

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



DESARROLLO DE NANOSISTEMAS HÍBRIDOS
MAGNETITA/POLIETILENIMINA CON FINES BIOMÉDICOS

TESIS DOCTORAL

José Raúl Megías Iglesias
Granada, Septiembre 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Raul Megías Iglesias
ISBN: 978-84-9163-872-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/51243>

D^a. Margarita López-Viota Gallardo, Contratada Doctor Interino del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, D. José Luis Arias Mediano, Profesor Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que se presenta en esta memoria, titulado:

**DESARROLLO DE NANOSISTEMAS HÍBRIDOS
MAGNETITA/POLIETILENIMINA CON FINES BIOMÉDICOS**

ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica bajo nuestra dirección, por el Licenciado de Grado D. José Raúl Megías Iglesias, y constituye su Tesis Doctoral.

Con esta fecha autorizamos su presentación ante la comisión de Doctorado de la Universidad de Granada.

Granada, 04 de Septiembre de 2017

Fdo.: Margarita López-Viota Gallardo.

Fdo.: José Luis Arias Mediano.

El Doctorando,

José Raúl Megías Iglesias

Es turno de concluir este camino que, sin saberlo, empecé hace ya más de 10 años. Casi la mitad de mi vida dedicada a culminar un recorrido cuyo mejor resumen científico es este texto. No obstante, no todo ha sido ciencia, también he tenido espacio para el desarrollo y recreo personal. En este apartado quiero referirme especialmente a esa segunda parte, a las personas que, de alguna manera, contribuyeron a que mi labor en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica diera este fruto.

Hay muchas personas que se me vienen a la mente cuando pienso en esta etapa pero, sin duda, la primera es siempre mi profesora Visitación Gallardo Lara. Ella fue quien sembró la semilla del interés por la investigación y, sin ella, posiblemente mi paso por la Universidad habría sido mucho más convencional. No sé qué le hizo pensar en aquel momento que un alumno más preocupado por la diversión y bastante irresponsable podía ser un buen candidato a trabajar en su departamento pero, fuera lo que fuera, tengo que agradecerle su confianza en mí. Sin ella, esto no habría sido posible.

Tengo que agradecer a mis directores de Tesis José Luis Arias Mediano y Margarita López-Viota Gallardo. José Luis me ha acompañado desde mis primeros compases en investigación hasta los últimos dándome un ejemplo a seguir y un modelo de trabajo bien hecho y esfuerzo del que he intentado aprender en todo momento. Muchas gracias José Luis por todo lo que me has enseñado, no solo en el ámbito de la investigación, eres el compañero que cualquiera querría. Margarita ha supuesto un apoyo moral y científico imprescindible sin el cual no creo que pudiera haber alcanzado esta meta. Su cercanía, dedicación y tesón, afortunadamente contagiosos, sirvieron en más de una ocasión como punto de apoyo para continuar en momentos de flaqueza. De nuevo una jefa que, más que eso, es una compañera. Muchas gracias Margarita por todo tu apoyo y enseñanzas.

Si nombrara a todos los compañeros del departamento que, sin ser protagonistas, fueron imprescindibles también en mis periplos seguramente no acabaría, llevo vinculado al Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica ya muchos años y, casi serían los compañeros de una vida. Muchas gracias a todos vosotros

por vuestra ayuda, amistad, sonrisas, apoyo, cafés, todo, muchas gracias por todo lo que me habéis dado y todo lo que me llevo de vosotros, me habéis ayudado a ser mejor profesional y persona.

En cualquier caso, mis investigaciones también se llevaron a cabo en otros lugares más allá del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, los próximos párrafos están dedicados a ellos.

Muchas gracias Ángel Delgado por abrirme las puertas del Departamento de Física Aplicada y hacer también de apoyo en áreas de investigación donde tenía mucho que aprender. Tus conocimientos y predisposición me han hecho crecer y ser capaz de comprender muchas cosas de la física de las nanopartículas. Me siento muy afortunado por haberme cruzado en tu camino.

Muchas gracias al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad del país Vasco y, muy especialmente, al Catedrático Jose Luis Pedraz, por acogerme sin condición en el seno de su grupo de investigación en el que pude culminar mi trabajo de laboratorio. No puedo pasar la ocasión de mencionar a Gustavo Puras, compañero de pupitre y mentor que siempre estuvo pendiente de que mi estancia fuera provechosa y agradable. Todo un ejemplo de dedicación, esfuerzo y positivismo del que tuve la suerte de poder aprender, muchas gracias por todo Gustavo. Y por último, aunque no por ello menos importante, Edi, que aunque a veces parecía más preocupado por mostrarme la cara lúdica de Vitoria, lo cual agradezco mucho, también demostró ser un gran investigador del que pude aprender numerosas técnicas. Muchas gracias Edi por tu amistad. Como es de esperar tampoco puedo nombrar a todas las personas que formaban la “piña de Vitoria” en la que me sentí perfectamente integrado pero, para todos mi más sincero agradecimiento, hicisteis de mi estancia en Vitoria algo muy especial.

Agradecer a mi familia, mis padres María y José a los cuales les debo todo, poco más puedo decir. No me olvido de aquellos que me acompañaron y dejaron de poder hacerlo, mis abuelos, los cuales me mostraron una cara de la vida que tardé en comprender. Muchas gracias.

A mi compañera de viaje, Vanessa, la cual se convierte frecuentemente en el

motivo por el que seguir avanzando. Tu sonrisa es lo más especial que he encontrado en este mundo, gracias por ser como eres.

A todos mis amigos, compañeros, conocidos que no he podido nombrar pero sin los que no sería quien soy y no habría llegado hasta donde lo he hecho. Gracias.

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Nanotecnología	1
1.1.1 <i>Nanotecnología en la actualidad</i>	1
1.1.2 <i>Fundamentos teóricos de la nanotecnología</i>	2
1.1.3 <i>Nanotecnología aplicada</i>	3
1.2 Óxidos de hierro superparamagnéticos	5
1.2.1 <i>Magnetita</i>	9
1.3 Biopolímeros	11
1.2.1 <i>Magnetita</i>	14
1.4 Terapia génica	21
1.4.1 <i>Terapia génica germinal</i>	23
1.4.2 <i>Terapia génica somática</i>	24
<u>1.4.2.1 Vectores virales</u>	26
1.4.2.1.1 Herpex Simplex Virus (HSV).....	27
1.4.2.1.1 Adenovirus y virus adeno-asociados.....	28
1.4.2.1.3 Lentivirus.....	29
1.4.2.1.4 Virus espumoso humano.....	30
<u>1.4.2.2 Vectores no virales</u>	31
1.4.2.2.1 Métodos físicos.....	31
1.4.2.2.1.1 ADN Desnudo.....	31
1.4.2.2.1.2 Pistola de genes.....	32
1.4.2.2.1.3 Electroporación.....	32
1.4.2.2.1.4 Hidrodinamia.....	33
1.4.2.2.1.5 Magnetofección.....	34
1.4.2.2.2 Métodos químicos.....	35
1.5 Terapia celular: Transporte y marcaje celular	40
Capítulo 2. Objetivos	47

Capítulo 3. Metodología	49
3.1 Síntesis de nanopartículas de magnetita.....	49
3.2 Tratamiento químico de la superficie de los núcleos de magnetita.....	50
3.3 Obtención de las nanopartículas magnetita/PEI.....	51
3.4. Rendimiento de los procesos de síntesis.....	52
3.5. Caracterización del tamaño de partícula y geometría.....	53
3.5.1 Espectroscopía por correlación de fotones.....	53
3.5.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	53
3.5.3 Microscopía electrónica de barrido.....	57
3.5.4. Microscopía electrónica de barrido/transmisión.....	60
3.5.5. Espectroscopía de energía dispersiva.....	62
3.6 Caracterización electroforética.....	63
3.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	64
3.8 Difracción de Rayos X.....	65
3.9 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	67
3.10 Análisis de respuesta magnética. Ciclos de histéresis. Observación macroscópica.....	70
3.11 Cultivo y transfección de la línea celular HEK-293.....	71
3.12 Cultivo y absorción de hierro en línea celular D1-MSCs.....	72
3.13 Ensayo de viabilidad de la línea celular D1-MSCs.....	73
3.14 Ensayo de enriquecimiento celular de la línea celular D1-MSCs.....	74
3.15 Análisis estadístico.....	74
CAPÍTULO 4. Resultados y discusión	76
4.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas.....	76
4.1.1 Núcleos magnéticos.....	76
4.1.2 Nanocompuestos magnetita/PEI.....	80
4.2 Influencia de la proporción magnetita/PEI en la síntesis de los nanocompuestos magnéticos.....	81
4.3 Influencia del pH y la fuerza iónica en la carga eléctrica superficial de las nanopartículas.....	83

4.4 Estudio icrofotográfico de las nanopartículas Magnetita/PEI.....	85
4.4.1 <i>Microscopía electrónica de transmisión.....</i>	<i>85</i>
4.4.2 <i>Microscopía electrónica de barrido y de barrido transmisión.....</i>	<i>86</i>
4.4.3 <i>Espectroscopía de energía dispersiva.....</i>	<i>88</i>
4.5 Rendimiento de los procedimientos de síntesis de nanocompuestos magnetita/PEI.....	90
4.6 Difracción de Rayos X.....	91
4.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.....	92
4.8 Comportamiento magnético.....	94
4.8.1 <i>Curvas de histéresis.....</i>	<i>94</i>
4.8.2 <i>Observación macroscópica.....</i>	<i>95</i>
4.8.3 <i>Observación microscópica.....</i>	<i>97</i>
4.9 Unión, protección y liberación de ADN desde las nanopartículas magnetita/PEI.....	98
4.10 Eficacia de transfección.....	100
4.10.1 <i>Citometría de flujo.....</i>	<i>100</i>
4.10.2 <i>Microscopía de fluorescencia.....</i>	<i>101</i>
4.11 Internalización de hierro.....	103
4.12 Actividad metabólica y viabilidad celular.....	105
4.13 Enriquecimiento celular.....	106
CAPÍTULO 5. Conclusiones.....	108
CAPÍTULO 6. Bibliografía.....	111

Capítulo 1. Introducción

1.1 Nanotecnología

1.1.1 Nanotecnología en la actualidad

La nanotecnología ha transformado nuestro mundo durante las últimas dos décadas. Actualmente, es un campo de conocimiento en efervescencia y de tan amplia expansión que cuesta incluso quedarse con una única de sus definiciones. Aquí se expone la definición ofrecida por el Consejo Nacional de Nanotecnología de los EEUU: “La manipulación de la materia con al menos una dimensión entre 1 a 100 nanómetros”. Esta forma de describirla es especialmente acertada por dos motivos:

1. Es una definición amplia: donde realmente queda patente su enorme aplicabilidad. Esto ha hecho posible que se aplique en muchos sectores diferentes como el electrónico o la medicina, llegando incluso a liderarlos.

2. Plasma su esencia: el manejo de la materia a una escala donde los fenómenos cuánticos toman más relevancia provocando que la materia deje de comportarse como un entorno infinito y que aparezcan nuevas propiedades exclusivas de esta escala.

La comprensión del potencial de esta ciencia y su florecimiento puede fecharse en el año 1998. Fue entonces cuando el Centro de Evaluación de la Tecnología Mundial terminó un análisis a nivel global sobre las diferentes investigaciones en Nanotecnología del planeta, destapando así sus prometedoras aplicaciones y poniendo de manifiesto dos de sus más importantes bases:

1. Las propiedades de los materiales tienen una longitud de onda crítica asociada. Cuando el tamaño del material alcanza dicha dimensión sus propiedades pueden sufrir profundas variaciones.

2. La nanotecnología es una ciencia multidisciplinar y transversal. Muchos investigadores de diversos campos abordan su estudio buscando tanto su comprensión (nanotecnología teórica) como su aplicación en diversas áreas de conocimiento (nanotecnología aplicada).

Desde ese punto se inició toda una carrera en subvenciones y facilidades para el desarrollo de la nanotecnología a lo largo del globo que la terminó colocando como una de las grandes revoluciones tecnológicas.

1.1.2 Fundamentos teóricos de la nanotecnología

En nuestra vida diaria estamos acostumbrados a tratar con escalas y objetos macroscópicos. En este orden de dimensiones los materiales se comportan de la misma manera ya sean de pocos centímetros o varios metros. Esto se debe a que en la escala atómica todos los átomos pueden comportarse como si su entorno fuera infinito. Llegado cierto punto, la limitación en el espacio de un material puede hacer que sus átomos ya no se comporten de ese modo lo que se conoce como confinamiento. Esto va a originar impedimentos en la movilidad electrónica y en la interacción interatómica. Es así como aparecen los conceptos de pozo cuántico, alambre cuántico y punto cuántico; materiales que tienen una, dos o las tres de sus dimensiones de

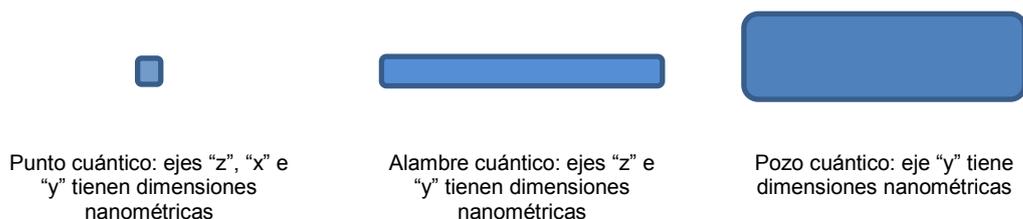


Figura 1. Esquema de los tres tipos de materiales nanométricos según su confinamiento tamaño nanométrico (Figura 1.).

Algunas de las propiedades susceptibles de sufrir variaciones debido a este fenómeno de confinamiento son las mecánicas, ferroeléctricas y ferromagnéticas. Para comprender mejor el impacto de la escala nanométrica sobre las propiedades del material se va a estudiar un ejemplo como es la conductividad eléctrica.

Los sistemas eléctricos macroscópicos presentan electrones conductores deslocalizados que pueden moverse libremente en todas las direcciones a lo largo de todo el material. Cuando limitamos alguna de esas dimensiones llevándola a una escala nanométrica, los electrones dejan de moverse libremente debido a una limitación de espacio y pasando a ser electrones confinados en lugar de deslocalizados. En este punto, la influencia de las fuerzas electrostáticas cobran una importancia aún mayor y los electrones quedan retenidos por una barrera electrostática que deben superar para moverse. A este confinamiento de los electrones es lo que se conoce como pozo de potencial, una región cerrada cargada de energías negativas.

La aparición de estos fenómenos en la escala nanométrica, ausentes a mayores tamaños, son la explicación de que el mismo material sea capaz de exhibir unas propiedades y comportamientos diferentes en función de su tamaño.

1.1.3 Nanotecnología aplicada

Conociendo un poco las bases de esta nueva ciencia parece lógico preguntarse: ¿Qué es lo que ha hecho que en los últimos años todo parezca volverse “nano”? Pues, sin ninguna duda, su completa transversalidad. En teoría, si tienes un soporte físico, éste es susceptible de ser manipulado y trabajado en la escala nanométrica ofreciendo un nuevo abanico de oportunidades que otorgan las propiedades específicas de los materiales cuando se emplean en dicha escala. Algunas de las tecnologías más punteras ya están viendo incrementada su eficiencia gracias a la aplicación de la

nanotecnología. Dentro del campo de las energías renovables, y más concretamente la energía solar, la nanotecnología se emplea para mejorar el rendimiento de los colectores solares gracias al diseño de nanofluidos, los cuales permiten mejorar la conversión de energía solar en calor o electricidad (Hussein, 2016). Otro ejemplo lo encontramos en la ingeniería agrónoma donde diferentes nanosistemas se utilizan como sistemas de liberación de agroquímicos y sustancias activas (Wang, Lombi, Zhao, & Kopittke, 2016). Podríamos seguir citando diversas áreas de conocimiento donde la nanotecnología se reivindica como necesaria para sobrevivir a las exigencias de hoy en día: industria alimentaria (Dasgupta et al., 2015), construcción (Niroumand, Zain, & Jamil, 2013), tratamiento de aguas (Qu, Alvarez, & Li, 2013) y química analítica (Trojanowicz, 2016) por citar algunos ejemplos.

Centrándonos en la medicina, la nanotecnología se torna en el camino a seguir para continuar con la lucha de patologías cuyos tratamientos no son a día de hoy satisfactorios. Este es el caso por ejemplo de la lucha contra el VIH, en la que el desarrollo de fármacos que permitieron combatir la infección y mantener al paciente con vida terminaron por hacer aparecer otras complicaciones como la llamada NeuroAIDS. Esta se refiere a la aparición de complicaciones nerviosas como resultado de un acantonamiento del VIH en el cerebro. La nanotecnología es presentada aquí como herramienta terapéutica eficaz para dar solución al problema ya que otorga numerosas ventajas en el transporte de fármacos contra el VIH a nivel cerebral (Nair, Jayant, Kaushik, & Sagar, 2016). Otra herramienta médica revolucionada por la nanotecnología es la hipertermia y su empleo contra el cáncer. En este ámbito, gracias al uso de nanopartículas (NPs) con un comportamiento magnético específico y con la capacidad de alojarse en el tumor de manera selectiva se pueden conseguir varias mejoras. Algunas de ellas son una generación de calor desde dentro hacia fuera, es decir, que el foco de calor se condensa específicamente en el tumor, con lo que se consigue una disminución de efectos adversos a nivel local. Pero la cosa no se queda ahí, en hipertermia han aparecido y se han desarrollado muchas estrategias novedosas como la hipertermia por

nanoultrasonidos, la ablación por nanoradiofrecuencia o la terapia nanofototermal, gracias a la aplicación de NPs (Beik et al., 2016).

Del mismo modo, la farmacia ha bebido de estos nuevos avances para la elaboración de más y mejores medicamentos que abarcan de una manera más eficaz al espectro de patologías de hoy en día. Dentro de todos los campos de avance presentes en farmacia podríamos citar un apartado de “nuevas formas farmacéuticas”, donde se abandonan viejos conocidos como el comprimido, la cápsula gelatinosa blanda o el jarabe, para dar paso a formas tan sofisticadas como vectores génicos inyectables, ferrofluidos sensibles a gradientes de campo magnético externo (GCMEs) o *stents* liberadores de fármaco.

1.2 Óxidos de hierro superparamagnéticos

Dentro de todos los “nuevos” materiales que han aportado a la medicina la nanotecnología, uno de los más relevantes y con amplio recorrido son los óxidos de hierro superparamagnéticos (SPIONs), también conocidos como SPIONs del inglés *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*.

Los SPIONs más utilizados son de magnetita y maghemita, aunque existen otros materiales con los que obtenerlos como el hierro carbonilo. Posiblemente esto sea debido a su elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que los convierte en una sustancia prácticamente inocua en el organismo. Su pequeño tamaño, en torno a los 10 nm de diámetro, y sus formas esféricas y redondeadas están muy relacionadas con dichas propiedades y la pérdida de ellas podría convertirlos en no biocompatibles. Sin embargo, lo que realmente las hace brillar dentro de la biomedicina son sus peculiares propiedades magnéticas recogidas bajo el término superparamagnetismo. Este comportamiento magnético está presente en materiales cuyas interacciones ferromagnéticas son intensas en su interior pero débiles con otras porciones del mismo material. Esto es lo que ocurre exactamente en los SPIONs, donde, dentro del coloide, cada NP presenta su

propio momento magnético pero es incapaz de alinearse con el de las otras NP de su entorno. Como consecuencia, todo el material tiene sus vectores magnéticos dispuestos de manera aleatoria y la sumatoria de todos ellos es cero. Al aplicar un GCME, todos los vectores magnéticos de las partículas se alinean con él y aparece la respuesta magnética. Otra característica de estos materiales es que no presentan histéresis, es decir, al retirar el GCME, no queda un vector de magnetización neto remanente y el conjunto vuelve a no mostrar vector de magnetización neto.

Algunas de las aplicaciones más extendidas de estos materiales son:

1. Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen: esta técnica se basa en aplicar al paciente un GCME y someterlo posteriormente a un pulso u onda de radiofrecuencia. Con la aplicación del gradiente de campo magnético inicial, conseguimos que los átomos de hidrógeno presentes en el cuerpo del paciente se alineen todos en la misma dirección del espacio. Posteriormente, el pulso de radiofrecuencia altera esa orientación y, al desaparecer, los átomos de hidrógeno vuelven a alinearse con el GCME. Este cambio de conformación en su estado vibracional desprende una energía que puede ser recogida por un sistema informático y convertido en una imagen tridimensional de las estructuras del cuerpo del paciente. El contraste de esta técnica puede verse alterado por la presencia *in vivo* de sustancias magnéticas. Esto es así debido a la capacidad que tienen de modificar los tiempos de relajación de los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua cercanas. Sin embargo, existen diversos tipos de agentes de contraste, cada uno con una aplicación particular, o con capacidad para conseguir modificar la señal de una manera concreta. Por ejemplo, los coloides magnéticos a base de SPIONs pueden ser usados para disminuir la señal en negativo de la imagen en aquellas que sea excesiva y permita ver la imagen con claridad (Bellizzi, Bucci, & Capozzoli, 2010). Esta capacidad de alterar la señal en una resonancia magnética de imagen (RMI) también ha llevado a estos SPIONs a otras aplicaciones diagnósticas diferentes. Por ejemplo, ciertos óxidos de hierro con la capacidad de incrementar la relaxividad en la RMI pueden ser recubiertos y funcionalizados

con anticuerpos específicos. Así formulados, pueden utilizarse para servir como moléculas de diagnóstico frente a antígenos específicos del anticuerpo utilizado ya que al reconocerlos van a generar nanocomplejos fácilmente detectables por ese cambio en la relaxividad en una imagen obtenida por RMI. Esta técnica se conoce como DMR o resonancia magnética de diagnóstico (Mornet, Vasseur, Grasset, & Duguet, 2004).

2. Hipertermia: La hipertermia consiste en una elevación controlada de la temperatura en el organismo, o alguna parte del mismo, con fines terapéuticos. Hoy día se emplea en el tratamiento del cáncer como coadyuvante de otras estrategias terapéuticas como pueden ser la radio o farmacoterapia. Esta aplicación conjunta hacen aflorar efectos sinérgicos que consiguen una eficacia antitumoral mucho más elevada que cuando son utilizadas ambas por separado. Las ventajas que aportan son una mayor tasa de curación, menor requerimiento de dosis y otra serie de ventajas que dependen de la técnica en la que la hipertermia se emplee como auxiliar. El mecanismo por el cual las NPs magnéticas consiguen un aumento localizado de la temperatura se basa en la aplicación de un GCME de corriente alterna. Este gradiente atraparé a las NPs selectivamente en la zona deseada, como por ejemplo un tumor, y las hará vibrar gracias a su carácter alterno. Recordemos que las NPs magnéticas de bajo tamaño son superparamagnéticas, esto significa que no van a producir calor como consecuencia de la pérdida de histéresis por estar sometidas a un gradiente de campo magnético alternante. El incremento en la temperatura se explica por la relajación del momento magnético de la partícula hasta su orientación de equilibrio, un fenómeno conocido como relajación de Néel. Además, se puede atribuir parte del calor al movimiento browniano y a la rotación de la propia partícula como un todo, derivado del uso del gradiente de campo magnético de corriente alterna (Mornet et al., 2004).

3. Sistemas transportadores: Uno de los mayores problemas de la quimioterapia consiste en la falta de selectividad de los fármacos por su diana. Esto se traduce en que ejercen sus efectos en el lugar deseado y también en el resto del cuerpo, pudiendo llegarse a producir reacciones adversas. En ciertas

patologías donde los fármacos empleados son especialmente agresivos y poco selectivos, esto supone un grave problema que incluso llega a conducir a la ineficacia terapéutica. El empleo de coloides magnéticos inyectables para conseguir a través de un GCME concentrar la dosis en el lugar deseado, nos permite emplear dosis más bajas y disminuir los efectos secundarios a la misma vez. Sin embargo, el empleo de SPIONs *per se*, presenta ciertos problemas como transportadores de fármaco. No tienen gran capacidad de carga, sufren fácilmente procesos de oxidación que los alteran, y presentan tendencia a la agregación debida a interacciones dipolo-dipolo (Chomoucka et al., 2010). El recubrimiento polimérico de los SPIONs solventa estos problemas y además otorga la posibilidad de funcionalizar la NP resultante. De esta manera se consiguen múltiples aplicaciones para estos vehículos. Por ejemplo, en terapia fotodinámica, gracias al empleo de SPIONs con cubierta polimérica se consigue proteger y dirigir a los agentes fotosensibilizadores hasta el lugar de acción (Sun et al., 2009). Otro ejemplo lo constituye el diseño de un sistema formado por un núcleo de óxido de hierro y un recubrimiento polimérico como agente transportador de doxorubicina. Este diseño permite la combinación de quimioterapia e hipertermia dentro de la misma formulación y consigue un efecto sinérgico entre ambas (Purushotham & Ramanujan, 2010).

4. Magnetofección: la magnetofección consiste en el transporte de material genético guiado por un gradiente de campo magnético externo. Esto se consigue gracias al empleo de SPIONs que pueden transportar directamente el material genético a la célula diana o incorporarse a otro sistema transportador para dotarlos de capacidad de respuesta magnética. El mecanismo por el que la magnetofección se lleva a cabo no dista de una transfección habitual. El agente transfectante funcionalizado con SPIONs llega a la superficie celular donde queda retenido y es internalizado por endocitosis. A continuación, es integrado dentro de un lisosoma desde donde se libera el material genético al citoplasma. Finalmente, se incorporará al genoma de la célula diana y comenzará la transcripción del gen transportado. La mayor parte de estos estudios se llevan a cabo a través del empleo de plásmidos codificantes para la proteína fluorescente verde (GFP) cuya facilidad para ser observada y

cuantificada la hace idónea para estudiar la viabilidad y eficacia de los procesos de transfección (Park & Takimoto, 2016).

1.2.1 Magnetita

La magnetita es un óxido de hierro ferrimagnético presente en la naturaleza en forma de mineral cuya fórmula química es Fe_3O_4 . Su comportamiento magnético, típico de un imán, se debe a que los momentos magnéticos de los átomos de hierro que la componen se alinean todos en la misma dirección pero no en el mismo sentido. Esto hace que no todos los momentos magnéticos se anulen entre sí de tal manera que el material se comporta netamente como un imán. Si calentásemos la magnetita por encima de su punto de Curie, este ferrimagnetismo se perdería y pasaríamos a un comportamiento de paramagnetismo, donde el vector de magnetización neto adquiere un valor de cero.

Su uso como nanomaterial en forma de NPs (8-12 nm de diámetro), le permite formar en suspensión acuosa un coloide magnético. A dicha escala, este material pierde su ferrimagnetismo para dar paso al superparamagnetismo. Este hecho unido fácil metabolización en el organismo, posibilidad de funcionalización y elevado momento magnético capaz de atravesar el cuerpo humano, hizo que la magnetita en la década de los años 90 diera el salto desde aplicaciones como grabaciones magnéticas, altavoces o tintas magnéticas, hasta la Biomedicina. Las aplicaciones biomédicas más estudiadas de este óxido de hierro desde entonces son las siguientes:

1. Transporte de fármacos: la magnetita se encuentra implicada en la vehiculización de fármacos de dos formas diferentes: como transportador de principios activos o como base magnética para la elaboración de nanotransportadores más complejos. Un fármaco antitumoral, como es la doxorubicina, puede ser vehiculizado en núcleos de magnetita para conseguir una mayor selectividad por la masa tumoral con la consecuente disminución de la dosis requerida (Guo, Li, Zhang, Li, & Wang, 2009). Sin embargo, lo más

común en cuanto a magnetita y transporte de fármacos se refiere, es el empleo de la misma para dotar a otro sistema transportador de la capacidad de respuesta a GCME. Esto le otorga ciertas ventajas, como pueden ser la posibilidad de controlar el lugar de liberación gracias a la aplicación de GCME o combinar diferentes estrategias terapéuticas como la quimioterapia e hipertermia (Arias, Ruiz, Gallardo, & Delgado, 2008).

2. Agentes de contraste en RMI: gracias a su elevada relaxividad, a su buena biocompatibilidad y a la capacidad de crear núcleos magnéticos de muy pequeño tamaño, la magnetita ha sido empleada desde hace años como agente de contraste en RMI. Aunque su uso para esta finalidad es más que conocido, el reto ahora consiste en conseguir nuevas aplicaciones a estas técnicas de imagen o aumentar la calidad de la información obtenida. En este sentido la magnetita continúa colaborando al avance de la técnica. Por ejemplo, su conjugación a pequeños polipéptidos con afinidad por células cancerosas está abriendo una nueva opción como es la aplicación de la RMI para la obtención de imágenes en directo e *in vivo* del paciente (L.X. Tiefenauer, A. Tschirky, G. Iwhne, 1996).

3. Hipertermia: la magnetita puede ser empleada como agente causante de hipertermia. Algunas de sus características especiales dentro de los SPIONs la convierten en uno de los más utilizados en este campo. La posibilidad de su preparación con elevada uniformidad, monodispersión y pequeño tamaño son algunas de sus ventajas para su aplicación en hipertermia donde la hidrodinámica de los SPIONs una vez localizados dentro en la masa tumoral va a ser fundamental. Estos núcleos pueden someterse a gradientes de campo magnético alternos biológicamente compatibles para conseguir una elevación local de la temperatura de entre 5-9 °C en menos de 30 min (Krishnan et al., 2006).

1.3 Biopolímeros

Con la aparición de conceptos como la biotecnología y la tecnología médica, surgió paralelamente la necesidad de emplear biomateriales para su desarrollo y aplicación. La principal exigencia de estos nuevos materiales era la biocompatibilidad y, en muchos de los casos, la biodegradabilidad. Desde la aparición de esta demanda de nuevos materiales, se puso el foco en los polímeros: macromoléculas constituidas por la unión covalente de unidades repetidas, conocidas como monómeros, gracias a un proceso de polimerización. Muchos de ellos ya cumplían con el requisito de biocompatibilidad, tanto polímeros naturales como sintéticos, y empezaron a seleccionarse y diseñarse para el desarrollo de la “biotecnología”. Por lo tanto, un biopolímero no es más que un polímero que cumple con el requisito de biocompatibilidad.

Una de las grandes ventajas que ofrecen los biopolímeros sintéticos frente a otro grupo de materiales es su capacidad de adaptación. Esto se debe a la posibilidad de amoldar sus propiedades, gracias a su funcionalización o a la obtención de uno nuevo que se ajuste a necesidades específicas según su finalidad. En ingeniería de tejidos se necesitan biomateriales biocompatibles y con una buena capacidad de adherencia celular para que pueda servir como matriz soporte. En la elaboración de sistemas transportadores de fármacos un requisito fundamental es la capacidad de responder a estímulos externos, como un cambio de pH o temperatura lo que posibilita la creación de sistemas inteligentes. Estos van a conseguir un uso óptimo del fármaco transportado gracias a su protección y liberación selectiva en el lugar apropiado de acción.

Las principales aplicaciones de los biopolímeros son las siguientes:

1. Productos sanitarios: gracias a su escasa toxicidad, sus propiedades mecánicas adecuadas y la posibilidad de controlar el tiempo de biodegradación han hecho que los biopolímeros se ganen un hueco en la fabricación de productos sanitarios. Un ejemplo de esto lo encontramos a nivel de ortopedia, donde hace años se empleaban materiales como metales y madera para la elaboración de prótesis y gracias a estos nuevos biomateriales se han

conseguido crear prótesis cuya concepción hace años era difícil de imaginar. El avance ha sido tal que incluso pueden implantarse piezas en el organismo, como clavos para fracturas, sin la necesidad de una posterior intervención para su remoción (Middleton & Tipton, 2000). También se ha desarrollado una nueva forma farmacéutica, los *stent*, cuya finalidad es liberar un fármaco al organismo en un prolongado periodo de tiempo, esto puede hacerse gracias al soporte polimérico en el que se encuentra vehiculado dicho fármaco. De este modo se puede conseguir una acción local y mantenida, presentando la ventaja de que una vez transcurrido dicho tiempo, el *stent* se reabsorberá solo y no será necesaria otra intervención para retirarlo del organismo (Divya, Rama, Prashanth, Senthil Kumar, & Vidya Sagar, 2012). También es importante destacar la labor de los biopolímeros en cuanto al cuidado del medio ambiente. Todos aquellos productos sanitarios de un solo uso, que constituyen una elevada fuente de residuos, se están empezando a fabricar con este tipo de materiales, cuya gestión como residuos es mucho más sencilla y no producen un daño directo al medio ambiente gracias a su biodegradabilidad.

2. Ingeniería tisular: esta ciencia multidisciplinar ha surgido para ofrecer una alternativa a los clásicos trasplantes de órganos y solucionar sus dos grandes inconvenientes: la necesidad de un donante y los problemas asociados al sistema inmune comúnmente conocidos como rechazo. Una de las claves para que la ingeniería de tejidos tenga éxito es el empleo de una matriz biodegradable y biocompatible que sirva de anclaje para llevar a cabo este tipo de procesos además de no desencadenar procesos inflamatorios o inmunológicos. Es por ello que aquí volvemos a encontrar un hueco dentro de la medicina donde los biopolímeros constituyen una herramienta clave de trabajo. Estos materiales pueden satisfacer todos estos requisitos necesarios e incluso ofrecer diferentes tipos de matrices según las necesidades del tipo de tejido que vayamos a reproducir, como hueso o músculo por citar algunos ejemplos (Tian, Tang, Zhuang, Chen, & Jing, 2012).

3. Transporte de fármacos: los biopolímeros han sido empleados en las últimas décadas como base de múltiples sistemas transportadores de

fármacos. Se han constituido con ellos múltiples tipos de plataformas, como NPs o micelas, cada uno con sus propias características. Los biopolímeros más interesantes en este tipo de ámbito son aquellos que, o bien presentan grupos reactivos o son capaces de responder a estímulos externos. Un ejemplo de los primeros puede ser el poli(α -ácido málico). Sus grupos carboxilo le permiten capturar fármacos para formar una micela y conjugarse con ácido fólico lo que aumenta su selectividad por células que sobreexpresen en su superficie receptores para dicha molécula, como algunas líneas de células tumorales. La utilidad de polímeros sensibles a estímulos externos queda demostrada en aquellas formas farmacéuticas de liberación controlada administradas por vía oral. Este tipo de formas farmacéuticas tienen en su composición polímeros que pueden responder frente a determinados pH de tal forma que el fármaco se libere en dichas condiciones. De esta manera y conociendo los diferentes rangos de pH que encontramos a lo largo de todo el tubo digestivo, podemos elaborar una forma farmacéutica que libere el principio activo específicamente en un lugar concreto del aparato digestivo (Ganta, Devalapally, Shahiwala, & Amiji, 2008).

4. Transporte de genes: desde que se empezó a trabajar en terapia génica ha sido necesario el desarrollo de vectores: sistemas víricos o no víricos con la capacidad de transportar, proteger y liberar material genético. El vector ideal debería reunir una buena biocompatibilidad, selectividad por las células diana, y una fácil degradación y eliminación *in vivo*. Inicialmente se emplearon los llamados vectores virales, sistemas transportadores basados en estructuras víricas. Su principal problema es de biocompatibilidad inherente a su propia naturaleza y, es por esto, que empezaron a ensayarse vectores no virales constituidos a base de biopolímeros. Uno de los más estudiados hoy en día, objeto de la presente tesis doctoral, es la PEI, cuyas principales características y aplicaciones se discutirán más adelante.

1.3.1 Polietilenimina

La Polietilenimina (PEI) es un polímero formado por la sucesión del monómero etilenimina. Por tanto, su estructura básica alterna una cadena carbonatada donde cada dos átomos de carbono encontramos uno de nitrógeno. Esta composición característica le otorga una carga eléctrica superficial marcadamente positiva gracias a la cual va a presentar sus principales propiedades y aplicaciones. Hablando en términos generales, existen dos tipos de PEI en función de la estructura que tenga: lineal o ramificada.

Como su nombre indica, la PEI lineal (PEI_L) presenta un monómero tras otro, de tal manera que su estructura tiene un extremo inicial con un carbono hidrófobo, un extremo final donde encontramos a una amina primaria y una sucesión repetitiva de aminas secundaria intercaladas cada dos carbonos. Por otro lado, en la PEI entrecruzada (PEI_E), sí que vamos a encontrar ramificaciones estructurales. Estas ramificaciones son posibles en los átomos de nitrógeno donde pueden insertarse hasta tres monómeros de etilenimina. Las estructuras esquematizadas de ambos tipos de PEI pueden observarse en la Figura 2.

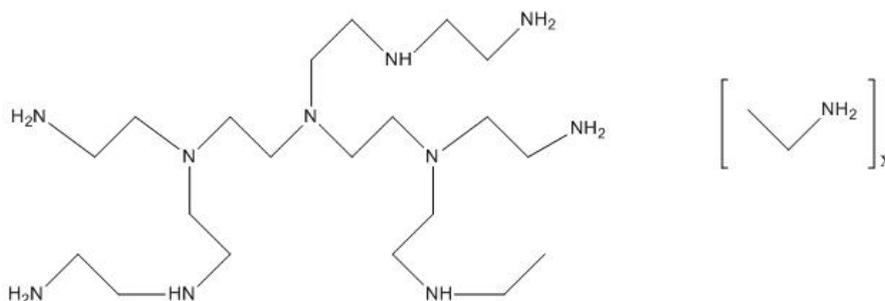


Figura 2. Estructura de la PEI_E (izquierda) y de la PEI_L

Aunque se conoce la existencia de la PEI desde la década de los setenta, no fue hasta finales del siglo XX cuando se empezó su estudio en Biomedicina (Jagur-Grodzinski, 1999). Desde ese momento, el interés por este polímero fue creciendo año tras año debido a sus prometedoras aplicaciones en el transporte de genes. Para ilustrar el proceso de cómo la PEI se ha hecho

huevo en el ámbito de la investigación, se ha elaborado la Figura 3 donde se presentan los resultados obtenidos en cuanto a número de publicaciones al emplear en la búsqueda polietilenimina y polietilenimina + transporte de genes en un conocido buscador de publicaciones científicas: Science-direct.

Como se puede observar en la figura, durante la última década se han quintuplicado los trabajos en cuanto a la PEI y más de la mitad de estos están relacionados con el transporte de genes. Este es uno de los motivos por el que se eligió este polímero para el desarrollo de la presente tesis doctoral ya que constituye una base sólida para comenzar a desarrollar un sistema nanométrico con la capacidad para el transporte de genes.

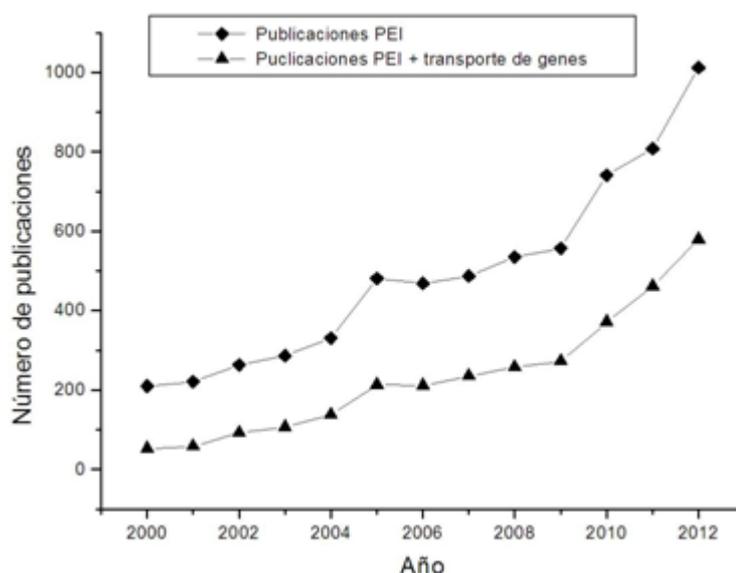


Figura 3. Evolución del número de publicaciones relacionadas con PEI

Uno de los motivos responsable del interés levantado por la PEI es que gracias a la correcta elección del tamaño del polímero a emplear y su grado de entrecruzamiento se pueden acotar y controlar sus propiedades. A continuación se exponen las dos principales variables a seleccionar cuando trabajamos con PEI y se desarrolla cómo pueden influir en el comportamiento del polímero:

1. Grado de entrecruzamiento: cómo el grado de entrecruzamiento influye en el comportamiento del polímero es un hecho que aún continúa redescubriéndose. Actualmente, puede decirse que a mayor grado de entrecruzamiento mayor cantidad de aminas terciarias y primarias aparecen en la estructura química del polímero. Esto trae consigo la consecuente pérdida de aminas secundarias, llegando al caso extremo de comparar la PEI_L, que sólo presenta aminas secundarias, con la PEI_E con un 25% de aminas secundarias y terciarias y un 50% de aminas secundarias aproximadamente. Estas diferentes proporciones de aminas influyen de forma significativa en varias de sus propiedades como son: viabilidad celular, capacidad y modo de acomplejar el ácido desoxirribonucleico (ADN), eficacia de transfección y promoción nuclear. De tal manera que puede tenerse una PEI sensiblemente diferente a otra, dependiendo de su grado de entrecruzamiento.

Por resultar crucial en sus propiedades fisicoquímicas y aplicaciones biomédicas, cabe analizar cómo el grado de entrecruzamiento influye en la capacidad y el modo de acomplejar el ADN así como de las diferencias que hay entre PEI_L y PEI_E. La PEI_E es capaz de acomplejar el ADN en pequeñas vesículas esféricas de tamaños nanométricos en una amplia variedad de entornos. Sin embargo, la PEI_L forma en estos medios complejos micrométricos mucho más grandes y hay que recurrir a medios libres de sales y elevar el ratio N/P (átomos de N de la PEI frente a los de P del material genético) para conseguir unos complejos de tamaño y forma similar a los obtenidos con la PEI_L. Al margen de esta pequeña dificultad, se ha observado que los complejos de PEI_L presentan en general mayor viabilidad celular y capacidad para promover la localización celular lo que se traduce en una mayor eficacia de transfección (Lungwitz, Breunig, Blunk, & Göpferich, 2005; Merdan, Kopeček, & Kissel, 2002).

Mucho se ha discutido en torno a este hecho porque, en principio, cabría esperar una mayor eficacia de transfección de la PEI_E debido a su mayor capacidad como esponja de protones. Esta propiedad se ha definido para la PEI como su capacidad para mantener el pH del entorno en la vesícula

endocítica cuando la célula intenta digerir el contenido descargando una gran cantidad de protones para ello. La mayor capacidad de la PEI_E en este sentido, se justifica por su amplia variedad de aminas y es por este hecho que se considera más eficaz protegiendo el material genético una vez dentro de la célula con respecto a la PEI_L.

Volviendo a la eficacia de transfección, algunos autores hipotetizan que la disparidad en dicho parámetro obtenida entre la PEI_L y la PEI_E se debe a la fase del ciclo celular en el que se encuentren las células a transfectar. Este parámetro puede no ser considerado en ocasiones y generar problemas de reproducibilidad. Brunner et al. han presentado trabajos que evidencian como la PEI_L presenta menor dependencia que la PEI_E con respecto al ciclo celular a la hora de la transfección. Esto se traduce en que cuando se ensaya sobre cultivos o líneas celulares que presentan nula o baja tasa de crecimiento la PEI_L muestra una mayor eficacia, mientras que si se ensaya sobre líneas o cultivos celulares con mayor tasa de crecimiento este parámetro va a dejar de ser influyente. Es en estas ocasiones es en las que la PEI_E es más eficaz que la PEI_L (Brunner et al., 2002).

2. Tamaño: la variedad de pesos moleculares (PM) empleados en la PEI_L es muy amplia, oscilando entre sólo algunos Da y 800 KDa. Con intención de utilizar la PEI más conveniente para cada tipo de uso biomédico, muchos autores han tratado de relacionar su tamaño con el diferente comportamiento del polímero y del sistema para cuya elaboración se emplea. Hablando de transporte de genes, un par de relaciones bien conocidas son cómo influye el tamaño de la PEI en la toxicidad *in vivo* del sistema y en la eficiencia de transfección. Se ha descrito como las PEIs de mayor PM, por ejemplo, 800 KDa son más tóxicas que las de menor PM, como 25 KDa. Sin embargo y como contrapartida, las primeras resultan mucho más eficaces si hablamos de transfección. Esto ha supuesto un dilema desde que se descubrió el potencial de la PEI en terapia génica y se ha trabajado para encontrar el tamaño que permite un mejor transporte de genes. Finalmente, se consensuó que la PEI

de 25KDa es la más adecuada ya que consigue en un margen de toxicidad aceptable la mayor eficiencia posible en el proceso de transfección (Xu et al., 2007).

Aunque es cierto que la PEI centra sus mayores expectativas en el transporte de genes, existen más campos en los que se utiliza y que merece la pena destacar:

1. Sensores químicos: las propiedades eléctricas superficiales características de la PEI la dotan de una singular capacidad para la captura de diferentes moléculas. Esta habilidad se emplea en la industria para fabricar sensores químicos de gran sensibilidad y especificidad en entornos complejos. En estos es más difícil discriminar entre la molécula de interés frente al resto y por ello es más complicado obtener un buen sensor. La síntesis y empleo de nanotubos de carbono funcionalizados con PEI para el empleo de un método de análisis rápido que detecte el grado de enranciamiento del aceite de soja podría ser un ejemplo de esta aplicación con potencial interés en la industria alimentaria (Fai et al., 2011).

2. Enzimas sintéticas: otra de sus aplicaciones es la creación y estudio de enzimas sintéticas. En ellas, la PEI_E constituye el cuerpo del enzima sobre el que se incorporarían los grupos químicos necesarios para dotarla de la forma y capacidad reactiva deseada. La PEI_E es utilizada en este campo por varios motivos: su estructura entrecruzada, su elevada solubilidad en agua y su gran cantidad y variedad de grupos aminos listos para ser funcionalizados. Este tipo de enzimas pueden controlarse gracias a factores externos, como por ejemplo el pH, debido a que modulan la estructura y grupos reactivos del polímero. Por lo tanto, se puede lograr que una enzima sintética fabricada con PEI cambie su reactividad y estructura tridimensional lo que abre un interesante campo de estudio (Suh, Paik, & Hwang, 1994).

3. Polímeros en estrella: la PEI también puede utilizarse como catalizador de la síntesis de polímeros en estrella. Este tipo de estructuras consiste en muchas cadenas de polímero confluyentes en un único punto. La PEI actúa no sólo como iniciador en la síntesis de polimerización sino también como una parte más del polímero en estrella. Ello permite usar el conjunto como un nanotransportador que alberga y transporta en su interior, gracias a la hidrofilia de la PEI, sustancias lipófilas. Un ejemplo de esta aplicación es el polímero en estrella que se obtiene, gracias al empleo de PEI como núcleo, de poli(ϵ -caprolactona) (Cao et al., 2008).

4. Sistemas transportadores de fármacos: la PEI puede utilizarse como parte de sistemas transportadores de fármacos. Las posibilidades son múltiples, desde NPs magnéticas (Lin & Ge, 2011), nanogeles (Li, Wang, Yang, & Li, 2011), liposomas (Thomas et al., 2011) hasta micelas (Qiu & Bae, 2007). Su función en estos sistemas suele ser aportar capacidad de carga gracias a su habilidad para atrapar diferentes fármacos por enlaces de carácter iónico o bien encapsularlos. Sin embargo, su interés no termina ahí ya que debido a su capacidad de respuesta a diferentes estímulos externos, como el pH, puede dotar también al sistema de una liberación inteligente controlada por dichos estímulos. Este hecho se vuelve particularmente interesante cuando hablamos por ejemplo de liberación selectiva. Un objetivo son los tumores localizados ya que presentan diferentes condiciones de pH que el resto del organismo. La mayor eficacia de este tipo de nanotransportadores en quimioterapia frente a otro tipo de estrategias ha sido evidenciada por múltiples trabajos de investigación (Lin & Ge, 2011).

5. RMI: Recientemente ha aparecido una nueva forma de aplicar núcleos magnéticos para la obtención de imágenes por RMI *in vivo* de tumores. Esta nueva técnica consiste en el empleo de unas pequeñas moléculas conocidas como aptámeros capaces de concentrarse de manera específica en las células tumorales del tejido *in vivo*. De esta manera, los aptámeros pueden actuar

como sondas para transportar los núcleos magnéticos necesarios para la obtención de este tipo de imágenes. Sin embargo, el empleo de estas moléculas, consistentes en pequeñas secuencias de ácidos nucleicos, presenta ciertas dificultades. Una de ellas es su rápida degradación cuando circulan por el torrente sanguíneo. El uso de PEI para proteger estos sistemas formados por aptámeros y núcleos magnéticos consigue una mayor perdurabilidad del mismo en la sangre y, por tanto, que pueda aplicarse la técnica obviando los problemas de estabilidad citados (Gong et al., 2012).

1.4 Terapia Génica

La terapia génica consiste en el empleo de material genético como sustancia activa para paliar o tratar una enfermedad. Este concepto se introdujo hace ya bastantes décadas cuando, sin aún medios para hacerlo, se especulaba con la posibilidad y ventajas de usar material genético como herramienta de curación. Por entonces se pensaba que se podrían curar patologías debidas a genes defectuosos pero pronto se amplió el espectro hasta prevención de enfermedades infecciosas o cáncer. Otras opciones como mejora de capacidades y diagnóstico también empezaron a considerarse posibles. Asociadas a éstas promesas también aparecieron advertencias, avisos de que la terapia génica podía traer nuevos problemas consigo y el pronóstico de que harían falta años de trabajo para evaluar si realmente era viable adaptar ese concepto a una realidad clínica. Un editorial de la revista Science en 1971 ya sentaba las bases de los que serían y siguen siendo, los retos a superar y problemas de la terapia génica: necesidad de tratamiento individualizado, mutagénesis, carcinogénesis asociada al uso de virus como vectores del material genético y algunos que mencionaba como “desconocidos” y que hoy en día se han revelado como falta de eficacia y estabilidad en el tiempo (Fox et al., 1971)

El primer gran salto para la terapia génica se produjo con la primera codificación del genoma humano en 2001(Lander et al., 2001). A partir de entonces, se pudieron sentar las bases moleculares de las enfermedades

genéticas de manera concreta y su investigación pudo comenzar a realizarse de una forma precisa, calculada y guiada. Conocer qué genes y en qué secuencia estaban fallando permitía el diseño de secuencias de inserción y genes corregidos específicos para cada una de las enfermedades que se fueron identificando a partir de entonces. Además, este desarrollo permitió conocer mucho mejor toda la genética humana, no solo la que pudiera tener mayor interés en terapia génica, lo que hizo que el campo de la genética creciera súbitamente. Algunos hechos que se ignoraban se pudieron poner de manifiesto:

1. No tenemos más que el doble de genes que codifican para proteínas con respecto a la moscas o el gusano, aunque sí más complejos.

2. Muchos genes humanos parecen haber tenido un origen transversal gracias a la incorporación de material genético procariota

3. La duplicación segmentaria es mucho más frecuente en nuestra especie que otras genéticamente bastante cercanas.

Los errores genéticos, ya identificados, comenzaron a clasificarse en varios tipos: anomalías cromosómicas, defectos de un gen único, multifactoriales y teratogénicos. Para todos ellos la sencilla estrategia del remplazamiento genético podría ser una opción válida *a priori*. En ella, un vector inserta el gen correcto dentro del genoma de las células que lo necesitan y así comienza a expresarse de manera adecuada la proteína ya corregida. No obstante, la terapia génica empezó por intentar solventar aquellos más sencillos y fáciles de tratar según sus premisas: los defectos de gen único.

A pesar de lo planteado en un origen, lo cierto es que la mayor cantidad de procesos en terapia génica se basan actualmente más en la adición de genes que en el remplazamiento de ellos. De los 2400 ensayos clínicos llevados a cabo a la fecha de escribir estas líneas, (The Journal of Gene Medicine, 2017) la mayor parte (65.5%) van destinados al tratamiento del cáncer, una enfermedad candente pero en la que, en principio, la terapia génica

no encontraría su protagonismo. Otras patologías en la que la terapia génica está desarrollando ensayos clínicos son enfermedades adquiridas como el Alzheimer e infecciosas.

Para clasificar los diferentes procesos de terapia génica hay admitida una amplia clasificación en la que diversos criterios se aplican para dar como resultado un “árbol” de procesos terapéuticos basados en material genético (Figura 4). El primer gran criterio que nos encontramos es la célula diana para llevar a cabo dicho proceso. De esta manera podemos encontrar la terapia génica germinal y la terapia génica somática.



Figura 4. Clasificación en árbol de las diferentes ramas de la terapia génica.

1.4.1 Terapia génica germinal

Es aquella basada en la modificación directa del material genético de la célula diana sin necesidad de su vehiculización. Sus células diana son células germinales, es decir, aquellas con capacidad de generar nuevos individuos. Por ello, estas modificaciones genéticas serían hereditarias. A día de hoy su práctica en humanos está prohibida debido a consideraciones éticas. Es la más cercana al concepto clásico de “genética a la carta”. Con ella se podría no solo introducir y reparar material genético de un individuo no nacido sino que se podrían seleccionar todos sus factores fenotípicos para crear un individuo a

medida de lo que dictase un criterio ajeno al propio individuo creado. Algunos de los procesos que han conseguido llevarse a cabo con éxito en este tipo de terapia incluyen:

1. Alteración *ex vivo* de células huevo para su posterior fertilización *in vitro*.
2. Manipulación *in vitro* de células embrionarias de ratón gracias al uso de diferentes formas de inserción de genes.
3. Inyección intranucleica de material genético exógeno.
4. Transporte de transgénicos por diferentes vías hasta gónadas masculinas listas para la fecundación *in vivo* por parte del individuo.

1.4.2 Terapia génica somática

Es una forma más conservadora y convencional de aplicar terapia génica. La gran diferencia con la terapia génica germinal es que las células diana no son susceptibles de dar lugar a nuevos individuos por lo que las modificaciones genéticas que se realizan no son hereditarias. Esto tiene una gran ventaja y es que, teniendo en cuenta las consideraciones éticas actuales, este tipo de terapia génica si puede practicarse en humanos. Sin embargo, no está exento de ciertos inconvenientes:

1. Sus efectos no son perdurables ya que las células diana tienen un periodo de vida útil.
2. Dificultad de acceso a las células diana.
3. Dificultad de protección y transporte del material genético hasta las células diana.

Dentro de la terapia génica somática podemos, a su vez, encontrar tres maneras diferentes de aplicarla:

1. Transporte *ex vivo*: es un método que consiste en introducir el material genético en la célula diana fuera de su organismo. Esta técnica se emplea para introducir genes en fragmentos de órganos como hígado o médula ósea y que luego vuelven a trasplantarse en el individuo. Así se evitan problemas inmunológicos, pero solo es de interés en el caso de que lo que queramos sea conseguir la segregación de una proteína cuya codificación podemos integrar en el genoma de las células gracias a un proceso de transfección *ex vivo*. Por lo tanto, sus aplicaciones son limitadas y, además, las células autotransplantadas tienen una baja tasa de supervivencia (Herrero et al., 2012).

2. Transporte *in situ*: este procedimiento consiste en inocular directamente los vectores en el entorno de las células diana para facilitar la transfección. Esta alternativa presenta una gran ventaja frente al transporte *ex vivo*: evita dos procesos quirúrgicos al paciente como son la biopsia y posterior autotransplante. Sin embargo, presenta tres grandes inconvenientes aún por resolver: requiere de una localización exacta de los vectores en el lugar de acción, una expresión prolongada del gen incorporado pero de duración controlada que termine una vez logrado el éxito terapéutico y, en caso de emplear vectores virales, una infección por parte del vector específica que evite efectos colaterales. Este método ha sido empleado muy frecuentemente en tratamiento de cáncer sin demasiado éxito ya que la supervivencia de pocos ejemplares de célula tumoral puede conseguir la aparición de un nuevo proceso canceroso (Hu, Wang, Hollister, & Krebsbach, 2007).

3. Transporte *in vivo*: la menos solventada de las tres opciones debido a su complejidad y la que mejores usos y aplicaciones puede llegar a tener. Ha día de hoy constituye un extenso campo de trabajo que aspira a solventar todos los problemas que su puesta en práctica está encontrando. La idea base del transporte *in vivo* es la administración de un vector, viral o no viral, al paciente para que éste se dirija a las células diana y libere en ellos el material genético deseado de manera específica y controlada. Dada la complejidad del transporte dirigido e imprevisible comportamiento *in vivo* de los vectores, los problemas de especificidad y eficacia son los mayores enemigos de esta

alternativa.

Independientemente de la rema elegida y si ignoramos la liberación de material genético desnudo cuya utilidad es muy limitada, el transporte de este tipo de sustancias activas va a llevarse a cabo gracias dos tipos de vehículos: los vectores no virales y los vectores virales.

1.4.2.1 Vectores virales

Los vectores virales empleados en terapia génica son principalmente pertenecientes a las familias *Herpex Simplex*, Adenovirus, Virus Espumoso y Lentivirus entre otros. El hecho de que naturalmente estén preparados para llevar a cabo procesos de integración y replicación genética los hace de gran interés en terapia génica. No obstante, precisamente esa naturaleza infectiva también se limita su uso debido a los procesos no deseados de inmunogenicidad e infección que pueden desarrollar. Para evitar estos efectos negativos, los virus son sometidos a un proceso de ingeniería genética gracias al cual se eliminan algunos genes necesarios para su replicación y, en su lugar, se insertan los genes terapéuticos. Así, los virus pasan a un estado no infectivo ya que no pueden desarrollar su ciclo de replicación con normalidad. Aunque es una solución, este proceso genera otro problema asociado, los virus ya no pueden “autoproducirse” y hay que producirlos en mayores cantidades y de manera más dificultosa. Una última vuelta de tuerca que permite al virus replicarse sin sus propios genes para ellos es cultivarlos junto a células de empaquetamiento. Esta célula codifica y produce la proteína que le falta al virus para realizar su ciclo de replicación con normalidad lo que permite postergar la vida de los cultivos y facilitar su producción. No obstante, este no elimina todos los riesgos derivados del uso de vectores virales, quedando siempre un pequeño riesgo de inmunogenicidad y la posibilidad de reactivación del virus durante el proceso de recombinación originando lo que se conoce como “reactivantes”. Dependiendo de su naturaleza lítica, *Herpex virus* o adenovirus o no-lítica, como lentivirus, los virus van a estar orientados y empleados en diferentes estrategias terapéuticas basadas en terapia génica (Gardlík et al.,

2005).

1.4.2.1.1 Herpex Simplex Virus (HSV)

Esta familia de virus son interesantes para la transfección de células por las que naturalmente son muy afines como lo son las células neuronales en las que, además, tienen elevados tiempos de permanencia. Su tropismo natural tras una inyección subcutánea los conduce a células epiteliales y neuronas aferentes periféricas pero, tras su transporte retrógrado en el sistema nervioso central, es capaz de llegar a la raíz dorsal de los ganglios sensoriales. Para su adecuado uso en terapia génica deben de ser sometidos a una serie de modificaciones como:

1. Atenuación de su toxicidad: para esta familia de virus el ser humano es hospedador natural.

2. Modulación del tiempo de expresión y permanencia en la célula hospedadora: estos parámetros son fundamentales para un proceso terapéutico exitoso.

3. Modificación de su tropismo natural: en algunos casos es necesario infectar otras líneas celulares y este paso es crucial para hacer el virus más selectivo frente a la célula diana.

Debido a sus peculiaridades y tropismo natural hacia el sistema nervioso, estos virus han sido explotados en el tratamiento del dolor crónico con cierto éxito. Por ejemplo, un HSV modificado para expresar péptidos opioides o la enzima ácido glutámico descarboxilasa podría expresar y liberar dichas moléculas en la primera sinapsis entre las neuronas nociceptivas primarias y las neuronas de segundo orden en la medula espinal. Esto conseguiría inhibir la neurotransmisión de la nocicepción. Los efectos beneficiosos de este tipo de estrategias han sido ya demostrados y publicados (Hao, Wolfe, Glorioso, Mata, & Fink, 2009) (Hao et al., 2005)

1.4.2.1.2 Adenovirus y virus adeno-asociados

Los adenovirus se encuentran frecuentemente en la naturaleza, especialmente algunos de sus serotipos, y tienen algunas características que los hacen de interés:

1. Elevada capacidad de carga: una cualidad inusitada en vectores virales cuyo espacio disponible a nuevos genes suele ser muy limitado.

2. Seguridad: según el serotipo es posible que el hospedador haya estado en contacto con él y tenga defensas específicas que pueda evitar una reacción adversa grave.

3. Versatilidad: puede infectar tanto células en división como en reposo y es poco específico en cuanto a su proceso de infección por lo que podría utilizarse en multitud de células diana diferentes.

En contrapartida a estas atractivas cualidades, los adenovirus no se integran en el genoma del hospedador, por lo que la expresión de sus genes es bastante reducida en el tiempo y también pueden desarrollar fuertes reacciones adversas que han llegado a matar al hospedador. Para evitar esto último, aparecen los virus adeno-asociados cuya base de adenovirus ha sido eliminada para evitar dicha problemática. Estos virus adeno-asociados tienen la habilidad de integrarse en el genoma humano por el cromosoma número 19 lo que les permite expresar durante periodos más prolongados de tiempo el gen que vehiculizan. Esta integración también se lleva a cabo en un lugar del cromosoma exento de riesgos en cuanto a mutagénesis. Otro problema de los virus adeno-asociados es precisamente su difícil obtención ya que proceden de un proceso de ingeniería genética que los hace costosos y de difícil acceso. Este tipo de virus han sido ya probados eficazmente para sobreexpresar receptores opioides en la vía nociceptiva con éxito, consiguiendo así un mayor efecto de analgésicos opioides sobre el individuo (Xu et al., 2003)

1.4.2.1.3 Lentivirus

Los lentivirus son una familia de virus pertenecientes a los retrovirus. Sus principales ventajas vienen definidas por ello:

1. Expresión a largo plazo: gracias a su integración en el genoma de la célula hospedadora
2. Baja inmunogenicidad.
3. Gran capacidad de transporte.
4. Tropicismo hacia células madre neuronales.

Los lentivirus son muy útiles como vehículos de genes dirigidos al sistema nervioso y ya han sido empleados a través de microinyecciones para conseguir expresar factores neuronales que modulan procesos sinápticos. Un ejemplo de esta aplicación podemos encontrarla en la expresión del factor neurotrófico glial, encargado a nivel del sistema nervioso tanto central como periférico de regular la expresión genética y supervivencia neuronal. Se ha postulado que su reducción en el sistema nociceptor aferente, encargado de la transmisión del dolor, disminuiría e impediría procesos de dolor neuropático gracias a su capacidad para estimular la expresión de algunas moléculas analgésicas como la somastatina (Nagano et al., 2003).

1.4.2.1.4 Virus espumoso humano

Fue el primer de los retrovirus humanos descritos. Tiene varias características que lo hacen único y viable en terapia génica:

1. No es patógeno.

2. Tiene una gran capacidad para vehiculizar genes.
3. Es versátil gracias a su afinidad por diversos tipos celulares.
4. Es perdurable en células quiescentes.

Su habilidad para transfectar de una manera eficaz y prolongada células madres hematopoyéticas está más que contrastada por lo que podría ser un vector ideal para dicha línea celular. Esto se ha llevado a cabo satisfactoriamente en modelos animales del dolor asociados a un daño en la espina dorsal. La incorporación de genes codificantes para la ácido glutámico descarboxilasa inyectados a nivel local en la espina dorsal consigue sobreexpresar dicha enzima. Esto se traduce en una mayor acción del GABA y en una normalización de estados de hiperalgesia y aloidía (Liu et al., 2008).

1.4.2.2 Vectores no virales

Dentro de este grupo se incluyen todos los métodos físicos y químicos de incorporación de material genético y vehiculización de genes salvo aquellos desarrollados por sistemas víricos. A pesar de su menor efectividad, tienen amplias ventajas como una mayor capacidad de carga, no inmunogenicidad, mayor disponibilidad, facilidad de fabricación y menor costo.

1.4.2.2.1 Métodos físicos

Existen varios métodos de este tipo que consiguen introducir el material genético en la célula. Todos ellos están basados en el uso de diferentes fuentes de energía para conseguir una permeación transitoria de la membrana celular y facilitar la entrada del material genético.

1.4.2.2.1.1 ADN Desnudo

Consiste en la aplicación de material genético directamente sobre el individuo sin ningún tipo de proceso tecnológico asociado a su vehiculización o protección. *A priori* presenta un par de ventajas como son su simplicidad y bajo costo. No obstante el empleo del ADN desnudo como método de transfección se ha llevado a cabo en diversas ocasiones sin demasiado éxito. Esta falta de eficacia puede achacarse a la ausencia de diversos factores como la protección del material genético, guiado hacia la célula diana o capacidad de adaptación del proceso. En la práctica sólo ha demostrado tener algo de potencial y aplicabilidad real como método control, en las vacunas de ADN y en la transfección de ciertos tipos celulares bajo condiciones muy concretas. Las células más transfectadas por esta metodología son las células musculares y hepáticas a través de inyecciones intravasculares en los vasos irrigadores de los órganos donde se encuentran. Algunas técnicas emplean un volumen grande que se aplica en un corto margen de tiempo para lograr una mayor eficacia en la penetración del ADN en las células, llegando a encontrarse poblaciones transfectadas cercanas al 40%. Sin embargo, también vienen acompañadas de dificultades en la reproducibilidad del método y cortos periodos de expresión de los transgenes (Herweijer & Wolff, 2003).

1.4.2.2.1.2 Pistola de genes

Traducido del inglés *gene gun* y también conocida como *biolistics*. Esta estrategia se basa en la aceleración de NPs cubiertas de genes para hacerlas penetrar en el interior de las células diana. En su origen fue ideada para penetrar las gruesas paredes celulares de células vegetales y poder hacer llegar moléculas al interior de dichas células. Ahora se aplica en terapia génica fundamentalmente gracias al uso de NPs de oro cuya densidad, uniformidad de tamaño e inocuidad las hacen idóneas para dicha aplicación. Recubiertas del material genético a introducir en la célula, pueden acelerarse por gas comprimido o descarga eléctrica. La mayor ventaja de esta estrategia es que, a diferencia de muchas otras, la penetración del material genético en la célula no depende de sus características físico-químicas como carga eléctrica superficial o interacciones ligando receptor. Además de ser un método simple, ha

conseguido transfectar células eficazmente tanto *in vitro* como *in vivo* en diversos tipos de tejidos de difícil acceso. Esta técnica ha conseguido emplearse con éxito en animales mamíferos e incluso humanos (Uchida, Li, Mertens, & Alpar, 2009).

1.4.2.2.1.3 Electroporación

La electroporación es un método de transfección basado en una desestabilización temporal de la membrana celular gracias a la aplicación de un pulso eléctrico, repetido o no. Esto conseguiría incrementar la permeabilidad de la célula a agentes externos como podría ser ADN desnudo. De este modo, la electroporación es una técnica de interés en procesos de transfección dirigidos a células con la habilidad innata de adquirir ADN del entorno. Una de estas células son los espermatozoides, los cuales son utilizados para la creación de animales transgénicos a través de su transfección y posterior fecundación del óvulo. A esta técnica se la conoce como transferencia genética mediada por espermatozoides y puede aplicarse *in vivo*.

Recientemente se ha propuesto mejorar la captación de ADN exógeno por parte del espermatozoide gracias a la técnica de electroporación alcanzando excelentes resultados y consiguiendo que la totalidad del proceso se realice *in vivo*. Con campos de baja intensidad y corta duración las células del espermatozoide son capaces de captar mejor el ADN de interés el cual simplemente hay que añadirlo al medio en el que se encuentran. A pesar de que estos resultados son prometedores, queda un escalón más por superar es esta técnica de transfección ya que, una vez conseguido el espermatozoide mutante, este parece no ser capaz de fecundar *in vivo* de la misma manera que el natural (Kumar Pramod, Kumar, & Mitra, 2016).

1.4.2.2.1.4 Hidrodinamia

La hidrodinamia es otra alternativa que también emplea ADN desnudo para la transfección y cuyas principales ventajas son su sencillez y rapidez.

Este tipo de protocolo de transfección se basa en someter al individuo a un bolo masivo de ADN que sature la circulación sistémica de material genético en volumen y cantidad. Este método ha sido muy utilizado en ratones a través de la vena de la cola mediante inyección de un volumen de suspensión de ADN equivalente al volumen plasmático del espécimen. Este tipo de metodología es apta para expresar un gen externo en la mayor parte de los órganos internos del individuo. La mayor tasa de expresión se consigue en el hígado gracias a su capacidad de hinchamiento que le permite absorber el exceso de volumen plasmático producido por el bolo masivo administrado. Pese a lo traumático que pudiera parecer el proceso, los individuos se reponen rápido a él sin secuelas y sin sufrir daños notables durante el mismo, solo algunos marcadores de leve daño hepático deberían ser observables. Este es un método que, si bien puede que no llegue a ser utilizado en humanos, es un interesante protocolo para investigación ya que ahorra mucho tiempo, costes y permite analizar el comportamiento *in vivo* de un inserto genético diseñado (Liu, Song, & Liu, 1999).

1.4.2.2.1.5 Magnetofección

La magnetofección es un protocolo de transfección mediado mediante NPs al cual se ha incorporado un guiado magnético para incrementar su eficiencia. Este tipo de procedimiento podría encontrarse en cualquiera de los dos grandes grupos de procesos de transfección descritos: métodos químicos o métodos físicos. Esto es así debido a que, si bien el guiado magnético es un fenómeno estrictamente físico, en este caso es posible y se apoya en uno de los métodos químicos que se desarrollará más adelante como es el de las NPs. En esencia, un proceso de magnetofección surge a partir de un protocolo de transfección realizado con NPs a las cuales se les incorpora un material con respuesta a GCMEs con la finalidad de conseguir una mayor eficacia en el protocolo de transfección. La magnetofección surgió como aplicación de una estrategia ya antigua, el guiado magnético en el transporte de fármacos para mejorar la liberación en el lugar de acción, a una de reciente aparición como es la terapia génica. Esta idea intentaba paliar el principal problema de los

procesos de transfección mediados por vectores no virales frente a los realizados con sistemas virales: la falta de eficacia. A día de hoy la magnetofección ha demostrado que es una estrategia viable que permite en ciertos casos mejorar los protocolos de transfección mediados por NPs, haciéndolo más eficaz, consiguiendo mejores tasas de viabilidad celular, expresión prolongada etc (Plank, Zelphati, & Mykhaylyk, 2011).

1.4.2.2.2 Métodos químicos

Los métodos químicos de transfección son aquellos basados en el uso de nanosistemas poliméricos o lipídicos. En ellos un polímero o lípido catiónico acompleja al material genético para dar lugar a una NP del tipo poliplexo, en el caso de que se hable de un polímero, o un lipoplexo, si se está empleando un lípido. Estos métodos son ampliamente utilizados y relegan a los físicos, anteriormente descritos, a un segundo plano. Algunas de sus ventajas que justifican este hecho son: periodos de expresión prolongados, baja inmunogenicidad y tasa de mutagenicidad. Aun así, siguen sin tener a día de hoy una eficiencia y eficacia de transfección deseada. Su esquema principal de funcionamiento está dividido en cuatro sencillos pasos:

1. Interacción inespecífica entre el polímero o lípido catiónico del sistema y la membrana celular.
2. Internalización en la célula gracias a la formación de una vesícula endocítica.
3. Liberación del material genético de la vesícula endocítica.
4. Translocación del material genético hasta el núcleo y su posterior expresión en forma de proteínas.

Para que los métodos químicos tengan lugar de una forma efectiva, deben de adaptarse a los diferentes entornos de transfección. Esta adaptación

requiere de un desarrollo tecnológico que puede pasar por una manipulación del entorno de transfección a un rediseño de la NP transfectante. Esto nos conduce a la gran ventaja y, a su vez, desventaja de los métodos químicos: su capacidad de adaptación y complejo diseño. Hay muchos factores que pueden llevar a un proceso de transfección al éxito o al fracaso y muchos de ellos están directamente ligados con la NP empleada: tipo de polímero o lípido, tamaño final del complejo o su carga eléctrica superficial pueden ser determinantes a la hora de conseguir una transfección exitosa. En ocasiones incluso pueden añadirse nuevos materiales a la estructura básica para conseguir mejorar la especificidad o alguna otra característica del proceso. Entre varios de los requisitos que podemos pedir a estas estrategias químicas podemos mencionar: protección, liberación intracelular adecuada, promoción de la integración nuclear y traducción del material transportado.

Como ya hemos mencionado estos métodos químicos pueden basarse en dos tipos de materiales:

1. Lípidos catiónicos: son lípidos cuya estructura química presenta, al menos, un grupo con carga positiva neta. Son empleados para crear liposomas capaces de compactar el material genético en su interior y vehiculizarlo protegido de agentes externos. A pesar de su baja toxicidad y facilidad para entrar en la célula diana, son estructuras relativamente lábiles con un periodo de vida media en el organismo bajo y cuya capacidad para soportar condiciones externas agresivas es pequeña. Normalmente, los liposomas están formados por uno o dos lípidos en los cuales se puede encontrar algún resto alquilo, una cabeza cargada positivamente y la cadena carbonatada hidrofóbica.

Un protocolo habitual de formación de un lipoplexo se lleva a cabo mediante un sencillo mezclado en un tampón adecuado del material genético con el lipoplexo. En la estructura, los dos lípidos, en caso de hallarse presentes, juegan un papel diferente. Uno podríamos decir que es el núcleo de la estructura, el lípido anfifílico con la cabeza cargada positivamente y una

cadena hidrocarbonada apolar cuya finalidad es permitir la formación del liposoma y vehicular el material genético. El lípido coadyuvante, tipo colesterol, permitiría el intercambio entre lípidos al hacer de agente desestabilizante una vez llegado el contacto entre el liposoma y la membrana celular. Este intercambio de lípidos entre ambos sistemas favorecería la adhesión e internalización del material genético en la célula. La evolución del liposoma como vector no viral ha dado lugar a diferentes tipos de liposomas: “liposomas silenciosos”, cuyo tiempo de vida media está alargado ya que no son capturados por el sistema retículo endotelial, “liposomas dirigidos”, capaces de introducir material genético específicamente en un tipo celular y “liposomas inteligentes”, capaces de liberar el material genético o responder frente a diferentes estímulos como un incremento de la temperatura o variación del pH.

2. Polímeros catiónicos: desde la introducción de los polímeros catiónicos en terapia génica, su uso ha ido evolucionando hasta dar una gran variedad de materiales empleados, metodologías de síntesis y protocolos de transfección. Cada polímero, dependiendo de su monómero constituyente, va a presentar unas propiedades únicas que lo pueden hacer idóneo bajo determinadas circunstancias de trabajo. Debido a la complejidad del proceso existen muchas variables por las cuáles esto puede suceder pero, las más usuales, son las siguientes: tamaño del gen a transportar, tipo de célula diana y necesidad de incorporar más materiales a la estructura además del propio polímero y material genético. Sin embargo, se han encontrado ciertas generalidades que puede ser de interés conocer antes de afrontar el diseño de un protocolo y herramienta de transfección. El tamaño del polímero, es decir, su peso molecular, parece estar directamente relacionado con su eficacia de transfección y toxicidad, siendo ambas relaciones de carácter lineal. Dentro de estos polímeros catiónicos, podemos encontrar también dos subtipos en función de si presentan una ramificación en su estructura o si son exclusivamente lineales. Ambos tipos también presentan propiedades distintas como son especificidad y afinidad por células en diferentes fases del ciclo celular, toxicidad, forma de acomplejamiento del material genético etc. Dentro

de este apartado es donde podemos encontrar la PEI como uno de los materiales de elección para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

A día de hoy se han logrado grandes avances gracias a la terapia génica como mejoras en métodos de investigación y nuevas herramientas para su desarrollo. Sus vehículos más potentes, los vectores virales, le han permitido llegar a etapas clínicas de desarrollo pero, la falta de seguridad de los mismos, dificultan su avance en ella. Algunos campos clínicos en los que se han logrado avances gracias a la terapia génica son los siguientes:

1. Enfermedades hereditarias congénitas: son aquellas enfermedades debidas a la alteración de un gen. Gracias al empleo de vectores virales y material genético como agente terapéutico su tratamiento clínico ya es posible. Uno de los lugares donde mejores resultados se han obtenido es en el ojo. Debido a algunas características particulares únicas como su localización concreta, flujo regulado y aislamiento del resto del organismo, se han podido ensayar éxito tratamientos para retinopatías congénitas consiguiendo desde una mejora en la visión hasta un incremento en la respuesta refleja (Maguire et al., 2008). Otra enfermedad que continúa sin cura y cuya base genética la hace idónea para ser susceptible de tratarse mediante terapia génica es la Hemofilia B. Aunque desde los años 70 puede afrontarse la enfermedad de manera paliativa, no se consigue una calidad de vida aceptable en dichos individuos. El tratamiento actual consiste en la administración de por vida cada 3-4 días de un concentrado de factores de coagulación. Gracias a la terapia génica se podría conseguir cambiar la naturaleza del tratamiento de paliativo a curativo. Esto podría conseguirse mediante la incorporación del gen sano que codifica para el factor de coagulación IX, defectuoso en dicha enfermedad. A día de hoy se ha conseguido expresar dicho factor de coagulación tras la inyección de vectores virales cargados con el gen sano del factor de crecimiento IX con nula respuesta inmunológica por parte del paciente (Sciences et al., 2011).

2. Medicina regenerativa: la medicina regenerativa persigue la curación de tejido dañado o disfuncional a través de su sustitución por uno nuevo sano.

La terapia génica ha alcanzado la clínica de enfermedades cardiovasculares tratadas mediante este tipo de terapia. El alto grado de morbilidad y mortalidad de estas enfermedades hace que sean objeto de un intenso estudio y que cada vez tengamos disponible más información sobre ellas.

Recientemente se ha descubierto que una función alterada y disminuida del retículo endoplásmico en cuanto a su capacidad de captación de Calcio conduce a una pérdida de funcionalidad de los miocitos y favorece la aparición de un accidente cardiovascular. La proteína encargada de retornar el calcio al retículo endoplasmático se conoce como SERCA2a y su correcta expresión colabora con la normalización de dicha función y previene la aparición de problemas cardíacos. Por todo ello, se planteó la posibilidad de incrementar la expresión de dicha proteína dentro de los miocitos gracias a la terapia génica. Esto conseguiría un flujo aumentado de calcio y prevendría la aparición de infartos. Esta posibilidad ya se encuentra en fase clínica gracias al empleo de vectores virales basados en adenovirus. Se ha conseguido aumentar la expresión de SERCA2a en los miocitos de pacientes cuya función cardíaca se ha visto mejorada gracias a ello (Jessup et al., 2011)

3. Enfermedades infecciosas y cáncer: otra de las contribuciones de la terapia génica es ayudar en la lucha contra enfermedades infecciosas a través del desarrollo de vacunas. La posibilidad de “diseñar” un virus a medida, inocuo pero que exprese proteínas clave de ciertos agentes infecciosos es una estrategia terapéutica que ya se encuentra en fase clínica. Hay varios objetivos muy interesantes a tratar de esta manera, como puede ser la malaria, para la cual ya se están probando vacunas. Gracias a ellas se consigue inducir una respuesta celular y humoral contra un antígeno del patógeno en su fase sanguínea del ser humano sin riesgo para la salud del paciente. Además, ésta vacuna ha demostrado acelerar e incrementar la respuesta inmune frente a dicho antígeno una vez pasado largo tiempo desde su administración (Sheehy et al., 2011).

En relación a la terapéutica antitumoral, la terapia génica también ha conseguido grandes avances en torno a una idea central: modificar los agentes inmunológicos genéticamente para que expresen proteínas de superficie que incrementen su afinidad por las células tumorales. Esta idea ha derivado en múltiples opciones basadas en diferentes formas de expresar antígenos en células del sistema inmune, tipos de cáncer a tratar o tipos de células del sistema inmune afectadas. Quizás la más estudiada de estas opciones es la aplicación de Linfocitos T tranfectados *in vitro* para conseguir que expresen receptores específicos de antígenos tumorales. Esta estrategia tiene una elevada eficacia y especificidad pero debe de emplearse con cuidado ya que un antígeno objetivo inespecífico de tumor podría causar una falta de especificidad en el tratamiento y graves reacciones adversas. La llegada a clínica de éste planteamiento teórico ya ha permitido la obtención de linfocitos T tranfectados que expresan receptores específicos para melanoma y cuya administración en pacientes ha conseguido una mejora en el estado del mismo y una remisión del tumor (Johnson et al., 2009).

1.5 Terapia celular: transporte y marcaje celular

La terapia celular es una estrategia terapéutica que se basa en la inoculación de células al paciente con el fin de tratar una patología. Esta idea no es nueva, de hecho se tiene constancia de inoculación de células a finales del siglo XIX pero, no fue hasta bien entrado el siglo XX cuando el empleo de células como herramienta terapéutica empezó a consolidarse como un campo de estudio con prometedores objetivos. Desde entonces la terapia celular ha crecido mucho y ha conseguido logros, tanto que es cada vez más difícil clasificar o hablar de los diferentes modelos o posibilidades de terapia celular existentes.

Varias de las líneas más desarrolladas suelen emplear un par compuesto por tipo celular/patología siendo terapias muy específicas donde no solo se selecciona el linaje celular que puede dar mejores resultados sino que

la patología a tratar también es específica. Aquí se presentan algunos ejemplos destacables que pueden ilustrar lo explicado:

1. Medicina regenerativa / células madre neuronales: en el sistema nervioso central adulto se encuentran células progenitoras con diferentes grados de diferenciación que pueden ser extraídas, expandidas y diferenciadas *in vitro*. La célula madre más indiferenciada del cerebro adulto es la célula madre neuronal periventricular con capacidad de diferenciarse en aún tres tipos de células progenitoras más y estas, a su vez, podrían terminar diferenciándose en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. Gracias a la inoculación local o sistémica de este tipo de células madre, se han conseguido combatir procesos de desmielinización, tanto en niños como en adultos, gracias a una taxis y diferenciación específica de las células inoculadas hasta oligodendrocitos y a un equilibrio paracrino y enzimático conseguido derivado de la presencia de la nueva población diferenciada de células (Goldman, 2005).

2. Terapia antitumoral individualizada / células madre hematopoyéticas: el empleo de estas células en terapéutica estuvo centrado en el tratamiento de deficiencias congénitas causantes de anemias y la restitución de la médula ósea de un paciente tras una dosis de quimioterapia mieloablativa. Otro beneficio del empleo de estos trasplantes de células madre hematopoyéticas tras la quimioterapia es el conocido como efecto de trasplante contra tumor, un fenómeno mediado por la inmunidad de las células trasplantadas que puede atacar y ayudar a combatir el cáncer del paciente. Aquí cabe colocar un inciso para destacar que, hablando de terapia celular pueden llegar a converger medicina regenerativa, terapia antitumoral personalizada y terapia inmunológica. Es por ello que se hace a veces tan difícil estudiar la terapia celular y explicarla con transversalidad ya que ha irrumpido y se ha fusionado con muchos campos terapéuticos (Jenq & van den Brink, 2010).

3. Células madre mesenquimales / terapia antitumoral: este tipo de células madre tienen propiedades inusitadas que les permiten ser de especial utilidad en el tratamiento del cáncer. Estas habilidades son: alta tasa de

autorenovación, facilidad de aislamiento y expansión *in vitro* y su migración natural hacia tejidos dañados o inflamados así como su capacidad de integrarse en ellos. De esta manera se estudia la posibilidad de administrar células madre mesenquimales modificadas genéticamente para incrementar la producción de diferentes mediadores antitumorales naturales como IL-2 IL-12 y TNF- β . Estos mediadores jugarían un papel muy importante en la remisión del tumor si las células madre fueran capaces de integrarse en las inmediaciones del tumor y secretar *in situ* dichas moléculas. Esto salvaría los problemas de administración y vida media en el organismo características de los mediadores antitumorales y permitiría una exposición prolongada a ellas por parte del tumor (Hu, Fu, Tabata, & Gao, 2010).

4. Macrófagos / terapia antitumoral: otra forma de terapia celular consiste en emplear células como medio de transporte y vehículo para fármacos. Esta vía dentro de la terapia celular está especialmente desarrolla en el caso de los macrófagos debido a su fuerte vinculación natural para migrar a tumores y liberar su contenido en ellos. Esta estrategia es comúnmente conocida como caballo de troya. El cultivo de macrófagos *in vitro* y su posterior carga con fármacos encapsulados proporciona un guiado natural y protección frente a las estrategias típicas de vehiculización en NPs. La mayor eficacia de la administración de doxorubicina encapsulada en liposoma y vehiculizada en macrófagos ha sido probada como ejemplo que ilustra esta aplicación de la terapia celular (Choi et al., 2012).

El transporte y marcaje celular representa un entorno muy importante dentro de la recientemente explorada terapia celular. Este tipo de terapia emplea la célula como herramienta terapéutica y se encuentra centrada fundamentalmente en medicina regenerativa aunque tratamiento de cáncer y enfermedades autoinmunes es también posible gracias a su aplicación Sus principales intereses son obtener información, en el caso del marcaje, y dirigir las células terapéuticas a su lugar de acción de una manera eficaz. El propio marcaje también es importante en la investigación del transporte celular ya que

funciona como prueba control para saber exactamente dónde son transportadas las células por los métodos diseñados para ello.

Hay diferentes formas de aplicar marcaje y transporte celular pero aquí se desarrollará la realizada por las partículas magnéticas objeto de la presente tesis doctoral. Una de las ventajas de emplear este tipo de partículas es que se pueden llevar a cabo ambos procesos con el mismo sistema sin la necesidad de marcar con fluoróforos u otras sustancias los agentes de transporte. Esto es así porque las partículas magnéticas, una vez internalizadas en la célula, son capaces de trasladar a la célula hacia un gradiente de campo magnético externo y, a su vez, son detectables por RMI dado que también funcionan como agentes de contraste.

Unas de las líneas celulares de mayor interés son las células madre mesenquimales (CMM) que, si bien no tienen la misma capacidad de proliferación y plasticidad que otras líneas de células madre, siguen teniendo algunas ventajas:

1. Diferenciación y proliferación: son de fácil obtención desde tejidos.
2. Teratogénesis: son células con una baja posibilidad de desencadenar procesos teratogénicos.
3. Fácil cultivo: su adherencia y tasa de crecimiento facilitan su cultivo *in vitro*.
4. Debate ético: ausencia de debate ético con respecto a su uso.

Algunas propiedades más específicas que las hacen de especial interés en terapias que requieran de inmunomodulación son su capacidad migratoria hacia zonas con daño y su habilidad para producir citoquinas inmunomoduladoras. Este tipo de células abrieron en su momento la posibilidad de ofrecer alternativas terapéuticas en enfermedades aún no

resueltas como cáncer o parkinson, por citar algún ejemplo (Guadix, Zugaza, & Gálvez-Martín, 2017).

Este tipo de líneas celulares pueden ser marcadas gracias al empleo de materiales magnéticos con idea de poder identificarlas y seguir su progreso gracias a técnicas no invasivas como la RMI. Esta técnica surgió de la necesidad de emplear procesos no invasivos para localizar poblaciones de células empleadas como terapia o en diagnóstico e investigación. Los métodos empleados con anterioridad estaban basados en transfectar genes que pudieran producir una señal fluorescente como la GFP o el uso de sustancias de por sí con color como fluorocromos o análogos timidínicos. El principal problema de estas metodologías era el hecho de tener que hacer una biopsia o eliminar parte del tejido donde se quería visualizar la población celular marcada pero, también, que daban una imagen única en un instante, el de retirar el tejido, y era imposible seguir la evolución de una manera eficaz.

El avance de las técnicas de imagen en diagnóstico, la aparición de las RMI y la posibilidad de usarlas en tiempo real, permitió su adaptación para ser empleadas en marcaje y seguimiento celular. Uno de los elementos clave de esta adaptación son los SPIONs que permiten rastrear las células marcadas y transportarlas sin perder su imagen en pantalla. A pesar de los inconvenientes que podría presentar al empleo de marcadores magnéticos para las células, como la pérdida de sus propiedades magnéticas *in vivo*, la modificación en su comportamiento como agente de contraste, la dificultad de incorporarlas a la célula y el imprevisible comportamiento de éstas una vez dentro de la célula; este tipo de tecnología empezó a funcionar con éxito ofreciendo grandes resultados. Las células madre captan con facilidad las NPs de óxido de hierro superparamagnético y las integran en su interior sin que altere su comportamiento habitual y, bajo las circunstancias adecuadas, permanecen en el interior de la célula durante largos periodos de tiempo.

La manera en la que los SPIONs pueden integrarse dentro de la célula es de diversas formas y depende del tipo celular. Una de los usos más

frecuente de los SPIONs para seguimiento celular es con células madre, sobre todo CMM. Encontramos un ejemplo de éxito en la funcionalización de dendrímeros con SPIONs. Estos magnetodendrímeros tiene algunas prometedoras cualidades:

1. Son reconocidas e incorporadas dentro de células madre de diversos tipos.
2. La estructura presenta un buen comportamiento una vez en el citoplasma sin interferir en las funciones celulares.
3. Consigue que la metabolización del sistema siga unos cursos normales dentro de la célula sin la producción de procesos citotóxicos y prolongando la vida de los SPIONs dentro de la célula.

Estos vehículos consiguieron ser introducidos en células madres neuronales posteriormente diferenciadas, transplantadas y localizadas en el cerebro gracias al empleo de RMI (Bulte et al., 2001).

Otro modo en el que las NPs de óxido de hierro pueden ayudar a la localización celular es siendo funcionalizadas con un fluoróforo y un agente con afinidad por determinado tipo o estructura celular. Posteriormente y gracias a una observación con microscopio de fluorescencia, se pueden localizar dichas células o estructuras celulares sin necesidad de recurrir a una técnica como la RMI. Este tipo de estrategia ha sido eficazmente empleada gracias al uso de magnetita como marcador (Becker et al., 2007).

CAPÍTULO 2. Objetivos

Los objetivos de la presente tesis doctoral se centran en satisfacer una de las principales necesidades del nuevo entorno terapéutico que se ha generado desde la aparición de la nanotecnología y su aplicación en medicina. Nuevas estrategias terapéuticas requieren de nuevas formas de aplicación y desarrollo que permitan su evolución. Una de estas herramientas fundamentales son las NPs, implicadas en el transporte de material terapéutico, en la mejora de técnicas de diagnóstico como la RMI, en la diferenciación celular o en la puesta a punto de metodologías como el marcaje celular.

Con este objetivo en mente se desarrolla un estudio para la obtención de una NP polimérica sensible a gradientes de campo magnético externo conformada por un núcleo de magnetita y un recubrimiento de PEI. Ambos materiales están fuertemente contrastados en bibliografía como componentes de sistemas con múltiples aplicaciones biomédicas como: agente hipertérmico, sistema transportador de fármacos y genes, agente de contraste en RMI y marcaje y transporte celular (Yang, Ma, Zhang, & Xie, 2016) (Prabha & Raj, 2016) (Iglesias, Delgado, Gonzalez-Caballero, & Ramos-Tejada, 2016)(Xie et al., 2015) (Megías et al., 2017).

El presente trabajo también contempla la confirmación y mejora de aquellos procedimientos encontrados en bibliografía para la obtención de sistemas nanométricos similares. Una extensa caracterización físico-química será realizada tras el ensayo de diferentes condiciones de obtención de la NP magnetita/PEI para asegurar la comprensión de dicho proceso.

El conocimiento sobre las propiedades del sistema final obtenido también permitirá evaluar y testar mejoras en las diferentes aplicaciones biomédicas ensayadas. Por su impacto e importancia en terapéutica, diversos procesos de magnetofección y transfección serán evaluados así como el ensayo de dichas NPs como agentes marcadores y transportadores de células.

De este modo, el presente trabajo se desarrolló en base a las siguientes premisas:

- Síntesis y caracterización de NP magnéticas que presenten un tamaño y carga eléctrica superficial adecuadas para su posterior recubrimiento polimérico.

- Evaluación de la PEI como material de recubrimiento de las citadas partículas magnéticas. Esto permitiría su aplicación en la vehiculización de genes y en el transporte y marcaje celular.

- Diseño y estudio de una metodología de síntesis del sistema compuesto por magnetita/PEI que logre un tamaño y una carga eléctrica superficial compatibles con la vía de administración parenteral.

- Extensa caracterización físico-química de la NP obtenida que permita conocer su tamaño, morfología, superficie, carga eléctrica superficial, composición y comportamiento magnético.

- Evaluación del transportador magnetita/PEI como vector no viral donde se estudiara su interacción con el ADN, protección, vehiculización, internalización celular y expresión de genes transportados.

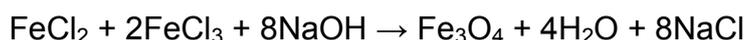
- Evaluación de la NP como agente de marcaje y transporte celular: citotoxicidad, condiciones de internalización y permanencia en el citoplasma.

CAPÍTULO 3. Metodología

La realización de la presente tesis doctoral implicó el empleo de diferentes técnicas experimentales específicas que abarcan campos diversos, desde la tecnología farmacéutica hasta la biología celular, pasando por complejas técnicas de imagen.

3.1 Síntesis de nanopartículas de magnetita

Para la obtención de las NP de magnetita se empleó la conocida síntesis mediante coprecipitación química en medio básico. Esta metodología se rige por la siguiente reacción química:



La adición de una disolución de ambas sales simultáneamente a un medio con un fuerte carácter básico hace que ambas sales pierdan su solubilidad y reaccionen entre ellas para dar un nuevo compuesto, la magnetita, que queda formando una dispersión coloidal y dotando al medio de un color negro muy oscuro y opaco (Massart, 1981). Durante el proceso también se forman sales que permanecerán en disolución y que hacen necesarios tanto un lavado de la muestra como su posterior estabilización.

La síntesis se realizó de la siguiente manera:

1. Preparación de las soluciones de partida: la relación estequiométrica entre el FeCl_3 y el FeCl_2 debe de ser de 2:1. Ambos cloruros de hierro deben disolverse independientemente antes de su adición al medio básico de coprecipitación.

2. Preparación del medio de síntesis: la coprecipitación se lleva a cabo en medio básico: amoníaco 0,7M.

3. Obtención de nanopartículas magnéticas: el medio de síntesis se somete a una agitación mecánica de 1500 r.p.m. y se procede a añadir lenta y simultáneamente las dos disoluciones de cloruro de hierro. El volumen añadido de ambas disoluciones responde a la relación estequiométrica 2:1 indicada. Rápidamente se observa un cambio de tonalidad en el medio hacia negro. La agitación se mantiene durante una hora para que se formen completamente las NP de magnetita.

4. Estabilización de la suspensión de nanopartículas: tras sucesivos lavados con agua bidestilada se procede a la incorporación del medio de estabilización: ácido perclórico 2M. Una vez transcurridas 12 h, se recoge el precipitado de magnetita por decantación magnética y se redispersa en agua bidestilada para dar lugar a la suspensión coloidal definitiva de NPs de magnetita.

3.2. Tratamiento químico de la superficie de los núcleos de magnetita

Una vez obtenido el coloide de magnetita se procedió a su tratamiento superficial para hacer virar su carga eléctrica superficial de positiva a negativa. Para ello se someten los núcleos magnéticos a la acción de citrato sódico. La magnetita previamente sintetizada tiene una carga superficial marcadamente positiva, al igual que el polímero con el que se pretende llevar a cabo su recubrimiento. Este hecho influye negativamente en el proceso ya que las fuerzas electrostáticas van a jugar en contra de la atracción entre ambos componentes. Es por este motivo que la magnetita se somete a un tratamiento con citrato sódico monohidrato que permite cambiar su carga eléctrica superficial de positiva a negativa. Con esto se pretende favorecer la interacción magnetita-polímero y, en consecuencia, el recubrimiento.

Para ello se adiciona citrato sódico monohidrato 0.1M a la suspensión de partículas obtenida 1,8% (m/v) y se aplican ultrasonidos durante 40 min. A continuación, se neutraliza el pH ácido al que vira la solución añadiendo progresivamente una solución 0.5M de NaOH. La suspensión obtenida se

centrífuga durante 20 min. a 9.500 r.p.m para eliminar posibles restos de sales. Una vez finalizado el proceso se recoge el sobrenadante y se desecha el sedimento donde estarán contenidos la mayor parte de los residuos de este tratamiento químico y posibles agregados de magnetita formados durante todo el procedimiento (Wang, Zhou, Ma, Li, & Gu, 2009).

3.3. Obtención de las nanopartículas magnetita/PEI

A continuación se describirá la metodología básica para la obtención de las NPs compuestas de magnetita/PEI:

El recubrimiento de las NPs magnéticas se llevó a cabo bajo agitación mecánica mediante un agitador de varilla. Para ello, se somete a 2000 r.p.m una suspensión de NPs de magnetita 1,8% (m/v) y, gota a gota, se incorpora la PEI en solución al 5% (m/m). Una vez finalizada la adición, se dejan transcurrir 5 min para dar por finalizado el recubrimiento. Tras una neutralización a pH 7 con HCl 0.5M las partículas se recogen y se lavan por decantación magnética gracias a la ayuda de un imán de 400 mT

Como ya se ha adelantado, también se ensayaron diferentes alteraciones en el método para intentar mejorar el mismo:

1. Agitación: este parámetro se empleó en dos variantes: agitación por varilla de vidrio y por vórtex. En el primer caso se operó como se ha descrito en el párrafo anterior. La agitación por vórtex se realizaba en las mismas condiciones exceptuando la adición de PEI que se hacía gota a gota en la suspensión de NPs de magnetita y, posteriormente, se sometía a la mezcla a agitación vigorosa en vórtex durante 5 min.

2. Incorporación: el orden en que los diferentes componentes se iban introduciendo en la síntesis también se modificó para intentar dar con la metodología más acertada. Una de las variantes ensayadas fue incorporar el citrato sódico monohidrato 0.1M tras la coprecipitación de los núcleos

magnéticos sin cesar la agitación durante 40 min y, posteriormente, añadir una solución de PEI al 5% (m/m). Transcurridos 5 minutos más de agitación, se daba la síntesis por finalizada.

Otra de las rutas exploradas fue incorporar el citrato sódico tras la coprecipitación de los núcleos de magnetita, al igual que en el caso anterior. Sin embargo, una vez transcurridos los 40 minutos de agitación, las NPs eran recogidas y lavadas por decantación magnética para terminar añadiéndoles la solución de PEI al 5% (m/m) gota a gota mientras eran sometidas a agitación mecánica de 2000 r.p.m.

3.4. Rendimiento de los procesos de síntesis

Este ensayo se fundamenta en la diferencia de pesada de un recipiente que contiene el coloide magnético obtenido y el mismo tras someterlo a un proceso de desecado. Dicha diferencia arrojará la cantidad de magnetita y PEI que permanecieron en el medio de síntesis en forma de NP compuesta magnetita/PEI. Conociendo las cantidades originales empleadas se podrán calcular los citados rendimientos.

Para recabar los datos se llevaron a cabo varios procesos de síntesis en pequeños frascos de cristal que habían sido previamente pesados tras secado en estufa. Una vez concluido el proceso de síntesis, se procedió a la decantación magnética gracias a la aplicación de un GCME de 400mT. Este se colocó de manera lateral para evitar que pudiesen quedar atrapados residuos de la síntesis o se depositasen por acción de la gravedad y pudieran ser contabilizados como NPs. Una vez eliminados todos los residuos de la síntesis, el frasco se volvió a secar y, transcurridas 24 h, se pesaron

Dado que conocíamos de antemano la cantidad añadida de magnetita y PEI utilizadas en la síntesis bastaba con relacionar éstas con la diferencia de pesada entre el frasco vacío y el mismo frasco con las NPs sintetizadas.

Los ensayos se realizaron en diferentes condiciones para estudiar cómo podían afectar dichas variables al proceso de obtención de NPs y su influencia en el rendimiento del mismo.

3.5. Caracterización del tamaño de partícula y geometría

3.5.1 Espectroscopía por correlación de fotones

Las medidas de tamaño de partícula se realizaron por la técnica de espectroscopía por correlación de fotones (PCS). Esta metodología consiste en la cuantificación de la dispersión de la luz, concretamente de un láser coherente monocromático, en función del tiempo. Cuando la luz incide sobre partículas pequeñas, inferiores a los 250nm, se dispersa en todas las direcciones. Si la luz incidente es un haz láser coherente y monocromático se puede observar una dependencia entre la dispersión de la luz y el tiempo transcurrido. Esta fluctuación se debe a que las partículas en suspensión presentan un continuo movimiento Browniano y, a consecuencia de ello, la distancia a la que dispersan los haces de luz se encuentra en un cambio continuo. De esta manera podemos obtener información gracias a la variación de intensidad de dispersión del haz láser a consecuencia del movimiento de las partículas en suspensión (Sun et al., 2009). La PCS es una técnica que está basada en la medida de sucesos de dispersión únicos. Esto significa que cada fotón recogido como señal se interpreta como si hubiera sufrido un proceso de dispersión tan sólo una vez.

Las medidas de tamaño se realizaron en un dispositivo Zetasizer Nano ZS a partir de muestras en suspensión acuosa. Para su preparación se diluyó la suspensión original, hasta una concentración 0.1% (m/v).

3.5.2. Microscopía electrónica de transmisión.

En microscopía electrónica de transmisión el objeto se ilumina por su cara posterior para formar delante una imagen invertida el mismo que termina por

adecuarse y aumentarse gracias a su paso por un sistema de lentes colocadas con tal fin. Un esquema general de funcionamiento viene recogido en la Figura 5.

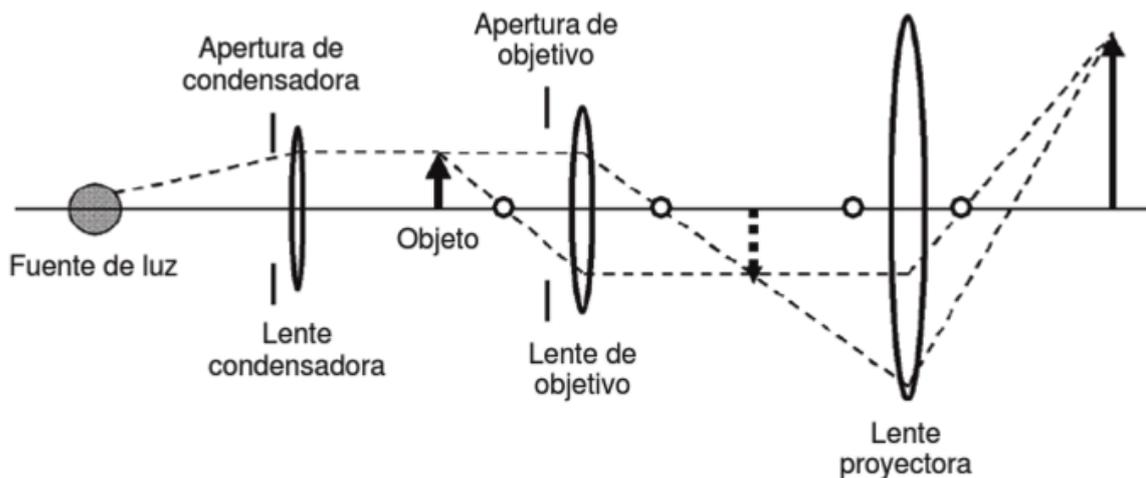


Figura 5. Esquema de la óptica de un microscopio electrónico de trasmisión.

Como ya se ha mencionado, la muestra se ilumina por un haz de electrones producido por un cañón al inicio del microscopio. Este haz es acelerado al pasar a través de una diferencia de potencial que les confiere una determinada energía cinética, su longitud de onda se ve modificada y les permite aprovechar su comportamiento ondulatorio. Esta longitud de onda, asociada al voltaje empleado para la aceleración del electrón y el tipo de fuente empleada conforman un par de características muy importantes y que suelen clasificar los microscopios electrónicos de transmisión por categorías. Un esquema básico del funcionamiento de un microscopio electrónico de transmisión queda recogido en la figura 6.

Al incidir el haz sobre la muestra los electrones generan dos tipos de fenómenos diferentes. Por un lado pueden ser dispersados sin ninguna pérdida energética o bien, pueden ceder parte de ella a los electrones de la muestra para generar transiciones electrónicas energéticas. Tras ello, la lente objetivo recoge los haces dispersados y forma la primera imagen de la muestra. Posteriormente, un complejo sistema de procesado de la imagen donde se opera con transformadas de Fourier termina por convertir esa primera imagen,

ampliándola y adaptándola en las microfotografías observables por esta metodología.

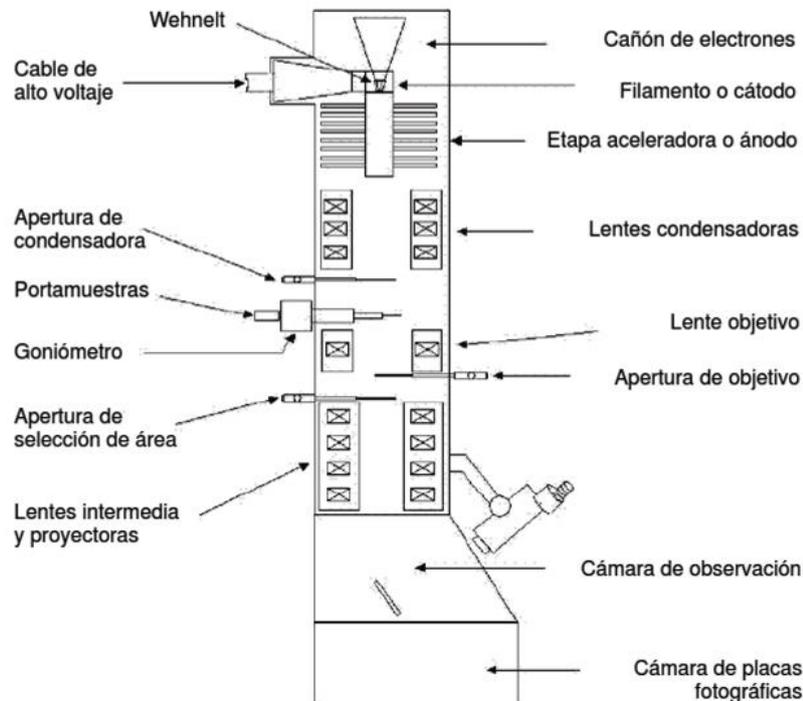


Figura 6. Esquema general de un microscopio electrónico de transmisión.

Otro aspecto importante de esta técnica es el contraste, una cualidad que queda definida como la diferencia de intensidad entre dos áreas adyacentes. En MET, se utilizan tres tipos de contraste diferentes, cada uno con sus propias cualidades y características únicas:

- Contraste de intensidad procedente de la absorción: obtiene la información de los sucesos inelásticos, es decir, de las transiciones electrónicas provocadas en la muestra por la incidencia del haz de electrones acelerado.

- Contraste de amplitud: queda definido por la amplitud del objetivo encargado de eliminar electrones dispersados. Normalmente este objetivo presenta una amplitud determinada para eliminar electrones dispersados no

deseados y que no participen en la imagen. Con el control de esta lente también se pueden conseguir imágenes por el llamado contraste de amplitud.

- Contraste de fase: posible gracias al foco del microscopio.

Cada tipo de contraste es más indicado en diferentes tipos de muestra y condiciones, algo que permite a esta técnica de microscopía electrónica obtener buenas imágenes en diversas circunstancias. Del mismo modo, también existe la posibilidad de trabajar con aperturas de objetivo diferentes para formar imágenes con haces de electrones difractados provenientes de diferentes lugares de la muestra:

- Campo claro: la más habitual de las técnicas y para cuyo empleo la lente objetivo se centra en el haz central de electrones y algunos haces más difractados adyacentes para formar la imagen.

- Campo oscuro: la lente objetivo no recoge información del haz transmitido principal y se orienta a haces dispersados en su lugar. Este tipo de técnica forma imágenes de campo oscuro gracias al contraste de amplitud que permite interpretar la información de los haces dispersados para formar una imagen.

Las imágenes obtenidas presentadas en este trabajo se obtuvieron a partir de suspensiones acuosas de NPs al 0,1% (m/v) tras posterior secado y colocación sobre rejilla para su observación. El microscopio empleado fue un LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT.

3.5.3. *Microscopía electrónica de barrido*

El fundamento básico de la microscopía electrónica de barrido es el mismo que gobierna la clásica microscopía óptica: un sistema óptico de reflexión. En ella, el objeto es iluminado frontalmente y los haces reflejados son los que aportan la información recogida mediante la técnica. Un esquema de este sistema de funcionamiento queda recogido en la Figura 7.

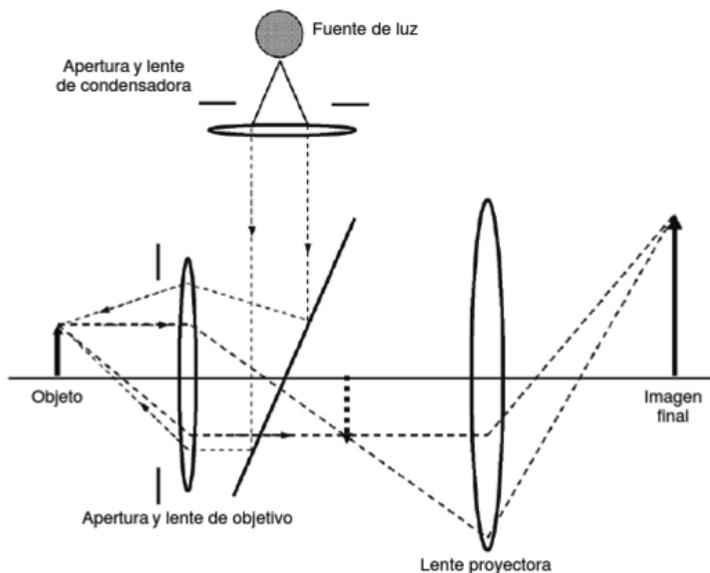


Figura 7. Esquema de la óptica de un microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la obtención de imágenes en tres dimensiones de la superficie de una muestra así como un conocimiento sobre los elementos que la forman. En él, el haz pasa a través de la lente condensadora y de una lente objetivo y es barrido a través de la muestra gracias a la acción de las bobinas de barrido. Un detector de electrones secundario va a ir capturando los electrones de baja energía emitidos por la superficie e irá formando la imagen principal. Entre sus principales sistemas de funcionamiento nos encontramos:

- Cañón de electrones: encargado de acelerar el haz de electrones hasta 40mV.

- Lentes condensadoras: a diferencia de otros sistemas de microscopía, las lentes SEM no contribuyen directamente a la formación de la imagen si no que se usan para ampliar y enfocar el haz de electrones sobre la superficie de la muestra.

- Bobinas de barrido: llevan el haz de electrones hasta toda la superficie de la muestra analizada.

- Detector de electrones secundario: permite recoger los electrones reflejados desde la muestra para conformar la imagen tridimensional de la superficie.

- Detector de electrones retrodispersado: construye la composición y topografía de la superficie.

- Detector de energía dispersiva: recoge los rayos x generados desde la muestra para conocer el tipo de composición atómica de la misma.

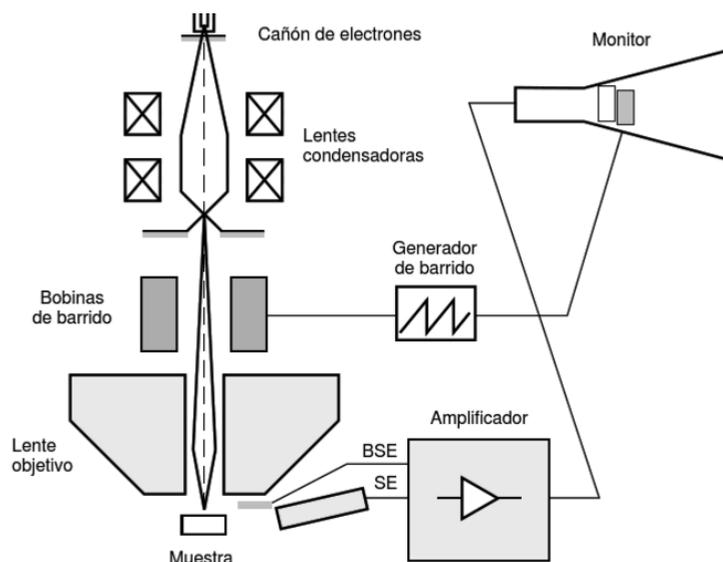


Figura 8. Esquema de un microscopio electrónico de barrido.

Un microscopio SEM (Figura 8) puede obtener información de dos tipos de electrones diferentes: electrones retrodispersados y secundarios. Los primeros arrojan información sobre la especie atómica y la estructura cristalográfica de la muestra, mientras que los segundos describen la topografía superficial de la muestra. Algunos microscopios SEM también recogen e interpretan rayos X emitidos desde la muestra, lo que les permite describir su composición atómica.

Este tipo de técnica microfotográfica tiene una gran ventaja: la profundidad de campo de la imagen. Esta es característica de las microfotografías SEM y es lo que permite enfocar simultáneamente a varias superficies que se encuentran a diferente altura. Esto se debe a que las lentes que emplea el sistema, como ya hemos avanzado, no se utilizan para la formación directamente de la imagen sino que constituyen un sistema de enfoque y control del haz de electrones que permite el enfoque simultáneo de una superficie a varias capas de profundidad.

La combinación de esta información y técnicas dan como resultado potentes microfotografías SEM que permiten a los investigadores extraer una información muy útil sobre la composición y superficie de las muestras analizadas a un gran nivel de resolución. Por ello la microscopía SEM es una de las más empleadas hoy día en diversos campos como el que nos ocupa (Nellist, 2017).

Las imágenes obtenidas presentadas en este trabajo se obtuvieron a partir de suspensiones acuosas de NPs al 0,1% (m/v) tras posterior secado y colocación sobre rejilla para su observación. El microscopio empleado fue un Hitachi, S- 510.

3.5.4. Microscopía electrónica de barrido/transmisión

La microscopía electrónica de barrido/transmisión es un punto intermedio entre la microscopía electrónica de barrido y la de transmisión. El fundamento teórico es muy similar al de la microscopía electrónica de transmisión pero con algunas diferencias que le permiten obtener más información de la muestra. Estas diferencias son:

- Grosor de la muestra: algo más gruesa que en TEM.

- Aceleración del haz de electrones: menor que en TEM. Este hecho unido al mayor grosor de la muestra permite que no todos los electrones atraviesen la muestra y haya algunos que salgan rebotados en ella.

- Haz de electrones: no es paralelo a la muestra. Es un haz que converge para la obtención de una sonda de electrones muy focalizada. Al atravesar la muestra se generan diferentes señales y haces dispersados que pueden recogerse para formar la imagen.

- Micrófono receptor de electrones secundario: además un micrófono receptor de electrones primario, ubicado tras la muestra como en cualquier TEM, existe un secundario. Este micrófono se ubica antes de la muestra y es el encargado de recoger los electrones que salen despedidos de la muestra.

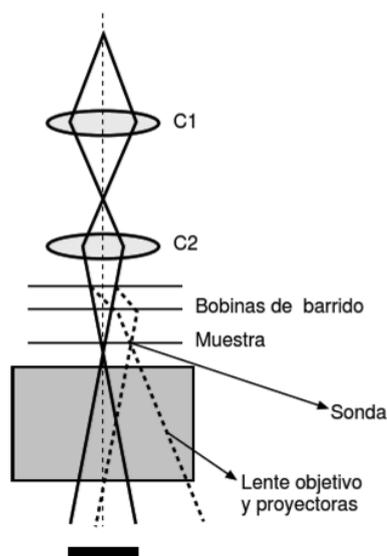


Figura 9. Esquema de funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido/transmisión.

Su funcionamiento y estructura (Figura 9) es básicamente la de un microscopio de transmisión al que se le han acoplado unas bobinas de barrido para poder barrer la muestra con el haz de electrones. Al igual que en la MET se pueden obtener imágenes de varios tipos dependiendo de los detectores empleados para ellos:

- Campo claro: formadas por los electrones difractados cerca del eje óptico, también conocidos como de bajo ángulo. Estos electrones pueden

haber sufrido efectos tanto elásticos, dispersión sin pérdida energética, como inelásticos, dispersión con pérdida energética cedida a la muestra.

- Campo oscuro: formada por los electrones difractados más alejados de la muestra, conocidos como de alto ángulo. Al igual que en campo claro, estos electrones pueden haber sufrido fenómenos elásticos e inelásticos.

- Contraste Z: formada por los electrones de más alto ángulo o, dicho de otro modo, solo los que han sufrido dispersión elástica.

Este tipo de funcionamiento híbrido permite obtener imágenes en profundidad de la muestra y llegar a un conocimiento sobre su morfología y composición algo más completo que si se emplea únicamente una técnica TEM o SEM pura (Nellist, 2017).

Las imágenes obtenidas presentadas en este trabajo se obtuvieron a partir de suspensiones acuosas de NPs al 0,1% (m/v) tras posterior secado y colocación sobre rejilla para su observación. El microscopio empleado fue un Hitachi, S- 510.

3.5.5. Espectroscopía de energía dispersiva

La espectroscopía por energía dispersiva (EDX) otra técnica más empleada en los microscopios electrónicos. Cuando un haz de electrones acelerado en un microscopio electrónico incide sobre la muestra, dichos electrones pueden ceder parte de su energía a los átomos de la muestra para generar transiciones electrónicas entre diferentes niveles de energía. Cuando tiene lugar una de estas transiciones, el electrón excitado termina por relajarse volviendo desde un orbital exterior a una más interior, lo que origina un rayo X (Figura 10).

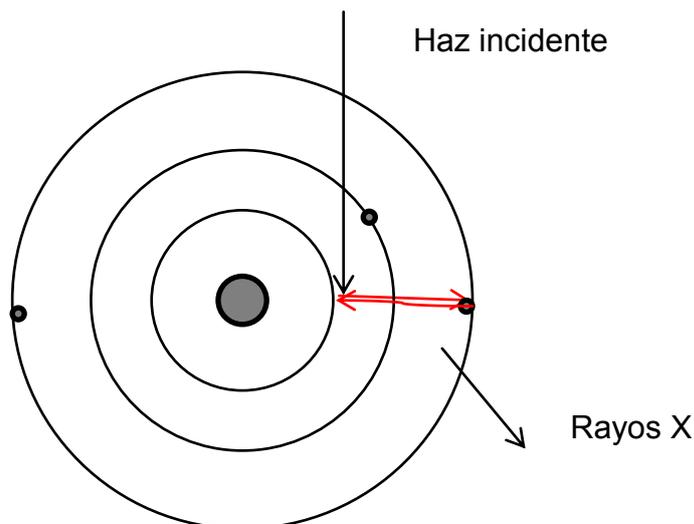


Figura 10. Esquema de generación de Rayos X por una muestra.

Los rayos X emitidos desde la muestra van a presentar unas características propias del salto electrónico y la transición energética propia del elemento que lo genera. Los microscopios electrónicos tienen detectores capaces de recoger esta información e integrarla para detectar qué especies atómicas están generando la señal. Esto, aplicado a una imagen previamente obtenida en dicho microscopio, puede generar un mapa de análisis elemental que puede ir desde un punto de la imagen, denominado análisis de punto, hasta la totalidad de la microfotografía, conocido como mapeado elemental.

Las imágenes obtenidas presentadas en este trabajo se obtuvieron a partir de suspensiones acuosas de NPs al 0,1% (m/v) tras posterior secado y colocación sobre rejilla para su observación. El microscopio empleado fue un Hitachi, S- 510.

3.6 Caracterización electroforética

La caracterización eléctrica superficial de las NPs se llevó a cabo por la técnica de electroforesis láser Doppler. Esta técnica permite medir el movimiento de partículas cargadas bajo un campo eléctrico gracias al efecto

Doppler. Este efecto consiste en la variación aparente de la luz de onda generada por el cambio de posición del cuerpo emisor con respecto al observador. Si tuviésemos una suspensión de partículas y se hiciese incidir un haz láser sobre ella, ésta saldría dispersa en la misma longitud de onda. Si esas partículas las ponemos en movimiento por electroforesis, la longitud de onda de la luz dispersa que recibe el detector variará. Dado que la velocidad a la que se mueve la partícula bajo el campo eléctrico va a depender de su carga superficial, se puede relacionar la variación en la longitud de onda sufrida por la luz dispersa y la carga eléctrica superficial de las partículas presentes en la suspensión (Uzgiris, 1981).

Las medidas de carga eléctrica superficial tomadas a lo largo de este trabajo se obtuvieron de muestras en suspensión acuosa 0,1% (m/v).

3.7 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es muy empleada para separar fragmentos de macromoléculas como el ADN o ARN en función de su carga y tamaño. Esto se hace gracias a la colocación de la muestra en pocillos dentro del gel de agarosa y tras la aplicación de una corriente eléctrica. Gracias a que los fragmentos de DNA tienen siempre la misma relación entre carga y masa, su mayor o menor velocidad de recorrido por el gel va a depender exclusivamente de su tamaño.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% (m/m) el cual fue inmerso en un tampón Tris/boratoEDTA (TBE) y sometido a un diferencial de corriente de 120V durante 30 minutos. Las bandas de ADN formadas se marcaron con GelRed y se obtuvieron las imágenes. Para la evaluación de la liberación y protección del DNA por parte de la NP se empleó dodecilsulfato sódico (SDS) al 3.5% (m/v) y ADNasa (1unidad de enzima por 2.5 µg de ADN), respectivamente. La integridad del ADN se determinó por comparación con ADN control.

3.8 Difracción de Rayos X

La difracción de Rayos X es una técnica analítica comúnmente empleada para el análisis estructural de sólidos y estudios cristalográficos. Aunque la aplicación de Rayos X es muy antigua, ha seguido en constante evolución para adaptarse a los nuevos tiempos y sigue siendo referencia en cuanto al análisis estructural se refiere.

La difracción de los Rayos X es posible gracias a que los elementos de una sustancia pueden absorber la radiación electromagnética y, a su vez, actuar como emisores secundarios reemitiendo la radiación que incide sobre ellos. Cuando esta sustancia es una red cristalina con sus átomos perfectamente ordenados en el espacio, la dispersión de los rayos X sucede de una manera peculiar. El entorno atómico del cristal es ordenado y, por tanto, todos los átomos van a recoger esa radiación y devolverla con la misma frecuencia. Esto va a generar que las radiaciones dispersadas por todos los átomos se anulen entre sí salvo aquellas que cumplan con la ecuación:

$$AB = n\lambda$$

siendo AB la distancia interatómica, n un número entero y λ la longitud de onda del rayo incidente.

Para las radiaciones dispersadas que cumplen dicha ecuación se dice que están en fase y producen una interacción constructiva que resulta en la difracción final del cristal del rayo X incidente.

El fundamento teórico de este hecho arranca en la conocida ley de Bragg:

$$\lambda = 2 d_{nh \ nk \ nl} \text{sen}\theta$$

Esta ecuación relaciona la distancias interplanares de la estructura cristalina del material ($d_{nh \ nk \ nl}$) con el ángulo al que se reflejan los Rayos X (θ)

de una determinada longitud de onda (λ). Los índices de Miller (h, k, l) representan los planos cristalinos y “n” es el retraso con que interfieren las ondas reflejadas por planos sucesivos.

La difracción de Rayos X se ve alterada por el número y distribución de los electrones presentes en la estructura del cristal. Por lo tanto, esta técnica también permite conocer la naturaleza del cristal gracias al estudio de su densidad electrónica, parámetro que se bautizó cómo $\rho(x,y,z)$. El análisis de esta nueva posibilidad requiere de modelos matemáticos complejos como son las sumatorias de Fourier. Su aplicación se traduce en la siguiente ecuación:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha' hkl)}$$

En la ecuación $|F_{hkl}|$ es la media experimental de la amplitud de la reflexión hkl y $\alpha' hkl$ es su ángulo de fase. Si bien es una expresión con cierta complejidad sí que permite ver la relación entre la densidad electrónica del cristal y las condiciones experimentales observadas al incidir dicho cristal con un haz de Rayos X (Dittrich & Bieniok, 2009).

Un hecho que puede pasar desapercibido y que resulta fundamental es que para que se produzca una interacción constructiva y el cristal devuelva una señal cuantificable, deben darse varias condiciones simultáneamente como emplear una λ adecuada y un ángulo de incidencia θ correcto. Esto quiere decir que, en la mayoría de los casos, no va a observarse interacción constructiva o, dicho de otro modo, encontrarla va a ser algo difícil e identificativo del cristal al que estamos analizando.

El análisis de difracción por rayos X para la identificación de la naturaleza cristalina de la muestra se realizó en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (UGR) en un difractor automático modelo Bruker D8 Venture. La muestra se obtuvo por desecación del coloide

húmedo y homogeneizado del polvo resultante. Por último se prensó para la obtención de una superficie plana y lisa a partir del polvo incorporado a la prensa.

3.9 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

La espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica para la detección e identificación de sustancias que estudia la interacción de la materia con la radiación infrarroja (IR). Esta radiación queda definida como aquella con una λ comprendida entre los 0.7 y 1000 μm . Su base se fundamenta en el hecho de que las moléculas absorben la energía de un haz infrarrojo incidente cuando ésta es igual a la necesaria para una transición vibracional en su estructura bien sea de elongación o de flexión. Esta transición se traduce en un cambio en la polaridad de la molécula.

Esta técnica presenta ciertas ventajas como es que puede analizar muestras independientemente del estado de la materia en el que se encuentren ya sean sólidas, líquidas o gaseosas. Otros aspectos interesantes son su sencillez, alta sensibilidad y un bajo costo. Sin embargo, no está exenta de algunos inconvenientes. El principal de ellos es que, debido a que detecta transiciones vibracionales en moléculas unidas por enlaces químicos, aquellas que no los presenten como átomos, iones monoatómicos y sustancias diatómicas homonucleares no van a poder ser detectados por FTIR.

La forma en la que se interpreta la señal de un espectro IR varía dependiendo de si consideramos moléculas diatómicas o poliatómicas. Para las moléculas diatómicas, el modelo matemático que más se ajusta a la realidad es conocido como el modelo del rotor vibrante anarmónico en el que se aúnan las variaciones vibracionales y rotacionales de la molécula para explicar las diferentes transiciones energéticas posibles en la molécula derivadas de su interacción con la radiación IR. La ecuación resultante es la siguiente:

$$\frac{E_{v,j}}{hc} = G(v) + F_v(J) = \omega_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - \omega_e x_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 + \dots + B_v J(J + 1) - D_v J^2(J + 1)^2 + \dots$$

Siendo v el número cuántico vibracional y j el número cuántico rotacional, quedan definidas así las diferentes transiciones energéticas. Cabe destacar que los intervalos entre diferentes valores de v quedan mucho más distanciados que los valores de j , lo cual explica las grandes señales en los FTIR correspondientes a el cambio de un nivel vibracional diferente y todas las señales más bajas adyacentes que suelen aparecer en los grandes picos como los diferentes niveles rotacionales para dicho nivel vibracional. Así los diferentes niveles energéticos en el rotor vibrante anarmónico se esquematizan en la Figura 11.

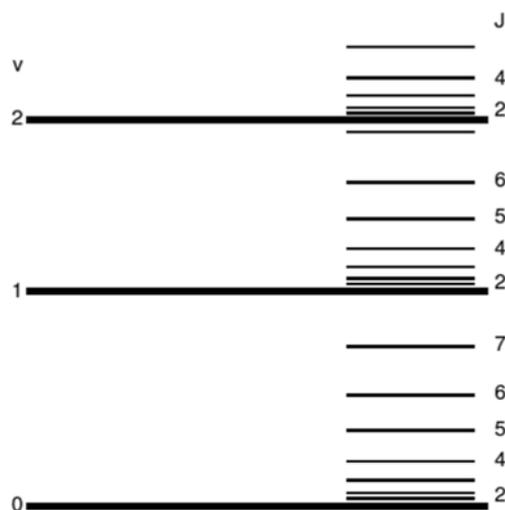


Figura 11. Esquema de los diferentes niveles energéticos en el rotor vibrante anarmónico.

Existen tres regiones del espectro infrarrojo analizables que dan información diferente sobre las moléculas analizadas:

- Infrarrojo próximo: se da en el intervalo de λ de $4000-13000\text{ cm}^{-1}$ y se producen transiciones energéticas en los armónicos de tensión del Hidrógeno. Permite obtener información cuantitativa de diversos grupos funcionales en los que debe estar implicado el Hidrógeno.

- Infrarrojo medio: es el intervalo de λ de $400-4000\text{ cm}^{-1}$ y se dan transiciones energéticas de tipo vibracional y rotacional. Arroja información cuantitativa y cualitativa sobre grupos funcionales y estructura molecular.

- Infrarrojo lejano: es el intervalo 10-400 cm^{-1} y se dan transiciones energéticas de tipo vibracional y rotacional. Permite el estudio de compuestos inorgánicos, energías reticulares de cristales, propiedades dieléctricas y ópticas.

Para la realización de un espectro se somete a la muestra a una radiación de infrarrojos la cual va alterando su λ haciendo un barrido en el rango del espectro deseado. La molécula va a absorber energía de la fuente incidente cuando su momento dipolar lo permita, generando una señal. La intensidad de dicha señal va a ser la probabilidad de la transición vibracional y depende de la magnitud del cambio polar. Es proporcional a la concentración del compuesto y esta relación se expresa mediante la ley de Lambert-Beer:

$$I = I_0 e^{-\epsilon lc} \rightarrow \ln(I/I_0) = \ln T = -\epsilon lc$$

I_0 : intensidad transmitida

I : intensidad incidente

ϵ : factor de calibración

c : concentración

T : transmitancia

Para la realización de las pruebas de infrarrojos, una muestra pulverizada de NPs desecadas fueron incorporadas a un pellet de KBr e introducidas en un Espectrómetro Infrarrojos por Transformada de Fourier, Jasco 6200, con software Spectra Manager v2.

3.10 Análisis de respuesta magnética. Ciclos de histéresis. Observación macroscópica

El análisis de la respuesta magnética tanto de los SPIONs de magnetita como de la NP compuesta por magnetita y PEI se llevó a cabo a través de diferentes métodos. Uno de ellos fue el análisis de histéresis en ciclos magnéticos del material. La histéresis se define como la tendencia de un

material a conservar una propiedad en ausencia del estímulo que la ha generado. Uno de los casos de histéresis más estudiado es la histéresis magnética en la que un compuesto superparamagnético puede exhibir comportamiento magnético al aplicarle un GCME y, tras retirarlo, debería de dejar esa respuesta magnética por completo sin conservar un vector de magnetización remanente.

Como ya se ha citado, muchas de las aplicaciones de la magnetita en biomedicina dependen en cierta forma de su superparamagnetismo y es una característica imprescindible tanto para sus SPIONs como para la NP híbrida magnetita/PEI diseñada.

Para la obtención de las curvas de histéresis la muestra se somete a un campo magnético creciente que hace que su imantación llegue desde 0 a la magnetización de saturación (M_s) instante en el cual todos los momentos magnéticos de la muestra están alineados y, por tanto, exhibe su máximo poder magnético. Posteriormente el campo magnético se revierte hasta alcanzar la misma M_s pero en la orientación contraria. Dado que la reorientación de los dominios no es completamente reversible, se producirá un desfase entre la aplicación del campo magnético y la reorientación magnética. Este hecho es lo que permite observar en las curvas de histéresis cuánto magnetismo remanente queda en la muestra al invertir el campo magnético externo ya que, una gráfica que no vuelva a pasar por el origen nos indica el vector de magnetización remanente y, por tanto, la presencia de histéresis magnética en el material; cualidad que no existe en los SPIONs superparamagnéticos.

Para la obtención de los datos en la presente tesis doctoral las muestras fueron introducidas, sin ningún tratamiento anterior en un Magnetómetro tipo Squid Quantum Design Mpms XL equipado con Evercool.

Para completar el análisis del comportamiento magnético de los SPIONs y la NP magnetita/PEI se realizaron un par de pruebas complementarias. La primera de ellas consiste en la observación del comportamiento del coloide

compuesto por SPIONs y NPs magnetita/PEI bajo la influencia de un imán de 400mT. Tras 1min de exposición al mismo se fotografiaron las muestras para su posterior análisis y observación. Por último, una alícuota de las mismas muestras de SPIONs y NPs magnetita/PEI fueron microfotografiadas en el campo de un microscopio óptico antes y después de la acción de un imán de 400mT.

3.11 Cultivo y transfección de la línea celular HEK-293

Las células HEK-293 se mantuvieron como monocapa en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con tampón de Earle (EBSS) y 2mM de L-glutamina suplementada con un 10% de suero equino inactivado y 1% de antibiótico/antimicótico. Las células fueron incubadas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y subcultivadas durante 3 días. Para los estudios de transfección, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (150.000 células/pocillo) y cultivadas durante toda la noche para permitir su adhesión a la placa y alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80%. Entonces, el medio regular de crecimiento es eliminado y las células fueron cultivadas bajo la acción de una placa magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente con las NPs magnetita/PEI que contenían 1.25 µg de pmax-GFP a diferentes rangos de PEI/DNA (m/m) desde 1/1 hasta 30/1. Finalmente, el medio es reemplazado para eliminar las NPs no internalizadas por las células y se añadió medio regular de crecimiento.

La expresión cualitativa de la proteína fluorescente verde (GFP) se examinó transcurridas 72 h tras la transfección empleando un microscopio invertido Eclipse TE200-S con la aplicación simultánea de fluorescencia y observación por contraste de fase. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCalibur. Las células fueron lavadas repetidas veces con tampón fosfato salino (TFS) y despegadas de la placa gracias a la adición de 300 µl de tripsina/EDTA al 0.05%. Las células fueron entonces centrifugadas y el pellet redispersado en TFS y diluido en el líquido FACSTFlow. Una vez hecho esto la muestra fue introducida en el citómetro de flujo para su análisis.

La eficacia de transfección fue expresada como el porcentaje de células GFP positivas a 525nm (FL₁). 5 µl de yoduro de propidio (IP) se añadieron a cada muestra para excluir a las células muertas del análisis y la fluorescencia correspondiente a las células muertas se midió a 650 nm (FL₃). La muestra control, células no transfectadas, se muestran en una dispersión frontal y lateral para establecer los rangos de medida adecuados y evitar que desechos celulares y otras interferencias alterasen los resultados. Otras muestras a base de células transfectadas con lipofectamina sin IP fueron usadas como control para compensar la señal FL₂ en FL₁ y FL₃. Para cada muestra se registraron 10.000 eventos.

3.12 Cultivo y absorción de hierro de la línea celular D1-MSCs

Las células D1-MSCs fueron cultivadas hasta subconfluencia en medio modificado de Eagle Dulbecco, rico en glucosa y suplementado con un 10% de bovino fetal inactivado no por calor y 1 unidad/ml de penicilina-estreptomicina. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos 25000 células/pocillo e incubadas durante la noche. Las Nps fueron diluidas en medio de cultivo y 300 µl fueron añadidos a las células en cultivo a diferentes ratios µg NP/10⁵células: 6.75, 15.5, 27, 54, 108, 216 y 432 en el caso de los SPIONs de magnetita y 2.75, 5.5, 11, 22, 44, 88 y 176 en el caso de las NPs magnetita/PEI. Entonces, las placas se expusieron a la influencia de un imán de 400mT durante 4 h. Los controles, células no incubadas con NPs, fueron sometidas al mismo proceso salvo dicha excepción.

Para la cuantificación espectrofotométrica del hierro internalizado por las células marcadas se siguió el protocolo de Dadashzadeh. Después de añadir las NPs magnetita/PEI a las células e incubarlas bajo la influencia de un imán de 400mT estas fueron lisadas con solución SDS al 10% y la absorbancia de los lisados fue medida a 370 y 750 nm en un lector de microplacas INFINITE M200. Los valores de absorbancia fueron compensados por un factor de

corrección correspondiente a la turbidez de los desechos celulares para determinar el contenido real en hierro de las muestras.

3.13 Ensayo de viabilidad de la línea celular D1-MSCs

La viabilidad celular de las células fue medida por dos métodos diferentes el test de supervivencia calceína-etidio y el kit-8 de recuento celular (CCK-8) usando los mismos ratios NP/célula que en los descritos en la sección anterior. En el ensayo CCK-8 los sobrenadantes se removieron y 100 μ l de medio de cultivo con 10 μ l de CCK-8 fueron añadidos a cada pozillo. Después de 4 h de incubación a 37°C las placas fueron leídas en un lector de microplacas INFINITE M200 a 450 y 650 nm.

Las muestras del test calceína-etidio fueron puestas en contacto con el kit vivo/muerto viabilidad/citotoxicidad. Después de eliminar el medio de cultivo las células fueron enjuagadas con TFS Dulbecco y 0.5 μ M de homodímero-1 de etidio en TFS de Dulbecco se añadieron a cada pozillo e incubadas a temperatura ambiente durante 40 min en ausencia de luz. Las muestras fueron examinadas por un microscopio confocal Nikon TMS Confocal Microscope en parámetro de excitación/emisión de 495/515 nm para calceína-AM y 495/635 para homodímero-1 de etidio. El análisis microscópico se realizó gracias al software NIKON Eclipse Net Software V.1.20.0.

3.14 Ensayo de enriquecimiento celular de la línea celular D1-MSCs

Células D1-MSC que expresan GFP (D1-MSCs-GFP) fueron expuestas a 27 μ g de SPIONs de magnetita/ 10^5 células o a 11 μ g de NPs magnetita/PEI/ 10^5 células y mantenidas en contacto con un imán de 400mT durante 15 minutos. Entonces, las células fueron recogidas y mezcladas con diferentes ratios de d1-MSCs/D1-MSCs-GFP: 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 y 100/0. Tubos de 50 ml de polipropileno fueron rellenos con estas muestras y sometidos durante 15 minutos a la acción de MACSxpress SEPARATOR. A continuación, el medio se recogió y los tubos de polipropileno fueron

desechados lavando previamente las paredes de los tubos con medio. Todas las muestras fueron analizadas con FACSCalibur FLOW CYTOMETER para cuantificar el enriquecimiento en D1-MSCs-GFP de las muestras retetinas en el separador en la pared de los tubos.

3.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y el test de Post-hoc Turkey considerando un intervalo de confianza del 95%. Los datos con un nivel de significancia $p < 0.05$ y $p < 0.01$ fueron considerados como significantes y muy significantes respectivamente.

CAPÍTULO 4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas

4.1.1 Núcleos magnéticos

Una vez finalizado el método de síntesis de los núcleos magnéticos mediante el proceso de coprecipitación en medio básico (ver Sección 3.1), se procedió al estudio de la carga eléctrica superficial y del tamaño de partícula. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Medidas de potencial zeta (mV) y tamaño (nm) de los núcleos de magnetita.

Determinación	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Potencial zeta (mV)	29,5	37,9	21,8	41	39,3	34,6	23,7	22,5	18,4
Diámetro (nm)	120,8	121,4	138,2	124,2	64,8	129,6	120,2	122,4	127,6

Los datos obtenidos en cuanto a PZ nos permiten afirmar que la magnetita obtenida a través de este procedimiento tiene una carga superficial positiva ($29,9 \pm 8,6$ mV). Por tanto, se desprende la necesidad de llevar a cabo un tratamiento con ácido cítrico monohidrato para su posterior recubrimiento con PEI (véase la sección 3.2).

Los datos de tamaño requieren de un análisis algo más concienzudo. Como se conoce por bibliografía y gracias al posterior ensayo mediante MET (véase la sección 3.3), las NP de magnetita obtenidas por este procedimiento presentan un tamaño de $12 \pm$ nm de diámetro, a diferencia de lo indicado en la Tabla 1. La explicación de los resultados obtenidos se encuentra en el fenómeno de agregación que pueden sufrir los núcleos magnéticos. La estabilización propuesta con ácido perclórico no consigue garantizar una ausencia total de fenómenos de agregación a lo largo del tiempo. Por tanto, puede concluirse que los núcleos magnéticos sufren procesos de agregación y

se disponen dentro del medio de dispersión acuoso, con el paso del tiempo, en forma de agregados cuyo tamaño es el recogido en la Tabla 1 ($126,7 \pm 6,7$ nm).

Terminado el tratamiento con citrato sódico monohidrato 0.1M, la carga superficial y el tamaño de los núcleos magnéticos, tanto obtenidos por la síntesis con estabilización en ácido perclórico como la estabilizada sólo mediante ácido cítrico monohidrato, fueron analizados tal y como se muestra en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Valores de potencial zeta (mV) y tamaño (nm) de los núcleos magnéticos obtenidos por síntesis con estabilización en ácido perclórico tras ser tratados con ácido cítrico monohidrato 0.1M.

Determinación	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Potencial zeta (mV)	-35,5	-31,6	-30,7	-33,5	-34,6	-38,2	-31,9	-33,1	-29,4
Diámetro (nm)	51,6	50,4	52,8	51,4	51,8	52,2	52,2	51,1	51,2

Tabla 3. Valores de potencial zeta (mV) y tamaño (nm) de los núcleos magnéticos obtenidos por síntesis con estabilización sólo mediante ácido cítrico monohidrato tras tratarlos con ácido cítrico monohidrato 0.1M.

Determinación	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Potencial zeta (mV)	-44,4	-45,5	-44,3	-35,2	-36,5	-37,8	-39,6	-39,4	-38,2
Diámetro (nm)	43,8	28,4	32,6	29,2	37,8	32,6	28,2	28,2	37,1

Como puede apreciarse en ambas tablas, con dicho tratamiento sobre los núcleos magnéticos se consigue cambiar la carga superficial de los núcleos magnéticos, desde un valor positivo ($29,9 \pm 8,6$ mV) a un valor negativo ($-33,2 \pm 2,7$ mV) para la síntesis con estabilización en ácido perclórico y ($-40,1 \pm 3,7$ mV) para la estabilizada solo con ácido cítrico monohidrato. Se logra así reducir el tamaño de partícula desde $126,7 \pm 6,7$ nm, hasta $51,6 \pm 0,71$ nm para la síntesis con estabilización en ácido perclórico y $33,1 \pm 5,5$ nm para la síntesis

con estabilización solo en ácido cítrico monohidrato.

Los núcleos obtenidos por la metodología de estabilización solo con ácido cítrico monohidrato alcanzan valores de PZ más negativos. Es posible que debido a la ausencia de tratamiento con ácido perclórico estos núcleos sean más susceptibles en su superficie a su acción y, por ello, este proceso transcurra de una manera más eficaz. Valores de PZ más negativos son considerados en este trabajo como una ventaja ya que las fuerzas de atracción magnetita/PEI van a ser de mayor intensidad y van a facilitar la creación de dichos nanocompuestos. Además, los núcleos obtenidos mediante el procedimiento de estabilización solo en ácido cítrico monohidrato presentan menor tamaño de partícula, lo cual puede interpretarse como una menor tendencia a la agregación. Este hecho cobra sentido sabiendo que las partículas tienen una mayor carga eléctrica superficial y, por tanto, deben establecerse entre ellas interacciones electrostáticas de carácter repulsivo más fuertes.

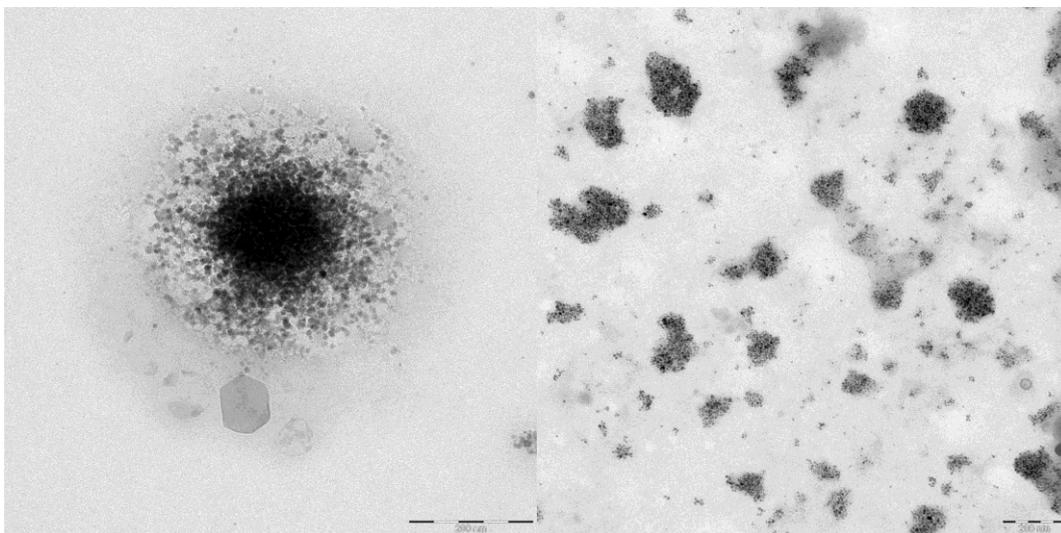


Figura 12. Microfotografías TEM de núcleos de magnetita estabilizados con ácido perclórico (izquierda) y con citrato sódico monohidrato (derecha). Longitud de barra 200 nm.

Como consecuencia de estas las anteriores apreciaciones, puede asumirse que el tratamiento con ácido cítrico monohidrato es de mayor eficacia y presenta mejores resultados con vistas a la posterior preparación de los

nanocompuestos magnetita/PEI en los núcleos obtenidos por la metodología de estabilización solo con ácido cítrico monohidrato.

Los tamaños de los núcleos de magnetita se analizaron también mediante TEM.

Como puede observarse en la Figura 12, ambos tipos de núcleos son morfológicamente similares, en ambos casos se obtienen pequeñas esferas de menos de 12 nm. Sin embargo, su tendencia a la agregación es significativamente distinta, los núcleos obtenidos por síntesis con estabilización en ácido perclórico tienden a la agregación y no se disponen individualmente en el espacio. Por otro lado, los núcleos obtenidos por el procedimiento de estabilización solo en ácido cítrico, generan agregados visiblemente más pequeños. Ya hemos discutido previamente las razones de este distinto comportamiento.

Durante el tratamiento con ácido cítrico monohidrato, se lleva a cabo un ciclo de centrifugación con el objetivo de seleccionar los núcleos magnéticos más pequeños y eliminar los residuos de la síntesis. Para comprobar la eficacia de este tratamiento, se analizó el tamaño y carga eléctrica superficial de los sedimentos obtenidos (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de potencial zeta (mV) y tamaño (nm) de las nanopartículas de magnetita recogidas en el sedimento obtenido por centrifugación.

Determinación	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Potencial zeta (mV)	-20,3	-22,1	-22,3	-22	-22,4	-7,54	-17,3	-21	-20,7
Diámetro (nm)	109,6	117,8	108,2	105,8	109,2	118,8	107,6	106,4	114,8

Si comparamos estos valores con los propios de las NP de magnetita que se recogen en el sobrenadante tras el proceso de centrifugación (aquellos que se utilizarán en la síntesis de los nanocompuestos), puede comprobarse como los valores de PZ para las NP recogidas en el sedimento presentan una disminución importante en su valor absoluto (hasta $-19,5 \pm 4,8$ mV). Además,

las partículas del sedimento son del orden de dos veces más grandes (diámetro $110,1 \pm 4,9$ mV). En definitiva, gracias a este proceso de centrifugación parece posible seleccionar los núcleos de magnetita más pequeños y de carga eléctrica superficial más negativa, lo cual consigue NPs compuestas más pequeñas y con mejor interacción magnetita/PEI.

4.1.2 Nanocompuestos magnetita/PEI

El siguiente estudio pretende discernir cuál de las diferentes metodologías de síntesis propuestas para la obtención del coloide magnético polimérico consigue un tamaño menor o válido para inyección parenteral. Las medias de los resultados obtenidos para cada una de ellas se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5. Tamaño (nm) de los nanocompuestos magnetita/PEI según la metodología empleada.

Metodología	Agitación en vórtex	Agitación con varilla	Síntesis directa	Síntesis en dos pasos
Diámetro(nm)	$254,2 \pm 88$	$260,8 \pm 73,4$	$1978 \pm 198,1$	$322 \pm 34,7$

Las metodologías por agitación en vórtex y por agitación con varilla parecen permitir la obtención de nanocompuestos más pequeños. A continuación, se realizó un estudio electroforético de ambos tipos de NPs para comparar las diferentes metodologías de obtención testadas (Tabla 6).

Tabla 6. Potencial zeta (mV) de los nanocompuestos magnetita/PEI obtenidos mediante la metodología por agitación en vórtex y por agitación con varilla.

Determinación	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Potencial zeta (mV)	31,1	31,4	31,3	32,7	31,7	32,9	33,1	34,4	34,3
Agitación en vórtex									
Potencial zeta (mV)	52,9	51,2	50,8	52,9	53,2	51,2	56,3	55,5	54,2
Agitación con varilla									

Como podemos observar, las medidas de PZ de los nanocompuestos obtenidos mediante la metodología por agitación con varilla ($53,1 \pm 1,9$ mV) parecen señalar que el recubrimiento obtenido de los núcleos magnéticos es más eficaz que el correspondiente a la metodología por agitación en vórtex ($32,5 \pm 1,2$ mV). La mayor diferencia con respecto a la carga eléctrica superficial de la magnetita es indicativa de que el recubrimiento por PEI se realiza de forma más eficaz.

De esta manera, en lo sucesivo, tan solo emplearemos la metodología por agitación con varilla como procedimiento para la síntesis del coloide magnético basado en PEI.

4.2 Influencia de la proporción magnetita/PEI en la síntesis de los nanocompuestos magnéticos

El siguiente paso para optimizar el método de obtención de NPs compuestas fue preparar una tanda de síntesis en las que las proporciones de masa de polímero y magnetita oscilasen. Este ensayo pretende encontrar la proporción que consiga el mejor recubrimiento y, a su vez, un tamaño de partícula más pequeño. Paralelamente, se pretendía ver qué núcleos magnéticos proporcionaban mejores resultados en la obtención de nanocompuestos con el fin de ahondar más en el estudio comparativo de los dos procedimientos de síntesis de magnetita. Las proporciones magnetita/PEI ensayadas fueron 4:1, 4:2, 4:3, 4:4, 3:4, 2:4 y 1:4 . Los datos de potencial zeta y tamaño de partícula obtenidos se recogen en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Valores de potencial zeta (mV) y tamaño de partícula (nm) de los nanocompuestos magnetita/PEI cuyo núcleo magnético ha sido sintetizado mediante la metodología de estabilización en ácido perclórico.

Proporción magnetita:PEI	4:1	4:2	4:3	4:4	3:4	2:4
Diámetro (nm)	334,4 ± 6,6	214,2 ± 2,8	248,4 ± 1,6	238,2 ± 1,8	350,2 ± 106,6	204,6 ± 21,2
Potencial zeta (mV)	46,42 ± 1,4	50,2 ± 3,3	50,7 ± 0,9	49,4 ± 0,6	62,9 ± 1,4	70,3 ± 5,5

Tabla 8. Valores de potencial zeta (mV) y tamaño de partícula (nm) obtenidos de los nanocompuestos magnetita/PEI cuyo núcleo magnético ha sido sintetizado mediante la metodología de estabilización solo con ácido cítrico monohidrato.

Proporción magnetita:PEI	4:1	4:2	4:3	4:4	3:4	2:4	1:4
Diámetro (nm)	1140 ± 185,4	1941 ± 417,5	110,1 ± 2,1	135,4 ± 39,1	144,1 ± 46,4	109,8 ± 9,4	102,1 ± 24,1
Potencial zeta (mV)	33,7 ± 1	48,2 ± 6,3	66,8 ± 8,6	65,9 ± 5,5	62,6 ± 7,3	54,2 ± 9,2	74,4 ± 4,8

El análisis de estos datos nos permite confirmar el completo recubrimiento de los núcleos magnéticos por el polímero. El viraje de la carga eléctrica superficial de los núcleos magnéticos hasta los valores positivos característicos de la PEI sustenta este hecho. Que los valores de PZ sean aún más elevados que los de la magnetita antes de tratar con el citrato sódico monohidrato (29,9 ± 8,6 mV), también apoya esta conclusión, ya que si los valores de PZ fueran similares, podría tratarse de una reversión en la carga eléctrica superficial hasta su valor original como consecuencia de la adición del polímero y no que este se encuentre formando un recubrimiento.

La similitud entre los valores de PZ de los nanocompuestos obtenidos con cada una de las proporciones magnetita/PEI hace pensar que el recubrimiento es siempre completo y que superficialmente todos estos tipos de NPs magnetita/PEI pueden considerarse como idénticas.

Por otro lado, en cuanto al efecto que tiene la proporción magnetita/PEI sobre el tamaño final de las NPs, los excesos de masa de óxido de hierro sobre la cantidad de polímero utilizado (proporciones 4:1 y 4:2) conducen a nanocompuestos mucho más grandes, o incluso a la generación de

macroagregados magnéticos inservibles para nuestros fines.

En cuanto al tipo de núcleo de magnetita utilizado, aquellos obtenidos mediante el método de estabilización solo por ácido cítrico monohidrato permite la preparación de nanocompuestos magnetita/PEI más pequeños y, por tanto, más apropiados para la vía de administración parenteral.

4.3 Influencia del pH y la fuerza iónica en la carga eléctrica superficial de las nanopartículas

Para predecir el comportamiento *in vivo* que pueden adquirir las NPs magnetita/PEI se evaluó una de sus principales características, como es la carga eléctrica superficial. Este parámetro va a determinar la manera de interaccionar con diferentes estructuras y moléculas en dicho entorno. También, y puesto que se ha asumido que una carga eléctrica superficial positiva corresponde al recubrimiento polimérico, nos permite evaluar su estabilidad frente a diferentes condiciones fisiológicas.

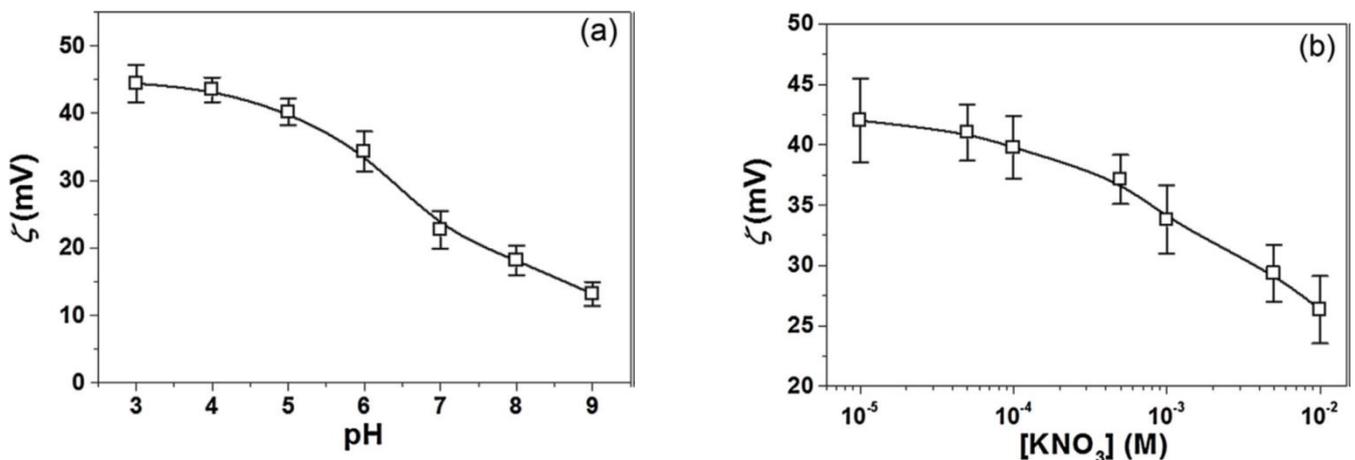


Figura 13. Influencia sobre el ζ de la NP magnetita/PEI del pH del medio (A) y de la fuerza iónica (B).

Como puede observarse en la figura 13, las NPs magnetita/PEI exhiben un ζ muy positivo en prácticamente todo el rango de pH. Solo a partir de pH 6 es donde el valor absoluto de ζ empieza a descender sugiriendo una proximidad al punto isoeléctrico a pH 9. Este comportamiento puede atribuirse

a la variedad de grupos amino, primarios, secundarios y terciarios, que posee la PEI_E y que le permite mantener un ξ positivo en todo el rango de pHs fisiológico. Esto permitiría a la NP magnetita/PEI mantener intactas algunas de sus peculiaridades derivadas de su marcado ξ positivo como es la capacidad para adherirse a las paredes celulares, con cargas eléctricas superficiales negativas. Este hecho también le permitiría permanecer acomplejado al ADN transportado ya que, de nuevo, las cargas eléctricas superficiales juegan un papel muy importante en este hecho.

En cuanto a la dependencia del ξ de la NP magnetita/PEI con respecto a la fuerza iónica del medio se puede observar como el valor absoluto de dicho parámetro se mantiene prácticamente constante. Solo cuando la fuerza iónica del medio sube drásticamente el comportamiento del parámetro comienza a oscilar. Esto constituye de nuevo una ventaja ya que evidencia la robustez del ξ de la NP magnetita/PEI que es capaz de permanecer prácticamente inalterable en un amplio rango de fuerzas iónicas.

Ambas observaciones conjuntas ponen de manifiesto el conocido como efecto “esponja de protones” que es atribuido a la PEI_E y gracias al cual este tipo de nanosistemas con dicho material protege el DNA transportado una vez es internalizado en la célula y se intenta digerir en el lisosoma mediante una descarga de protones. Como se puede observar, la carga eléctrica superficial, atribuible a las aminas es muy robusta y soporta muy bien el cambio de condiciones de medio por lo que cabría esperar del mismo modo, que se mantenga íntegra en el interior del lisosoma.

4.4 Estudio icrofotográfico de las nanopartículas Magnetita/PEI

Para estudiar la forma y características de superficie de las NPs Magnetita/PEI se llevó a cabo un estudio microfotográfico MET, MEB y MEET. Estos ensayos permitirían también confirmar y completar los ensayos realizados sobre tamaño y composición de la NP magnetita/PEI.

4.4.1 Microscopía electrónica de transmisión

La Figura 14 constituye un ejemplo de dispersión acuosa de nanocompuestos. Las flechas incluidas en la microfotografía resaltan las zonas donde el recubrimiento polimérico es más visible.

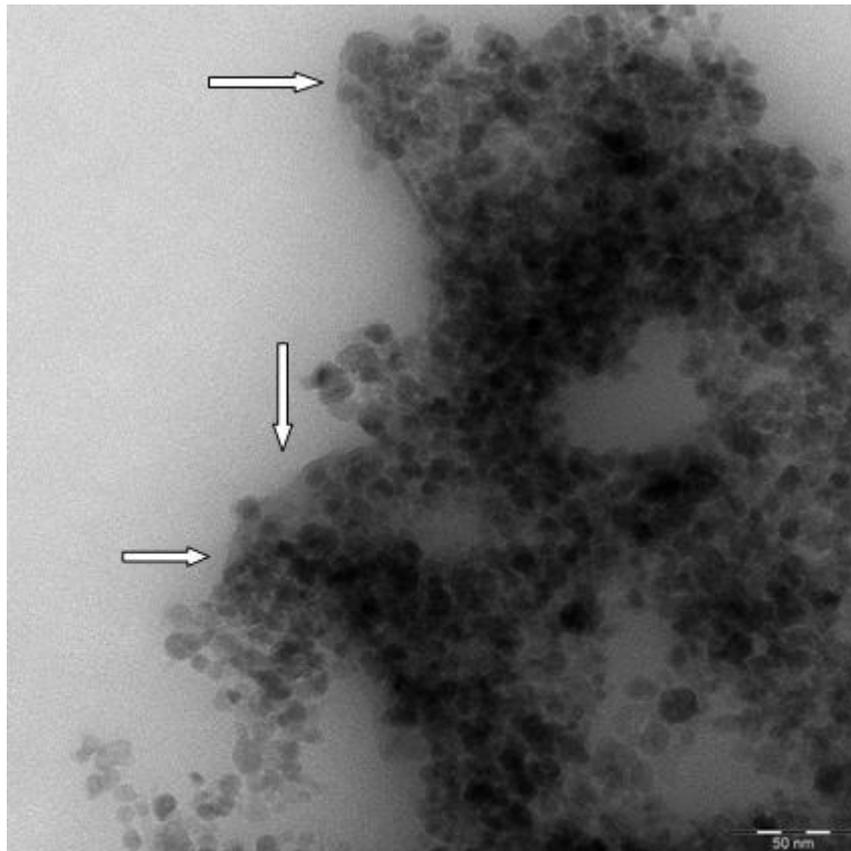


Figura 14. Microfotografía TEM de las nanopartículas magnetita/PEI.

Longitud de barra 50 nm.

Como puede observarse en ella, el tamaño de partícula, en torno a 12 nm de diámetro, se corresponde con lo descrito en bibliografía pero no concuerda con los resultados obtenidos por PCS. Esto es debido a que, como ya ha sido previamente comentado, las medidas de PCS están distorsionadas por la formación de agregados del coloide en suspensión y es aquí, en las microfotografías, donde puede apreciarse el tamaño real de los núcleos de magnetita, las pequeñas esferas negras. Debido a la potente aceleración del haz de electrones se hace muy difícil detectar la presencia de PEI ya que el número atómico de sus componentes (C, N y H) es muy bajo y es atravesada

con mucha facilidad. No obstante es posible distinguir algunos halos en torno a las agrupaciones de núcleos magnéticos que pueden interpretarse como la matriz polimérica donde se encuentran embebidos los núcleos de magnetita.

4.4.2 Microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de barrido y transmisión

Para completar el estudio microfotográfico de MET se realizaron microfotografías por las técnicas de MEB y METB. La primera de ellas permite la observación tridimensional de la estructura del nanosistema magnetita/PEI exclusivamente en superficie mientras que la segunda aúna ambas técnicas para ofrecer imágenes en profundidad de las mismas. Una microfotografía del mismo campo de la muestra obtenida por ambas técnicas puede observarse en la Figura 15.

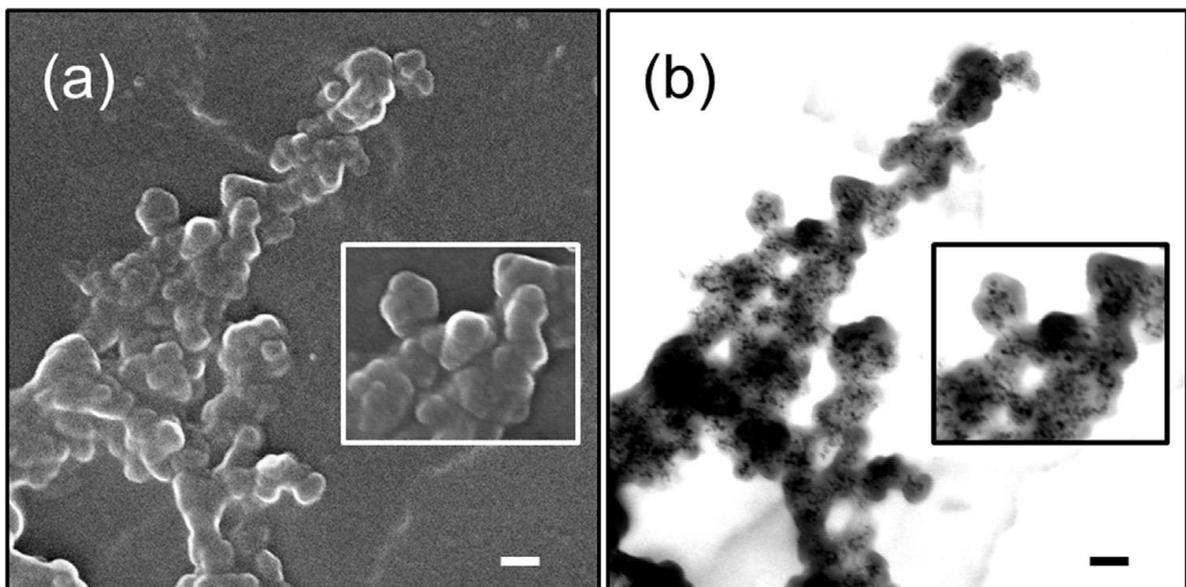


Figura 15. Microfotografía MEB (a) y METB (b) del mismo campo. Longitud de barra 100 nm.

Como puede observarse, la microfotografía MEB (a) las NPs magnetita/PEI presenta una morfología regular esférica con una superficie lisa exenta de picos e irregularidades. La aglomeración de las NPs se debe a la manipulación de la muestra que deposita y seca una muestra del coloide

formado en suspensión.

La microfotografía obtenida por METB permite observar el interior de las NPs magnetita/PEI dejando al descubierto varios hechos. Por un lado descubre la nanoestructura del híbrido, revelando una matriz polimérica en la que quedan embebidos los núcleos de magnetita. La forma esférica y redondeada de las partículas queda reforzada y, gracias a la superposición con la microfotografía MEB puede afirmarse que la totalidad de los núcleos de magnetita están dentro de la matriz polimérica y no se encuentran incrustados en la superficie del mismo. Esto explicaría el marcado carácter positivo del ξ de la estructura.

4.4.3 Espectroscopía de energía dispersiva

Otro estudio microfotográfico más que se llevó a cabo fue un análisis elemental de punto. En este tipo de análisis, un microscopio electrónico analiza la muestra en un punto indicado de la misma que ya ha sido previamente fotografiado. Esto permite identificar las especie atómicas presentes en la muestra como puede verse en la Figura 16.

Como puede observarse en la figura, se han realizado tres análisis de punto en la imagen en diferentes partes representativas de la muestra:

1. Morado: fuera de la muestra. Recoge la composición de la rejilla y hace las funciones de “blanco” para este análisis elemental.

2. Amarillo: dentro de la muestra sobre una zona donde *a priori* únicamente se encuentra el recubrimiento polimérico y no las NPs de magnetita (puntos negros). El análisis revela, como cabe esperar que no hay hierro en ese punto de la muestra.

3. Rojo: sobre un punto oscuro, presumiblemente magnetita, que se encuentra dentro de la matriz polimérica observada. Como puede apreciarse en el diagrama, este es el único punto del estudio en el que podemos encontrar Fe, correspondiente a la fórmula química de la magnetita Fe_3O_4 .

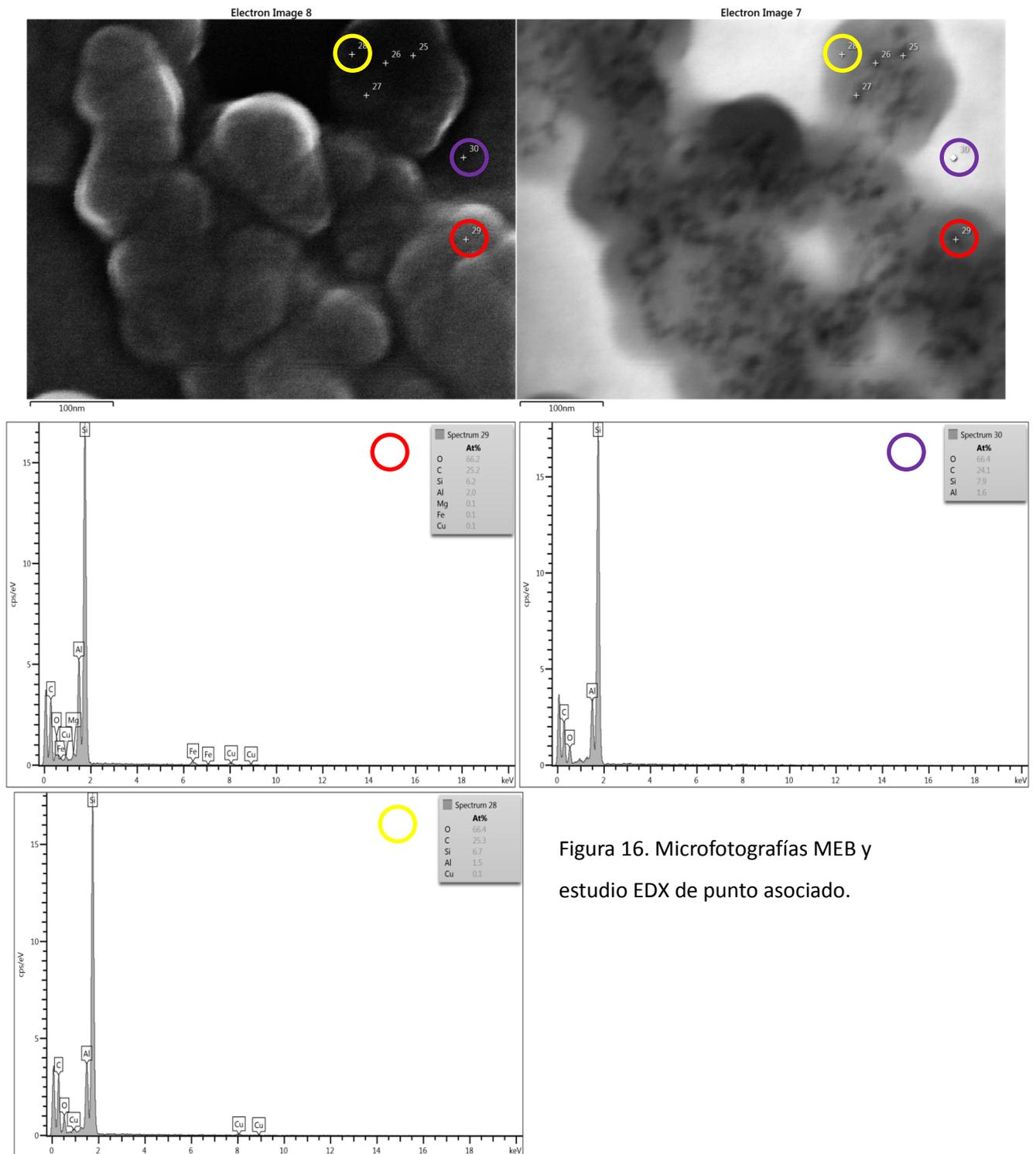


Figura 16. Microfotografías MEB y estudio EDX de punto asociado.

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que, como ya se ha mencionado, las NPs están formadas por una matriz polimérica de PEI en la que se encuentran completamente embebidas y sin presencia alguna en

superficie, los núcleos de magnetita. Este hecho es sumamente interesante ya que son sensibles a la oxidación y su protección dentro del nanosistema va a permitir una mayor estabilidad del mismo tanto estructuralmente como en sus propiedades magnéticas *in vivo*.

4.5 Rendimiento de los procedimientos de síntesis de nanocompuestos magnetita/PEI

La proporción magnetita:PEI tiene una influencia clara en el rendimiento que se obtiene en la síntesis de nanocompuestos magnéticos (Figura 17).

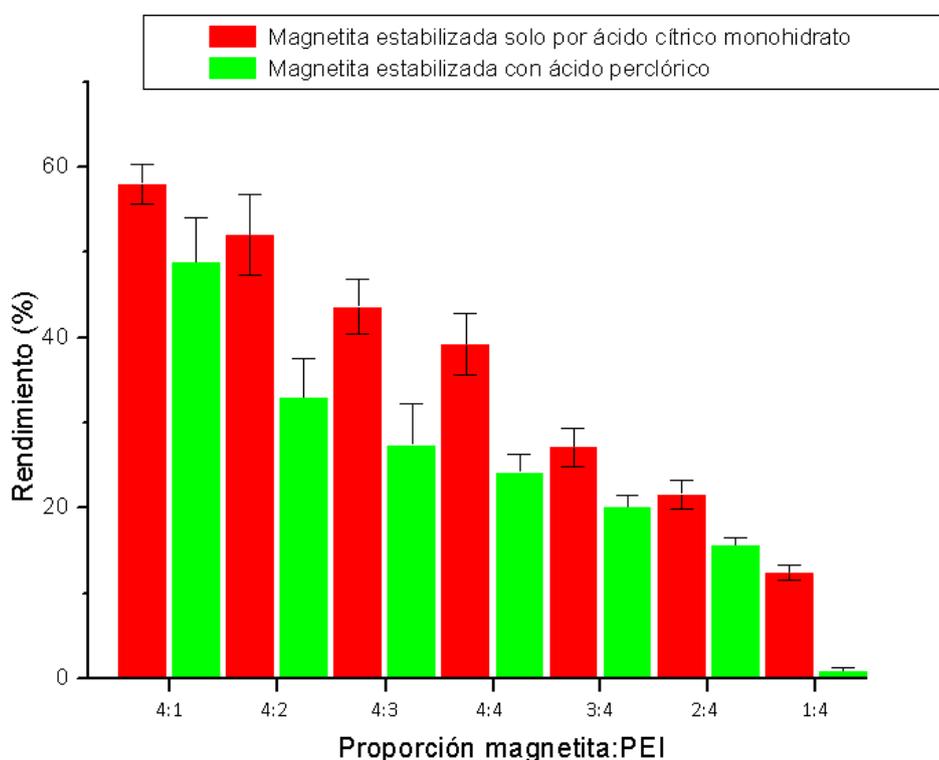


Figura 17. Rendimientos de los procesos de síntesis de las NPs magnetita/PEI en función del ratio magnetita:PEI (m/m)

Puede observarse cómo la cantidad de núcleos magnéticos utilizada en la síntesis condiciona el rendimiento de ésta. En concreto, puede intuirse cómo una mayor proporción de magnetita en comparación con la cantidad de PEI debe permitir una mayor formación de nanocompuestos magnetita/PEI. Si bien las relaciones más extremas (4:1 y 4:2) determinan la formación de macroagregados y micropartículas magnéticas que no tienen interés para la vía

de administración parenteral.

En cuanto al tipo de núcleos empleados, claramente la magnetita preparada mediante la metodología con estabilización solo por ácido cítrico monohidrato asegura un mayor rendimiento en la síntesis de nanocompuestos magnetita/PEI. Como se ha señalado previamente, este hecho puede ser consecuencia de una más intensa interacción electrostática atractiva entre los núcleos de óxido de hierro y la matriz polimérica.

4.6 Difracción de Rayos X

Una de las técnicas más empleadas para el conocimiento de la composición molecular de la materia es la difracción de rayos X. Para este ensayo se analizaron muestras de los núcleos magnéticos de magnetita y las NPs magnetita/PEI.

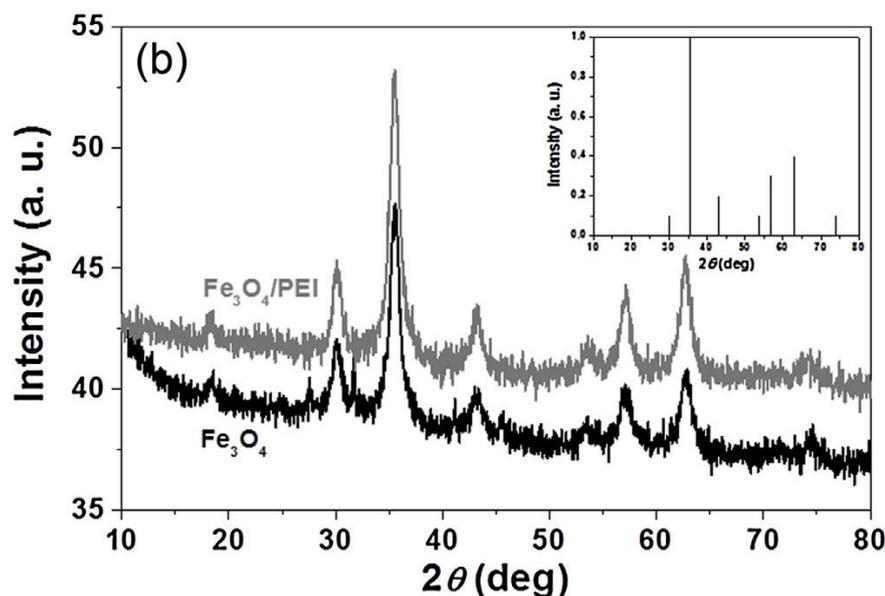


Figura 18. Difractograma de núcleos magnéticos de magnetita y magnetita/PEI y patrón ASTM para la magnetita.

Como puede observarse en el difractograma, los picos correspondientes a la señal de la magnetita (Fe₃O₄), representada por la línea negra,

corresponden con el patrón ASTM de la magnetita, encontrándose todos sus picos característicos en nuestra muestra. Esto nos permite afirmar que nuestra muestra es, efectivamente, magnetita y, además, posee su estructura cristalina típica de la cual depende en gran medida su comportamiento superparamagnético. Por último, al comparar la señal ofrecida por las NPs de magnetita/PEI, podemos observar como los mismos picos se encuentran presentes en la estructura. Aunque la intensidad de la señal sea menor, lo cual es normal debido a que los núcleos se encuentran embebidos en la matriz polimérica. La presencia de los mismos picos es indicativa de que el proceso de incorporación de los núcleos de magnetita a la matriz polimérica no afecta a la estructura cristalina de la misma y que, por ello, seguirán manteniendo inalterado su comportamiento superparamagnético.

4.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que permite identificar moléculas y conocer exactamente su composición. En la presente tesis doctoral la FTIR pretende ser una forma más de demostrar la formación de híbridos magnetita/PEI, evidenciar la eficacia del recubrimiento y, además que los SPIONs de magnetita permanecen inalterados tras el proceso de recubrimiento.

Como se puede observar en la figura 19 se realizó un interferograma en las zonas de infrarrojo de los grupos funcionales (4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}), de la huella dactilar (1300 cm^{-1}) y de las zonas aromáticas (900 cm^{-1} a 650 cm^{-1}). Se encontraron las siguientes bandas de interés:

- 600 cm^{-1} : esta banda es característica de los óxidos de hierro y está presente en las moléculas magnetita.

- 1380 cm^{-1} y 1620 cm^{-1} : estas bandas son debidas a las elongaciones simétricas y asimétricas de grupos carboxilo.

• 3425 cm^{-1} : esta señal se debe a la presencia de grupos hidroxilo en la muestra.

• 3500 cm^{-1} hasta 2000 cm^{-1} : este intervalo se atribuye a humedad de la muestra.

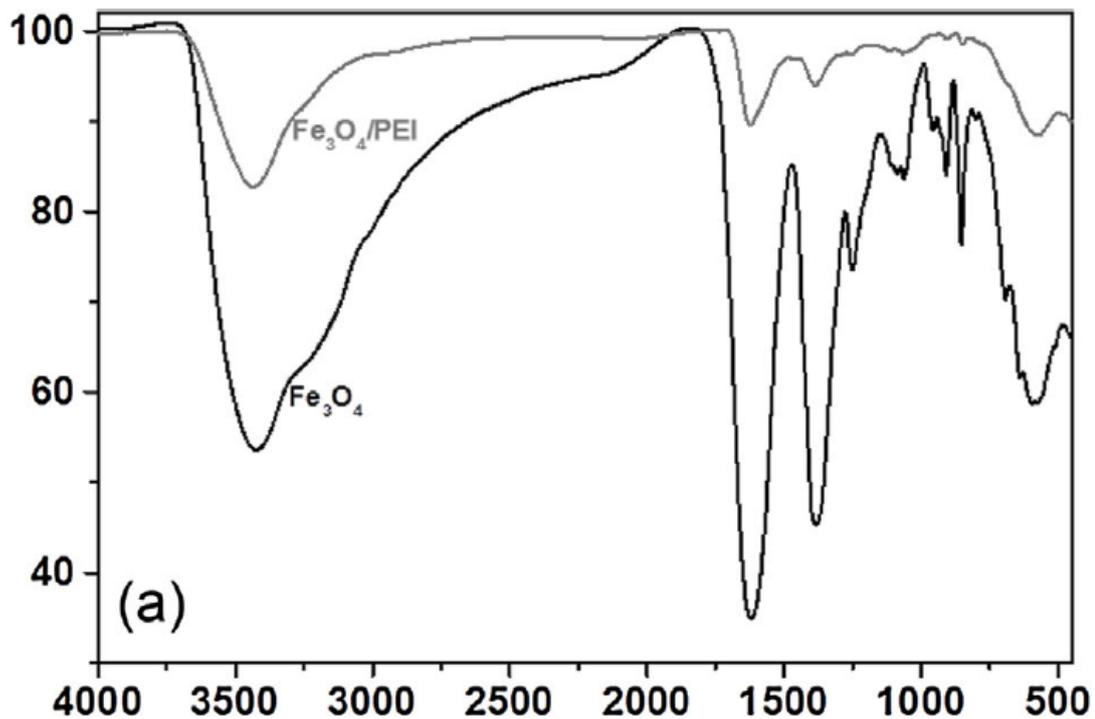


Figura 19. Interferograma FTIR para magnetita (negro) y magnetita/PEI (gris).

De la interpretación de estas bandas se pueden sacar algunas conclusiones interesantes. Primero hay que aclarar que en el proceso de manipulación de la muestra es muy difícil evitar la contaminación por humedad de tal manera que el intervalo de señal entre 3500 cm^{-1} y 2000 cm^{-1} aproximadamente, queda justificado. El resto de bandas si va a permitir sacar conclusiones directas sobre la composición de la NP magnetita/PEI. En primera instancia, la banda a 600 cm^{-1} característica de los óxidos de hierro nos permite asegurar que hay uno presente en la muestra y, gracias a otros estudios paralelos realizados, que corresponde a los núcleos magnéticos de magnetita. El resto de bandas observadas y concretamente las de 1380 cm^{-1} y 1620 cm^{-1}

ponen de manifiesto la presencia de grupos COOH en la muestra. La presencia de estos grupos puede explicarse por el tratamiento superficial de los núcleos de magnetita con citrato previo a su recubrimiento con el polímero. Las moléculas de citrato parecen quedar adheridas en la superficie del SPION siendo responsables directamente del viraje en la carga eléctrica superficial del sistema, recordemos que torna de positiva a negativa, y haciendo de intermediarios entre la unión de la magnetita y la PEI.

Gracias a este análisis se descubre un hecho importante que habría pasado desapercibido hasta ahora, la presencia de grupos citrato intercalados entre los núcleos de magnetita y la matriz polimérica de PEI.

4.8 Comportamiento magnético

4.8.1 Curvas de histéresis

Uno de los parámetros que define el comportamiento magnético de una sustancia es su histéresis magnética. Como ya se ha mencionado, en una sustancia superparamagnética, la histéresis debe de ser 0 para la magnetización adquirida al someter a dicho material a un gradiente de campo magnético externo. Para demostrar que las NPs magnetita/PEI diseñadas en el presente trabajo exhiben este peculiar comportamiento magnético se analizó su histéresis magnética.

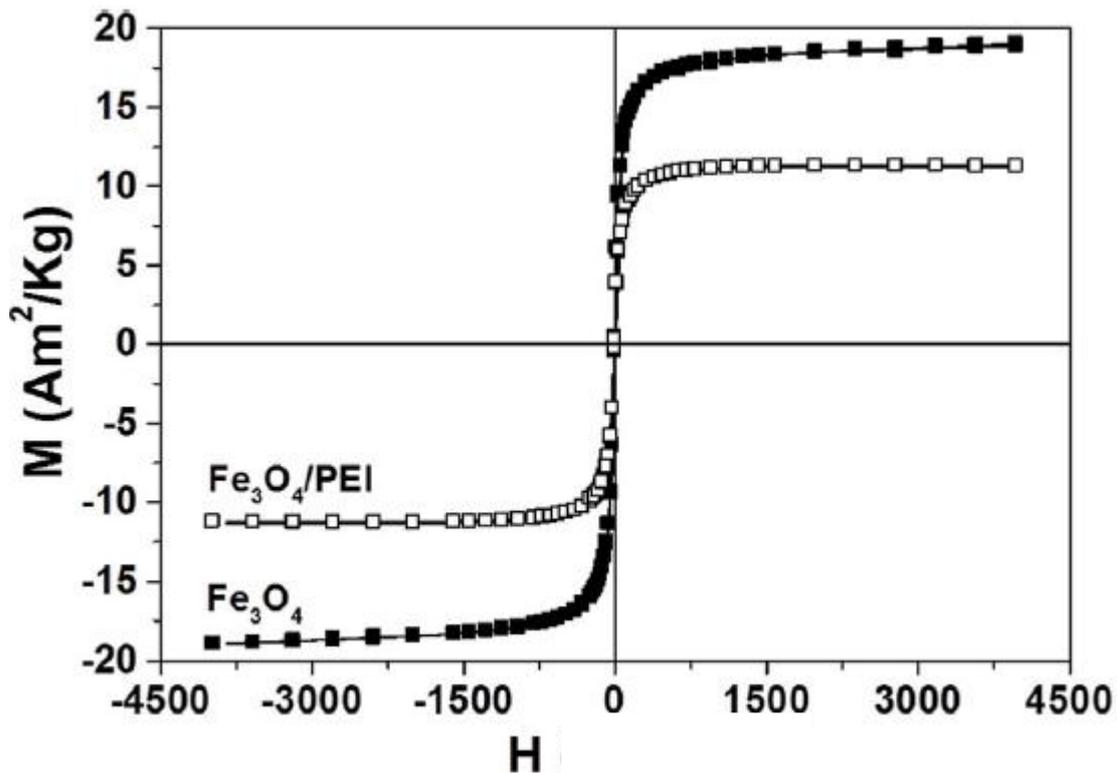


Figura 20. Curva de histéresis de magnetita (negro) y NPs magnetita/PEI (blanco).

Como puede observarse en la figura 20, la magnetita presenta una capacidad de magnetización muy alta, siendo muy baja la intensidad del gradiente de campo magnético empleado para la obtención de una carga de magnetización muy alta. Además, puesto que su curva de histéresis pasa por el origen, queda justificado y evidenciado su comportamiento superparamagnético. Esto es así puesto que al desaparecer el gradiente de campo magnético externo (H), la magnetización en el sistema (M) también queda reducida a cero, dicho de otro modo, no queda vector de magnetización remanente. Por otro lado, en cuanto a la NP magnetita/PEI podemos observar como el comportamiento es similar salvo en la saturación de la magnetización la cual es alcanzada antes. Esto puede explicarse debido a que en estos sistemas la cantidad de material magnético es menor con respecto a los núcleos de magnetita, donde el 100% de la masa del sistema es material magnético. De este modo, podemos concluir que las núcleos de magnetita dotan al sistema NP magnetita/PEI de un comportamiento adecuado para fines

biomédicos iguales al de los núcleos solos a excepción de la saturación de magnetización neta.

4.8.2 Observación macroscópica

Una forma de completar el conocimiento del comportamiento magnético de un sistema es mediante la observación macroscópica de su comportamiento frente a un imán.



Figura 21. Fotografía del coloide formado por magnetita (izquierda) y por NPs magnetita/PEI (derecha) bajo la acción de imán de 400 mT (centro).

Como se puede observar en la figura 21, el coloide magnético formado por núcleos de magnetita no presenta respuesta magnética observable a escala macroscópica. Esto es así debido a que el proceso de estabilización con citrato sódico monohidrato es lo suficientemente eficaz como para evitar la agregación entre las NPs de magnetita. De este modo, cada núcleo magnético genera un vector magnético en respuesta al gradiente de campo magnético aplicado que no es lo suficientemente grande como para desplazar al propio núcleo que lo genera. De esta forma y a simple vista, el coloide magnético de magnetita no exhibe respuesta magnética observable a escala macroscópica.

Continuando con la observación de la figura 21, se puede observar el coloide formado por las NPs de magnetita/PEI se agolpa casi por completo al lado del imán. La presencia aquí de respuesta magnética observable macroscópicamente puede explicarse gracias a la estructura de NP del sistema. Al haber embedidos en la matriz polimérica varios núcleos magnéticos, esto les permite sumar sus vectores magnéticos generados al aplicar el gradiente de campo magnético externo. De este modo el vector es lo suficientemente grande y tiene la fuerza suficiente como para desplazar a la totalidad de la NP. Este hecho es especialmente relevante ya que para las aplicaciones biomédicas vamos a necesitar que la NP magnetita/PEI presente respuesta magnética capaz de movilizar al sistema.

4.8.3 Observación microscópica

Del mismo modo que puede hacerse una observación macroscópica para extraer información del comportamiento magnético de un sistema, este puede quedar también evidenciado a escala microscópica.

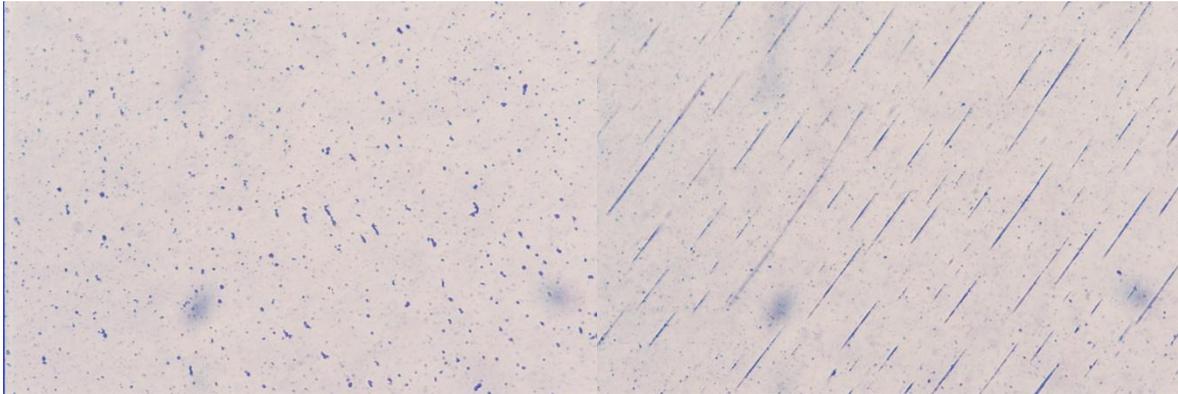


Figura 22. Fotografía de campo de microscopio óptico para las NPs de magnetita en reposo (izquierda) y bajo la acción de un imán (derecha).

La figura 22 muestra dos microfotografías de un campo de visión de un microscopio óptico. A la izquierda se puede observar una microfotografía de un coloide de núcleos de magnetita en reposo. A la derecha puede observarse al mismo coloide bajo la acción de un gradiente de campo magnético externo. La dirección del vector de magnetización es fácilmente observable dado que todas las partículas se orientan del mismo modo y apuntando en la misma dirección. La diferencia observable entre ambas fotografías cuya diferencia en su estado radica en la presencia o no del gradiente de campo magnético externo, permite afirmar que el coloide de magnetita presenta respuesta magnética y es capaz de orientarse en la dirección del gradiente de campo magnético aplicado.

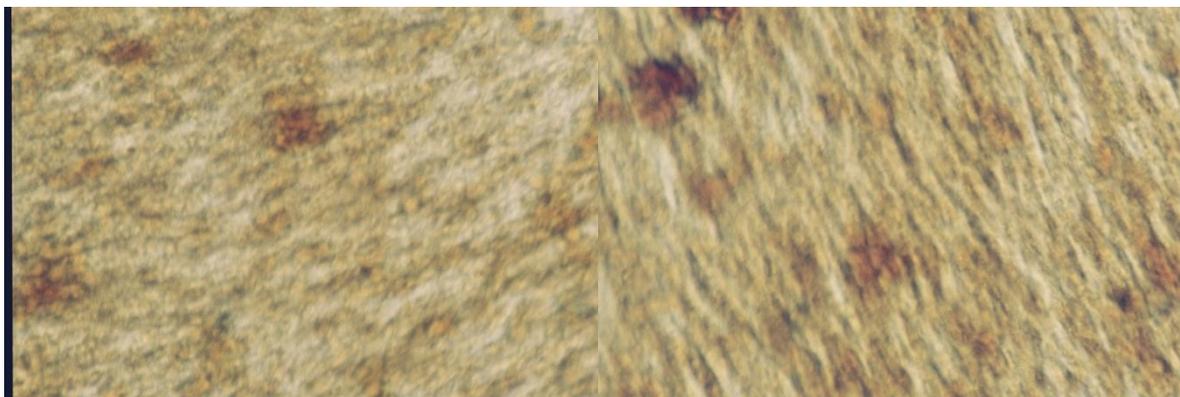


Figura 23. Fotografía de campo de microscopio óptico para las NPs de magnetita/PEI en reposo (izquierda) y bajo la acción de un imán (derecha).

En la Figura 23 puede observarse la diferencia entre el mismo coloide formado por NPs de magnetita/PEI en reposo (izquierda) y bajo la aplicación de un gradiente de campo magnético externo (derecha). La principal diferencia observable es que sin gradiente de campo magnético externo el coloide se dispone de forma aleatoria y azarosa sin orientarse a ninguna dirección, mientras que bajo la exposición de un gradiente de campo magnético externo el coloide migra hacia su dirección y las partículas se orientan hacia la misma. Este hecho demuestra cómo las NPs de magnetita/PEI presentan respuesta magnética observable microscópicamente y cómo son capaces de alinearse con un gradiente de campo magnético externo.

4.9 Unión, protección y liberación de ADN desde las nanopartículas magnetita/PEI.

La unión, protección y liberación del ADN desde el vector no-viral, en el presente caso las NPs de magnetita/PEI, son parámetros cruciales a la hora de poder realizar procesos de transfección. Es por ello que se estudiaron dichos parámetros gracias al diseño de un experimento en gel de agarosa.

En la Figura 24 se pueden observar se calles de una electroforesis en gel de agarosa. Las tres primeras (1-3) corresponden a una muestra de ADN sin acomplejar y las tres últimas (4-6) a una muestra de ADN acomplejada con NPs magnetita/PEI. La primera calle de cada muestra (1 y 4), corresponde al control. La presencia de ADN en el final de la calle 1 evidencia que el ADN es capaz de migrar a través del gel y, la acumulación del ADN al principio de calle 4 pone de manifiesto que la NP ha conseguido acomplejar el ADN y es capaz de retenerlo por lo que no migra y toda la señal se obtiene al inicio de la calle.

La segunda calle de cada muestra (2-5) corresponde al ensayo de liberación de ADN en el que se añade SDS a la muestra. La calle 2 actúa como control evidenciando que el SDS no daña el ADN y que es capaz de migrar. Como podemos observar en la calle 5, la huella es prácticamente idéntica a la

obtenida en la calle 2, por lo que se pone de manifiesto la liberación desde la NP magnetita/PEI del ADN previamente acomplejado.

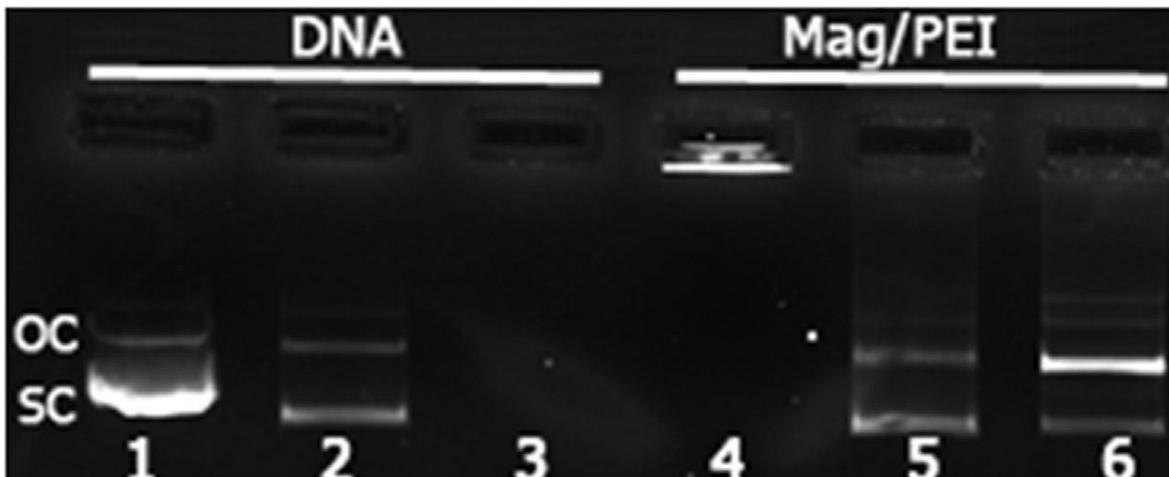


Figura 24. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de ADN (izquierda) y ADN acomplejado con NPs magnetita/PEI.

La tercera calle de cada muestra (3-6) corresponde al ensayo de protección de DNA. En la calle 3 podemos observar como el ADN desaparece por completo, lo cual sirve como control para asegurar que el ensayo funciona bien. En la calle 6 observamos como el DNA está presente en ambas bandas, tanto la superenrollada (SC) como la abierta circular (OC). Si se comparan estas bandas con las de la calle 1, se puede extraer información sobre cómo ha afectado la adición de la enzima DNAsa a la muestra. Se puede observar un aumento en la intensidad de la banda OC en detrimento de la SC. Esto se debe a una degradación parcial del ADN ya que la DNAsa rompe la doble hélice del DNA superenrollado y lo transforma en abierto circular. No obstante, se puede afirmar que la NP magnetita/PEI consigue proteger el ADN de la muestra de la acción enzimática y parte de su carga transportada es capaz de ser liberada en su forma funcional, la forma SC.

4.10 Eficacia de transfección

Para evaluar la eficacia de transfección del híbrido magnetita/PEI se llevaron a cabo dos tipos de ensayos diferentes. Se evaluó por citometría de

flujo la cantidad de células transfectadas y se confirmaron dichos resultados gracias a la toma de microfotografías en el microscopio de fluorescencia.

4.10.1 Citometría de flujo

Para la evaluación de la eficacia de transfección se llevaron a cabo diferentes procesos de transfección en los que se modificó el ratio PEI/ADN (m/m) con la idea de encontrar aquel que alcanzara la mayor eficacia de dicho proceso.

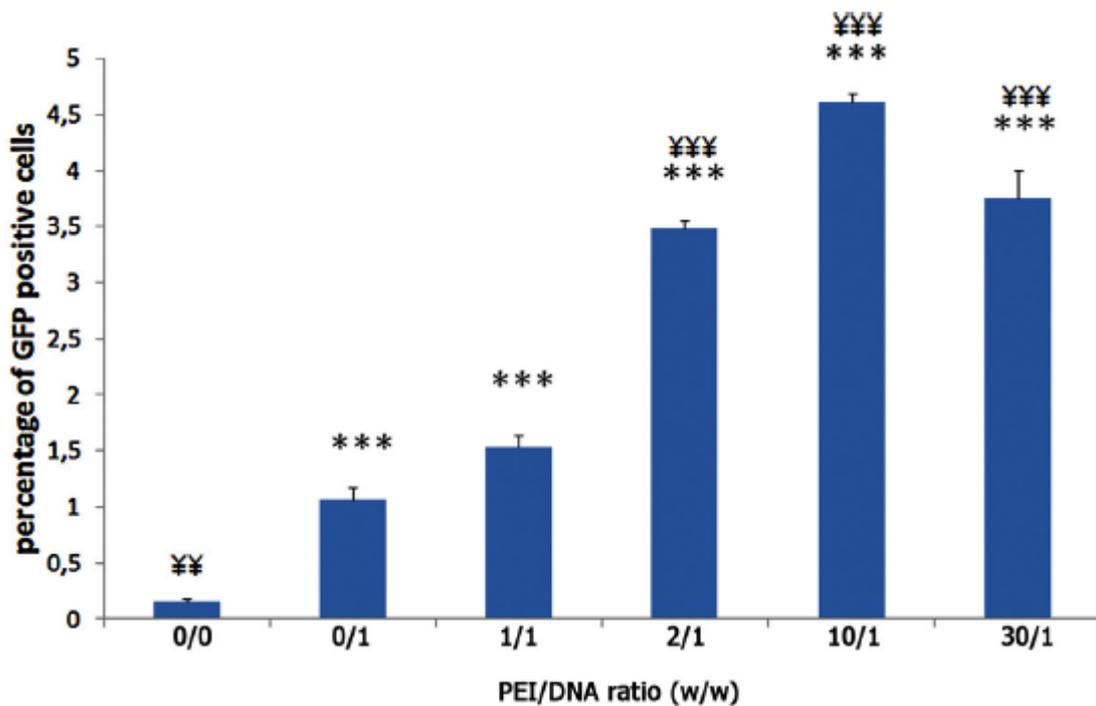


Figura 25. Eficacias de transfección de las NPs magnetita/PEI para los diferentes ratios ensayados.

Como puede observarse en la Figura 5, la incorporación del ADN en el sistema NP magnetita/PEI mejora el porcentaje total de células transfectadas llegando a ser del 4.5% frente al 1% del ADN desnudo. Dentro de todos los ratios m/m evaluados, el que mejor resultados consiguió fue el ratio 10/1 el cual parece contener la cantidad justa del polímero para conseguir una buena capacidad de carga y protección sin resultar demasiado y afectar a la eficacia del proceso.

4.10.2 Microscopía de fluorescencia

Para confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo se fotografiaron deferentes muestras de procesos de transfección para tratar de observar la expresión de la GFP codificada en el gen vehiculizado en la NP magnetita/PEI empleada. Las microfotografías de la Figura 26 fueron obtenidas de muestras en las que se emplearon los mismos ratios PEI/ADN que en el estudio anterior.

Como puede observarse en ellas, en todos los rangos del ratio PEI/DNA ensayados se consigue la transfección de células y la expresión de la GFP. Las imágenes Merged, obtenidas de la superposición de la imagen de contraste de fase y la de fluorescencia permite corroborar que la fluorescencia corresponde a células vivas sanas.

De Ambos ensayos se puede deducir que, si bien el sistema NP magnetita/PEI diseñado es válido para la transfección de células, la mayor eficacia de transfección obtenida (4.5%) queda muy por debajo de los controles realizados con el estándar de mercado Lipofectamina (25.83%). Esto sugiere que es necesaria la optimización del vehículo magnetita/PEI para conseguir su incremento en estos porcentajes y que pueda convertirse en una alternativa real a la Lipofectamina y similares.

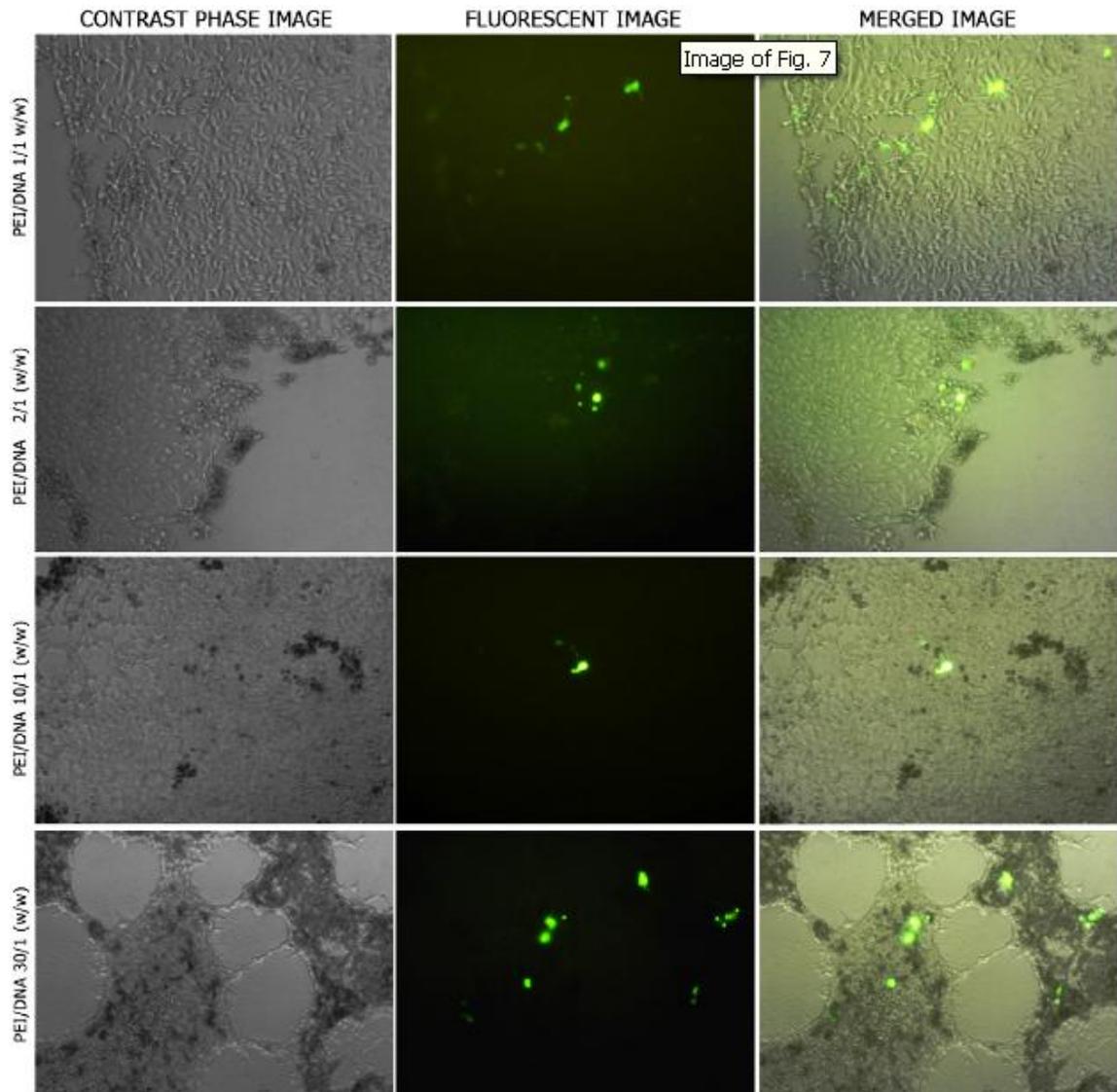


Figura 26. Microfotografías de contraste de fase (izquierda), fluorescencia (centro) y Merged (derecha) de muestras transfectadas con NPs magnetita/PEI

4.11 Internalización de hierro

Los primeros ensayos que se realizaron para evaluar la eficacia de la NP magnetita/PEI como agente marcador y de transporte de células fueron ensayos de internalización celular de hierro.

Como puede observarse en la Figura 27, la internalización celular de hierro es conseguida para todas las condiciones experimentales ensayadas y, a medida que las cantidades de NPs son mayores, la concentración de hierro encontrada también es mayor, sin concentración de saturación encontrada para el proceso. En la gráfica correspondiente a los con magnetita (A), las concentraciones de hierro conseguidas son superiores a las conseguidas con la NP magnetita/PEI. Esto puede explicarse debido a que el contenido en hierro con respecto a la masa total de NP es muy superior en la magnetita pura con respecto a la magnetita/PEI. También, con el incremento del tiempo de incubación bajo la influencia de un imán se consigue un incremento de la cantidad de hierro internalizado, llegando los valores a doblarse para una incubación de 4 h en lugar de 15 minutos en los valores más altos de ratio masa/células. En la gráfica correspondiente a la NP magnetita/PEI encontramos valores más bajos, como ya hemos indicado, y una internalización del hierro casi idéntica para 4 h o 15 min. Este hecho puede explicarse gracias al comportamiento magnético previamente estudiado de las NPs. Muy posiblemente, y gracias a su buena respuesta magnética, las NPs de magnetita/PEI no necesitan más de 15 min bajo la acción del imán para conseguir una internalización casi total en dicho intervalo de tiempo.

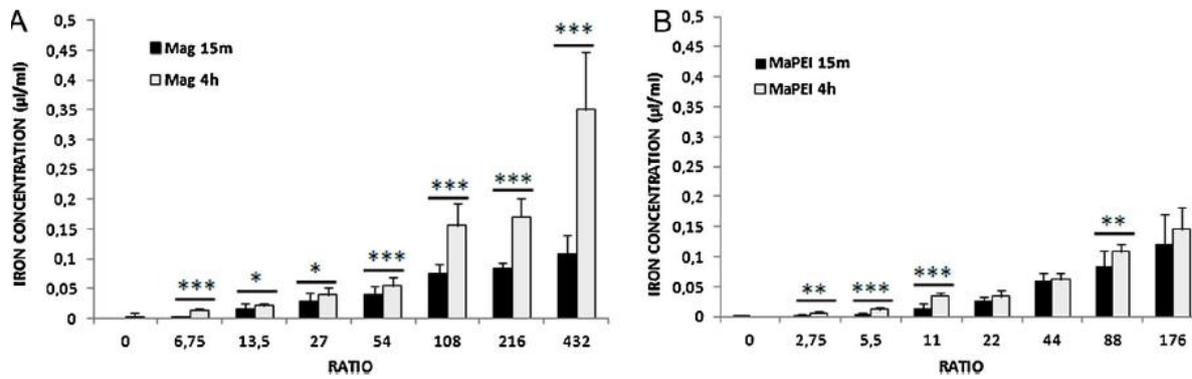


Figura 27. Ensayo de internalización celular para hierro. Concentraciones de hierro obtenidas para magnetita (izquierda) y NPs magnetita/PEI (derecha).

Por tanto, podemos afirmar que ambos sistemas consiguen integrarse en la célula diana, siendo la magnetita quien consigue mayor cantidad de hierro en el interior celular y siendo la NP magnetita/PEI la que lo consigue de una manera más rápida en el tiempo.

4.12 Actividad metabólica y viabilidad celular

Para el estudio de cómo la internalización celular de los núcleos magnéticos de magnetita y las NPs de magnetita/PEI afectan a la actividad celular se realizaron dos ensayos diferentes: un CCK-8 y un estudio de calceína-etidio. Ambos se encuentran recogidos en la Figura 28.

Como se puede observar en el ensayo CCK-8 (A-B), apenas existen diferencias significativas en la actividad metabólica de la célula una vez incorporados los dos tipos de NPs. A ratios bajos podría hablarse de un incremento en la actividad metabólica, sobre todo en cuanto a los núcleos de magnetita (A), que se va reduciendo a medida que incrementamos dicho ratio hasta caer incluso por debajo de la actividad metabólica inicial. Este hecho es más significativo en las NPs magnetita/PEI (B) lo cual puede atribuirse a su ampliamente descrita citotoxicidad. En ningún caso pudieron apreciarse diferencias significativas entre los dos tiempos de incubación bajo imán ensayados.

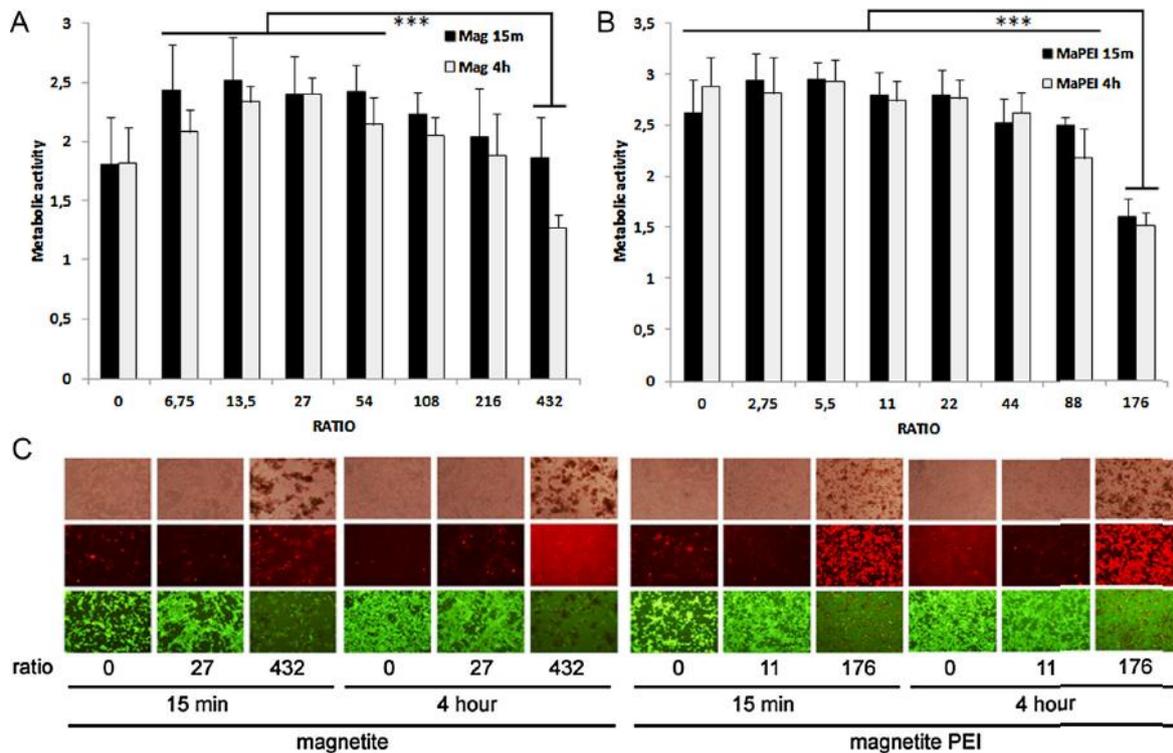


Figura 28. Tasa metabólica para células incubadas con magnetita (izquierda) y NPs magnetita/PEI (derecha). Las fotografías corresponden al estudio de calceína y etidio.

4.13 Enriquecimiento celular

La habilidad de las NPs de magnetita y magnetita PEI para mejorar los procesos de separación celular fueron también testados. En la Figura 29 podemos observar la modificación en los resultados de recuperación de una línea celular transfectada e incubada con la misma línea celular no transfectada. En la parte izquierda de la figura (A) tenemos los resultados correspondientes a células transfectadas marcadas y cargados con núcleos de magnetita tras un periodo de incubación de 15 min. Como puede observarse en todas las proporciones se consigue una mejora en el porcentaje de células transfectadas retenidas, no bajando nunca de un 70% y consiguiendo duplicar la efectividad del proceso para una proporción inicial 75/25 (%MSCs/%MSCsGFP).

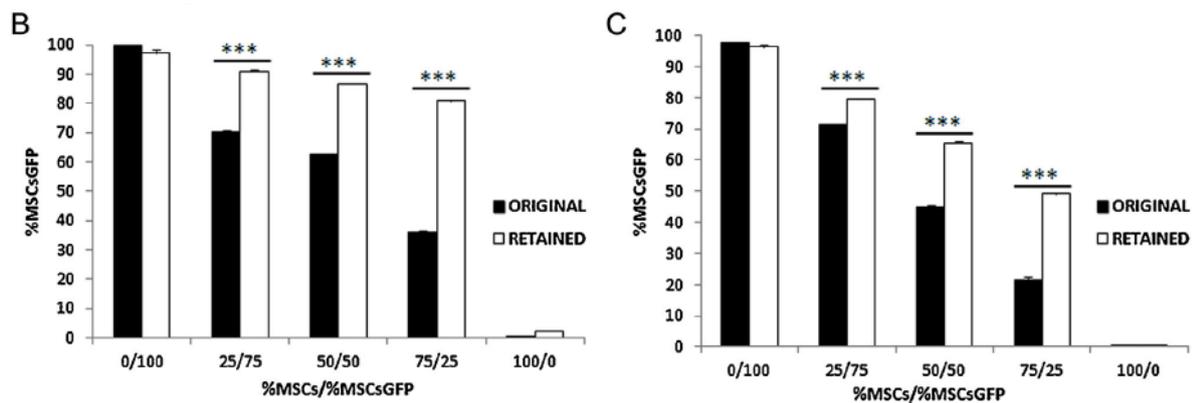


Figura 29. Ensayo de enriquecimiento celular. Rendimientos obtenidos con magnetita (izquierda) y NPs magnetita/PEI (derecha).

En la zona derecha de la Figura 29 (B) tenemos el mismo ensayo tras la incubación de las células transfectadas con NPs magnetita/PEI. Del mismo modo que ocurre con los núcleos de magnetita, el proceso consigue mejorarse para todos los ratios %MSCs/%MSCsGFP ensayados. No obstante, no se consiguen valores absolutos tan prometedores como cuando son empleadas únicamente las NPs de magnetita. Esto es posible, probablemente, a la menor cantidad de material magnético que consigue introducirse en la célula con las NPs magnetita/PEI como ya se vio en el apartado anterior.

Capítulo 5. Conclusiones

A continuación se expondrán las conclusiones obtenidas fruto del trabajo de la presente tesis doctoral. Los resultados obtenidos en cuanto a la síntesis de NPs de magnetita, magnetita/PEI y a su evaluación como vectores no-virales y agentes marcadores y transportadores de células nos permiten concluir los siguientes apartados.

5.1 Obtención de nanopartículas de magnetita

Se ha estudiado el método de obtención de NPs de magnetita por coprecipitación en medio básico confirmando que permite obtener un coloide magnético formado por NPs de magnetita con unas propiedades físico-químicas que lo habilitan como herramienta de desarrollo y aplicación de biomedicina. Las más destacables son su pequeño tamaño, su carga eléctrica superficial negativa y su forma regular esférica. Estudios de cristalografía y FTIR confirman la composición de las muestras garantizando que no aparecen otros óxidos de hierro como contaminantes como pueden ser maghemita o goethita. Además, se mejoró el, hasta la fecha empleado, método de estabilización de dichas NPs por empleo de ácido perclórico; la estabilización con citrato sódico monohidrato es sensiblemente más eficaz evitando la agregación y permite convertir la carga eléctrica superficial de dichas NPs cuando fuera conveniente en signo negativo. Los ensayos de caracterización electroforética y extensos estudios microfotográficos avalan estas conclusiones.

5.2 Obtención de nanopartículas de magnetita/PEI

Se ha desarrollado un método para la obtención de un nanosistema híbrido compuesto por núcleos magnéticos de magnetita y una matriz polimérica de PEI. Las propiedades físico-químicas observadas avalan a dicho sistema como apto para el desarrollo y aplicación de la biomedicina. Su extensa caracterización físico-química y estructural gracias a diversos ensayos

electroforéticos, estudios microfotográficos, de comportamiento magnético así como cristalográficos y FTIR permiten llegar a dicha conclusión. La NP compuesta magnetita/PEI presenta una carga eléctrica superficial marcadamente positiva, lo cual facilita su interacción con la célula diana, un tamaño en torno a los 100 nm de diámetro, lo cual la compatibiliza con la vía parenteral, una morfología esférica regular sin aristas y una estructura matricial polimérica donde se encuentran embebidos los núcleos magnéticos. Esta disposición protege y mantiene intactos los núcleos de magnetita haciendo perdurar el comportamiento magnético total del sistema.

5.2 Evaluación de la NP magnetita/PEI como agente de transfección

La NP magnetita/PEI presenta unas cualidades que pueden hacerla útil como agente para desarrollar procesos de magnetofección. Su capacidad para acomplejar, proteger y liberar ADN fue evaluada a través de diversas técnicas electroforéticas. De los resultados expuestos se pueden extraer diferentes conclusiones al respecto. La NP magnetita/PEI es capaz de acomplejar ADN en su superficie sin un incremento significativo en el tamaño del sistema. Del mismo modo es capaz de proteger dicho ADN frente a la acción de enzimas externas sin evitar su liberación cuando sea necesario.

Posteriormente, se realizaron ensayos de transfección cuya eficacia fue evaluada mediante citometría de flujo y técnicas microscópicas. Estos ensayos confirmaron la capacidad de las NPs magnetita/PEI para desarrollar procesos de magnetofección que culminen con la expresión de la proteína codificada en el gen vehiculizado. Sin embargo, pese a la optimización realizado de dicho proceso, no se consiguieron resultados equiparables a los estándares de mercado actuales por lo que cabría, en un futuro, revisar dicho procedimiento o adaptar las características físico-químicas del sistema en vista a incrementar la eficacia de transfección del sistema.

5.2 Evaluación de la NP de magnetita y de la NP magnetita/PEI como agente de marcaje y transporte celular.

Otra de las aplicaciones para las que las NPs de magnetita y magnetita/PEI exhibían prometedoras propiedades físico-químicas era el marcaje y transporte celular. Para comprobar su eficacia en ambos campos se llevaron a cabo ensayos de internalización de hierro y de enriquecimiento celular. La capacidad para internalizarse sin alterar el metabolismo y supervivencia celular de ambos tipos de NPs quedó plasmada en los resultados de los ensayos de internalización donde altas concentraciones de hierro pudieron ser observadas en el interior celular. Además, la presencia de NPs en el citoplasma de las células no alteraba su tasa metabólica ni presentaba efectos citotóxicos.

Los ensayos de enriquecimiento celular también pusieron de manifiesto la viabilidad de ambas NPs para llevar a cabo procesos de esta naturaleza. Esto reafirmaba también los anteriores ensayos de internalización celular. No solo consiguieron mejorar las tasas de enriquecimiento y recuperación de células marcadas sino que, en algunos casos, llegaron hasta a duplicar los efectos de dicho proceso.

Capítulo 6. Bibliografía

Arias, J. L., Ruiz, M. A., Gallardo, V., & Delgado, Á. V. (2008). Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 125(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.008>

Becker, C., Hodenius, M., Blendinger, G., Sechi, A., Hieronymus, T., Müller-Schulte, D., ... Zenke, M. (2007). Uptake of magnetic nanoparticles into cells for cell tracking. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1 SPEC. ISS.), 234–237. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.203>

Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F. S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A., & Kamrava, S. K. (2016). Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release*, 235, 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.062>

Bellizzi, G., Bucci, O. M., & Capozzoli, A. (2010). Broadband spectroscopy of the electromagnetic properties of aqueous ferrofluids for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322(20), 3004–3013. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.05.020>

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297–301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>

Brunner, S. (2002). Overcoming the Nuclear Barrier: Cell Cycle Independent Nonviral Gene Transfer with Linear Polyethylenimine or Electroporation. *Molecular Therapy*, 5(1), 80–86. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0509>

Bulte, J. W., Douglas, T., Witwer, B., Zhang, S. C., Strable, E., Lewis, B. K.,

Frank, J. a. (2001). Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1141–7. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1141>

Cao, X., Li, Z., Song, X., Cui, X., Cao, P., Liu, H., Chen, Y. (2008). Core-shell type multiarm star poly(ϵ -caprolactone) with high molecular weight hyperbranched polyethylenimine as core: Synthesis, characterization and encapsulation properties. *European Polymer Journal*, 44(4), 1060–1070. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.01.035>

Choi, J., Kim, H. Y., Ju, E. J., Jung, J., Park, J., Chung, H. K., Choi, E. K. (2012). Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors. *Biomaterials*, 33(16), 4195–4203. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.022>

Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Huska, D., Adam, V., Kizek, R., & Hubalek, J. (2010). Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*, 62(2), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.014>

Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R., & Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Research International*, 69, 381–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.005>

Dittrich, H., & Bieniok, A. (2009). Structural Properties: X-Ray and Neutron Diffraction, 718–737.

Divya, P., Rama, N., Prashanth, S., Senthil Kumar, N., & Vidya Sagar, J. (2012). Bioabsorbable stents – Has the concept really translated to clinical benefits? – Concept to clinical – Update: 2012. *Journal of Indian College of Cardiology*, 2(4), 156–159. <https://doi.org/10.1016/j.jicc.2012.09.005>

Fox MS, Littlefield JW. Reservations Concerning Gene Therapy. *Science* 1971;173:195–195. doi:10.1126/science.173.3993.195.

Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., & Amiji, M. (2008). A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(3), 187–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.017>

Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., & Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 11(4), RA110–A121.

Goldman, S. (2005). Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nature Biotechnology*, 23(7), 862–871. <https://doi.org/10.1038/nbt1119>

Guadix, J. a., Zugaza, J. L., & Gálvez-Martín, P. (2017). Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Medicina Clínica*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.033>

Hao, S., Wolfe, D., Glorioso, J. C., Mata, M., & Fink, D. J. (2009). Effects of transgene-mediated endomorphin-2 in inflammatory pain. *European Journal of Pain*, 13(4), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.05.008>

Herrero, M. J., Sabater, L., Guenechea, G., Sendra, L., Montilla, a I., Abargues, R., Aliño, S. F. (2012). DNA delivery to “ex vivo” human liver segments. *Gene Therapy*, 19(5), 504–512. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.144>

Herweijer, H., & Wolff, J. A. (2003). Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Therapy*, 10(6), 453–8. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301983>

Hu, W. W., Wang, Z., Hollister, S. J., & Krebsbach, P. H. (2007). Localized viral

vector delivery to enhance in situ regenerative gene therapy. *Gene Ther*, 14(11), 891–901. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302940>

Hu, Y. L., Fu, Y. H., Tabata, Y., & Gao, J. Q. (2010). Mesenchymal stem cells: A promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.015>

Huang, Y., Liu, X., Dong, L., Liu, Z., He, X., & Liu, W. (2011). Development of viral vectors for gene therapy for chronic pain. *Pain Research and Treatment*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/968218>

Hussein, A. K. (2016). Applications of Nanotechnology To Enhance the Performance of the Direct Absorption Solar Collectors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2(1), 767–792. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.050>

Iglesias, G. R., Delgado, a. V., Gonz??lez-Caballero, F., & Ramos-Tejada, M. M. (2016). Simultaneous hyperthermia and doxorubicin delivery from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 431, 294–296. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.08.023>

Jagur-Grodzinski, J. (1999). Biomedical application of functional polymers. *Reactive and Functional Polymers*, 39(2), 99–138. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(98\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(98)00054-6)

Jenq, R. R., & van den Brink, M. R. M. (2010). Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 213–221. <https://doi.org/10.1038/nrc2804>

Jeong, E. H., Kim, H., Jang, B., Cho, H., Ryu, J., Kim, B., Lee, H. (2015). Technological development of structural DNA/RNA-based RNAi systems and their applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 104, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.008>

Johnson, L. a, Morgan, R. a, Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., S, M., Lee, C. R. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Hematology*, 114(3), 535–547. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211714>

Krishnan, K. M., Pakhomov, a. B., Bao, Y., Blomqvist, P., Chun, Y., Gonzales, M., Roberts, B. K. (2006). Nanomagnetism and spin electronics: Materials, microstructure and novel properties. *Journal of Materials Science*, 41(3), 793–815. <https://doi.org/10.1007/s10853-006-6564-1>

Kumar Pramod, R., Kumar, R., & Mitra, A. (2016). Transgenic expression of green fluorescent protein in caprine embryos produced through electroporation-aided sperm-mediated gene transfer. *Gene*, 576(1), 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.066>

L.X. Tiefenauer, A. Tschirky, G. Iwhne, R. Y. A. (1996). In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI. *Science*, 14(4), 391–402.

Liu, F., Song, Y., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(7), 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>

Liu, W., Liu, Z., Liu, L., Xiao, Z., Cao, X., Cao, Z., ... Li, W. (2008). A novel human foamy virus mediated gene transfer of GAD67 reduces neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 432(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.054>

Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., & Göpferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 247–266. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.11.011>

Massart, R. (1981). *Ieee Transactions on Magnetics*, 17(2), 1247–1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>

Megías, R., Arco, M., Ciriza, J., Burgo, L. S. Del, Puras, G., López-Viota, M., ... Pedraz, J. L. (2017). Design and characterization of a magnetite/PEI multifunctional nanohybrid as non-viral vector and cell isolation system. *International Journal of Pharmaceutics*, 518(1), 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.042>

Merdan, T., Kopeček, J., & Kissel, T. (2002). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 54). [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00046-7)

Middleton, J. C., & Tipton, A. J. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21(23), 2335–2346. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00101-0)

Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F., Duguet, E. (2004). Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Forunal of Materials Chemistry*, 14, 2161–2175. <https://doi.org/10.1039/b402025a>

Nagano, M., Sakai, A., Takahashi, N., Umino, M., Yoshioka, K., & Suzuki, H. (2003). Decreased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in rat models of neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, 140(7), 1252–1260. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705550>

Nair, M., Jayant, R. D., Kaushik, A., & Sagar, V. (2016). Getting into the brain: Potential of nanotechnology in the management of NeuroAIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 103, 202–217. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.008>

Nellist, P. D. (2017). Scanning Transmission Electron Microscopy. *Scanning Transmission Electron Microscopy*, 1–53.

Niroumand, H., Zain, M. F. M., & Jamil, M. (2013). The Role of Nanotechnology in Rammed Earth Walls and Earth Buildings. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 89, 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2013.08.842>

Park, E., & Takimoto, K. (2016). A long-lasting cardiomyogenic gene expression by PEI-based transfection induces endogenous cardiac mRNAs in human adipose-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.113>

Plank, C., Zelphati, O., & Mykhaylyk, O. (2011). Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(14-15), 1300–1331. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.002>

Prabha, G., & Raj, V. (2016). Formation and characterization of β -cyclodextrin (β -CD) - polyethyleneglycol (PEG) - polyethyleneimine (PEI) coated Fe₃O₄ nanoparticles for loading and releasing 5-Fluorouracil drug. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 80, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.015>

Purushotham, S., & Ramanujan, R. V. (2010). Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.004>

Qu, X., Alvarez, P. J. J., & Li, Q. (2013). Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Research*, 47(12), 3931–3946. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.058>

Sciences, H. H., Miller, M. E., Byington, R. P., Forest, W., Bigger, J. T., Buse, J. B., Friedewald, W. T. (2011). Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *The New England Journal of Medicine*, 2545–2559. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402685>

Shao, H., Yoon, T. J., Liong, M., Weissleder, R., Lee, H. (2010). Magnetic nanoparticles for biomedical NMR-based diagnostics. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 1(1), 142–154. <https://doi.org/10.3762/bjnano.1.17>

Sheehy, S. H., Duncan, C. J., Elias, S. C., Collins, K. a, Ewer, K. J., Spencer, A. J., Draper, S. J. (2011). Phase Ia Clinical Evaluation of the Plasmodium falciparum Blood-stage Antigen MSP1 in ChAd63 and MVA Vaccine Vectors. *Molecular Therapy*, 19(12), 2269–2276. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.176>

Suh, J., Paik, H. J., & Hwang, B. K. (1994). Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at Various pH's. *Bioorganic Chemistry*. <https://doi.org/10.1006/bioo.1994.1025>

Sun, C., & Berg, J. C. (2003). Photon correlation spectroscopy investigations of proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 105, 151–175. <https://doi.org/10.1016/S0001-8686>

Sun, Y., Chen, Z. L., Yang, X. X., Huang, P., Zhou, X.-P., Du, X. X. (2009). Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. *Nanotechnology*, 20(13), 135102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/13/135102>

The Journal of Gene Medicine. 2017 [Consulta 14 Abril 2017] Disponible en: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>

Trojanowicz, M. (2016). Impact of nanotechnology on design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. *Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.027>

Uchida, M., Li, X. W., Mertens, P., Alpar, H. O. (2009). Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(8), 754–764. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.013>

Uzgiris, E. E. (1981). Laser Doppler methods in electrophoresis. *Progress in Surface Science*, 10(1), 53–164. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(81\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0079-6816(81)90006-X)

Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science*, xx, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>

Wang, X., Zhou, L., Ma, Y., Li, X., Gu, H. (2009). Control of aggregate size of polyethyleneimine-coated magnetic nanoparticles for magnetofection. *Nano Research*, 2(5), 365–372. <https://doi.org/10.1007/s12274-009-9035-6>

Xie, S., Zhang, B., Wang, L., Wang, J., Li, X., Yang, G., Gao, F. (2015). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with different polymers and their MRI contrast effects in the mouse brains. *Applied Surface Science*, 326, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.11.099>

Xu, Y., Gu, Y., Xu, G.-Y., Wu, P., Li, G.-W., & Huang, L.-Y. M. (2003). Adeno-associated viral transfer of opioid receptor gene to primary sensory neurons: a strategy to increase opioid antinociception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 6204–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930324100>

Yang, G., Ma, W., Zhang, B., & Xie, Q. (2016). The labeling of stem cells by superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with PEG/PVP or PEG/PEI. *Materials Science and Engineering C*, 62, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.090>