



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**“Desarrollo de una terapia molecular contra
aterosclerosis basada en la modificación del
epigenoma vascular con nanopartículas”**

**TESIS
Que presenta**

Alejandro Manzanares Guzmán

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Directores de tesis: Dra. Gertrud Lund
Dr. Silvio Zaina**

Irapuato, Guanajuato

JULIO 2018

El trabajo experimental se llevó a cabo en:

El laboratorio de Microscopía del Laboratorio Nacional PLANTECC localizado en las instalaciones de CINVESTAV Unidad Irapuato.

El laboratorio de Fitobioquímica de CINVESTAV Unidad Irapuato.

El Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Salud, Campus León.

El Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. Unidad León.

AGRADECIMIENTOS

Para el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por su gran preocupación por formar recursos académicos de alto nivel.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo con la beca 707860, muchas gracias.

Con todo mi agradecimiento para la Dra. Gertrud Lund y Dr. Silvio Zaina, por su gran apoyo y confianza para la realización del presente trabajo.

Para la Dra. Nayelli Marsch Martínez por su consejo y contribución al trabajo.

Para el Dr. Lino Sánchez Segura, Dr. Ramón Carriles Jaimes y el Dr. Enrique Ramírez Chávez por su contribución al trabajo, especialmente en la parte metodológica.

Para la M. en C. Dalia Rodríguez Ríos por su gran apoyo durante mi formación, por haberme mostrado en los inicios de mi preparación las bases de una nueva faceta del proceso enseñanza-aprendizaje y por su valiosa amistad.

Para mis compañeros del Laboratorio de Epigenética, Nicolás Fragoso Bargas, Azucena Pescador Tapia y José Filimón Gonzaga Espíritu.

Para mis amigos, por su apoyo incondicional y consejo: Richard Méndez Pérez, Lizandra Januet y María Lorena Gómez Ramírez, Érica Ramírez Velázquez, Luis Fernando Limón Pelayo y Lourdes Fuentes.

Para mis amigos y colegas de CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Para aquellos que omití involuntariamente.

DEDICATORIAS

A mi familia, cuyo cariño y apoyo incondicional han sido vitales para el logro de ésta meta.

A mi madre, Laura Josefina Guzmán Enríquez, cuyo cariño, apoyo y ejemplo han sido fundamentales para el logro de mis metas profesionales y mi desarrollo como persona. Y a mi padre, Eduardo Manzanares Acuña por su cariño, consejo y tenacidad a lo largo de mi formación académica y personal.

A mis hermanos: Luis Eduardo y Laura Karina Manzanares Guzmán, por su gran afecto y cariño.

A mi sobrina Violeta Elizabeth, con gran cariño y admiración.

A mi tío Juan de Dios Manzanares, a mi tía Lucía Arango, a mis primos Ashanti y Yair Manzanares, por su gran ejemplo de trabajo, dedicación, cariño y gran apoyo a lo largo de mi estancia.

Y para todos aquellos familiares, que en este momento omito involuntariamente.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Aterosclerosis: historia natural y etiología.....	10
1.2 Factores de riesgo de aterosclerosis	11
1.3 Metilación del ADN	12
1.4 Metilación del ADN en la aterosclerosis	13
1.5 Evidencia experimental del papel causal que tiene la hipermetilación del ADN en aterosclerosis.....	14
1.5.1 SGI-1027: un fármaco inhibidor de la metilación	16
1.6 Sistemas portadores de fármacos	16
1.6.1 Potencial de las nanopartículas en el diagnóstico y terapia de las ECVs.....	17
1.7 Albúmina sérica humana (HSA)	17
1.8 Propiedades de las nanopartículas de albúmina	18
1.8.1 Modificación y direccionamiento de las nanopartículas de albúmina.	18
1.8.2 Conjugados de albúmina para entrega de fármacos.	19
1.8.3 Conjugados de albúmina - fármacos	19
1.8.4 Fármacos solubles en agua y su encapsulamiento dentro de las nanopartículas de albúmina	19
1.8.5 Fármacos insolubles en agua y su encapsulamiento dentro de las nanopartículas de albúmina	20
1.9 NPs-HSA para entrega a órganos específicos	20
II JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
General:	23

Específicos:	23
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Materiales y animales de laboratorio.....	24
3.2 Elaboración de NPs-HSA	24
3.2.1 Purificación de NPs-HSA.....	24
3.2.2 Caracterización morfológica de NPs-HSA	24
3.2.3 Determinación de tamaño y potencial ζ de las NPs-HSA y NPs-HSA + SGI-1027	25
3.2.4 Determinación de la variación del potencial ζ de las NPs-HSA en función del pH ..	25
3.3 Cuantificación de la proteína en muestras de NPs-HSA (sin SGI-1027).....	25
3.4 Internalización del inhibidor SGI-1027 dentro de las NPs-HSA.....	25
3.4.1 Extracción de SGI-1027 de NPs-HSA	25
3.4.2 Detección de SGI-1027 por HPTLC	25
3.5 Protocolo de inyección de NPs-HSA en ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal, subcutánea y obtención de sangre periférica	26
3.6 Detección de NPs-HSA.....	26
3.6.1 Detección de NPs-HSA por medio de electroforesis SDS - PAGE	26
3.6.2 Detección de NPs-HSA en membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau.....	26
3.6.3 Detección de NPs-HSA en muestras de sangre de ratones por inmuno-dot blot	26
3.6.4 Western blot.....	27
3.7 Cuantificación de NPs-HSA en sangre periférica de ratones.....	27
3.8 Variables	28
3.9 Análisis estadístico	28
IV RESULTADOS	29
4.1 Elaboración de NPs-HSA	29
4.2 Caracterización morfológica de las NPs-HSA.....	29
4.3 Determinación del tamaño y potencial ζ de NPs-HSA	29
4.4 Determinación de la variación del potencial ζ de las NPs-HSA en función del pH	29
4.5 Cuantificación de proteína en muestras de NPs-HSA (sin SGI-1027).....	30

4.6 Internalización del inhibidor SGI-1027 dentro de NPs-HSA.....	31
4.7 Caracterización de las NPs-HSA con SGI-1027	31
4.7.1 Tamaño de NPs-HSA con el inhibidor SGI-1027.....	31
4.7.2 Potencial ζ	32
4.8 Caracterización de la morfología de las NPs-HSA con SGI-1027.....	33
4.9 Detección de SGI-1027 por HPTLC.....	34
4.10 Detección de NPs-HSA (sin SGI-1027)	34
4.10.1 Detección de NPs-HSA por medio de electroforesis SDS-PAGE.	35
4.10.2 Detección de NPs-HSA en membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau.	35
4.11 Inyección de NPs-HSA en ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal y subcutánea ...	36
4.12 Detección de las NPs-HSA en muestras de sangre de los ratones ip y sc por inmunodot blot	36
4.13 Cuantificación de NPs-HSA en las muestras sanguíneas de ratones inyectados por vía sc	38
4.14 Análisis estadístico	39
4.14.1 Análisis de varianza (ANOVA doble).....	39
4.14.2 Prueba de post hoc (Scheffé).....	39
V DISCUSIÓN	41
VI CONCLUSIONES	45
VII PERSPECTIVAS	46
VIII. REFERENCIAS	47

RESUMEN

Evidencia reciente sugiere que la reducción del nivel de la metilación global del ADN a través de la inhibición de la actividad de las ADN metiltransferasas, puede desacelerar la progresión de la aterosclerosis. Existen varios fármacos inhibidores de la metilación del ADN como por ejemplo SGI-1027. Sin embargo dichos fármacos no pueden ser administrados por vías convencionales, ya que causarían una hipometilación generalizada en múltiples órganos. La tecnología de nanopartículas permite en principio dirigir fármacos hipometilantes al tejido vascular de manera específica, minimizando así los efectos adversos. El presente trabajo es parte de los esfuerzos iniciales de un plan a largo plazo para desarrollar una estrategia contra la aterosclerosis basada en la encapsulación de SGI-1027 en nanopartículas de albúmina sérica humana (NPs-HSA).

El objetivo principal de este trabajo fue elaborar NPs-HSA sin o con SGI-1027 (NPs-HSA+SGI-1027) por desolvatación, caracterizar su morfología por microscopía electrónica de transmisión y determinar su tamaño y potencial ζ en un rango relevante de pH por espectroscopía de correlación fotónica. Además, se investigó si la inyección por vía intraperitoneal (ip) o subcutánea (sc) podrían representar una alternativa eficaz a la administración de NPs-HSA por vía intravenosa en ratones. Para este fin seis ratones recibieron inyecciones ip o sc con 150 μg de NPs-HSA. Se obtuvo sangre periférica inmediatamente antes de la inyección (tiempo 0) y a las 4, 8, 24 y 48 horas post inyección (hpi) y en cada muestra se determinó la presencia de NPs-HSA por inmuno-dot blot o Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-HSA.

Las NPs-HSA tuvieron un tamaño promedio de 562.6 nm. Al agregar SGI-1027, se observó un incremento significativo en el tamaño y la agregación de las NPs-HSA dependiente de la concentración del SGI-1027. Se determinó que la concentración 6 μM del SGI-1027 es el máximo adecuado de acuerdo a la caracterización morfológica de NPs-HSA. El potencial ζ determinado a pH 7 fue de -37.4 mV. Este parámetro se encuentra dentro del rango de estabilidad ideal reportado en la literatura. Posterior a la administración sc, las NPs-HSA fueron detectables en la sangre periférica y mostraron un incremento significativo dependiente de hpi ($p=4 \times 10^{-5}$), con un máximo a las 48 hpi. Se estimó que ~20% de las NPs-HSA inyectadas migraron hacia el sistema vascular a las 48 hpi. Por otra parte, en el caso de la administración ip no se obtuvieron datos conclusivos. En resumen, la vía sc de administración representa una vía práctica y efectiva para la entrega de NPs-HSA para el tejido vascular.

Palabras clave: Sistemas portadores de fármacos, nanopartículas, albúmina sérica humana, aterosclerosis, metilación del ADN, SGI-1027

ABSTRACT

Recent evidence suggests that reducing the level of overall vascular DNA methylation by inhibiting the activity of DNA methyltransferases can slow the progression of atherosclerosis. Several drugs that inhibit DNA methylation exist, but cannot be administered by conventional routes, since they would cause generalized hypomethylation in multiple organs. The nanoparticle technology allows in principle to direct hypomethylating drugs specifically to the vascular tissue, thus minimizing any adverse effects. The present work is part of the initial efforts of a long-term plan to develop a strategy against atherosclerosis based on the encapsulation of a drug that inhibits DNA methylation (SGI-1027) in human serum albumin nanoparticles (HSA-NPs).

The main objective of this work was to synthesize HSA-NPs with or without SGI-1027, to characterize their morphology by transmission electron microscopy and to determine their size and ζ potential in a relevant pH range. In addition, we investigated whether intraperitoneal (ip) or subcutaneous (sc) injection represent an effective alternative to intravenous administration of HSA-NPs in mice. To this end, we injected six mice ip or sc with 150 μg of HSA-NPs and extracted peripheral blood immediately prior to injection (time 0) and at 4, 8, 24 and 48 hours post injection (hpi). The presence of HSA-NPs in peripheral blood was determined by immuno-dot blot or Western blot with an anti-HSA monoclonal antibody

HSA-NPs had a mean size of 562.6 nm and a trend towards increasing size and aggregation of HSA-NPs with increasing concentrations of SGI-1027 was observed. Furthermore, we found that the optimal concentration of SGI-1027 with respect to morphological characteristics of HSA-NPs was 6 μM . The ζ potential was -37.4 mV at pH 7, which is within the ideal stability range reported in the literature. Following sc administration, HSA-NPs were detectable in peripheral blood showed a significant increase dependent on hpi ($p=4 \times 10^{-5}$) with a maximum at 48 hpi. At the latter timepoint, we estimated that ~ 20% of the injected HSA-NPs migrated to the vascular system. Conversely, no conclusive data was obtained with respect to ip injections of HSA-NPs. In summary, sc administration represents a practical and effective route for the delivery of HSA-NPs for vascular tissue.

Key words: Drug delivery systems, nanoparticles, human serum albumin, atherosclerosis, DNA methylation, SGI-1027.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Aterosclerosis: historia natural y etiología.

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son una de las primeras causas de muerte en el mundo (Hansson & Hermansson, 2011). Se calcula que para el año 2030, habrá un total de 23.6 millones de individuos que mueran a causa de ECVs a nivel mundial (Mathers & Loncar, 2006). La causa subyacente más importante de las ECVs es la aterosclerosis (Hansson & Hermansson, 2011). Esta es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared arterial, la cual es iniciada por la acumulación de lipoproteínas en el tejido vascular. La subsecuente activación de la capa suprayacente del endotelio conlleva a la adhesión de los monocitos circulantes al mismo endotelio e infiltración hacia la pared arterial (Hansson & Hermansson, 2011). Estos fenómenos son cruciales para el inicio de la enfermedad, como demuestra la observación de que ratones que carecen de la maquinaria de adhesión e infiltración de monocitos padecen menor grado de aterosclerosis (Boring et al., 1998; Gu et al., 1998; Braunerseuther et al., 2007). Una vez penetrados en el tejido vascular, los monocitos se diferencian a macrófagos que subsecuentemente fagocitan partículas de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) por medio de los receptores recolectores (scavenger receptors), principalmente CD36 y el receptor recolector-A (SR-A) (Kunjathoor et al., 2002). Bekkering et al. (2014) encontraron que tanto CD36 como SR-A incrementan fuertemente su número en los monocitos reclutados en comparación con los controles. Este proceso conlleva a la generación de células espumosas que forman una estría grasa, la primera estructura anormal visible durante la formación de la placa aterosclerótica (Moore & Tabas, 2011). La transición de la estría grasa a la placa de ateroma fibrocelular está acompañada por la proliferación y migración de las células del músculo liso de la capa media arterial hacia la íntima. Las células espumosas, las plaquetas activadas y las células endoteliales sintetizan citoquinas, factores secretados involucrados en la comunicación intercelular, que regula procesos fundamentales incluyendo crecimiento corporal, lactancia y hematopoyesis (Tedgui, & Mallat, 2006). Las citoquinas están agrupadas en varias clases: Interleucinas (33 identificadas hasta la fecha), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN), factores estimulantes de colonia (CSF), factores transformantes de crecimiento (TGF) y quimiocinas, tales como la proteína quimiotáctica de monocitos1 (MCP-1), RANTES (regulado en activación, células T normales expresadas y secretadas)/CCCL5, el péptido gamma inflamatorio de macrófagos, MIP-1y (CCL9) y el receptor de quimiocinas tipo 2 (CCR2). Las citoquinas son especialmente importantes para regular la inflamación y las respuestas inmunes y tienen funciones cruciales en el control de la inmunidad innata y adaptativa (Tedgui, & Mallat, 2006). Además de su papel inflamatorio en aterosclerosis, en también dirigen la migración y proliferación de las células del músculo liso (Lilly, 2009), esto llevado a cabo por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y TNFα (Lilly, 2009). La componente fibrosa de la placa es

originada por la secreción de macromoléculas de la matriz extracelular por parte de las células de músculo liso. Además, estas citoquinas inducen la activación de leucocitos, lo cual impulsa mayormente la liberación de citosinas, y de este modo se refuerza y mantiene la inflamación de la lesión (Lilly, 2009).

Las complicaciones de las placas ateroscleróticas, entre ellas calcificación, ruptura, hemorragia y embolización, pueden presentar consecuencias clínicas graves debido a la restricción aguda de flujo sanguíneo o alteraciones en la pared de los vasos (Lilly, 2009):

- Calcificación de la placa aterosclerótica, que aumenta la rigidez de la pared arterial y aumenta su fragilidad.
- Ruptura y ulceración de la placa aterosclerótica, que expone los procoagulantes del interior de la placa a la circulación de la sangre, lo cual hace que se forme un trombo en esa zona. Esta trombosis puede obstruir el vaso y provocar un infarto del órgano afectado.
- Hemorragia en la placa debida de la ruptura de la cubierta fibrosa o de los microvasos que se forman en la lesión. El hematoma intraparietal resultante puede reducir más la luz del vaso.
- Embolización de los fragmentos de la disgregación del ateroma hacia las zonas vasculares distales.
- Debilidad de la pared de los vasos: la placa fibrosa somete a la capa medial limítrofe a un aumento de la presión, que puede provocar atrofia y pérdida de tejido elástico y posterior dilatación de la arteria, con formación de un aneurisma.

Las complicaciones de la placa aterosclerótica pueden dar lugar a diferentes consecuencias clínicas en diversos sistemas de órganos. En el caso de la placa coronaria, las lesiones con expansión progresiva gradual y una cubierta fibrosa gruesa tienden a reducir la luz del vaso y producir malestar torácico intermitente al hacer esfuerzo (angina de pecho) (Lilly, 2009). En contraposición, la placa que no deteriora la luz de los vasos pero que presenta características de vulnerabilidad (cubierta fibrosa fina y núcleo rico en lípidos) puede romperse y provocar trombosis aguda e infarto de miocardio. Estas placas suelen ser numerosas y estar dispersas por todo el árbol arterial y, dado que no deterioran de forma significativa la luz de los vasos, no producen síntomas y a menudo ni las pruebas de esfuerzo ni la angiografía las detectan (Lilly, 2009).

1.2 Factores de riesgo de aterosclerosis

Se han realizados intensos esfuerzos para identificar los factores de riesgo, patogénesis y vías de señalización involucradas en la aterosclerosis. Estos enfoques tradicionales han llevado a la identificación de muchos factores de riesgo, incluyendo el tabaquismo, hiperglicemia, hipertensión, resistencia a insulina, exceso de lípidos circulantes y sedentarismo (Worthley et al., 2001).

Como puede notarse, muchos de los riesgos de enfermedades cardiovasculares (ECVs) son ambientales y debidos al estilo de vida, por lo tanto son manejables y pueden ser prevenidos. Por ejemplo, un estilo de vida activo puede disminuir el riesgo de padecer ECVs (Chomistek et al., 2013). Las medidas preventivas actuales para enfermedades relacionadas con aterosclerosis están basadas consecuentemente en la modificación de estos factores de riesgo. Sin embargo, en la era postgenómica, en la cual se cuenta con la secuencia completa del genoma de referencia y también se tienen algunas de sus variantes más comunes, un nuevo capítulo concerniente a la investigación de las alteraciones genéticas en aterosclerosis se ha abierto.

La predisposición genética es un factor significativo en aterosclerosis, pero estudios de asociación de genoma completo, sugieren que sólo aproximadamente el 10% de los casos de enfermedades cardiovasculares es explicable por variantes genéticas (Marian & Belmont, 2011; Dubé & Hegele, 2013). Por lo tanto, elucidar el papel de los mecanismos no genéticos – como por ejemplo la epigenética - en enfermedades cardiovasculares es una tarea crucial y lograda sólo parcialmente (Zaina et al., 2014).

De cualquier manera, a pesar de una mejora evidente del resultado y la supervivencia de los pacientes con ECVs con la ayuda de la terapia cardiovascular tradicional tales como estatinas, bloqueadores beta e inhibidores de enzima convertidora de la angiotensina, dichos protocolos de tratamiento no son completamente eficaces en la prevención o la progresión de las ECVs. De hecho, se requiere de un nuevo acercamiento para encontrar tratamientos más eficientes para ECVs, explorar nuevos campos biomédicos para identificar blancos terapéuticos más prometedores y desarrollar nuevos enfoques farmacéuticos. La epigenética podría satisfacer algunas o todas estas necesidades (Feinberg, 2010; Aizik, G et al., 2017).

1.3 Metilación del ADN

La metilación del ADN (mDNA) es la modificación epigenética más estudiada. Consiste en la adición postreplicación de un grupo metilo en la posición 5 del anillo de citosina. La mADN está presente en todos organismos con muy pocas excepciones. En los mamíferos, las citosinas metiladas se encuentran en su gran mayoría dentro de un contexto de dinucleótidos CpG. A nivel transcripcional, una regla general no siempre respetada es que los promotores de genes transcripcionalmente activos se encuentran hipometilados, mientras que la hipermetilación de esos elementos puede resultar en el silencio génico (Suzuki & Bird, 2008; Marurano et al., 2015).

La mDNA participa en procesos celulares fundamentales, ya que es esencial para el desarrollo embrionario (Li et al., 1992), la inactivación del cromosoma X (Panning & Jaenisch, 1998), la impronta genética (Li et al., 1993) y la supresión de secuencias parasíticas de ADN (Walsh et al., 1998). La mDNA es un fenómeno suficientemente dinámico para responder a factores fisiológicos y

exógenos, pero al mismo tiempo puede mantenerse estable, resultando en principio en la propagación de la mADN de una generación de una célula a la siguiente, lo que es esencial para la formación de poblaciones celulares homogéneas específicas de tejido (Feinberg, 2010).

La mDNA es mediada por la familia de enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) que catalizan la transferencia de un grupo metilo al ADN a partir del donador universal S-adenosil metionina. En mamíferos, cinco miembros de la familia DNMT han sido reportados: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, pero sólo la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b poseen actividad catalítica (Portela & Esteller, 2010). Los miembros activos de la familia de DNMTs son clasificadas convencionalmente como DNMTs de mantenimiento (DNMT1) y *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) (Esteller, 2007). De manera consistente con su papel de metiltransferasa de mantenimiento, la DNMT1 tiene de 30 a 40 veces mayor preferencia por el ADN hemimetilado generado durante la replicación semiconservativa del ADN (Portela & Esteller, 2010). Sin embargo, se ha reportado que puede tener también una actividad de mADN *de novo*. La DNMT1 es la DNMT más abundante en la célula y es transcrita principalmente durante la fase S del ciclo celular. Existe evidencia de que las DNMT3A y DNMT3B son responsables de establecer los patrones de mADN durante el desarrollo embrionario. Las DNMTs *de novo* son muy expresadas en células madre embrionarias (ES) y su expresión disminuye en las células diferenciadas (Esteller, 2007).

Un fenómeno observado en varias enfermedades es la aparición de perfiles anormales de mADN. En el cáncer, el genoma sufre comúnmente una hipometilación global, mientras que algunos promotores específicos se encuentran hipermetilados. Otro caso notable es la asociación significativa de la mADN con condiciones tales como la obesidad y el envejecimiento (Chuang et al., 1997; Worthley et al., 2001; Singh, 2002; Lilly, 2009). En el párrafo siguiente me enfocaré en la mADN en la aterosclerosis.

1.4 Metilación del ADN en la aterosclerosis

Los primeros estudios sobre la mADN en la aterosclerosis se enfocaron en genes candidatos. Esos trabajos encontraron hipermetilación del ADN en genes tales como los receptores de estrógenos α y p53, reguladores importantes de la proliferación del músculo liso vascular en placas ateroscleróticas de pacientes que fueron sometidos a cirugía coronaria (Worthley et al., 2001). Notablemente, la metilación del receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) correlaciona con la edad, un factor independiente de riesgo cardiovascular (Stary, 1980; Post et al., 1999). Además, en cultivos de células de músculo liso vascular humanas de la arteria aorta, se demostró un incremento en la mADN en células proliferativas, un hallazgo peculiar de la placa aterosclerótica (Ying et al., 2000). Otros estudios enfocados a genes específicos han demostrado hipermetilación en loci como c-myc, c-Fos, factor de crecimiento similar a la insulina-II, MYOD1, N33, HIC1, PAX6, DBCCR1, E-cadherina y P15 (Issa, 2000).

En otro estudio reciente de epigenómica, en el cual se obtuvieron de donadores post mortem, porciones pareadas de aorta aterosclerótica y normal, se encontró que el ADN de la porción aterosclerótica está hipermetilado con respecto a su contraparte normal. Este patrón fue consistente en todos los cromosomas (Zaina et al., 2014). Una vez que los autores identificaron la existencia de un patrón de mADN aberrante en todo el genoma en la lesión aterosclerótica, también buscaron definir tendencias de todo el genoma de DMRs (Regiones Diferencialmente Metiladas) entre la lesión aterosclerótica y su contraparte normal. Identificaron 54,625 DMRs en todo el genoma con un tamaño promedio de 615 pb y consistentemente con las características observadas a nivel de todo el genoma, es decir los DMRs estaban principalmente hipermetilados en la lesión aterosclerótica. Los CpGs diferencialmente metilados correspondieron a genes que regulan la contracción de las células de músculo liso vascular y formación de matriz extracelular. Estos genes están involucrados en la aterosclerosis y son por lo tanto de potencial relevancia terapéutica (Zaina et al., 2014). Recientemente, Yamada et al. (2018) llevaron a cabo otro estudio con un diseño muy similar, lo cual confirmó estos resultados.

Otros estudios apuntan a la relevancia de la hipermetilación en la aterosclerosis. Algunos de estos estudios utilizaron monocitos THP-1, ya que ésta línea celular puede diferenciarse a células similares a macrófagos y son por lo tanto un modelo para estudiar el rol de las células inflamatorias en aterosclerosis (Auverx, 1991). Por ejemplo, se encontró que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) inducen hipermetilación del ADN en células THP-1 cultivadas, lo cual sugiere que los cambios en la mADN son de los primeros cambios celulares en aterosclerosis. Estas observaciones demostraron por primera vez una relación directa entre un factor proaterogénico y cambios en la mADN (Lund, 2004). Por lo tanto, la hipermetilación del ADN podría tener impactos importantes en la patogénesis de aterosclerosis (Dong, 2002).

1.5 Evidencia experimental del papel causal que tiene la hipermetilación del ADN en aterosclerosis

La epigenómica descriptiva no puede concluir si la hipermetilación del ADN observada en la aterosclerosis es consecuencia o causa del proceso aterogénico. Sin embargo, una serie de estudios experimentales en los cuales se alteró el perfil de mADN con fármacos o manipulando la expresión de DNMTs indican un papel causal. El tratamiento con un inhibidor de la ADN metiltransferasa conocido como decitabina (5-aza-dC) redujo las lesiones ateroscleróticas de manera dependiente de la dosis en ratones knockout para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), un modelo de aterosclerosis inducida por hiperlipidemia, por medio de la supresión de la inflamación endotelial (Dunn et al., 2014).

En otro estudio, Cao *et al.* (2014) analizaron el efecto de la 5-aza-dC sobre el tamaño de la placa aterosclerótica en otro modelo animal, los ratones knockout para el receptor de la lipoproteína de baja densidad ($Ldlr^{-/-}$). Encontraron que el tratamiento con 5-aza-dC disminuyó importantemente el desarrollo de aterosclerosis en estos ratones, sin cambios en el peso corporal, perfil lipídico de plasma o niveles de colesterol encontrados en macrófagos ni el contenido lipídico dentro de la placa aterosclerótica. Este efecto fue atribuido con el decremento en la inflamación de macrófagos. Los macrófagos tratados con 5-aza-dC mostraron una disminución en la expresión de genes involucrados en la inflamación, (TNF- α , IL-6, IL-1 β y la oxidasa nítrica inducible) y quimiotaxis (L-selectina, MCP-1, CCL5, CCL9 y CCR2). Esto coincidió con una migración atenuada de macrófagos y adhesión de células endoteliales y redujo la infiltración de macrófagos dentro de las placas ateroscleróticas. 5-aza-dC también suprimió el estrés del retículo endoplásmico en macrófagos, una señal que activa la inflamación y vías apoptóticas (Cao *et al.*, 2014). La 5-aza-dC desmetiló los promotores del receptor α hepático X (LXR α) y del receptor activado por proliferador de peroxisoma γ 1 (PPAR γ 1). Esto conllevó a la sobreexpresión de LXR α y PPAR γ , a lo cual se atribuye el efecto anti-inflamatorio y ateroprotector de la 5-aza-dC (Cao *et al.*, 2014). LXR α y PPAR γ son factores de transcripción que desempeñan un papel importante durante el desarrollo de aterosclerosis por medio de la regulación de la inflamación de macrófagos y/o la homeostasis de colesterol (Joseph, 2003; Gerry & Pascual, 2008; Calkin, & Tontonoz, 2010).

Yu *et al.* (2016) analizaron la expresión ectópica de la DNMT1 en macrófagos como herramienta para aclarar el papel de la hipermetilación del ADN en la aterosclerosis. Utilizaron un modelo murino transgénico con sobreexpresión específica de DNMT1 (TgDNMT1) o PPAR- γ (TgPPAR- γ) para investigar sus efectos en la progresión de aterosclerosis en la regulación de la producción de las citoquinas inflamatorias. Yu *et al.* (2016) demostraron que TgDNMT1 tuvo una profunda influencia en las vías de inflamación y señalización, potenciando el efecto de la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, aumentando con ello la aterosclerosis. También demostraron que en los monocitos asociados con aterosclerosis los niveles de DNMT1 estaban elevados y que la expresión de PPAR- γ estaba disminuida. Sus resultados indicaron por lo tanto que la vía DNMT1/PPAR γ podría regular la producción de citoquinas proinflamatorias (Yu *et al.*, 2016).

En resumen, los hallazgos presentados en este párrafo sugieren que el control farmacológico de la hipermetilación del ADN podría ser una estrategia para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis.

1.5.1 SGI-1027: un fármaco inhibidor de la metilación

Con la reactivación de genes supresores de tumores por 5-azacitidina (Vidaza) y su congénere 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina) se ha provisto un enfoque alternativo para la terapia contra el cáncer. La toxicidad de estos compuestos es alta debido a su incorporación en el ADN, por lo tanto es crítico explorar la eficacia de inhibidores no nucleosídicos. Un compuesto a base de quinolina, designado SGI-1027, inhibe directamente la actividad de la DNMT1, DNMT3A y DNMT3B al competir con S-adenosilmetionina en la reacción de mADN, sin incorporarse a la cadena del ADN. Además, presenta una IC₅₀ (6-13 µM) similar a la de la 5-azacitidina (Gutman & Golomb, 2012). SGI-1027 también afecta a la estabilidad proteica de las DNMTs (Chuang et al., 2005). El tratamiento de diferentes líneas de cáncer con SGI-1027 resultó en la degradación selectiva de la DNMT1 con menores efectos sobre la DNMT3A y DNMT3B (Datta et al., 2009). Otra ventaja de los inhibidores no nucleosídicos tales como SGI-1027 sobre la 5-aza-dC, es que fueron diseñados para ser metabolizados preferentemente por medio de la N-acetilación para minimizar la formación de subproductos citotóxicos (Rilova et al., 2014).

A pesar del creciente interés en el desarrollo de estrategias que permitan el tratamiento de aterosclerosis por medio de inhibidores de la mADN, continúa existiendo un alto riesgo de efectos secundarios debidos a hipometilación indiscriminada en el organismo. Esto obliga por lo tanto a crear sistemas que permitan dirigir fármacos hacia el sitio blanco específico. Esto es facilitado por la tecnología de los sistemas portadores de fármacos.

1. 6 Sistemas portadores de fármacos

El descubrimiento de enfoques innovadores para la entrega de biomoléculas para el tratamiento de enfermedades, ha despertado el creciente interés tanto de investigaciones experimentales como de revisiones literarias (Prabhakar et al., 2013; Zhang et al., 2013; Karimi et al., 2015, 2016a).

Teóricamente, un portador cargado con fármaco puede proporcionar protección contra la degradación o inactivación del fármaco en el camino al sitio diana. Esto puede dar como resultado una reducción adicional de la cantidad del agente activo necesario para obtener eficacia terapéutica y puede reducir eficazmente los efectos adversos inducidos por el fármaco (Moghimi et al., 2012). Una de las mayores ventajas de los sistemas portadores de fármacos (DDSs – drug delivery systems) particulados, es el poder alterar la biodistribución del fármaco en el cuerpo (Moghimi et al., 2005). De hecho, la tecnología de DDS ha generado nanomedicinas exitosas para el tratamiento del cáncer (Allen & Cullis, 2004; Ferrari, 2005; Peer et al., 2007; Hamad & Moghimi, 2008; Davis et al., 2008). Esta tendencia continúa fuertemente no sólo en oncología sino también en otras áreas terapéuticas, como el tratamiento de afecciones inflamatorias e infarto (Moghimi et al., 2001b, 2005; Kim et al. 2010).

Con la aparición de la nanotecnología y el desarrollo paralelo en la ciencia de los materiales, comienzan a emerger portadores sofisticados que permiten la focalización, detección, señalización y liberación simultánea de fármacos (Allen, 2002; Moghimi et al., 2005; Andresen et al., 2005; Kim et al. 2010). De manera similar, otros fármacos de interés, los cuales por si no exhiben una captación específica, pueden ser internalizados efectivamente por células fagocíticas seguido a la encapsulación en un sistema de entrega de partículas especialmente diseñado (Drinkwater et al., 1989). Ejemplos de este tipo celular son los monocitos y macrófagos. Esas son células fagocíticas que internalizan extensivamente varias fracciones particuladas, tales como células apoptóticas, bacterias, virus, micro- y nanopartículas (NPs) (Gray & Botelho, 2017). Estas propiedades son particularmente relevantes en el presente trabajo, por el importante papel de los macrófagos en la aterosclerosis, como se mencionó en los párrafos anteriores.

1.6.1 Potencial de las nanopartículas en el diagnóstico y terapia de las ECVs

Las NPs pueden ser fabricadas para llevar a cabo más de una tarea simultáneamente y pueden tener un considerable número de roles, tales como actuar como agente terapéutico, un sistema portador de fármaco y/o como un agente para tomar imágenes (Zhu et al., 2014). Muchas plataformas de sistemas de entrega a escala nanométrica han sido propuestos para el tratamiento de ECVs, tales como micelas, dendrimeros, nanocristales semiconductores y metálicos, liposomas y NPs poliméricas (Godin et al., 2010; Matoba et al., 2017). En algunos casos las NPs se han diseñado para inhibir los procesos proinflamatorios (Afergan et al., 2010; Leuschner et al., 2011; Gutman & Golomb, 2012; Koga et al., 2016). A continuación, se mencionarán las características generales más relevantes de las NPs de albúmina sérica humana (NPs-HSA). Nos enfocamos en las NPs-HSA, ya que el uso de este material facilitará la transición a la fase clínica, en el caso que las NPs descritas en el presente trabajo mostraran efectos en modelos animales.

1.7 Albúmina sérica humana (HSA)

Las albúminas de mamíferos son una familia de proteínas globulares solubles en agua, producidas en el hígado, y que tienen su mayor abundancia en el plasma sanguíneo humano (35 - 50 g/L) (He, X.M. & Carter, 1992). La albúmina tiene un peso molecular en un rango de 65 – 70 kDa, y una vida media en el cuerpo de 19 días. Contiene 585 aminoácidos con una marcada abundancia de cisteína y bajo contenido en triptofano (He, X.M. & Carter, 1992). Es estable en un rango de pH de 4-9 y puede ser calentada a 60 °C durante 10 horas sin sufrir efectos deletéreos (He, X.M. & Carter, 1992; Zsila, 2013). La estructura secundaria de la albúmina consiste de 67% de α -hélice y posee diecisiete puentes disulfuro junto con seis vueltas (Narazaki et al., 1997; Carter et al., 1989).

La albúmina sérica posee una estructura tridimensional parecida a un corazón o elipsoide con dominios alfa-helicoidales con tres dominios homólogos I, II, III que se encuentran entrecruzados por

puentes disulfuro (Kratz, 2008; Wang et al., 2013). Cada uno de estos dominios tiene un par de subdominios denominados “A” y “B” (Zsila, 2013). La albúmina tiene una alta capacidad de unión y una habilidad multifuncional para transportar muchos fármacos, ácidos grasos, bilirrubina, iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), y una variedad de hormonas. En el torrente sanguíneo otra función importante de la albúmina es el mantenimiento de la presión osmótica (Elzoghby et al., 2012; Divsalar et al., 2012).

En resumen, la albúmina es una proteína con baja inmunogenicidad y sin toxicidad, una buena biodisponibilidad, acoplada con buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, estas propiedades la hacen un portador ideal para la entrega de fármacos (Elzoghby et al., 2012; Zheng et al., 2014).

La flexibilidad estructural de la albúmina y de las NPs de albúmina resultantes permite una unión reversible de diferentes compuestos al portador y permite su transferencia al tejido blanco (Wang et al., 2013). Los sitios de unión de diferentes especies de albúmina son muy similares, particularmente en términos de tamaño, número de constituyentes de aminoácidos y función biológica (Panjehshahin et al., 1992). Pero hay cerca de un 25-30% de variabilidad en el arreglo de la secuencia de aminoácidos entre la HSA y la albúmina sérica de rata (RSA) y albúmina sérica bovina (BSA) (Morávek et al., 1975). La estructura y frecuencia de los sitios de unión de albúmina tendrán un gran efecto en la farmacocinética, entrega del fármaco/diseño y eficacia terapéutica (Anand & Mukherjee, 2013).

1.8 Propiedades de las nanopartículas de albúmina

Las NPs de albúmina son vehículos apropiados para la terapia génica y entrega de fármacos debido a que son relativamente inertes en la circulación. Un ejemplo es su uso como portadores eficientes para incrementar las actividades antitumorales de los fármacos anti cáncer (Li et al., 2013). La variabilidad de las estructuras de albúmina en términos de tamaño, forma y composición ofrecen nuevas oportunidades para la entrega de diferentes materiales terapéuticos de manera precisa y controlada (Karimi et al., 2016b). La geometría espacial de las NPs es un parámetro adicional importante que afecta la internalización celular. Se ha demostrado que las NPs esféricas pueden ser internalizadas de mejor manera por numerosas líneas celulares en comparación con NPs no esféricas (Doshi & Mitragotri, 2010).

1.8.1 Modificación y direccionamiento de las nanopartículas de albúmina

Como se mencionó anteriormente, debido a la estructura química de la albúmina y a la presencia de diferentes grupos funcionales las NPs de albúmina proveen buenas oportunidades para la modificación superficial de la partícula por medio de enlaces no covalentes y covalentes. Esto en principio permite dirigir las NPs de albúmina a células y tejidos específicos (Patil, 2003; Yewale et al., 2013).

Con la finalidad de modificar la eficiencia de las NPs para el direccionamiento y entrega, diferentes enlazadores (linkers) y espaciadores pueden ser usados. Estos materiales mejoran la estabilidad del fármaco en la circulación, mientras que facilitan la liberación del fármaco en la localización deseada (Karimi et al., 2016b). Los investigadores pueden optimizar los portadores de fármacos por medio de la alternación de las características de enlazador/espaciador tales como el tipo del material, tamaño de la estructura y tipo de enlace (Karimi et al., 2016b).

1.8.2 Conjugados de albúmina para entrega de fármacos

Existen muchos métodos que pueden ser utilizados para cargar las NPs de albúmina con el fármaco deseado, incluyendo la unión por enlaces covalentes, el revestimiento de la superficie y adsorción electrostática, lo cual es posible debido a que existen un gran número de grupos funcionales disponibles en la estructura primaria de la albúmina. El dominio I y II de la HSA es el responsable de muchas de las interacciones de los fármacos, además de que otros sitios de unión pueden ser cargados con diferentes concentraciones de fármacos (Elzoghby et al., 2012).

1.8.3 Conjugados de albúmina - fármaco

Diversos métodos se han propuesto para clasificar los conjugados de albúmina-fármaco tales como aquellos basados en los métodos de fabricación (Kouchakzadeh et al., 2015), estructura de NPs (Kratz, 2008; Anand & Mukherjee, 2013) o la estructura del conjugado de NPs-fármaco (Kratz, 2008; Kouchakzadeh et al., 2015; Vhora et al., 2015), el tipo de interacción (Kouchakzadeh et al., 2015), receptores, o el tejido blanco (Kratz, 2008) y el incremento de la vida media del fármaco (Sleep et al., 2013). Un enfoque que permite una clasificación más sencilla es dividir estos conjugados basándose en la solubilidad en agua del fármaco que será encapsulado en las nanopartículas (Kratz & Elsadek, 2012).

1.8.4 Fármacos solubles en agua y su encapsulamiento dentro de las nanopartículas de albúmina

Existen tres métodos principales para cargar fármacos hidrosolubles dentro de la NPs de albúmina (Merodio et al., 2001; Elzoghby et al., 2012):

- A) Incubación del fármaco con las NPs de albúmina preformadas.
- B) Mezclar el fármaco y la solución de albúmina seguida del entrecruzamiento de las NPs (incorporación).
- C) Adición del fármaco a la solución de glutaraldehído y después el entrecruzamiento para la formación de las NPs

En todas estas categorías, el fármaco puede ser adsorbido en la superficie de la NPs o incorporado dentro de la matriz de las NPs (Arnedo et al., 2004; Elzoghby et al., 2012).

Usando el método (A), se obtiene una alta cantidad de fármaco incorporado dentro de la primera hora de incubación y después la cantidad de fármaco cargada dentro de las NPs se vuelve constante. El método de incorporación (B) puede ser utilizado para cargar la mayor cantidad de fármaco dentro de las nanopartículas, mientras que el tercer método (C) es similar al primer enfoque (Karimi et al., 2016b).

1.8.5 Fármacos insolubles en agua y su encapsulamiento dentro de las nanopartículas de albúmina

Existen muchos métodos diferentes que han sido utilizados para encapsular fármacos insolubles o poco solubles en agua dentro de las NPs de albúmina. Los dos principales métodos son atrapamiento y encapsulación. Los fármacos pueden unirse a las nanopartículas por adsorción electrostática de moléculas cargadas, o por unión covalente entre el fármaco y la matriz de albúmina de las nanopartículas (Elzoghby et al., 2012).

El Paclitaxel es un fármaco que tiene una baja solubilidad en agua, y cuando es entregado en una formulación con una alta concentración puede inducir reacciones de hipersensibilidad. Zhao *et al.* reportaron la administración dirigida *in vitro* de NPs de BSA cargadas con paclitaxel y también las decoraron con folato para direccionarlas a los receptores de folato en una línea celular de cáncer de próstata humano (Zhao et al., 2010). Además de resultar en un incremento significativo en la solubilidad de Paclitaxel en agua, las NPs tuvieron propiedades superficiales deseables, alta estabilidad y mostraron un direccionamiento específico para las células cancerígenas (Zhao et al., 2010).

La entrega de algunos fármacos como HI-6 dicloruro monohidrato (Dadparvar et al., 2011), aspirina (Das et al., 2005), metrotexato (fármaco anticancerígeno) (Taheri et al., 2012), platino (IV) en profármacos como cisplatino (tratamiento del cáncer) (Divsalar et al., 2012), los medicamentos contra el cáncer basados en rutenio (Zhang et al., 2014), diclofenaco (un fármaco antiinflamatorio y tracolimus (como inmunosupresor) (Zhao et al., 2015) también se ha investigado para mejorar su estabilidad y solubilidad con NPs de albúmina sérica.

1.9. NPs-HSA para entrega a órganos específicos

Entre los estudios reportados para NPs-HSA, existen algunos protocolos de tratamiento de cáncer de pulmón resistente a fármacos. Los autores reportaron excelentes propiedades de las partículas, una eficacia antitumoral sinérgica con citotoxicidad y una actividad apoptótica. Además de una disminución en el tamaño del tumor, una reducción en las dosis de fármaco y bajos efectos secundarios (Choi et al., 2015).

Las NPs-HSA también se han utilizado para la incorporación de oligonucleótidos anti-sentido para manipular la expresión de la enzima Polo-quinasa 1 (Plk1) (Steinhauser et al., 2008), un regulador importante para la mitosis en células de mamíferos y cuya actividad es elevada en todas las células de cáncer analizadas a la fecha (Barr et al., 2004; Strebhardt & Ullrich, 2006).

Se han reportado también para el tratamiento de intoxicación por organofosforados, en la cual los autores reportan una rápida liberación del fármaco antídoto obidoxima y la formación de una capa de éste en la superficie de las NPs (Kufleitner et al., 2010).

Asimismo, también se han marcado NPs-HSA con quantum dots de grafito para la entrega específica del fármaco y visualización de cáncer de páncreas. Los autores reportaron un incremento en la biodisponibilidad y la liberación sostenida de gemcitabina, además de una mejoría en la eficiencia del fármaco en células de cáncer de páncreas resistentes al fármaco y un excelente potencial de visualización (Nigam et al., 2014).

II JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta mortalidad mundial por las complicaciones clínicas de la aterosclerosis y a las limitaciones de los tratamientos actuales para combatir sus efectos, existe una creciente necesidad de buscar tratamientos más efectivos desde una nueva perspectiva biomédica y farmacéutica más eficaces en ralentizar o disminuir la progresión e incidencia de aterosclerosis.

El proyecto es parte de la fase inicial de la búsqueda y desarrollo de una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de aterosclerosis utilizando avances de vanguardia desde una perspectiva molecular. La idea principal es crear una herramienta terapéutica eficaz que permita la modificación del metiloma (el conjunto de patrones celulares de la mADN) para desacelerar la progresión de la aterosclerosis.

La estrategia propuesta es innovadora ya que representa una combinación interdisciplinaria entre la terapia epigenética y el uso de la tecnología de nanopartículas como sistemas portadores de fármacos, un enfoque terapéutico que aún no ha sido contemplado en el área cardiovascular.

Desde una perspectiva clínica, el proyecto podría representar un medio innovador tecnológico y práctico capaz de atender un serio problema de salud nacional, contribuyendo por lo tanto al bienestar social.

Los estados de conocimiento sobre los sistemas particulados portadores de fármacos para entrega dirigida y los efectos biológicos de la inhibición de la mADN en la progresión de la placa aterosclerótica permiten plantear en esta investigación la siguiente pregunta: ¿Es posible desarrollar un método efectivo para inhibir la metilación por medio de la encapsulación de un inhibidor de la mDNA en nanopartículas y podría éste representar una estrategia futura para el tratamiento de aterosclerosis?

HIPÓTESIS

La inhibición parcial o total de la hipermetilación del ADN por medio de la encapsulación del fármaco inhibidor de la mADN (SGI-1027) en nanopartículas de HSA (NPs-HSA) podría representar una estrategia para el tratamiento de aterosclerosis.

OBJETIVOS

General:

Elaborar NPs-HSA sin o con SGI-1027 (NPs-HSA+SGI-1027) por desolvatación, caracterizar su morfología por microscopía electrónica de transmisión y determinar su tamaño y potencial ζ en un rango relevante de pH por espectroscopía de correlación fotónica, y administrarla en ratones para su cuantificación en sangre periférica.

Específicos:

1. Elaborar NPs-HSA por desolvatación
2. Caracterizar la morfología de NPs-HSA por microscopía electrónica de transmisión.
3. Determinación del tamaño y potencial ζ de NPs-HSA por espectroscopía de correlación fotónica.
4. Determinación de la variación del potencial ζ de NPs-HSA en función del pH.
5. Cuantificación de proteína en NPs-HSA.
6. Analizar las NPs-HSA+SGI-1027 como descrito en los puntos 1-3.
7. Detectar SGI-1027 en NPs-HSA+SGI-1027 por HPTLC y barrido de absorbancia con espectrofotómetro UV.
8. Optimizar un método para detectar y cuantificar NPs-HSA en la sangre periférica de ratones.
9. Inyectar NPs-HSA en ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal y subcutánea y cuantificar su concentración en sangre periférica.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y animales de laboratorio

HSA (Fracción V, pureza 96-99%), SGI-1027 (pureza $\geq 98\%$ HPLC, 25 MG), Ninhidrina (pureza $\geq 99\%$) fueron obtenidas de Sigma; etanol 200 Proof (100%) de Fisher Chemical; el metanol (pureza $\geq 99.8\%$), etanol, la solución de glutaraldehído 25% y acetonitrilo de Thermo Fisher Scientific. Los ratones C57Bl/6 de ocho semanas de edad fueron criados en el bioterio de la División de Ciencias de la Salud del Campus León de la Universidad de Guanajuato Campus León.

3.2 Elaboración de NPs-HSA

Las NPs-HSA fueron preparadas por la técnica de desolvatación (Weber et al., 2000). 200 mg de HSA en NaCl 10 mM, pH 9.4, fueron transformados en nanopartículas por la adición de 4 ml de etanol (el agente desolvatante) bajo agitación constante (200 rpm – HSA sin SGI-1027; 500 rpm HSA con SGI-1027) a temperatura ambiente. Después del proceso de desolvatación, se añadió una solución de 4% de glutaraldehído en agua para inducir el entrecruzamiento de partículas. El proceso de entrecruzamiento fue llevado a cabo en agitación (200 rpm – HSA sin SGI-1027; 900 rpm HSA con SGI-1027) durante 1 h (Figura 1).

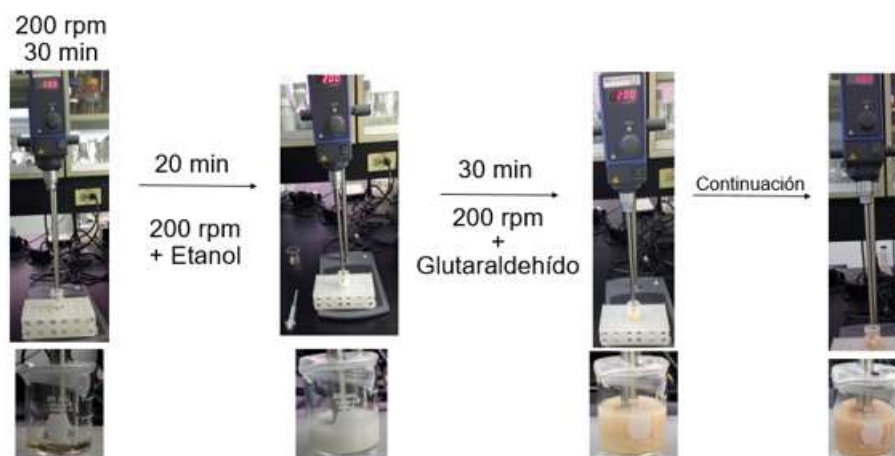


Figura 1. Método de desolvatación

3.2.1 Purificación de NPs-HSA

Las NPs-HSA resultantes fueron purificadas por tres ciclos de centrifugación (11,000 rpm, 6 min) y redispersión del pellet en 1 ml de NaCl 10 mM, pH 9.4. Cada paso de redispersión se llevó a cabo con vortex.

3.2.2 Caracterización morfológica de NPs-HSA y NPs-HSA+SGI-1027

La morfología de las NPs-HSA se determinó por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) con el equipo FEI Morgagni 268(D) (CINVESTAV, Irapuato, México).

3.2.3 Determinación de tamaño y potencial ζ de las NPs-HSA y NPs-HSA+SGI-1027

El tamaño promedio y el potencial ζ de NPs fueron medidos por espectroscopía de correlación fotónica (PCS) utilizando el equipo de Malvern Zetasizer Nano Zs (CIO, León, México). Las muestras fueron diluidas 1:100 con NaCl 10 mM y medidas a temperatura ambiente y a un ángulo de dispersión de 90°.

Para los experimentos del efecto del pH, se prepararon las soluciones con diferente pH ajustando la solución de NaCl 10 mM con ácido clorhídrico 0.1 N o hidróxido de sodio 0.1 N. Se hicieron diluciones 1:100 para cada uno de los puntos de pH evaluados (CIO, León, México).

3.3 Cuantificación de la proteína en muestras de NPs-HSA (sin SGI-1027)

La cuantificación de proteína en las muestras de NPs-HSA se llevó a cabo por el método de Lowry en placa de 96 pozos (Ciencias Médicas-UG, León, México).

3.4 Internalización del inhibidor SGI-1027 dentro de las NPs-HSA

Para la internalización del fármaco SGI-1027 dentro de las NPs-HSA, se preparó inicialmente una solución stock de SGI-1027 1 mM disuelto en DMSO y de acuerdo a la literatura se establecieron las dosis de SGI-1027 en base al IC₅₀ de la DNMT1 (6 μ M) (Datta et al., 2009). Para este fin se llevaron a cabo 6 preparaciones utilizando una concentración de SGI-1027 de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ M, calculándolos para un volumen final de 2 mL de la solución de NaCl en la que se preparan las NPs-HSA. Cada preparación se hizo por triplicado.

3.4.1 Extracción de SGI-1027 de NPs-HSA

Se liofilizaron 200 μ L de cada preparación de NPs-HSA+SGI-1027. Esto se hizo por duplicado. Las muestras permanecieron a -80 °C durante 48 h. Al cumplirse este lapso, se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 min. Se decantó y agregó 100 μ L de acetronitrilo, se agitó en vórtex y se dejó reposar durante 60 min. Se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a viales de cromatografía. Estos se almacenaron a -4 °C.

3.4.2 Detección de SGI-1027 por HPTLC

La detección de SGI-1027 se llevó a cabo por medio de la técnica de Cromatografía en capa fina (HPTLC) con el equipo Camag automatic TLC sampler 4. Las muestras para HPTLC se prepararon en una dilución 1:10 (20 μ L de muestra NPs-HSA o SGI-1027 en DMSO se diluyeron en 180 μ L metanol) en viales de HPLC.

3.5 Protocolo de inyección de NPs-HSA en ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal, subcutánea y obtención de sangre periférica

Las inyecciones de las NPs-HSA se realizaron en ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal (ip) o subcutánea (sc). Los ratones C57BL/6 utilizados en este estudio provienen de una población mixta de mutantes ApoE (silvestres, heterocigotos y nulicigotos). Se administró una inyección ip (n=3) o sc (n=3) consistente de 150 µg de NPs-HSA en 150 µL de PBS. En otro grupo de animales, se administró otra inyección ip o sc de HSA nativa como control positivo. Se recolectó sangre (100-150 µL) en un tubo vacutainer (EDTA) a diferentes tiempos por incisión caudal. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Forane®) previo al procedimiento. Al tiempo post-inyección final (48 horas) los ratones anestesiados fueron sacrificados por decapitación para obtener sangre periférica y otros tejidos. Estos se colectaron en un tubo Eppendorf, se les adicionó una cantidad generosa de la solución de RNAlater para conservar los tejidos y se procedió a almacenarlos a -80 °C junto con el resto de las muestras de sangre.

3.6 Detección de NPs-HSA

3.6.1 Detección de NPs-HSA por medio de SDS - PAGE

Las muestras de NPs-HSA fueron sometidas a electroforesis en un gel de acrilamida al 10%, en condiciones reductoras y no reductoras (respectivamente con y sin β-mercaptoetanol).

3.6.2 Detección de NPs-HSA en membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau.

Se inmovilizaron las NPs-HSA depositándolas cuidadosamente con una micropipeta en una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau durante 5 min.

3.6.3 Detección de NPs-HSA en muestras de sangre de ratones por inmuno-dot blot

La detección de las NPs-HSA se llevó a cabo por inmuno-dot blot. Se mezclaron 2.5 µL de las muestras de sangre: ip o sc de los tiempos 0-48 h.p.i. en tubos Eppendorf con 2.5 µL de una solución de TBS, Tween 2% (TBS-T), y se dejó incubando durante 5 minutos a 4 °C. El objetivo de este tratamiento de solubilización fue liberar eventuales NPs-HSA atrapada en el interior de las células y evitar agregados que pudiesen disminuir la calidad de la detección. Posterior a esto, se tomaron los 5 µL de cada muestra y se procedió a depositarlas manualmente en una membrana de nitrocelulosa. Una vez que las membranas se secaron, se bloquearon las membranas por inmersión en leche Carnation 5% en TBS-T en agitación en frío durante 1.5 h. Se lavó con TBS-T y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-HSA (ab24458 anti-HSA-HRP, Abcam) a una dilución de 1:2500 en TBS-T, 0.1% leche Carnation y se dejó agitar durante 30 min a temperatura ambiente. Después de 3 lavados

en TBS-T, el complejo antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia con el reactivo ECL™ Prime Western Blotting Detection (Amersham), y se tomaron las imágenes con el equipo ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad).

3.6.4 Western blot.

Se utilizaron 2 muestras de HSA reactivo (control positivo) de 100 ng y 500 ng, y las muestras de sangre sc, las cuales se lisaron con TBS Tween 2%. Las muestras se separaron por SDS-PAGE en gel al 10% y se transfirió a una membrana PVDF (Millipore). Después de dejarse bloqueando toda la noche en TBS-T con 5% de leche Carnation, se incubó con un anticuerpo anti-HSA (ab24458 anti-HSA-HRP, Abcam) a una dilución de 1:2500 durante 30 min. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó por medio de su incubación con el reactivo ECL™ Prime Western Blotting Detection (Amersham) durante 1 min, y se tomaron las imágenes con el equipo ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad).

3.7 Cuantificación de NPs-HSA en sangre periférica de ratones

1. El programa de Image Lab ofrece una herramienta de volumen que permite delimitar el área de la membrana en la cual se detecta la señal del anticuerpo. Esto se hizo primeramente con la curva estándar de HSA (0-50 ng) (Figura 2):



Figura 2. Curva estándar de HSA.

Cada uno de los círculos identifica una señal correspondiente a una concentración de HSA desde 0 ng (U1) hasta 50 ng (U7). Los valores intermedios desde U2 hasta U6 son respectivamente: 1 ng, 2.5 ng, 5 ng y 10 ng. Como puede observarse, existe un incremento en la intensidad o señal a medida que la concentración de HSA aumenta.

2. Image Lab permitió conocer los valores de la intensidad de la señal correspondientes a cada concentración de HSA (Figura 2), esta información se tabuló (Tabla 1):

Mean Value (Int)	Mean Value (Int) - 0	ng
769.6	0	0
1,178.60	409.00	1
1,645.30	875.70	2.5
2,692.10	1,922.50	5
2,844.60	2,075.00	10
12,481.20	11,711.60	50

Tabla 1. Valores de intensidad promedio (Int) correspondientes a cada concentración de HSA (U1-U7).

Los valores de la intensidad promedio (Int) representan los valores de la señal para cada uno de los puntos de la curva estándar de HSA (U1-U7).

3. Como puede notarse (Tabla 1), existe un valor de intensidad promedio (Int) en U1 (0 ng), motivo por el cual se normalizaron los datos al restar este valor inicial del resto de los valores de intensidad (Int) en la columna de “Mean Value (Int) – 0”.

4. Se hizo una gráfica con los valores promedio de intensidad (Int) con respecto a los ng que representan (0-50 ng) (Figura 3). Se representó la ecuación de la pendiente y R^2 . Esta ecuación de la curva estándar permitió realizar los cálculos posteriores, como se explicará más adelante.

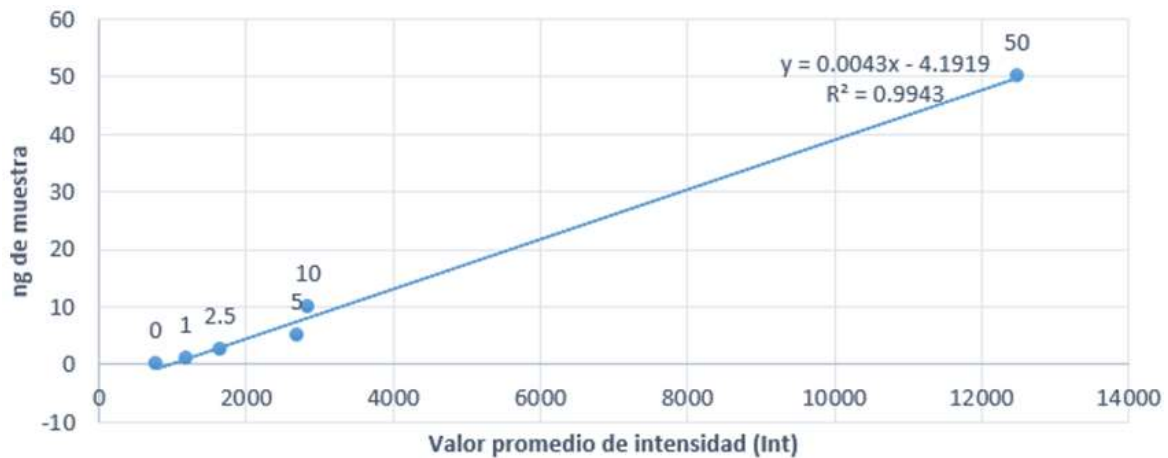


Figura 3. Valor promedio de intensidad (Int) por ng de muestra de la curva estándar de HSA.

3.8 Variables

Dependiente; respuesta (ng de nanopartículas), determinadas por la intensidad promedio de la señal de anti-HSA en el inmuno-dot blot de las muestras sc comparadas con la curva estándar HSA.

Independiente; Factores:

- I. Tiempo (0-48 h)
- II. Ratón inyectado (SC1, SC2, SC3)

3.9 Análisis estadístico

Se usó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Scheffé con el programa StatView para analizar si la cantidad (ng) de NPs-HSA era diferente entre los tiempos y entre los ratones sc.

IV RESULTADOS

4.1 Elaboración de NPs-HSA

Se llevaron a cabo 3 réplicas experimentales para la elaboración de las NPs-HSA vacías (sin SGI-1027) con el método de desolvatación (Figura 1). De cada repetición experimental se recuperaron 5 ml de NPs-HSA.

4.2 Caracterización morfológica de las NPs-HSA

Para las tres réplicas experimentales indicadas en el párrafo 4.1 se analizó un total de 30 imágenes/réplica.

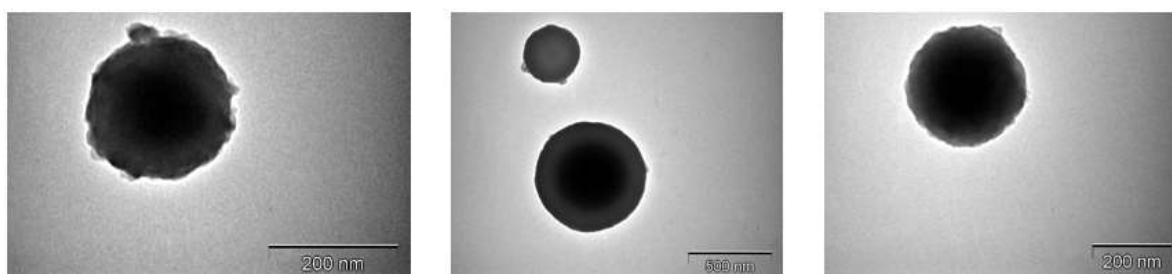


Figura 4. Caracterización morfológica de las NPs-HSA por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Se presentan imágenes obtenidas por MET de NPs-HSA de las tres réplicas experimentales.

Hubo variación en la distribución de tamaño de las NPs-HSA obtenidas. La figura 4 muestra los ejemplos representativos de cada una de las réplicas.

4.3 Determinación del tamaño y potencial ζ de NPs-HSA

El promedio de NPs-HSA fue 562.6 ± 39.0 nm, con un rango entre 162 – 724 nm. El potencial ζ promedio de las NPs-HSA obtenido a pH 9 fue de -35.9 mV.

El potencial ζ es un parámetro importante que describe la carga superficial de las nanopartículas y por lo tanto indica el grado de estabilidad del sistema, es decir si tiende a la formación o no de agregados. Cuando el potencial ζ está ligeramente alejado de ± 30 mV el sistema es estable. Esto indicó que nuestras NPs-HSA no tenderían a formar agregados y que representan una dispersión coloidal estable.

4.4 Determinación de la variación del potencial ζ de las NPs-HSA en función del pH

El objetivo de este experimento fue analizar la variación del potencial ζ en función del pH. Esto es especialmente importante para el diseño de sistemas portadores de fármacos, sobre todo si se pretende investigar el comportamiento de las NPs-HSA *in vivo* en pH fisiológico de 7.4.

Se analizó el potencial ζ de las 3 réplicas experimentales NPs-HSA a cinco pH diferentes (3, 4, 5, 7 y 9). Para cada réplica experimental se hizo tres repeticiones técnicas.

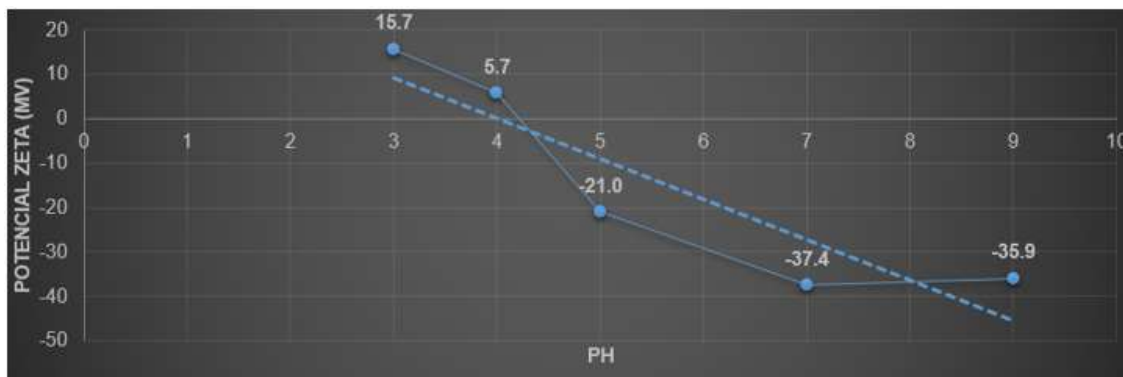


Figura 5. Variación del potencial ζ en función del pH.
Representación del potencial ζ promedio de las mediciones (triplicado) para cada uno de los puntos de pH de las tres réplicas de NPs-HSA.

Se encontró una correlación negativa entre el pH y potencial ζ ($r=-0.91$; $p<0.0320$) (figura 5). Como se puede observar, el punto isoeléctrico de las NPs-HSA, es decir el punto en el cual la carga neta es igual a 0, está entre el pH de 4 y 5. En condiciones de pH superior, las NPs-HSA tienen una carga neta negativa.

El resultado más relevante de este experimento es que las NPs-HSA son estables a pH 7. Esto se concluye debido a que el valor del potencial ζ está entre -30 mV - -40 mV, un valor donde no tienden a formar agregados a un pH fisiológico. Esta característica es altamente deseable considerando futuros usos terapéuticos. En la figura 3 también puede apreciarse que de pH 7, donde se obtuvo un potencial ζ de -37.4 mV, hasta pH 9, no hay mucha variación del potencial ζ .

4.5 Cuantificación de proteína en muestras de NPs-HSA (sin SGI-1027)

La tabla 2 muestra el promedio de proteína total medida en cada una de las muestras de NPs-HSA (consistentes de 1mL) por réplica experimental de NPs-HSA.

Réplica de NPs-HSA	Promedio total (mg)	Desviación estándar
1	11.17	1.08
2	10.71	1.07
3	10.60	0.98

Tabla 2. Promedio de proteína total presente en cada una de las tres réplicas experimentales de NPs-HSA.

Esta medición fue de vital importancia para la realización de los siguientes experimentos tanto de detección de las NPs-HSA como para el protocolo de inyección en ratones C57BL/6.

4.6 Internalización del inhibidor SGI-1027 dentro de NPs-HSA

Otra parte fundamental del proyecto era la internalización del fármaco SGI-1027 (un inhibidor de la mADN) en las NPs-HSA (NPs-HSA+SGI-1027). Para ese fin, se utilizó el mismo método de desolvatación mencionado en la metodología. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes de SGI-1027 (2, 4, 6, 8, 10 y 12 μM)

4.7 Caracterización de las NPs-HSA con SGI-1027

4.7.1 Tamaño de NPs-HSA con el inhibidor SGI-1027

Nos preguntamos si el tamaño de ellos variaba en función de las diferentes concentraciones del SGI-1027. Al comparar el tamaño promedio de las tres réplicas biológicas de las NPs-HSA sin SGI-1027 con el promedio de tamaño las NPs-HSA+SGI-1027, puede observarse que el tamaño de las NPs-HSA+SGI-1027 aumenta conforme aumenta la cantidad de fármaco utilizado en la reacción de encapsulación ($p < 0.0145$; Figura 6).

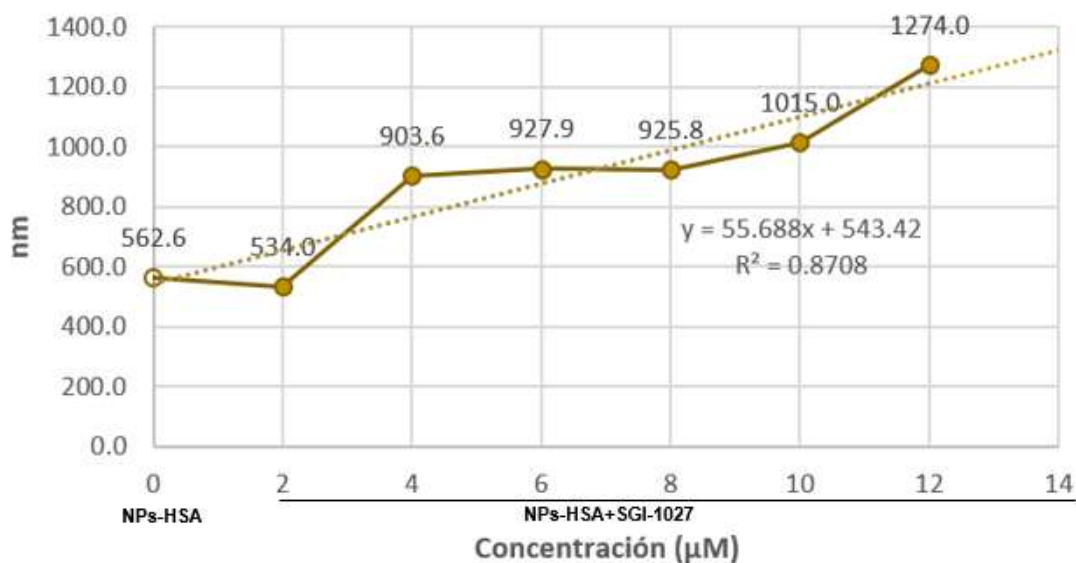


Figura 6. Tamaño de nanopartículas de HSA en función de la concentración de SGI-1027.

Se muestra el promedio del tamaño de las NPs-HSA (0 μM) y el promedio de las NPs-HSA+SGI-1027 (2 μM – 12 μM)

4.7.2 Potencial ζ

Se analizó también el potencial ζ de las NPs-HSA+SGI-1027 en función de la concentración de SGI-1027 a pH 9. Contrario a lo observado en el tamaño, no se encontró ninguna asociación clara entre el potencial ζ y la concentración de SGI-1027 (Figura 7).

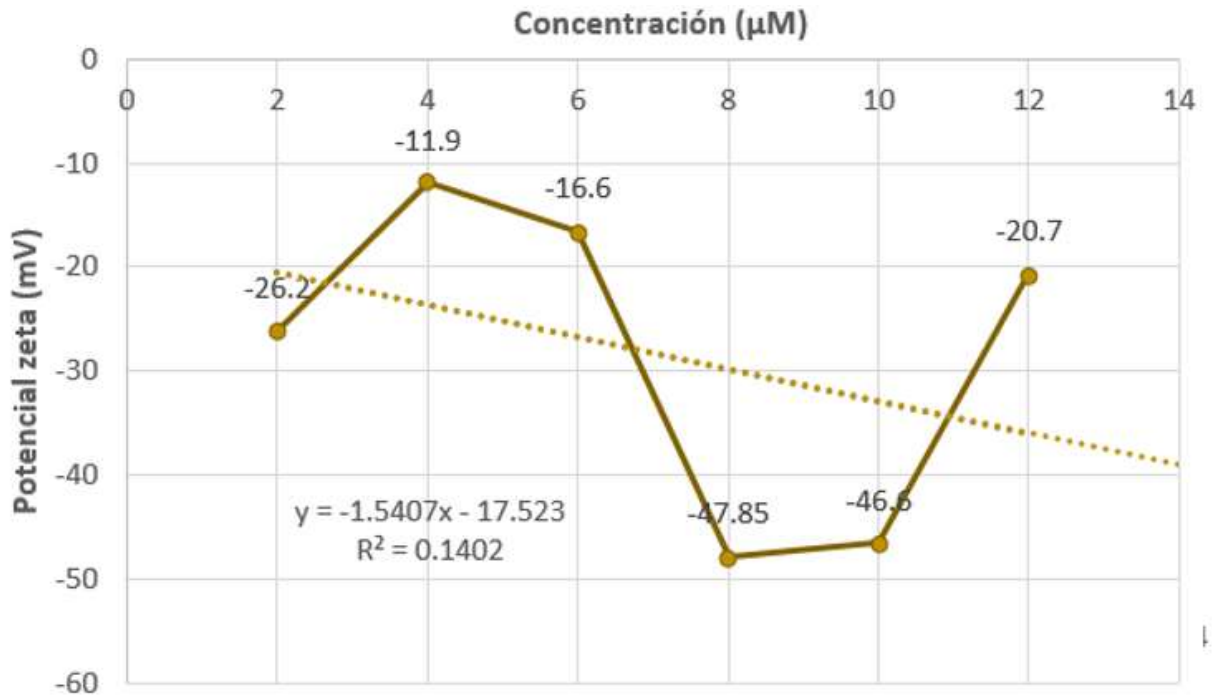


Figura 7. Potencial ζ de nanopartículas de HSA en función de la concentración de SGI-1027.

4.8 Caracterización de la morfología de las NPs-HSA con SGI-1027

Se tomaron aproximadamente 60 imágenes al azar de las NPs-HSA+SGI-1027 a las seis concentraciones (2 - 12 μM) (Figura 8). Se observó que las NPs-HSA+SGI-1027 individuales poseen formas mucho más definidas de 2 - 8 μM . A 10 μM las NPs son mucho menos definidas y en la concentración de 12 μM prácticamente ya no existe una estructura definida.

También se observa que el tamaño de las NPs-HSA+SGI-1027 individual cambia según la concentración de SGI-1027: de 2 a 4 μM el tamaño oscila entre 200 - 500 nm; a concentraciones mayores de 6 μM esto incrementa hasta llegar a 2000 nm. Además, se observa que a partir de 4 μM se forman agregados compuestos tanto por NPs-HSA de menor o mayor tamaño y estos incrementan al aumentar la concentración de SGI-1027.

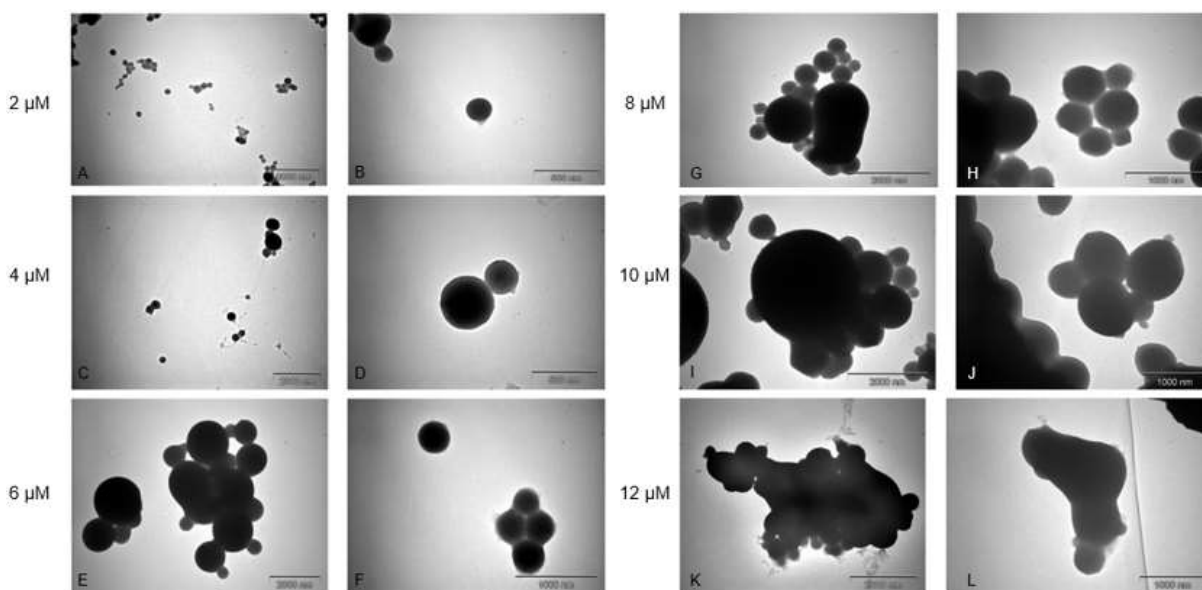


Figura 8. Caracterización morfológica de las NPs-HSA+SGI-1027.

Izquierda a derecha. Se presentan las imágenes de las NPs-HSA en las diferentes concentraciones de SGI-1027 (2-12 μM) con menor y mayor magnificación, respectivamente:

A, B: 8900X, 44000X. C, D: 7100X, 44000X. E, F: 8900X, 28000X.
G, H: 14000X, 28000X. I, J: 14000X, 22000X. K, L: 11000X, 22000X.

4.9 Detección de SGI-1027 por HPTLC

Para demostrar que el SGI-1027 fue encapsulado en las NPs-HSA se cuantificó el SGI-1027 extraído de las NPs, por HPTLC. El revelado se hizo con ninhidrina que al reaccionar con una amina primaria de SGI-1027 produce una coloración violeta intenso. Los controles negativos fueron DMSO, metanol y NPs-HSA sin SGI-1027; los controles positivos fueron una misma concentración de SGI-1027 disuelta en metanol, utilizada en diferentes cantidades.

Como se puede observar en la Figura 9, sólo los controles positivos y las muestras de las NPs-HSA+SGI-1027 muestran una banda de coloración violácea debido a la reacción con ninhidrina. Esto demuestra que el SGI-1027 fue encapsulado en las NPs-HSA.

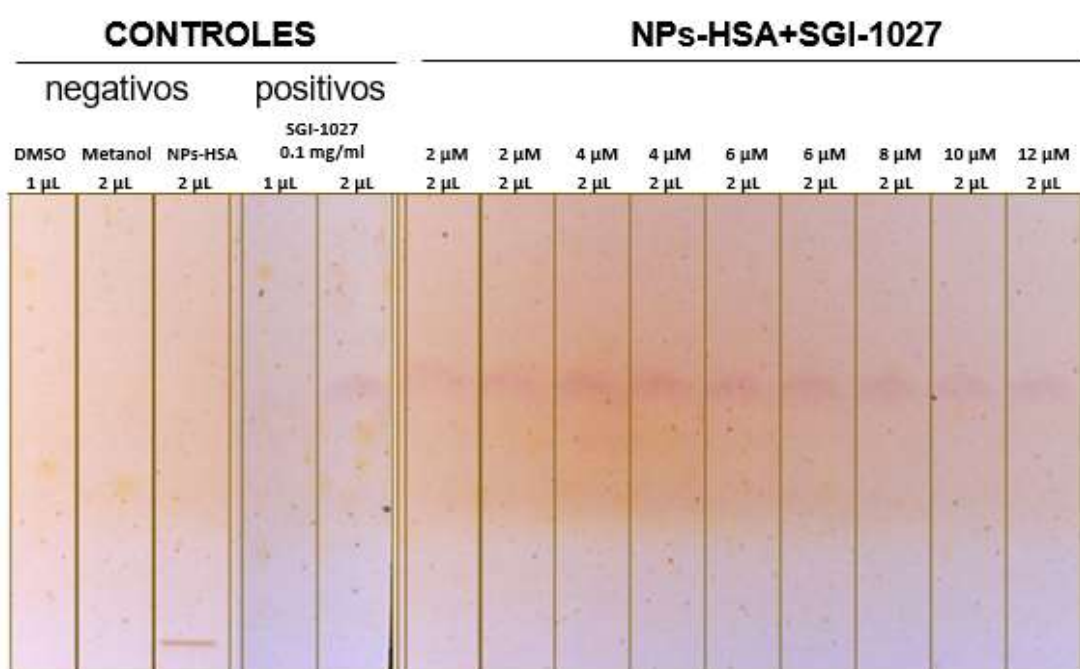


Figura 9. Detección de SGI-1017 por HPTLC.

Se depositó una cantidad de ~20 µg (0.020 mg) de NPs-HSA, las muestras de NPs-HSA+SGI-1027 (SGI-1027 extraído previamente), la separación se llevó a cabo en un solvente de acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico: H₂O, se reveló al sumergir la placa sílica en una solución de ninhidrina:etanol:ácido acético y posterior secado a 120 °C.

4.10 Detección de NPs-HSA (sin SGI-1027)

El propósito de los siguientes experimentos fue estandarizar una técnica que permitiese la detección de las NPs-HSA en sangre periférica una vez que éstas fuesen inyectadas por vía ip o sc en ratones C57BL/6. Las NPs-HSA se podrían distinguir de otros componentes de suero debido a su relativamente largo tamaño.

4.10.1 Detección de NPs-HSA por medio de electroforesis SDS-PAGE.

Las muestras de NPs-HSA se analizaron por SDS-PAGE en un gel al 10%. Se analizaron muestras con y sin β -mercaptoetanol en el buffer de carga, con el propósito de determinar si la reducción de los puentes disulfuro pudiese fragmentar las NPs-HSA y así mejorar la migración en geles de SDS-PAGE.

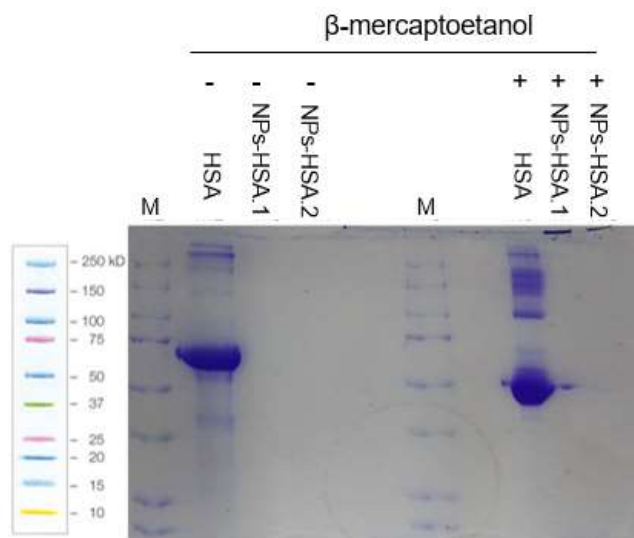


Figura 10. SDS-PAGE de HSA y NPs-HSA.

M= marcador de Kaleidoscope; tinción con azul de Coomassie.
NPs-HSA.1 y 2=49.5 y 4.9 μ g, respectivamente.

La figura 10 muestra la migración en SDS-PAGE de las muestras de HSA (reactivo) y 49.15 y 4.9 μ g de NPs-HSA, con y sin β -mercaptoetanol. La migración de las muestras de HSA (reactivo) con y sin β -mercaptoetanol fue diferente. Las diferencias se deben a que en ausencia de β -mercaptoetanol las proteínas generalmente conservan una estructura relativamente más compacta que permite una mayor migración en el gel, en comparación con estructuras parcial o completamente abiertas por el tratamiento de reducción. Sin embargo, el tratamiento de reducción no disminuyó de manera apreciable el tamaño de las NPs-HSA, las cuales no abandonaron los pozos, como puede apreciarse en los últimos carriles (NPs-HSA.1 y NPs-HSA.2). Este resultado indicó que la SDS-PAGE no es un método apto para la detección de NPs-HSA en muestras biológicas.

4.10.2 Detección de NPs-HSA en membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

El propósito de este experimento fue identificar un método de detección de las NPs-HSA independiente de electroforesis, por medio de su inmovilización en una membrana de nitrocelulosa y su posterior tinción por medio de Rojo Ponceau (Figura 11).

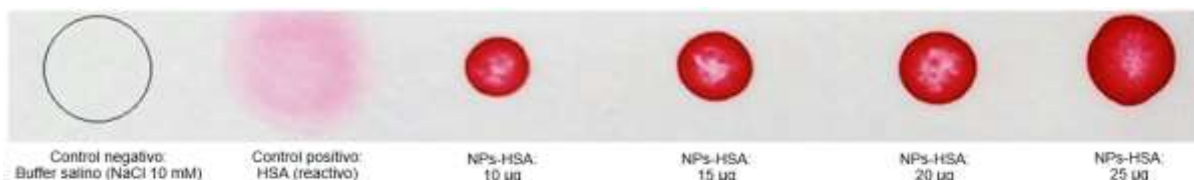


Figura 11. NPs-HSA se tiñen de manera diferencial respecto a HSA nativo (reactivo) y varían en función de la concentración.

De izquierda a derecha. Control negativo: Buffer salino (NaCl 10 mM) con el que se prepararon las NPs, control positivo: HSA nativo, reactivo con el que se elaboraron las NPs, muestra de NPs-HSA (10 μ g-25 μ g). Se puso la misma cantidad (1 μ L) para todas las muestras. Tinción con Rojo Ponceau en membrana de nitrocelulosa.

Un primer resultado importante fue que las NPs-HSA se inmovilizan en nitrocelulosa, lo que es esencial para su eventual detección por medio de anticuerpos contra HSA. Además, el patrón de tinción reveló que las NPs-HSA muestran una menor migración radial desde el punto de aplicación, en comparación con la HSA. Esto es explicable por el mayor tamaño de las NPs-HSA, lo que retarda su migración en la matriz de la nitrocelulosa.

4.11 Inyección de NPs-HSA en ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal y subcutánea

Se procedió a la inyección de 150 μ L NPs-HSA en tres ratones machos C57BL/6 (2 ratones heterocigotos ApoE y 1 ratón silvestre) por vía intraperitoneal (ip) o subcutánea (sc). La inyección control se realizó en 1 ratón macho heterocigoto por ApoE. Se obtuvo sangre periférica previo a la inyección (0 h) y a las 4, 8, 24 y 48 horas post inyección (hpi). A las 48 hpi los ratones fueron sacrificados por decapitación y se extrajeron tejidos de corazón, riñón, hígado y aorta. La razón para obtener dichos tejidos es determinar en estudios futuros si existe o no una acumulación de NPs-HSA en tejidos específicos.

4.12 Detección de las NPs-HSA en muestras de sangre de los ratones ip y sc por inmuno-dot blot

En las imágenes tomadas por el equipo de ChemiDoc™ Touch sí se detectó una señal del anticuerpo anti-HSA en las muestras de C57BL/6 tanto en los ratones inyectados por vía ip como sc (Figura 12). En ambos grupos de ratones inyectados se detectó una señal en el tiempo 0, lo que sugirió un cierto grado de reactividad cruzada entre la HSA y murina. Sin embargo, los ratones ApoE heterocigotos inyectados por vía ip tuvieron un fondo alto (0 h) (datos no mostrados) pero éste no se observó en los ratones ApoE nulicigotos inyectados por vía sc, los cuales mostraron en general una menor intensidad de señal con respecto a las muestras ip. El inmuno-dot blot de sc reveló además que había un incremento en la intensidad de señal de manera dependiente al tiempo (0-48 h). El resultado fue consistente en todas las repeticiones (Figura 12).

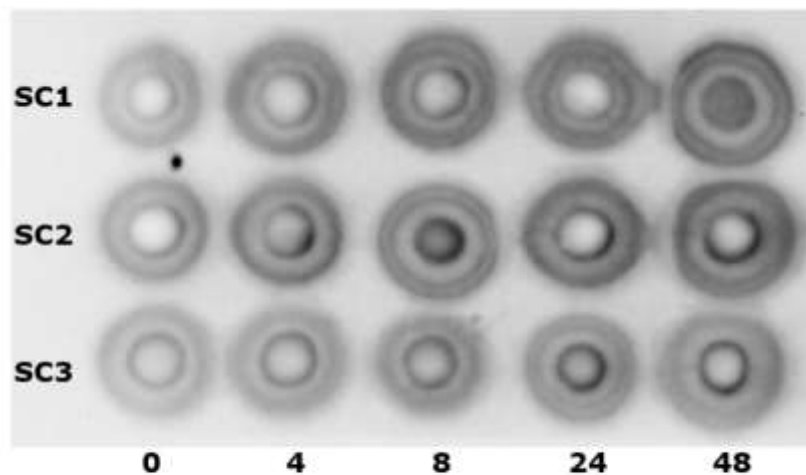


Figura 12. Inmuno-dot blot de las muestras sanguíneas de ratones ApoE^{-/-} inyectados por vía subcutánea (sc) contra HSA. SC1-SC3 representan cada una muestras de un ratón diferente, en la parte inferior, de izquierda a derecha, se presentan los tiempos: previo a la inyección (0 h) y las horas post-inyección (4-48 h).

Estos resultados dan paso a dos posibilidades interesantes, es decir, que efectivamente las NPs-HSA inyectadas por vía subcutánea estuviesen siendo detectadas por el anticuerpo anti-HSA e incrementaran en cantidad en función de las horas post-inyección (hpi). Sin embargo, este efecto podría también reflejar un incremento de la expresión de albúmina endógena murina causado por la inyección. Para excluir este último, se realizó un Western blot para las muestras de unos de los ratones sujeto a inyección sc (SC2) en los tiempos 0-48 h (Figura 13).

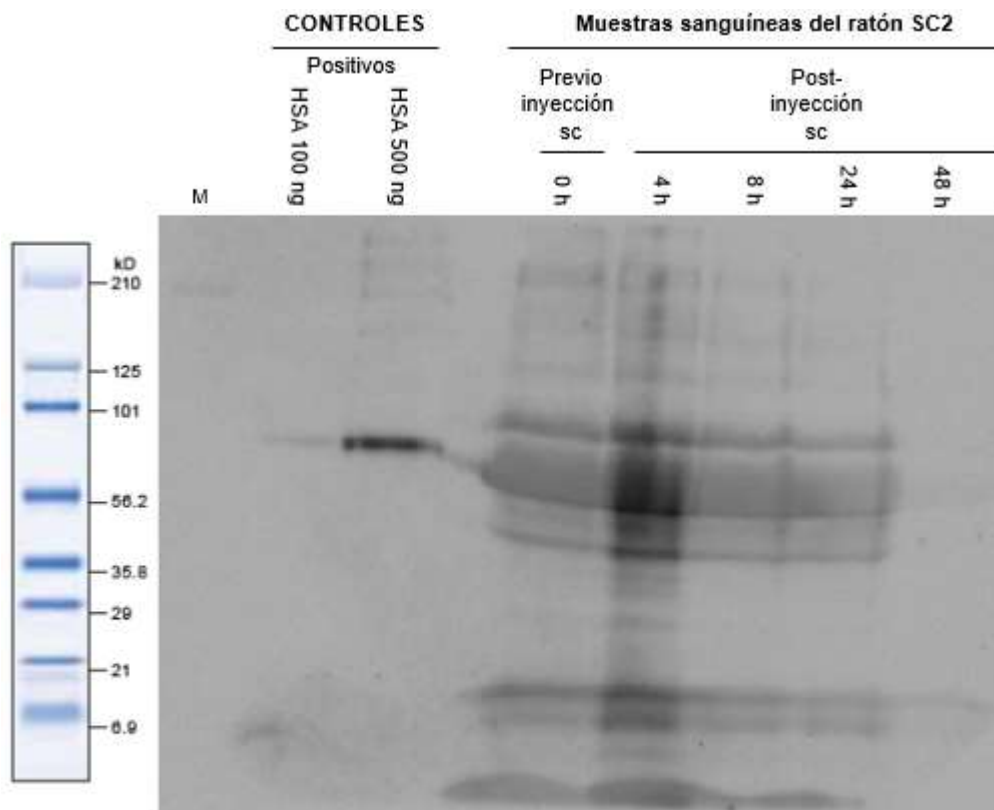


Figura 13. Western blot de las muestras sanguíneas del ratón SC2. Izquierda a derecha. M= Marcador Prestained SDS-PAGE Standards, controles positivos de HSA (reactivo) de 100 y 500 ng, muestras sanguíneas del ratón SC-2 en el tiempo previo a inyección sc (0 h) y tiempo post-inyección sc (4-48 h).

Como era esperado, se ve que conforme aumenta la cantidad de HSA de 100 ng a 500 ng hay una mayor detección de la intensidad de señal (Figura 13). Por otro lado, en las muestras sc del ratón SC2 (0 –48h), no se observó un incremento similar. Esto indica que la señal detectada por inmuno-dot blot (Figura 12) no es consecuencia del aumento de expresión de la albúmina sérica murina.

4.13 Cuantificación de NPs-HSA en las muestras sanguíneas de ratones inyectados por vía sc

Para la determinación de la cantidad de NPs-HSA en las muestras de sangre de los ratones inyectados por vía sc, se hizo nuevamente un inmuno-dot blot usando las mismas muestras sc además de una curva estándar de HSA (reactivo). Las imágenes obtenidas por ChemiDoc™ Touch fueron analizadas con Image Lab. Para cada hpi, el valor de intensidad fue calculado restando el valor de la intensidad del tiempo 0 (Tabla 3). Se graficaron los valores determinados de la Tabla 3 (columna “y = ng”) (Figura 14).

Ratón	Tiempo (h)	Mean Value (Int)	Mean Value (Int) - 0	y = ng
SC1	0	3,236.30	0.00	0
	4	6,266.00	3,029.70	8.84
	8	7,864.90	4,628.60	15.71
	24	7,640.90	4,404.60	14.75
	48	9,021.10	5,784.80	20.68
SC2	0	4,083.60	0.00	0
	4	6,697.60	2,614.00	7.05
	8	7,657.40	3,573.80	11.18
	24	8,217.90	4,134.30	13.59
	48	9,174.00	5,090.40	17.70
SC3	0	3,378.30	0.00	0
	4	4,770.50	1,392.20	1.80
	8	5,588.00	2,209.70	5.31
	24	6,185.70	2,807.40	7.88
	48	6,648.50	3,270.20	9.87

Tabla 3. Esquematación de los valores de intensidad promedio (Int) y recuperación (ng) de las NPs-HSA inyectadas sc en sangre periférica de los ratones sc (SC1-SC3).

Se presentan los valores de intensidad promedio en los diferentes tiempos 0-48 h de los tres ratones sc [C. “Mean Value (Int)”]. Debido a la señal encontrada a las 0 h debida a la reactividad cruzada con la albúmina endógena del ratón, se restó este valor de señal al resto de los tiempos [C. “Mean Value (Int) - 0”]. Al sustituir los valores de la penúltima columna en la ecuación de la curva estándar ($y = 0.0043x - 4.1919$) – Figura 3 – se obtienen los valores de los ng recuperados de las NPs-HSA en los diferentes tiempos (C. “y = ng”).

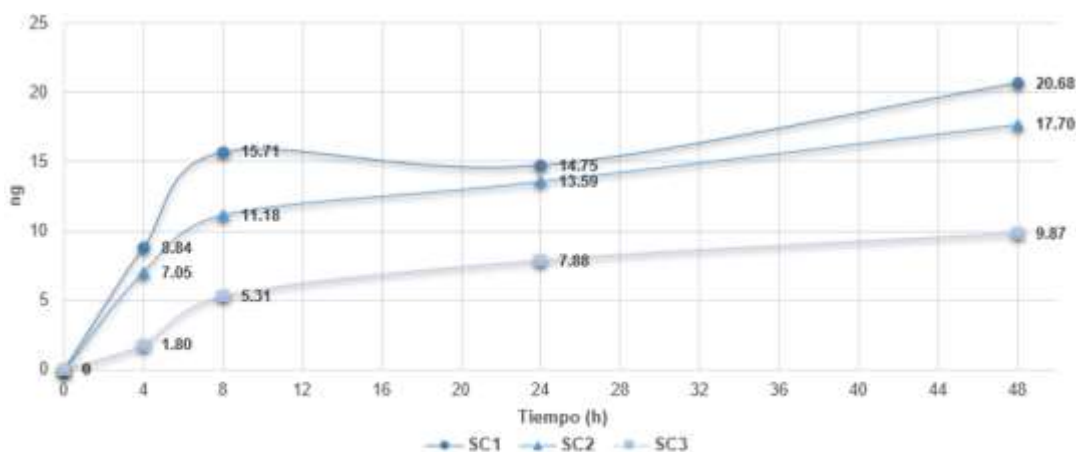


Figura 14. Recuperación dependiente del tiempo de las NPs-HSA inyectadas sc en sangre periférica.

Este gráfico representa la cantidad (ng) de NPs-HSA recuperadas de las muestras de sangre de ratones sc de 0-48 h. Cada color corresponde a un ratón sc individual.

Como puede apreciarse la cantidad en ng de NPs-HSA incrementó de manera dependiente del tiempo en cada uno de los ratones. Basándonos en los valores a las 48 hpi, la cantidad de NPs-HSA detectada en las muestras de sangre periférica de los ratones inyectados por vía sc fue el ~20% de las NPs-HSA inyectadas totales.

Además, entre las muestras de los tres ratones se observó diferencias en la cantidad de NPs-HSA en la sangre. Se procedió con el análisis estadístico para comparar las diferencias entre tiempo y grupos sc.

4.14 Análisis estadístico

4.14.1 Análisis de varianza (ANOVA doble)

Se comparó la variable dependiente (respuesta) representada por ng contra los grupos de variables independientes (factores), tiempo (h) y ratón sc (SC1-3) por medio de una prueba ANOVA. Se presentan estos datos (Tabla 4)

Fuente de Variación	valor-p	d.f.
Factor #1 (tiempo)	0.00023	3
Factor #2 (ratón)	0.0001	2
<i>Dentro del grupo</i>		6
Total		11

Tabla 4. Comparación la variable dependiente (respuesta – ng) contra los grupos de variables independientes (Factores: Tiempo y ratón).

El valor de p de esta prueba revela que existe diferencia entre algunos de los tiempos y también entre los ratones sc, siendo muy significativa la p del factor tiempo. Sin embargo, como puede notarse, el ANOVA no revela cuáles grupos son diferentes entre sí, motivo por el que fue necesario hacer una prueba post hoc.

4.14.2 Prueba de post hoc (Scheffé)

Se comparó primeramente el factor 1 (tiempo), comparando los grupos de tiempo entre sí (Tabla 5) y en segundo lugar se utilizó la prueba de Scheffé para comparar el factor 2 (ratón), comparando los grupos de ratones sc entre sí (Tabla 6)

Grupo vs. Grupo (Contraste)	valor-p
4 vs 8	0.00649
4 vs 24	0.00139
4 vs 48	0.00004
8 vs 24	0.59094
8 vs 48	0.0035
24 vs 48	0.01873

Tabla 5. Comparación entre los grupos de horas post-inyección (h.p.i) de los ratones sc (Factor #1).

Al comparar las diferentes hpi, detectamos diferencias altamente significativas, excepto en el caso de 8 h en comparación con 24 h. Este último dato refleja el carácter bifásico de la cinética de aparición de

las NPs-HSA en la sangre periférica, con una aparente ralentización del fenómeno entre las 8 y 24 h (véase figura 13). La conclusión fue que el incremento de las cantidades de NPs-HSA detectadas en la sangre periférica es significativo.

Grupo vs. Grupo (Contraste)	valor-p
SC1 vs SC2	0.03236
SC1 vs SC3	7.20927E-6
SC2 vs SC3	0.00013

Tabla 6. Comparación entre los grupos de ratones sc (Factor #2).

Cuando se compararon los ratones individuales, detectamos diferencias significativas que revelan una cierta variabilidad interindividual en la migración de las NPs-HSA del espacio subcutáneo a la circulación sanguínea.

V DISCUSIÓN

En este estudio se describe el diseño de sistemas portadores de fármacos consistentes en nanopartículas de albúmina sérica humana (NPs-HSA), reportando por primera vez, la internalización del SGI-1027, un inhibidor de la mADN, con la finalidad a largo plazo de desarrollar una terapia para el tratamiento de aterosclerosis por medio de la modificación del epigenoma vascular.

Las NPs-HSA se elaboraron por la técnica de desolvatación (Weber et al., 2000), se hizo una caracterización morfológica de las mismas, así como una caracterización del tamaño y potencial ζ . La caracterización es importante debido a que la distribución en el cuerpo de los sistemas coloidales transportadores de fármacos es influenciada principalmente por estas dos propiedades fisicoquímicas (Moghimi et al., 2001b).

Concerniente al tamaño, las NPs-HSA se obtuvieron de tamaños menores a 200 nm, éstas deberían ser lo suficientemente pequeñas para no ser removidas por mecanismos de filtración simple en los capilares (Moghimi et al., 2012).

El potencial ζ representa uno de los principales determinantes para la absorción proteica en fluidos biológicos y puede modificar la interacción con receptores específicos de membrana (Langer et al., 2003). El potencial ζ obtenido del promedio de las réplicas biológicas de NPs-HSA sin SGI-1027 para un pH de 9, fue de -35.9 mV. El análisis de la variación del potencial ζ en función del pH reveló una correlación negativa, el potencial ζ en pH 7 fue de -37.4 mV y hubo valores similares en el rango de pH 7-9. Por lo tanto, las NPs-HSA no tenderían a formar agregados en pH fisiológico, lo cual es especialmente importante en el diseño de sistemas portadores de fármacos.

Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por Langer *et al.* (2003) medido en pH 7, con un potencial ζ cercano a -40 mV. Sin embargo, hay una diferencia en cuanto a los valores obtenidos por encima de este valor. Ellos reportaron que a medida que incrementó el valor de pH el potencial ζ se redujo de -40 mV a -50 mV en valores de pH comprendidos entre 7.2 y 10. Esta diferencia podría deberse debido a la concentración de glutaraldehído (8%) utilizada para la elaboración de las NPs-HSA en ese estudio, debido a que los autores encontraron una reducción en el valor del punto isoeléctrico (PI) conforme se incrementa la concentración de glutaraldehído, esto puede por lo tanto, modificar los valores del potencial ζ obtenidos en los diferentes puntos de pH (Langer et al., 2003)

La internalización del inhibidor de la metilación SGI-1027 dentro de las NPs-HSA se llevó a cabo en un rango de concentración de 2-12 μM de fármaco. La caracterización de su tamaño y morfología revelaron que hay una consistencia en los cambios encontrados conforme se incrementa la concentración de SGI-1027 utilizada. Adicionalmente se encontró una correlación significativa entre el tamaño de las NPs-HSA y la concentración de SGI-1027. No se observó ésta misma correlación para el potencial ζ , tampoco se encontró una correlación significativa entre el tamaño y el potencial ζ . En la caracterización morfológica se observó una tendencia en la agregación, en la concentración de 2 μM de fármaco pueden encontrarse principalmente nanopartículas individuales y esféricas de tamaño entre 200-500 nm, conforme se incrementa la concentración de SGI-1027 comienzan a ver mayores agrupaciones de NPs-HSA y se va perdiendo la definición morfológica.

La concentración de 6 μM de SGI-1027 representa el punto medio, a partir de esta concentración, comienza a haber NPs-HSA de gran tamaño (1000 nm) e incrementan los agregados de las nanopartículas. En la concentración de 10 μM de SGI-1027 las NPs-HSA son de gran tamaño y hay un gran número de agregados. Finalmente, en la concentración de 12 μM caracterizado por grandes agrupaciones amorfas, ya no existen NPs-HSA individuales ni NPs-HSA definidas. Esto también podría ser consistente con la solubilidad de SGI-1027, de acuerdo con Datta *et al.* (2009) el límite solubilidad de SGI-1027 es de 20 μM , 12 μM se estaría acercando a este límite, pudiendo repercutir en la cantidad de SGI-1027 que puede internalizarse dentro de las NPs-HSA o en su agregación.

Este estudio sugiere por lo tanto, que la concentración ideal para la internalización de SGI-1027 podría oscilar en el rango de 2 – 6 μM , siendo este último el máximo.

La detección de SGI-1027 encapsulado fue posible por HPTLC. El SGI-1027 fue extraído de las NPs-HSA+SGI-1027 y al comparar el estándar de SGI-1027 con las muestras de 2-12 μM se observó que presentaron la misma coloración violácea debida a la reacción con ninhidrina, pero no se detectó ninguna señal en el material extraído de NPs-HSA vacías.

Como se mencionó a lo largo del estudio, se buscaron métodos que permitiesen la detección de las NPs-HSA en muestras biológicas. Inicialmente se pensó en la separación de las NPs-HSA por medio de electroforesis SDS-PAGE, ya que este tipo de metodología de separación se ha utilizado previamente para NPs de plata y oro en geles de agarosa al 0.2% (Hanauer *et al.*, 2007). Sin embargo, el tamaño de las NPs en dicho estudio estuvo en el rango de 20-40 nm. Como era esperado, las NPs-HSA no migraron en el gel debido a su tamaño.

El método más efectivo encontrado en este estudio para la detección de las NPs-HSA fue por medio de su inmovilización en una membrana de nitrocelulosa, lo que permitió la posterior detección por inmuno-dot blot en las muestras de sangre ip y sc de los ratones C57BL/6.

La inyección de la vena caudal lateral es la vía usada tradicionalmente para la entrega de fármacos al sistema vascular, sin embargo, representa complicaciones prácticas y éticas en el caso de administraciones repetidas, especialmente en ratones de pelaje oscuro como la cepa C57BL/6 utilizada en este estudio. Por lo tanto, analizamos la posibilidad de que la administración ip o sc fuesen alternativas eficaces a la vía intravenosa. Al detectar la intensidad de señal de anti-HSA, se encontró que en ambas vías hubo reactividad cruzada del anticuerpo anti-HSA con la albúmina sérica endógena murina.

Sin embargo, los ratones inyectados por vía ip tuvieron una mayor intensidad de la señal inespecífica. Debido a la inespecificidad de la señal, las muestras ip no fueron utilizadas en los análisis posteriores. La cavidad peritoneal es un compartimento único dentro del cual residen una variedad de células inmunes, entre ellas, el 55% está representado por poblaciones de macrófagos residentes que contribuyen a la mayor parte de la fagocitosis que ocurre dentro de la cavidad peritoneal (Ghosn et al., 2010). Se ha reportado la internalización específica de NPs por parte de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal después de la administración por vía ip (Matsui et al., 2015; Pham et al., 2018). Por lo tanto, la inyección ip podría no representar la mejor vía de administración para las NPs-HSA considerando la internalización de las mismas por parte de estas poblaciones residentes de macrófagos en la cavidad peritoneal y por el sitio de la lesión aterosclerótica.

Adicionalmente, se consideró que el genotipo ApoE podría haber influido en la diferencia de detección de la HSA más que la vía de administración per sé, aunque esto necesitaría ser investigado con mayor detenimiento. De cualquier manera, estos resultados son consistentes con los de Moghimi *et al.* (2001a, 2008), ya que ellos encontraron que las variaciones en el contenido, la concentración y la actividad de proteínas plasmáticas, siendo la albúmina sérica la más abundante de ellas, están asociadas con el sexo, la edad, las condiciones dietéticas, las diferencias de poblaciones, las condiciones fisiopatológicas y la composición genética, y pueden por lo tanto, esperarse variaciones significativas en los patrones de unión a proteínas y en las respuestas a las NPs que pueden tener consecuencias importantes en la farmacocinética de las mismas.

Debido a la reactividad cruzada de anti-HSA encontrada en las muestras sanguíneas de los ratones inyectados por vía sc, fue necesario descartar la posibilidad de que la señal detectada por anti-HSA la señal detectada por anti-HSA fuese en realidad un incremento de la albúmina endógena propia del ratón. Esto se descartó con el Western Blot realizado, debido a que no ocurrió un cambio relacionado con la expresión de la albúmina sérica endógena.

En este estudio se encontró que la vía sc representa una vía práctica y efectiva para entregar NPs-HSA al tejido vascular, además de ser mucho menos invasiva que la inyección de la vena caudal o la inyección intraperitoneal. En este estudio se encontró que la cantidad (ng) de NPs-HSA incrementó de manera altamente significativa en sangre periférica en función del tiempo, detectado inicialmente por el inmuno-dot blot de las muestras de sangre sc y por medio de su comparación con el estándar de HSA se determinó que se recuperó ~20% de las NPs-HSA inyectadas por vía subcutánea a las 48 horas post-inyección.

VI CONCLUSIONES

1. Las NPs-HSA representan un excelente sistema portador de fármacos *in vivo* debido a sus propiedades fisicoquímicas y estabilidad en un rango de pH de 4-9, no teniendo una variación importante en el potencial ζ en pH de 7-9.
2. La internalización de SGI-1027 se llevó a cabo en un rango de concentración de 2-12 μM , se encontró una correlación significativa entre el tamaño de las NPs-HSA y la concentración de SGI-1027 y una pérdida en la definición morfológica conforme se incrementó la concentración del inhibidor.
3. El rango más propicio para la internalización de SGI-1027 se encontró de 2 μM – 6 μM , siendo la concentración 6 μM de SGI-1027 el máximo adecuado de acuerdo con la caracterización morfológica.
4. La vía de administración sc representa una vía práctica y efectiva para la entrega de NPs-HSA para el tejido vascular. La cantidad de NPs-HSA recuperada en sangre periférica incrementa significativamente en función de las hpi y alcanzando su recuperación máxima a las 48 hpi.

VII PERSPECTIVAS

El advenimiento de la nanotecnología y el desarrollo de sistemas portadores sofisticados que permitan la detección, focalización y liberación de fármacos para el tratamiento de enfermedades, han dado paso al diseño de sistemas de entrega dirigidos basados en nanopartículas, siendo especialmente importantes aquellos sistemas basados en nanopartículas de albúmina sérica, debido a la alta encapsulación de fármacos, buena biocompatibilidad y biodegradación de estos.

Actualmente existen plataformas basadas en estos sistemas portadores de fármacos de escala nanométrica para el tratamiento de ECVs, incluyendo NPs poliméricas, sin embargo, no se ha propuesto hasta el momento la utilización de sistemas basados en NPs-HSA para el tratamiento de aterosclerosis por medio de la modificación del epigenoma vascular debida a la internalización de un inhibidor de la metilación, lo que representa una perspectiva novedosa. Por los resultados de esta investigación se propone indagar más a fondo si las diferencias de genotipo para ApoE pueden influir en la farmacocinética y ulterior detección de las NPs-HSA.

Además, se debe investigar si existe acumulación de NPs-HSA en tejidos de hígado, riñones, corazón y aorta, para dilucidar con mayor detalle cuál es su comportamiento *in vivo* y de qué manera se ve influenciada la biodistribución de las NPs-HSA, además de las NPs-HSA encontradas en sangre periférica reportadas en el presente estudio. Otro punto interesante por investigar sería analizar cuál es el comportamiento de las NPs-HSA más allá de 48 h, analizar el tiempo de vida media de las mismas y también su tiempo máximo de circulación en sangre periférica.

Los resultados son muy alentadores ya que permiten iniciar con una serie de experimentos para el diseño de sistemas portadores para el direccionamiento de fármacos con blancos terapéuticos más específicos en aterosclerosis, dando lugar a la posibilidad de generar nuevos conocimientos en el campo de la nanotecnología, en el diseño de sistemas transportadores con fines terapéuticos y en los mecanismos epigenéticos involucrados en la etiología de ECVs como aterosclerosis, pudiendo contribuir de manera muy importante a la medicina tradicional del futuro.

VIII. REFERENCIAS

1. Afergan, E., Ben, David, M., Epstein, H., Koroukhov, N., Gilhar, D., Rohekar, K., et al. (2010). Liposomal simvastatin attenuates neointimal hyperplasia in rats. *AAPS J*, 12(2), 181–187.
2. Aizik, G., Grad, E. & Golomb, G. (2017). Monocyte-mediated drug delivery systems for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Deliv Transl Res*, 1-15.
3. Allen, T.M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2(10), 750–763
4. Allen, T.M. & Cullis, P.R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303(5665) ,1818–1822.
5. Anand, U. & Mukherjee, S. (2013) Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12), 5394-5404.
6. Andresen, T.L., Jensen, S.S. & Jørgensen K. (2005). Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res*, 44(1), 68–97.
7. Arnedo, A., Irache, J., Merodio, M., et al. (2004). Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J Control Release*, 94(1), 217-227.
8. Auverx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte macrophage differentiation. *Experientia*, 47(1), 22–31.
9. Barr, F.A., Sillje, H.H., Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(6):429–440.
10. Bekkering, S., Quintin, J., Joosten, L.A., Van der Meer, J.W., Netea, M.G. & Riksen, N.P. (2014). Oxidized Low-Density Lipoprotein induces Long-Term Proinflammatory Cytokine Production and Foam Cell Formation Via Epigenetic Reprogramming of Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(8), 1731-1738.
11. Bird, A. (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70(1), 5–8.

12. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. & Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation of CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696), 894-897.
13. Braunerseuther, V., Zerneck, A., Arnaud, C., Lehn, E.A., Steffens, S., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Burger, F., Pelli, G., Luckow, B., Mach, F. & Weber C. (2007). Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(2), 373-379.
14. Calkin, A.C. & Tontonoz, P. (2010). Liver X receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(8), 1512-1518.
15. Cao, Q. Wang, X., Jia, L., Mondal, A.K., Diallo, A., Hawkins, G.A., Das, S.K., Parks, J.S., Yu, L., Shi, H. & Xue B. (2014). Inhibiting DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine ameliorates atherosclerosis through suppressing macrophage inflammation. *Endocrinology*, 155(12), 4925-4938.
16. Carter, D.C., He, X.M., Munson, S.H., et al. (1989). Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, 244(4909), 1195-1198.
17. Choi, S.H., Byeon, H.J., Choi, J.S., et al. (2015). Inhalable self-assembled albumin nanoparticles for treating drug-resistant lung cancer. *J Control Release*, 197, 199-207.
18. Chomistek, J.E., Manson, M.L., Stefanick, B., Lu, M., Sands-Lincoln, S.B., Going, L., Garcia, M.A., Allison, S.T., Sims, M.J., LaMonte, K.C. & Johnson, C.B. Eaton. (2013). Relationship of sedentary behavior and physical activity to incident cardiovascular disease: results from the Women's Health Initiative. *J. Am. Coll. Cardiol*, 61(23), 2346-2354.
19. Chuang, L.S. Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. & Li, B.F. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21^{wAF1}. *Science*, 277(5334), 1996-2000.
20. Chuang, J.C., Yoo, C.B., Kwan, J.M., Li, T.W., Liang, G., Yang, A.S. & Jones, P.A. (2005). Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther*, 4(10), 1515-1520.

21. Dadparvar, M., Wagner, S., Wien, S., et al. (2011). HI 6 human serum albumin nanoparticles—Development and transport over an in vitro blood– brain barrier model. *Toxicol Lett*, 206(1), 60-66.
22. Das, S., Banerjee, R. & Bellare, J. (2005). Aspirin loaded albumin nanoparticles by coacervation: implications in drug delivery. *Trends Biomater Artif Organs*, 18(2), 203-212.
23. Datta, J., Ghoshal, K., Denny, W.A., Gamage, S.A., Brooke, D.G., Phiasivongsa, P., Redkar, S. & Jacob, S.T. (2009). A New Class of Quinoline-Based DNA Hypomethylating Agents Reactivates Tumor Suppressor Genes by Blocking DNA Methyltransferase 1 Activity and Inducing Its Degradation. *Cancer Res*, 69(10), 4277–4285.
24. Davis, M.E., Chen, Z. & Shin, D.M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 7(9):771-782.
25. Divsalar, A., Saboury, A.A., Nabiuni, M., et al. (2012). Characterization and side effect analysis of a newly designed nanoemulsion targeting human serum albumin for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1; 98:80-84.
26. Dong, C., Yoon, W. & Goldschmidt-Clermont P.J. (2002). DNA methylation and atherosclerosis. *J Nutr*, 132(8 Suppl):2406S-2409S.
27. Doshi, N. & Mitragotri, S. (2010). Macrophages recognize size and shape of their targets. *PLoS One.*, 5(3):e10051.
28. Drinkwater, R. D., Blake, T. J., Morley, A. A. & Turner, D. R. (1989). Human lymphocytes aged in vivo have reduced levels of methylation in transcriptionally active and inactive DNA. *Mutat Res*, 219(1), 29–37.
29. Dubé, J.B & Hegele R.A (2013). Genetics 100 for cardiologists: basics of genome-wide association studies. *Can J Cardiol*, 29(1), 10-17.
30. Dunn, J., Qiu, H., Kim, S., Jingo, D., Hoffman, R., Kim, C.W., Jang, I., Son, D.J., Kim, D., Pan, C., Fan, Y., Jordan, I.K. & Jo, H. (2014). Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 124(7), 3187 – 3199.
31. Elzoghby, A.O., Samy, W.M. & Elgindy, N.A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*, 157(2),168-82.

32. Esteller, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1, R50–R59.
33. Feinberg, A.P. (2010). Epigenomics reveals a functional genome anatomy and a new approach to common disease. *Nat. Biotechnol*, 28 (10), 1049–1052.
34. Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, 5(3), 161–71.
35. Gerry, J.M. & Pascual G. (2008). Narrowing in on cardiovascular disease: the atheroprotective role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Trends Cardiovasc Med*, 18(2), 39-44.
36. Ghosn, E.E., Cassado, A.A., Govoni, G.R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D.M., Bortoluci, K.R., Almeida, S.R. & Herzenberg, L.A. (2010). Two physically, functionally and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci*, 107(6): 2568-2573.
37. Godin, B., Sakamoto, J.H., Serda, R.E., Grattoni, A., Bouamrani, A. & Ferrari, M. (2010). Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 31 (5), 199–205.
38. Gray, M. & Botelho. R.J. (2017). Phagocytosis: hungry. *Hungry Cells. Methods Mol Biol*, 1519, 1–16.
39. Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P. & Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 2(2), 275-281.
40. Gutman, D. & Golomb, G. (2012). Liposomal alendronate for the treatment of restenosis. *J Control Release*, 161(2), 619–627.
41. Hamad, I. & Moghimi, S.M. (2008). Critical issues in site-specific targeting of solid tumours: the carrier, the tumour barriers and the bioavailable drug. *Exp Opin Drug Deliv*, 5(2), 205–219.
42. Hanauer, M., Pierrat, S., Zins, I., Lotz, A. & Sönnichsen, C (2007). Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape. *Nano Lett*, 7(9):2881-2885.

43. Hansson, G.K. & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 12(3), 204-212.
44. He, X.M. & Carter, D.C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358(6383), 209-215.
45. Issa, J. P. (2000). CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 249, 101–118.
46. Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J. & Tontonoz P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*, 9(2): 213-219.
47. Karimi, M., Solati, N., Amiri, M., et al. (2015). Carbon nanotubes part I: preparation of a novel and versatile drug-delivery vehicle. *Expert Opin on Drug Deliv*, 12(7) ,1-17.
48. Karimi, M., Mirshekari, H., MoosaviBasri, M., Bahrami, S., Moghoofei, M., Hamblin, MR. (2016a). Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv Drug Deliv Rev*, 106(Pt A), 45-62.
49. Karimi, M., Bahrami, S., Ravari, S.B., Zangabad, P.S., Mirshekari, H, Bozorgomid, M., Shahreza, S., Sori, M. & Hamblin, M.R. (2016b). Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, 13(11):1609-1623.
50. Kim, B.Y., Rutka, J.T. & Chan, W.C. (2010). Nanomedicine. *N. Engl. J. Med*, 363(25) 2434-43.
51. Koga, J., Matoba, T. & Egashira, K. (2016). Anti-inflammatory nanoparticle for prevention of atherosclerotic vascular diseases. *J Atheroscler Thromb*, 23(7), 757–765.
52. Kouchakzadeh, H., Safavi, MS. & Shojaosadati, S.A. (2015). Efficient Delivery of Therapeutic Agents by Using Targeted Albumin Nanoparticles. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 98,121-143.
53. Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*, 132(3), 171-183
54. Kratz, F. & Elsadek, B. (2012). Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release*, 161(2), 429-445

55. Kufleitner, J., Wagner, S., Worek, F., et al. (2010). Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: Drug loading, particle size and drug release. *J microencapsul*, 27(6), 506-513.
56. Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff H.F. & Freeman M.W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, 277(51), 49982-49988.
57. Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H. & Schubert, D. (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*, 257(1-2), 169-180.
58. Lawrence, T. & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 750–761.
59. Leuschner, F., Dutta, P., Gorbato, R., Novobrantseva, T.I., Donahoe, J.S., Courties, G., et al. (2011). Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol*, 29(11), 1005–1010.
60. Li, C., Zhang, D., Guo, H., et al. (2013). Preparation and characterization of galactosylated bovine serum albumin nanoparticles for liver-targeted delivery of oridonin. *Int J Pharm*, 448(1), 79-86.
61. Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915–926.
62. Li, E., Beard, C. & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366(6453), 362–365.
63. Lilly, L.S. (2009). *Fisiopatología de las cardiopatías*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
64. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117(1), 175–184 .
65. Lund, G., Andersson, L., Lauria, M., Lindholm, M., Fraga, M. F., VillarGarea, A., Ballestar, E., Esteller, M. & Zaina, S. (2004). DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem*. 279(28): 29147–29154.

66. Marian, A.J. & Belmont, J. (2011). Strategic approaches to unraveling genetic causes of cardiovascular diseases. *Circ Res*, 108(10), 1252-1269.
67. Marurano, M. T., Wang, H., John, S., Shafer, A., Canfield, T., Lee, K. & Stamatoyannopoulos J.A. (2015). Role of DNA Methylation in Modulating Transcription Factor Occupancy. *Cell Rep*, 12(7), 1184-1195.
68. Mathers, C.D. & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3(11), e442.
69. Matoba, T., Koga, J.I., Nakano, K., Egashira, K. & Tsutsui, H (2017). Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. *J Cardiol*, 70(3), 206-211.
70. Matsui, H., Sato, Y., Hatakeyama, H., Akita, H. & Harashima, H. (2015). Size-dependent specific targeting and efficient gene silencing in peritoneal macrophages using a pH-sensitive cationic liposomal siRNA carrier. *Int J Pharm* 495 (1), 171-178.
71. Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M.J. & Irache J.M. (2001). Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eu J Pharm Sci*, 12(3), 251-259.
72. Moghimi, S.M. & Hunter, A.C. (2001a). Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst*, 18(6), 527–550
73. Moghimi, S.M., Hunter, A.C. & Murray, J.C. (2001b). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53(2), 283–318.
74. Moghimi, S.M., Hunter, A.C. & Murray, J.C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*, 19(3), 311–330.
75. Moghimi, S.M. & Hamad, I. (2008). Liposome-mediated triggering of complement cascade. *J. Liposome Res*, 18(3), 195–209.
76. Moghimi, S.M., Hunter, A.C. & Andresen, T.L. (2012). Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52(1), 481-503.

77. Moore KJ. & Tabas I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341-355
78. Morávek, L., Kostka, V., Saber, M. & Meloun B. (1975). Peptides isolated from tryptic and chymotryptic digest of fragment CB6 (Pro) of human plasma albumin. *Col Czech Chem Commun*, 40(4), 1103-1111.
79. Narazaki, R., Maruyama, T. & Otagiri, M. (1997). Probing the cysteine 34 residue in human serum albumin using fluorescence techniques. *Biochim Biophys Acta*, 1338(2), 275-281.
80. Nigam, P., Waghmode, S., Louis, M., et al. (2014). Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer. *J Mater Chem B*, 2, 3190-3195.
81. Panjehshahin, M.R., Yates, M.S. & Bowmer, C.J. (1992). A comparison of drug binding sites on mammalian albumins. *Biochem pharmacol*, 1992.44(5), 873-879
82. Panning, B. & Jaenisch, R. (1998). RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell*, 93(3), 305–308.
83. Patil, G.V. (2003). Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Dev Res*, 58(3), 219-247
84. Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R. & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol*, 2(12), 751–60
85. Pham, B.T.T., Colvin, E.K., Pham, N.T.H., Kim, B.J., Fuller, E.S., Moon, E.A., Barbey, R., Yuen, S., Rickman, B.H., Bryce, N.S., Bickley, S., Tanudji, M., Jones, S.K., Howell, V.M. & Hawkett, B.S. (2018). Biodistribution and Clearance of Stable Superparamagnetic Maghemite Iron Oxide Nanoparticles in Mice Following Intraperitoneal Administration. *Int J Mol Sci*. 19 (1), pii: E205.
86. Portela, A. & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*, 28(10), 1057-1068.
87. Post, W.S., Goldschmidt-Clermont, P.J., Wilhide, C.C., Heldman, A.W., Sussman, MS., Ouyang, P., Milliken, E.E. & Issa, J.P. (1999). Methylation of the estrogen receptor gene is

- associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res*, 43(4), 985–991.
88. Prabhakar, U., Maeda, H., Jain, R.K., Sevick-Muraca, E.M., Zamboni, W., Farokhzad, O.C., Barry, S.T., Gabizon, A., Grodzinski, P. & Blakey, D.C. (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res*, 73(8), 2412-2417.
89. Rilova, E., Erdmann, A., Gros, C., Masson, V., Aussagues, Y., Poughon-Cassabois, V., Rajavelu, A., Jeltsch, A., Menon, Y., Novosad, N., Gregoire, J.M., Vispé, S., Schambel, P., Ausseil, F., Sautel, F., Arimondo, P.B. & Cantagrel, F. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of 4-amino-N-(4-aminophenyl) benzamide analogues of quinoline-based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation. *ChemMedChem*, 9(3), 590–601.
90. Singh, P.P., Singh, M. & Mastana, S.S. (2002). Genetic variation of apolipoproteins in North Indians. *Hum. Biol*, 74(5), 673-682.
91. Sleep, D., Cameron, J. & Evans, L.R. (2013). Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12), 5526-5534.
92. Stary, H.C. (1980). The intimal macrophage in atherosclerosis. *Artery*, 8(3), 205–207,
93. Steinhauser, I.M., Langer, K., Strebhardt, K.M., et al. (2008). Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation. *Biomaterials*, 29(29), 4022-4028.
94. Stenvinkel, P., Karimi, M., Johansson, S., et al. (2007). Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease?. *J Intern Med*, 261(5), 488-499.
95. Strebhardt, K. & Ullrich, A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 6(4), 321–330.
96. Suzuki, M.M. & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 9(6), 465-476.

97. Taheri, A., Dinarvand, R., Atyabi, F., et al. (2012) Trastuzumab decorated methotrexate–human serum albumin conjugated nanoparticles for targeted delivery to HER2 positive tumor cells. *Eu J Pharm Sci*, 47 (2), 331-340.
98. Tedgui, A. & Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86(2), 515-581.
99. Thum T. (2012). MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol Med*, 4(1), 3-14.
100. Vhora, I., Patil, S., Bhatt, P., et al.(2015). Drug Conjugates: An Emerging Drug Delivery Technology. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 98, 1-55
101. Walsh, C.P., Chaillet, J.R. & Bestor, T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet*, 20(2), 116–117.
102. Wang, Z-m., Ho, J.X., Ruble J.R., et al. (2013). Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12), 5356-5374.
103. Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., et al. (2000). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm*, 194(1), 91-102.
104. Worthley, S.G., Osende, J.I., Helft, G., Badimon, J.J. & Fuster, V. (2001). Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt Sinai J Med*, 68(3), 167–181.
105. Yamada, Y., Horibe, H., Oguri, M., Sakuma, J., Takeuchi, I., Yasukochi, Y., Kato, K. & Sawabe, M. (2018). Identification of novel hyper- or hypomethylated CpG sites and genes associated with atherosclerotic plaque using and epigenome-wide association study. *Int J Mol Med*, 41(5), 2724-2732.
106. Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I, et al. (2013). Proteins: emerging carrier for delivery of cancer therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*, 10(10), 1429-1448.
107. Ying, A.K., Hassanain, H.H., Roos, C.M., Smiraglia, D.J., Issa, J.J., Michler, R.E., Caligiuri, M., Plass, C. & Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000). Methylation of the estrogen receptor- α gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res*, 46(1), 172–179.

108. Yu, J., Qiu, Y., Yang, J., Bian, S., Chen, G., Deng, M., Kang, H. & Huang L. (2016). DNMT1-PPAR γ in macrophages regulates chronic inflammation and atherosclerosis development in mice. *Sci Rep*, 17; 6:30053.
109. Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F.J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., Ramírez-Ruz, J., Gomez, A., Gonçalves, I., Moran, S. & Esteller, M. (2014). DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet*, 7 (5), 692-700.
110. Zhang, Y., Chan, H.F. & Leong, K.W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(1) ,104-120.
111. Zhang, Y., Ho, A., Yue, J., et al. (2014). Structural basis and anticancer properties of ruthenium-based drug complexed with human serum albumin. *Eu J Med Chem*, 86, 449-455.
112. Zhao, D., Zhao, X., Zu, Y., et al. (2010). Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 5, 669-677.
113. Zhao, L., Zhou, Y., Gao, Y., et al. (2015). Bovine serum albumin nanoparticles for delivery of tacrolimus to reduce its kidney uptake and functional nephrotoxicity. *Int J Pharm*, 483(1) 180-187.
114. Zheng, Y-R., Suntharalingam, K., Johnstone, T.C., et al. (2014), Pt (IV) prodrugs designed to bind non-covalently to human serum albumin for drug delivery. *J Am Chem Soc*, 136(24):8790-8798.
115. Zhu, X.F., Amir, E., Singh, G., Clemons, M. & Addison, C. (2014). Bone-targeted therapy for metastatic breast cancer—where do we go from here? A commentary from the BONUS 8 meeting. *J Bone Oncol*, 3(1), 1–4.
116. Zsila, F. (2013). Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol pharmaceutics*, 10(5), 1668-1682