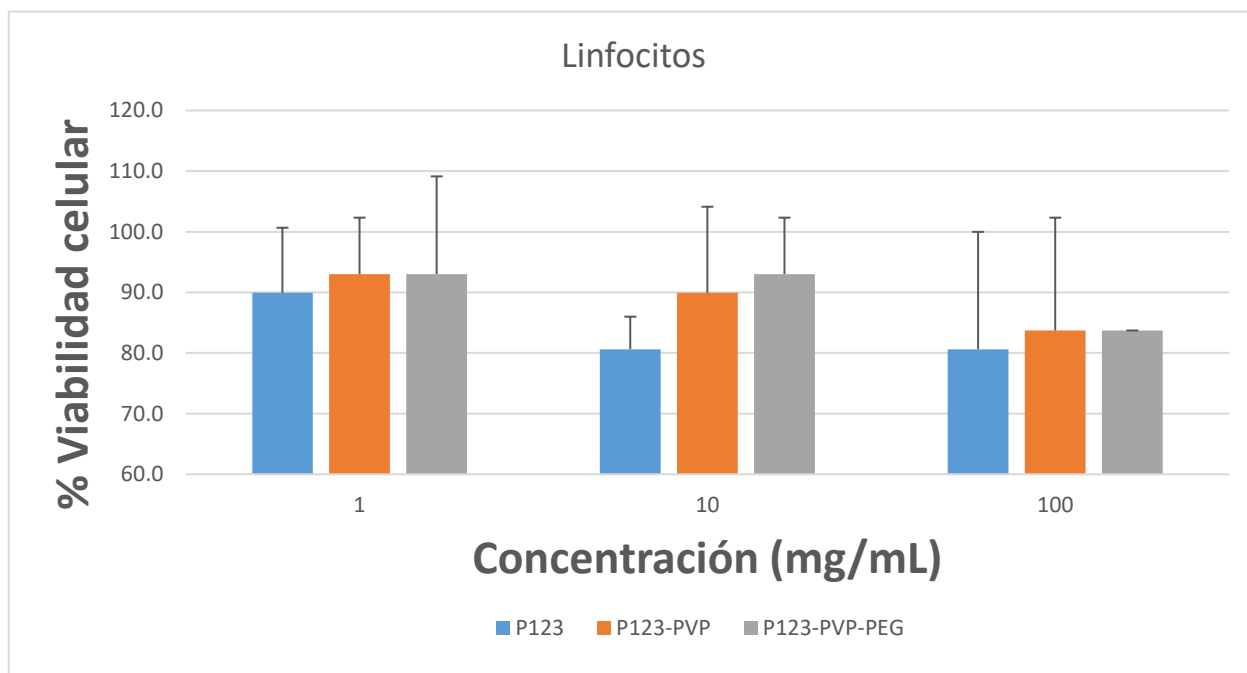


Figura 21: Gráfica de viabilidad celular comparativa entre las muestras de materiales poliméricos P123 individuales, P123-PVP y P123-PVP-PEG evaluadas en linfocitos de sangre periférica humana.

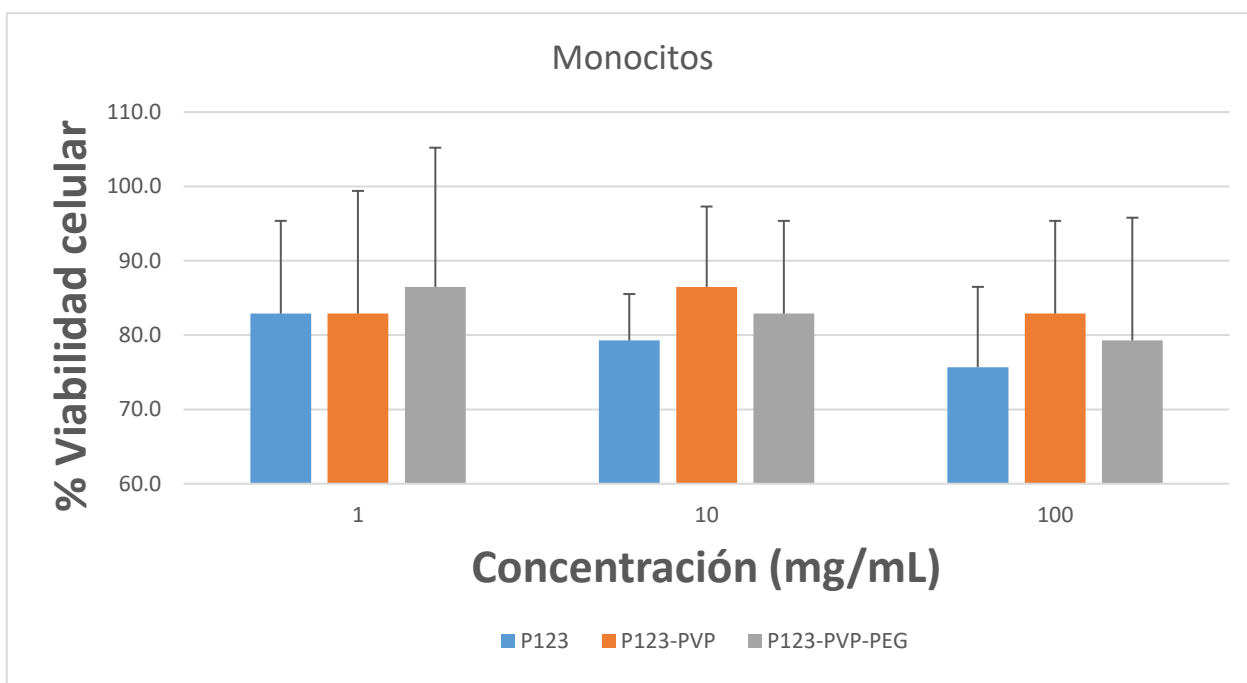


Figura 22: Gráfica de viabilidad celular comparativa entre las muestras de materiales poliméricos P123 individuales, P123-PVP y P123-PVP-PEG evaluadas en monocitos de sangre periférica humana.

La **figura 23** representa en conjunto todas las concentraciones de polímeros evaluadas tanto en linfocitos

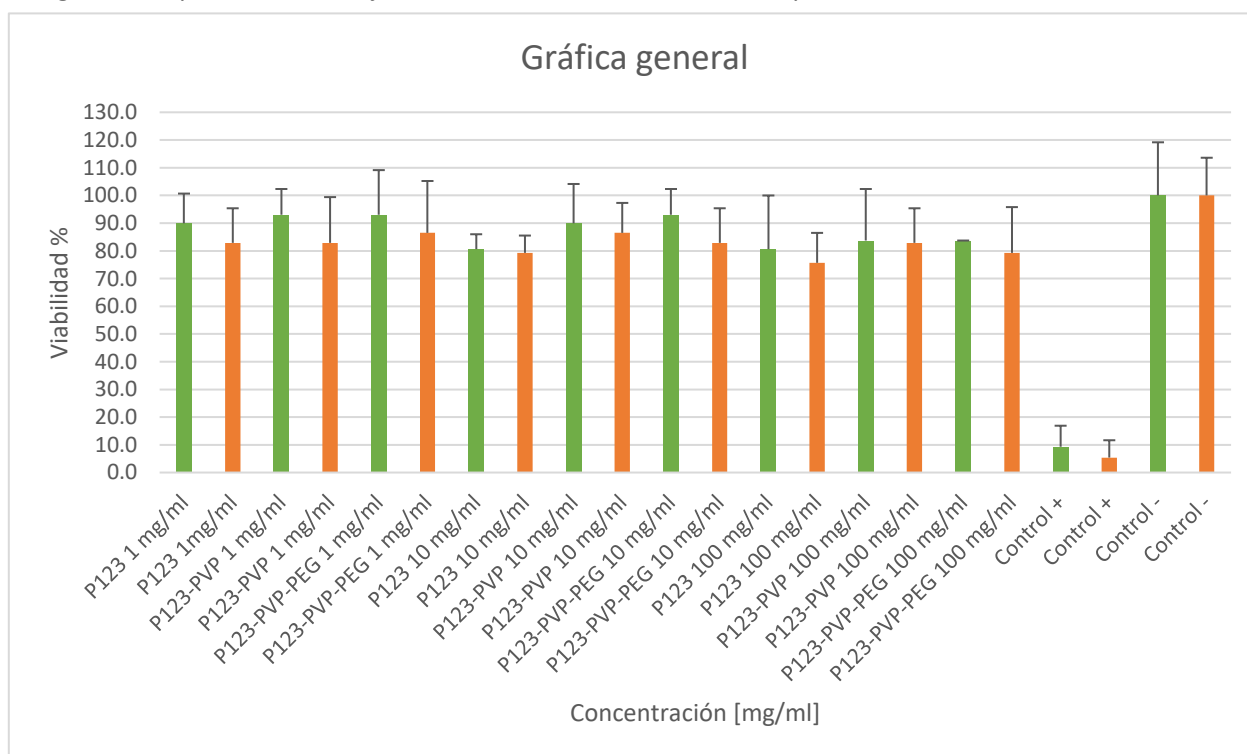


Figura 23: Gráfica de viabilidad celular general de polímeros Pluronic® P123, P123-PVP, P123-PVP-PEG y controles positivos con respecto de la viabilidad celular de los controles negativos en linfocitos y monocitos por azul tripano.

(en verde) y monocitos (en naranja) incluyendo los controles positivos y negativos. De esta manera, la viabilidad obtenida de las células mononucleares expuestas a las concentraciones de cada nanopolímero se representa como un porcentaje con respecto a los controles negativos, que son la referencia del comportamiento normal del cultivo primario (interpretados como un 100%). Así mismo, el control positivo representa una respuesta conocida o esperada en las células a causa del agua inyectable.

Los datos obtenidos en el ensayo fueron analizados estadísticamente (ver en anexos) con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, siendo los polímeros y las concentraciones las variables independientes y teniendo la viabilidad celular como variable dependiente. Los resultados indicaron que no hay diferencia significativa entre polímeros ni sus concentraciones en la influencia de la viabilidad celular con una confiabilidad del 95% ($p \leq 0.05$).

3.1.2 Citotoxicidad celular y actividad metabólica por ensayo MTT

Los siguientes resultados representan el total de datos del ensayo de MTT realizado por triplicado, para Pluronic® P123 se presenta en la **figura 24**. El desglose individual de cada uno de ellos se incluye en la sección de anexos. Los resultados mostrados en las gráficas, a diferencia del ensayo con azul tripano, no representa un número de células viables sino la actividad metabólica presente, así, la viabilidad celular está dada en función de ella.

En Pluronic® P123 el porcentaje de viabilidad con respecto a las células de linfocitos presenta un valor mínimo a 1 mg/ml con un 87.2% de viabilidad celular mientras que las dos concentraciones restantes se encuentran por arriba del 90%. Por otra parte, en monocitos se presenta una variación menor al 1% en las tres concentraciones alrededor de un 79% de viabilidad celular.

Los resultados para Pluronic® P123-PVP en promedio se presentan en la **figura 25**. En este caso se observa una significativa diferencia del número en la viabilidad celular en linfocitos a una concentración de 10 mg/ml con un 137.8% mientras que a concentraciones de 1 y 100 mg/ml se mantiene en un 88% con un 1.2 unidades de diferencia. La viabilidad resultante en monocitos se mantiene en un 79% con un máximo de 0.2 unidades de variación.

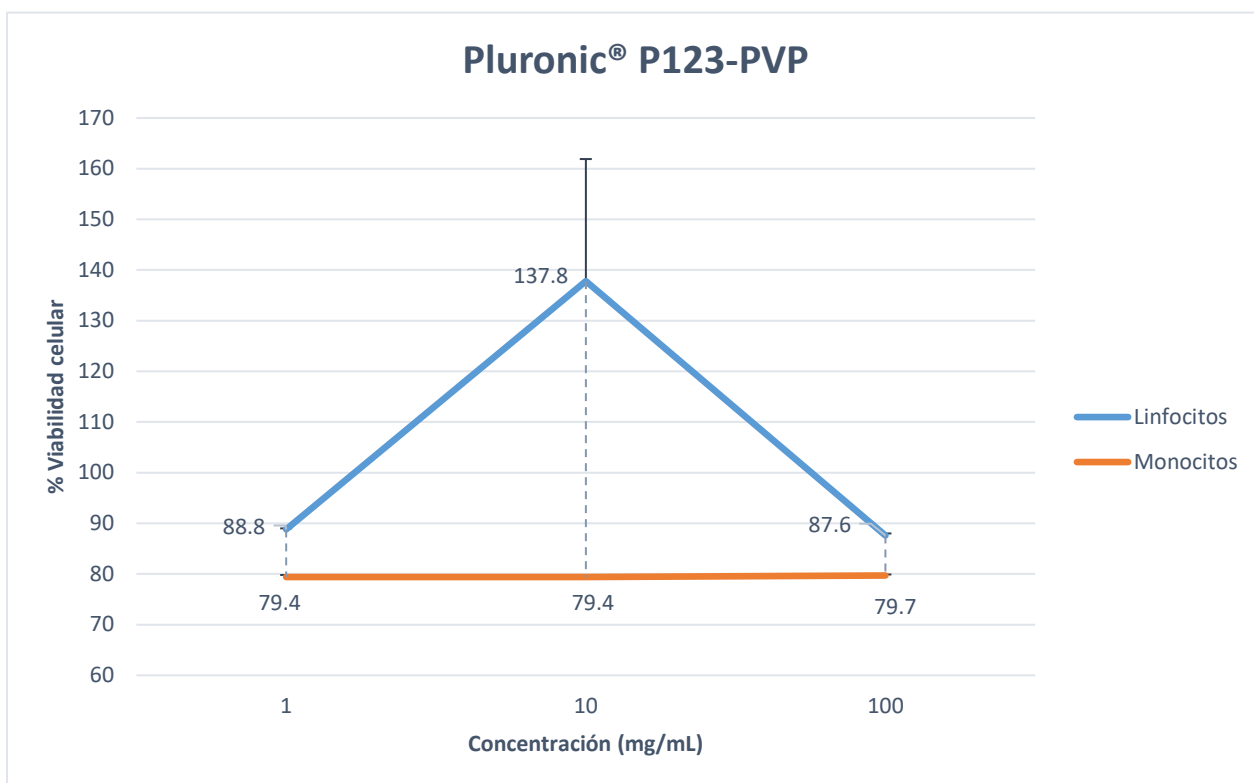


Figura 24: Gráfica de viabilidad celular de polímeros Pluronic® P123. *Desviación estándar para cada concentración en linfocitos: 2.7, 0.7 y 0.3 para concentraciones 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente. **Desviación estándar para cada concentración en monocitos: 0.1, 0.2 y 0 respectivamente.

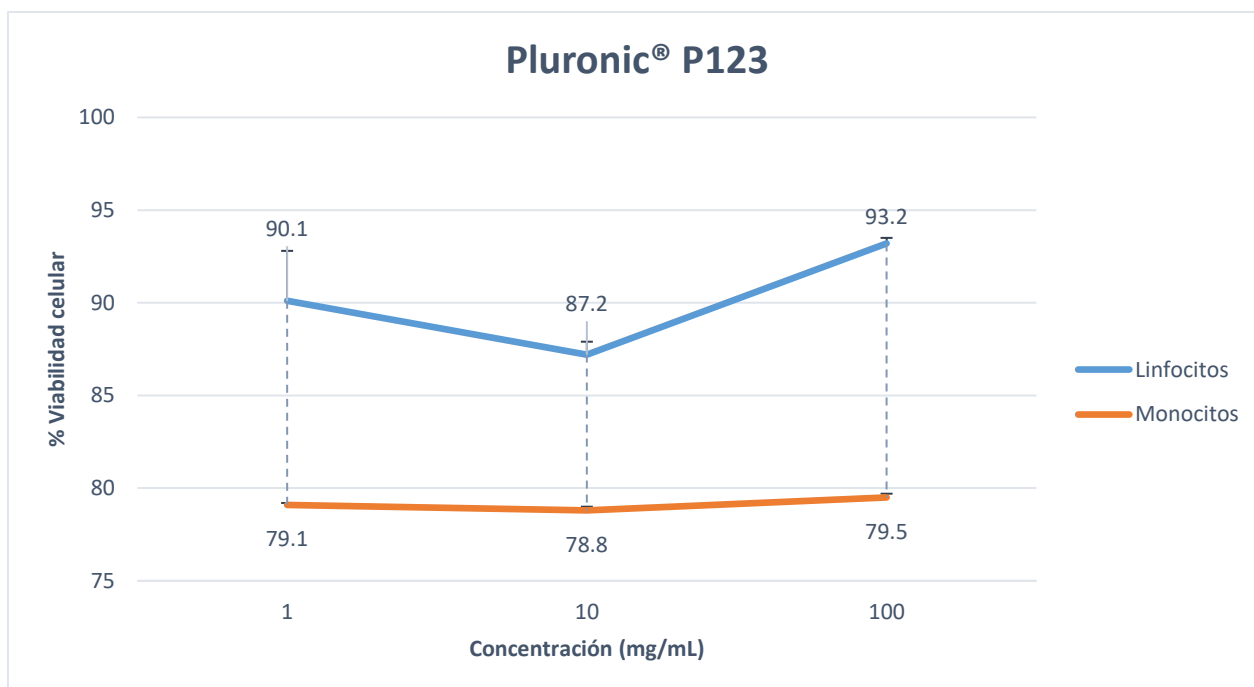


Figura 25: Gráfica de viabilidad celular de polímeros P123-PVP. *Desviación estándar para cada concentración en linfocitos: 0.2, 24.1 y 0.4 para concentraciones 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente. **Desviación estándar para cada concentración en monocitos: 0.4, 0.2 y 0.2 respectivamente.

Los resultados para Pluronic® P123-PVP-PEG se observan en la **figura 26**. De la misma manera que se observa en la gráfica anterior, a una concentración de 10 mg/ml también se muestra una diferencia significativa en linfocitos presentándose una viabilidad del 103.1%, las concentraciones en 1 y 100 mg/ml se mantienen en un 90% con una variación del 0.9 unidades entre ambos valores. Los valores para las células de monocitos al igual que los observados en las gráficas con Pluronic® P123 y Pluronic® P123-PVP corresponden a una viabilidad del 80% con un máximo de una unidad en variación.

Los resultados de las evaluaciones hechas con las concentraciones de cada polímero, P123, P123-PVP y P123-PVP-PEG, se comparan en la **figura 27** para linfocitos y en la **figura 28** para monocitos. Todos los resultados obtenidos para cada una de las muestras muestran viabilidad superior a un 79% con respecto de los controles. Sin embargo, se observa una diferencia significativa relacionada a los dos nuevos materiales poliméricos, P123-PVP y P123-PVP-PEG a una concentración de 10 mg/ml con respecto al polímero base individual, P123. Los resultados de los nuevos materiales poliméricos a una concentración de 1 y 100 mg/ml se asemejan a los resultados que presenta el polímero base individual, P123.

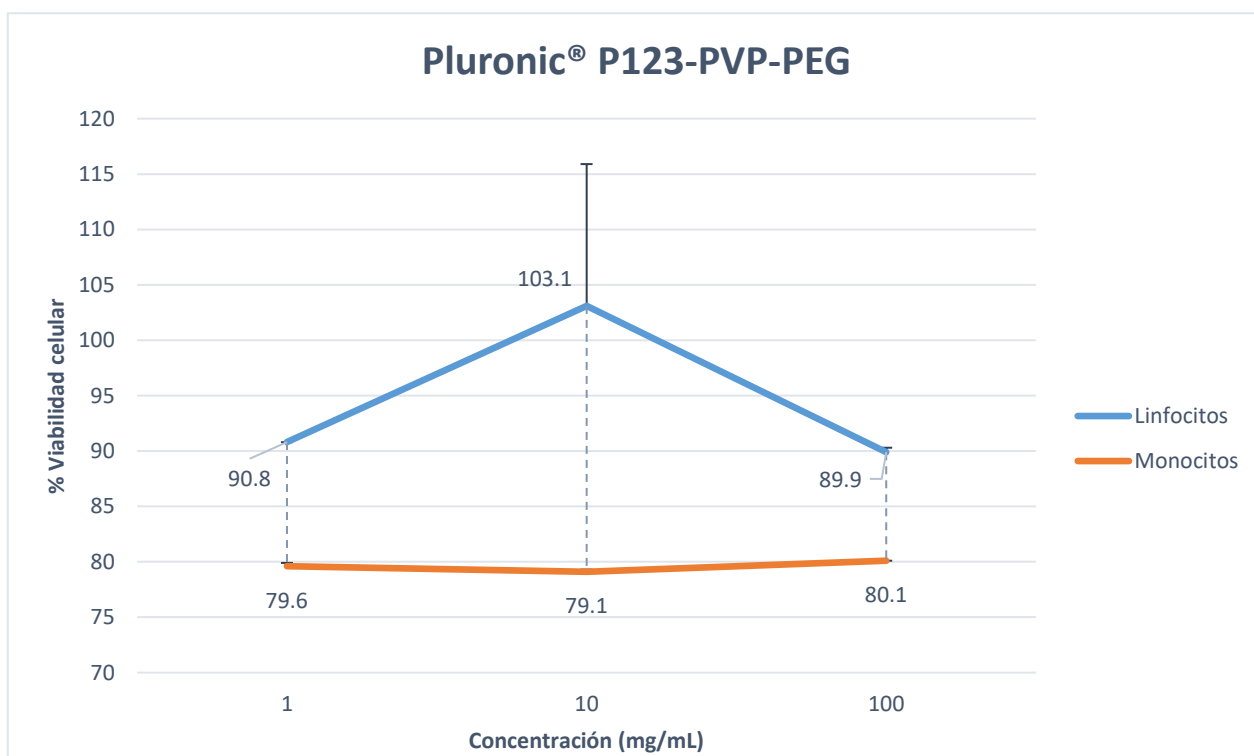


Figura 26: Gráfica de viabilidad celular de polímeros P123-PVP-PEG. *Desviación estándar para cada concentración en linfocitos: 0, 12.8 y 0.4 para concentraciones 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente. **Desviación estándar para cada concentración en monocitos: 0.3, 0.2 y 0 respectivamente.

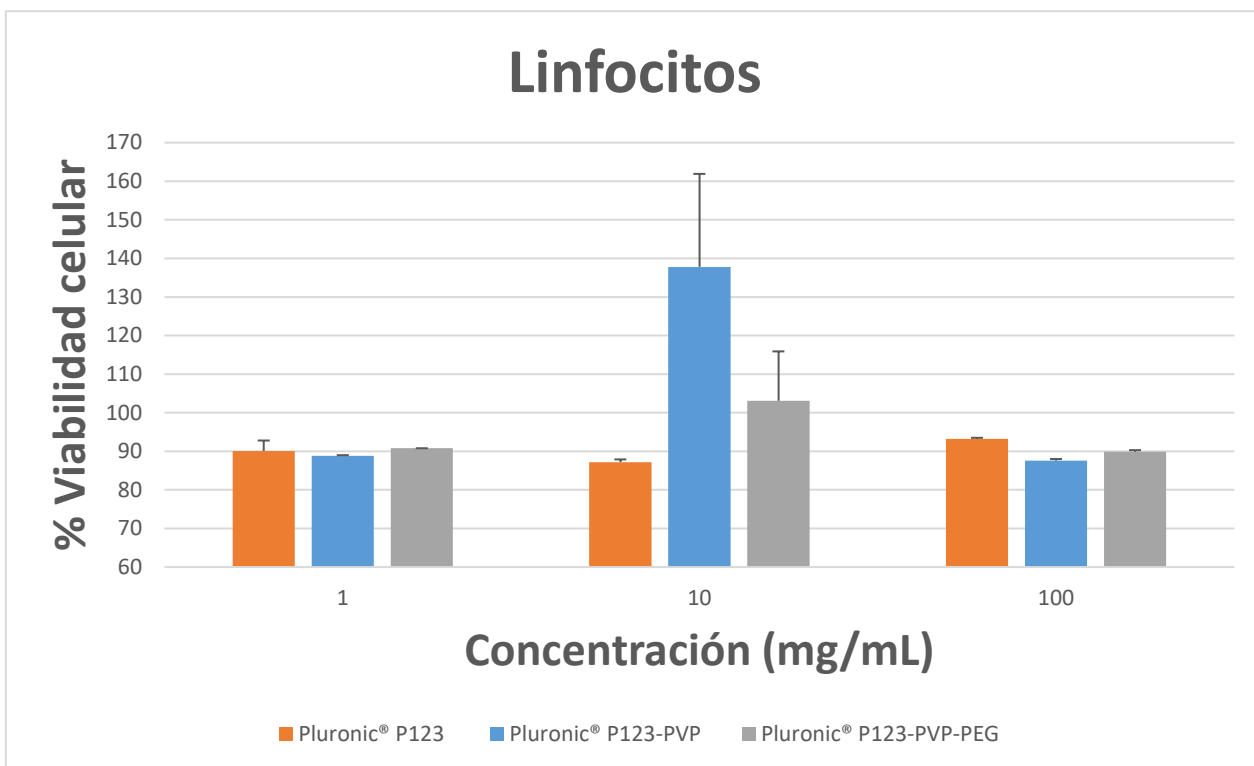


Figura 27: Gráfica de viabilidad celular comparativa entre las muestras de materiales poliméricos P123 individuales, P123-PVP y P123-PVP-PEG evaluadas en linfocitos de sangre periférica humana.

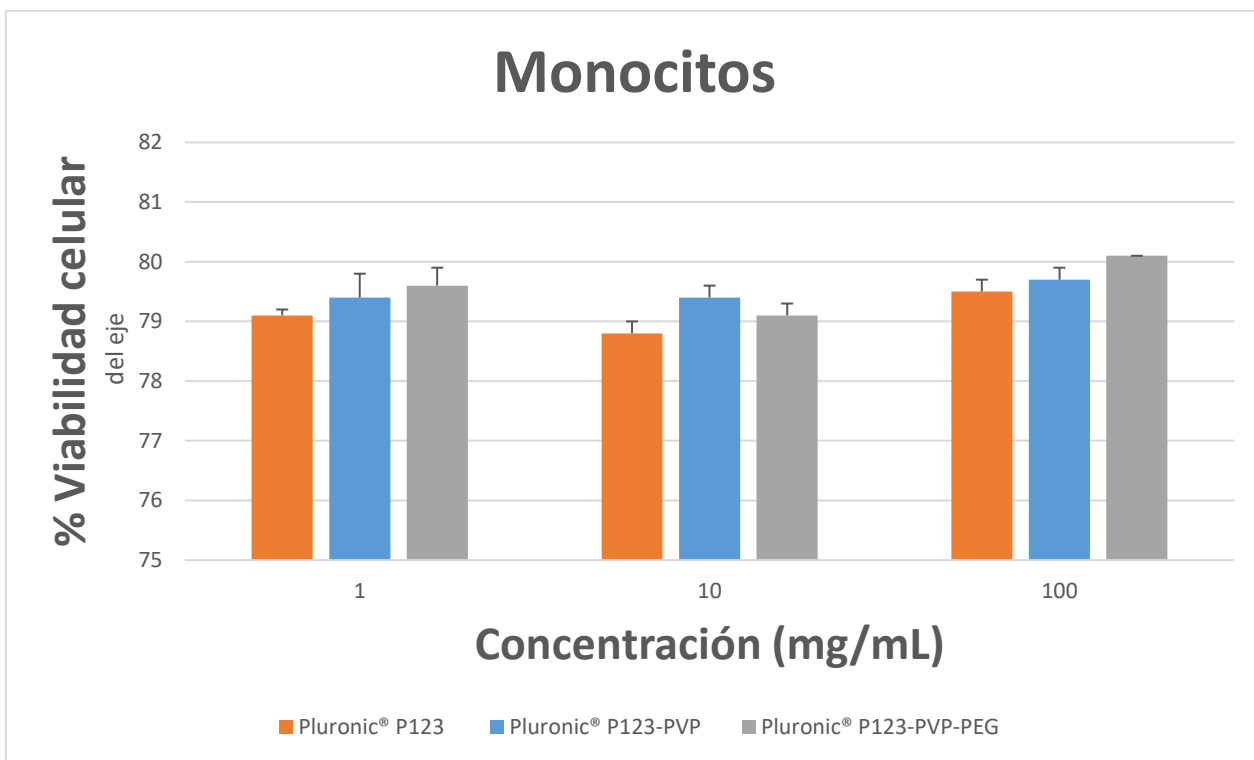


Figura 28: Gráfica de viabilidad celular comparativa entre las muestras de materiales poliméricos P123 individuales, P123-PVP y P123-PVP-PEG evaluadas en monocitos de sangre periférica humana.

En la **figura 29** se muestra una gráfica general resultante del ensayo por triplicado realizado con MTT y se representan, de la misma manera que para el ensayo con azul tripano, las concentraciones evaluadas de los polímeros tanto en linfocitos (en verde) como monocitos (en naranja) ordenados de menor a mayor concentración seguido de los controles positivos que representan el porcentaje de viabilidad con respecto del 100% que se observa en los controles negativos.

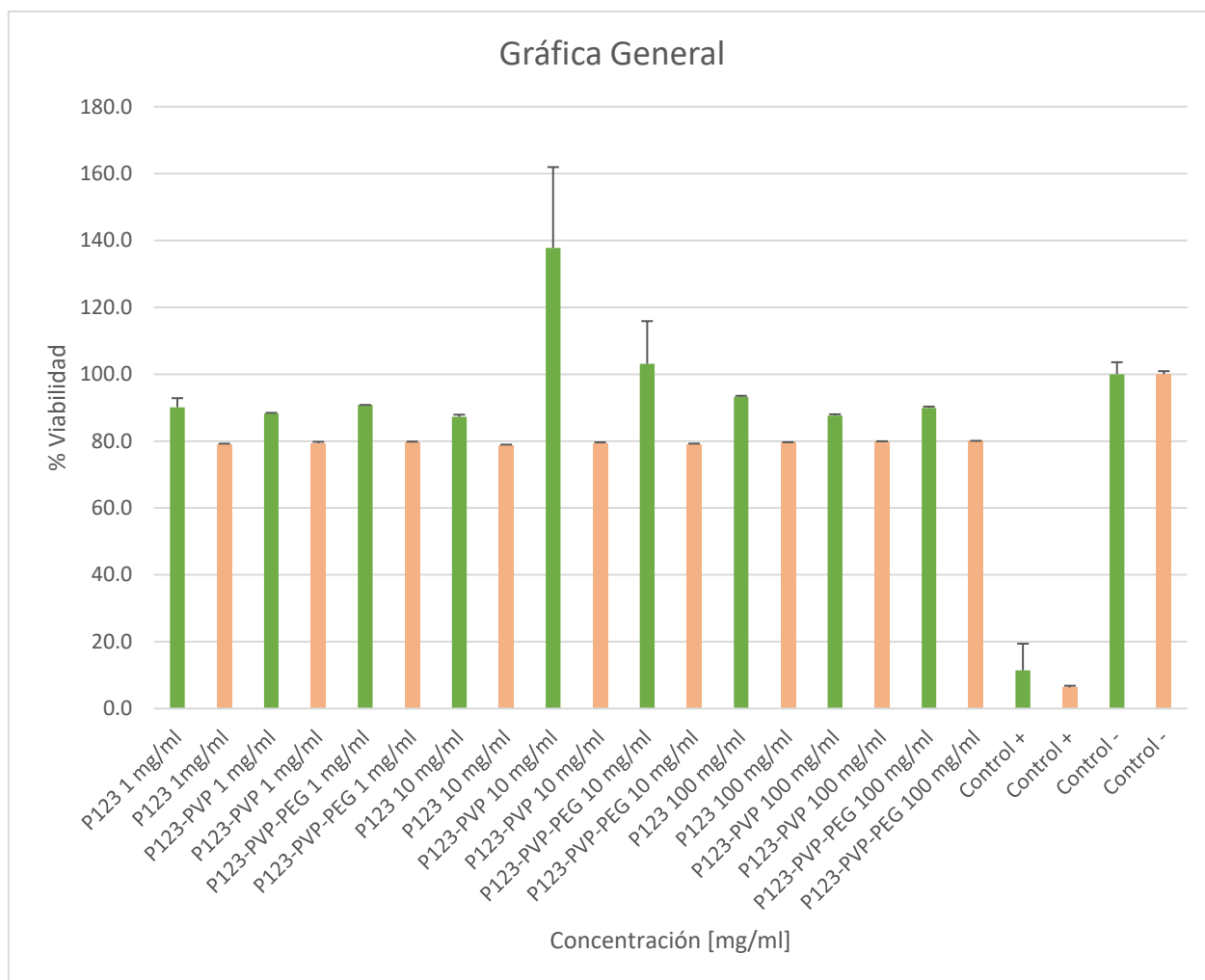


Figura 29: Gráfica de viabilidad celular general de polímeros Pluronic® P123, P123-PVP, P123-PVP-PEG y controles positivos con respecto de la viabilidad celular de los controles negativos en linfocitos y monocitos por ensayo MTT.

En la **figura 30** se muestran los residuos de formazán tomados tras la reacción del reactivo MTT tomado aleatoriamente de uno de los pozos de uno de los ensayos realizados. Los datos obtenidos en el ensayo fueron analizados estadísticamente (ver en anexos) con un ANOVA de dos factores, siendo los polímeros y las concentraciones las variables independientes y teniendo la viabilidad celular como la variable dependiente. Los resultados indicaron que no había diferencia significativa entre polímeros ni sus

concentraciones en la influencia de la viabilidad celular con una confiabilidad del 95% ($p < 0.05$). Los valores de desviación estándar (DS) representan el porcentaje de dispersión de los datos con respecto a la muestra y se utilizó la siguiente fórmula:

$$DS = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{(n - 1)}} \quad (3)$$

donde \bar{X} es la media y n el tamaño de la muestra.

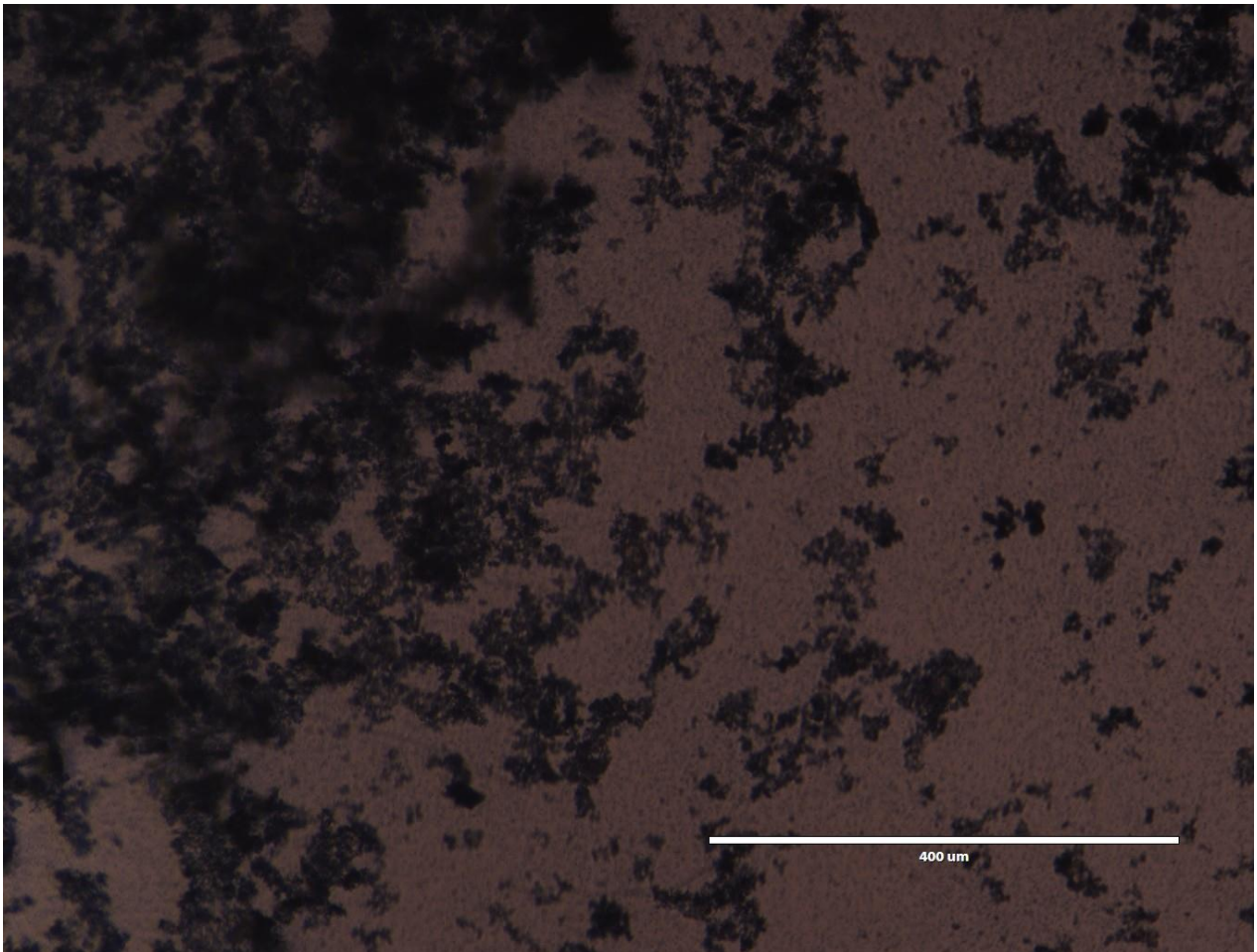


Figura 30: Residuos de formazán observados a 400 μm en un microscopio de fluorescencia invertido EVOS FLC (Fisher Scientific).

Capítulo 4. Discusión

Hoy en día el uso de la nanotecnología en aplicaciones, biológicas, farmacológicas o biomédicas, así como en el cuidado de la salud, se ha convertido en un área de la ciencia, también llamada nanomedicina, de alto desarrollo y con un amplio campo de aplicación. Esto proyecta el uso de nanomateriales en el mercado y se traduce por tanto en la búsqueda de aplicaciones y generación de productos comerciales. Si bien en las últimas décadas se han aprobado alrededor de 100 productos o aplicaciones en nanomedicina por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (US FDA por sus siglas en inglés), no es una muestra de las tendencias actuales en este campo (Farjadian et al., 2019). Sin embargo, si el objetivo apunta al desarrollo de un nuevo material para el campo de la nanomedicina, deben tomarse en cuenta importantes implicaciones; desde el desarrollo del producto, costos de producción y estudio de mercado, hasta la ética, eficacia y, sobre todo, la garantía asociada a la bioseguridad al aplicar dicho material.

Los sistemas para administración de fármacos basados en nanopartículas tienen un rendimiento terapéutico que está estrechamente relacionado con las características fisicoquímicas específicas al material utilizado. A su vez, esto implica que su desarrollo comercial sea particularmente desafiante debido a que se busca una aplicación específica del material que cumpla con las expectativas para el tratamiento para el que es diseñado (Ragelle et al., 2017). En ese sentido, se entiende que el objetivo de usar polímeros como Pluronic® P123, PVP y PEG radica en que sus aplicaciones previas muestran no solo una alta biocompatibilidad sino un bajo reconocimiento por el sistema inmune, pudiendo así estar en contacto con el ambiente biológico sin ser detectado como un agente patógeno. Esto facilita ampliamente su finalidad y objeto de estudio, que en este caso está dirigido para la aplicación en el tratamiento del cáncer.

El carcinoma basocelular es uno de los tipos de cáncer maligno más comunes y representa un 80% de los cánceres de piel no melanoma y aunque, dentro los tipos de cáncer se le asocia con una baja mortalidad, esto depende de la detección temprana y el tratamiento oportuno. Por otra parte, en casos avanzados los tratamientos convencionales no son eficaces debido a la falta de especificidad, alto riesgo de recurrencia y su alta morbilidad relacionada, solo en Estados Unidos se reportan 2.8 millones de casos cada año (Leavitt, 2019) En la investigación previa con Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG, en términos de relación a su aplicación farmacológica, se concluyó que los resultados obtenidos eran ideales para la liberación de agentes activos contra cáncer de piel; una estabilidad en suspensión sobresaliente predecible

por los resultados de potencial Zeta obtenidos que predecían niveles de aglomeración leves para las partículas cargadas con fármacos.

Sin embargo, no se realizaron estudios en células humanas ni ensayos relacionados a su aplicación biomédica. Debido a que estos materiales estarán en contacto con seres humanos, los ensayos en sangre periférica humana nos ayudan a tener un indicador de la respuesta celular inmediata que se pueda generar. Así, si la respuesta indica un grado de toxicidad importante, sería necesario revisar la composición y las características del nanomaterial antes de continuar con su ampliación biomédica.

Para la realización de este trabajo se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana aisladas por medio de un gradiente de densidades. Este gradiente se utiliza debido a su alta reproducibilidad y eficiencia en la obtención de células mononucleares. Sin embargo, es una técnica que tiene muchos pasos determinantes los cuales deben ser realizados cuidadosamente para obtener un cultivo axénico y un alto rendimiento, de tal manera que es necesario adquirir cierta habilidad para realizar correctamente el protocolo. Comúnmente para este tipo de procedimiento se utiliza albúmina sérica o Ficoll. El uso de la albúmina sérica, una proteína presente en el plasma sanguíneo, suele alterar la movilidad de los leucocitos (English y Anderson, 1974) por lo que para la finalidad de este estudio no se consideró en la metodología.

La pertinencia y relevancia del uso de cultivos primarios radica en la similitud o cercanía a la respuesta que tendría la aplicación *in vivo*. Es decir que, al ser las células aisladas del organismo, no se han visto afectadas por las modificaciones y el significativo número de generaciones con el que se trabaja en líneas celulares criopreservadas, que si bien, son útiles para infinidad de aplicaciones en la investigación, no poseen las características exactas a las presentes en el individuo original. Además, las células mononucleares son la primera línea de defensa del sistema inmune, los linfocitos se encargan principalmente de la respuesta inmune adaptativa y los monocitos, encargados en la respuesta inmune innata. Esto permite estudiar en un modelo celular el efecto que los nanomateriales evaluados podrían tener en un organismo completo.

Las muestras de sangre obtenidas fueron seleccionadas de donantes diferentes para considerar la relación entre el efecto citotóxico y la variabilidad genética. El primer ensayo, correspondiente al realizado con azul tripano, es un ensayo independiente y representa los resultados evaluados sobre una sola muestra de sangre. El porcentaje de viabilidad más bajo observado es de un 75.7% que corresponde a los nanopolímeros Pluronic® P123 a 100 mg/ml, este dato corresponde a la evaluación realizada en monocitos y cabe mencionar que los monocitos presentaron una viabilidad celular inferior a la presente en linfocitos.

Esto puede estar relacionado con la posible presencia de algunos linfocitos en el medio, los cuales está demostrado son estimulados por las células presentadoras de antígenos (monocitos) produciendo una respuesta innata por las células T citotóxicas o NK, por lo que, si algunos monocitos han generado una respuesta al estímulo presentando antígenos es posible que algunos linfocitos se hayan activado lisando células y produciendo un menor número de células viables. Por el contrario, el número de células en el ensayo con linfocitos puede no verse afectado al mismo grado debido a la ausencia de monocitos que, según Mookerjee y Ballard, (1979), son indispensables para impulsar la respuesta inmune en presencia de un agente.

Los resultados en linfocitos presentaron una viabilidad superior al 80% para todas las muestras. En contraste, ninguno de los resultados muestra una diferencia significativa en la viabilidad celular. Sin embargo, sí se puede observar una tendencia de disminución en la viabilidad celular con respecto al aumento de la concentración para cada solución de nanopolímeros. En relación al efecto de incorporar PVP o PEG, las muestras de polímeros Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG mostraron un incremento en la viabilidad celular entre un 3 y 10% con respecto del polímero Pluronic® P123, siendo la muestra P123-PVP-PEG la que lo presentó en mayor grado. Esta respuesta puede deberse a la presencia de PEG en el polímero, debido a su alta biocompatibilidad y su característica conocida de camuflaje, es posible que disminuya la respuesta asociada en las células mononucleares.

El ensayo con azul tripano se realizó en primera instancia para determinar si las células eran viables al primer contacto con los materiales poliméricos, debido que se observó una respuesta favorable, se realizaron los ensayos con el reactivo MTT para complementar el estudio. Es necesario mencionar que el método de exclusión por el colorante azul tripano es una técnica simple y rápida que mide la viabilidad celular, pero está sujeta a que la viabilidad se determina indirectamente a partir de la integridad de la membrana celular. Por lo tanto, es posible que la viabilidad de una célula se haya visto comprometida (medida por la capacidad de crecer o funcionar) aunque su integridad de membrana se mantenga (al menos transitoriamente). Una evaluación conjunta a este ensayo es determinar si existe internalización en las células utilizando algún marcador fluorescente, así de esta forma podremos determinar si la membrana está siendo permeable a los nanopolímeros.

Con respecto al ensayo MTT, se realizó un ensayo por triplicado para tener reproducibilidad en los resultados. En este caso, en comparación con la evaluación con azul tripano, se observó la similitud que los monocitos presentaban valores de viabilidad menores que los observables en linfocitos. Sin embargo, uno de los aspectos más importantes que hay que destacar es que, en los resultados observados en las

muestras de polímeros Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG a una concentración de 10 mg/ml en linfocitos, se observó una viabilidad superior al 100% con respecto de los controles. Esta información puede entenderse como proliferación celular, sin embargo, el ensayo MTT evalúa la viabilidad celular en función de la actividad metabólica presente en el cultivo celular. Esta actividad metabólica es proporcional a la cantidad de formazán formada en el pocillo y no necesariamente se debe a la actividad producida por los linfocitos. Si la respuesta no se observa en ambos grupos celulares, es decir, tanto en linfocitos como en monocitos, existe la posibilidad de que algunos de los pozos evaluados presenten contaminación bacteriana. Si analizamos los valores individuales, es decir, los valores por triplicado para cada concentración dentro de cada ensayo (ver anexos), podremos observar que en realidad se debe a que uno de esos pozos presenta una diferencia significativa, lo que afecta al promedio de las tres muestras como es el caso para Pluronic® P123-PVP-PEG, donde uno de los pozos presenta un valor de viabilidad de 213%, mientras que las dos muestras restantes mantienen un 93 y 94% respectivamente. Algo similar ocurre con la muestra Pluronic® P123-PVP, aunque en este caso dos de las muestras sobrepasan el 100% de viabilidad, la muestra restante indica un valor de 91% que se relaciona más con la media de todas las muestras evaluadas. En el primer caso podríamos descartar el pozo significativamente diferente y obtendríamos un resultado congruente al comportamiento observado en el conjunto de valores. De la misma manera para Pluronic® P123-PVP, aunque en este caso, al ser dos de los tres pozos, sería recomendable repetir el ensayo evaluando específicamente esa concentración y así determinar si el primer resultado es un caso aislado o se reproduce en cada evento. De tal forma que podríamos centrarnos en identificar por qué se está generando dicha respuesta. Sin embargo, los ensayos biológicos están comúnmente sujetos a contaminación por manipulación, por lo que en este caso podemos atribuirle a ese motivo al resultado observado. Es poco probable observar proliferación celular en cultivos de células mononucleares dentro de las primeras 24 horas debido a que no es sino hasta las 36 horas del cultivo cuando este proceso se lleva a cabo. Es conocido que, entre las 24 y 36 horas aumenta la actividad celular porque las células se preparan para llevar a cabo la diferenciación celular. De tal manera que, debido a que los ensayos se fijaron al cumplir 24 horas, el número de células no pudo haber incrementado. Un proceso de diferenciación dentro de las primeras 24 horas estaría relacionado a una respuesta inflamatoria grave lo cual no estaría en concordancia con la bibliografía consultada que reporta la inocuidad de estos polímeros.

Para las mediciones de las densidades ópticas en el ensayo de MTT se utilizó el filtro de 600/690 nm, el recomendado en la literatura es de 570/690 nm. Sin embargo; Maldonado et al. (2018) y el protocolo MTT de la compañía ATCC (ATCC® 30-1010K), mencionan que el intervalo de detección del formazán puede ser entre 500-600 nm. Algunos datos de densidades ópticas se encuentran fuera del intervalo recomendado

de absorbancias (0.75 - 1.25) para el ensayo MTT. Sin embargo, la mayor parte de los datos si corresponden a la misma.

Según indica el protocolo indicado para evaluar viabilidad y citotoxicidad celular por MTT, se debe sembrar un total de 100,000 células por pozo. Debido a una de las extracciones sanguíneas realizadas se obtuvo un menor número de células durante la realización del protocolo de aislamiento por gradiente de densidades, se tuvo que ajustar el resultando a un sembrado de aproximadamente 80,000 células en los monocitos de la primera muestra evaluada.

Con motivo de la variación de los datos observados en los resultados individuales, fue necesario corroborar la confiabilidad de los resultados realizando un análisis estadístico para cada ensayo. Se realizó un ANOVA de dos factores con una confiabilidad del 95% ($p \leq 0.05$) para determinar si se presenta una diferencia significativa dentro de los datos evaluados. Este análisis relaciona dos factores independientes, en este caso los polímeros y la concentración, sobre la viabilidad celular o variable dependiente. Como el resultado estadístico no presentó diferencia significativa, es decir, que la viabilidad celular no se ve influenciada, ni negativa ni positivamente a causa de la concentración o el tipo de polímero, estas diferencias se le atribuyen a la variabilidad genética presente en individuos. Por tal razón será necesario que los siguientes ensayos toxicológicos correspondan a evaluar los polímeros en organismos vivos que correspondan a una población para corroborar o refutar la presencia de efectos adversos. El siguiente ensayo factible sería determinar la dosis letal en ratones CD1, que en toxicidad aguda sería evaluar a que concentración las muestras causan muerte en ratones. Esto para determinar su peligro asociado y no tanto la toxicidad intrínseca, es decir, determinar la posibilidad de que el material cause efectos dañinos a causa de sus características y no tanto de los factores específicos o circunstancias bajo las que se encuentre cada administración (García et. al, 2012).

Bajo la norma ISO 10993 que describe métodos de prueba para evaluar la toxicidad *in vitro* asociada a dispositivos médicos y cuya clasificación menciona que una viabilidad entre un 75 y 100% corresponde a un agente no tóxico, de tal manera que podemos decir que no existe un efecto citotóxico agudo asociado con las muestras analizadas.

Cabe destacar que estos ensayos se realizaron para conocer el primer grado de respuesta de estos materiales y compararlos con la respuesta presentada a Pluronic® P123 que es un polímero comercial y del cual ya existe una base de información. Sin embargo, los polímeros elaborados para esta investigación son polímeros no patentados que se pretende tengan aplicación biomédica como transportadores de

fármacos, principalmente porque se demostró que existe una respuesta a estímulos biológicos. Asimismo, fueron probados cargados con fármacos teniendo resultados favorables.

El estudio con fármacos es otro punto que debe tomarse en cuenta para el desarrollo completo sobre el estudio de estos materiales. Está reportado que los materiales poliméricos a los que se les incluyen agentes activos incrementan su tamaño y características como potencial Zeta y su área superficial se ven afectados. Debido a que, en ámbitos moleculares, la morfología, el tamaño y la variación de las propiedades fisicoquímicas son fundamentales en las funciones biológicas, lo que en primera instancia podría observarse como un agente sin efectos adversos, al incluir estos cambios es necesario realizar pruebas de toxicidad posteriores como daño al ADN y vía de muerte celular en el caso que se presente algún efecto citotóxico.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se extrajeron y aislaron exitosamente linfocitos y monocitos de sangre periférica humana. Las muestras de sangre se obtuvieron de donantes sanos entre 20 y 35 años, intervalo considerado dentro de los parámetros de inclusión. Se aislaron las células mononucleares presentes en sangre utilizando un gradiente de densidades, se recolectaron y se realizaron cultivos celulares primarios para linfocitos y monocitos de manera independiente.
- Se cuantificó la viabilidad celular en cultivos teñidos con azul tripano. Se realizó un ensayo para linfocitos y monocitos en una placa de 96 pocillos expuestos a las muestras de nanopolímeros Pluronic® P123, Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG a concentraciones de 1, 10 y 100 mg/ml por 24 horas, posteriormente se tiñeron y fijaron para evaluar el número de células vivas. Los valores resultantes se compararon con el valor de referencia o control negativo para determinar un porcentaje de viabilidad. Se obtuvieron resultados equivalentes a los reportados en la literatura para polímeros Pluronic® P123. Para Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG se obtuvieron resultados superiores al 75% de viabilidad celular concluyentes con un resultado no tóxico. La significativa variación de la desviación estándar que representa la dispersión de los datos en se le atribuyó al número de muestras evaluadas ya que es necesario tener una población mayor de datos para determinar la variabilidad entre individuos.
- Se evaluó la viabilidad celular en función de la actividad metabólica por el ensayo de MTT por medio de un ensayo por triplicado para linfocitos y monocitos en placas de 96 pocillos de manera independiente. Se expusieron las células a las concentraciones de nanopolímeros por 24 horas y se aplicó el protocolo con el MTT para evaluar la viabilidad celular en respuesta de la actividad metabólica presente. Los resultados en ambos cultivos primarios, linfocitos y monocitos, mostraron un efecto similar en los tres polímeros a concentraciones de 1 y 100 mg/ml, sin embargo, en Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG en linfocitos, a concentraciones de 10 mg/ml se obtuvo una actividad metabólica significativamente superior al 100%.
- Los resultados correspondientes a una viabilidad superior al 100% con respecto de los controles en el ensayo de MTT se le atribuyó a la presencia de contaminación en y error de manipulación en los pocillos de la placa en la que se observaban estos resultados. Esto debido a que las mismas muestras evaluadas en otros pozos no presentaban dicho comportamiento.

- Se determinó el efecto citotóxico agudo de las muestras en los cultivos de sangre periférica humana obteniéndose un resultado no-tóxico dentro de la clasificación ISO 10993-5, así como no se encontró diferencia significativa en el efecto del polímero o la concentración del mismo en la viabilidad celular.
- Se concluyó que los nuevos materiales de nanopolímeros Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG no presentan una respuesta adversa al primer contacto con las células del sistema inmune, sin embargo, se sugieren pruebas de internalización y bioacumulación, así como realizar ensayos citotóxicos a 48 y 72 horas para estudiar el comportamiento-respuesta de las células a una exposición más prolongada.
- Las variaciones entre los resultados entre individuos se le atribuyó a la variabilidad genética existente en la población. Se sugiere continuar con la investigación realizando ensayos toxicológicos en organismos vivos para determinar la dosis letal en una misma población.
- En relación a los resultados presentados, se plantea que Pluronic® P123-PVP y Pluronic® P123-PVP-PEG son nanopolímeros potencialmente aplicables al transporte de fármacos de manera segura ya que mostraron resultados favorables en respuesta de la viabilidad celular y, en comparación a Pluronic® P123, la adición de PVP y, sobre todo PEG, sugiere una menor respuesta en la disminución de la viabilidad celular.

Literatura citada

- Arroyo, E. C. 2017. Desarrollo de un sistema de transporte y liberación de fármacos basado en nanopartículas poliméricas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 81 pp.
- Bhattacharjee, J., Verma, G., Aswal, V. K., Patravale, V., Hassan, P. A. 2013. Microstructure, drug binding and cytotoxicity of Pluronic P123-aerosol OT mixed micelles. *RSC Advances*, 3(45), 23080–23089. doi:10.1039/c3ra44983a
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951. doi:10.1038/nbt.3330
- Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4), 17–71. doi:10.1116/1.2815690
- Coillard, A., Segura, E. 2019. *In vivo* Differentiation of Human Monocytes. *Frontiers in Immunology*. 10 (1907) pp 1–7. doi:10.3389/fimmu.2019.01907
- D'souza, A. A., Shegokar, R. 2016. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(9), pp 1257–1275. doi:10.1080/17425247.2016.1182485
- Eldridge, L. 2020. Cytotoxic Actions and Precautions. Recuperado el 15 de septiembre de 2020 de <https://www.verywellhealth.com/cytotoxic-definition-and-examples-2249082>
- Elsaesser, A., Howard, C. V. 2012. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129–137. doi:10.1016/j.addr.2011.09.001
- English, D., Andersen, B. R. 1974. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of Immunological Methods*, 5(3), 249–252. doi:10.1016/0022-1759(74)90109-4
- Fang, I., & Trewyn, B. G. 2012. Chapter 3 - Application of Mesoporous Silica Nanoparticles in Intracellular Delivery of Molecules and Proteins. In *Nanomedicine: Cancer, Diabetes, and Cardiovascular, Central Nervous System, Pulmonary and Inflammatory Diseases* (1st edition) *Methods in Enzymology*, 508 pp. 46-59. doi:10.1016/B978-0-12-391860-4.00003-3
- Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. In *Nanomedicine*, 4 pp 93-126. doi:10.2217/nnm-2018-0120
- García E., Valverde M. A., Agudo J., Novales M., Luque, I. Toxicología clínica. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México. pp 667 - 711

- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. 2010. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. doi:10.1002/path.2697
- Golstein, P., Griffiths, G. M. 2018. An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nature Reviews Immunology*, pp. 527–535. doi:10.1038/s41577-018-0009-3
- Grumezescu, A. M. 2017. Nano- and microscale drug delivery systems: Design and fabrication. *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*. Elsevier. pp. 1–491. doi:10.1016/C2016-0-02239-8
- Guan, Y., Huang, J., Zuo, L., Xu, J., Si, L., Qiu, J., & Li, G. 2011. Effect of pluronic P123 and F127 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism. *Archives of Pharmacal Research*, 34(10), 1719–1728. doi:10.1007/s12272-011-1016-0
- Hobson, D. W., Roberts, S. M., Shvedova, A. A., Warheit, D. B., Hinkley, G. K., Guy, R. C. 2017. Applied Nanotoxicology. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. doi:1177/1091581816628484.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. 2015. Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321. doi:10.1177/0960327115603588
- Hussain, S. M., Warheit, D. B., Ng, S. P., Comfort, K. K., Grabinski, C. M., & Braydich-Stolle, L. K. 2015. At the crossroads of nanotoxicology *in vitro*: Past achievements and current challenges. *Toxicological Sciences*, 147(1), 5–16. doi:10.1093/toxsci/kfv106
- Italiani, P., & Boraschi, D. 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages : phenotypical vs . functional differentiation. 5, pp 1–22. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
- Katial, R. K., Sachanandani, D., Pinney, C. 1998. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. *Clinical and Liagnostic Laboratory Immunology*. 5(1) pp. 78–81
- Kay, H. D. 1980. A new procedure to overlay diluted blood on ficoll-hypaque gradients. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 01(01), 1689–1699.
- Kent, C. 1998. Chapter 4 - The Dose - Response Relationship. *Basics of Toxicology: Preserving the Legacy* (1st Edition). John Wiley & Sons Inc Print on, New York (p. 79).
- Kurakula, M., Rao, G. S. N. K. 2020. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60(September), 102046. doi:10.1016/j.jddst.2020.102046
- Leavitte, E., Lask, G., Martin, S. (2019). Sonic Hedgehog Pathway Inhibition in the Treatment of Advanced Basal Cell Carcinoma. *Current Treatments Options in Oncology*. 20(84) pp 1-12. doi:10.1007/s11864-019-0683-9

- Liu, X., Tang, R. 2017. Biological responses to nanomaterials : understanding nano-bio effects on cell behaviors. *Drug Delivery*, 24 (2), 1–15. doi:10.1080/10717544.2017.1375577
- Maldonado C, J., Casañas P, G., Martínez M, I. E., San Martín M, E. 2018. La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American Journal of Physics Education* 12 (2) pp 1-7
- Mookerjee, B. K., Ballard, J. 1979. Functional Characteristics of Monocytes II. Further observations on Lymphocyte-Monocyte Collaboration in the Response to Phytomitogens.
- OMS. 2018. Cáncer. Recuperado el 19 de septiembre de 2019 de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Osinski, V. 2019. Isolating immune cells from peripheral blood. recuperado el 49 de agosto de 2020 de <https://www.novusbio.com/antibody-news/isolating-immune-cells-from-peripheral-blood-how-and-when-to-use-density-gradient-centrifugation>
- Pasquali, R. C., Chiappetta, D. A., & Bregni, C. 2005. Los copolímeros en bloques anfífilos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 24(4), 610–618.
- ThermoFisher Scientific. PBS buffer. Consultado el 3 de diciembre de 2020 de <file:///C:/Users/Edgar/Documents/EDGAR/CICESE/Proyecto%20de%20Tesis/Metodolog%C3%ADa/PBS%20buffer.html#/PBS%20buffer.html>
- Phillips, J. R., Cadwallader, D. E. 1971. Erythrocytes in Phosphate Buffer Systems. 60(7), pp 1033–1035.
- Ragelle, H., Danhier, F., Pr at, V., Langer, R., & Anderson, D. G. 2017. Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(7), 851–864. doi:10.1080/17425247.2016.1244187
- Raulf-Heimsoth, M. 2008. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods in Molecular Medicine*, 138, pp 17–30. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0_2
- Raulf, M. 2019. T cell: Primary culture from peripheral blood. *Methods in Molecular Biology*, pp 17–31. doi:10.1007/978-1-4939-9591-2_2
- Reinholz, J., Landfester, K., & Mail ander, V. 2018. The challenges of oral drug delivery via nanocarriers. *Drug Delivery*, 25(1), 1694–1705. doi:10.1080/10717544.2018.1501119
- Riedhammer, C., Halbritter, D., Weissert, R. 2014. Peripheral Blood Mononuclear Cells : Isolation, Freezing , Thawing , and Culture. doi:10.1007/7651
- S ez, V., Hern ez, E., Sanz Angulo, L. 2004. Mecanismos de liberaci n de f armacos desde materiales pol meros. *Revista Iberoamericana de Pol meros*, 5(1), 55–70.

- 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), pp 115–124.
- Sanz, P., & Repetto, M. 1993. *Glosario De Terminos Toxicologicos*. Asociación Española de Toxicología. p 78
- Schultz, K. T., Grieder, F. 1987. Structure and function of the immune system in the spleen. *Toxicologic Pathology*, 15(3), 262–264
- Shakya, A. K., Al-Najjar, B. O., Deb, P. K., Naik, R. R., & Tekade, R. K. 2018. Chapter 8 - First-Pass Metabolism Considerations in Pharmaceutical Product Development. Tekade, R. K. (Eds.), In *Dosage Form Design Considerations: volume I (Advances in Pharmaceutical Product Development and Research)*. Academic Press, United Kindom (pp. 259-286)
- Sigma-Aldrich. 2020. Ficoll. Recuperado el 17 de septiembre de 2019 de <https://qaci.sial.com/catalog/product/sigma/10771?lang=en®ion=US>
- Sigma Aldrich. 2012. In vitro toxicology assay kit MTT based. Sigma Aldrich, pp. 3–4.
- Sollome, J., Fry, R. C. 2015. Environmental Contaminants and the Immune System: A Systems Perspective. In *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*. pp. 171-186. doi:10.1016/B978-0-12-801564-3.00007-9
- Sompayrac, L. M. 2016. Chapter 1 - A review. *How the Immune System Works (6th Edition)*. John Wiley & Sons, p. 3
- Stoddart, M. J. 2011. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols - Cell Viability Assays. *Methods in Molecular Biology*, 740, pp 1–6. doi:10.1007/978-1-61779-108-6
- Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., & Haidar, Z. S. 2018. Polymeric nanoparticle systems: Structure, elaboration methods, characteristics, properties, biofunctionalization and self-assembly layer by layer technologies. *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463–1471. doi:10.4067/S0717-95022018000401463
- Wadhwa, S., Mumper, R. J. 2015. Polymer-drug conjugates for anticancer drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 32(3), pp 215–245. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2015010174
- Walker, N. J., Bucher, J. R. 2009. A 21st century paradigm for evaluating the health hazards of nanoscale materials? *Toxicological Sciences*, 110(2), 251–254. doi:10.1093/toxsci/kfp106
- Yang, N., Ray, S. D., & Wayne, F. 2014. Cell Proliferation. In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edit)*. Minneapolis, USA. 3(1) pp 495–498. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00274-8>

- Zhang, G., Zeng, X., Li, P. 2013. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9(5), 741–750. doi:10.1166/jbn.2013.1583
- Zhao, L. Y., Zhang, W. M. 2017. Recent progress in drug delivery of pluronic P123: pharmaceutical perspectives. *Journal of Drug Targeting*, 25(6), pp 471–484. doi:10.1080/1061186X.2017.1289538
- Zhou, L., Somasundaram, R., Nederhof, R. F., Dijkstra, G., Faber, K. N., Peppelenbosch, M. P., Fuhler, G. M. 2012. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(7), 1065–1074. doi:10.1128/CVI.05715-11

Anexos

Anexo A. Datos referentes al ensayo con azul tripano

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1	0	2	1	8	11	11	13	
B	7	11	8	9	8	9	9	11	9
C	7	9	11	11	8	10	9	11	10
D	9	9	9	10	9	11	8	11	11
E	0	1	1	0	9	11	8	9	
F	6	8	7	7	8	7	7	9	7
G	7	7	9	8	7	9	6	9	8
H	6	9	7	9	7	7	6	9	9

Figura 31. Conteo celular en linfocitos y monocitos por azul tripano realizado bajo microscopio óptico correspondiente a la placa de 96 pocillos. Se representa el número de células por pozo vistas bajo microscopio en el hemocitómetro en 10 µl de cultivo celular. La distribución corresponde de A-D para linfocitos, siendo A1-A4 los controles positivos y A5-A8 controles negativos. B representa a las muestras de polímeros Pluronic® P123 de mayor a menor concentración por triplicado. El mismo fundamento se aplica para monocitos, valores correspondientes a la distribución desde E hasta H.

A1. Cálculo de las células totales por pozo.

Se promedian los valores (dependiendo del número repeticiones) para cada grupo de muestras. Es decir, los estímulos están hechos por triplicado por lo que se suman los tres valores correspondientes y se divide entre 3. Por otra parte, se tomaron 4 valores para cada control por lo que se hace el cálculo para cuatro valores.

Ejemplo: Para el control negativo en monocitos tenemos el promedio de células

$$\text{células promedio} = \frac{8 + 11 + 11 + 13}{4}$$

De ecn. (1) página 35, tenemos para el control negativo en linfocitos que

$$\text{concentración celular (C-)} = \left(\frac{43}{4}\right)(1.5)(10,000)$$

$$C- = (10.75)(1.5)(10,000)$$

$$C- = 40,312.5 \text{ células}$$

El factor de dilución se obtiene debido a que, del medio del cultivo celular original (100%) se utilizaron 148 μl por pozo y se llevó hasta 220 al volumen final diluyendo el número de células presentes originalmente. De la misma forma aplica para monocitos, sin embargo, debido al número de células totales se utilizaron 155 μl del cultivo original obteniéndose así un factor de dilución de 1.4.

Para el control negativo en monocitos tenemos:

$$\text{células promedio} = \frac{8 + 11 + 11 + 13}{4}$$

De (1) tenemos para el control negativo en monocitos que

$$\text{concentración celular } (C-) = \left(\frac{37}{4}\right)(1.4)(10,000)$$

$$C- = (9.25)(1.4)(10,000)$$

$$C- = 32,375 \text{ células}$$

El mismo procedimiento se realiza con el resto de los datos. Esto se resume en la **figura 32**.

Linfocitos						
	C1	C2	C3	Celulas C1	Celulas C2	Celulas C3
Pluronic P123	8.7	8.7	9.7	32500	32500	36250
P123/PVP	9	9.7	10	33750	36250	37500
P123/PVP/PEG	9	10	10	33750	37500	37500
Controles						
Control +	1			3750		
Control -	10.75			40312.5		
Monocitos						
	C1	C2	C3	Celulas C1	Celulas C2	Celulas C3
Pluronic P123	7	7.3	7.7	24500	25667	26833
P123/PVP	7.7	8	7.7	26833.3	28000	26833
P123/PVP/PEG	7.3	7.7	8	25667	26833	28000
Controles						
Control +	0.5			1750		
Control -	9.25			32375		

Figura 32. Representación del promedio de células y el total correspondiente después de aplicar las formulas. C1, C2 y C3 representan a las concentraciones de la solución con polímeros de 1, 10 y 100 mg/ml respectivamente. De igual forma cada celda tiene su valor correspondiente indicado en el total de células.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	3750	0	7500	3750	30000	41250	41250	48750	
B	26250	41250	30000	33750	30000	33750	33750	41250	33750
C	26250	33750	41250	41250	30000	37500	33750	41250	37500
D	33750	33750	33750	37500	33750	41250	30000	41250	41250
E	0	3500	3500	0	31500	38500	28000	31500	
F	21000	28000	24500	24500	28000	24500	24500	31500	24500
G	24500	24500	31500	28000	24500	31500	21000	31500	28000
H	21000	31500	24500	31500	24500	24500	21000	31500	31500

Figura 33. Representación cuantitativa del número de células totales calculadas por pozo.

A2. Cálculo del porcentaje de viabilidad celular.

El total de células para cada control negativo representa un 100% de viabilidad, de tal modo que la viabilidad del resto de pozos se indicara con respecto a este valor. Es decir

$$Viabilidad\ celular = \frac{\text{número de células por pozo}}{\text{número de células totales (control)}} \times 100 \quad (4)$$

De esta forma obtenemos el porcentaje de viabilidad para cada pozo (ver **figura 34**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	9.3	0.0	18.6	9.3	74.4	102.3	102.3	120.9	
B	65.1	102.3	74.4	83.7	74.4	83.7	83.7	102.3	83.7
C	65.1	83.7	102.3	102.3	74.4	93.0	83.7	102.3	93.0
D	83.7	83.7	83.7	93.0	83.7	102.3	74.4	102.3	102.3
E	0.0	10.8	10.8	0.0	97.3	118.9	86.5	97.3	
F	64.9	86.5	75.7	75.7	86.5	75.7	75.7	97.3	75.7
G	75.7	75.7	97.3	86.5	75.7	97.3	64.9	97.3	86.5
H	64.9	97.3	75.7	97.3	75.7	75.7	64.9	97.3	97.3

Figura 34. Representación de la viabilidad celular por pozo indicada en porcentaje.

A3. Desviación Estándar (DS)

Tabla 4. Valores de viabilidad celular para cada concentración de las muestras con nanopolímeros con su desviación estándar.

	Linfocitos			Monocitos		
	Concentración [mg/ml]					
	1	10	100	1	10	100
Pluronic P123	89.9	80.6	80.6	82.9	79.3	75.7
DS	10.7	5.4	19.4	12.5	6.2	10.8
P123/PVP	93.0	89.9	83.7	82.9	86.5	82.9
DS	9.3	14.2	18.6	16.5	10.8	12.5
P123/PVP/PEG	93.0	93.0	83.7	86.5	82.9	79.3
DS	16.1	9.3	0.0	18.7	12.5	16.5

Tabla 5. Conjunto de valores de viabilidad celular general ordenada de menor a mayor concentración utilizada para la gráfica comparativa entre estímulos y controles. Valores para linfocitos representados en verde. Valores para monocitos representados en rosa.

	Concentración [mg/ml]	Viabilidad %	DS (%)
P123 1 mg/ml	1	89.9	10.7
P123 1mg/ml	1	82.9	12.5
P123-PVP 1 mg/ml	1	93.0	9.3
P123-PVP 1 mg/ml	1	82.9	16.5
P123-PVP-PEG 1 mg/ml	1	93.0	16.1
P123-PVP-PEG 1 mg/ml	1	86.5	18.7
P123 10 mg/ml	10	80.6	5.4
P123 10 mg/ml	10	79.3	6.2
P123-PVP 10 mg/ml	10	89.9	14.2
P123-PVP 10 mg/ml	10	86.5	10.8
P123-PVP-PEG 10 mg/ml	10	93.0	9.3
P123-PVP-PEG 10 mg/ml	10	82.9	12.5
P123 100 mg/ml	100	80.6	19.4
P123 100 mg/ml	100	75.7	10.8
P123-PVP 100 mg/ml	100	83.7	18.6
P123-PVP 100 mg/ml	100	82.9	12.5
P123-PVP-PEG 100 mg/ml	100	83.7	0.0
P123-PVP-PEG 100 mg/ml	100	79.3	16.5
Control +		9.3	7.6
Control +		5.4	6.2
Control -		100.0	19.2
Control -		100.0	13.6

A4. Análisis estadístico de los datos: ANOVA de dos factores

Tabla 6. Planteamiento del análisis estadístico

ANOVA DE DOS FACTORES		
Variables independientes	Polímero	Concentración
Variable dependiente	Viabilidad	

Confiabilidad	95%
P	0.05

Ho	Las medias de las concentraciones son iguales
H1	Al menos una media de las concentraciones es diferente
Ho	Las medias de los tipos de polímero son iguales
H1	Al menos una media de los tipos de polímero es diferente

Tabla 7. Distribución de valores para ANOVA de dos factores

Tabla de valores					
	1 mg/ml	10 mg/ml	100 mg/ml	suma	suma2
P123	89.9	80.6	80.6	251.1	21074.7
P123	82.9	79.3	75.7	237.9	18891.4
P123-PVPV	93.0	89.9	83.7	266.6	23736.7
P123-PVPV	82.9	86.5	82.9	252.3	21227.1
P123-PVP-PEG	93.0	93.0	83.7	269.7	24303.7
P123-PVP-PEG	86.5	82.9	79.3	248.7	20643.2
suma	528.2	512.2	485.9	1526.3	777442.9

Tabla 8. Suma de cuadrados para el cálculo de las diferentes varianzas

FC	Factor de corrección	129421.8
SCT	Suma de cuadrados totales	648021.1
SCB	Suma de cuadrados de los bloques	234.3
SCTR	Suma de cuadrado de los tratamientos	152.1
SCE	Suma cuadrados del error	647634.8

Tabla 9. Resultado estadístico F_{ratio} que sigue una distribución Fisher-Snedecor con $k-1$ y $N-t$ grados de libertad, se puede conocer la probabilidad de obtener valores iguales o más extremos que los observados.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados de totales	Cuadrados medios	F		Fc
T	17	648021.1	38118.9			
B	5	234.3	46.9	FB	0.00072363	3.32583453
TR	2	152.1	76.0	FTR	0.00117392	4.10282102
e	10	647634.8	64763.5			

Tabla 10. Resultado concluyente del análisis estadístico para el ensayo realizado por azul tripano

Fc>F	No Diferencia Significativa
----------------	------------------------------------

No hay diferencia significativa entre bloques (Polímeros)
No hay diferencia significativa entre tratamientos (Concentración)

Anexo B. Datos referentes al ensayo con MTT

Anexo B1. Datos Individuo 1

Tabla 11. Valores de densidad óptica para la muestra de sangre del individuo 1 analizada en ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.092	0.098	0.623	0.977	1.321	1.344	1.443	1.405	1.513	0.044
B	1.103	1.115	1.126	1.1	1.095	1.106	1.095	1.102	1.112	0.048
C	1.114	1.104	1.115	1.114	1.13	1.129	1.096	1.099	1.102	0.045
D	1.125	1.11	1.128	1.153	1.127	1.109	1.123	1.11	1.102	0.06
E	0.085	0.084	0.088	0.064	1.483	1.394	1.353	1.44	1.394	0.049
F	1.103	1.109	1.113	1.097	1.099	1.103	1.108	1.109	1.115	0.037
G	1.113	1.106	1.106	1.123	1.107	1.107	1.098	1.101	1.112	0.049
H	1.124	1.115	1.114	1.104	1.101	1.101	1.108	1.103	1.114	0.047

Tabla 12. Distribución ordenada de datos correspondientes a densidad óptica registrada para los resultados y su desviación estándar asociada.

		Linfocitos		Monocitos	
	mg/ml	Σ (DO)	DS (DO)	Σ (DO)	DS (DO)
Pluronic® P123	100	1.115	0.012	1.108	0.005
Pluronic® P123-PVP	100	1.111	0.006	1.108	0.004
Pluronic® P123-PVP-PEG	100	1.121	0.010	1.118	0.006
Pluronic® P123	10	1.100	0.006	1.100	0.006
Pluronic® P123-PVP	10	1.124	0.009	1.112	0.009
Pluronic® P123-PVP-PEG	10	1.130	0.022	1.102	0.022
Pluronic® P123	1	1.103	0.009	1.111	0.004
Pluronic® P123-PVP	1	1.099	0.003	1.104	0.007
Pluronic® P123-PVP-PEG	1	1.112	0.011	1.108	0.006
Control +	Agua inyectable	0.271	0.305	0.078	0.012
Control -	Células sin tratar	1.396	0.086	1.439	0.045
	Blanco	0.047	0.006		

% Células viables = (Densidad Óptica Muestra x 100) ÷ Densidad Óptica de Células sin trata

Tabla 13. Distribución ordenada de datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada para los resultados y su desviación estándar asociada.

		Linfocitos		Monocitos	
	mg/ml	Σ (%)	DS (%)	Σ (%)	DS (%)
Pluronic® P123	100	79.861	1.340	77.021	1.131
Pluronic® P123-PVP	100	79.599	0.709	77.021	0.908
Pluronic® P123-PVP-PEG	100	80.315	1.124	77.670	1.237
Pluronic® P123	10	78.835	0.642	76.419	1.237
Pluronic® P123-PVP	10	80.554	1.044	77.299	2.014
Pluronic® P123-PVP-PEG	10	80.936	2.577	76.581	4.970
Pluronic® P123	1	79.026	0.995	77.183	0.851
Pluronic® P123-PVP	1	78.739	0.350	76.697	1.656
Pluronic® P123-PVP-PEG	1	79.647	1.235	77.021	1.237
Control +	Agua inyectable	19.416	35.520	5.397	2.662
Control -	Células sin tratar	100.000	10.000	100.000	10.000

r

Tabla 14. Distribución del contenido en la placa de 96 pocillos que corresponde a la cantidad de medio, cultivo celular y estímulos agregados.

Linfocitos	
Positivo	138 μ l células + 61.2 μ l de agua inyectable
Negativo	138.8 μ l células + 61.2 μ l de medio
Muestras	138.8 μ l células + 10 μ l de estímulo + 51.2 μ l de medio
Cargado	100,000 células por pozo
Monocitos	
Positivo	138 μ l células + 61.2 μ l de agua inyectable
Negativo	138.8 μ l células + 61.2 μ l de medio
Muestras	138.8 μ l células + 10 μ l muestra + 51.2 μ l de medio
Cargado	81,597 células por pozo

Anexo B2. Datos Individuo 2

Tabla 15. Valores de densidad óptica para la muestra de sangre del individuo 2 analizada en ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.056	0.057	0.054	0.054	1.264	1.128	1.162	1.085	1.3	0.045
B	1.255	1.185	1.104	1.085	1.089	1.091	1.115	1.112	1.114	0.044
C	1.107	1.104	1.094	2.265	1.182	1.181	1.098	1.118	1.096	0.052
D	1.103	1.107	1.093	1.975	1.085	1.86	1.128	1.113	1.151	0.051
E	0.104	0.091	0.116	0.082	1.379	1.494	1.265	1.535	1.358	0.052
F	1.12	1.11	1.111	1.102	1.107	1.106	1.106	1.104	1.109	0.043
G	1.121	1.127	1.118	1.11	1.11	1.117	1.107	1.128	1.12	0.046
H	1.119	1.12	1.127	1.109	1.103	1.105	1.113	1.115	1.119	0.047

Tabla 16. Distribución ordenada de datos correspondientes a densidad óptica registrada para los resultados y su desviación estándar asociada.

		Linfocitos		Monocitos	
		Σ (DO)	DS (DO)	Σ (DO)	DS (DO)
Pluronic® P123	100	1.181	0.076	1.114	0.006
Pluronic® P123-PVP	100	1.102	0.007	1.122	0.005
Pluronic® P123-PVP-PEG	100	1.101	0.007	1.122	0.004
Pluronic® P123	10	1.088	0.003	1.105	0.003
Pluronic® P123-PVP	10	1.543	0.001	1.112	0.001
Pluronic® P123-PVP-PEG	10	1.640	0.030	1.106	0.081
Pluronic® P123	1	1.114	0.002	1.106	0.003
Pluronic® P123-PVP	1	1.104	0.012	1.118	0.011
Pluronic® P123-PVP-PEG	1	1.131	0.019	1.116	0.003
Control +	Agua inyectable	0.056	0.002	0.092	0.011
Control -	Células sin tratar	1.194	0.104	1.424	0.097
	Blanco	0.048	0.004		

% Células viables = (Densidad Óptica Muestra x 100) ÷ Densidad Óptica de Células sin tratar

Tabla 17. Distribución ordenada de datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada para los resultados y su desviación estándar asociada.

		Linfocitos		Monocitos	
	mg/ml	Σ (%)	DS (%)	Σ (%)	DS (%)
Pluronic® P123	100	98.918	7.274	78.207	0.570
Pluronic® P123-					
PVP	100	92.248	0.655	78.792	0.474
Pluronic® P123-					
PVP-PEG	100	92.192	0.694	78.792	0.451
Pluronic® P123	10	91.131	0.294	77.598	0.316
Pluronic® P123-					
PVP	10	129.175	0.068	78.113	0.073
Pluronic® P123-					
PVP-PEG	10	137.325	2.927	77.645	8.409
Pluronic® P123	1	93.252	0.147	77.692	0.260
Pluronic® P123-					
PVP	1	92.443	1.171	78.535	1.096
Pluronic® P123-					
PVP-PEG	1	94.676	1.843	78.347	0.316
Control +	Agua inyectable	4.661	0.147	6.484	1.144
Control -	Células sin tratar	100.000	10.000	100.000	10.000

Tabla 18. Distribución del contenido en la placa de 96 pocillos que corresponde a la cantidad de medio, cultivo celular y estímulos agregados.

Linfocitos	
Positivo	38.7 μ l células + 100 μ l de agua inyectable + 61.3 μ l medio
Negativo	38.7 μ l células + 161.3 μ l de medio
Muestras	38.7 μ l células + 10 μ l de muestra + 151.3 μ l de medio
Cargado	100,000 células por pozo
Monocitos	
Positivo	137.9 μ l células + 62.1 μ l de agua inyectable
Negativo	137.9 μ l células + 62.1 μ l de medio
Muestras	137.9 μ l células + 10 μ l de muestra + 52.1 μ l de medio
Cargado	100,000 células por pozo

Anexo B3. Datos Individuo 3

Tabla 19. Valores de densidad óptica para la muestra de sangre del individuo 3 analizada en ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.106	0.107	0.104	0.132	1.232	1.205	1.119	1.192	1.15	0.044
B	1.158	1.24	1.298	1.087	1.128	1.122	1.093	1.294	1.194	0.043
C	1.112	1.1	1.093	2.888	2.448	2.311	1.144	1.131	1.137	0.044
D	1.186	1.169	1.189	1.13	1.138	1.126	1.215	1.173	1.195	0.043
E	0.096	0.092	0.1	0.097	1.356	1.472	1.395	1.174	1.458	0.044
F	1.118	1.109	1.104	1.096	1.099	1.099	1.096	1.1	1.098	0.044
G	1.113	1.116	1.11	1.104	1.1	1.104	1.103	1.106	1.107	0.044
H	1.114	1.121	1.115	1.11	1.105	1.105	1.108	1.113	1.116	0.044

Tabla 20. Distribución ordenada de datos correspondientes a densidad óptica registrada para los resultados y su desviación estándar asociada

		Linfocitos		Monocitos	
		Σ (DO)	DS (DO)	Σ (DO)	DS (DO)
Pluronic®					
P123	P1 (100 mg/ml)	1.232	0.070	1.110	0.007
Pluronic®					
P123-PVP	P2 (100 mg/ml)	1.102	0.010	1.113	0.003
Pluronic®					
P123--PVP-					
PEG	P3 (100 mg/ml)	1.181	0.011	1.117	0.004
Pluronic®					
P123	P1 (10 mg/ml)	1.112	0.022	1.098	0.022
Pluronic®					
P123-PVP	P2 (10 mg/ml)	2.549	0.301	1.103	0.301
Pluronic®					
P123-PVP-					
PEG	P3 (10 mg/ml)	1.131	0.006	1.107	0.006
Pluronic®					
P123	P1 (1 mg/ml)	1.194	0.101	1.098	0.002
Pluronic®					
P123-PVP	P2 (1 mg/ml)	1.137	0.007	1.105	0.002
Pluronic®					
P123-PVP-					
PEG	P3 (1 mg/mL)	1.194	0.021	1.112	0.004
Control +	Agua inyectable	0.106	0.002	0.095	0.003
	Células sin				
Control -	tratar	1.195	0.034	1.329	0.144
	Blanco	0.044	0.000		

% Células viables = (Densidad Óptica Muestra x 100) ÷ Densidad Óptica de Células sin tratar

Tabla 21. Distribución ordenada de datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada para los resultados y su desviación estándar asociada.

	mg/ml	Linfocitos		Monocitos	
		Σ (%)	DS (%)	Σ (%)	DS (%)
Pluronic® P123	100	103.118	20.586	83.526	0.493
Pluronic® P123- PVP	100	92.209	2.812	83.726	0.209
Pluronic® P123- PVP-PEG	100	98.877	3.157	84.002	0.263
Pluronic® P123	10	93.102	6.480	82.598	1.539
Pluronic® P123- PVP	10	213.350	88.226	82.949	20.955
Pluronic® P123- PVP-PEG	10	94.692	1.788	83.250	0.425
Pluronic® P123	1	99.909	29.412	82.598	0.139
Pluronic® P123- PVP	1	95.194	1.904	83.149	0.145
Pluronic® P123- PVP-PEG	1	99.965	6.148	83.676	0.281
Control +	Agua inyectable	8.844	0.447	7.146	0.184
Control -	Células sin tratar	100.000	10.000	100.000	10.000

Tabla 22. Distribución del contenido en la placa de 96 pocillos que corresponde a la cantidad de medio, cultivo celular y estímulos agregados.

Linfocitos	
Positivo	27.3 µl células + 100 µl de agua inyectable + 72.7 µl de medio
Negativo	27.3 µl células + 172.7 µl de medio
Muestras	27.3 µl células + 10 µl de muestra + 162.7 µl de medio
Cargado	100,000 células por pozo
Monocitos	
Positivo	138.8 µl células + 61.2 µl de agua inyectable
Negativo	138.8 µl células + 61.2 µl de medio
Muestras	138.8 µl células + 10 µl de muestra + 51.2 µl de medio
Cargado	93,403 células por pozo

Tabla 23. Valores de densidad óptica promediadas de las tres muestras de sangre analizada en ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.085	0.087	0.260	0.388	1.272	1.226	1.241	1.227	1.321
B	1.172	1.180	1.176	1.091	1.104	1.106	1.101	1.169	1.140
C	1.111	1.103	1.101	2.089	1.587	1.540	1.113	1.116	1.112
D	1.138	1.129	1.137	1.419	1.117	1.365	1.155	1.132	1.149
E	0.095	0.089	0.101	0.081	1.406	1.453	1.338	1.383	1.403
F	1.114	1.109	1.109	1.098	1.102	1.103	1.103	1.104	1.107
G	1.116	1.116	1.111	1.112	1.106	1.109	1.103	1.112	1.113
H	1.119	1.119	1.119	1.108	1.103	1.104	1.110	1.110	1.116

Tabla 24. Datos correspondientes al porcentaje de viabilidad registrada para los resultados promediados del ensayo por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	6.7	6.9	20.6		100.9	97.2		97.3	104.7
B	92.9	93.5	93.2	86.5	87.5	87.7	87.3	92.7	90.4
C	88.1	87.4	87.2	165.6	125.8	122.1	88.2	88.5	88.1
D	90.2	89.5	90.1	112.5	88.5	108.2	91.6	89.7	91.1
E	6.8	6.4		5.8	100.6			99.0	100.4
F	79.7	79.4	79.4	78.6	78.8	78.9	79.0	79.0	79.2
G	79.8	79.9	79.5	79.6	79.1	79.4	78.9	79.5	79.6
H	80.1	80.1	80.1	79.3	78.9	79.0	79.4	79.5	79.9

Tabla 25. Estructura general de los datos del ensayo por triplicado MTT representado por los valores de densidad óptica obtenidos del equipo ELISA.

	Concentración [mg/ml]	DO	DS (DO)
P123	100	1.176	0.004
P123	100	1.111	0.002502
P123-PVP	100	1.105	0.005481
P123-PVP	100	1.114	0.002715
P123-PVP-PEG	100	1.134	0.005048
P123-PVP-PEG	100	1.119	0.000192
P123	10	1.100	0.008452
P123	10	1.101	0.002269
P123-PVP	10	1.739	0.304281
P123-PVP	10	1.109	0.003339
P123-PVP-PEG	10	1.300	0.161363
P123-PVP-PEG	10	1.105	0.002524
P123	1	1.137	0.03428
P123	1	1.105	0.002082
P123-PVP	1	1.113	0.002269
P123-PVP	1	1.109	0.005621
P123-PVP-PEG	1	1.146	0.012117
P123-PVP-PEG	1	1.112	0.003672
Control +		0.144	0.10066
Control +		0.088	0.008668
Control -		1.262	0.040116
Control -		1.397	0.01258

Tabla 26. Estructura general de los datos del ensayo por triplicado MTT ordenados en función de la concentración representado por los valores de viabilidad celular calculados.

	Concentración [mg/ml]	Viabilidad %	DS (%)
P123 1 mg/ml	1	90.1	2.7
P123 1mg/ml	1	79.1	0.1
P123-PVP 1 mg/ml	1	88.3	0.2
P123-PVP 1 mg/ml	1	79.4	0.4
P123-PVP-PEG 1 mg/ml	1	90.8	0.0
P123-PVP-PEG 1 mg/ml	1	79.6	0.3
P123 10 mg/ml	10	87.2	0.7
P123 10 mg/ml	10	78.8	0.2
P123-PVP 10 mg/ml	10	137.8	24.1
P123-PVP 10 mg/ml	10	79.4	0.2
P123-PVP-PEG 10 mg/ml	10	103.1	12.8
P123-PVP-PEG 10 mg/ml	10	79.1	0.2
P123 100 mg/ml	100	93.2	0.3
P123 100 mg/ml	100	79.5	0.2
P123-PVP 100 mg/ml	100	87.6	0.4
P123-PVP 100 mg/ml	100	79.7	0.2
P123-PVP-PEG 100 mg/ml	100	89.9	0.4
P123-PVP-PEG 100 mg/ml	100	80.1	0.0
Control +		11.4	8.0
Control +		6.3	0.5
Control -		100.0	3.6
Control -		100.0	0.9

Literatura sugerida y consultada

Wei Z, Yuan S, Hao J, Fang X. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by Pluronic P123/F127 block copolymers: relationship between copolymer concentration and inhibitory activity. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013 Feb;83(2):266-74. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.09.014.