



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico que comprenden surfactantes amonio cuaternario y colesterol

Héctor Santana Milián ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-2149-0921>
Lidia Ferrer Tasies ² <https://orcid.org/0000-0001-5788-3172>
Nora Ventosa Rull ³ <https://orcid.org/0000-0002-8008-4974>
Lidia Ballell Hosa ² <https://orcid.org/0000-0001-5806-7759>
Jaume Veciana Miró ³ <https://orcid.org/0000-0003-1023-9923>
Eduardo Martínez Díaz ¹ <https://orcid.org/0000-0001-8030-2364>
Ingrid Cabrera Puig ³ <http://orcid.org/0000-0003-2583-9307>
Jorge Berlanga Acosta ¹ <https://orcid.org/0000-0001-9797-1986>
Santiago Sala Verges ² <https://orcid.org/0000-0002-1164-7964>
Elisabet González Mira ³ <https://orcid.org/0000-0003-2502-225X>
Alba Córdoba Insensé ² <https://orcid.org/0000-0002-2726-5119>
Haydeé Gerónimo Pérez ¹ <http://orcid.org/0009-0006-8150-6872>
Glay Chinae Santiago ¹ <http://orcid.org/0009-0006-6005-7668>
Miladys Limonta Fernández ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1664-5255>
Viviana Falcón Cama ¹ <https://orcid.org/0000-0002-3795-9966>
Carla Castellar Álvarez ² <https://orcid.org/0000-0002-5540-2141>
Josep Merlo Mas ² <https://orcid.org/0000-0002-3698-6655>
Judith Morlá Folch ³ <https://orcid.org/0000-0003-1059-6939>
Evelyn Moreno Calvo ³ <http://orcid.org/0009-0000-0950-3745>
Jan Skov Pedersen ⁴ <https://orcid.org/0000-0002-7768-0206>
Calixto Valdés Pérez ⁵ <https://orcid.org/0000-0001-6227-3002>
Jessica Romero Rueda ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-7503-7620>
Claudia Navarro Requena ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-0833-5118>
Yaima Martínez Prieto ¹ <http://orcid.org/0009-0004-9477-920X>
Marc Moreno Masip ³ <https://orcid.org/0000-0001-6585-8110>
Albert Revuelta Díez ³ <http://orcid.org/0000-0002-5843-8502>
Primiano Pio Di Mauro ³ <https://orcid.org/0000-0002-0530-4981>
Fidel Raúl Castro Odio ¹ <https://orcid.org/0009-0008-7316-4395>
Dinorah Torres Idavoy ¹ <http://orcid.org/0000-0002-4514-1881>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, BioCubaFarma. La Habana, Cuba

² Nanomol Technologies S.L. Barcelona, España

³ Instituto de Ciencias de los Materiales de Barcelona. Barcelona, España

⁴ Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vasculár. La Habana, Cuba

⁵ Universidad de Aarhus. Aarhus, Dinamarca

⁶ Centro Tecnológico LEITAT. Barcelona, España

* Autor para la correspondencia: hector.santana@cigb.edu.cu

RESUMEN

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Introducción: Se ha señalado que los tratamientos tópicos de heridas complejas con factor de crecimiento epidérmico exógeno ven afectada su biodisponibilidad y efectividad. En consecuencia, son deseables productos novedosos que puedan superar las limitaciones que enfrentan dichos tratamientos. **Objetivos:** El objetivo principal fue desarrollar una nanofor-



Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

mulación en la cual sus componentes y estructura supramolecular permitieran aumentar la biodisponibilidad del factor de crecimiento epidérmico en el sitio de la herida al tiempo de resultar biocompatible con el mismo. **Métodos:** El desarrollo y evaluación de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico se realizó en 4 etapas: diseño de la nanoformulación, síntesis por un novedoso método de fluidos supercríticos, caracterización físico-química y biofísica, y su evaluación por ensayos biológicos in vitro. **Resultados:** Se sintetizaron nanoconjugados no covalentes de factor de crecimiento epidérmico que comprenden surfactantes amonio cuaternario y colesterol, novedosos en el contexto de los sistemas lipídicos, que supera a los métodos tradicionales de preparación de sistemas lipídicos. La caracterización del sistema con una amplia batería de técnicas analíticas, que se encuentran al nivel del estado del arte o superior, demostró que el sistema presenta valores apropiados de los principales atributos de calidad críticos: estabilidad, atrapamiento y liberación del factor de crecimiento epidérmico, protección frente a proteasas, actividad regeneradora, actividad antimicrobiana, biocompatibilidad y capacidad de localización. **Conclusiones:** se desarrolló una nanoterapia basada en nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico compuestos de colesterol y bromuro de hexadeciltrimetilamonio, que combina 2 actividades farmacológicas: son un vehículo prometedor de administración tópica del factor de crecimiento epidérmico, que mejora la biodisponibilidad y eficacia de la proteína, y exhiben propiedades antimicrobianas intrínsecas debido a la composición de su membrana.

Palabras clave: factor de crecimiento epidérmico; surfactantes amonio cuaternario; nanoconjugados; nanovesículas; heridas complejas

Epidermal growth factor nanoconjugates comprising quaternary ammonium surfactants and cholesterol

ABSTRACT

Introduction: It has been suggested that topical treatments for complex wounds with exogenous epidermal growth factor affect their bioavailability and effectiveness. Consequently, novel products that can overcome the limitations faced by these treatments are desirable.

Objectives: To develop a nanoformulation whose components and supramolecular structure would increase epidermal growth factor bioavailability at the wound site while remaining biocompatible with the wound. **Methods:** The development and evaluation of epidermal growth factor nanoconjugates was carried out in four stages: nanoformulation design, synthesis by a novel supercritical fluid method, physicochemical and biophysical characterization, and evaluation by in vitro biological assays. **Results:** Non-covalent epidermal growth factor nanoconjugates comprising quaternary ammonium surfactants and cholesterol were synthesized. These compounds are novel in the context of lipid systems and outperform traditional methods for preparing lipid systems. Characterization of the system using a broad battery of state-of-the-art analytical techniques or better demonstrated that the system exhibits appropriate values for the main critical quality attributes: stability, epidermal growth factor entrapment and release, protease protection, regenerative activity, antimicrobial activity, biocompatibility, and localization capability. **Conclusions:** A nanotherapy based on epidermal growth factor nanoconjugates composed of cholesterol and Cetyltrimethylammonium bromide was developed, combining two pharmacological activities: they are a promising vehicle for topical delivery of epidermal growth factor improving the protein's bioavailability and efficacy, and exhibiting intrinsic antimicrobial properties due to their membrane composition.

Keywords: epidermal growth factor; quaternary ammonium surfactants; nanoconjugates; nanovesicles; complex wounds

INTRODUCCIÓN

Las heridas agudas y, en particular, las crónicas son un problema de salud mundial. La incidencia de heridas crónicas que no cicatrizan ha aumentado exponencialmente con el envejecimiento de la población, se ha estimado que entre el 1 % y el 2 % de la población de los países desarrollados experimentarían una herida crónica a lo largo de su vida. ^(1,2)

Los factores clave asociados con la fisiopatología de la herida y la pérdida de una extremidad incluyen la neuropatía y la gravedad de la herida, la isquemia y la infección del pie. ⁽³⁾ Las heridas abiertas como las úlceras del pie diabético (UPD), las úlceras venosas de las piernas (VLU) y las úlceras por presión (PU), dejan el lecho de la herida en riesgo de colonización por patógenos oportunistas, agravando la situación del paciente. La colonización bacteriana de las heridas a menudo facilita la producción de una matriz extracelular viscosa, conocida como biopelícula, que se cree que afecta hasta el 80 % de las heridas crónicas. Casi la mitad de todas las UPD se clasifican como infectadas, lo que se correlaciona fuertemente con la amputación y el aumento de la mortalidad. ⁽⁴⁾

El factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF) ha atraído un gran interés debido a sus posibles aplicaciones, especialmente dirigidas a mejorar el proceso de cicatrización. Se cree que la deficiencia de EGF es uno de los fundamentos fisiopatológicos de las heridas complejas. ⁽²⁾ Se ha informado que el EGF facilita la cicatrización de heridas, ya que puede promover la angiogénesis y regular muchos aspectos de la actividad celular, incluida la migración celular, la proliferación y el metabolismo de la matriz extracelular. ⁽⁵⁾ Sin embargo, la evidencia demuestra que el EGF exógeno se elimina rápidamente del sitio de aplicación tópica, probablemente mediante escisión impulsada por proteasas debido al rico ambiente proteolítico que se encuentra en estas heridas afectando la biodisponibilidad y efectividad de los tratamientos tópicos basados en EGF. ⁽⁶⁾ En consecuencia son deseables productos novedosos que puedan superar las limitaciones que enfrentan los tratamientos tópicos basados en EGF. ⁽⁷⁾

La nanotecnología ha contribuido a un cambio de paradigma en la terapia de curación de heridas para superar la naturaleza crónica y las complicaciones asociadas de las heridas que no cicatrizan. El uso de tecnologías eficientes para materiales nanoestructurados con características controladas ha dado como resultado 2 categorías de nanomateriales utilizados en la curación de heridas: a) nanomateriales que muestran propiedades intrínsecas para la curación de heridas y b) nanomateriales utilizados como portadores de fármacos. ^(8,9) Para la preparación de los nanoconjugados de EGF se propuso una plataforma basada en fluidos comprimidos

denominada DELOS-susp (despresurización de una solución-suspensión orgánica líquida expandida). La plataforma DELOS-susp es un proceso ecoeficiente que utiliza CO₂ comprimido que permite la producción reproducible y escalable de sistemas nanovesiculares con notable estabilidad coloidal en términos de tamaño, morfología y lamellaridad, en medios acuosos. ^(10,11,12) Sin embargo, en el momento de realizar nuestra investigación dicha plataforma DELOS-susp nunca se había aplicado a proteínas recombinantes que son biomoléculas frágiles y cuya funcionalidad depende de la preservación, durante la preparación y almacenamiento, de su estructura secundaria y de orden superior. ⁽⁷⁾

El objetivo principal de la presente investigación fue resolver los problemas para la liberación tópica eficiente del EGF asociados con su degradación por proteasas en el ambiente de las heridas crónicas y su rápida eliminación del sitio de acción. Para ello fue necesario desarrollar una nueva nanoformulación en la cual sus componentes y estructura supramolecular permitieran aumentar la biodisponibilidad del EGF en el sitio de la herida al tiempo de resultar biocompatible con el mismo. Otro objetivo fue el desarrollo de un proceso de preparación que fuera escalable, robusto y amigable con el medio ambiente. No menos importante, la caracterización del sistema con una amplia batería de técnicas físico-químicas, biofísicas y de microscopía electrónica para evaluar el cumplimiento del sistema con los atributos críticos de calidad deseables para las nanoformulaciones coloidales. Finalmente, también fue objetivo de este trabajo la realización de una amplia variedad de estudios en modelos *in vitro* que dieran información de la integridad del sistema, funcionalidad biológica, resistencia a proteasas y la predicción de su biocompatibilidad y potencial de localización para administración tópica.

MÉTODOS

Se trata de una investigación tecnológica para el tratamiento tópico de heridas complejas. Esta investigación se desarrolló en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba de manera conjunta con el Instituto de Ciencias de los Materiales de Barcelona y la empresa Nanomol Technologies SL de España. La investigación se desarrolló a tiempo parcial desde el año 2010 hasta el 2016.

El EGF fue producido mediante tecnología de ADN recombinante. Brevemente, el gen de EGF humano se clonó en un vector de integración en la levadura Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y se desarrolló un proceso de fermentación con altos rendimientos para la expresión de la proteína al medio de cultivo. Posteriormente, tras una secuencia de procesos cromatográficos, se obtuvo el EGF con alto grado de pureza y con la actividad biológica esperada. ⁽¹³⁾

Los nanoconjugados de EGF se prepararon mediante el método DELOS-susp, un proceso de un solo paso. ⁽¹⁴⁾ Se utilizaron diferentes reactores, desde escala de laboratorio hasta escala piloto. En primer lugar, se introduce en un reactor de alta presión, a presión atmosférica y temperatura de trabajo, una solución de etanol que contiene colesterol y CTAB. Se añade CO₂ comprimido, produciendo una expansión volumétrica de la solución hasta alcanzar una fracción molar deseada y una presión de trabajo. Finalmente, la solución orgánica expandida se despresuriza desde la presión de trabajo a la presión atmosférica, sobre una solución que contiene la proteína en el tampón deseado y a la concentración deseada.

Los nanoconjugados de EGF se caracterizaron con una amplia batería de técnicas analíticas. El tamaño de partícula, la polidispersidad y el potencial Zeta se determinaron con el Zetasizer Nano ZS. La eficiencia de atrapamiento de proteínas (PEE %) se determinó después de la separación del EGF libre de los nanoconjugados de EGF mediante ultracentrifugación a 600 000 g a 4 °C durante 6 h. El contenido de EGF en las diferentes fases se analizó mediante los espectros de fluorescencia intrínseca del Trp.

La morfología y tamaño de los nanoconjugados en solución acuosa se evaluó mediante criomicroscopía electrónica de transmisión (Crio-TEM) para lo cual la muestra se vitrificó sumergiendo la rejilla en etano líquido a temperatura de -179,15 °C. Para la localización del EGF en los nanoconjugados se utilizó la inmunomicroscopía electrónica de transmisión (inmuno-TEM), empleando un anticuerpo monoclonal específico en ratones anti-EGF (clon CB.EGF.1, CIGB). El marcaje secundario se realizó con IgG antiratón de conejo conjugada con oro coloidal de 15 nm de diámetro. Antes de la observación al microscopio, la membrana se contrastó con acetato de uranilo.

Los espectros de diroísmo circular (CD) en el UV lejano (190-250) nm se registraron en un espectropolarímetro. Debido a la interferencia de la histidina de los medios dispersantes, a las muestras se les cambiaron los medios por agua mediante el uso de una columna de filtración en gel PD-10 desechable. Como control de los componentes de los nanoconjugados blanco, los mismos se secaron en un concentrador Speed Vac y se disolvieron con etanol absoluto hasta el mismo volumen inicial para generar la muestra con una concentración equivalente de componentes libre en la solución etanólica. Se utilizaron cubetas de cuarzo (Hellma) de 0,1 cm de longitud de paso. Los espectros de fluorescencia intrínseca del triptófano (Trp) se registraron en un espectrofotómetro de fluorescencia. Los espectros de emisión de fluorescencia se midieron en el rango de (305-450) nm después de la excitación a 295 nm. El paso óptico de las cubetas de cuarzo fue de 1,0 cm.

La liberación *in vitro* de la proteína de los nanoconjugados de EGF se evaluó en solución de medio dispersante a pH 5,5 y 7,0; en un baño termostático a 32 °C y a 37 °C después de 3 días de incubación con agitación. El porcentaje acumulado de proteína liberada (CPR %) se determinó después de separar el EGF libre de los nanoconjugados de EGF mediante ultracentrifugación a 600 000 g a 4 °C durante 6 h. El contenido de EGF en las diferentes fases se cuantificó mediante el ELISA de EGF como se ha descrito previamente. ⁽¹⁵⁾ La estabilidad del EGF en modelo de proteasa con quimotripsina se evaluó en el mismo medio dispersante tanto para el EGF libre como para los nanoconjugados de EGF. La quimotripsina se añadió utilizando una relación enzima (Quimotripsina): sustrato (EGF) de 1:20 (m/m) y las muestras se incubaron con agitación a 32 °C durante 24 h. El porcentaje de EGF degradado se determinó por diferencia después de cuantificar el EGF remanente mediante ELISA.

La actividad biológica *in vitro* del EGF libre y nanoconjugados de EGF mediante ensayo de proliferación celular se evaluó a través de su capacidad de estimular la proliferación de células de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 clon A31. Los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI), en comparación con un material de referencia de trabajo que se calibró con el estándar internacional 91/530 de EGF. Por otra parte, para la actividad antimicrobiana *in vitro* se evaluó la eficacia de los nanoconjugados de EGF frente a bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633), bacterias gramnegativas (*E. coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) y hongos (*Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404) utilizando la técnica del método de difusión en pozos de agar. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana analizada, y luego se miden los diámetros en mm de las zonas de inhibición del crecimiento. ⁽¹⁶⁾

La evaluación de la irritación cutánea aguda de los nanoconjugados de EGF se realizó mediante un ensayo *in vitro* basado en la directriz 439 de la OCDE utilizando el modelo epidérmico humano *in vitro* EpiSkin™. El método consiste en la aplicación del producto de prueba y la posterior determinación de los niveles de interleucina-1 α (IL-1 α) inducida por los procesos irritantes. ⁽¹⁷⁾ Se utilizaron controles como PBS y una solución de SDS al 5 % en PBS (control negativo y positivo, respectivamente), así como el tensioactivo CTAB solubilizado en el medio dispersante y el propio medio dispersante solo. Para evaluar la irritación cutánea aguda, todos los productos se expusieron a la epidermis durante 24 h y 48 h. Según este modelo predictivo, un producto se considera irritante de la piel cuando la concentración de IL-1 α liberada es mayor o igual a 40 pg/mL.

Los experimentos de permeación *ex vivo* en piel humana dañada para comparar la permeación del EGF libre y los nanoconjugados de EGF, se realizaron con piel humana procedente de cirugía plástica la cual se dermatomizó hasta alcanzar un espesor de 400 μm . El estudio de absorción/permeación se realizó en células de difusión estática de Franz, que constan de una cámara de vidrio aceptora y otra donora fijada entre sí con una abrazadera. Se aplicaron 100 μL de las muestras de EGF libre y nanoconjugados de EGF en el lado epidérmico de cada piel, y se selló la abertura del compartimento donante con parafilm, limitando la evaporación del producto. Luego de 24 h de aplicación del producto, se procesaron muestras de piel y se generaron 3 fracciones: la no traspasada, la absorbida y la permeada. El EGF de estas fracciones, así como de las muestras aplicadas, se cuantificaron con el ELISA de EGF humano de R&D Systems siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, el CTAB de las muestras aplicadas y permeadas se analizó mediante UPLC-MS/MS.

Para los análisis estadísticos, los resultados se expresan como el valor medio con su desviación estándar (media \pm DE) de cada muestra, al menos 2-3 réplicas. Para investigar las diferencias entre diferentes grupos se utilizaron pruebas ANOVA seguidas de las pruebas posteriores de comparación múltiple de Tukey, de post hoc de Dunnett y de post hoc de Sidak, utilizando el paquete de software estadístico Minitab-17. Las diferencias estadísticas se acep-

taron como significativas ($*p < 0,05$), muy significativas ($**p < 0,01$) o altamente significativas ($***p < 0,001$) según el valor de p obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formulación, preparación y caracterización de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico

Por primera vez se obtienen nanoconjugados no covalentes de EGF que comprenden surfactantes amonio cuaternario y colesterol, novedosos en el contexto de los sistemas lipídicos. En la figura 1A se presentan las estructuras moleculares de los diferentes componentes estructurales del nuevo sistema lipídico que incluye al EGF en su estructura supramolecular. En particular, ya que a pH neutro el EGF está cargado negativamente y los surfactantes amonio cuaternario están cargados positivamente, se espera una interacción electrostática favorable entre estos componentes del sistema, y por consiguiente la unión del EGF a la membrana lipídica que los surfactantes amonio cuaternario y el colesterol tienden a formar (figura 1B).

Aunque en este trabajo se presentan los resultados para el sistema EGF con CTAB y colesterol, también se demostró la posibilidad de extender este tipo de nanoconjugados a otros sistemas del EGF: con CTAB y sitosterol, cloruro de benzalconio (BKC) y colesterol o cetrimida y colesterol. En los diferentes sistemas mencionados se obtuvieron nanopartículas

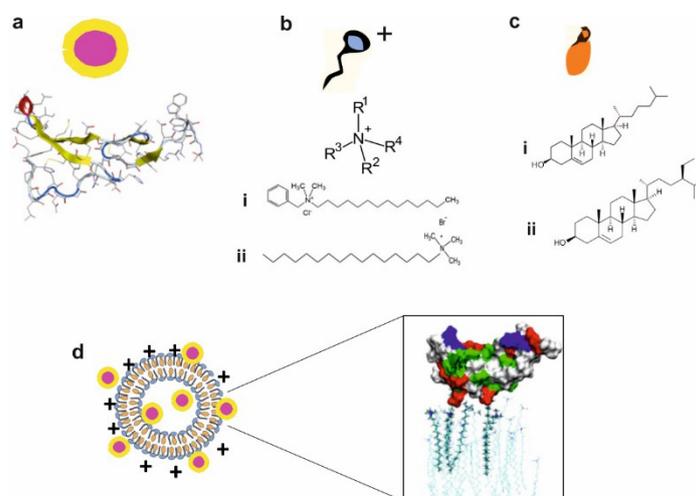


Fig. 1. Descripción general de la estructura propuesta de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante; A, B, C) representación simbólica y estructural de los componentes del sistema; A, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante humano recombinante; B, surfactantes amonio cuaternario (I, BKC o II, bromuro de hexadeciltrimetilamonio); C, colesterol o sus derivados (I, colesterol o II, sitosterol); D) representación esquemática de la estructura de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante

catiónicas, en forma de vesículas unilamelares, con diámetro medio entre (5 y 100) nm; y con mayor potencia biológica que el EGF libre, con capacidad de proteger al fármaco frente a la degradación por proteasas y con actividad antimicrobiana. (7)

Por primera vez se preparan nanoconjugados con proteínas recombinantes como componentes intrínsecos del sistema supramolecular, empleando una tecnología de fluidos comprimidos conocida como DELOS-susp que es escalable; y que supera a los métodos de preparación de sistemas lipídicos tradicionales en cuanto a manufacturabilidad, estabilidad y robustez. A diferencia de los métodos convencionales para la producción de sistemas lipídicos que son procedimientos de varios pasos, este método ecológico, basado en el uso de CO₂ comprimido como codisolvente, permite la preparación en un solo paso de los nanoconjugados con distribución de tamaño y morfología de partículas controladas, y alta estabilidad.

El proceso consiste en la preparación de una solución orgánica expandida con CO₂, que contiene colesterol, CTAB y etanol hasta alcanzar el equilibrio a alta presión. Dicha solución se despresurizó, con ayuda de N₂(g) que actúa como embolo también a alta presión, sobre una solución acuosa de histidina-HCl de 5 mM (pH 7,0), que también contenía el EGF a las concentraciones deseadas (0; 25; 100) µg/mL. El proceso no requiere de pasos adicionales para lograr las características estructurales deseadas o para aumentar la carga de la proteína (figura 2 A y B).

El procedimiento que se observa en el sector A incluye la carga de una solución etanólica de colesterol y CTAB en un recipiente de alta presión a temperatura de trabajo (Tw) y presión atmosférica; la adición de CO₂ para producir una solución expandida con CO₂, a una fracción molar (XCO₂), presión de trabajo (Pw) y Tw determinados; donde los componentes de la membrana permanecen disueltos; y finalmente, la despresurización de la solución orgánica expandida sobre una solución acuosa, que contiene el EGF en tampón histidina-HCl (pH 7,0); para producir una dispersión acuosa de los nanoconjugados de EGF.

Para desarrollar una nanomedicina robusta, que pueda progresar a la etapa clínica, es esencial lograr una reproducibilidad completa de sus características fisicoquímicas, morfología y carga de sustancias farmacológicas entre diferentes producciones de lotes, lo que se denomina consistencia entre lotes. Además, es muy importante el uso de metodologías escalables industrialmente con características adecuadas y reproducibles, involucrando un número mínimo de pasos y equipos y cumpliendo con los requisitos de las guías farmacéuticas y las buenas prácticas de fabricación (GMP). Los tamaños medios de partículas, las distribuciones de tamaños de partículas (o índice de polidispersidad, Pdl) y los potenciales zeta aparente de los nanoconjugados de EGF son atributos de calidad críticos importantes de los sistemas coloidales, que desempeñan un papel importante

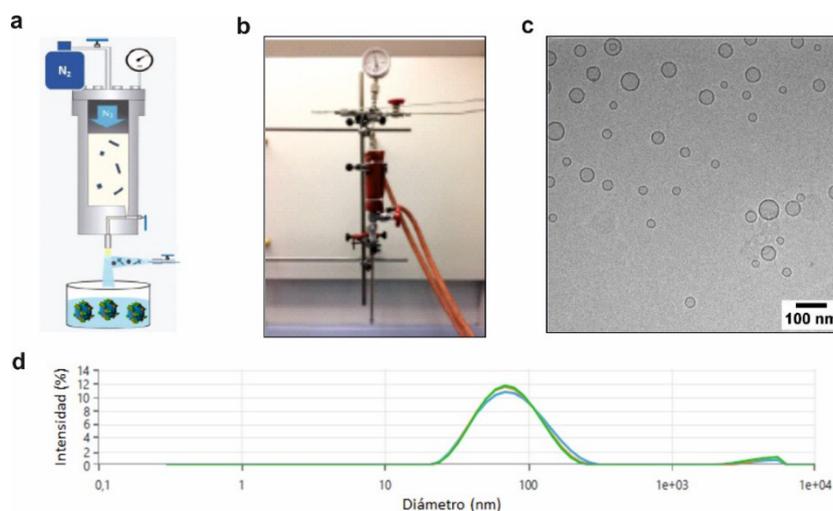


Fig. 2. Funcionamiento de la tecnología despresurización de una solución-suspensión orgánica líquida expandida y caracterización físico-química de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante; A) representación esquemática del método de preparación de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante; B) equipo que incluye recipiente de alta presión a escala de laboratorio P6 mL (tamaño de lote 25 mL); C) caracterización de nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante por criomicroscopía electrónica de transmisión; D) caracterización por dispersión dinámica de la luz

en la determinación de su estabilidad, carga y liberación de fármacos, biodistribución y capacidad de localización. ⁽¹⁸⁾

La morfología de los nanoconjugados de EGF según criio-TEM evidenció la presencia de vesículas esféricas, homogéneas y unilamelares (ver figura 2C). El tamaño medio de partículas de los nanoconjugados de EGF con 25 µg/mL y 100 µg/mL de proteína fue inferior a 100 nm y similar entre sí, lo que significa que la concentración de proteína no altera el tamaño medio de los nanoconjugados (ver figura 2D). El potencial zeta, que representa la carga eléctrica en la superficie de los nanoconjugados y es también un parámetro importante que permite correlacionarse con la estabilidad coloidal, se encontraron valores de potencial zeta aparente muy altos (superiores a + 70 mV), de acuerdo con la gran estabilidad encontrada. Los porcentajes de eficiencia de atrapamiento (EE %) se mantuvieron muy altos (≥ 97 %) para todos los nanoconjugados obtenidos independientemente de las cargas de proteínas. Estos valores altos pueden racionalizarse por el valor de potencial zeta aparente negativo (cerca de -16 mV) del EGF libre y los valores positivos (cerca de +103 mV) para los nanoconjugados blancos (sin EGF), lo que sugiere una interacción electrostática fuerte entre ambos.

La estructura de un nanoconjugado es otro atributo de calidad importante para el desempeño de cualquier sistema de administración de fármacos. Anteriormente demostramos que se trata de vesículas unilamelares esféricas (ver figura 2C). Para demostrar experimentalmente la localización del EGF en los nanoconjugados, se tomaron imágenes de inmuno-TEM (figura 3A). Las imágenes de microscopía muestran la presencia de puntos negros correspondientes a nanopartículas de oro coloidal (de unos 15 nm de diámetro) en las membranas de las estructuras vesiculares de los nanoconjugados de EGF, confirmando la localización del EGF anclado a la membrana lipídica de las nanovesículas. Además, las imágenes inmuno-TEM revelan la formación de agrupaciones de EGF, que se localizaron claramente con un anticuerpo monoclonal específico. Estos grupos característicos de EGF en la superficie de las nanopartículas, con alta concentración local, pueden implicar una mayor facilidad para la dimerización del receptor de EGF y potencialmente pueden mejorar su actividad biológica.

Dado que tanto el colesterol como el EGF muestran propiedades quirales, se accedió al comportamiento estructural de los nanoconjugados y del EGF mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD). La figura 3C muestra los espectros CD del UV lejano de muestras y controles. Como control para el análisis de los nanoconjugados, se secaron nanoconjugados blancos (sin EGF) y se disolvieron con etanol para generar la muestra con composición equivalente en solución. Esta muestra genera una banda dicroica positiva que alcanza un máxi-

mo alrededor de 200 nm y una banda negativa por debajo de 195,5 nm. Estos resultados concuerdan con los informados anteriormente para la solución de colesterol libre en ciclohexano y acetonitrilo. ⁽¹⁹⁾ Sin embargo, los nanoconjugados blanco nanoestructurados en agua, mostraron grandes cambios en el espectro en comparación con la mezcla de componentes disueltos en etanol, mostrando una única e intensa banda dicroica negativa por debajo de 230 nm. Adicionalmente, el espectro experimental de los nanoconjugados de EGF se comparó con el espectro resultante de la suma de los espectros individuales del EGF libre y los nanoconjugados blanco. Ambos espectros se superponen bastante bien, lo que sugiere que no se producen alteraciones estructurales importantes debido a la formación del complejo, nanoconjugado de EGF. Sin embargo, la banda positiva alrededor de 230 nm observada en la suma de los espectros desapareció en el espectro de los nanoconjugados de EGF (inserto de la figura 3C). Esta banda probablemente esté asociada con los aminoácidos aromáticos (Trp y Tyr) y, posiblemente, con los enlaces disulfuro del EGF. La pérdida de la banda positiva a 230 nm sugiere fuertemente que tras la unión del EGF a la superficie de los nanoconjugados se producen algunos cambios en el entorno estructural de los aminoácidos aromáticos de la proteína. Además, en la misma dirección de estos resultados, el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca del Trp (ver figura 3B) sugiere que los aminoácidos aromáticos en el EGF probablemente estén interactuando con la membrana catiónica.

La fluorescencia intrínseca de las proteínas es otra propiedad sensible a los cambios en su estructura terciaria que también revela la polaridad del microambiente presente alrededor de sus fluoróforos, en particular los residuos Trp. Por tanto, la ubicación (y el entorno estructural) de dichos residuos determina el valor de intensidad y la longitud de onda de emisión máxima de fluorescencia, que varía de 330 nm a 355 nm dependiendo de las propiedades del disolvente, el grado de exposición al disolvente y otras interacciones locales. Como ya se mencionó, los resultados del inmuno-TEM (ver figura 3A) sugirieron que parte de la proteína debería estar interactuando con la membrana produciendo su inmovilización. El espectro de emisión del EGF libre en el medio dispersante se caracterizó por un máximo de emisión a (350-352) nm (ver figura 3B), lo que indica que los residuos de Trp residen en la superficie de la proteína y están en contacto con agua. Estos resultados son consistentes con los reportados previamente para Trp en EGF libre mediante espectroscopias de resonancia magnética nuclear. ⁽²⁰⁾ Sin embargo, en los nanoconjugados de EGF, la emisión máxima se desplazó a longitudes de onda más cortas (aproximadamente 346 nm) y se observó que está acompañado de un aumento de la intensidad de

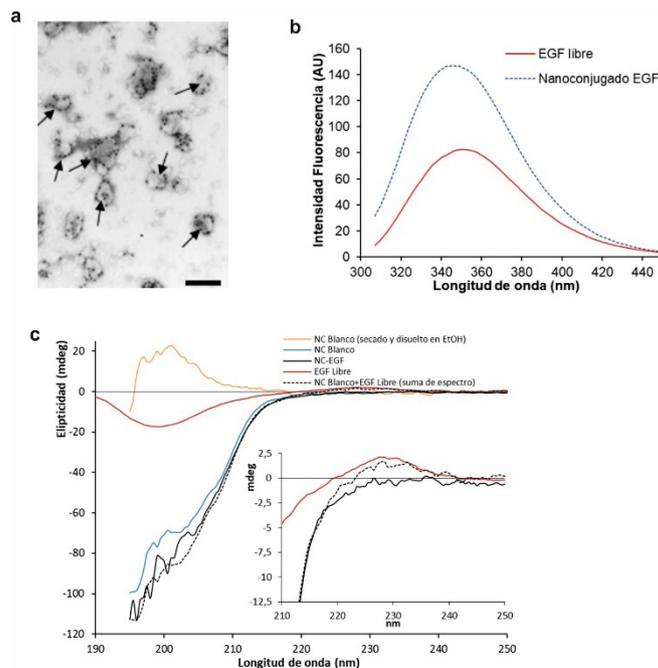


Fig. 3. Estructura de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico; A) imágenes de inmunomicroscopía electrónica de transmisión que muestran la localización del factor de crecimiento epidérmico en la bicapa de los nanoconjugados con anticuerpo monoclonal específico seguido de la detección con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón en conejo marcado con nanopartículas de oro coloidal (15 nm), la longitud de la barra representa 200 nm; B) espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano del factor de crecimiento epidérmico libre y los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico; C) espectros de CD de UV lejano de diferentes muestras después del intercambio de medios dispersantes con agua en columnas de desalinización PD-10

la fluorescencia, en comparación con la proteína libre. Esto también indica que los residuos de Trp se encuentran en un ambiente menos polar cuando se integran en la membrana.

Estudios in vitro de caracterización de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico

El perfil de liberación del EGF de los nanoconjugados de EGF a pH 5,5 y 7,0 se investigó mediante la incubación con agitación a 32 °C y 37 °C y después 3 días de almacenamiento. No se observó claramente ninguna liberación inmediata del EGF cargado al comienzo del estudio en ambos valores de pH, ni se observó ninguna liberación de EGF para la muestra mantenida durante 3 días a pH 5,5 después de la incubación a ambas temperaturas. Sin embargo, a pH 7,0 se observó una pequeña liberación del EGF que tiende a aumentar ligeramente en función del tiempo, pero permanece por debajo del 5 % después de los 3 días a 32 °C (figura 4A). Se detectó una liberación ligeramente mayor del EGF al mismo pH después del almacenamiento a 37 °C, siendo prácticamente irrelevante (de 10 % a 15 %), teniendo en cuenta que la frecuencia de administración de los productos tópicos es menor de 3 días.

Las heridas crónicas, como las úlceras del pie diabético, presentan un entorno proteolítico que puede afectar la biodisponibilidad de los fármacos proteicos utilizados durante los tratamientos. Por tanto, se evaluó la capacidad protectora de los nanoconjugados de EGF a través de su capacidad de preservar la estabilidad y bioactividad del EGF en presencia de proteasas. En este estudio se seleccionó la quimotripsina como modelo de proteasa porque tiene muchos sitios de corte en la secuencia del EGF y su proteólisis del EGF fue sensible al ensayo ELISA. Los resultados mostraron que a la misma concentración aparente de EGF, los nanoconjugados de EGF presentaron una mayor estabilidad frente a la quimotripsina en comparación con la proteína libre (ver figura 4B). A la misma concentración aparente de EGF, el porcentaje global de proteína degradada fue mayor del 95 % para el EGF libre, mientras que para el nanoconjugado de EGF fue entre el (50-60) % después de 24 h. Es probable que el EGF libre se degrade mucho más rápido por una mayor exposición de la proteína libre al solvente que en el nanoconjugado. Dado que el objetivo final de este trabajo es el uso de los nanoconjugados de EGF como formulación tópica, una alta resistencia a las proteasas podría traducirse en una mejor biodisponibilidad y una acción más prolongada y eficaz del EGF en las áreas de las heridas.

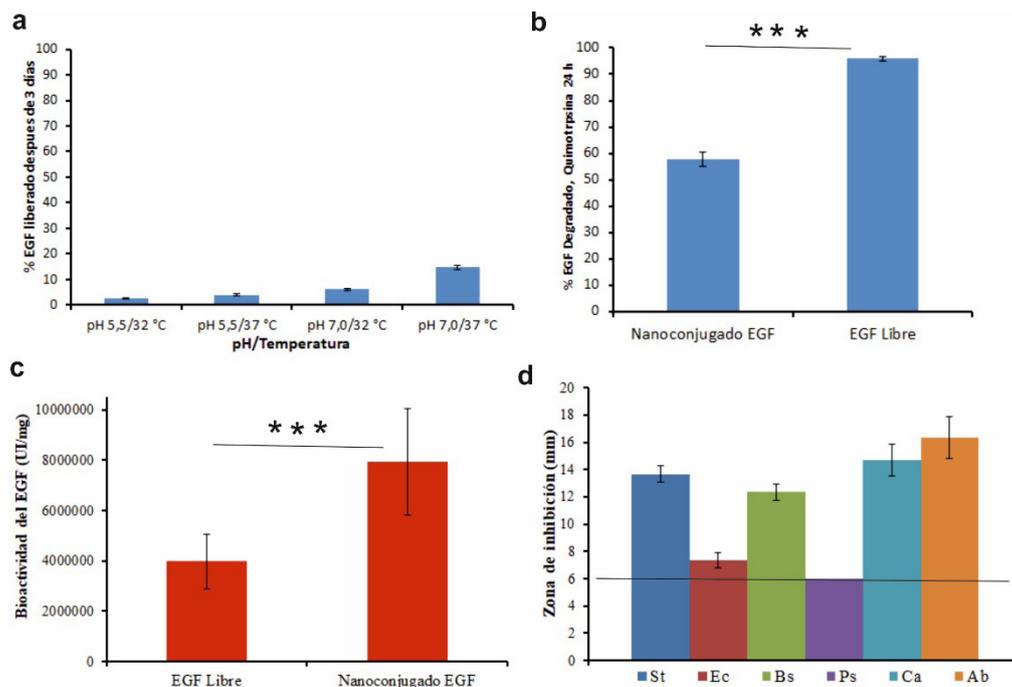


Fig. 4. Estudios in vitro de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico en el medio dispersante (EtOH 10 % v/v en tampón histidina-HCl 5 mM, pH 7,0); A) perfil de liberación en el tiempo de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico (EGF 100 µg/mL) a diferentes valores de pH y temperatura de incubación; B) evaluación de la estabilidad proteolítica después de 24 h del factor de crecimiento epidérmico libre y los nanoconjugados de EGF a 100 µg/mL en presencia de quimotripsina a la temperatura de 32 °C; C) actividad biológica específica del factor de crecimiento epidérmico y los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico en el ensayo de proliferación celular en la línea celular de fibroblastos murinos 3T3 A431; D) actividad antimicrobiana evaluada por zona de inhibición durante los ensayos de difusión en pozos de agar contra diferentes microorganismos. St, *Staphylococcus aureus*; Ec, *Escherichia coli*; Bs, *Bacillus subtilis*; Ps, *Pseudomonas aeruginosa*; Ca, *Candida albicans*; Ab, *Aspergillus brasiliensis*. Leyenda: La línea discontinua representa el diámetro del pozo donde se aplicó la muestra; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representan diferencias estadísticamente significativas; NS, diferencias no significativas. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de una comparación por pares de Tukey.

Es muy importante que el proceso de fabricación utilizado para preparar los nanoconjugados no perjudique la bioactividad de la proteína con la consiguiente pérdida de su función en el sitio de acción. La dilución mínima válida donde los nanoconjugados de EGF no presentan actividad citotóxica en el ensayo de actividad biológica fue mayor de 1/400, las diluciones de todas las muestras evaluadas en el ensayo fueron superiores a 1/400.

Para comparar la bioactividad específica de la proteína en diferentes formulaciones de nanoconjugados de EGF, la actividad específica de las muestras se calculó dividiendo la actividad biológica absoluta por la concentración nominal de proteína de cada muestra. Un punto digno de mención de estos experimentos fue que la bioactividad del EGF no solo se conservó después de la preparación mediante la metodología DELOS-susp, sino que también aumentó (ver figura 4C). Este aumento fue al menos el doble de la potencia de los nanoconjugados de EGF, en comparación con el EGF libre en la misma

concentración aparente. Como se discutió en una sección anterior, el aumento de actividad podría estar relacionado con la inmovilización de la proteína en la membrana de la nanovesícula con probablemente una orientación sitio de unión al receptor específica de la región proteica activa hacia el medio circundante, lo que es favorable para la interacción con el receptor de EGF. Es bien sabido que el receptor de EGF está organizado en pequeños grupos de aproximadamente 150 nm de diámetro promedio en la membrana plasmática de las células.⁽²¹⁾ Esta superficie coincidía bien con la del nanoconjugado de EGF con un diámetro promedio de (50-70) nm (ver figura 2 C y D). Esto favorecería la multimerización del receptor; ya que dos receptores que se unen a ligandos inmovilizados en el mismo nanoconjugado estarían cerca, favoreciendo la señalización dependiente de la dimerización.

Como ya se mencionó la infección de las heridas es uno de los factores más importantes que contribuyen a su cronicidad

y, por tanto, el control eficaz de la infección es un atributo de calidad apropiado para un fármaco administrado por vía tópica destinado a tratar heridas complejas. Se analizó la eficacia anti-microbiana de los nanoconjugados de EGF frente a bacterias, levaduras y hongos. Como se muestra en la figura 4D, los nanoconjugados de EGF presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas, levaduras y hongos. Es notable el hecho de que algunos microorganismos sensibles a los nanoconjugados (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) se encuentran entre los principales microorganismos que se sabe que contribuyen a complicaciones graves en la infección de heridas y la flora microbiana de biopelículas y quemaduras de heridas crónicas. ⁽²²⁾

Las propiedades antimicrobianas encontradas de los nanoconjugados de EGF demostraron el gran potencial de las preparaciones basadas en los mismos como formulaciones tópicas. Por su actividad antiséptica, los nanoconjugados de EGF también puede actuar como agente profiláctico que previene infecciones microbianas, dificultando la formación de biopelículas. Según estos hallazgos, los nanoconjugados de EGF podrían favorecer la señalización del receptor EGF dependiente de dimerización al tiempo que protege a la proteína de otras vías de degradación, permitiendo la optimización de sus propiedades farmacológicas. El tratamiento tópico con dichos nanoconjugados también podría reducir las posibles infecciones por microorganismos y proteger la herida de futuras contaminaciones.

La seguridad y tolerancia de los medicamentos es también un aspecto importante a evaluar. En particular, para los medicamentos que se proponen para administración tópica la prueba de irritación cutánea *in vitro* basada en la directriz 439 de la OCDE en el modelo epidérmico humano EpiSkin™ brinda información relevante. ⁽²³⁾ Para evaluar la potencial citotoxicidad del CTAB, además de los nanoconjugados de EGF y del EGF libre, se evaluó como referencia una solución de este tensioactivo catiónico preparada en el mismo medio y a una concentración de tensioactivo equivalente a la de los nanoconjugados. Bajo las condiciones experimentales aplicadas, los resultados obtenidos de la liberación de interleucina-1 α (factor proinflamatorio liberado en respuesta a un irritante), después de 24 h y 48 h de exposición al producto, permitieron clasificar los nanoconjugados de EGF como no irritantes (figura 5A). Sin embargo, la solución CTAB indujo una respuesta irritante en ambos tiempos de exposición. En ese caso, la liberación de interleucina-1 α fue mayor que 40 pg/mL, siendo este último valor similar al observado por el control negativo del experimento (solución de SDS al 5 % en PBS). Por lo tanto, esta prueba *in vitro* sugirió que la irritación inducida por

CTAB se reduce ampliamente cuando el surfactante se nanoestructura en los nanoconjugados, lo que indica que los mismos podrían tolerarse bien por vía tópica.

Para evaluar el perfil de absorción del EGF contenido en nanoconjugados a través de la piel, se realizaron ensayos de permeación en celdas de difusión tipo Franz. Para reproducir mejor el comportamiento de permeación en las heridas se utiliza piel humana con la función de barrera deteriorada. Como referencia se evaluó una solución de EGF libre usando el mismo medio y que contenía una cantidad total de EGF equivalente a la transportada en los nanoconjugados. La permeación del EGF se reduce significativamente cuando se presenta en forma de nanoconjugados. Después de 24 h, el contenido de EGF en la solución de EGF libre penetró completamente ($103 \% \pm 28 \%$), mientras que solo la mitad de la dosis del EGF en los nanoconjugado traspasó la piel ($50 \% \pm 10 \%$) (ver figura 5B). Este resultado sugiere que los nanoconjugados de EGF permiten una mejor retención de la proteína en la piel, consiguiendo un efecto más local y duradero y, en consecuencia, un tratamiento más eficaz y eficiente. Además, la cuantificación de CTAB después de 24 h mostró que solo el 5 % de la dosis aplicada permeaba la piel, lo que minimiza los potenciales problemas de seguridad del uso de este tensioactivo catiónico (ver figura 5C).

Después del desarrollo de los nanoconjugados de EGF, se demostró la factibilidad de vehiculizar los mismos en una formulación tópica en forma de hidrogel, evidenciando la integridad del sistema supramolecular (Cryo-TEM y espectroscopía FRET) e incrementando significativamente la bioactividad *in vitro* del EGF con relación al hidrogel del EGF libre. ⁽²⁴⁾

Conclusiones

Se sintetizaron nuevos nanoconjugados no covalentes de EGF que comprenden surfactantes amonio cuaternario y colesterol, novedosos en el contexto de los sistemas lipídicos. Se empleó una tecnología de fluidos comprimidos (DELOS-susp) en un solo paso y escalable, que supera a los métodos de preparación de sistemas lipídicos tradicionales. Se aplicó a la caracterización del sistema una amplia batería de técnicas físico-químicas, biofísicas, bioquímicas y biológicas que se encuentran al nivel del estado del arte o superior, que muestran valores apropiados de los principales atributos de calidad críticos de las nanomedicinas coloidales, que desempeñan papeles importantes en la determinación de su estabilidad, atrapamiento del EGF, protección frente a proteasas, potencia del EGF, actividad antimicrobiana, biocompatibilidad y capacidad de localización. Debido a sus propiedades los nanoconjugados de EGF son una plataforma atractiva para el tratamiento tópico de las heridas complejas porque combinan 2 enfoques de los

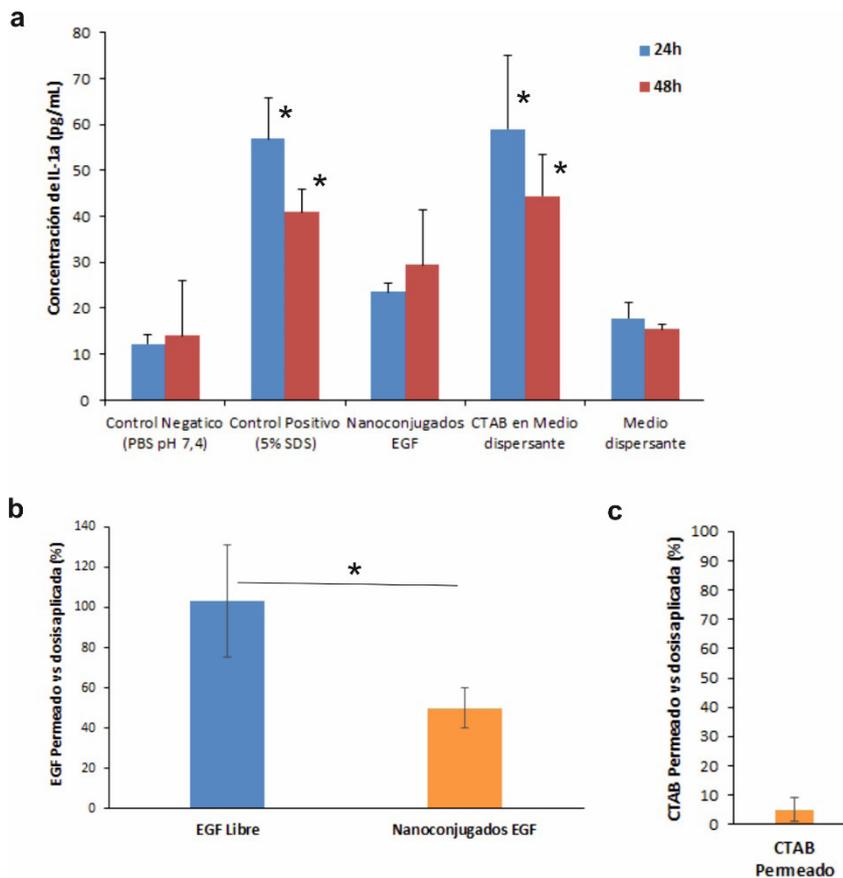


Fig. 5. Estudios *in vitro* de biocompatibilidad y localización de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico en tejido epidérmico; A) irritación cutánea *in vitro* de los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico y los controles correspondientes en el modelo epidérmico humano reconstruido Episkin™; resultados obtenidos de la liberación de interleucina-1α, tras 24 h y 48 h de exposición; * $p < 0,05$ con respecto al control negativo (PBS), determinado mediante ANOVA de 2 vías con la prueba post hoc de Dunnett; B, C) permeación *ex vivo* del factor de crecimiento epidérmico libre y los nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico a través de la piel dañada. B) factor de crecimiento epidérmico permeado (%) después de 24 h en relación con la dosis aplicada. C) bromuro de hexadeciltrimetilamonio permeado (%) después de 24 h en relación con la dosis aplicada. * $p < 0,05$ determinado mediante ANOVA de 2 vías con la prueba post hoc de Sidak

nanomateriales utilizados en la cicatrización de heridas, son un prometedor portador de administración tópica de EGF, que mejora la biodisponibilidad y eficacia de las proteínas, y exhiben propiedades antimicrobianas intrínsecas debido a la composición de su membrana, crucial para prevenir la infección de la herida y lograr una cicatrización adecuada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Sen CK, Gordillo GM, Roy S, *et al.* Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration.* 2009;17(6):763-71.
- Wong VW, Gurtner GC. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. *Experimental dermatology.* 2012;21(10):729-34.
- Bandyk DF. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. In: *Seminars in vascular surgery.* Elsevier; 2018. 43-8 p.
- Boulton AJ, Armstrong DG, Hardman MJ, *et al.* Diagnosis and management of diabetic foot infections. Virginia: American Diabetes Association; 2020.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration.* 2008;16(5):585-601.
- Dinh T. Global perspective on diabetic foot ulcerations: BoD-Books on Demand. 2011.
- Santana H, Ventosa N, Martínez E, Berlanga J, Cabrera I, Veciana J. Vesicles comprising epidermal growth factor and compositions thereof. In: *Google Patents;* 2022. Priority: 02.08.2012 CU 20120112.
- Hamdan S, Pastar I, Drakulich S, *et al.* Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications. *ACS central science.* 2017;3(3):163-75.
- occo I, Zavan B, Bassetto F, *et al.* Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration. *Journal of Nanomaterials.* 2012;(1):714134.

10. Grimaldi N, Andrade F, Segovia N, *et al.* Lipid-based nanovesicles for nanomedicine. *Chemical society reviews*. 2016;45(23):6520-45.
11. Cabrera I, Elizondo E, Esteban O, *et al.* Multifunctional nanovesicle-bioactive conjugates prepared by a one-step scalable method using CO₂-expanded solvents. *Nano letters* 2013;13(8):3766-74.
12. Merlo-Mas J, Tomsen-Melero J, Corchero J-L, *et al.* Application of Quality by Design to the robust preparation of a liposomal GLA formulation by DELOS-susp method. *The Journal of Supercritical Fluids* 2021;173:105204.
13. Valdés J, Mantilla E, Márquez G, *et al.* Improving the expression of Human Epidermal Growth Factor in *Saccharomyces cerevisiae* by manipulating culture conditions. *Biotechnol Apl.* 2009;26(1):1-9.
14. Ferrer-Tasies L, Santana H, Cabrera-Puig I, *et al.* Recombinant human epidermal growth factor/quatsome nanoconjugates: a robust topical delivery system for complex wound healing. *Advanced Therapeutics*. 2021;4(6):2000260.
15. Leyva A, Santana H, Font M, *et al.* An ELISA for quantification of recombinant human EGF in production process samples, serum and urine. *Biologicals*. 2018;51:12-7.
16. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016;6(2):71-9.
17. Alépée N, Grandidier MH, Cotovio J. Skin Irritation Hazard of Chemicals Assessed by the EpiSkin™ In Vitro Test Method. *Alternatives for Dermal Toxicity Testing* 2017:25-39.
18. Porfire A, Achim M, Barbalata C, *et al.* Pharmaceutical development of liposomes using the QbD approach. *Liposomes Adv. Perspect* 2019;2019:1-20.
19. Bonvicini A, Guilhaudis L, Tognetti V, *et al.* Revisiting absorption and electronic circular dichroism spectra of cholesterol in solution: a joint experimental and theoretical study. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2018;20(7):5274-84.
20. Huang H-W, Mohan SK, Yu C. The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its interactions with suramin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;402(4):705-10.
21. Abulrob A, Lu Z, Baumann E, *et al.* Nanoscale imaging of epidermal growth factor receptor clustering: effects of inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(5):3145-56.
22. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(10):1541-9.
23. OECD TN. 439: In vitro skin irritation: Reconstructed human epidermis test method. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section*. 2015;4.
24. Ballell-Hosa L, González-Mira E, Santana H, *et al.* DELOS Nanovesicles-Based Hydrogels: An Advanced Formulation for Topical Use. *Pharmaceutics*. 2022;14(1):199.

Recibido: 14/02/2025

Aprobado: 7/04/2025

Agradecimientos

Agradecemos a los colegas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología que colaboraron con la investigación: Milagros Font Batista, Yenay Díaz León, Yaima González González, Odaly Amarante González, Saily Martínez Gómez, Roxely Mok Arrastía, Maelys Miyares Estrada, Samuel Mesa Alvarez, Yusnelis Bustamante Pérez,

Luisa Glenda Silega, Julio Antonio Ancizar Fragoso, José Suárez Alba, Odalys Ruiz Hernández, Ana Aguilera Barreto, Lizet Aldana Velazco, Jorge Castro Velazco.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses. Los siguientes autores son inventores de la patente (CU 20120112/WO/2014/019555): Héctor Santana Milián, Nora Ventosa Rull, Eduardo Martínez Díaz, Jaume Veciana Miró, Ingrid Cabrera Puig y Jorge Berlanga Acosta. Los siguientes autores son inventores de la patente WO/2006/079889: Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró y Santi Salas Verges, propiedad de Nanomol Technologies SL.

Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies, Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró, Eduardo Martínez Díaz, Ingrid Cabrera Puig, Jorge Berlanga Acosta, Santi Salas Verges, Elisabet González Mira
- Curación de datos: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies, Ingrid Cabrera Puig
- Análisis formal: Héctor Santana Milián, Josep Merlo Mas, Jan Skov Pedersen
- Adquisición de financiamiento: Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró, Santi Salas Verges, Alba Córdoba Insensé
- Investigación: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies, Lidia Ballell Hosa, Ingrid Cabrera Puig, Haydeé Gerónimo Pérez, Glay Chinae Santiago, Viviana Falcón Cama, Carla Castellar Álvarez, Josep Merlo Mas, Judit Morlá Folch, Evelyn Moreno Calvo, Calixto Valdés Pérez
- Metodología: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies, Lidia Ballell Hosa, Ingrid Cabrera Puig, Elisabet González Mira, Alba Córdoba Insensé, Haydeé Gerónimo Pérez, Glay Chinae Santiago, Viviana Falcón Cama, Carla Castellar Álvarez, Josep Merlo Mas, Judit Morlá Folch, Evelyn Moreno Calvo, Jan Skov Pedersen, Calixto Valdés Pérez
- Administración del proyecto: Lidia Ferrer Tasies, Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró, Eduardo Martínez Díaz, Santi Salas Verges, Elisabet González Mira, Miladys Limonta Fernández, Fidel Raúl Castro Odio, Dinorah Torres Idavoy
- Recursos: Héctor Santana Milián, Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró, Eduardo Martínez Díaz, Jorge Berlanga Acosta, Santi Salas Verges, Miladys Limonta Fernández
- **Software**: Josep Merlo Mas, Jan Skov Pedersen
- Supervisión: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies, Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró, Eduardo Martínez Díaz, Santi Salas Verges, Alba Córdoba Insensé, Miladys Limonta Fernández, Calixto Valdés Pérez, Fidel Raúl Castro Odio, Dinorah Torres Idavoy
- Validación: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies
- Visualización: Nora Ventosa Rull
- Redacción-borrador original: Héctor Santana Milián, Lidia Ferrer Tasies, Lidia Ballell Hosa, Ingrid Cabrera Puig, Elisabet González Mira, Glay Chinae Santiago, Viviana Falcón Cama, Carla Castellar Álvarez, Josep Merlo Mas, Jan Skov Pedersen
- Redacción-revisión y edición: Nora Ventosa Rull, Jaume Veciana Miró, Eduardo Martínez Díaz, Santi Salas Verges, Alba Córdoba Insensé

Financiamientos

Los autores están financiados por sus respectivas instituciones.

Cómo citar este artículo

Santana Milián H, Ferrer Tasies L, Ventosa Rull N, Ballell Hosa L, Veciana Miró J, Martínez Díaz E et al. Nanoconjugados de factor de crecimiento epidérmico que comprenden surfactantes amonio cuaternario y colesterol. An Acad Cienc Cuba [internet] 2024 [citado en día, mes y año];15(2):e2923. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/2923>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2025.

