



Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ALMIDÓN
CARGADAS CON QUERCETINA SOBRE LA
PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS
ENDOTELIALES INDUCIDAS POR ADENOCARCINOMA
OVÁRICO**

Noelia Fernanda Benavente González

Tutor Dr. Marcelo González Ortiz

Cotutora Dra. Saddys Rodríguez Llamazares

Diciembre 2024

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2024, Noelia Fernanda Benavente González

DEDICATORIA

A mi familia y amigos, quienes fueron un pilar fundamental para poder terminar esta etapa y que me acompañaron en los momentos más difíciles.

No hubiera sido capaz de lograr todo esto sin ustedes, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Marcelo González, quien decidió continuar con este proyecto en el Laboratorio de Investigación Materno Fetal.

Al Centro de Investigación de Polímeros Avanzados, en especial a la Dra. Saddys Rodríguez-Llamazares por darme la oportunidad de realizar algunas de estas actividades en el extranjero.

Gracias a los miembros de la comisión por brindarme apoyo en cuento a dudas que surgieron en el camino. Y especialmente a Solange Torres por el apoyo brindado para poder realizar algunos de los experimentos.

A mi familia, que estuvo conmigo en cada momento de este magíster, sin entender necesariamente pero siempre brindando apoyo y ánimo para terminar este proceso.

Gracias a mis amigas y amigos, por escucharme y aconsejarme en los momentos más difíciles de este proceso.

ANID Beca Magíster Nacional 22221403.

ECOS 220020.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Cáncer de ovario.....	2
I.2 Angiogénesis y cáncer.....	4
I.3 Nanotecnología enfocada a la biomedicina.....	5
I.4 Nanopartículas y su efecto anti angiogénico.....	7
I.6 Polifenoles.....	8
I.7 Quercetina.....	9
I.8 Almidón.....	11
I.9 Nanopartículas obtenidas por nano precipitación ultrarrápida.....	16
I.10 Nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	21
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	24
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVO GENERAL.....	25
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
VII. METODOLOGÍA.....	26
VII.1 Preparación de nanopartículas de almidón por método de nanoprecipitación ultrarrápida.....	26
VII.2 Eficiencia de encapsulación.....	30
VII.3 Hinchamiento y solubilidad.....	31
VII.4 Liberación de quercetina.....	32
VII.5 Actividad antioxidante.....	32

VII.6 Cultivo de línea celular de adenocarcinoma ovárico	34
VII.7 Cultivo de células endoteliales de microvasculatura humana	34
VII.8 Preparación de medio condicionado.....	34
VII.9 Protocolo de incubación SKOV-3.....	35
VII.10 Protocolo incubación HMEC-1	36
VII.11 Viabilidad celular	37
VII.12 Ensayo cierre de herida	38
VII.14 Análisis estadístico	40
VIII. RESULTADOS	41
VIII.1 Nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	41
VIII.2 Eficiencia de encapsulación	41
VIII.3 Hinchamiento y solubilidad	43
VIII.4 Liberación de quercetina	43
VIII.5 Actividad antioxidante.....	45
VIII.6 Viabilidad celular de SKOV-3 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	45
VIII.7 Viabilidad celular de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	50
VIII.8 Ensayo cierre de herida	55
IX. DISCUSIONES	67
IX.1 Nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	67
IX.2 Eficiencia de encapsulación	68
IX.3 Hinchamiento y solubilidad.....	70
IX.4 Liberación de quercetina	71
IX.5 Actividad antioxidante	72
IX.6 Viabilidad celular de SKOV-3 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	73
IX.7 Viabilidad celular de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina.....	76
IX.8 Ensayo cierre de herida.....	78
X. CONCLUSIONES.....	86
X. BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Poder de hinchamiento e índice de solubilidad de almidón de maíz, nanopartículas de almidón de maíz sin cargar y cargadas con quercetina en PBS a 37°C.	44
Tabla 2	Actividad antioxidante de nanopartículas de almidón de maíz sin cargar y cargadas con quercetina.	47
Tabla 3	Velocidad de proliferación de SKOV-3 y HMEC-1 incubadas con distintas concentraciones de quercetina por 24 horas.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Arquitectura molecular del gránulo de almidón. Imagen de SEM proveniente de un gránulo de almidón de papa con corte transversal.	14
Figura 2	Polimorfismos de almidones tipo A y B.	15
Figura 3	Esquema del proceso de obtención de nanopartículas por el método de nano precipitación y las fases que lo constituyen.	19
Figura 4	Representación esquemática de cámara de micro mezclado para la obtención de partículas por nano precipitación ultrarrápida.	20
Figura 5	Esquema representativo de la preparación de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina mediante el proceso de nanoprecipitación ultrarrápida.	29
Figura 6	Imágenes SEM e histograma de nanopartículas sin cargar y cargadas con quercetina obtenidas a partir de almidón de maíz por nanoprecipitación ultrarrápida.	42
Figura 7	Confluencia de SKOV-3 incubadas con quercetina a diferentes concentraciones por 24 horas.	48
Figura 8	Viabilidad celular de SKOV-3 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz sin cargar y cargadas con quercetina a diferentes concentraciones en $\mu\text{g/mL}$.	49
Figura 9	Confluencia de HMEC-1 incubadas con quercetina a diferentes concentraciones por 24 horas.	52
Figura 10	Viabilidad celular de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz sin cargar y cargadas con quercetina a diferentes concentraciones en $\mu\text{g/mL}$.	54
Figura 11	Diferencia en confluencia de HMEC-1 incubadas con medio condicionado de SKOV-3.	56
Figura 12	Diferencia en confluencia de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz en medio condicionado de SKOV-3.	58
Figura 13	Imágenes de microscopía de contraste de fase del cierre de herida de HMEC-1 incubadas con diferentes tratamientos al tiempo 0 y 24 horas.	60

Figura 14	Porcentaje de cierre de herida de HMEC-1 incubadas con medio condicionado de SKOV-3.	61
Figura 15	Imágenes de microscopía de contraste de fase del cierre de herida de HMEC-1 incubadas con nanopartículas al tiempo 0 y 24 horas.	63
Figura 16	Porcentaje de cierre de herida HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz en medio condicionado de SKOV-3.	64
Figura 17	Efecto sobre la proliferación y migración de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz 1µg/mL.	66

RESUMEN

Introducción: El cáncer de ovario es uno de los más frecuentes en la población femenina y su progresión a estadios avanzados está asociada a la capacidad de las células tumorales de liberar factores proangiogénicos que estimulan la migración de células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos. En este contexto, el uso de *nanocarriers* se ha establecido como una solución para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de compuestos con potencial anti angiogénico, como la quercetina. Trabajo previo de nuestro equipo de investigación se ha enfocado en preparar y caracterizar nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina. Sin embargo, su efecto sobre la migración endotelial inducida por medio condicionado de células de cáncer de ovario no ha sido estudiado.

Objetivo: Evaluar el efecto de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre el proceso angiogénico de células endoteliales de microvasculatura humana inducida por medio condicionado de adenocarcinoma de ovario.

Metodología: Se prepararon las nanopartículas cargadas con quercetina mediante el método de nano precipitación ultrarrápida. Se caracterizó su eficiencia de encapsulación, hinchamiento, solubilidad, liberación y actividad antioxidante. A partir de la línea celular de adenocarcinoma de ovario SK-OV-3 se recolectó el medio condicionado. Se determinó la viabilidad celular de SK-OV-3 y de las células endoteliales incubadas con nanopartículas. Y se determinó el efecto sobre la proliferación y migración de las células endoteliales mediante el ensayo la herida.

Resultados: Las nanopartículas presentaron una morfología esférica con tamaños promedio de 100-300 nm, una eficiencia de encapsulación del 0,196 % y una liberación del 7,97%. La actividad antioxidante de las nanopartículas cargadas fue baja (3,27%), y para las sin cargar esta fue nula. En los ensayos de cierre de herida, las nanopartículas cargadas mostraron un efecto inhibitorio significativo en la migración de células endoteliales, sugiriendo un potencial efecto antiangiogénico.

Conclusiones: Las nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina, preparadas mediante el método de nanoprecipitación ultrarrápida, mostraron una morfología esférica y una eficiencia moderada de encapsulación y liberación de quercetina. Aunque su actividad antioxidante fue baja, los ensayos de cierre de herida demostraron que estas nanopartículas ejercen un efecto inhibitorio en la migración de células endoteliales inducida por medio condicionado de adenocarcinoma de ovario. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones evaluadas, las nanopartículas cargadas con quercetina tienen un efecto antiangiogénico específico, relevante para su potencial aplicación en terapias dirigidas contra la angiogénesis tumoral.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye una de las patologías más preocupantes del siglo XXI presentando un continuo aumento en la tasa de recurrencia y mortalidad. Se ha descrito que 1 de cada 4 personas presenta el riesgo de padecer cáncer durante alguna etapa de su vida (American Cancer Society, 2023) convirtiéndose así en una patología con un alto impacto a nivel económico y social, siendo considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los temas de salud más importantes para combatir durante esta década (World Health Organization, 2023). Entre todos los tipos de tumores, el adenocarcinoma de ovario es uno de la más alta prevalencia entre mujeres después de la menopausia (Doubeni, Doubeni & Myers, 2016). Su progresión se asocia con la capacidad de las células tumorales de mantener una señalización de tipo proliferativa, evadir los mecanismos de supresión de crecimiento, generar invasión y metástasis, presentar una capacidad proliferativa ilimitada, evadiendo el proceso de apoptosis e induciendo angiogénesis (Hanahan & Weinberg, 2000). Este último mecanismo lleva a la formación de vasos sanguíneos para permitir el crecimiento tumoral en donde existe una estimulación en la proliferación y migración de células endoteliales (Ramjiawan, Griffioen & Duda, 2017). Así, se han tratado de diseñar diferentes estrategias para inhibir la capacidad de las células tumorales para inducir la migración de células endoteliales. En esta tesis, estudiaremos el efecto de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre la migración de células endoteliales inducida por medio condicionado de adenocarcinoma de ovario.

I.1 Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es una neoplasia ginecológica maligna que constituye la principal causa de muerte en mujeres diagnosticadas con cánceres ginecológicos (Arora, Mullangi & Lekkala, 2022). Este comprende varios histotipos con distintos orígenes celulares, aberraciones moleculares y progresión de la enfermedad (Hasan, Ohman & Dinulescu, 2015), siendo afectadas mujeres de todas las edades, pero presentándose con mayor frecuencia después de la menopausia (Doubeni, Doubeni & Myers, 2016). Durante el año 2020, en el mundo se confirmaron 21750 casos nuevos de este cáncer, representando así el 1,2% de todos los casos de cáncer a nivel mundial (Sung *et al.*, 2021).

Dependiendo del tejido de origen, el cáncer de ovario puede ser: carcinoma epitelial, carcinoma de células germinales y sarcoma de células estromales. El más común en mujeres es el carcinoma epitelial (EOC), correspondiendo al 90% de los casos y que se clasifica en dos tipos histológicos: tumores de tipo 1, que son considerados genéticamente homogéneos, de lento desarrollo y suelen estar contenidos dentro del ovario en el momento que se descubre el cáncer, por lo que se puede decir que la mayoría de este tipo de cáncer son diagnosticados en etapa temprana; y tumores de tipo 2, que se caracterizan por ser altamente invasivos y de crecimiento rápido, por lo que se detectan en una etapa tardía (Kroeger & Drapkin, 2017). En este último tipo, encontramos el carcinoma seroso de alto grado (HGSOC) el cual es el histotipo más común y uno de los más agresivos, correspondiendo

alrededor del 70% de los casos diagnosticados (Natanzon, Goode, & Cunningham, 2018). El diagnóstico tardío y la recurrencia acompañada de la resistencia a la quimioterapia son los responsables de la alta mortalidad que este presenta.

Los síntomas y signos clínicos incluyen una combinación de dolor abdominal, hinchazón persistente, fatiga, síntomas urinarios, dolor de espalda, pérdida de peso, sangrado y secreciones vaginales anormales (Lheureux et al., 2019). Aproximadamente el 80% de las pacientes presentan una recidiva de la enfermedad en los primeros 5 años tras el diagnóstico, el que se acompaña de una quimiorresistencia a las drogas antineoplásicas utilizadas (van Zyl, Tang, & Bowden, 2018). En etapas tempranas, el cáncer de ovario presenta una tasa de supervivencia a los 5 años del 92%, pero esta disminuye a un 17- 28% para aquellas pacientes en etapa avanzada (Kroeger & Drapkin, 2017). Al tratarse de etapas avanzadas, es necesario establecer tratamientos antineoplásicos agresivos que además de generar el efecto terapéutico esperado, producen efectos secundarios que deterioran la salud del paciente afectando así su calidad de vida y supervivencia (Toledo, 2023).

Una forma de comprender los mecanismos por los cuales se desarrollan este tipo de tumores es a través del estudio de líneas celulares que mantienen características tumorales en condiciones *in vitro*. Así, las células SK-OV-3 son una línea celular de cáncer de ovario humano, derivada de EOC no seroso, que presenta una morfología tipo epitelial. Esta línea celular se obtuvo en 1973 a partir de líquido ascítico de una mujer caucásica de 64 años con adenocarcinoma de ovario (Ahmed & Stenvers, 2013). Aunque la información sobre el origen de SK-OV-3 es limitada,

se sabe que al provenir de líquido ascítico (ascitis se asocia con la enfermedad avanzada) en vez de un tumor primario, presenta un comportamiento invasivo que representa el comportamiento de la enfermedad en etapa avanzada (Toledo, 2023).

I.2 Angiogénesis y cáncer

En el cáncer se ha descrito la habilidad de mantener señalización de tipo proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, presentar inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

En ese contexto, la angiogénesis es un proceso con múltiples etapas que tiene como fin la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (Adair & Montani, 2010). Esta suele ocurrir en condiciones fisiológicas, cumpliendo distintos roles en procesos como la reparación de heridas, la regeneración cíclica del endometrio, el desarrollo placentario y la reparación del daño cardiaco generado por un proceso isquémico (Ferrara & Alitalo, 1999).

Sin embargo, en un contexto fisiopatológico como el cáncer, la angiogénesis se describe como un proceso vital para la proliferación y viabilidad de las células tumorales (Ramjiawan, Griffioen & Duda, 2017) al abastecerlas con nutrientes y oxígeno, para posteriormente formar una red vascular que apoya el proceso metastásico en estadíos más avanzados (Tonini *et al.*, 2003).

La angiogénesis tumoral se caracteriza por la presencia exacerbada de factores proangiogénicos los cuales guían la proliferación de las células endoteliales y promueven la migración de éstas (Asprițoiu *et al.*, 2021).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por el inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) juega un rol vital para el crecimiento y supervivencia de las células endoteliales, promoviendo la proliferación de las células endoteliales, aumentando la permeabilidad vascular y puede causar angiogénesis tumoral al activar la vía de señalización dependiente del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) (Wong *et al.*, 2009; Adams & Alitalo, 2007).

La angiogénesis, al ser un proceso necesario para el crecimiento, mantenimiento de las células tumorales y posterior metástasis, se vuelve un punto clave en el estudio del cáncer como un potencial blanco de tratamiento.

I.3 Nanotecnología enfocada a la biomedicina

La nanotecnología se ha posicionado como una herramienta prometedora para resolver los desafíos que enfrentan los tratamientos profilácticos y paliativos de las enfermedades oncológicas. El uso de *nanocarriers* es una opción viable para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos anticancerígenos, entregando estas drogas a través de las barreras biológicas presentes en el organismo.

Durante el último tiempo investigadores se han enfocado en desarrollar variadas nanoestructuras de distintas formas, tamaños y composiciones; utilizando

distintos materiales como lípidos, proteínas, polisacáridos, polímeros sintéticos y materiales inorgánicos (Abdelaziz *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2021; De la Torre *et al.*, 2020). En particular, se ha demostrado en el último tiempo los beneficios biológicos de la utilización de matrices naturales para la síntesis de nano y micropartículas con gran potencial en la terapia contra el cáncer. Estas materias primas han demostrado tener una mayor biocompatibilidad y no-inmunogenicidad; además de presentar distintos grupos funcionales que facilitan su modificación química y que a nivel estructural permiten obtener nuevas formulaciones cada vez más eficientes (Ion *et al.*, 2021).

En el contexto del cáncer, las fenestraciones de los vasos sanguíneos tumorales son una característica relevante al facilitar la entrega de nanopartículas al tejido tumoral mediante el efecto de permeabilidad y retención mejorada (ERP por las siglas en inglés Enhanced Permeability and Retention Effect) (Haley & Frenkel, 2008). Al presentar drenaje linfático reducido y fenestraciones que pueden ir de los 200 a 800 nm (en comparación con un endotelio normal con fenestraciones de 5 a 10 nm) el EPR es un proceso distintivo de la vasculatura tumoral generando una mayor acumulación de nanopartículas en el sitio del tumor mediante una "focalización pasiva" (Aslan *et al.*, 2013).

I.4 Nanopartículas y su efecto anti angiogénico

En el área de la nanotecnología se ha vuelto relevante el estudio del potencial anti angiogénico de diversas nanopartículas producidas a partir de fuentes biológicas. En 2009, Xu y colaboradores evaluaron el efecto de nanopartículas de quitosano (un biopolímero proveniente de la quitina) sobre un modelo de ratón *nude* (ratón que no presenta timo y que se utiliza para el estudio del cáncer) con xenoinplante de células de carcinoma hepático. Ellos demostraron que las nanopartículas de quitosano presentaban un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tumor y que este se podría encontrar asociado a la inhibición de la angiogénesis mediante la supresión de la expresión del VEGFR2 (Xu *et al.*, 2009). Asimismo, Jin y colaboradores estudiaron la actividad anti angiogénica de nanopartículas de quitosano cargadas con ácido ursólico (un compuesto triterpénico pentacíclico altamente presente en la cáscara de las manzanas). Estas nanopartículas mostraron un gran potencial anti angiogénico al inhibir la migración y formación de nuevos vasos *in vitro* de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs por su sigla en inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), además de disminuir los niveles de VEGF producido por células de hepatocarcinoma (Jint *et al.*, 2016).

Este efecto anti angiogénico reportado para estos *nanocarriers* podría estar dado por la matriz a partir de la cual se encuentran preparadas estas nanopartículas, así como también por la presencia de compuestos encapsulados con alta actividad biológica.

I.6 Polifenoles

Los polifenoles son los metabolitos secundarios más abundantes del reino vegetal, del cual forman parte un grupo grande y diverso de moléculas que se encuentran presentes en una variedad de alimentos como el té, vino tinto, cacao, frutas y verduras. Se ha reportado que compuestos provenientes de fuentes naturales al ser incorporados en la dieta son una alternativa efectiva para la prevención del cáncer o como complemento de algunas terapias farmacológicas destinadas al tratamiento de esta patología (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019).

Un estudio de caso (Christensen *et al.*, 2012) reportó una disminución del riesgo de cáncer de pulmón en pacientes con una dieta de alto consumo de flavonoides, mientras que en otro estudio (Woo *et al.*, 2014) se asoció el consumo de flavonoides, flavonas y antocianidinas con una disminución del riesgo de padecer cáncer gástrico. En el caso de carcinoma hepatocelular también se ha sugerido que una mayor ingesta de flavonoles dietarios puede disminuir el riesgo de ocurrencia (Zamora-Ros *et al.*, 2012; Zamora-Ros *et al.*, 2013), mientras que de acuerdo con un metaanálisis realizado en 2013 se demostró que existe una disminución del riesgo de presentar cáncer de mama en mujeres con un alto consumo de flavonoles y flavonas (Hui *et al.*, 2013).

Por otro lado, el efecto que los polifenoles presentan sobre las células tumorales está dado por sus propiedades pro oxidativas que llevan a la muerte de estas células malignas. Se ha reportado que el ácido ursólico (presente en una

variedad de frutas) induce la vía de receptores de muerte celular por medio de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por las siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (Prasad *et al.*, 2011). A su vez, en líneas celulares de cáncer de ovario (SK-OV-3, OVCAR-3, TOV-21G y HOSE) la quercetina en concentraciones de 200 μ M demostró tener una actividad prooxidante induciendo la producción de ROS y aumentando la sensibilidad de las células tumorales al ligando inductor de apoptosis asociado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) (Yi *et al.*, 2014). Finalmente, el dialil disulfuro (presente en el ajo) presenta también un aumento de ROS en células de cáncer de colon, generando arresto del ciclo celular, disminuyendo la proliferación e induciendo apoptosis (Sriram *et al.*, 2008), mientras que en células normales el dialil disulfuro restaura el nivel de enzimas antioxidantes y la peroxidación lipídica modulada por compuestos carcinógenos, protegiendo así a las células del estrés oxidativo (Prasad *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2008).

1.7 Quercetina

La quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) es un flavonol perteneciente a la familia flavonoide que se encuentra ampliamente distribuida en frutas y verduras, siendo el flavonol más prevalente en la dieta occidental. Se han reportado una gran variedad de efectos biológicos dentro de los cuales se incluyen su capacidad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética y antimicrobiana (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019).

En bajas concentraciones la quercetina actúa como un antioxidante generando así un efecto quimiopreventivo, sin embargo, en altas concentraciones esta misma actúa como un prooxidante teniendo a su vez un efecto quimioterapéutico (Schmalhausen *et al.*, 2007). El efecto anticancerígeno de la quercetina recae en la capacidad que esta tiene de reducir la proliferación, inducir apoptosis, generar un arresto en el ciclo celular e inhibir los procesos mitóticos, modulando vías moleculares como PI3K/Akt y MAPK (Jana *et al.*, 2018). Se ha reportado que la incubación con quercetina (50 a 100 μM) genera una disminución de la viabilidad celular en líneas de cáncer de colon (Kim *et al.*, 2010) y disminución en la proliferación en líneas de cáncer de ovario y de mama (Xintaropoulou *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2018).

Se han descrito a su vez propiedades anti angiogénicas y anti metastásicas, la quercetina al ser utilizada en combinación con quimioterapia y radioterapia puede actuar como sensibilizador y proteger a las células no cancerígenas de los efectos secundarios de las terapias utilizadas al presentar un efecto *scavenger* de ROS (Jana *et al.*, 2018). La inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos por parte de la quercetina se da mediante el VEGFR2 en células endoteliales, inhibiendo la fosforilación de Akt/mTOR a una concentración de 40 μM y disminuyendo la liberación de VEGF por parte del tumor (Pratheeshkumar *et al.*, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2016). Además, se ha descrito que la quercetina puede modular el proceso angiogénico en células tumorales resistentes y mejorar el efecto de drogas antineoplásicas (Long *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2018).

La potencial utilidad de la quercetina para la prevención y tratamiento del cáncer ha sido ampliamente documentada, sin embargo, ésta presenta una baja solubilidad en agua por lo que estudios recientes se han enfocado en el desarrollo de nano-formulaciones para mejorar su baja biodisponibilidad, lo que actualmente limita su uso como agente antineoplásico (Qi *et al.*, 2022).

I.8 Almidón

El almidón es un polisacárido abundante en la naturaleza y uno de los más consumidos por el ser humano. Su bajo costo y amplia disponibilidad lo posiciona como un polímero natural, biodegradable y biocompatible para su uso en distintas áreas (Farrag *et al.*, 2018).

El almidón nativo es sintetizado en forma de pequeñas partículas denominadas gránulos, los cuales poseen un tamaño que oscila entre 1 a 200 μm de diámetro y que depende de la fuente botánica de origen. Además de la amilosa y amilopectina, que representan los componentes principales del gránulo (98-99%), se encuentran proteínas, lípidos y minerales (Yuryey, 2007). La proporción entre estos polisacáridos, así como las características de su estructura, depende de la fuente botánica de origen del gránulo de almidón. La amilosa es un polisacárido principalmente lineal que posee alrededor de un 99% de enlaces (1 \rightarrow 4)- α glucosídicos y 1% (1 \rightarrow 6)- α glucosídicos. Por otro lado, la amilopectina es una molécula de mayor peso molecular y altamente ramificada construida a partir de un 95% de enlaces (1 \rightarrow 4)- α glucosídicos y 5% (1 \rightarrow 6)- α glucosídicos (Buleon *et al.*, 1998).

En los gránulos de almidón, el arreglo de la amilosa y amilopectina genera una estructura semi-cristalina con anillos concéntricos compuestos de una lámina cristalina y otra amorfa (Figura 1). Las dobles hélices de la amilopectina conforman las láminas cristalinas mientras que las hélices simples de amilosa y las ramificaciones de la amilopectina constituyen la lámina amorfa formando así una estructura organizada dentro del gránulo (Maizoobi & Farahnaky, 2021). En general, los almidones provenientes de cereales presentan un patrón de difracción de rayos X del tipo A, almidones de tubérculos presentan un patrón de difracción de rayos X del tipo B, mientras que almidones provenientes de leguminosas, raíces y algunas frutas y tallos presentan un patrón de difracción de rayos X del tipo C. Este último contiene los polimorfismos de los tipos A y B. Las dobles hélices presentes en ambos polimorfismos son idénticas respecto a la estructura helicoidal, sin embargo, la disposición de las dobles hélices en la estructura cristalina de los almidones tipo A es relativamente compacta (con un bajo contenido de agua) mientras que en los almidones tipo B se presenta una estructura más abierta de las dobles hélices con un centro que contiene un mayor contenido de agua (Figura 2) (Tester *et al.*, 2004).

Hoy en día, existe un aumento en el interés sobre la utilización de almidones provenientes de distintas fuentes botánicas para el diseño y síntesis de diversos productos de la industria farmacéutica debido a sus propiedades estructurales y nula toxicidad (Chakraborty *et al.*, 2019). En esta industria el almidón se utiliza de manera principal como excipiente debido a sus propiedades gelificantes y desecantes (Bhoyar, Belgamwar, & Trivedi, 2022). Las modificaciones que se le puedan realizar ya sean químicas, enzimáticas o físicas, mejoran la dosificación de

los compuestos activos tanto en la mezcla física del almidón con el fármaco (sistemas convencionales), como en el uso de este como agente encapsulante de estos compuestos (Zhu, 2017; Ghosh, 2006).

Se ha reportado que el uso de almidón como agente encapsulante mejora la biodisponibilidad y estabilidad de los principios activos (Iqbal *et al.*, 2015). De esta forma, al lograr encapsular utilizando almidón y generando partículas de escala nanométrica, se alcanza una mejor eficiencia de entrega de estos compuestos activos, incluidos aquellos que presentan una baja solubilidad en agua (Caldonazo *et al.*, 2021; Rostamabadi *et al.*, 2019).

La alta relación superficie/volumen de las nanopartículas le entrega una gran superficie donde adsorber estos compuestos, aumentando significativamente su solubilidad y biodisponibilidad. (Ding, Lin, & Kan, 2018).

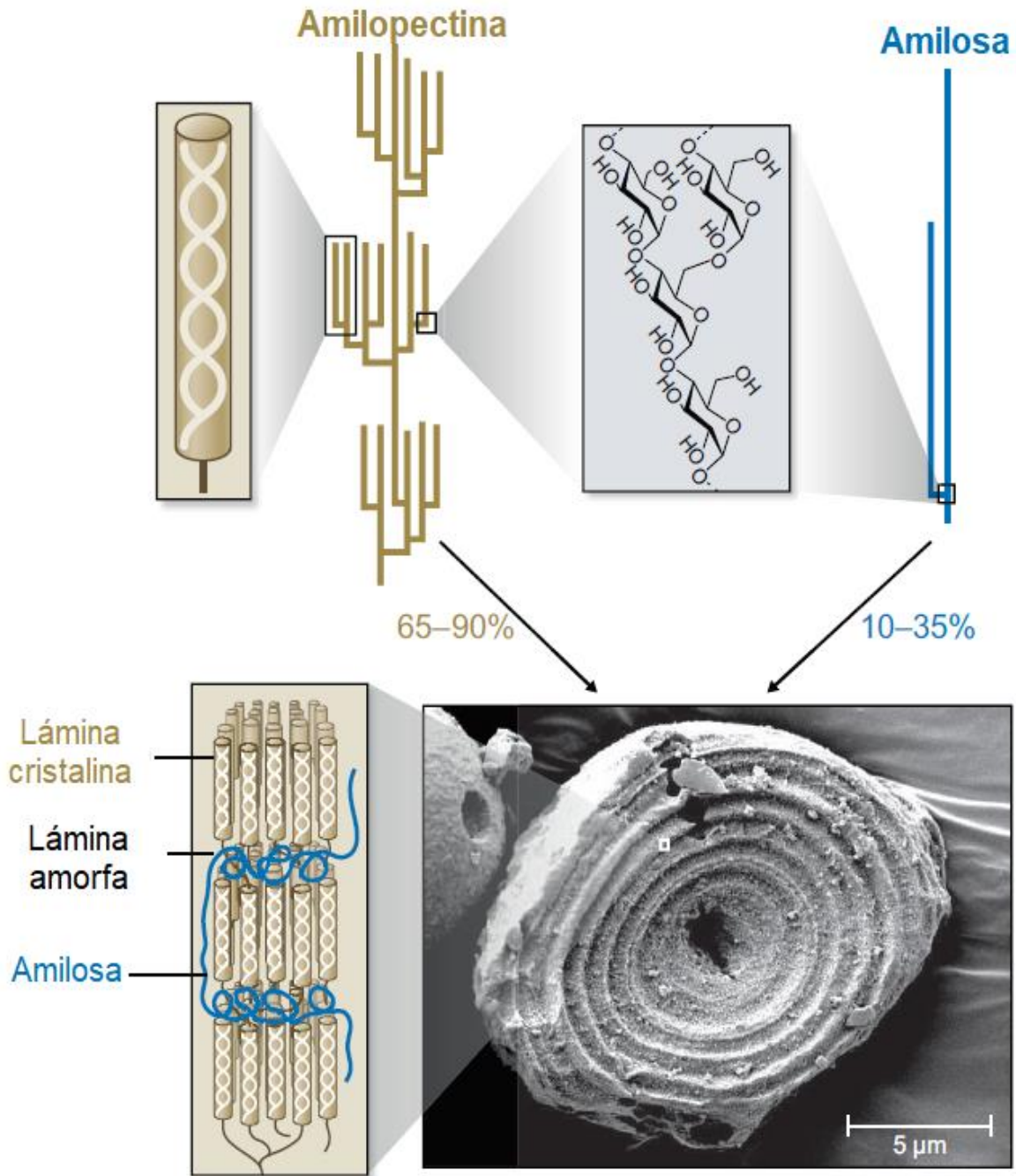


Figura 1. Arquitectura molecular del gránulo de almidón. Imagen de SEM proveniente de un gránulo de almidón de papa con corte transversal. Barra de escala= 5 µm. Adaptado de Seung, 2020.

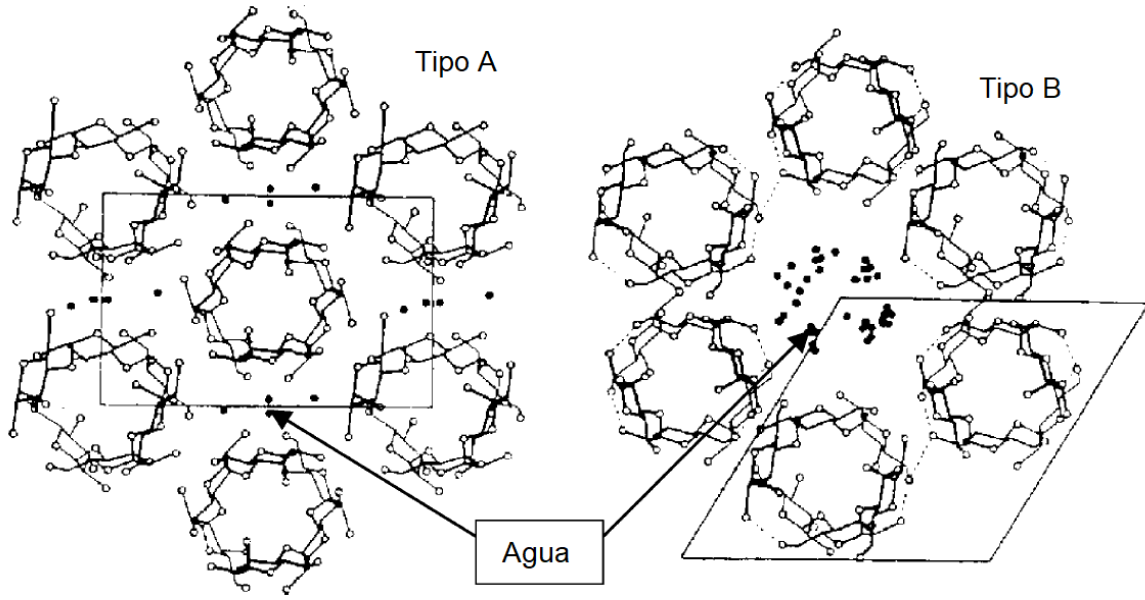


Figura 2. Polimorfismos de almidones tipo A y B. Extraído de Tester *et al.*, 2004.

I.9 Nanopartículas obtenidas por nano precipitación ultrarrápida

Las nanopartículas se pueden obtener por diversos métodos tales como la nanoprecipitación (Rivas et al., 2017) y ultrasonificación (Caldonazo et al., 2021). Esta última se utiliza como un pretratamiento físico del almidón que conduce a la disminución de su peso molecular y al desenmarallamiento de sus cadenas. En la cavitación que produce la ultrasonificación, la fuerza de cizallamiento creada por el colapso de las burbujas puede romper enlaces covalentes de las macromoléculas (Arzeni et al., 2012).

Por otro lado, la nanoprecipitación se ha utilizado ampliamente para la encapsulación de fármacos principalmente hidrófobos en nanocápsulas, donde el principio activo se encuentra confinado dentro de una cavidad y es recubierto por una capa polimérica, o nanoesferas, donde el principio activo se puede encontrar disperso en una matriz polimérica o incluso absorbido en la superficie (Letchford & Burt, 2007). La nanoprecipitación se basa en la interdifusión de dos solventes miscibles entre sí donde uno de ellos está disuelto el polímero y en el otro el polímero no es soluble, generalmente uno de los solventes es agua. En el proceso se añade gradualmente, gota a gota, la solución diluida de un polímero mientras que el no solvente se agita constantemente. La nanoprecipitación tiene las siguientes ventajas sobre otras técnicas de encapsulación: simplicidad, facilidad de escalabilidad, buena reproducibilidad, obtención de tamaños de partícula submicrónicos con una distribución de tamaños estrecha, se evita el uso de grandes

cantidades de solventes tóxicos y no es necesario el uso de un elevado aporte de energía (Lassalle & Ferreira, 2007).

En el método de nano precipitación, la formación de partículas ocurre en tres fases: nucleación, crecimiento y agregación. La sobresaturación, definida por la relación entre la concentración de polímero y su solubilidad en el no solvente, se describe como la fuerza motriz del proceso de nano precipitación. La sobresaturación es crucial porque también determina la velocidad de nucleación (Rivas et al., 2017). Una vez que se alcanza la sobresaturación se promueve la nucleación, condensación, crecimiento y la formación de las nanopartículas como se esquematiza en la Figura 3, donde partículas más pequeñas se producen cuando la velocidad de nucleación es mayor que la de crecimiento.

La nano precipitación se combina con técnicas de pretratamiento como lo son la ultra sonicación, la homogenización a alta presión o la desramificación enzimática para la obtención de nanopartículas de almidón con las propiedades específicas (Dong et al., 2021).

Un método para escalar la producción de nano y micropartículas basado en la nano precipitación es utilizar dispositivos de micormezclado tal como el mezclador de chorros de impacto confinado (Dong et al., 2022). Esta técnica consiste en dirigir dos chorros alineados a una pequeña cámara de mezclado confinada haciéndolos impactar en el medio de la cámara (Figura 4). La energía cinética de los chorros se convierte en un movimiento turbulento por colisión y redirección del flujo con una alta disipación de energía, principalmente en el plano del encuentro de los dos chorros. El plano de mezclado oscila y amplifica fuertemente el mezclado, donde

todos los elementos de fluido son obligados a pasar por una zona altamente turbulenta. En este dispositivo la razón de flujos es fija de 1:1 donde los chorros opuestos impactan en el medio de la cámara. A través de estos dispositivos es posible realizar una mezcla del orden de los milisegundos de esta forma lograr una alta sobresaturación local uniforme. Esto conduce a la precipitación de cualquier molécula o soluto que este por encima de su nivel de saturación con una distribución acotada de tamaño (Letchford, Liggins & Burt., 2008). Este método logra condiciones de mezclado altamente reproducibles para la producción de nanopartículas. Los mezcladores tienen dimensiones pequeñas con diámetros de chorro de fracción de milímetros y diámetro de cámara de mezclado de unos 5 veces el diámetro del chorro.

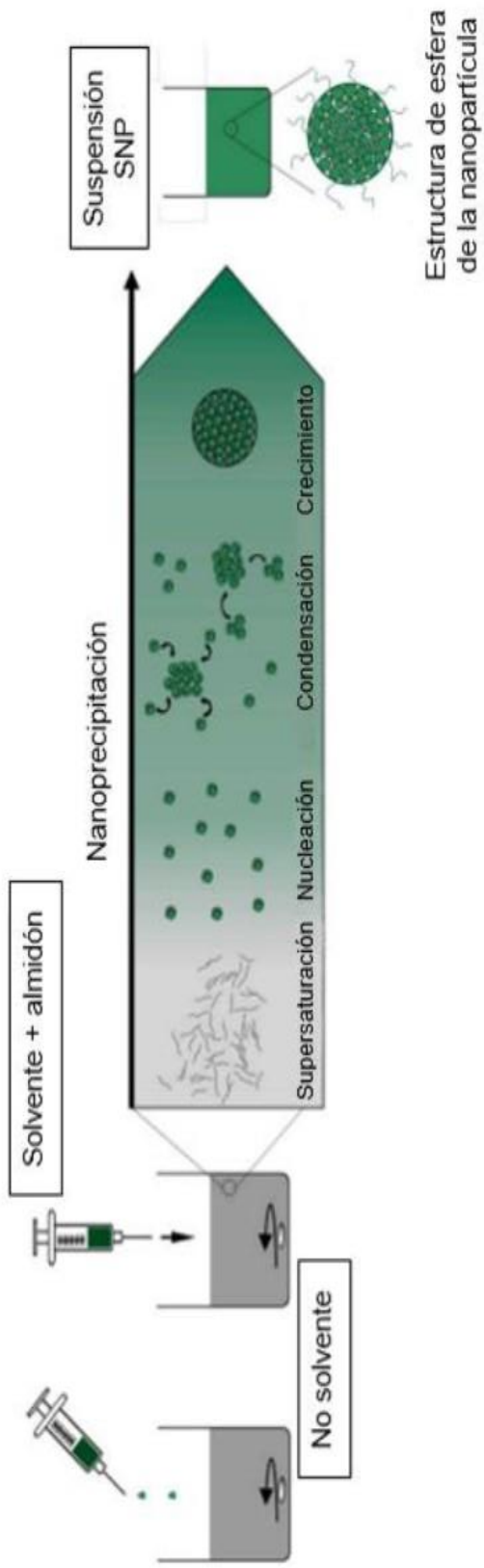


Figura 3. Esquema del proceso de obtención de nanopartículas por el método de nano precipitación y las fases que lo constituyen. Adaptado de Dong et al., 2022.

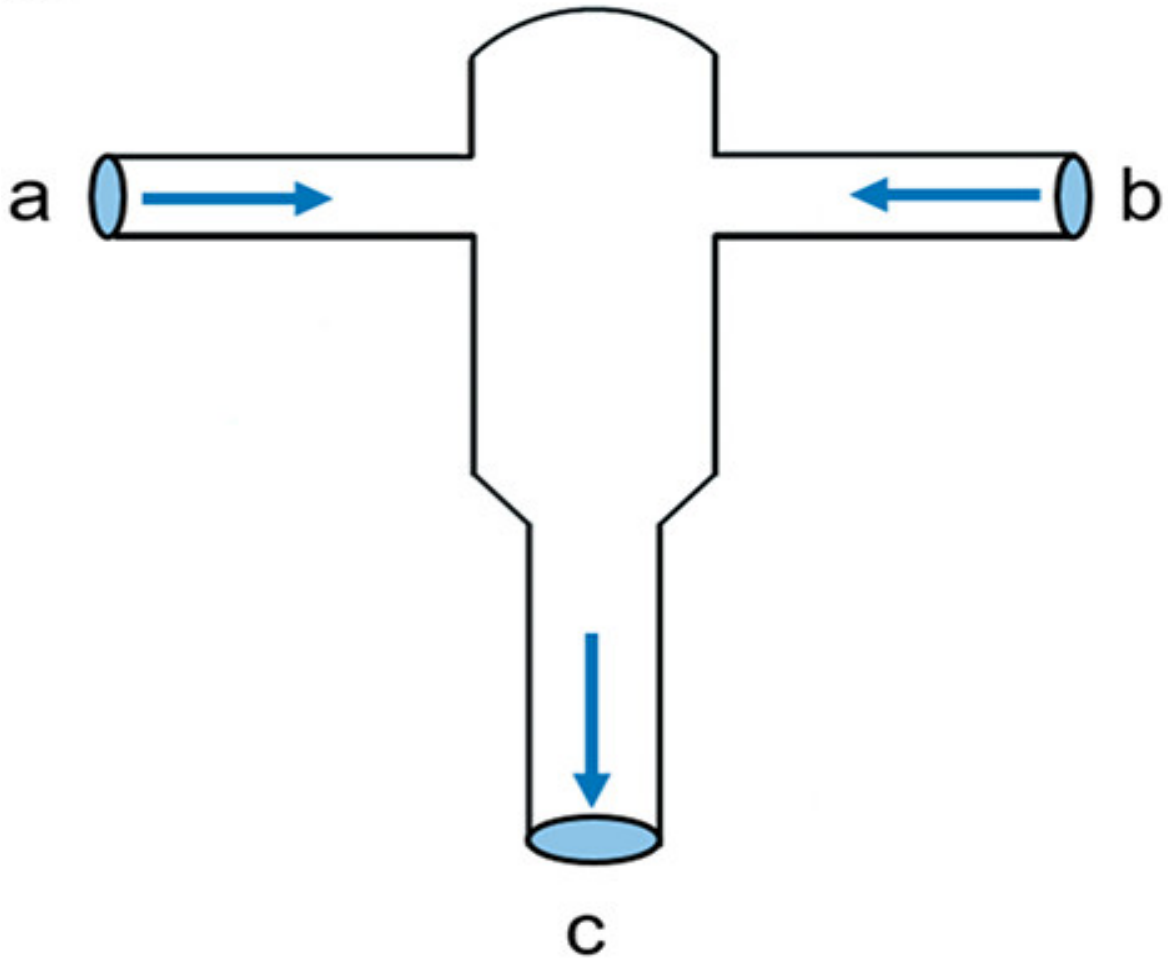


Figura 4. Representación esquemática de cámara de micro mezclado para la obtención de partículas por nano precipitación ultrarrápida. a-b: entradas; c: salida. Adaptado de Saad & Prud'homme, 2016.

I.10 Nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

En 2023, nuestro equipo de trabajo mediante el método de nano precipitación ultrarrápida preparó nanopartículas de almidón de maíz sin cargar (CS-NP por las siglas en inglés *Corn Starch Nanoparticles*) y cargadas con quercetina (CS-Q-NP por las siglas en inglés *Corn Starch Quercetin loaded Nanoparticles*).

El almidón de maíz, tipo A, constituye una de las principales fuentes de almidón en la industria a nivel mundial en comparación con otros almidones (Wang *et al.*, 2022). La mayoría de los almidones contienen entre un 20 a 30% de amilosa y un 70 a 80% de amilopectina, a diferencia de ellos, el almidón de maíz ceroso contiene menos de un 5 % de amilosa. Esto le confiere propiedades diferentes, como una estructura más compacta y uniforme, con menor tendencia a la retrogradación, presentando una gelificación más pronunciada y formando geles más blandos y frágiles en comparación con los otros tipos de almidones (Owen, 2005). Estas características lo hacen una matriz ideal para la encapsulación y liberación controlada de compuestos bioactivos, como la quercetina.

Las curvas de DSC de las nanopartículas cargadas con quercetina no presentan el *peak* característico de la gelatinización del almidón ni de las transiciones de fase de la quercetina. De acuerdo con la literatura, las curvas de DSC de la quercetina presentan tres picos: dos endotérmicos a 127,8 y 327,5°C correspondientes al reordenamiento debido a la pérdida de agua y el cambio de fase sólido-líquido de la quercetina, respectivamente. Los valores de T_0 del pico

endotérmico para partículas cargadas estuvieron en el rango de 135-143°C. Zhang y colaboradores reportaron que el *peak* ancho endotérmico alrededor de 120 °C en complejos de inclusión de almidón de maíz con quercetina, se debe a un reordenamiento de la estructura debido a la pérdida de agua. Estos autores tampoco reportaron los *peaks* de fusión alrededor de 330°C de la quercetina en complejo quercetina-almidón, sugiriendo así que el almidón y la quercetina forman una nueva fase (Figura 5) (Zhang *et al.*, 2011).

Para las nanopartículas sin cargar se observa una mayor descomposición en comparación con las nanopartículas cargadas y los gránulos de almidón. Esta diferencia se da por la estructura compacta que posee el gránulo de almidón y que por tanto requiere una mayor energía para su descomposición. Para las nanopartículas cargadas con quercetina existe un menor porcentaje de degradación en comparación con las nanopartículas sin cargar lo que sugiere que las interacciones supramoleculares almidón-quercetina que le brindan una mayor estabilidad térmica a la nanopartícula (Miranda, 2024).

La posición de las bandas corresponde a las vibraciones características del almidón de maíz y estas no se modifican al formar las nanopartículas ni la presencia de quercetina. Sin embargo, sí se observan diferencias en la intensidad de algunas bandas del almidón precursor en comparación con las nanopartículas sin cargar y cargadas con quercetina, por ejemplo, en la región entre 3650 y 3000 cm^{-1} asociada a la vibración de los grupos hidroxilos libres que interactúan intra e intermolecularmente formando enlaces de tipo hidrógeno. En esta región la intensidad de la vibración es mayor para el almidón precursor en comparación con

las nanopartículas lo cual puede explicarse por la pérdida de la estructura cristalina del gránulo (Pozo et al., 2018).

En los ensayos de rayos X para evaluar el grado de cristalinidad, el almidón de maíz es el que presenta el mayor porcentaje de cristalinidad dado por el ordenamiento de los gránulos que contienen un mayor porcentaje de amilopectina (Owen, 2005). La disminución en el porcentaje de cristalinidad de las nanopartículas tanto cargadas como sin cargar se debe a la combinación de los procesos de nano precipitación y ultrasonido. Para el primer caso, las moléculas de almidón experimentan una ruptura parcial de los enlaces de hidrógeno y de la estructura helicoidal, uniéndose en entre sí en un estado desordenado resultando en una estructura global amorfa que difiere a la del almidón natural (Ruan *et al.*, 2022).

Si bien se han realizado ensayos para la caracterización física y química de estas nanopartículas, todavía falta información en relación con sus propiedades de encapsulación, hidratación, liberación de compuestos encapsulados y el efecto que podrían tener en un contexto celular fisiológico y patológico, como es el proceso angiogénico inducido por células tumorales.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Durante el último tiempo, se ha enfocado el estudio de nanopartículas cargadas con compuestos bioactivos como una alternativa al tratamiento del cáncer al demostrarse su efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células tumorales y la angiogénesis, sin embargo, no se ha estudiado el efecto de las nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre el proceso angiogénico de células endoteliales de microvasculatura humana inducidas por medio condicionado de adenocarcinoma de ovario.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tienen las nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre la proliferación y migración de células endoteliales inducida por medio condicionado de adenocarcinoma de ovario?

III. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina inhiben la proliferación y migración de células endoteliales inducida por medio condicionado de células de adenocarcinoma ovárico.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre el proceso angiogénico de células endoteliales inducida por medio condicionado de células de adenocarcinoma ovárico.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la encapsulación de quercetina en las propiedades de hidratación, liberación y antioxidante de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina preparadas mediante el método de nano precipitación ultrarrápida.
2. Determinar el efecto de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre la viabilidad de las células de adenocarcinoma ovárico.
3. Determinar el efecto de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre la proliferación y migración de células endoteliales de microvasculatura humana incubadas con medio condicionado de células de adenocarcinoma ovárico.

VII. METODOLOGÍA

VII.1 Preparación de nanopartículas de almidón por método de nanoprecipitación ultrarrápida

Las nanopartículas de almidón se prepararon por el método de nanoprecipitación ultrarrápida, más conocida como *flash nanoprecipitation*, utilizando un dispositivo de micro fluido, mezclador de chorro de impacto confinado como se observa en la Figura 5. Este dispositivo presenta una cámara de dimensiones pequeñas (Figura 4) donde en su interior colisionan los dos fluidos caracterizados por la miscibilidad de los dos solventes, y la inmiscibilidad de uno de ellos con el polímero precursor de las nanopartículas (Figura 3). El anti solvente utilizado fue etanol absoluto y el solvente del almidón el agua. Para ello se preparó una suspensión acuosa de almidón de maíz ceroso con 5 % de amilosa S9679 (Sigma Aldrich) al 1 % m/v en un matraz aforado de 100 mL. Seguidamente, la solución se traspasó a un vaso precipitado de 250 mL para su gelatinización utilizando un microondas (Thomas Modelo No: TH-20DM, China) a 40 watts de potencia, por 9 minutos. Cada 30 segundos la suspensión se agitó con una bagueta para evitar la formación de grumos, utilizando a su vez un vidrio reloj para evitar la evaporación del agua. Una vez gelatinizado el almidón, se repuso el volumen de solvente perdido en el proceso.

Después de la gelatinización, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación magnética a 400 rpm, utilizando un agitador IKA Modelo:

RCT B S000 y posteriormente se dejó en un baño de hielo por 5 minutos alcanzando una temperatura aproximada de 13-14°C.

Luego, se sonicó la solución de almidón (para favorecer el desenmarañamiento de las cadenas de amilosa y amilopectina) utilizando un ultrasonido de barra (Qsonica Q700, USA) con 700 watts y una sonda de 12,7 mm de diámetro, durante 10 minutos a una amplitud de 60 alcanzando la solución una temperatura aproximada de 30°C. La sonicación se realizó con pulso de apagado y encendido 5/2 segundos. Al finalizar, se obtuvo una solución transparente y menos viscosa.

Dos jeringas, una con la solución de almidón y otra con etanol absoluto (Merck 107017) se inyectó simultánea y manualmente en el mezclador de chorro de impacto confinado. Las dos corrientes de líquido al impactar provocan un régimen de turbulencia dentro de la microcámara del mezclado, lo que llevó a una condición de supersaturación y a la formación de las nanopartículas de almidón siendo éstas recibidas en 5 mL de etanol absoluto.

La dispersión resultante se homogeneizó con un ultraturrax (IKA Modelo: T 25 D, Alemania) a 8000 rpm durante 1 minuto, para promover precipitación de las nanopartículas de almidón. Luego, se centrifugó (Eppendorf Modelo 5804, Alemania) a 7500 rpm por 10 minutos y se lavó el precipitado 2 veces con etanol absoluto centrifugando entre lavados nuevamente a 7500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y el etanol remanente se dejó evaporar por 2 horas, para luego disgregar las nanopartículas secas con una espátula y se dispersarlas en agua para ser congeladas (Freezer HEAIR) a -40°C por 12 horas, donde finalmente se liofilizaron (VirTis SP scientific Modelo: sentry 2.0) por 2 días.

Las nanopartículas cargadas con quercetina se prepararon utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente con algunas modificaciones. Se masó 0,1 gramos de quercetina (SIGMA Q4951) y se llevó a un matraz aforado de 100 mL el cual se completó con etanol absoluto, obteniendo así una solución de quercetina en etanol de 0,1 m/v. Las dos jeringas, una con la solución de almidón y otra con la solución de quercetina, se inyectaron de manera simultánea y manualmente en el mezclador de chorro de impacto confinado para ser recibidas en un vaso precipitado con 5 mL de etanol.

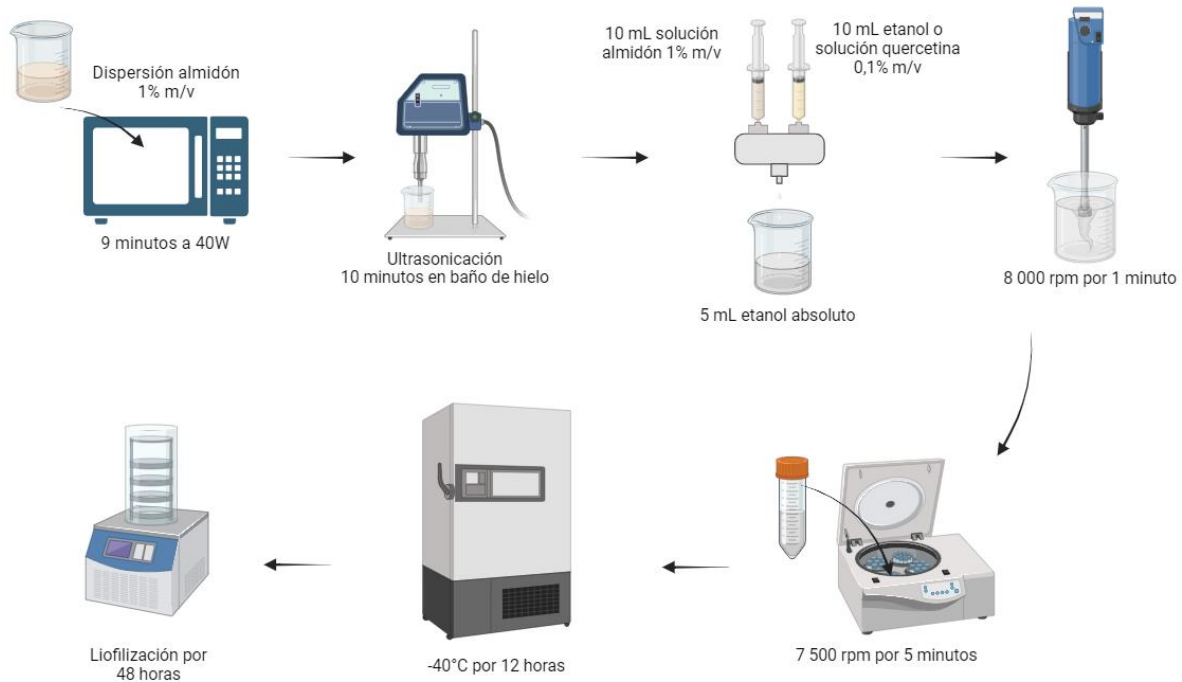


Figura 5. Esquema representativo de la preparación de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina mediante el proceso de nanoprecipitación ultrarrápida.

VII.2 Eficiencia de encapsulación

Se pesó 50 mg de nanopartículas, los que fueron suspendidos en 5 mL de metanol. La suspensión fue sometida a extracción con ultrasonido por 20 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos, filtradas por membrana de 0,45 μm e inyectadas directamente en el sistema HPLC. Las muestras fueron preparadas en triplicado. La muestra de sobrenadante fue inyectada directamente.

El análisis de HPLC se realizó utilizando una bomba binaria YL9111S acoplada al detector UV/Vis YL9120s (Young Lin®, Corea). Para el análisis cromatográfico se usó una columna Kromasil KR100 columna 100Å - 5 μm -C18, 4,6 mm x 250 mm (Eka Chemicals AB, Bohus, Suecia). El sistema de disolventes estaba compuesto por el disolvente A (agua ultrapura que contenía 2 % de acético, v/v) y el disolvente B (100 % de ACN). El programa de gradiente fue de 0-5 minutos (2% B); 3-22 minutos (2-20% B); 22-24 minutos (20-30% B); 24-26 minutos (30-60% B); 26-32 minutos (60-2%B). Finalmente, la columna se reequilibró durante 5 minutos más. El caudal fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 20 μL . La temperatura de trabajo fue de 35 °C. La detección se realizó mediante cromatogramas UV-VIS adquiridos a 280 nm y 350 nm. Para la determinación cuantitativa se preparó una curva de calibración con quercetina entre 5-75 $\mu\text{g/mL}$ en metanol.

La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó mediante la Ecuación 1 (Sabando *et al.*, 2022).

$$EE (\%) = \frac{\text{Quercetina encapsulada (mg)}}{\text{Contenido inicial de quercetina (mg)}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

VII.3 Hinchamiento y solubilidad

El poder de hinchamiento y solubilidad para las nanopartículas de almidón de maíz cargadas y sin cargar se determinó a 37°C utilizando el método reportado por Castaño y colaboradores (Castaño *et al.*, 2014), con modificaciones. Se preparó una suspensión de nanopartículas de almidón al 3,3% m/v utilizando PBS (PBS por sus siglas en inglés Phosphate-buffered saline) [(mM): 130 NaCl, 2.7 KCl, 0.8 Na₂HPO₄, 1.4 KH₂PO₄ (pH 7.4; 4°C)] precalentado a 30°C, para posteriormente llevarlo a 37°C en un baño de agua por 24 horas. La suspensión se enfrió rápidamente hasta temperatura ambiente y se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos. El residuo sólido de la centrifugación se masó para calcular el poder de hinchamiento. El sobrenadante se secó en la estufa a 70°C por 24 horas y el residuo soluble seco obtenido se masó para obtener el índice de solubilidad de las nanopartículas.

El poder de hinchamiento se calculó como la relación entre la masa del residuo centrifugado sólido y la masa inicial de las nanopartículas secas utilizadas; y la

solubilidad se determinó como la relación entre la masa del residuo soluble seco y la masa inicial de las nanopartículas secas.

VII.4 Liberación de quercetina

Se preparó una suspensión de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina en PBS en una proporción 32:1 m/v y se llevó a 37°C por 24 horas sin agitación en un baño de agua. El análisis del sobrenadante se realizó mediante HPLC como se describió para la determinación de la eficiencia de encapsulación.

Se calculó el porcentaje de quercetina liberada en 24 horas en función del porcentaje de quercetina encapsulada.

VII.5 Actividad antioxidante

El ensayo de radical catiónico ABTS^{•+} [(sal de diamonio 2',2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazlina-6-sulfónico)] se realizó de acuerdo con lo descrito por Li *et al.*, 2019 y Re *et al.*, 1999 con modificaciones. Una solución stock del radical catiónico ABTS^{•+} se preparó mediante la reacción de 1,225 mM de persulfato de potasio y 3,5 mM de solución acuosa de ABTS. La mezcla se incubó en ausencia de luz a temperatura ambiente por 16 horas. Luego la solución ABTS^{•+} se diluyó con etanol absoluto y se dejó por lo menos 6 horas hasta que alcanzó una absorbancia de 0,7 a una longitud de onda de 734 nm. La curva de calibración se preparó a partir de 2mM de solución

stock de Trolox (el antioxidante estándar para este ensayo) en etanol absoluto. El rango de concentración de las soluciones de trabajo de Trolox fueron de 12,5 a 400 μM y el etanol absoluto se utilizó como blanco.

250 mg de nanopartículas sin cargar y cargadas con quercetina fueron suspendidas en 5 mL de agua destilada por 24 horas y luego centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. 20 μL de sobrenadante de cada muestra de nanopartículas (previamente diluido con un factor de dilución de 3) o las soluciones de Trolox, se mezclaron con 180 μL de solución diluida de ABTS \bullet^+ .

La lectura de absorbancia a 734 nm se realizó previo a la mezcla de la muestra o las soluciones de Trolox con la solución de ABTS \bullet^+ ($A_{0\text{min}}$) y 6 minutos después de la mezcla ($A_{6\text{min}}$).

La actividad sobre los radicales libres se calculó mediante la Ecuación 2:

$$\text{Actividad ABTS (\%)} = \left[\frac{A_{0\text{min}} - A_{6\text{min}}}{A_{0\text{min}}} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

El porcentaje de actividad sobre los radicales libres del ABTS a 734 nm se graficó en función de la concentración de la solución estándar de Trolox. Los valores obtenidos se expresaron como miligramos de Trolox por gramo de nanopartículas secas.

VII.6 Cultivo de línea celular de adenocarcinoma ovárico

La línea celular SKOV-3 (ATCC HTB-77, células resistentes) provenientes de adenocarcinoma de ovario humano fueron expandidas, cultivadas y mantenidas a 37°C con un 5% de CO₂ en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB por las siglas en inglés *Serum Fetal Bovine*) (Thermo Fisher Scientific) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco).

VII.7 Cultivo de células endoteliales de microvasculatura humana

Las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1 por su sigla en inglés *Human Microvascular Endothelial Cells*) humano fueron expandidas, cultivadas y mantenidas a 37°C y con CO₂ al 5% por 24 horas con M199 (Gibco) suplementado con 10% de SBF y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina.

VII.8 Preparación de medio condicionado

El medio condicionado se obtuvo de acuerdo con lo descrito por Makhoul *et al.*, 2016, Di Santo *et al.*, 2016 y Dowling & Clynes, 2011. Las células SK-OV-3 se incubaron a 37°C y 5% CO₂ con RPMI suplementado hasta alcanzar el 60-70% de confluencia. Alcanzada la confluencia deseada las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio RPMI sin suplementar por 18 horas. El medio

obtenido se recolectó y filtró utilizando un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,2 μm (STERLITECH) y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Para la preparación del medio condicionado se utilizó una razón 1:1 (medio de SK-OV-3: medio de HMEC-1) y se añadió a las HMEC-1 para los experimentos posteriores.

VII.9 Protocolo de incubación SKOV-3

Al encontrarse al 100% de confluencia las células en las placas de 100 mm, fueron traspasadas a placas de 96 pocillos y se dejaron crecer por 12 horas hasta que alcanzaron el 50% de confluencia. Posteriormente las células fueron incubadas con las siguientes condiciones por 24 horas:

- ⇒ Control: células con medio RPMI suplementado al 10% con SBF.
- ⇒ Vehículo: células incubadas con medio RPMI suplementado al 10% con SBF y DMSO al 1% v/v.
- ⇒ Quercetina: células con medio RPMI suplementado al 10% con SBF incubadas con quercetina disuelta en DMSO (<1% v/v) en un rango de concentraciones de 2,5 nM a 250 μM .
- ⇒ CS-NP: células con medio RPMI suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$.
- ⇒ CS-Q-NP: células con medio RPMI suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-Q-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

- ⇒ CS-NP en vehículo: células con medio RPMI suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL, previamente suspendidas en DMSO (<1% v/v).
- ⇒ CS-Q-NP en vehículo: células con medio RPMI suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-Q-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL, previamente suspendidas en DMSO (<1% v/v).

VII.10 Protocolo incubación HMEC-1

Al encontrarse al 100% de confluencia las células en las placas de 100 mm fueron traspasadas a placas de 96 pocillos y se dejaron crecer por 12 horas hasta que alcanzaron el 50% de confluencia. Posteriormente las células fueron incubadas con las siguientes condiciones por 24 horas:

- ⇒ Control: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF.
- ⇒ Vehículo: células incubadas con medio M199 suplementado al 10% con SBF y DMSO al 1% v/v.
- ⇒ Quercetina: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con quercetina disuelta en DMSO (<1% v/v) en un rango de concentraciones de 2,5 nM a 250 µM.
- ⇒ CS-NP: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL.
- ⇒ CS-Q-NP: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-Q-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL.

- ⇒ CS-NP en vehículo: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL, previamente suspendidas en DMSO (<1% v/v).
- ⇒ CS-Q-NP en vehículo: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-Q-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL, previamente suspendidas en DMSO (<1% v/v).

VII.11 Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular de SK-OV-3 y HMEC-1 se utilizó la sonda fluorescente SYTOX Green la cual se agregó al momento de incubar con las condiciones descritas previamente (VII.9 y VII.10) a una concentración final en pocillo de 60 nM. Pasados los tiempos de incubación respectivos se realizó la medición de fluorescencia mediante el instrumento de análisis de células vivas Incucyte® S3. El instrumento entregó el porcentaje de células muertas por campo analizado, sin embargo, para el análisis de los datos se calculó la diferencia como porcentaje de células vivas por campo.

VII.12 Ensayo cierre de herida

Se realizó el ensayo de cierre de herida sobre HMEC-1 que se encontraban al 80% de confluencia de acuerdo con lo descrito por Jin y colaboradores (Jin *et al.*, 2016). Se realizó una disrupción en la superficie de cada pocillo con una punta de pipeta de 10 μ L para generar una brecha libre de células y se lavó con PBS 2 veces para luego incubar las células por 24 horas con las siguientes condiciones:

- ⇒ Control: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF.
- ⇒ Restricción de suero (0%): células con M199 sin suplementar para inducir estrés y sincronizar el ciclo celular.
- ⇒ Extra suplementado (20%): células con M199 suplementadas con 20% SBF para promover proliferación y supervivencia celular.
- ⇒ Vehículo: células incubadas con medio M199 suplementado al 10% con SBF y DMSO al 1% v/v.
- ⇒ Quercetina: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con quercetina disuelta en DMSO (<1% v/v) en concentraciones de 12,5 nM y 25 nM.
- ⇒ CS-NP en vehículo: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 μ g/mL, previamente suspendidas en DMSO (<1% v/v).

⇒ CS-Q-NP en vehículo: células con medio M199 suplementado al 10% con SBF incubadas con CS-Q-NP en un rango de concentraciones de 1 a 100 µg/mL, previamente suspendidas en DMSO (<1% v/v).

Para determinar la proliferación y migración de HMEC-1 se capturaron imágenes de cada pocillo mediante el instrumento de análisis de células vivas Incucyte® S3. El instrumento entregó el porcentaje de confluencia de cada pocillo y una imagen con aumento de 10X de la brecha generada por el ensayo de cierre de herida al tiempo 0 y 24 horas. Para la determinación de la proliferación se calculó la diferencia en confluencia como se describe en la Ecuación 3.

$$\Delta \text{ confluencia } (\%) = \frac{\text{Confluencia } 24h (\%) - \text{Confluencia } 0h (\%)}{\text{Confluencia } 0h (\%)} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ (versión 1.54j) donde se determinó el área de cada brecha y se calculó el porcentaje de área cerrada como se describe en la Ecuación 4.

$$\text{Cierre de herida } (\%) = \frac{\text{Área } 0h (mm^2) - \text{Área } 24h (mm^2)}{\text{Área } 0h (mm^2)} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

VII.14 Análisis estadístico

Los valores se presentaron como la media \pm desviación estándar (SD por las siglas en inglés *Standard Deviation of Mean*) o error estándar (SEM por las siglas en inglés *Standard Error of Mean*), n indica el número de pocillos o réplicas realizadas para cada condición. Las comparaciones entre dos y más grupos se realizaron por medio de la prueba t de Student no pareada y el análisis de la varianza (ANOVA), respectivamente. Se consideró como estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.00 para Windows.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

Las nanopartículas cargadas y sin cargar con quercetina preparadas a partir de almidón de maíz presentaron una morfología esférica de acuerdo con lo descrito previamente por Miranda (Miranda, 2024) (Figura 6 A y B). Para el tamaño de partícula, en general estas presentaron valores de los 100 nm para CS-NP y 219 nm para CS-Q-NP con un rango de distribución de 50-150 nm y 100-300 nm para respectivamente (Figura 6 C y D).

VIII.2 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación para CS-Q-NP presentó un valor de $0,196 \pm 0,028$ % de encapsulación de quercetina en las nanopartículas cargadas utilizando la Ecuación 1.

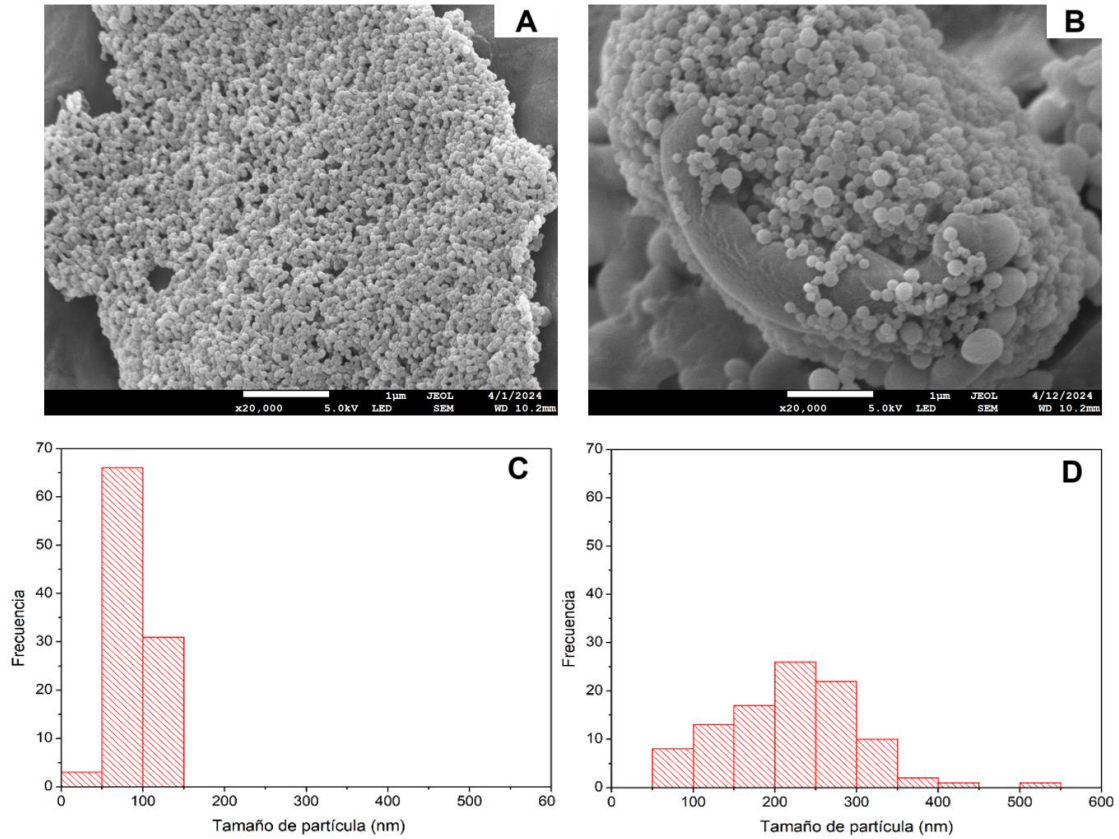


Figura 6. Imágenes SEM (A y B) e histograma (C y D) de nanopartículas sin cargar (A, C) y cargadas con quercetina (B, D) obtenidas a partir de almidón de maíz por nanoprecipitación ultrarrápida. Barra de escala= 1 µm. Conteo de partículas=100.

VIII.3 Hinchamiento y solubilidad

CS-NP y CS-Q-NP presentaron un mayor hinchamiento en comparación con CS, siendo CS-NP la que presentó el mayor poder de hinchamiento a 37°C en PBS con un valor de $5,00 \pm 0,14$ m/m. Al comparar el hinchamiento de las nanopartículas cargadas y sin cargar existió una diferencia estadísticamente significativa donde CS-Q-NP presentó un valor menor de $4,03 \pm 0,06$ m/m (Tabla 1).

El índice de solubilidad de las nanopartículas fue de $9,56 \pm 1,28$ % para CS-NP, $7,32 \pm 0,22$ % para CS-Q-NP y $2,49 \pm 0,89$ % para CS. Entre nanopartículas cargadas y sin cargar con quercetina no se presentó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de solubilidad, sin embargo, al comparar las nanopartículas con el gránulo de almidón si existe una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 1).

VIII.4 Liberación de quercetina

La liberación de quercetina desde CS-Q-NP fue determinada por HPLC-DAD, obteniéndose un porcentaje de liberación de 7,97 % en función del porcentaje encapsulado.

Tabla 1. Poder de hinchamiento e índice de solubilidad de almidón de maíz (CS), nanopartículas de almidón de maíz sin cargar (CS-NP) y cargadas con quercetina (CS-Q-NP) en PBS a 37°C.

Muestra	Poder de hinchamiento (m/m)	Índice de solubilidad (%)
CS	1,78 ± 0,21 ^a	2,49 ± 0,89 ^a
CS-NP	5,00 ± 0,14 ^b	9,56 ± 1,28 ^b
CS-Q-NP	4,03 ± 0,06 ^c	7,32 ± 0,22 ^b

Valores expresados como la media ± desviación estándar, n=3. Valores con diferentes letras en la misma columna son estadísticamente distintos ($p < 0,05$).

VIII.5 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las nanopartículas se obtuvo mediante el ensayo del radical ABTS•+ a una longitud de onda de 734 nm para la cuantificación. Se determinó un valor de 0 % de actividad ABTS o 0 equivalentes de Trolox para CS-NP y de $3,27 \pm 1,41$ % de actividad ABTS o $0,23 \pm 0,08$ equivalentes de Trolox para CS-Q-NP utilizando la Ecuación 2 (Tabla 2).

VIII.6 Viabilidad celular de SKOV-3 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

En la Figura 10 se observa cómo varía la confluencia relativa de las células SKOV-3 en función del tiempo, sometidas a distintas concentraciones de quercetina (Q) en comparación con el control. En la condición con vehículo se determinó una tendencia a la disminución de la confluencia, la cual se observa en la Tabla 3 donde se cuantificó la velocidad de proliferación (expresada como el cambio en la confluencia inicial por hora) de las células SKOV-3, presentando un valor de $-0,0036 \pm 0,0008$ confluencia/hora, indicando una reducción significativa en comparación con el control (* $p < 0,05$).

Con relación a los grupos tratados con quercetina, el tratamiento con 250 μ M presentó una disminución de la confluencia en el tiempo con un valor de velocidad de proliferación de $-0,0073 \pm 0,0005$ confluencia/hora (Tabla 3) teniendo así un efecto inhibitorio sobre la proliferación en comparación con el control (* $p < 0,05$). Para

las demás concentraciones utilizadas (25 μ M a 2,5 nM) no muestran diferencias significativas en comparación con el control ($p > 0,05$) (Figura 10 y Tabla 3).

Las células tumorales incubadas con nanopartículas de almidón sin cargar y cargadas con quercetina, no presentaron una variación en los valores de viabilidad celular en comparación con el control, sin embargo, se presentó una diferencia significativa entre CS-NP y CS-Q-NP a una concentración de 100 μ g/mL ($*p < 0,05$) (Figura 8A). Por otro lado, se observó una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células vivas para la condición de vehículo en comparación con el control ($\#p < 0,05$), disminución que se ve revertida significativamente por todas las nanopartículas que fueron previamente suspendidas en el vehículo ($\&p < 0,05$) (Figura 8B). De la misma manera que en la Figura 8A, para las células incubadas con nanopartículas suspendidas previamente en el vehículo, en general no se observó un cambio en el porcentaje de células vivas en comparación con el control para las nanopartículas, a excepción de CS-Q-NP 100 μ g/mL donde se observó un aumento significativo del porcentaje de células vivas en comparación con el control ($\#p < 0,05$) y a su vez una diferencia con CS-NP 100 μ g/mL ($*p < 0,05$) (Figura 8B).

Tabla 2. Actividad antioxidante de nanopartículas de almidón de maíz sin cargar y cargadas con quercetina.

Muestra	% Actividad ABTS	Equivalentes de Trolox (mg/g)
CS-NP	0	0
CS-Q-NP	3,27 ± 1,41	0,23 ± 0,08

Valores expresados como la media ± desviación estándar, n=3.

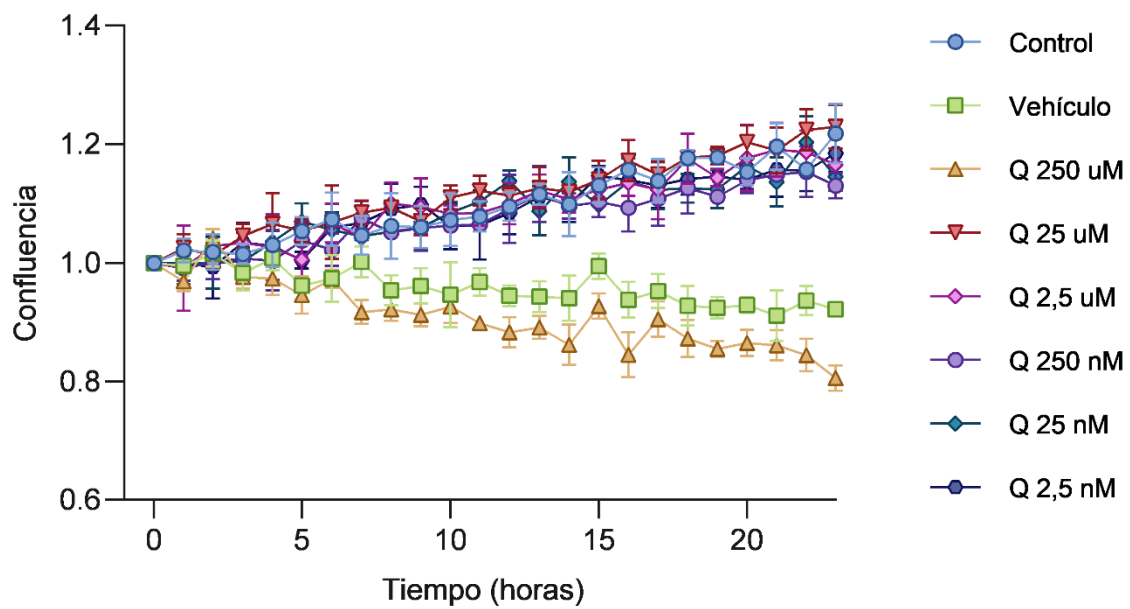


Figura 7. Confluencia de SKOV-3 incubadas con quercetina (Q) a diferentes concentraciones por 24 horas. Los valores de confluencia se expresaron como confluencia relativa al tiempo 0h. Control: células incubadas con medio RPMI; Vehículo: DMSO 1%. n=3.

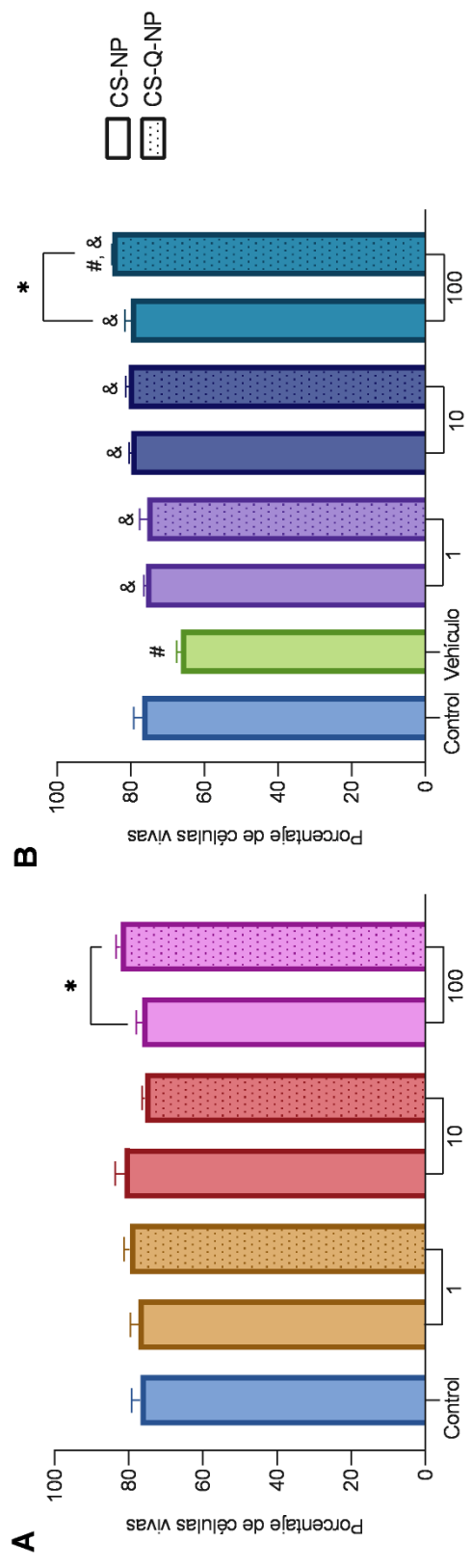


Figura 8. Viabilidad celular de SKOV-3 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz sin cargar (CS-NP) y cargadas con quercetina (CS-Q-NP) a diferentes concentraciones en µg/mL. (A) Células incubadas con nanopartículas sin vehículo. (B) Células incubadas con nanopartículas previamente suspendidas en vehículo (DMSO < 1%). Los valores de viabilidad celular se expresaron como porcentaje de células vivas a las 24 horas del tratamiento. Control: células incubadas con medio RPMI sin nanopartículas; Vehículo: DMSO 1%. #: p < 0,05 versus control; &: p < 0,05 versus vehículo; *: p < 0,05. n=3.

VIII.7 Viabilidad celular de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

En la Figura 9 se observa cómo varía la confluencia relativa de las células HMEC-1 en función del tiempo, sometidas a distintas concentraciones de quercetina (Q) en comparación con el control. En la condición con vehículo se determinó una tendencia a la disminución de la confluencia, la cual se observa en la Tabla 3, presentando un valor de $-0,0004 \pm 0,0009$, indicando una reducción significativa en comparación con el control ($*p < 0,05$).

Con relación a los grupos tratados con quercetina, el tratamiento con $250 \mu\text{M}$ presentó una disminución de la confluencia en el tiempo con un valor de velocidad de proliferación de $-0,0097 \pm 0,0003$ (Tabla 3) teniendo así un efecto inhibitorio sobre la proliferación en comparación con el control ($*p < 0,05$). Para las demás concentraciones utilizadas ($25 \mu\text{M}$ a $2,5 \text{ nM}$) no muestran diferencias significativas en comparación con el control ($p > 0,05$) (Figura 9 y Tabla 3).

Las células endoteliales incubadas con CS-NP y CS-Q-NP no presentaron una variación en los valores de viabilidad celular en comparación con el control como se puede observar en la Figura 10A para las concentraciones de 1 hasta $100 \mu\text{g/mL}$ de nanopartículas ($p > 0,05$).

Para las células incubadas con nanopartículas suspendidas previamente en el vehículo (Figura 10B), no se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular de las condiciones con CS-NP 1, 10 y $100 \mu\text{g/mL}$ en comparación con el

control ($p > 0,05$). Por otro lado, se observó un aumento significativo en la viabilidad celular para las condiciones con CS-Q-NP 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con el control ($\#p < 0,05$), presentando también una diferencia estadísticamente significativa con CS-NP 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente ($*p < 0,05$).

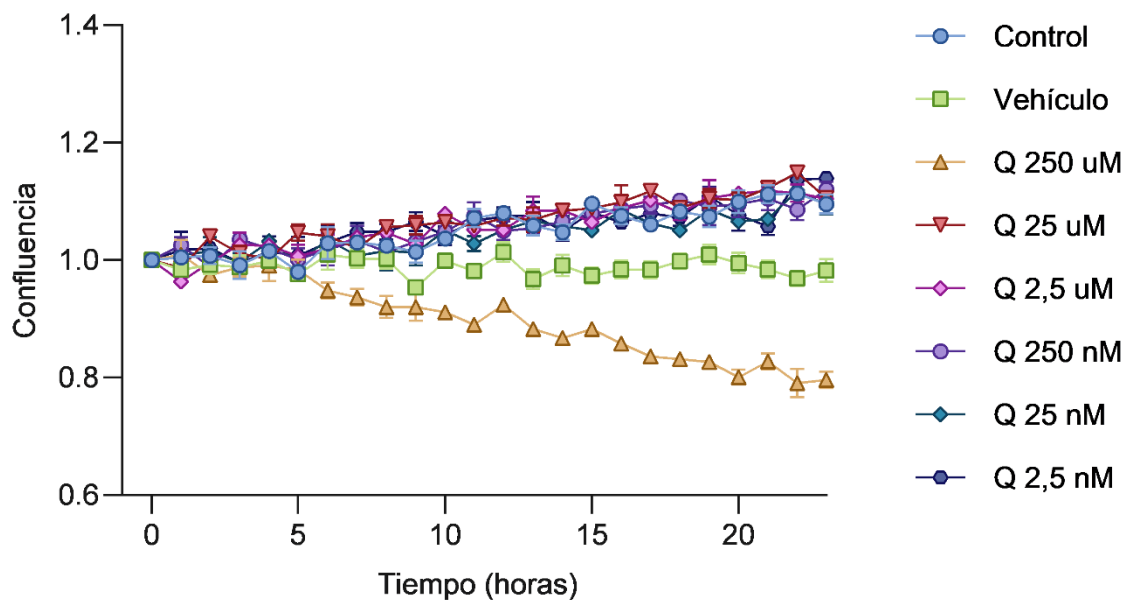


Figura 9. Confluencia de HMEC-1 incubadas con quercetina (Q) a diferentes concentraciones por 24 horas. Los valores de confluencia se expresaron como confluencia relativa al tiempo 0h. Control: células incubadas con medio M199; Vehículo: DMSO 1%. n=3.

Tabla 3. Velocidad de proliferación de SKOV-3 y HMEC-1 incubadas con distintas concentraciones de quercetina (Q) por 24 horas.

Condiciones	Velocidad de proliferación (confluencia al tiempo 0/hora)	
	SKOV-3	HMEC-1
Control	0,0087 ± 0,0006	0,0052 ± 0,0004
Vehículo	-0,0036 ± 0,0008 *	-0,0004 ± 0,0009 *
Q 250 µM	-0,0073 ± 0,0005 *	-0,0097 ± 0,0003 *
Q 25 µM	0,0092 ± 0,0010	0,0056 ± 0,0005
Q 2,5 µM	0,0084 ± 0,0008	0,00583 ± 0,0003
Q 250 nM	0,0070 ± 0,0018	0,0050 ± 0,0013
Q 25 nM	0,0075 ± 0,0004	0,0042 ± 0,0010
Q 2,5 nM	0,0078 ± 0,0012	0,0048 ± 0,0007

Control: células incubadas con medio RPMI (SKOV-3) o M199 (HMEC-1); Vehículo: DMSO 1%. n=3, * p<0,05 versus Control.

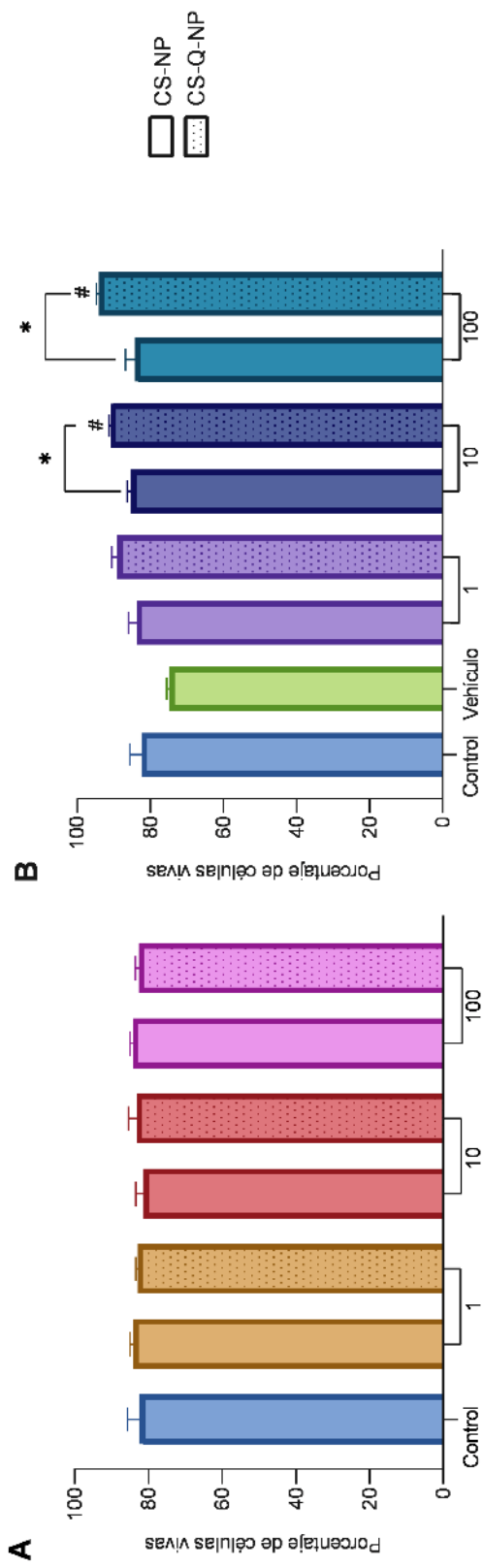


Figura 10. Viabilidad celular de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz sin cargar (CS-NP) y cargadas con queretina (CS-Q-NP) a diferentes concentraciones en µg/mL. (A) Células incubadas con nanopartículas sin vehículo. (B) Células incubadas con nanopartículas previamente suspendidas en vehículo (DMSO<1%). Los valores de viabilidad celular se expresaron como porcentaje de células vivas a las 24 horas del tratamiento. Control: células incubadas con medio M199 sin nanopartículas; Vehículo: DMSO 1%. #: p<0,05 versus control; *: p<0,05. n=3.

VIII.8 Ensayo cierre de herida

En la Figura 11, se muestra el análisis de la confluencia de células HMEC-1 incubadas con medio condicionado proveniente de la línea celular SKOV-3, en comparación con la condición sin medio condicionado. La confluencia celular, medida como el cambio en el porcentaje de proliferación a las 24 horas postratamiento, se evaluó bajo diferentes condiciones experimentales.

En la condición control se observó un aumento significativo en la confluencia celular cuando se utiliza medio condicionado, en comparación con el medio sin condicionar (* $p < 0,05$). Para el caso de la restricción de suero, se observó una disminución significativa de la confluencia en presencia de medio condicionado en comparación con el control (# $p < 0,05$), además de una diferencia significativa con respecto a la condición sin medio condicionado (* $p < 0,05$). Mientras que, para el tratamiento extra, la confluencia fue mayor solo en presencia de medio condicionado (* $p < 0,05$) pero no en comparación con el control ($p > 0,05$).

El tratamiento con el vehículo también presentó un aumento significativo en la proliferación celular con medio condicionado (* $p < 0,05$), y también comparado con el control sin medio condicionado (# $p < 0,05$).

Los tratamientos con quercetina a concentraciones de 12,5 nM y 25 nM no presentaron diferencias significativas en la confluencia celular con respecto a las demás condiciones, independientemente de la presencia o ausencia de medio condicionado.

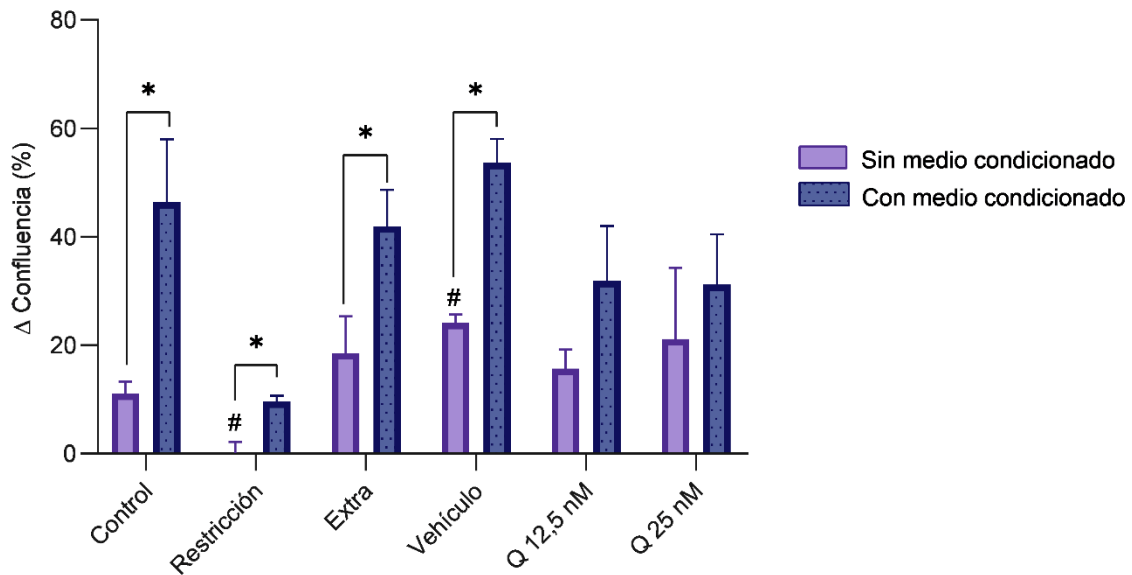


Figura 11. Diferencia en confluencia de HMEC-1 incubadas con medio condicionado de SKOV-3. El Δ confluencia se encuentra expresado como la diferencia en el porcentaje de proliferación a las 24 horas del tratamiento. Control: medio suplementado al 10%; Restricción: medio sin suero; Extra: medio suplementado al 20%; Vehículo: DMSO 1%; Q: quercetina. #: $p < 0,05$ versus control sin medio condicionado; *: $p < 0,05$.

La confluencia de células HMEC-1 incubadas con CS-NP y CS-Q-NP en presencia o ausencia de medio condicionado de células SKOV-3 se observa en la Figura 12. En la condición de ausencia de medio condicionado (Figura 12A), se observó un aumento estadísticamente significativo en la confluencia celular en las condiciones de vehículo y en el tratamiento con nanopartículas a las concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\#p<0,05$). Para CS-Q-NP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un incremento significativo en la proliferación celular con respecto al control ($\#p<0,05$), al vehículo ($\&p<0,05$) ya CS-NP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($*p<0,05$).

Para el tratamiento con medio condicionado (Figura 12B) se observaron cambios en el patrón de proliferación. No existiendo diferencias significativas en los tratamientos con nanopartículas 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio condicionado ($p>0,05$).

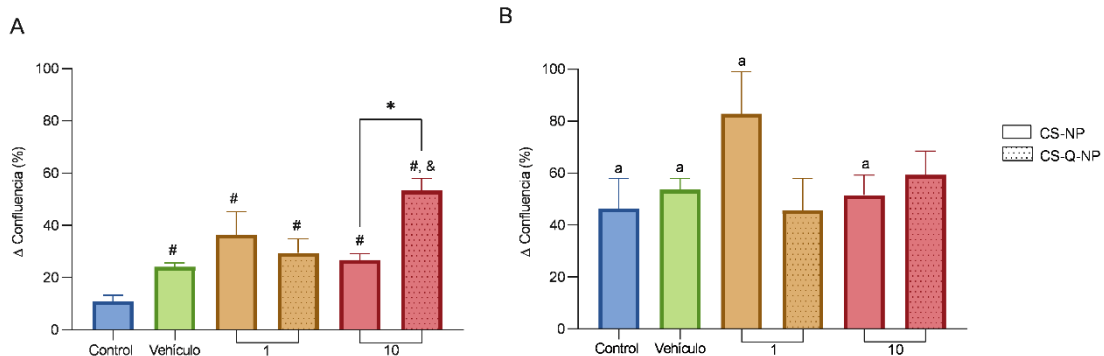


Figura 12. Diferencia en confluencia de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz en medio condicionado de SKOV-3. El Δ confluencia se encuentra expresado como la diferencia en el porcentaje de proliferación a las 24 horas del tratamiento. A. Tratamiento sin medio condicionado. B. Tratamiento con medio condicionado. Control: medio suplementado al 10%; Vehículo: DMSO 1%; #: $p < 0,05$ versus control; &: $p < 0,05$ versus vehículo; *: $p < 0,05$; a: $p < 0,05$ versus condición sin medio condicionado.

En la Figura 13 se obtuvo por microscopía de contraste de fase el cierre de herida de HMEC-1 incubadas con medio condicionado de SKOV-3 con distintos tratamientos a las 24 horas. El porcentaje de cierre de herida se observa en la Figura 14 donde se cuantificó la reducción en el área de la herida a las 24 horas de tratamiento en las distintas condiciones experimentales.

Para grupo control se observó un porcentaje de cierre de herida cercano al 50%, sin diferencia significativa entre la presencia o ausencia de medio condicionado ($p > 0,05$). En la condición de restricción, el cierre de herida es significativamente menor en comparación con el control tanto en presencia ($&p < 0,05$) como en ausencia de medio condicionado ($\#p < 0,05$). Para el grupo extra suplementado se observó una disminución en el cierre de herida en comparación con el control sin medio condicionado ($\#p < 0,05$) y un aumento en la condición de medio condicionado ($&p < 0,05$), siendo el cierre de herida significativamente mayor en presencia de medio condicionado en comparación con la condición sin medio condicionado ($*p < 0,05$).

En la condición del vehículo, se observó una disminución en el porcentaje de cierre de herida en comparación con el control sin medio condicionado ($\#p < 0,05$). Y un efecto positivo significativo del medio condicionado sobre el cierre de herida ($*p < 0,05$) en comparación con la condición sin medio condicionado. Finalmente, en el tratamiento con quercetina 12,5 nM se observó una disminución en el cierre de la herida en comparación con el control sin medio condicionado ($\#p < 0,05$), mientras que para el resto de los tratamientos con quercetina no se observó una diferencia significativa entre las condiciones con y sin medio condicionado ($p > 0,05$).

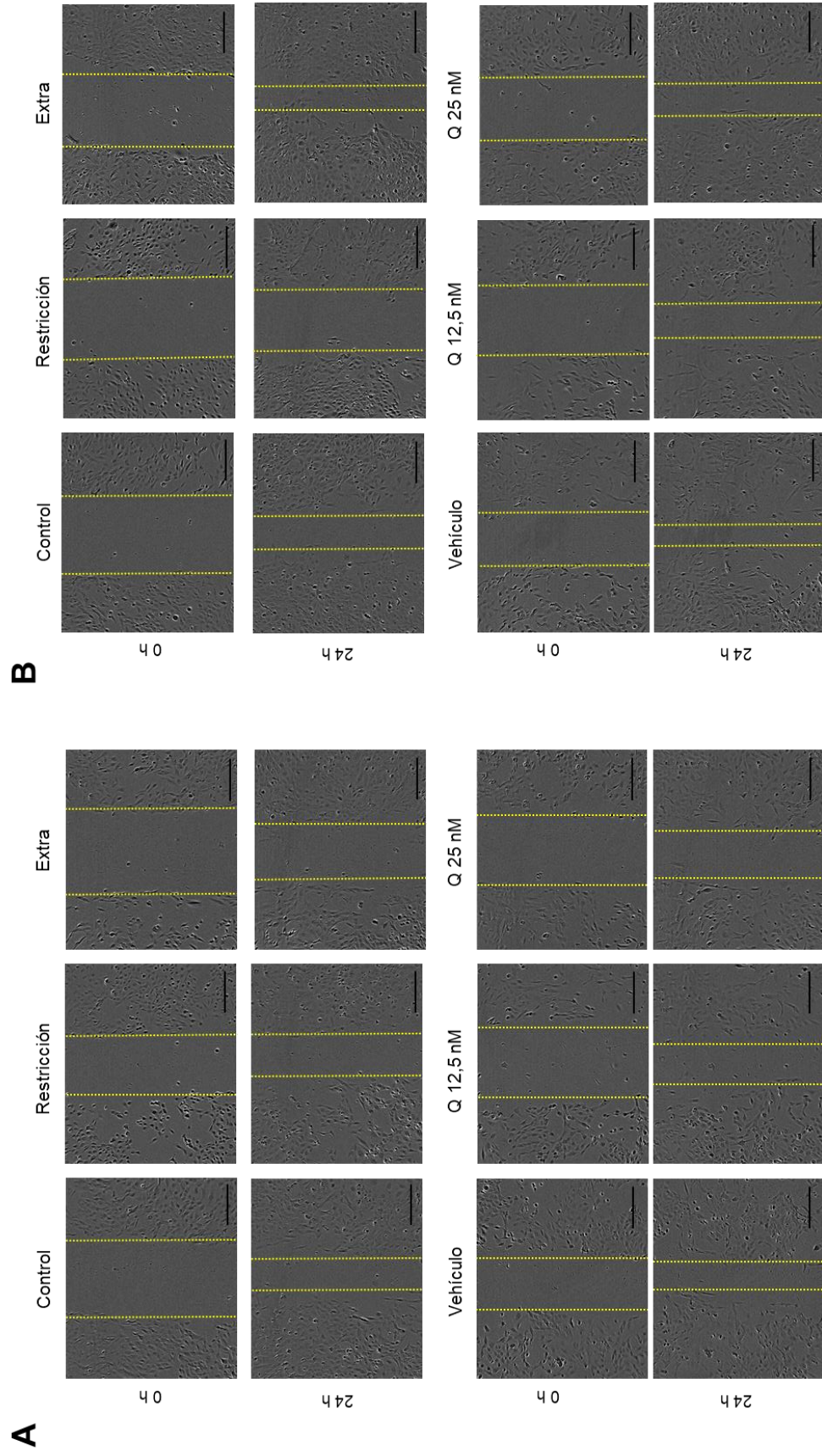


Figura 13. Imágenes de microscopía de contraste de fase del cierre de herida de HMEC-1 incubadas con diferentes tratamientos al tiempo 0 y 24 horas. A: sin medio condicionado. B: con medio condicionado. Control: medio suplementado al 10%; Restricción: medio sin suero; Extra: medio suplementado al 20%; Vehículo: DMSO 1%; Q: quercetina. Barra de escala= 250 μ m.

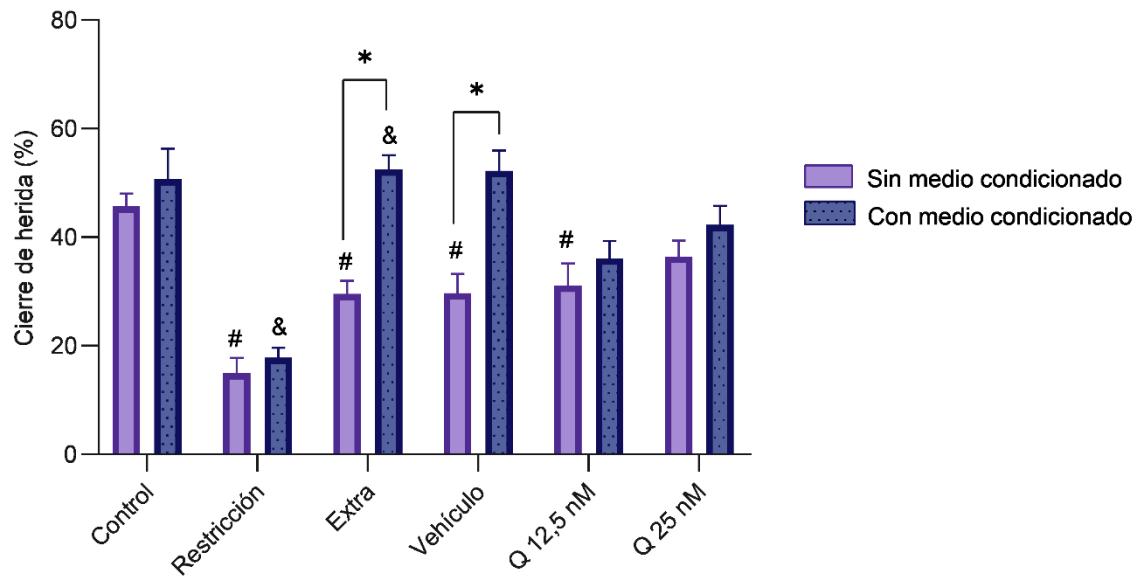


Figura 14. Porcentaje de cierre de herida de HMEC-1 incubadas con medio condicionado de SKOV-3. El porcentaje de cierre se encuentra expresado como la diferencia en el área de la herida a las 24 horas del tratamiento. Control: medio suplementado al 10%; Restricción: medio sin suero; Extra: medio suplementado al 20%; Vehículo: DMSO 1%; Q: quercetina. #: $p < 0,05$ versus control sin medio condicionado; &: $p < 0,05$ versus control con medio condicionado *: $p < 0,05$.

En la Figura 15 se obtuvo por microscopía de contraste de fase el cierre de herida de HMEC-1 incubadas con medio condicionado de SKOV-3 con distintos tratamientos de nanopartículas a las 24 horas. El porcentaje de cierre de herida se observa en la Figura 16 donde se cuantificó la reducción en el área de la herida a las 24 horas de tratamiento en las distintas condiciones experimentales. Para las condiciones tratadas con nanopartículas en la concentración 100 µg/mL tanto cargadas como sin cargar se observó que en el tiempo 0h las nanopartículas se depositan en la zona de la herida, generando problemas al delimitar el área de la herida por lo que la cuantificación en estas condiciones tanto de confluencia (Figura 13) y de cierre de herida (Figura 16) no fueron consideradas.

En las condiciones tratadas sin medio condicionado (Figura 16A) el grupo control presenta un cierre de herida de aproximadamente un 50%, mientras que para el grupo tratado con el vehículo se muestra una disminución significativa ($p < 0,05$) en el cierre (alrededor de un 30%). Para los grupos tratados con nanopartículas en ambas concentraciones se observó un aumento significativo del cierre de herida en comparación con el vehículo ($p < 0,05$) y específicamente para CS-Q-NP 1 µg/mL se observa un aumento en el cierre de herida en comparación con el control ($p < 0,05$) y con CS-NP 1 µg/mL.

En las condiciones tratadas con medio condicionado (Figura 16B) no se observaron diferencias significativas con la mayoría de las condiciones en comparación con el control y el vehículo ($p > 0,05$), a excepción de CS-Q-NP 1 µg/mL, la cual presentó una disminución significativa del cierre de herida en comparación con el control ($p < 0,05$) y el vehículo ($p < 0,05$).

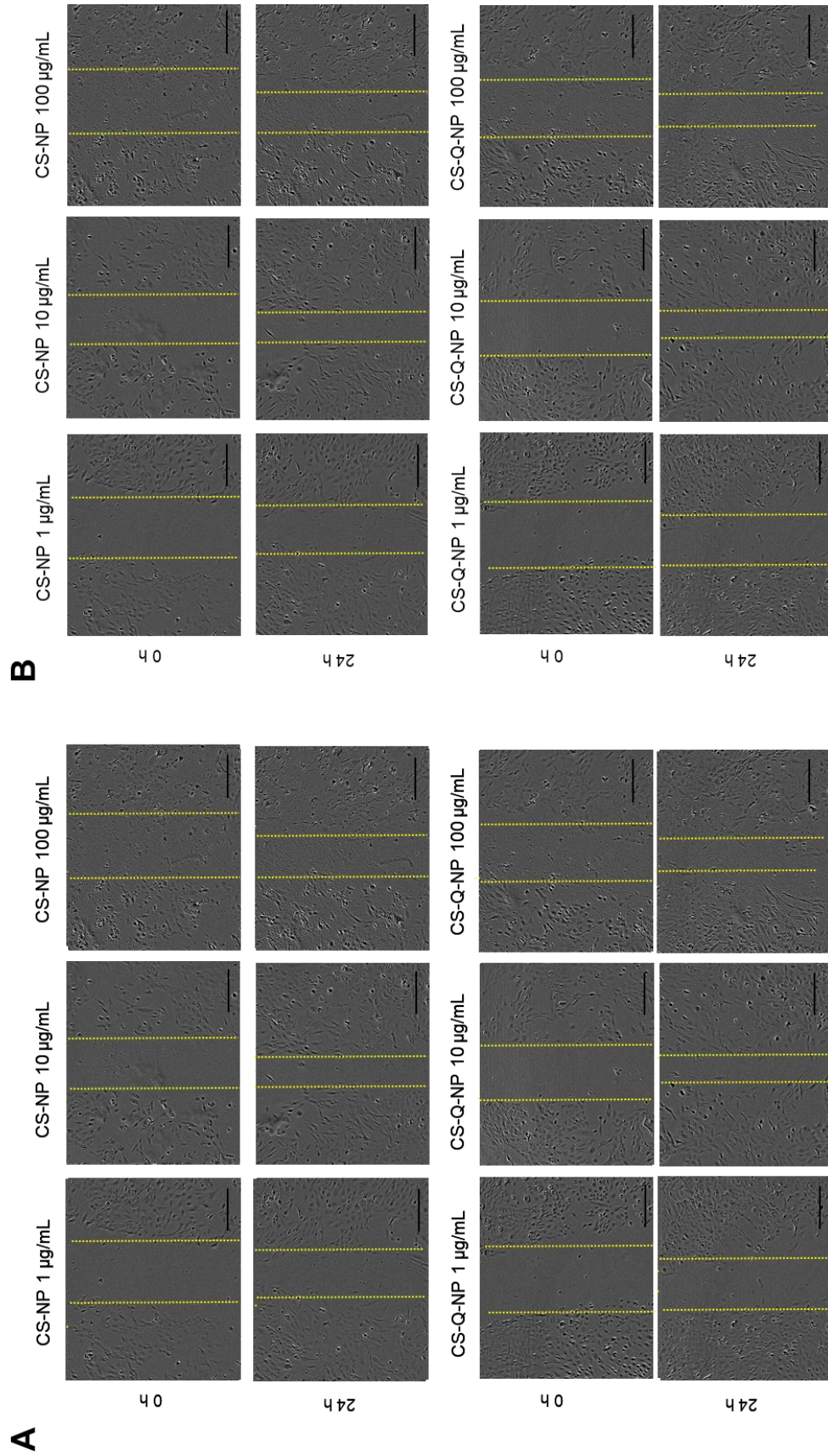


Figura 15. Imágenes de microscopía de contraste de fase del cierre de herida de HMEC-1 incubadas con nanopartículas al tiempo 0 y 24 horas. A: sin medio condicionado. B: con medio condicionado. Control: medio suplementado al 10%; Restricción: medio sin suero; Extra: medio suplementado al 20%; Vehículo: DMSO 1%; Q: quercetina. Barra de escala= 250 μm .

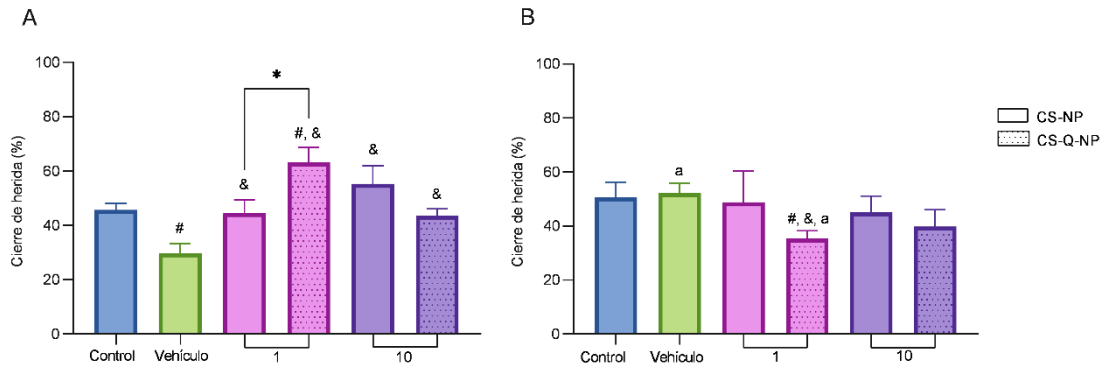


Figura 16. Porcentaje de cierre de herida HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz en medio condicionado de SKOV-3. El porcentaje de cierre se encuentra expresado como la diferencia en el área de la herida a las 24 horas del tratamiento. A. Tratamiento sin medio condicionado. B. Tratamiento con medio condicionado. Control: medio suplementado al 10%; Vehículo: DMSO 1%; #: $p < 0,05$ versus control; &: $p < 0,05$ versus vehículo; *: $p < 0,05$; a: $p < 0,05$ versus condición sin medio condicionado.

Los resultados del ensayo del cierre de herida se encuentran resumidos en la Figura 17 donde se resume la cuantificación de diferencia en confluencia y porcentaje de cierre de herida para las nanopartículas en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con y sin medio condicionado.

Respecto a la diferencia en confluencia (Figura 17A) tenemos que el tratamiento con el vehículo y nanopartículas presentaron un aumento en la confluencia en comparación con el control en las condiciones sin medio condicionado ($\#p<0,05$). Mientras que el tratamiento con medio condicionado aumenta la proliferación de todas las condiciones ($*p<0,05$) a excepción de CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde no se observa diferencia con la condición sin medio condicionado ($p>0,05$).

En relación con el porcentaje de cierre de herida (Figura 17B), podemos ver que la condición con medio condicionado no logra generar un cierre significativo en comparación con las condiciones sin medio condicionado ($p>0,05$). Para el tratamiento con el vehículo se observó una disminución en el cierre de herida en comparación con el control sin medio condicionado, sin embargo, la condición con medio condicionado logra revertir esa disminución. Para CS-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observaron diferencias en el cierre de la herida para las condiciones con y sin medio condicionado, mientras que para CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ podemos observar que en la condición sin medio condicionado existe un aumento en el porcentaje de cierre en comparación con el control y con CS-NP. Pro lo contrario, en la condición con medio condicionado CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ logra disminuir el porcentaje de cierre de herida en comparación con el control ($\#p<0,05$) y el vehículo ($\&p<0,05$).

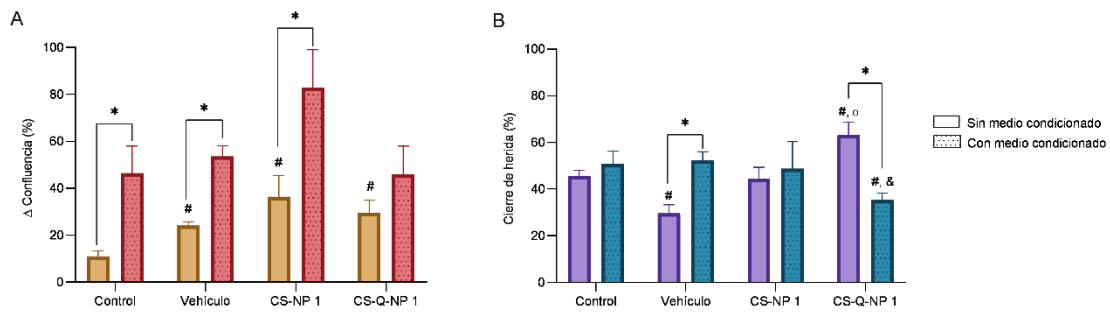


Figura 17. Efecto sobre la proliferación y migración de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz 1 μ g/mL sin cargar (CS-NP) y cargadas con quercetina (CS-Q-NP). A. Diferencia en confluencia. B. Porcentaje de cierre de herida. Control: medio suplementado al 10%; Vehículo: DMSO 1%; #: $p < 0,05$ versus control; &: $p < 0,05$ versus vehículo; ϕ $p < 0,05$ versus CS-NP 1 sin medio condicionado *: $p < 0,05$.

IX. DISCUSIONES

IX.1 Nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

Las nanopartículas tanto sin cargar como cargadas con quercetina presentaron una morfología esférica (Figura 6 A y B), lo cual es semejante con lo reportado previamente en la literatura para este tipo de sistema de generación de nanopartículas (Ruan *et al.*, 2022). La morfología esférica y el tamaño reducido de las nanopartículas está dado por el método utilizado. Las condiciones de sobresaturación limitan el tiempo disponible para el crecimiento de las nanopartículas generando varias nucleaciones simultáneas que resultan en la generación de nanopartículas esféricas y de menor tamaño (en un rango de 100 a 300 nm) (Rivas *et al.*, 2017). En comparación con otros métodos de síntesis de nanopartículas como la emulsificación o la sonicación, el método de nanoprecipitación ultrarrápida es un proceso mucho más simple que genera nanopartículas más uniformes y con mayor reproducibilidad (Lassalle & Ferreira, 2007).

En relación con el tamaño de las nanopartículas, CS-Q-NP presentaron un mayor rango de distribución de tamaño que CS-NP (Figura 6 C y D). Similares resultados reportaron otros trabajos donde se prepararon nanopartículas de almidón cargadas con polifenoles (Wang *et al.*, 2016) y con quercetina (Jiang *et al.*, 2022) por nanoprecipitación. Ruan y colaboradores atribuyeron este aumento a la incorporación de la quercetina en la matriz del almidón, lo que disminuye el

porcentaje de cristalinidad de las nanopartículas y que por lo tanto podría estar provocando una mayor heterogeneidad en la distribución de tamaño de estas nanopartículas (Ruan *et al.*, 2022).

El tamaño nanométrico de estas nanopartículas es una característica favorable para su potencial uso biomédico dado que estas facilitarían la entrega de compuestos bioactivos, como la quercetina, al tejido tumoral mediante ERP (Haley & Frenkel, 2008).

IX.2 Eficiencia de encapsulación

El valor obtenido de la eficiencia de encapsulación para las nanopartículas cargadas con quercetina preparadas mediante el método de nanoprecipitación ultrarrápida se encuentra bajo el rango descrito por Miranda en 2024 y Hasanvand y colaboradores donde prepararon nanopartículas de almidón, con bajo contenido de amilosa, cargadas con vitamina D3 mediante nanoprecipitación por goteo, obteniendo valores en un rango de 3,7 a 5,8% (Hasanvand *et al.*, 2018; Miranda, 2024).

Esto indica que solo una pequeña parte de la quercetina fue encapsulada dentro de las nanopartículas de almidón de maíz. Esto podría deberse a factores como la baja afinidad de la quercetina por el almidón o la rápida difusión del compuesto hacia el antisolvente (etanol) durante el proceso de nanoprecipitación.

Si bien el método de nanoprecipitación ultrarrápida es efectivo para encapsular compuestos hidrofóbicos, en este caso, las condiciones específicas utilizadas

pueden no haber sido las óptimas. La estructura polar del almidón pudo haber interferido con la encapsulación eficiente de la quercetina, ya que este compuesto hidrofóbico podría haberse disuelto preferentemente en el antisolvente, lo que explicaría el bajo porcentaje de encapsulación (Qiu *et al.*, 2016).

Al contrastar estos resultados con los reportados por Miranda en 2024 de una encapsulación de 6,5 % para CS-Q-NP podemos notar que existen diferencias en el método utilizado para la determinación que pudo ser un factor notable en la cuantificación (Miranda, 2024). Miranda realizó la determinación de la eficiencia de encapsulación mediante medición del sobrenadante obtenido de la preparación de las nanopartículas mientras que en este trabajo se realizó mediante la destrucción de las nanopartículas para poder determinar de manera más exacta la quercetina encapsulada. Ciertas consideraciones se deben realizar para el método de sobrenadante el cual presenta ciertas limitaciones que pueden llevar a sobreestimar la quercetina encapsulada. Cualquier pérdida de quercetina en el proceso experimental puede llevar a una subestimación de la quercetina libre en el sobrenadante lo cual aumentaría el valor obtenido de la quercetina encapsulada. Por otro lado, no contempla la quercetina que se encuentra absorbida en la superficie de las nanopartículas y que no se encuentra de esa manera encapsulada generando errores en la medición.

De esta manera con este trabajo se obtuvo un valor de encapsulación mucho más certero que el previamente reportado.

IX.3 Hinchamiento y solubilidad

El poder de hinchamiento e índice de solubilidad de las micropartículas cargadas y sin cargar son indicadores de las interacciones entre las zonas cristalinas y amorfas del almidón (Benavente, 2022).

En relación con los valores de hinchamiento tenemos que existe un aumento en la capacidad de retener agua de las nanopartículas en comparación con el almidón de maíz (Tabla 1), esto podemos relacionarlo a la disminución en la cristalinidad presentada en las nanopartículas las cuales al presentar estructuras más amorfas permiten la entrada de un mayor número de moléculas de agua. CS-NP presentó el mayor valor de hinchamiento en comparación con CS-Q-NP (Tabla 1), esta diferencia significativa puede atribuirse a la presencia e interacción entre la quercetina y el almidón de maíz, ya la primera al ser hidrofóbica reduciría la interacción de la matriz con las moléculas de agua (Chavan *et al.*, 2021).

En cuanto a la solubilidad, también se pudo observar un incremento significativo en los valores de solubilidad de las nanopartículas en comparación con el almidón de maíz (Tabla 1), asociados también a la pérdida de la estructura cristalina la cual permite una mayor interacción con las moléculas de agua y por lo tanto una mayor solubilidad. Si bien CS-NP presentó un valor de solubilidad mayor a CS-Q-NP, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En resumen, el proceso de nanoprecipitación ultrarrápida combinado con la incorporación de la quercetina, interfiere en la estructura cristalina del almidón promoviendo una configuración más amorfa. La disminución de la cristalinidad está relacionada con la pérdida del orden estructural del gránulo, lo que resulta en una estructura desordenada. Este cambio estructural afecta tanto el hinchamiento como la solubilidad, ya que una estructura más amorfa tiende a tener una mayor capacidad para retener agua y disolverse en medios acuosos (Sabando *et al.*, 2022).

IX.4 Liberación de quercetina

El resultado obtenido de liberación de quercetina podría encontrarse relacionado directamente con el bajo porcentaje de encapsulación obtenido. Al no ser incorporada eficazmente en la formulación la mayoría de la quercetina utilizada en la preparación de las nanopartículas se encuentra limitada así la cantidad de quercetina disponible para ser liberada desde el inicio.

Por otro lado, la preparación de las muestras antes del análisis por HPLC-DAD pudo ser crucial, ya que, errores las condiciones de almacenamiento o preparación de la muestra podrían hacer que la pequeña cantidad liberada de quercetina por las nanopartículas no llegara correctamente al sistema HPLC para su análisis.

La quercetina es sensible a la luz ultravioleta (UV) y la luz visible, lo que provoca su degradación fotolítica a lo largo del tiempo. A su vez esta es susceptible a la oxidación en presencia de oxígeno por lo que, con el tiempo, la exposición al

aire puede llevar a la autooxidación de la quercetina, especialmente en soluciones acuosas reduciendo su concentración (Wang *et al.*, 2016).

IX.5 Actividad antioxidante

La ausencia de actividad antioxidante en CS-NP en comparación con la de CS-Q-NP (3,27%), sugiere que la capacidad antioxidante observada se encuentra directamente relacionada con la presencia de quercetina en las nanopartículas.

La ausencia total de actividad antioxidante en CS-NP es razonable, ya que el almidón en su conjunto, así como las cadenas de amilosa y amilopectina, no poseen propiedades antioxidantes descritas (Menzel *et al.*, 2019). Sin poder contribuir así a la neutralización de radicales libres en este ensayo.

Por otro lado, el que CS-Q-NP haya presentado un 3,27% de actividad antioxidante confirma la presencia de quercetina en la muestra que fue detectada por HPLC, sin embargo, su capacidad antioxidante es muy limitada. Este valor podría estar relacionado con varios factores como: el bajo porcentaje de encapsulación de quercetina en las nanopartículas, la limitada liberación de esta y la posibilidad de una fuerte interacción con la matriz de almidón junto con una baja solubilidad en agua la cual limitaría su interacción con los radicales libres (Wang *et al.*, 2016).

En comparación con sistemas que presentan una alta actividad antioxidante (generalmente con un valor mayor al 50% de actividad ABTS) como las

nanopartículas de almidón de papa y arveja cargadas con quercetina reportadas por Farrag y colaboradores (Farrag *et al.*, 2018) o las de almidón de plátano cargadas con quercetina (Kumar & Sharma, 2023), el valor del 3,27% es considerablemente bajo, lo que indica que CS-Q-NP no presentan una alta capacidad antioxidante.

IX.6 Viabilidad celular de SKOV-3 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

En los ensayos de proliferación y viabilidad celular se utilizó el DMSO como vehículo para la quercetina, sin embargo, éste puede presentar efectos secundarios sobre la viabilidad celular especialmente a concentraciones superiores al 0,5% (Dludla *et al.*, 2018). En la Figura 7 se aprecia que en la condición con el vehículo se observó una disminución en la confluencia en el tiempo en comparación con el control. Esto puede estar dado por los efectos prooxidantes del DMSO como son la disfunción mitocondrial, inhibición de enzimas antioxidantes (como la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa), disminución de los niveles de glutatión, peroxidación lipídica y activación de vías celulares como la vía del factor nuclear kappa B y la vía de señalización JNK/p38 MAPK involucradas en los procesos inflamatorios y apoptóticos en respuesta al estrés oxidativo (Galvao *et al.*, 2014; Dludla *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2014). Si bien estos procesos se han descrito en su mayoría a concentraciones superiores al 1% v/v el tipo de célula en estudio puede generar variaciones en estos resultados. Es importante considerar que las células SKOV-3 al ser cancerígenas ya se encuentran en un estado metabólicamente alterado y con niveles de estrés oxidativo aumentado como resultado de una mayor

producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por las siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) y/o una capacidad comprometida de eliminación de ROS, pudiendo ser más vulnerables a estos efectos prooxidantes (An *et al.*, 2024).

Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la confluencia de las células SKOV-3 en comparación con el control en las concentraciones de tratamiento con quercetina desde 2,5 nM a 25 μ M (Figura 7). Esto lo podemos asociar a la capacidad antioxidante de la quercetina que se presenta en bajas concentraciones, activando la regulación de la expresión de enzimas antioxidantes y protegiendo a las células del daño oxidativo lo cual se ha reportado ocurre en concentraciones cercanas a los 10 μ M (Nishimura *et al.*, 2017). Por otro lado, a la concentración de 250 μ M se observó una disminución significativa de la confluencia a las 24 horas en comparación con el control y demás concentraciones de quercetina. Estudios previos reportan cambios en la proliferación a las 24 horas de tratamiento con quercetina a una concentración de 100 μ M (Ren *et al.*, 2015). A concentraciones desde los 100 μ M la quercetina presenta actividad antiapoptótica mediante la activación de caspasas, la regulación de genes proapoptóticos, y la inhibición de vías de señalización de supervivencia como la vía PI3K/Akt teniendo un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular (Ramachandran *et al.*, 2022; Ren *et al.*, 2015).

Los resultados de viabilidad celular indican que las células tratadas con nanopartículas dispersadas en medio (Figura 8A) y previamente suspendidas en DMSO (Figura 8B) no generan una disminución significativa en la viabilidad celular

en todas las concentraciones utilizadas, lo que sugiere que estas nanopartículas son biocompatibles y no inducen toxicidad por sí mismas en las células SKOV-3.

Al utilizar DMSO 1% como vehículo para las nanopartículas se observó una disminución en la viabilidad celular en comparación con el control, esto podemos asociarlo con los valores de proliferación obtenidos (Figura 8) donde el DMSO ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación celular de SKOV-3 ejerciendo un efecto proapoptótico y oxidativo (Galvao *et al.*, 2014; Dlodla *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2014). Sin embargo, en las condiciones con nanopartículas a distintas concentraciones ya sea cargadas o sin cargar con quercetina vemos un efecto compensatorio sobre los efectos del DMSO mejorando los niveles de viabilidad celular siendo comparables con el control (Figura 8B). Este efecto es incluso mayor en CS-Q-NP 100 µg/mL donde se determinó un aumento en la viabilidad celular en comparación con el control, lo que se asocia a la cantidad de quercetina que es entregada por las nanopartículas en donde las células incubadas con CS-Q-NP a concentraciones de 100, 10 y 1 µg/mL reciben teóricamente 52,9, 5,29 y 0,529 nM de quercetina respectivamente. Es así como la quercetina en estas bajas concentraciones podría estar ejerciendo un efecto antioxidante (Jana *et al.*, 2018) que sería compensatorio al efecto prooxidante que genera el DMSO.

Sin embargo, existen limitaciones en la realización de estos experimentos y que afectan por consiguiente los demás procedimientos y resultados obtenidos. Debemos considerar que al suspender previamente las nanopartículas en el vehículo este pudo tener efectos sobre la estructura de la nanopartícula. El DMSO es un mejor solvente que el agua para el almidón, por lo que generaremos un

hinchamiento inmediato de la nanopartícula pudiendo incluso disolverla completamente, generando así cambios en las estructuras cristalinas y amorfas promoviendo un estado más amorfo (Dintzis & Tobin, 1974). Al afectar su cristalinidad también se verá afectada su capacidad de encapsulación y retención de compuestos bioactivos (Han & Lim, 2004), como la quercetina, la cual al ser más soluble en el DMSO también se solubilizará rápidamente en éste liberando la formulación de la nanopartícula (Qiu *et al.*, 2016) y por lo tanto eliminando su efecto como potencial vehículo de entrega.

Es quizás por esta razón que se observó una mayor viabilidad en el tratamiento con CS-Q-NP 100 µg/mL previamente dispersadas en DMSO, ya que al entregar una mayor concentración de nanopartículas estaríamos proporcionando una mayor cantidad de quercetina al medio para su utilización por parte de las células.

IX.7 Viabilidad celular de HMEC-1 incubadas con nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina

Al estudiar el efecto de la quercetina sobre la proliferación de las células HMEC-1 podemos evidenciar que altas concentraciones como 250 µM resultan en una notable disminución de la confluencia en el tiempo en comparación con el control (Figura 9), sugiriendo así un efecto citotóxico de la quercetina (Ren *et al.*, 2015). Por otro lado, para los tratamientos con quercetina a concentraciones menores (desde 2,5 nM hasta 25 µM) se mantuvo la confluencia en comparación con el control e incluso presentaron ligeros aumentos en algunos casos, sin

embargo, estos no fueron significativos. Estos resultados sugieren que a concentraciones elevadas la quercetina induce mecanismos proapoptóticos y citostáticos, lo que se condice con sus propiedades antioxidantes en altas dosis (Kim *et al.*, 2010; Xintaropoulou *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2018). Estos resultados son relevantes ya que, al dirigirlos a aplicaciones terapéuticas como la inhibición de la angiogénesis en un contexto tumoral, es necesario alcanzar concentraciones previamente descritas de al menos 100 μM (Ramachandran *et al.*, 2022; Ren *et al.*, 2015) para evitar la proliferación de las células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos que contribuyan a la progresión del proceso tumoral.

Al evaluar la viabilidad de las células HMEC-1 incubadas con nanopartículas a las 24 horas de tratamiento (Figura 10) tenemos que las nanopartículas en las concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ tanto cargadas como sin cargar no presentan un efecto citotóxico sobre las células siendo así biocompatibles para la entrega de compuestos bioactivos la quercetina. Esto es especialmente relevante para la condición de nanopartículas que fueron dispersadas en el medio de cultivo (Figura 10A) ya que no se genera una alteración en la estructura y capacidad de encapsulación y entrega de la nanopartícula. Diferente es el caso de la Figura 10B donde las nanopartículas al ser previamente suspendidas en DMSO pierden sus propiedades como vehículo de entrega de quercetina. Es por esto por lo que nuevamente podemos observar que en las condiciones de CS-Q-NP de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ existe un aumento en la viabilidad celular en comparación con el control. Asociando estos resultados con una mayor presencia de quercetina en ambas

condiciones al presentar una mayor cantidad de nanopartículas inicialmente en la suspensión.

IX.8 Ensayo cierre de herida

Inicialmente se evaluó la diferencia de porcentaje de confluencia a las 24 horas de células HMEC-1 que fueron incubadas con distintas condiciones en presencia o ausencia de medio condicionado proveniente de células SKOV-3 (Figura 11). En general se determinó que las células incubadas en presencia de medio condicionado presentan un aumento en la confluencia en comparación con las células sin medio condicionado. Esto sugiere que en el medio condicionado proveniente de las células SKOV-3 existen factores solubles capaces de estimular la proliferación de las células HMEC-1. De acuerdo con lo descrito en la literatura estos factores podrían ser VEGF (Hu *et al.*, 2020), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (Di Blasio *et al.*, 1995), NF- κ B, IL-8 y TNF α (Yang *et al.*, 2018) los cuales promueven la proliferación y migración de células endoteliales.

Específicamente en la condición de restricción de suero (restricción 0%) es posible notar que al encontrarse privadas las células de suero, los factores presentes en el medio condicionado son capaces de compensar parcialmente la falta de nutrientes, favoreciendo la proliferación celular. Mientras que en la condición con suplementación extra de suero igualmente se observó un aumento en la confluencia el cual es más marcado debido a que el medio extra ya proporciona de por sí un mayor soporte para la proliferación celular en condiciones

proangiogénicas. A su vez el tratamiento con DMSO si bien se describió anteriormente que podría tener un efecto perjudicial para las células SKOV-3 eso no se encuentra presente en las células HMEC-1 donde en experimentos previos de proliferación y viabilidad celular no presentó efectos negativos sobre estos parámetros. De esta forma, al encontrarse expuesto a medio condicionado igual que en los demás tratamientos se observó un aumento en la confluencia.

Finalmente, para los tratamientos con quercetina en bajas concentraciones de 12,5 y 25 nM no se observan diferencias significativas entre condiciones con y sin medio condicionado. Esto podría estar relacionado con la capacidad antiangiogénica que se ha reportado de la quercetina, sin embargo, no se han reportado valores menores a 10 μ M que logren inhibir la proliferación y migración de células endoteliales expuestas a concentraciones de 100 ng/mL de VEGF (Li *et al.*, 2015). Por lo tanto, se sugiere en futuros ensayos realizar una medición de factores proangiogénicos en el medio obtenido de las células SKOV-3, como VEGF, por ejemplo. Ya que no podemos atribuir a qué factores y en qué concentración estuvieron expuestas las células endoteliales al momento de realizar los ensayos y por tanto si el efecto que observamos en las condiciones tratadas con quercetina se encuentra relacionado con una disminución de estos.

Al incubar las células endoteliales con nanopartículas (Figura 12) podemos ver que en ausencia de factores externos de crecimiento (sin medio condicionado), las nanopartículas de almidón de maíz tanto cargadas como sin cargar con quercetina mejoran la proliferación de las células HMEC-1, especialmente a concentraciones más altas para CS-Q-NP (10 μ g/mL). Esto podríamos relacionarlo con los efectos

antioxidantes de la quercetina, que facilitan la proliferación endotelial (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019). Por otro lado, al someter a las células a la condición de medio condicionado junto con los demás tratamientos podemos identificar claramente que existe un aumento en la proliferación en las condiciones control, vehículo y CS-NP 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto asociado a los efectos proangiogénicos presentes en el medio de cultivo de las células SKOV-3 (Hu *et al.*, 2020; Di Blasio *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2018). Sin embargo, es posible notar que en ambas condiciones con CS-Q-NP no se observó una diferencia significativa en la proliferación de las células endoteliales en comparación con su equivalente sin medio condicionado. Es lo más probable que esto se deba a la presencia de quercetina en la muestra la cual como podemos observar presenta un efecto antiangiogénico según lo descrito en la literatura (Jana *et al.*, 2018; Pratheeshkumar *et al.*, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2016).

Finalmente, es importante destacar que si bien pareciera existir un potencial efecto inhibitorio sobre la proliferación de HMEC-1 por parte de las CS-Q-NP en ambas concentraciones evaluadas, debemos recordar que experimentalmente se dispersó previamente las nanopartículas en DMSO para ser agregadas al medio de cultivo. Es por esto por lo que no podemos asociar este efecto a la formulación de las nanopartículas, ya que como se describió con anterioridad al encontrarse dispersadas en DMSO este promueve su solubilización y pérdida de estructura inhibiendo así su efecto como vehículo para la quercetina.

El ensayo de cierre de herida se utilizó para evaluar la migración celular. En las condiciones con diferentes tratamientos en ausencia y presencia de medio

condicionado (Figura 13 y 18) se pudo observar una tendencia al aumento en la migración de HMEC-1 en la condición control con medio condicionado en comparación con la de sin medio condicionado, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en un caso u otro. Esto no se condice con lo reportado por otros autores donde se han utilizado medio condicionado proveniente de otras líneas celulares donde en la condición con el medio condicionado presenta un aumento significativo en comparación con el control (Zhang *et al.*, 2020; Noh *et al.*, 2023). Lo mismo ocurre para la condición de restricción de suero (0%) donde no se ven cambios en la migración de las células endoteliales entre tratamientos con y sin medio condicionado. Demostrando así que si bien la confluencia de las células aumenta al estar expuestas al medio condicionado, la señalización no es suficiente para promover la migración de éstas.

Por otro lado, tanto en la condición con extra de suero (20%) como en la con vehículo podemos observar que existe un aumento significativo en la migración de HMEC-1 al estar expuestas al medio condicionado en comparación con la condición sin medio. Por lo que en estas condiciones los factores adicionales presentes en el medio condicionado potencian el efecto migratorio, incluso cuando el medio ya está altamente suplementado. Mientras que en las condiciones con quercetina tanto 12,5 y 25 μM no se observaron cambios significativos en el cierre de herida entre tratamientos con y sin medio condicionado. Es con estos resultados que podemos reportar que estas concentraciones inhiben tanto la proliferación y migración de HMEC-1 inducida por medio condicionado proveniente de SKOV-3.

El ensayo de cierre de herida para las células endoteliales incubadas con nanopartículas se evaluó en ausencia y presencia de medio condicionado. En la condición sin medio condicionado (Figura 16A) se determinó que las nanopartículas sin cargar y cargadas con quercetina en las concentraciones utilizadas aumentan el cierre de la herida en comparación con el vehículo y este aumento es estadísticamente significativo para CS-Q-NP 1 µg/mL en comparación con el control. Al encontrarnos en ausencia de factores externos que promuevan la migración y proliferación de las células endoteliales podríamos asociar el efecto migratorio a la presencia de quercetina en las nanopartículas, sin embargo, no es un efecto que observa en CS-Q-NP 10 µg/mL las cuales al estar en una mayor concentración deberían entregar una mayor cantidad de quercetina al medio.

Por otro lado, en el tratamiento con medio condicionado observamos que para las condiciones con CS-NP 1 µg/mL, CS-NP 10 µg/mL y CS-Q-NP 10 µg/mL no se observan cambios en el cierre de la herida en comparación con el tratamiento sin medio condicionado, presentando así un efecto que no es inhibitorio, pero tampoco proliferativo. Sin embargo, CS-Q-NP 1 µg/mL presentó una disminución significativa del cierre de herida en comparación con el control, vehículo y CS-Q-NP 1 µg/mL sin medio condicionado. Entonces, CS-Q-NP 1 µg/mL tiene un efecto inhibitorio sobre la migración de HMEC-1 expuestas a medio condicionado de SKOV-3.

Para resumir, de acuerdo con lo que se indica en la Figura 17 en el tratamiento con CS-NP 1 µg/mL se observa que sin medio condicionado la proliferación celular aumenta en comparación con el control mientras que con medio condicionado esta aumenta aún más dada la presencia de factores proangiogénicos presentes en el

medio. Sin embargo, el cierre de herida en presencia de CS-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no es mayor que el control en ausencia o presencia de medio condicionado, por lo que podemos deducir que existe una respuesta proliferativa en esta condición que no es funcional al proceso angiogénico ya que también es requerida la migración celular. Para CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ también observamos un aumento en la proliferación en comparación con el control sin medio condicionado, pero al tratarse con medio condicionado este no presenta un aumento significativo, por lo que se podría inferir que es la presencia de quercetina en la muestra que limita el proceso proliferativo. Finalmente, en el ensayo de cierre de herida para CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se pudo constatar que en ausencia de medio condicionado existe un aumento en el cierre de herida en comparación con el control, mientras que al encontrarse en presencia de medio condicionado exhibe el efecto contrario inhibiendo la migración de las células endoteliales en comparación con el control. Así, se observa una inhibición funcional de la proliferación y migración de HMEC-1 expuestas a medio condicionado de SKOV-3.

Con estos resultados surgen un gran número de interrogantes, como, por ejemplo: ¿Cómo es posible que las nanopartículas cargadas y sin cargar en la condición sin medio condicionado mejoran la proliferación y migración de HMEC-1?, ¿Por qué CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta este efecto antiangiogénico y no CS-Q-NP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo que esta condición presenta un mayor número de nanopartículas y por tanto un mayor contenido de quercetina?

Para responder ambas preguntas debemos considerar que las nanopartículas fueron previamente dispersadas en DMSO, lo que promueve la pérdida de su

estructura y solubilidad. De esta manera a lo que realmente fueron expuestas las células en las distintas condiciones con nanopartículas es una combinación de moléculas de amilosa y amilopectina en conjunto con quercetina para las nanopartículas cargadas. En relación con el aumento de la proliferación celular en las condiciones con nanopartículas sin medio condicionado podemos asociar este aumento con el mismo incremento en la condición de vehículo, ya que las nanopartículas se encontraban previamente dispersadas en este. Para CS-Q-NP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ este aumento es mucho mayor que en las demás condiciones, lo cual podría estar asociado a la quercetina contenida en la solución la cual será teóricamente mayor que en la condición CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este ambiente libre de factores externos proangiogénicos la quercetina en bajas concentraciones podría estar cumpliendo un rol antioxidante en las células favoreciendo su proliferación (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019).

El que CS-Q-NP 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ haya presentado un mayor efecto antiangiogénico que CS-Q-NP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sigue siendo una interrogante ya que esto no se condice con lo reportado por otros investigadores donde, concentraciones crecientes de las nanopartículas utilizadas presentaron un mayor efecto antiangiogénico (Song *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2009).

Con toda esta información es importante reconocer entonces las limitantes de este trabajo. Para poder obtener resultados más claros sería de utilidad repetir los experimentos de proliferación y migración con nanopartículas que no hayan sido dispersadas previamente en DMSO para evitar la alteración sobre el efecto que estas tienen como vehículo de quercetina. También es de importancia notar que

sería relevante analizar los componentes del medio condicionado para poder comprender de mejor manera los mecanismos involucrados que promueven la proliferación y migración de las células endoteliales expuestas a estas condiciones y cómo los distintos tratamientos podrían jugar un rol importante al inhibir estos procesos. Finalmente sería de interés poder determinar la concentración de quercetina liberada por las nanopartículas en el medio de cultivo para poder determinar realmente las concentraciones en las que estaría actuando sobre las células y el efecto que podría tener en ellas con relación a la proliferación y migración.

X. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el efecto de nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina sobre la proliferación y migración de células endoteliales inducidas por medio condicionado de adenocarcinoma ovárico.

Las nanopartículas fueron preparadas por nanoprecipitación ultrarrápida el cual demostró ser un método efectivo para la obtención de nanopartículas esféricas y de tamaño nanométrico en las cuales se pudo encapsular quercetina. Estas nanopartículas presentaron una eficiencia de encapsulación limitada la cual va acompañada de valores de liberación y actividad antioxidante bajos.

Los ensayos realizados en células SKOV-3 y HMEC-1 demostraron que las nanopartículas en las concentraciones utilizadas no afectan la viabilidad celular tanto en las condiciones con nanopartículas dispersadas en medio de cultivo y las dispersadas en DMSO. En el ensayo de la herida se pudo determinar que las nanopartículas cargadas con quercetina en la concentración de 1µg/mL logran inhibir la proliferación y migración de HMEC-1 inducidas por medio condicionado de SKOV-3. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes.

En relación con las limitaciones presentes en este estudio se debe considerar que la dispersión previa de las nanopartículas en DMSO generó cambios en su estructura lo que afecta directamente la habilidad de estas para entregar compuestos bioactivos como la quercetina. Por otro lado, se vuelve necesario para futuros estudios la caracterización del medio condicionado obtenido por parte de las

células SKOV-3 de manera de tener el conocimiento de su composición y cómo este puede modular distintas respuestas en el contexto angiogénico.

En conclusión, las nanopartículas de almidón de maíz cargadas con quercetina preparadas por nanoprecipitación ultrarrápida constituyen una estrategia prometedora en terapias celulares como vehículo de compuestos activos como la quercetina debido a la biocompatibilidad y potencial efecto antiangiogénico que estas presentan.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abdelaziz, H. M., Gaber, M., Abd-Elwakil, M. M., Mabrouk, M. T., Elgohary, M. M., Kamel, N. M., ... & Elzoghby, A. O. (2018). Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *Journal of Controlled Release*, 269, 374-392.

Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(6), 464-478.

Adair, T. H., & Montani, J. P. (2010). Chapter 1, Overview of Angiogenesis. *Angiogenesis*. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences.

Ahmed, N., & Stenvers, K. L. (2013). Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in oncology*, 3, 256.

American Cancer Society. Cancer Statistics Center. Available at: <http://cancerstatisticscenter.cancer.org>. Accessed February 6, 2023.

An, X., Yu, W., Liu, J., Tang, D., Yang, L., & Chen, X. (2024). Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death & Disease*, 15(8), 556.

Arora, T., Mullangi, S., & Lekkala, M. R. (2022). Ovarian Cancer. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.

Aslan, B., Ozpolat, B., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2013). Nanotechnology in cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*, 21(10), 904–913.

Asprițoiu, V. M., Stoica, I., Bleotu, C., & Diaconu, C. C. (2021). Epigenetic regulation of angiogenesis in development and tumors progression: Potential implications for cancer treatment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 689962.

Balakrishnan, S., Bhat, F. A., Raja Singh, P., Mukherjee, S., Elumalai, P., Das, S., ... & Arunakaran, J. (2016). Gold nanoparticle–conjugated quercetin inhibits epithelial–mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. *Cell proliferation*, 49(6), 678-697.

Benavente, N. (2022). Determinación del efecto de micropartículas de almidón con forma de rosquilla cargadas con ácido gálico sobre la función endotelial. Tesis presentada para optar al título profesional de Bioquímico, Universidad de Concepción, Chile, 80 pp.

Bhojar, V. T., Belgamwar, V. S., & Trivedi, S. S. (2022). Method of starch acetylation and use of acetylated starch as polymer in pharmaceutical formulations. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(11), 5337-5343.

Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International journal of biological macromolecules*, 23(2), 85-112.

Caldonazo, A., Almeida, S. L., Bonetti, A. F., Lazo, R. E. L., Mengarda, M., & Murakami, F. S. (2021). Pharmaceutical applications of starch nanoparticles: A scoping review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 697-704.

Castaño, J., Rodríguez-Llamazares, S., Contreras, K., Carrasco, C., Pozo, C., Bouza, R., ... & Giraldo, D. (2014). Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) starch: basic physico-chemical characteristics and use as thermoplastic material. *Carbohydrate polymers*, 112, 677-685.

Chakraborty, R., Kalita, P., & Sen, S. (2019). Natural Starch in Biomedical and Food Industry: Perception and Overview. *Current drug discovery technologies*, 16(4), 355–367.

Chavan, P., Sinhmar, A., Nehra, M., Thory, R., Pathera, A. K., Sundarraj, A. A., & Nain, V. (2021). Impact on various properties of native starch after synthesis of starch nanoparticles: A review. *Food Chemistry*, 364, 130416.

Christensen, K. Y., Naidu, A., Parent, M. É., Pintos, J., Abrahamowicz, M., Siemiatycki, J., & Koushik, A. (2012). The risk of lung cancer related to dietary intake of flavonoids. *Nutrition and cancer*, 64(7), 964-974.

De la Torre, P., Pérez-Lorenzo, M. J., Alcázar-Garrido, Á., & Flores, A. I. (2020). Cell-based nanoparticles delivery systems for targeted cancer therapy: Lessons from anti-angiogenesis treatments. *Molecules*, 25(3), 715.

Di Blasio, A. M., Carniti, C., Vigano, P., & Vignali, M. (1995). Basic fibroblast growth factor and ovarian cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1-6), 375-379.

Di Santo, S., Fuchs, A. L., Periasamy, R., Seiler, S., & Widmer, H. R. (2016). The cytoprotective effects of human endothelial progenitor cell-conditioned medium against an ischemic insult are not dependent on VEGF and IL-8. *Cell transplantation*, 25(4), 735-747.

Ding, Y., Lin, Q., & Kan, J. (2018). Development and characteristics nanoscale retrograded starch as an encapsulating agent for colon-specific drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 656-667.

Dintzis, F. R., & Tobin, R. (1974). Molecular-sieve chromatography of amylose and dextran over porous glass. *Journal of Chromatography A*, 88(1), 77-85.

Dludla, P. V., Jack, B., Viraragavan, A., Pheiffer, C., Johnson, R., Louw, J., & Muller, C. J. (2018). A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicology Reports*, 5, 1014-1020.

Dong, H., Zhang, Q., Gao, J., Chen, L., & Vasanthan, T. (2021). Comparison of morphology and rheology of starch nanoparticles prepared from pulse and cereal starches by rapid antisolvent nanoprecipitation. *Food Hydrocolloids*, 119, 106828.

Dong, H., Zhang, Q., Gao, J., Chen, L., & Vasanthan, T. (2022). Preparation and characterization of nanoparticles from field pea starch by batch versus continuous nanoprecipitation techniques. *Food Hydrocolloids*, 122, 107098.

Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., & Myers, A. E. (2016). Diagnosis and management of ovarian cancer. *American family physician*, 93(11), 937-944.

Dowling, P., & Clynes, M. (2011). Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*, 11(4), 794-804.

Farrag, Y., Ide, W., Montero, B., Rico, M., Rodríguez-Llamazares, S., Barral, L., & Bouza, R. (2018). Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique. *International journal of biological macromolecules*, 114, 426-433.

Farrag, Y., Sabando, C., Rodríguez-Llamazares, S., Bouza, R., Rojas, C., & Barral, L. (2018). Preparation of donut-shaped starch microparticles by aqueous-alcoholic treatment. *Food chemistry*, 246, 1-5.

Ferrara, N., & Alitalo, K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* 5, 1359–1364.

Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchen, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 28(3), 1317-1330.

Ghosh, S. K. (2006). Functional coatings and microencapsulation: a general perspective. *Functional Coatings: by polymer microencapsulation*, 1-28.

Han, J. A., & Lim, S. T. (2004). Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI system. *Carbohydrate Polymers*, 55(3), 265-272.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Hasan, N., Ohman, A. W., & Dinulescu, D. M. (2015). The promise and challenge of ovarian cancer models. *Translational cancer research*, 4(1), 14.

Hasanvand, E., Fathi, M., & Bassiri, A. (2018). Production and characterization of vitamin D 3 loaded starch nanoparticles: effect of amylose to amylopectin ratio and sonication parameters. *Journal of food science and technology*, 55, 1314-1324.

Hu, H., Zhu, S., Tong, Y., Huang, G., Tan, B., & Yang, L. (2020). Antitumor activity of triptolide in SKOV3 cells and SKOV3/DDP in vivo and in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 31(5), 483-491.

Hui, C., Qi, X., Qianyong, Z., Xiaoli, P., Jundong, Z., & Mantian, M. (2013). Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PloS one*, 8(1), e54318.

Ion, D., Niculescu, A. G., Păduraru, D. N., Andronic, O., Mușat, F., Grumezescu, A. M., & Bolocan, A. (2021). An Up-to-Date Review of Natural Nanoparticles for Cancer Management. *Pharmaceutics*, 14(1), 18.

Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 496(2), 173-190.

Jana, N., Břetislav, G., Pavel, S., & Pavla, U. (2018). Potential of the flavonoid quercetin to prevent and treat cancer-current status of research. *Klinicka onkologie: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*, 31(3), 184-190.

Jia, L., Huang, S., Yin, X., Zan, Y., Guo, Y., & Han, L. (2018). Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction. *Life sciences*, 208, 123-130.

Jiang, F., Du, C., Zhao, N., Jiang, W., Yu, X., & Du, S. K. (2022). Preparation and characterization of quinoa starch nanoparticles as quercetin carriers. *Food Chemistry*, 369, 130895.

Jin H, Pi J, Yang F, Wu C, Cheng X, Bai H, Huang D, Jiang J, Cai J, Chen ZW. (2016). Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potent anti-angiogenesis in tumor. *Applied microbiology and biotechnology* 100(15):6643-6652.

Khan, H., Ullah, H., Martorell, M., Valdes, S. E., Belwal, T., Tejada, S., ... & Kamal, M. A. (2021, February). Flavonoids nanoparticles in cancer: Treatment, prevention and clinical prospects. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 69, pp. 200-211). Academic Press.

Kim, H. J., Kim, S. K., Kim, B. S., Lee, S. H., Park, Y. S., Park, B. K., ... & Jung, J. Y. (2010). Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8643-8650.

Kroeger Jr, P. T., & Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 29(1), 26.

Kumar, D., & Sharma, P. K. (2023). Wound Healing, Anti-inflammatory and Antioxidant Potential of Quercetin Loaded Banana Starch Nanoparticles. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 22(4), 230-235.

Li, F., Bai, Y., Zhao, M., Huang, L., Li, S., Li, X., & Chen, Y. (2015). Quercetin inhibits vascular endothelial growth factor-induced choroidal and retinal angiogenesis in vitro. *Ophthalmic research*, 53(3), 109-116.

Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *The Lancet*, 393(10177), 1240-1253.

Lei, C. S., Hou, Y. C., Pai, M. H., Lin, M. T., & Yeh, S. L. (2018). Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: in vitro and in vivo studies. *The Journal of nutritional biochemistry*, 51, 105-113.

Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 65(3), 259-269.

Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y., & Wang, M. (2018). Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules*, 24(1), 51.

Long, Q., Xie, Y., Huang, Y., Wu, Q., Zhang, H., Xiong, S., ... & Gong, C. (2013). Induction of apoptosis and inhibition of angiogenesis by PEGylated liposomal quercetin in both cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant ovarian cancers. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(6), 965-975.

Majzoobi, M., & Farahnaky, A. (2021). Granular cold-water swelling starch; properties, preparation and applications, a review. *Food hydrocolloids*, 111, 106393.

Makhoul, G., Jurakhan, R., Jaiswal, P. K., Ridwan, K., Li, L., Selvasandran, K., ... & Cecere, R. (2016). Conditioned medium of H9c2 triggers VEGF dependent angiogenesis by activation of p38/pSTAT3 pathways in placenta derived stem cells for cardiac repair. *Life sciences*, 153, 213-221.

Menzel, C., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Vilaplana, F. (2019). Antioxidant starch films containing sunflower hull extracts. *Carbohydrate Polymers*, 214, 142-151.

Miranda, B. (2024). Nanopartículas de almidón obtenidas por precipitación ultrarrápida como vehículo de compuestos fenólicos. Tesis para optar al título profesional de Químico Analista. Universidad de Concepción.

Natanzon, Y., Goode, E. L., & Cunningham, J. M. (2018, August). Epigenetics in ovarian cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 51, pp. 160-169). Academic Press.

Nishimura, K., Matsumoto, R., Yonezawa, Y., & Nakagawa, H. (2017). Effect of quercetin on cell protection via erythropoietin and cell injury of HepG2 cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 636, 11-16.

Noh, C. H., Park, S., Seong, H. R., Lee, A. Y., Tsolmon, K. E., Geum, D., ... & Kim, Y. B. (2023). An Exosome-Rich Conditioned Medium from Human Amniotic Membrane Stem Cells Facilitates Wound Healing via Increased Reepithelization, Collagen Synthesis, and Angiogenesis. *Cells*, 12(23), 2698.

Owens, F. (2005). Corn grain processing and digestion. Pioneer Hi-Bred International, Johnston, IA.

Pozo, C., Rodríguez-Llamazares, S., Bouza, R., Barral, L., Castaño, J., Müller, N., & Restrepo, I. (2018). Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. *Journal of Polymer Research*, 25, 1-8.

Prasad, S., Kalra, N., & Shukla, Y. (2006). Modulatory effects of diallyl sulfide against testosterone-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian journal of andrology*, 8(6), 719-723.

Prasad, S., Kalra, N., Srivastava, S., & Shukla, Y. (2008). Regulation of oxidative stress-mediated apoptosis by diallyl sulfide in DMBA-exposed Swiss mice. *Human & experimental toxicology*, 27(1), 55-63.

Prasad, S., Yadav, V. R., Kannappan, R., & Aggarwal, B. B. (2011). Ursolic acid, a pentacyclin triterpene, potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors: evidence for the role of reactive oxygen species and JNK. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5546-5557.

Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y. O., Wang, X., Zhang, Z., Ding, S., ... & Shi, X. (2012). Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways.

PromoCell (2023) Endothelial Cells (Large Vessels) Instruction Manual. promocell.com. Available at: <https://promocell.com/wp-content/uploads/product-information/manual/C-12271.pdf>. Revisado por última vez el 22 de Mayo del 2023.

Qi, X., Gao, C., Yin, C., Fan, J., Wu, X., Di, G., ... & Guo, C. (2022). Development of quercetin-loaded PVCL–PVA–PEG micelles and application in inhibiting tumor angiogenesis through the PI3K/Akt/VEGF pathway. *Toxicology and applied pharmacology*, 437, 115889.

Qiu, C., Qin, Y., Zhang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). A comparative study of size-controlled worm-like amylopectin nanoparticles and spherical amylose nanoparticles: Their characteristics and the adsorption properties of polyphenols. *Food chemistry*, 213, 579-587.

Ramachandran, B., Jeyarajpandian, C., Jeyaseelan, J. M., Prabhu, D., Rajamanikandan, S., Boomi, P., ... & Jeyakanthan, J. (2022). Quercetin-induced apoptosis in HepG2 cells and identification of quercetin derivatives as potent inhibitors for Caspase-3 through computational methods. *Structural Chemistry*, 33(6), 1867-1893.

Ramjiawan, R. R., Griffioen, A. W., & Duda, D. G. (2017). Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy?. *Angiogenesis*, 20(2), 185–204.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Ren, M. X., Deng, X. H., Ai, F., Yuan, G. Y., & Song, H. Y. (2015). Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, 10(2), 579-583.

Reyes-Farias, M., & Carrasco-Pozo, C. (2019). The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3177.

Rivas, C. J. M., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., ... & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 532(1), 66-81.

Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., & Jafari, S. M. (2019). Starch-based nanocarriers as cutting-edge natural cargos for nutraceutical delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 397-415.

Ruan, S., Tang, J., Qin, Y., Wang, J., Yan, T., Zhou, J., ... & Liu, D. (2022). Mechanical force-induced dispersion of starch nanoparticles and nanoemulsion: Size control, dispersion behaviour, and emulsified stability. *Carbohydrate Polymers*, 275, 118711.

Saad, W. S., & Prud'homme, R. K. (2016). Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today*, 11(2), 212-227.

Sabando, C., Bouza, R., Rodríguez-Llamazares, S., Pettinelli, N., Ide, W., Barral, L., ... & Dufresne, A. (2022). Donut-Shaped Microparticles Prepared from Different C-Type Starch Sources: Characterization and Encapsulation of Gallic Acid. *ACS Food Science & Technology*, 2(5), 862-871.

Sabando, C., Rodríguez-Díaz, M., Ide, W., Pastene, E., Avello, M., Simirgiotis, M., ... & Rodríguez-Llamazares, S. (2020). Improvement of endothelial function by *Gunnera tinctoria* extract with antioxidant properties. *Biological Research*, 53.

Schmalhausen, E. V., Zhlobek, E. B., Shalova, I. N., Firuzi, O., Saso, L., & Muronetz, V. I. (2007). Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1988-1993.

Seung, D. (2020). Amylose in starch: Towards an understanding of biosynthesis, structure and function. *New Phytologist*, 228(5), 1490-1504.

Song, H., Wang, W., Zhao, P., Qi, Z., & Zhao, S. (2014). Cuprous oxide nanoparticles inhibit angiogenesis via down regulation of VEGFR2 expression. *Nanoscale*, 6(6), 3206-3216.

Sriram, N., Kalayarasan, S., Ashokkumar, P., Sureshkumar, A., & Sudhandiran, G. (2008). Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF- κ B, and ERK-2. *Molecular and cellular biochemistry*, 311, 157-165.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal science*, 39(2), 151-165.

Tonini, T., Rossi, F., and Claudio, P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22, 6549–6556.

Toledo, K. (2023). Dependencia del metabolismo celular con la sensibilidad a drogas antineoplásicas en células de cáncer de ovario. Tesis para optar al título profesional de Bioquímico, Universidad de Concepción, Chile, 116pp.

Troncoso, F., Herlitz, K., Acurio, J., Aguayo, C., Guevara, K., Castro, F. O., ... & Escudero, C. (2020). Advantages in wound healing process in female mice require upregulation α 2a-mediated angiogenesis under the stimulation of 17β -estradiol. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7145.

Vallejos, N. (2019). Efecto de D-glucosa y diabetes gestacional en la barrera endotelial. Tesis presentada para optar al título profesional de Bioquímico, Universidad de Concepción, Chile, 75 pp.

van Zyl, B., Tang, D., & Bowden, N. A. (2018). Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. *Endocrine-related cancer*, 25(5), R303-R318.

Wang, B., Yu, B., Yuan, C., Guo, L., Liu, P., Gao, W., ... & Abd El-Aty, A. M. (2022). An overview on plasticized biodegradable corn starch-based films: The physicochemical properties and gelatinization process. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(10), 2569-2579.

Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., & Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in food science & technology*, 56, 21-38.

Wong, M. L., Prawira, A., Kaye, A. H., & Hovens, C. M. (2009). Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(9), 1119-1130.

Woo, H. D., Lee, J., Choi, I. J., Kim, C. G., Lee, J. Y., Kwon, O., & Kim, J. (2014). Dietary flavonoids and gastric cancer risk in a Korean population. *Nutrients*, 6(11), 4961-4973.

World Health Organization. (2023). Ten threats to global health in 2019.. Available at: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Accessed: February 27, 2023.

Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Marston, H., Turnbull, A., & Langdon, S. P. (2015). A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget*, 6(28), 25677.

Xu Y, Wen Z, Xu Z. 2009. Chitosan nanoparticles inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts through an antiangiogenic mechanism. *Anticancer Research* 29(12):5103-5109.

Yang, W., Liu, L., Li, C., Luo, N., Chen, R., Li, L., ... & Cheng, Z. (2018). TRIM52 plays an oncogenic role in ovarian cancer associated with NF-κB pathway. *Cell death & disease*, 9(9), 908.

Yi, L., Zongyuan, Y., Cheng, G., Lingyun, Z., GuiLian, Y., & Wei, G. (2014). Quercetin enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in ovarian cancer cells through reactive oxygen species (ROS) mediated CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)-death receptor 5 pathway. *Cancer science*, 105(5), 520-527.

Yuryev, V. P. (2007). *Starch: Achievements in understanding of structure and functionality*. Nova Publishers.

Zamora-Ros, R., Agudo, A., Luján-Barroso, L., Romieu, I., Ferrari, P., Knaze, V., ... & González, C. A. (2012). Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *The American journal of clinical nutrition*, 96(6), 1398-1408.

Zamora-Ros, R., Fedirko, V., Trichopoulou, A., González, C. A., Bamia, C., Trepo, E., ... & Jenab, M. (2013). Dietary flavonoid, lignan and antioxidant capacity and risk of hepatocellular carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *International journal of cancer*, 133(10), 2429-2443.

Zhang, L., Jiao, G., Ren, S., Zhang, X., Li, C., Wu, W., ... & Chen, Y. (2020). Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion. *Stem cell research & therapy*, 11, 1-15.

Zhang, L., Yang, X., Li, S., & Gao, W. (2011). Preparation, physicochemical characterization and in vitro digestibility on solid complex of maize starches with quercetin. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 787-792.

Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food chemistry*, 229, 542-552.