



# Cytotoxicidad de nanopartículas a base de poli (L-glutamato de $\gamma$ -bencilo) cuando es expresada en molaridad

Cytotoxicity of poly ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) based nanoparticles when expressed as molarities

An Young Sarahi Taylor-Castillo<sup>1,2</sup>, Gilles Ponchel<sup>1</sup> and María Elisa Martínez-Barbosa<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Paris Sud, Université Paris Saclay, UMR CNRS 8612, Institut Galien, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

<sup>2</sup> Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, CP 83000, Mexico.

## RESUMEN

En este trabajo se propone un método para calcular la concentración molar en base al número de nanopartículas poliméricas ( $M_{nps}$ ) contenidas en una suspensión coloidal para ser utilizada en estudios de MTT, permitiendo comparar el impacto del número, tamaño y morfología de las nanopartículas en la determinación de la citotoxicidad. Para ello, dos derivados de PBLG, PBLG<sub>35</sub>-bz y PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, fueron sintetizados mediante polimerización por apertura aniónica del anillo  $\gamma$ -bencilo-L-glutamato *N*-carboxianhídrido. Posteriormente, se prepararon nanopartículas por nanoprecipitación. El sistema PBLG<sub>35</sub>-bz presenta morfología esférica y el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> morfología de elipsoide prolato. Para cada sistema de nanopartículas, se midió el eje largo y eje corto y se calculó la relación de aspecto y el diámetro equivalente. La  $M_{nps}$  se determinó tomando en cuenta el número de nanopartículas presentes en un determinado volumen de suspensión coloidal expresado en litros, y el número de Avogadro. Los resultados de MTT permiten concluir que, debido a las diferencias en las características morfológicas de los sistemas estudiados, el mejor enfoque para la evaluación de la citotoxicidad en nanopartículas de PBLG es la utilización de la molaridad en base al número de nanopartículas, en lugar de concentración en base a masa de polímero ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **Palabras Claves:** MTT, molaridad, nanopartículas, PBLG, morfología.

## ABSTRACT

In this work a method is proposed to calculate the molar concentration based on the number of polymeric nanoparticles  $M_{nps}$  contained in a colloidal suspension, to be used in MTT studies, allowing to compare the impact of the nanoparticles number, size and morphology in the determination of their cytotoxicity. For this, two PBLG derivatives, referred as PBLG<sub>35</sub>-bz and PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, were synthesized by anionic ring-opening of the  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate ring *N*-carboxyanhydride polymerization. Subsequently, nanoparticles were prepared by nanoprecipitation. The PBLG<sub>35</sub>-bz system presents spherical morphology and the PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> system presents an ellipsoid prolate morphology. For each system, we measured the long axis and short axis to calculate their aspect ratio and equivalent diameter. The determination

takes into account the number of nanoparticles present in a given volume of colloidal suspension expressed in liters, and the Avogadro number. The MTT results allow us to conclude that, due to the differences in the morphological characteristics of the systems studied, the best approach for the cytotoxicity evaluation of PBLG nanoparticles is the use of molarity based on the number of nanoparticles, instead of concentration based on polymer mass ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

**Keywords:** MTT, molarity, nanoparticles, PBLG, morphology.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente existen áreas de la ciencia enfocadas a la producción de sistemas terapéuticos más eficaces, que permitan reducir los efectos secundarios de los fármacos (de Miguel *et al.*, 2014; Fattal y Vauthier, 2013; Nicolas *et al.*, 2013). Una vez administrados en el organismo, numerosos fármacos se ven comprometidos por las malas propiedades fisicoquímicas que presentan y que conducen a una pobre solubilidad y biodistribución, impedimento para la aplicación efectiva de dichos compuestos. Una estrategia para resolver estas problemáticas ha sido diseñar sistemas acarreadores de fármacos (DDS por sus siglas en inglés) cuyas propiedades y características son moldeadas de acuerdo a la aplicación requerida (Nicolas *et al.*, 2013; Larionova *et al.*, 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Brigger *et al.*, 2002).

En la actualidad existe una gran variedad de sistemas acarreadores de fármacos (Kang *et al.*, 2017; de Miguel *et al.*, 2014; Luhmann *et al.*, 2008; Martínez-Barbosa *et al.*, 2008; Duchêne *et al.*, 1999). Entre ellos, las nanopartículas poliméricas se han convertido en un sistema de transporte versátil para la administración selectiva de fármacos (Patil *et al.*, 2010; Cormode *et al.*, 2009; Couvreur y Vauthier, 2006; Duchêne *et al.*, 1999). En este sentido, los polímeros sintéticos han despertado gran interés por su alto potencial de ser sintetizados con características específicas (Tiwari y Bellare, 2012; Anderson *et al.*, 1985). Entre los polipéptidos se encuentra el poli(L-glutamato de  $\gamma$ -bencilo), PBLG, el cual es un polímero sintético biodegradable de la familia de los poli( $\alpha$ -aminoácidos). El interés en este polímero radica en tres puntos: una amida degradable, un grupo amino reactivo terminal, y una función de ácido carboxílico lateral, disponible después de la hidrólisis del éster bencílico. Características que permiten

\*Autor para correspondencia: María Elisa Martínez-Barbosa  
 Correo electrónico: memartinez@polimeros.uson.mx

Recibido: 5 de septiembre de 2018

Aceptado: 23 de enero de 2019

agregar otras moléculas para obtener derivados de PBLG con propiedades específicas para ser utilizados en nanoacarreadores (de Miguel *et al.*, 2014; Cauchois *et al.*, 2013; Özcan *et al.*, 2011; Martínez-Barbosa *et al.*, 2008; Martínez-Barbosa *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 1985). Por otro lado, el ensayo MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolio bromuro) es un método ampliamente utilizado para determinar la citotoxicidad *in vitro* de una amplia gama de sustancias en las células metabólicamente activas mediante la conversión de MTT en cristales de formazan por la actividad mitocondrial (Tolosa *et al.*, 2015; van Meerloo *et al.*, 2011; Burton, 2005). Según la literatura, la selección apropiada de las células, la preparación de la muestra y el uso de la dosis correcta son consideraciones cruciales para evaluar el nivel de citotoxicidad de las nanopartículas mediante ensayos *in vitro* (Kong *et al.*, 2011). El objetivo del ensayo MTT, es la evaluación de la citotoxicidad de una molécula o compuesto en estado 'libre' (Kong *et al.*, 2011; van Meerloo *et al.*, 2011; Burton, 2005). Por ejemplo, el cisplatino (Jiang *et al.*, 2014) y el bexaroteno (Fu *et al.*, 2011). Para ambos, se realizaron ensayos de MTT con las respectivas moléculas en disolución, a concentraciones micromolares. En nuestro caso, viendo las diferencias en la morfología de las nanopartículas estudiadas, el interés no es evaluar la citotoxicidad de las cadenas del polímero PBLG en solución, sino evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas formuladas con dichas cadenas de PBLG. Para ello, nuestro equipo de investigación desarrolló un método para el cálculo de la concentración molar en base al número de partículas poliméricas o  $M_{nps}$ .

En el presente trabajo se sintetizaron dos derivados de PBLG, el PBLG<sub>35</sub>-bz y el PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, éste último conteniendo un extremo hidrofílico que permite un aumento en el tiempo de residencia en el torrente sanguíneo (Gref *et al.*, 2000). Una vez caracterizados los polímeros, se prepararon nanopartículas por nanoprecipitación, y posteriormente se evaluó su citotoxicidad por ensayo de MTT, encontrando que, debido a las diferencias sustanciales en las características morfológicas de los sistemas formulados, y considerando el principio del ensayo de MTT, el mejor enfoque para la evaluación de la citotoxicidad en nanopartículas de PBLG es la utilización de la molaridad en base al número de nanopartículas en lugar de la manera tradicional de  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

N,N-dimetilformamida (DMF) y bencilamina anhidra fueron adquiridos de Acros Organics. Éter dietílico (DEE), metanol y tetrahidrofurano (THF) fueron adquiridos a Carlo Erba Reagents. Cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), ácido trifluoroacético (TFA), (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil-bromuro de tetrazolio) (MTT), buffer salino de fosfato (PBS), medio Eagle modificado Dulbecco - glucosa alta, penicilina (100 U/mL), y estreptomina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se adquirieron en Sigma-Aldrich. El monómero  $\gamma$ -bencilo-L-glutamato N-carboxianhídrido ( $\gamma$ -BLG-NCA) fue adquirido en ISO-CHEM-SNPE. Todos los disolventes, de grado analítico, así como el monómero, se usaron como se recibieron, a menos que se indique lo contrario.  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino-poli(etilenglicol) (MeO-PEG-NH<sub>2</sub>) Mw = 5000 g/mol de IRIS Biotech GMBH se secó a vacío con atmósfera de argón a 30 °C durante 24 h. El agua se purificó por ósmosis inversa (MilliQ, Millipore).

### Métodos

#### Síntesis de derivados de PBLG

Dos derivados del PBLG, PBLG<sub>35</sub>-bz y PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, el último conteniendo PEG en un extremo, fueron sintetizados mediante polimerización por apertura aniónica del anillo (ROP) del  $\gamma$ -bencilo-L-glutamato N-carboxianhídrido ( $\gamma$ -BLG-NCA), usando como iniciadores el MeO-PEG<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> y bencilamina, respectivamente, en dimetilformamida (DMF), de acuerdo al método descrito por Martínez-Barbosa *et al.* (2007) ligeramente modificado. Brevemente, se pesaron n milimoles de  $\gamma$ -BLG-NCA bajo atmósfera inerte en un matraz de tres bocas purgado con argón (ver Tabla 1). El  $\gamma$ -BLG-NCA se disolvió en DMF anhidro a 30 °C bajo flujo de argón y agitación mecánica. La ausencia de autopolimerización del anhídrido se confirmó por espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR, Perkin Elmer FT-IR espectro II - USA) antes de la adición del iniciador. La solución de iniciador se añadió con una jeringa purgada con argón. La evolución de la reacción fue monitoreada por espectroscopía infrarroja para lo cual se tomaron pequeñas alícuotas directamente de la mezcla de reacción. Los polímeros se obtuvieron por precipitación en un exceso de DEE frío. Para eliminar el exceso de iniciador sin reaccionar, en el caso del PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, el precipitado se filtró y se

**Tabla 1.** Condiciones de la polimerización del  $\gamma$ -BLG-NCA en DMF a 30°C.

**Table 1.** Polymerization conditions of  $\gamma$ -BLG-NCA in DMF at 30 °C.

Polímero	DP Teórico (g mol <sup>-1</sup> )	NCA (mmol)	[M] <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	[I] <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	Tiempo de reacción (días)	Rendimiento (%)	Mw (g mol <sup>-1</sup> )
PBLG <sub>35</sub> -bz	160	13.8	0.5	0.009	3	82	45 000 <sup>(2)</sup>
PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	160	15.2	0.025	0.009	6	80	41 000 <sup>(1)</sup>

(DP<sub>teórico</sub>), indica el grado de polimerización teórico para cada polímero, [M]<sub>0</sub> y [I]<sub>0</sub> son las concentraciones iniciales de NCA e Iniciador, respectivamente. Los polímeros fueron denominados de la siguiente manera: PBLG-seguido del nombre del iniciador (bz=bencilamina, PEG= polietilén glicol), y un número como subíndice indicando el peso molecular teórico de cada segmento dividido por 1000. El peso molecular Mw promedio se determinó por (1) RMN <sup>1</sup>H, ó (2) MALDI-TOF.

lavó tres veces con metanol. Posteriormente, los polímeros se lavaron con DEE frío y se secaron al vacío a temperatura ambiente durante al menos 12 h. Finalmente, se realizó un segundo procedimiento de precipitación, lavado y secado para ambos polímeros.

### Caracterización de derivados de PBLG

#### FT-IR

La estructura de los polímeros obtenidos se confirmó mediante caracterización por FT-IR (en modo ATR) a temperatura ambiente directamente de los polímeros en polvo. Las mediciones se realizaron con un sistema Perkin Elmer FT-IR espectro II - USA.

#### RMN <sup>1</sup>H

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los derivados de PBLG se registraron usando el equipo Bruker B-ACS 60 (Bruker Biospin Automated Control System, Alemania); operado a 300 MHz. Las muestras se analizaron en CDCl<sub>3</sub> y 15% de TFA. Para el PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, el peso molecular se determinó mediante la integración de la señal de los protones bencilo que pertenecen al bloque PBLG (7.26 (br, s, 5H, Ph-) ó 5.04 (br, s, 2H, -CH<sub>2</sub>- bencilo) y los protones de etileno del bloque de PEG (3.65 (br, s, 4H, -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O-)) y teniendo en cuenta el peso molecular del iniciador.

#### MALDI-TOF MS

Los análisis por MALDI-TOF MS se realizaron usando un espectrómetro de masas UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Las adquisiciones se realizaron en modo de ión positivo lineal. La intensidad del láser se estableció justo por encima del umbral de generación de iones para obtener picos con la relación señal/ruido (S/N) más alta posible sin un aumento significativo del pico. Todos los datos fueron procesados utilizando el programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen). Se usó DCTB como matriz y CF<sub>3</sub>COOK como agente cationizante.

### Preparación de nanopartículas poliméricas autoensambladas

La síntesis de nanopartículas de los derivados de PBLG se llevó a cabo por nanoprecipitación de acuerdo al método descrito por Martínez-Barbosa *et al.* (2008), ligeramente modificado. Brevemente, los derivados de PBLG se disolvieron en THF a 30 °C. La solución se añadió gota a gota a una solución de poloxámero F68 al 0.125% p/v bajo agitación magnética. El disolvente fue evaporado mediante un protocolo estandarizado en rotavapor (BUCHI R-210) a 40 °C. Las suspensiones de nanopartículas se filtraron y almacenaron a 4 °C para su uso posterior.

### Caracterización de nanopartículas poliméricas autoensambladas

Dispersión de Luz (DLS) y Potencial Zeta

El radio hidrodinámico y el potencial ζ de las nanopartículas fueron determinados mediante dispersión dinámica

de luz (DLS) y dispersión de luz electroforética, usando el equipo Zetasizer Nano ZS, de Malvern Instruments, Inglaterra. La medición por dispersión dinámica de luz se llevó a cabo a un ángulo de 90°. Para las mediciones de potencial ζ, las muestras fueron diluidas 1:1 con solución salina 1 mM. Se utilizó una celda capilar con electrodos de oro, modelo DTS1070. Los experimentos y las mediciones se realizaron por triplicado (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Diámetro y potencial ζ de los sistemas preparados.

**Table 2.** Diameter and ζ potential of the prepared systems.

Sistema nanoparticulado	Diámetro hidrodinámico (nm) <sup>a</sup>	PDI	Potencial ζ (mV) <sup>b</sup>
PBLG <sub>35</sub> -bz	65 ± 2.3	0.090	-13 ± 0.8
PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	42 ± 0.7	0.099	-10 ± 0.9

<sup>a</sup> Determinados por dispersión de luz dinámica. <sup>b</sup> determinados por dispersión de luz electroforética. Zetasizer 4, Malvern Instruments. Los datos son el promedio de 3 lotes ± SD (desviación estándar), es decir, n=3.

### Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

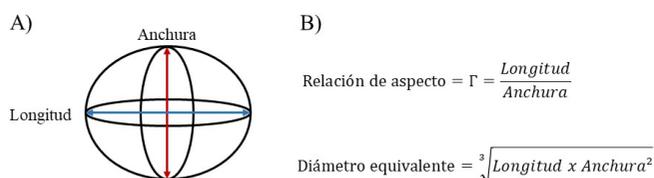
Las nanopartículas de PBLG fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), usando un microscopio JEOL, modelo JEM-1400, USA, equipado con una cámara Orius *High speed*, siguiendo el protocolo establecido por Martínez-Barbosa *et al.* (2008), lo que nos permitió observar tamaño y morfología. Para la preparación de la muestra, se colocaron 5 µL de suspensión de nanopartículas en una rejilla de cobre cubierta con película de formvar-carbono (malla 400). Después de 1 minuto de deposición a temperatura ambiente, se eliminaron las nanopartículas no adherentes y la muestra se tiñó con ácido fosfotúngstico (1%) durante 30 s. La imagen de campo brillante en MET se realizó bajo un voltaje de aceleración de 120 kV. Se utilizó el software ImageJ para analizar las imágenes.

### Análisis de la morfología de las nanopartículas autoensambladas

Debido a que las nanopartículas de los derivados de PBLG utilizados para este estudio pueden ser tanto esféricas como elipsoide prolato, se realizó un análisis de las nanopartículas obtenidas, mediante imágenes de MET para determinar el tamaño y la forma, siguiendo el método propuesto por Martínez-Barbosa *et al.* (2006), así como por Cauchois *et al.* (2013). Para ello, para cada sistema de nanopartículas, se midieron las dimensiones del eje largo (longitud) y el eje corto (anchura), respectivamente, sobre 100 nanopartículas de cada muestra observadas en diferentes imágenes de MET. Las medidas se utilizaron para calcular la relación de aspecto y el diámetro equivalente, siguiendo las ecuaciones de la Figura 1. El análisis se llevó a cabo con ayuda del software ImageJ (ver Tabla 3).

### Determinación de la concentración de la suspensión coloidal en microgramos/mL

Para la determinación de la concentración real de cada suspensión coloidal, en µg/mL, se tomó una alícuota (1 mL)



**Figura 1.** A) Esquema de los ejes medidos over a nanoparticle de PBLG y derivados para el análisis morfológico. B) Fórmulas para calcular la relación de aspecto y el diámetro equivalente.

**Figure 1.** A) Schema of the axes measured over a nanoparticle of PBLG and derivatives for the morphological analysis. B) Formulas to calculate the aspect ratio and the equivalent diameter.

**Tabla 3.** Diámetro promedio, relación de aspecto y diámetro equivalente a la esfera, de las nanopartículas de derivados de PBLG sintetizados.

**Table 3.** Average diameter, aspect ratio and equivalent diameter to the sphere, of the nanoparticles of PBLG derivatives synthesized.

Sistema nanoparticulado	Diámetro promedio (nm)	Relación de aspecto $\Gamma$	Diámetro equivalente (nm)
PBLG <sub>35</sub> -bz	46 ± 8	1.2 ± 0.2	41 ± 7
PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	34 ± 3	1.6 ± 0.3	25 ± 3

Datos promedio de 3 lotes ± SD (n=100).

de cada preparación y se liofilizó en un liofilizador modelo Alfa 1-2 LD plus de la compañía Christ. Posteriormente se calculó el peso de cada muestra y se determinó la concentración (ver Tabla 4).

### Cálculo de la concentración molar en base al número de partículas ( $M_{nps}$ )

El cálculo de la concentración molar en base al número de partículas se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Martínez-Barbosa *et al.* (2006), así como por de Miguel *et al.* (2014) con ligeras modificaciones (ver Tabla 4). El cálculo se obtuvo considerando la densidad del PBLG, el volumen de una nanopartícula, el número de nanopartículas por unidad de volumen de la suspensión coloidal, la masa del polímero,

**Tabla 4.** Tabla de equivalencias de la concentración evaluada en el ensayo de MTT en  $\mu\text{g/mL}$  a la concentración en  $M_{nps}$  para cada sistema estudiado, así como su porcentaje de viabilidad celular por el ensayo MTT (datos sin modificación), en células HUVEC a 24h de incubación.

**Table 4.** Table of equivalences of the concentration evaluated in the MTT assay in  $\mu\text{g/mL}$  at the concentration in  $M_{nps}$  for each system studied, as well as its percentage of cell viability by the MTT assay (data without modification), in HUVEC cells a 24h incubation.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nanopartículas/mL		$M_{nps}$		Relación PBLG <sub>35</sub> -Bz : PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	% de Viabilidad celular ± SD (n=3)	
	PBLG <sub>35</sub> -bz	PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	PBLG <sub>35</sub> -bz	PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>		PBLG <sub>35</sub> -bz	PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>
500	1.15 x 10 <sup>13</sup>	4.5 x 10 <sup>13</sup>	1.9 x 10 <sup>-8</sup>	7.4 x 10 <sup>-8</sup>	1:4	5 ± 0.2	12 ± 1
200	4.6 x 10 <sup>12</sup>	1.8 x 10 <sup>13</sup>	7.6 x 10 <sup>-9</sup>	3.0 x 10 <sup>-8</sup>	1:4	65 ± 10	70 ± 6
100	2.3 x 10 <sup>12</sup>	8.9 x 10 <sup>12</sup>	3.8 x 10 <sup>-9</sup>	1.5 x 10 <sup>-8</sup>	1:4	93 ± 1	79 ± 7
50	1.2 x 10 <sup>12</sup>	4.5 x 10 <sup>12</sup>	1.9 x 10 <sup>-9</sup>	7.4 x 10 <sup>-9</sup>	1:4	95 ± 4	84 ± 8
25	5.8 x 10 <sup>11</sup>	2.2 x 10 <sup>12</sup>	9.6 x 10 <sup>-10</sup>	3.7 x 10 <sup>-9</sup>	1:4	94 ± 5	91 ± 4
10	2.3 x 10 <sup>11</sup>	8.9 x 10 <sup>11</sup>	3.8 x 10 <sup>-10</sup>	1.5 x 10 <sup>-9</sup>	1:4	101 ± 5	93 ± 8
1	2.3 x 10 <sup>10</sup>	8.9 x 10 <sup>10</sup>	3.8 x 10 <sup>-11</sup>	1.5 x 10 <sup>-10</sup>	1:4	109 ± 6	95 ± 4

en gramos, presentes en el volumen de 1 litro de suspensión coloidal, y el número de Avogadro, de la siguiente manera:

$$M_{nps} = \frac{N_{nps}}{N_A V_{susp}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde:  $M_{nps}$  es la Molaridad en base al número de nanopartículas,  $N_{nps}$  es el número de nanopartículas contenidas en un volumen determinado  $V_{susp}$  de suspensión coloidal (expresado en litros), y  $N_A$  es el número de Avogadro.

El número de nanopartículas ( $N_{nps}$ ) se calculó de la siguiente manera:

$$N_{nps} = \frac{V_{PBLG}}{V_{np}} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde:  $V_{PBLG}$  es el volumen ocupado por el polímero, calculado de acuerdo a la ecuación 3, y  $V_{np}$  es el volumen de una nanopartícula. El volumen del polímero PBLG ( $V_{PBLG}$ ) se calculó de la siguiente manera:

$$V_{PBLG} = \frac{m}{\rho_{PBLG}} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde:  $m$  es la masa del polímero, en gramos, determinada después de liofilizar 1 mL de muestra (suspensión coloidal) y multiplicada por 1000 para llegar a la relación de moles/litro, y  $\rho_{PBLG}$  es la densidad del PBLG reportada en la literatura (1.217 g/cm<sup>3</sup>) (Shiau y Labes, 1989). El volumen de una nanopartícula ( $V_{np}$ ) se calculó de la siguiente manera:

$$V_{np} = V_{esf\ eq} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (\text{Ec. 4})$$

donde:  $r$  es el radio equivalente de la esfera, calculado a partir de las mediciones por MET.

## Evaluación de la citotoxicidad por el método de MTT

La prueba de citotoxicidad se realizó mediante el método MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil-tetrazolio-bromuro). Las células del endotelio vascular (HUVEC, ATCC® CRL-1730™) se mantuvieron cultivadas en medio Dulbecco's Eagle modificado (pH 7.4 = 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub>) conteniendo 10 % de suero fetal bovino inactivado, penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada al 95 %, CO<sub>2</sub> al 5 % y 37 °C.

Posteriormente, las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a 7 x 10<sup>3</sup> células/pocillo y se incubaron durante la noche para permitir su adhesión. Luego, se agregaron 100 µL de suspensión de nanopartículas a diferentes concentraciones (2 x 10<sup>-9</sup> - 2 x 10<sup>-12</sup> M) a cada pocillo (tres repeticiones por muestra) y posteriormente se incubaron durante 24 y 48 h en una atmósfera humidificada al 95 % de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 20 µL de MTT (0.5 mg/mL en PBS) durante 2 h adicionales. Posteriormente, los sobrenadantes se eliminaron y se añadieron 200 µL de DMSO para solubilizar los productos de formazano. Las células viables fueron cuantificadas registrando la absorbancia de UV a 570 nm usando un espectrofotómetro de exploración de múltiples pocillos de lector de placas (LabSystems Multiskan MS). Los controles fueron: el medio de cultivo celular, el medio de cultivo celular con la suspensión de nanopartículas a la concentración más alta, y las células no tratadas. El porcentaje de viabilidad se expresó como la tasa de crecimiento relativo (TCR), calculada siguiendo la ecuación 5 (Zhang *et al.*, 2012).

$$TCR (\%) = \frac{(Abs_{muestra} - Abs_{control nps})}{(Abs_{control cel} - Abs_{control medio})} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

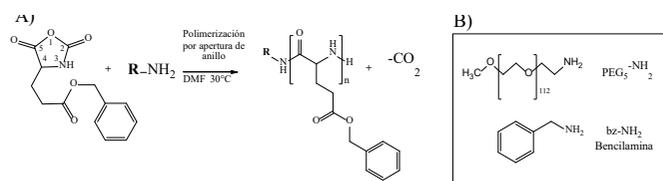
donde:  $Abs_{muestra}$  es la absorbancia detectada de las células después del tratamiento con nanopartículas,  $Abs_{control nps}$  es la absorbancia detectada del medio de cultivo con nanopartículas en las mismas condiciones (para eliminar cualquier absorbancia de nanopartículas),  $Abs_{control cel}$  es la absorbancia de las células de control y,  $Abs_{control medio}$  es la absorbancia del medio de cultivo (para eliminar cualquier interferencia de absorbancia).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis y caracterización de derivados de PBLG

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de dos derivados de PBLG, el PBLG<sub>35</sub>-bz y PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> (ver Tabla 1 y Figura 2). Los subíndices 35 y 5 corresponden al peso molecular teórico en kDa. Las polymerizaciones fueron seguidas por la desaparición de las bandas de absorción de anhídrido a ~ 1855, ~ 1787 y ~ 920 cm<sup>-1</sup> correspondientes a C<sub>5</sub> = O, C<sub>2</sub> = O y C-O-C mediante FT-IR en modo ATR, respectivamente. La desaparición de esas bandas indicó el final de la reacción de polymerización.

Además de permitir el seguimiento de la síntesis de polymerización, las posiciones de las bandas de absorción del grupo amida en los espectros de FT-IR se usan para caracteri-



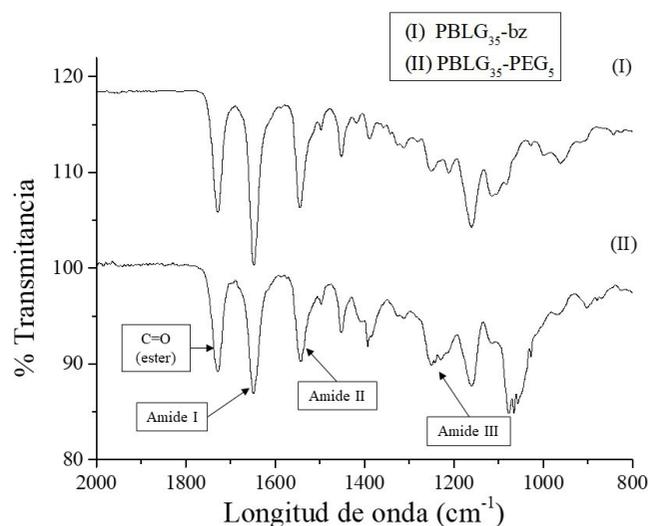
**Figura 2.** A) Esquema de la polymerización del  $\gamma$ -bencilo-L-glutamato *N*-carboxianhídrido a PBLG y derivados. B) Estructura de los iniciadores amino-terminales (R-NH<sub>2</sub>) utilizados en este estudio.

**Figure 2.** A) Polymerization scheme of the  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate *N*-carboxyanhydride to PBLG and derivatives. B) Structure of the terminal-amino initiators (R-NH<sub>2</sub>) used in this study.

zar la conformación del polipéptido. Para un polipéptido en una conformación de  $\alpha$ -hélice, la banda de amida I y la banda de amida II están ubicadas a 1656 cm<sup>-1</sup> y 1548 cm<sup>-1</sup>, respectivamente (Segura-Sánchez *et al.*, 2010; Martínez-Barbosa *et al.*, 2007; Fontaine *et al.*, 2001); y para una conformación  $\beta$ , la banda de amida I y amida II están ubicadas a 1630 cm<sup>-1</sup> y 1536 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Además, se puede observar una banda de absorción próxima a 1260 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la banda de amida III en el espectro FT-IR de un polipéptido en una conformación de  $\alpha$ -hélice (Martínez-Barbosa *et al.*, 2007).

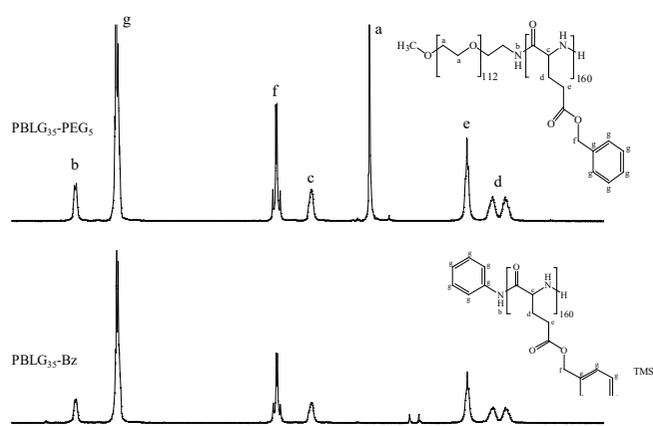
Para los derivados de PBLG obtenidos en el presente trabajo, se observaron las señales correspondientes a las bandas de amida I y amida II a 1654 cm<sup>-1</sup> y 1548 cm<sup>-1</sup>, así como una señal situada a 1260 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la amida III (Figura 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, por lo que se puede determinar que los derivados de PBLG obtenidos en el presente trabajo presentan una conformación de  $\alpha$ -hélice.

Para determinar el peso molecular de cada polímero sintetizado, se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H) y espectrometría de masas por ionización (MALDI-TOF). En la Figura 4, se presentan los espectros de PBLG<sub>35</sub>-bz y PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, respectivamente. En los espectros obtenidos se puede confirmar la presencia de las



**Figura 3.** Espectro de FT-IR de los diferentes derivados de PBLG sintetizados.

**Figure 3.** FT-IR spectra of the different PBLG derivatives synthesized.



**Figura 4.** Espectros RMN  $^1\text{H}$  a 300 MHz de los diferentes polímeros sintetizados.

**Figure 4.**  $^1\text{H}$  RMN to 300 MHz of the different polymers synthesized.

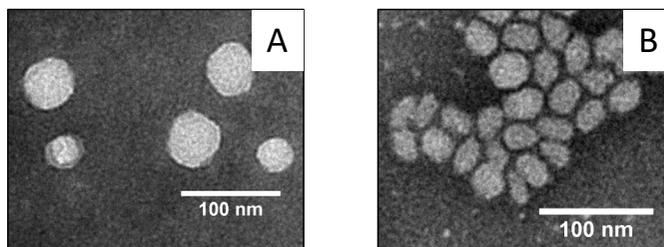
señales características para los derivados de PBLG, las cuales fueron reportadas con anterioridad (Segura-Sánchez *et al.*, 2010; Martínez-Barbosa *et al.*, 2007); Así, el Mw del polímero PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, se determinó por medio de la relación entre las intensidades máximas de la señal de protones del metileno de la cadena PEG (3.65 (br, s, 4H, -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O-) y la señal de protones del bencilo de la cadena PBLG (7.26 (br, s, 5H, Ph-) o 5.04 (br, s, 2H, -CH<sub>2</sub>- bencilo)). Esta relación es posible porque el peso molecular del bloque de PEG (el cual fue usado como iniciador de la polimerización) es fijo. Para el polímero PBLG<sub>35</sub>-bz, se utilizó la técnica de MALDI-TOF, ya que el grupo bencilo está presente tanto en la molécula iniciadora como en la cadena de PBLG. La Tabla 1 resume las condiciones de síntesis para cada caso, el tiempo de reacción, el porcentaje de rendimiento, así como el peso molecular obtenido.

#### Preparación y caracterización de nanopartículas a base de derivados de PBLG

Se obtuvieron nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación, a partir de los dos derivados de PBLG sintetizados, de acuerdo al método descrito por Martínez-Barbosa *et al.* (2008), ligeramente modificado (de Miguel *et al.*, 2014), considerando la naturaleza de los derivados de PBLG, obteniendo suspensiones coloidales estables y reproducibles. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz (DLS) y dispersión de luz electroforética. Podemos observar que las nanopartículas preparadas para ambos casos tienen un diámetro hidrodinámico promedio inferior a 100 nm y un potencial  $\zeta$  negativo.

En lo que respecta a la caracterización por MET, las micrografías obtenidas, permiten apreciar la morfología de las nanopartículas. Para el caso del sistema PBLG<sub>35</sub>-bz, las nanopartículas exhiben una forma semi-esférica (Figura 5-A). Para el caso del sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, se aprecia un cierto grado de elongación (Figura 5-B) la cual es reportada en la Tabla 3.

Considerando la morfología observada en las micrografías de MET, para determinar la diferencia entre ambos sistemas, se realizó un análisis complementario, mediante



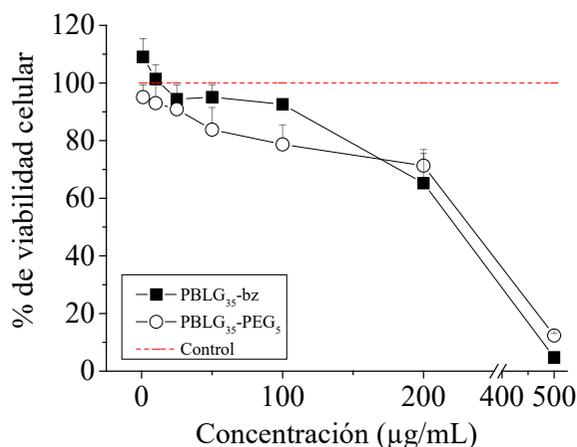
**Figura 5.** Micrografías obtenidas por MET a 120 kV. (A) PBLG<sub>35</sub>-bz, y (B) PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>.

**Figure 5.** Micrographs obtained by TEM at 120 kV. (A) PBLG<sub>35</sub>-bz, and (B) PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>.

la medición individual de la longitud y la anchura máximas sobre 100 nanopartículas, siguiendo el método propuesto por Martínez-Barbosa *et al.* (2006), así como por Cauchois *et al.* (2013). Los resultados obtenidos indican que los sistemas nanoparticulados presentan tallas inferiores a 100 nm (Tabla 3). Además, se llevó a cabo el cálculo de la relación de aspecto, como se indicó en la Figura 1. Este parámetro indica qué tanto se acerca la forma de una partícula a la esfera perfecta, ya que la distancia de una esfera (radio) es igual, independientemente del punto seleccionado en la superficie hacia el centro (Wadell, 1935). Los resultados obtenidos del cálculo de la relación de aspecto (longitud/anchura) concuerdan con lo observado. Considerando que el valor de la relación de aspecto de una esfera es igual a 1, el sistema que se aproxima más a este valor es el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz, cuya relación de aspecto es igual a 1.2. En el caso del sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, la relación de aspecto presenta un valor de 1.5, indicando que la morfología de las nanopartículas preparadas a base de PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, se aleja sutilmente de la morfología esférica, tal y como se puede apreciar en la micrografía por MET.

#### Determinación de la citotoxicidad de nanopartículas formuladas a base de derivados de PBLG por el ensayo de MTT

La evaluación de la citotoxicidad de los sistemas PBLG<sub>35</sub>-bz y PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, se llevó a cabo por el método de MTT. Primeramente, se seleccionó una variedad de concentraciones fijas de polímero en  $\mu\text{g/mL}$  (desde 1 hasta 500  $\mu\text{g/mL}$ ). Para determinar la concentración de polímero en cada suspensión, se realizó la liofilización de un volumen conocido de cada muestra y posteriormente se pesó el liofilizado. En la Figura 6 se muestran los resultados del porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración en masa de polímero, en  $\mu\text{g/mL}$ , obtenidos para ambos sistemas poliméricos. Se puede observar que ambos sistemas presentan perfiles similares. El análisis de resultados permitió determinar para el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz una  $\text{CL}_{50}$  de 278  $\mu\text{g/mL}$  y para el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> una  $\text{CL}_{50}$  de 306  $\mu\text{g/mL}$ . Cuando tabulamos (tabla 4) los resultados del ensayo de MTT en base a la concentración de número de nanopartículas incubadas ( $M_{\text{np}}$ ), en lugar de concentración en masa de polímero ( $\mu\text{g/mL}$ ), se puede observar que existe una gran diferencia entre los valores de  $M_{\text{np}}$  entre un sistema y otro. En la tabla 4, se muestran los resultados del porcentaje de viabilidad (sin



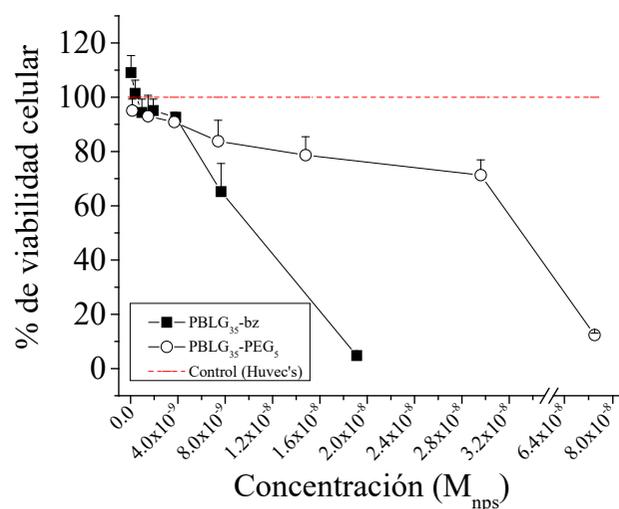
**Figura 6.** Ensayo citotóxico determinado por MTT, en términos de concentración de polímero en µg/mL ( $n = 3$ ), sobre la línea celular HUVEC a 24h de incubación de nanopartículas a base de dos derivados de PBLG preparadas por nanoprecipitación. Control: Células HUVEC sin tratamiento.

**Figure 6.** Cytotoxic assay determined by MTT, in terms of polymer concentration in µg/mL ( $n = 3$ ), over the HUVEC cell line at 24h incubation of nanoparticles based on two PBLG derivatives prepared by nanoprecipitation. Control: HUVEC cells without treatment.

modificación) y las equivalencias de las concentraciones expresadas de ambas maneras, para cada sistema evaluado, retomando los valores obtenidos en la Figura 6. Analizado la Tabla 4, se puede observar que lo que aparentemente sería dos series de nanopartículas a las mismas concentraciones para comparar el efecto en MTT resultan ser dos series incomparables, ya que cada sistema presenta una serie de concentraciones independientes, a pesar de que en un principio se seleccionó una serie aparentemente igual (1-500 µg/mL de polímero). Retomando los resultados de la caracterización por MET de las nanopartículas estudiadas, podemos observar que el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz presenta un tamaño promedio de ~ 46 nm, con un diámetro equivalente de ~ 41 nm, lo que refleja que la nanopartícula presenta una morfología semi-esférica. Por otro lado, el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> presenta un tamaño promedio de ~ 34 nm, con un diámetro equivalente de ~ 25 nm; lo que refleja que el sistema tiene una morfología semi-elongada. Estas diferencias en tamaño, se traducen en diferencias en el volumen de partícula, que al final impacta en el valor de la molaridad  $M_{nps}$  (ver Ecuaciones de 1-4). Primeramente, el valor de diámetro equivalente calculado en el presente trabajo, es un valor que traduce las dimensiones de una partícula a su equivalente en una esfera de superficie igual. Es decir, el diámetro equivalente es el diámetro de una esfera equivalente a la que sería en caso hipotético si la partícula no esférica fuese esférica. Por ejemplo, si tomamos como referencia la concentración de 100 µg/mL del MTT de la Figura 6, la concentración en base al número de partículas calculada para el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz es de  $3.8 \times 10^{-9} M_{nps}$ , y para el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> es de  $1.5 \times 10^{-8} M_{nps}$ . Esto corresponde a  $2.3 \times 10^{12}$  nanopartículas por mililitro para el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz, y a  $8.9 \times 10^{12}$  nanopartículas por mililitro para el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> (Tabla 4). Estos valores demuestran que

las características morfológicas de cada sistema impactan en la cantidad de nanopartículas preparadas a partir de una concentración en masa de polímero fija. Además, la Tabla 4 nos permite observar que en base al impacto de las características de cada sistema e independientemente de la concentración observada, existe una relación de 1 nanopartícula de PBLG<sub>35</sub>-bz por aproximadamente 4 nanopartículas de PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>. Lo que a primera instancia denotaba una cierta igualdad al evaluar la citotoxicidad de los sistemas de PBLG en base a concentraciones en masa de polímero, en realidad introducen un error sistemático.

La Figura 7 nos permite observar que, en este caso, existe una gran diferencia entre los perfiles obtenidos para ambos polímeros, tendencia que no se apreciaba en la Figura 6. Analizando los perfiles obtenidos en la Figura 7, se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $1.1 \times 10^{-8} M_{nps}$  para el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz, y una  $CL_{50}$  de  $4.5 \times 10^{-8}$  para el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>. Si contrastamos los valores de las concentraciones en  $M_{nps}$  con respecto a las concentraciones en µg/mL, de manera cruzada para ambos polímeros, como lo podemos observar en la Tabla 5, podemos ver que  $1.1 \times 10^{-8} M_{nps}$  equivalen a 278 µg/mL del sistema PBLG<sub>35</sub>-bz y tan solo 75.3 µg/mL del sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>. Por otro lado,  $4.5 \times 10^{-8} M_{nps}$  equivalen a 306 µg/mL del sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, y 1185.9 µg/mL del sistema PBLG<sub>35</sub>-bz. Ahora bien, si analizamos que la  $IC_{50}$  del sistema PBLG<sub>35</sub>-bz de  $1.1 \times 10^{-8} M_{nps}$  representa  $6.62 \times 10^{12}$  nps/mL y la  $IC_{50}$  del sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> de  $4.5 \times 10^{-8} M_{nps}$  representa  $2.7 \times 10^{13}$  nps/mL y considerando que cada pocillo de la placa de MTT contiene 7 000 células, esto equivale a  $2 \times 10^8$  nps/célula



**Figura 7.** Resultados de MTT después de la conversión de las concentraciones en µg/mL a su correspondiente molaridad con base en el número de partículas ( $M_{nps}$ ) ( $n = 3$ ), sobre la línea celular HUVEC a 24h de incubación de nanopartículas a base de dos derivados de PBLG preparadas por nanoprecipitación. Control: Células HUVEC sin tratamiento. Porcentajes de viabilidad celular y desviación estándar sin modificación.

**Figure 7.** MTT results of after the conversion of the concentrations in µg/mL to its corresponding molarity based on the number of particles ( $M_{nps}$ ) ( $n = 3$ ), on the HUVEC cell line at 24 h incubation of nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Control: HUVEC cells without treatment. Percentages of cell viability and standard deviation without modification.

**Tabla 5.** (Arriba) Equivalencias de las concentraciones utilizadas para el ensayo de MTT en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  convertidas a  $M_{\text{nps}}$  para cada sistema y éstas a su vez convertidas a  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del sistema contrario. (Abajo) Equivalencia de las  $CL_{50}$  en  $M_{\text{nps}}$  a  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada sistema y éstas a su vez convertidas a  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del sistema contrario.

**Table 5.** (Top) Equivalences of the concentrations used for the MTT assay in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  converted to  $M_{\text{nps}}$  for each system and these in turn converted to  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the opposite system. (Bottom) Equivalence of the  $LC_{50}$  in  $M_{\text{nps}}$  to  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for each system and these in turn converted to  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the opposite system.

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Equivalente de la concentración inicial en $M_{\text{nps}}$		Equivalente de concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el sistema contrario	
	PBLG <sub>35</sub> -bz	PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	PBLG <sub>35</sub> -bz	PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>
500	$1.9 \times 10^{-8}$	$7.4 \times 10^{-8}$	1935.3	129.2
200	$7.6 \times 10^{-9}$	$3.0 \times 10^{-8}$	774.1	51.7
100	$3.8 \times 10^{-9}$	$1.5 \times 10^{-8}$	387.1	25.8
50	$1.9 \times 10^{-9}$	$7.4 \times 10^{-9}$	193.5	12.9
25	$9.6 \times 10^{-10}$	$3.7 \times 10^{-9}$	96.8	6.5
10	$3.8 \times 10^{-10}$	$1.5 \times 10^{-9}$	38.7	2.6
1	$3.8 \times 10^{-11}$	$1.5 \times 10^{-10}$	3.9	0.3
$IC_{50} M_{\text{nps}}$	$IC_{50}$ expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$		Concentración equivalente en $\mu\text{g}/\text{mL}$	
PBLG <sub>35</sub> -bz	PBLG <sub>35</sub> -bz		PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	
$1.1 \times 10^{-8}$	287.7		75.3	
$IC_{50} M_{\text{nps}}$	$IC_{50}$ expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$		Concentración equivalente en $\mu\text{g}/\text{mL}$	
PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>	PBLG <sub>35</sub> -PEG <sub>5</sub>		PBLG <sub>35</sub> -bz	
$4.5 \times 10^{-8}$	306.4		1185.9	

#### LISTA DE ABREVIATURAS

Abs<sub>control cel</sub> = Absorbancia de las células de control  
 Abs<sub>control medio</sub> = Absorbancia detectada del medio de cultivo  
 Abs<sub>control nps</sub> = Absorbancia del medio de cultivo con nanopartículas, en las mismas condiciones  
 Abs<sub>muestra</sub> = Absorbancia detectada de las células después del tratamiento con nanopartículas  
 $\gamma$ -BLG-NCA =  $\gamma$ -bencilo-L-glutamato *N*-carboxianhídrido  
 bz = Bencilamina  
 CDCl<sub>3</sub> = Cloroformo deuterado  
 CL = Concentración letal  
 DCTB = Trans-2- [3- (4-tert-butilfenil) -2-metil-2-propeniliden]malononitrilo  
 DEE = Éter dietílico  
 DLS = Dispersión dinámica de luz (del inglés: Dynamic light scattering)  
 DMF = N,N-dimetilformamida  
 DMSO = Dimetilsulfóxido  
 FT-IR = Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier  
 HUVEC = Células del endotelio vascular  
 m = Masa  
 MALDI-TOF MS = Desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (del inglés: *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*)

MeO-PEG-NH<sub>2</sub> =  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino-poli(etilenglicol)  
 MET = Microscopía Electrónica de Transmisión  
 $M_{\text{nps}}$  = Molaridad en base al número de nanopartículas  
 MTT = (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil-bromuro de tetrazolio)  
 Mw = Masa molecular  
 N<sub>A</sub> = Número de Avogadro  
 nm = Nanómetro  
 N<sub>nps</sub> = Número de nanopartículas  
 nps = Nanopartículas  
 PBLG = Poli(L-glutamato de  $\gamma$ -bencilo)  
 PBS = Buffer salino de fosfato  
 PEG = Poli(etilenglicol)  
 Potencial  $\zeta$  = potencial zeta  
 RMN <sup>1</sup>H = Espectroscopía de resonancia magnética nuclear  
 TCR = Tasa de crecimiento relativo  
 TFA = Ácido trifluoroacético  
 THF = Tetrahidrofurano  
 V<sub>esfera</sub> = Volumen de una esfera  
 V<sub>np</sub> = Volumen de una nanopartícula  
 V<sub>PBLG</sub> = Volumen de polímero PBLG  
 $\rho_{\text{PBLG}}$  = Densidad del PBLG (1.217 g/cm<sup>3</sup>)

para el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz y  $8 \times 10^8$  nps/célula para el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>, por lo tanto, el número de nanopartículas por célula es 4 veces mayor para el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub>.

En la literatura podemos encontrar una vasta diversidad de compuestos evaluados por el ensayo MTT de manera convencional. Por ejemplo, el cisplatino, fármaco anticancerígeno por su capacidad de dañar el ADN. En este caso, Jiang y colegas (2014) evaluaron una serie de concentraciones de cisplatino en células HUVEC a 6 y 12h. Los resultados demuestran que el cisplatino, a dosis entre 5-500  $\mu$ M, indujo citotoxicidad dosis dependiente a las 6 y 12h, disminuyendo la supervivencia celular (20-30%) a concentraciones altas. Los autores llevaron a cabo el ensayo de MTT mediante la solubilización de cisplatino (peso molecular: 300.1 g/mol) en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% suero fetal bovino (Jiang *et al.*, 2014). Otro ejemplo es el Bexaroteno/Targretin<sup>®</sup> (peso molecular: 348.448 g/mol), molécula utilizada para tratamiento del linfoma cutáneo de células T. Esta molécula fue evaluada por Fu y colegas (2011) para investigar sus propiedades anti-angiogénicas *in vitro* en células HUVEC. Los resultados sugirieron que el Targretin<sup>®</sup> puede alterar el potencial angiogénico y metastásico inducido por células cancerígenas por medio de la supresión de Runx2 directamente en células HUVEC. Para poder llevar a cabo esta evaluación, los autores realizaron una serie de diluciones de targretin en DMSO (0.8, 4, 20, 100  $\mu$ M), y posteriormente fue utilizado para administrarlas directamente a las placas de 96 pozos con las células HUVEC (Fu *et al.*, 2011).

De acuerdo a la literatura, la selección apropiada de las células, la preparación de la muestra y el uso de la dosis correcta son consideraciones cruciales para evaluar el nivel de citotoxicidad de las nanopartículas mediante ensayos *in vitro* (Kong *et al.*, 2011). Sin embargo, considerando la vasta diversidad de arquitecturas y materiales utilizados para el diseño y concepción de nanopartículas, determinar la citotoxicidad de estos dispositivos se ha convertido en una parte fundamental del análisis de sus propiedades. Por lo tanto, considerando que existen diferencias en tamaño y morfología, entre cada sistema evaluado en el presente estudio, y sabiendo que dichas diferencias podrían conducir a un error sistemático al realizar el ensayo de MTT en base a la concentración de polímero en  $\mu$ g/mL, ya que el ensayo MTT se usa para evaluar la citotoxicidad de una molécula en solución, y dado que en nuestro caso la nanopartícula se usará como una unidad vector de principio activo, consideramos pertinente proponer a las nanopartículas como 'moléculas' aisladas. Para ello, nuestro equipo de investigación desarrolló un método para el cálculo de la concentración molar en base al número de partículas poliméricas o  $M_{nps}$  (Martínez-Barbosa, 2006; de Miguel *et al.*, 2014) de acuerdo a lo descrito para la Ecuación 1. Con este enfoque, podemos darnos cuenta que efectivamente, debido a la diferencia en morfología y tamaño de las nanopartículas estudiadas, y que debido a la diferencia en cantidad de materia presente en cada nanopartícula, es más adecuado realizar los estudios de MTT en base a la concentración en función del número de nanopartículas,  $M_{nps}$  con

respecto a  $\mu$ g/mL. Desde esta perspectiva, el análisis de morfología realizado en el presente trabajo y los cálculos para determinar el número de nanopartículas poliméricas por volumen de muestra, derivados del análisis de morfología, se convierten en una herramienta excelente para realizar los ensayos de MTT basados en una concentración en función del número de nanopartículas a incubar por célula. Por lo tanto, el análisis de la morfología no solo permite determinar las características de las nanopartículas para cada sistema, sino que además permite eficientemente calcular la cantidad de nanopartículas (que efectivamente interactúan con las células) de manera homogénea para determinar la toxicidad de los sistemas nanoparticulados en el presente trabajo.

## CONCLUSIONES

Los sistemas de nanopartículas poliméricas estudiados presentaron dos morfologías diferentes, el sistema PBLG<sub>35</sub>-bz presenta una morfología esférica y el sistema PBLG<sub>35</sub>-PEG<sub>5</sub> una morfología de elipsoide prolato. Debido a tales diferencias, se desarrolló un método para el cálculo de la concentración molar en base al número de nanopartículas poliméricas ( $M_{nps}$ ) presentes en una suspensión coloidal para ser utilizada en el ensayo de MTT, permitiendo comparar la citotoxicidad de las nanopartículas tomando en cuenta su número, tamaño y morfología. Los resultados de MTT nos permiten concluir que, debido a las diferencias en las características morfológicas de los sistemas estudiados, el mejor enfoque para la evaluación de la citotoxicidad en nanopartículas de PBLG es la utilización de la molaridad en base al número de nanopartículas, en lugar de concentración en base a masa de polímero ( $\mu$ g/mL). Este análisis puede aplicarse a cualquier sistema polimérico nanoparticulado.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Gobierno de México por el apoyo financiero brindado a través del CONACyT para los proyectos No. 104931 y No. 218866 (No. Becario CVU 375160), así como al proyecto interno Unison USO316001742. El presente trabajo se ha beneficiado de las instalaciones centrales de Imagerie-Gif, y Labex "Saclay Plant Science". Los autores desean agradecer a Stephanie Denis por el asesoramiento brindado para los ensayos de cultivo celular.

## REFERENCIAS

- Anderson, J.M., H., R., Praphulla, B. K., H. P., D., Anne, H., R. F., O., U. Prasad, K., Sableman, E. E., Schlag, G., Spilizewski, K. L., Urry, D. W. and F., W. D. 1985. Poly- $\alpha$ -Amino Acids as Biomedical Polymers. En: Biocompatibility of Tissue Analogs. F., W.D. (ed.) Boca Raton, CRC Press, Inc. Florida.
- Brigger, I., Dubernet, C. y Couvreur, P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54(5): 631-651.
- Burton, J.D. 2005. The MTT Assay to Evaluate Chemosensitivity in Blumenthal, R.D. (ed.) *Chemosensitivity: Volume 1 In Vitro Assays*. Totowa, NJ: Humana Press: 69-78.

- Cauchois, O., Segura-Sanchez, F. y Ponchel, G. 2013. Molecular weight controls the elongation of oblate-shaped degradable poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*. 452(1-2): 292-299.
- Cormode, D.P., Skajaa, T., Fayad, Z.A. y Mulder, W.J.M. 2009. Nanotechnology in Medical Imaging Probe Design and Applications. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 29(7): 992-1000.
- Couvreur, P. y Vauthier, C. 2006. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research*. 23(7): 1417-1450.
- de Miguel, L., Noiray, M., Surpateanu, G., Iorga, B.I. y Ponchel, G. 2014. Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-PEG-alendronate multivalent nanoparticles for bone targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 460(1-2): 73-82.
- Duchêne, D., Ponchel, G. y Wouessidjewe, D. 1999. Cyclodextrins in targeting - Application to nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 36(1): 29-40.
- Fattal, E. y Vauthier, C. 2013. Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology*, Fourth Edition: Vol. null: Taylor & Francis.
- Fontaine, L., Ménard, L., Brosse, J.C., Sennyey, G. y Senet, J.P. 2001. New polyurethanes derived from amino acids: Synthesis and characterization of  $\alpha,\omega$ -diaminooligopeptides by ring-opening polymerization of glutamate N-carboxyanhydrides. *Reactive and Functional Polymers*. 47(1): 11-21.
- Fu, J., Wang, W., Liu, Y.H., Lu, H. y Luo, Y. 2011. *In vitro* anti-angiogenic properties of LGD1069, a selective retinoid X-receptor agonist through down-regulating Runx2 expression on Human endothelial cells. *BMC Cancer*. 11: 227-227.
- Gref, R., Luck, M., Quéllec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T. y Muller, R.H. 2000. Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 18(3-4): 301-313.
- Jiang, Y., Shan, S., Gan, T., Zhang, X., Lu, X., Hu, H.U., Wu, Y., Sheng, J. y Yang, J.U.N. 2014. Effects of cisplatin on the contractile function of thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *Biomedical Reports*. 2(6): 893-897.
- Kang, T., Zhu, Q., Wei, D., Feng, J., Yao, J., Jiang, T., Song, Q., Wei, X., Chen, H., Gao, X. y Chen, J. 2017. Nanoparticles Coated with Neutrophil Membranes Can Effectively Treat Cancer Metastasis. *ACS Nano*. 11(2): 1397-1411.
- Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M. y Lee, S.B. 2011. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine*. 6(5): 929-941.
- Larionova, N.I., Duchêne, D., Couvreur, P., Ollivon, M. y Gref, R. 2008. Development of micro- and nanosystems for drug delivery. *Russian Journal of General Chemistry*. 78(11): 2220-2229.
- Luhmann, T., Rimann, M., Bitterman, A.G. y Hall, H. 2008. Cellular uptake and intracellular pathways of PLL-*g*-PEG-DNA nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*. 19(9): 1907-1916.
- Martínez-Barbosa, M.E., Bouteiller, L., Cammas-Marion, S., Montembault, V., Fontaine, L. y Ponchel, G. 2008. Synthesis and ITC characterization of novel nanoparticles constituted by poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Recognition*. 21(3): 169-178.
- Martínez-Barbosa, M.E. 2006. *Synthèse de dérivés du poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle)*. Préparation et caractérisation de nanoparticules multifonctionnelles. Thèse Doctorale. Université Paris XI, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.
- Martínez-Barbosa, M.E., Montembault, V., Cammas-Marion, S., Ponchel, G. y Fontaine, L. 2007. Synthesis and characterization of novel poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) derivatives tailored for the preparation of nanoparticles of pharmaceutical interest. *Polymer International*. 56(3): 317-324.
- Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N. y Couvreur, P. 2013. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews*. 42(3): 1147-1235.
- Patil, Y.B., Swaminathan, S.K., Sadhukha, T., Ma, L. and Panyam, J. 2010. The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance. *Biomaterials*. 31(2): 358-365.
- Segura-Sánchez, F., Montembault, V., Fontaine, L., Martínez-Barbosa, M.E., Bouchemal, K. y Ponchel, G. 2010. Synthesis and characterization of functionalized poly(3-benzyl-L-glutamate) derivatives and corresponding nanoparticles preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 387(1-2): 244-252.
- Shiau, C.C. y Labes, M.M. 1989. Correlation of pitch with concentration and molecular weight in poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) lyophases. *Macromolecules*. 22(1): 328-332.
- Tiwari, M. y Bellare, J. 2012. Polymer-Based Nanoparticulate Systems as Versatile Agents in the Prognosis and Therapy of Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences. India Section B: Biological Sciences*. 82(1): 37-58.
- Tolosa, L., Donato, M.T. y Gómez-Lechón, M.J. 2015. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. in Vinken, M. & Rogiers, V. (eds.) *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. New York, NY: Springer New York.
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L. y Cloos, J. 2011. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. in Cree, I.A. (ed.) *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Wadell, H. 1935. Volume, Shape, and Roundness of Quartz Particles. *The Journal of Geology*. 43(3): 250-280.
- Zhang, J., Chen, X.G., Huang, L., Han, J.T. y Zhang, X.F. 2012. Self-assembled polymeric nanoparticles based on oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide: biocompatibility, protein adsorption and cellular uptake. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23(7): 1775-1783.
- Özcan, İ., Bouchemal, K., Segura-Sánchez, F., Özer, Ö., Güneri, T. y Ponchel, G. 2011. Synthesis and characterization of surface-modified PBLG nanoparticles for bone targeting: In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 100(11): 4877-4887.