



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS TERMOSENSIBLES PARA BIOIMAGEN, TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Lucía Navarro Serrano

Tutora: Carmen Reyes Mateo Martínez

Cotutora: M^a José Martínez Tomé

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

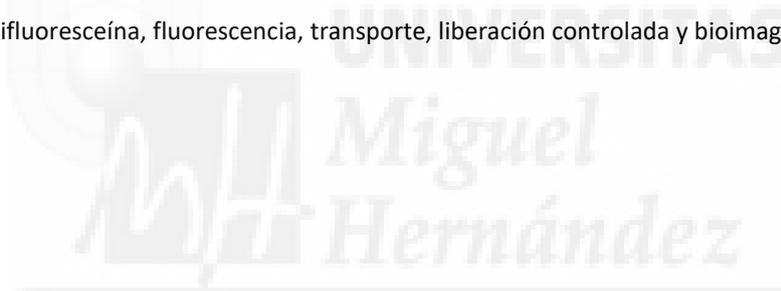
Área de conocimiento: Química-Física

Grado en Biotecnología

Curso 2016/2017

Resumen: En este trabajo se han desarrollado unas nuevas nanopartículas termosensibles fluorescentes basadas en liposomas termosensibles compuestos por un lípido aniónico (DPPG) y un polielectrolito conjugado que emite en el azul (HTMA-PFP). Además, se han realizado ensayos preliminares para ampliar su funcionalidad hasta hacerlas fotosensibles con la incorporación de nanopartículas de oro (AuNPs). Su caracterización se ha llevado a cabo utilizando diferentes técnicas analíticas como son la espectroscopía de absorción y fluorescencia, la microscopía de fluorescencia o la dispersión dinámica de la luz. Los resultados derivados de dicho estudio han mostrado su capacidad para encapsular fármacos hidrofílicos, que pueden ser posteriormente liberados aumentando la temperatura por encima de la temperatura de transición de fase gel a fluida del lípido que forma las nanopartículas. Para ello, como modelo de fármaco se ha empleado la carboxifluoresceína (CF). También se ha mostrado una correcta incorporación del polielectrolito en la bicapa lipídica, dotando así a las nanopartículas de la fluorescencia deseada. En cuanto al marcaje celular, los resultados han mostrado la capacidad de interaccionar con modelos de membrana celulares, marcando la región donde se produce la interacción. Debido a los resultados obtenidos, se ha podido confirmar la multifuncionalidad de las nanopartículas obtenidas y su potencial utilidad como medio de transporte, liberación controlada de fármacos y monitorización mediante bioimagen.

Palabras clave: nanopartícula termosensible fluorescente, liposomas, DPPG, temperatura de transición de fase, HTMA-PFP, carboxifluoresceína, fluorescencia, transporte, liberación controlada y bioimagen.



Abstract: In this work, new thermosensitive fluorescent nanoparticles based on thermosensitive liposomes composed of an anionic lipid (DPPG) and a conjugated polyelectrolyte emitting in blue (HTMA-PFP) have been developed. In addition, preliminary tests have been done to extend its functionality to make them photosensitive with the incorporation of gold nanoparticles (AuNPs). Its characterization has been done using various analytical techniques such as absorption and fluorescence spectroscopy, fluorescence microscopy or dynamic light scattering. The results derived from the study have shown their ability to encapsulate hydrophilic drugs, which can be release by raising the temperature above the gel phase transition temperature to fluid of the lipid that form the nanoparticles. For this, carboxyfluorescein (CF) has been used as the drug model. It has also been observed a correct incorporation of the polyelectrolyte into the lipid, giving the nanoparticles the desired fluorescence. As for cell labeling, the results have shown the ability to interact with cellular membrane models, marking the region where the interaction takes place. Due to the results obtained, it has been possible to confirm the multifunctionality of the nanoparticles obtained and their potential utility as means of transport, controlled release and bioimaging monitoring.

Keywords: thermosensitive fluorescent nanoparticle, liposomes, DPPG, phase transition temperature, HTMA-PFP, carboxyfluorescein, fluorescence, transport, controlled release and bioimaging.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. LIPOSOMAS	4
1.2. POLIELECTROLITOS CONJUGADOS.....	5
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1. LIPOSOMAS COMO TRANSPORTADORES Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	7
2.2. LIPOSOMAS HÍBRIDOS	8
2.3. LIPOSOMAS TERMOSENSIBLES	8
2.4. HTMA-PFP: caracterización e interacción con liposomas.....	9
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. MATERIALES.....	12
4.2. MÉTODOS	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. LIPOSOMAS DE DPPG.....	16
5.2. NANOPARTÍCULAS DE DPPG CON HTMA-PFP.....	21
5.3. APLICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOIMAGEN.....	28
5.4. NANOPARTÍCULAS FOTOTÉRMICAS: RESULTADOS PRELIMINARES	33
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ABREVIATURAS

NPs	Nanopartículas
MLV	Vesícula multilamelar (del inglés <i>multilamellar vesicle</i>)
SUV	Vesícula unilamelar pequeña (del inglés <i>small unilamellar vesicle</i>)
LUV	Vesícula unilamelar grande (del inglés <i>large unilamellar vesicle</i>)
GUV	Vesícula unilamelar gigante (del inglés <i>giant unilamellar vesicle</i>)
DPPG	1,2-dipamitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal de amonio
T _c	Temperatura de transición de fase
QDs	Puntos cuánticos (del inglés <i>quantum dot</i>)
CPEs	Polielectrolitos conjugados
HTMA-PFP	Poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo] fluoreno-fenileno}
CF	Carboxifluoresceína
DPH	Difenilhexatrieno
DMSO	Dimetilsulfóxido
AQS	Ácido 9,10-antraquinona-2,6-disulfónico
AuNPs	Nanopartículas de oro
<r>	Anisotropía
K _p	Coeficiente de partición
DLS	Dispersión dinámica de luz (del inglés <i>dynamic light scattering</i>)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente que forman estructuras esféricas. Estructuralmente, los liposomas se constituyen por moléculas derivadas de los lípidos de membranas biológicas [1]. Cada lípido está formado por una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica de cadenas hidrocarbonadas, por ello decimos que tienen carácter anfipático [2]. Debido a dicha característica en contacto con el agua forman, espontáneamente, una esfera organizada en bicapas, quedando una fase acuosa en el interior (Figura 1). Suelen ser de talla nanométrica, no obstante, se pueden alcanzar mayores tamaños [1]. Los liposomas con diámetros <200 nm pueden englobarse dentro de la categoría de nanopartícula.

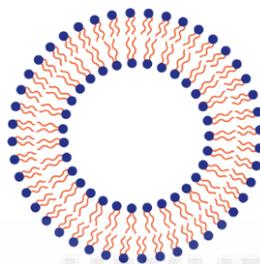


Figura 1. Estructura de un liposoma.

Entre las propiedades de los liposomas podemos encontrar:

- **Permeabilidad:** sus membranas lipídicas son semi-permeables. Las sustancias que son capaces de atravesar la membrana están relacionadas con la solubilidad de las grasas. El grado de difusión varía de unas moléculas a otras dependiendo de su solubilidad en agua y en grasas, su tamaño y su carga. Además, se ha de tener en cuenta que pueden estar presentes en la membrana otros componentes como grupos proteicos que funcionan como reguladores del *tráfico* de sustancias. También, hay que considerar que, como apuntan últimas investigaciones, existen poros en la bicapa provocados por imperfecciones. Esta propiedad es relevante para la aplicación de estos sistemas como transportadores de fármacos [3].
- **Carga superficial:** responsable de crear un campo eléctrico que afecta a la estructura, la fluidez y el transporte de moléculas. Además, ejerce un papel fundamental en la estabilidad de los liposomas, controlando los procesos de agregación y fusión mediante la repulsión o atracción de las superficies lipídicas. La carga superficial depende de la composición fosfolipídica de la bicapa [3]. Para ello, es determinante la cabeza polar hidrofílica de los lípidos, éstas pueden ser zwitteriónicas: fosfatidil colina (PC), fosfatidil etanolamina (PE), esfingomielina (SM); cargadas negativamente: ácido fosfatídico (PA), fosfatidil glicerol (PG), fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI), cardiolipina (CL) y glicolípidos que pueden estar cargados negativamente o no [1].

Fosfolípidos cargados negativamente se añaden en muchas preparaciones para disminuir la tendencia de los liposomas de PC a agregarse, incrementando así la eficiencia para encapsular fármacos [3].

- **Transiciones de fase de la bicapa lipídica:** la bicapa lipídica posee fluidez y movilidad, las cuales dependen de la temperatura. A bajas temperaturas, los lípidos se encuentran en estado gel cristalino, con una estructura rígida y la movilidad reducida. Al aumentar la temperatura se produce una pre-transición de fase que tiene que ver con el aumento en la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y la aparición de ondulaciones en la superficie de los liposomas (Figura 2). A mayores temperaturas tiene lugar una transición en la movilidad de las colas de los fosfolípidos. Es una transición en la estructura laminar de la bicapa, hacia un estado líquido cristalino, en el que la fluidez es mayor. La temperatura a la cual las cadenas de ácidos grasos se funden se denomina temperatura de transición de fase, T_c . La formación de liposomas se produce a una temperatura superior a la T_c de los lípidos que los constituyen y de ahí la importancia de conocer esta temperatura [3].

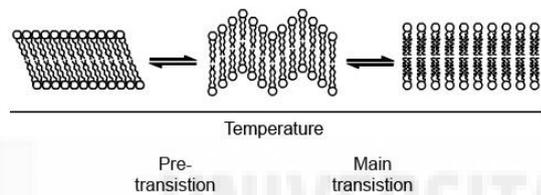


Figura 2. Transición de fase lipídica.

Para su clasificación, podemos distinguir diferentes estructuras lamelares que al sellarse forman las vesículas. Diferenciamos unos tipos de otros atendiendo al número de bicapas y a su tamaño. Podemos encontrar vesículas multilamelares (del inglés *multilamellar vesicles* MLV, 0,1-10 μm) o vesículas unilamelares, que pueden ser de diámetro pequeño (del inglés *small unilamellar vesicles* SUV <100 nm), de diámetro grande (del inglés *large unilamellar vesicles* LUV 100-500 nm) o gigantes (del inglés *giant unilamellar vesicles* GUV $\geq 1 \mu\text{m}$) [1].

1.2. POLIELECTROLITOS CONJUGADOS

Los marcadores fluorescentes son de gran interés en diagnóstico clínico, terapia clínica, fisiopatología, detección de células patógenas y en el transporte y liberación de fármacos, entre otras. Para que el desciframiento y seguimiento de los comportamientos y las funciones fisiológicas se produzcan con una buena resolución, sin perturbar los sistemas biológicos, dichos marcadores han de tener una serie de características. Deben poseer una fluorescencia altamente duradera, ser solubles en agua, biocompatibles (perturbando mínimamente a los sistemas biológicos), fácilmente bioconjugables, fotoestables y han de poseer una buena resolución espacial [4].

En la actualidad, los marcadores fluorescentes más utilizados son: pequeños fluoróforos, proteínas fluorescentes y puntos cuánticos semiconductores (QDs). Sin embargo, dichos marcadores presentan una serie de inconvenientes que se mencionan a continuación. Entre ellos encontramos que, pequeñas moléculas fluorescentes y proteínas fluorescentes son inestables frente a la irradiación (*photobleaching*), mientras que los QDs, a pesar de poseer mayor estabilidad, también poseen elementos tóxicos como el Cd o el Se, que son susceptibles de liberarse y resultan tóxicos tanto para cultivos celulares como para organismos vivos [4].

Todos estos inconvenientes y limitaciones complican el uso de dichos materiales fluorescentes. Por ello, aparece la necesidad de desarrollar nuevos materiales fluorescentes que mejoren las propiedades de los anteriormente citados. Es decir, que posean una elevada estabilidad y sensibilidad y que no presenten toxicidad. Entre estos nuevos materiales encontramos los polielectrolitos conjugados (CPEs), que han surgido como materiales funcionales versátiles [4].

Los polielectrolitos conjugados (CPEs) (Figura 3) son polímeros π -conjugados formados por un esqueleto rígido o semirrígido (alternando enlaces simples y dobles) y por cadenas laterales con grupos ionizables que pueden estar cargados negativa o positivamente. Estos grupos son los que facilitan la solubilización en agua. Además, los CPEs son fluorescentes y presentan alta absorción y fotoestabilidad, baja citotoxicidad y estabilidad térmica. Un aspecto interesante a considerar es que, mediante bioconjugación, las cadenas laterales son fácilmente manejables y que junto con el esqueleto principal pueden ser modificadas con el objetivo de personalizar las propiedades fotofísicas [5-6].

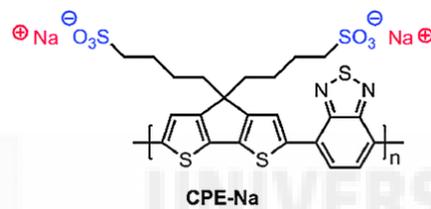


Figura 3. Ejemplo de CPE.

Todas estas propiedades han llevado al uso de los CPEs para el estudio de su interacción con biomoléculas y modelos de lípidos de membrana, que imitan la complejidad natural de la membrana celular. Además, han despertado el interés de su desarrollo para su uso en técnicas de bioimagen, detección de biomoléculas y diseño de biosensores [7-10].

2. ANTECEDENTES

2.1. LIPOSOMAS COMO TRANSPORTADORES Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Los primeros liposomas fueron creados en 1965 por Bangham al añadir agua a un matraz que contenía lípidos. Desde entonces, laboratorios alrededor de todo el mundo se han centrado en sus propiedades y en sus posibles aplicaciones, entre las que destaca su uso como sistema de transporte para la liberación controlada de fármacos [3].

➤ **Transporte**

Un transportador ideal tiene que ser capaz de mantener la concentración adecuada del fármaco, protegerlo de la degradación y evadir la eliminación temprana por parte del organismo. A pesar de que las partículas inorgánicas (que también son usadas como transportadores) son más estables que los liposomas, éstos últimos son biocompatibles, cosa que es muy cuestionable en las primeras. Los liposomas, además, presentan ventajas en comparación, como son una baja toxicidad y una menor incidencia de efectos secundarios [2].

Los liposomas pueden incorporar fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. En el caso de los hidrofílicos, éstos permanecen encapsulados en el interior (siendo este un medio acuoso), mientras que los hidrofóbicos pueden situarse en la estructura de la bicapa lipídica. Además, se pueden diseñar para que posean características tales que les permitan adherirse a las membranas celulares o para que puedan ser endocitados y así poder liberar el fármaco [11].

➤ **Liberación**

En el caso de la liberación, es necesario que se establezca un mecanismo para que el liposoma libere el contenido. Para ello, hay distintos enfoques basados en la sensibilidad de los liposomas a diferentes estímulos [2]. Entre estos encontramos:

- Sensibles a los cambios de pH: este tipo de liposomas liberan su contenido al citoplasma celular cuando son endocitados. Esto se produce porque en los endosomas se encuentran con un medio de pH ácido, el cual los desestabiliza [12].
- Sensibles a los pulsos láser UV/VIS: este tipo de liposomas tienen un sistema de liberación de su contenido fotoinducido. Para conseguirlo, se construyen liposomas con lípidos fotoisomerizables que al ser expuestos a la luz UV/VIS producen cambios en la permeabilidad de la membrana [13].
- Sensibles a los cambios de temperatura: este tipo de liposomas tienen un sistema de liberación de su contenido basado en la temperatura de transición del lípido que lo forma. Lo que ocurre es que una vez se sobrepasa dicha temperatura, la fluidez de la bicapa aumenta, con lo que se produce la liberación de su contenido a una temperatura que somos capaces de controlar. Es relevante en uso

como fuente de calor de nanopartículas magnéticas, las cuales generan calor cuando se exponen a un campo magnético [14], o de nanopartículas de oro, que al absorber luz transforman la energía lumínica en calorífica [15].

➤ **Orientación de la liberación**

Los liposomas pueden incorporar *guías* tanto en su interior como en su superficie que facilitan la orientación del liposoma hacia el lugar al que se desea dirigir la liberación del fármaco. Podemos distinguir diferentes tipos de *guías*, como son las nanopartículas magnéticas y los péptidos, entre otras. En el caso de las nanopartículas magnéticas (situadas en el interior), éstas pueden ser orientadas mediante el uso de campos magnéticos. Mientras que los péptidos (situados en la superficie externa), puede dirigirse a lugares que presenten receptores característicos de un área afectada por algún tipo de enfermedad [2].

Por todas estas razones, los liposomas son estudiados como transportadores y liberadores de fármacos, ya que tienen el potencial de conseguir las metas para ello (concentración, protección, evasión, transporte dirigido y liberación) [2].

2.2. LIPOSOMAS HÍBRIDOS

Los liposomas pueden acoplarse a otras estructuras tanto orgánicas (polímeros) como inorgánicas (nanopartículas metálicas de oro, etc). Dicho acoplamiento permite en algunos casos ampliar la funcionalidad del liposoma, dando lugar a nanopartículas multifuncionales. Así, por ejemplo, encontramos liposomas cargados con verde indocidina (colorante fluorescente) para la liberación mediante activación por luz en aplicaciones oftalmológicas [16], sistemas liposómicos en gel en aplicaciones para agentes terapéuticos de la vejiga urinaria [17], liposomas unidos a péptidos para el tratamiento del glioblastoma [18]. Aunque destacan las aplicaciones terapéuticas de estos liposomas, también los encontramos en otros ámbitos como pueden ser la conservación y administración de sustancias alimentarias [19].

El gran interés que despiertan estos sistemas liposómicos ha llevado a que cada vez más estudios sean destinados a la mejora y el descubrimiento de nuevas técnicas para su uso, desarrollando investigaciones incluso en el ámbito del modelaje computacional [20].

2.3. LIPOSOMAS TERMOSENSIBLES

Este tipo concreto de liposomas modifican la estructura de su bicapa por encima de una determinada temperatura, haciéndola más fluida o permeable. En la mayoría de los casos esta temperatura corresponde a la temperatura de transición, T_c . En la literatura encontramos la aplicación de diferentes tipos de liposomas, los cuales poseen una T_c superior a los 37°C , formados bien por un solo tipo de lípido o por combinaciones de varios (generalmente zwitteriónicos). Ejemplo de ello es el uso del 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) ($T_c = 41^\circ\text{C}$) [21], el cual también podemos encontrar combinado con el 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) ($T_c = 60^\circ\text{C}$) y el colesterol [22-23].

Otro tipo de liposoma termosensible es el formado por DPPG, denominado 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol). Es un fosfolípido sintético que posee una cabeza polar hidrofílica de fosfatidil glicerol cargada negativamente (PG) y dos cadenas hidrocarbonadas saturadas, constituidas por 16 átomos de carbono (Figura 4).

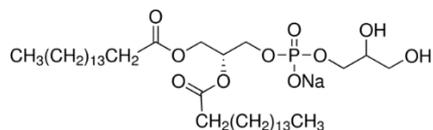


Figura 4. Estructura del DPPG.

La transición de fase, T_c , del DPPG ocurre entre 41 y 42°C, dependiendo del tampón, pasando de una fase más ordenada a una más fluida. Por ello, los liposomas constituidos por este lípido se pueden considerar termosensibles, ya que pueden transportar fármacos a temperaturas fisiológicas y liberarlos al elevar la temperatura unos pocos grados [24-27].

En la literatura no se encuentra un amplio uso de este tipo particular de liposoma, aunque presenta ventajas frente a los formados por lípidos zwitteriónicos. Por ejemplo, su superficie se encuentra cargada negativamente, lo que hace que se produzcan fuerzas de repulsión que impiden que estos liposomas interactúen entre sí y se produzca agregación.

2.4. HTMA-PFP: caracterización e interacción con liposomas

Dentro de los polielectrolitos conjugados, los basados en anillos de fluoreno poseen propiedades ópticas únicas, como su alto rendimiento cuántico, en la región azul del espectro, su alta estabilidad química y térmica, así como una elevada fotoestabilidad [5]. El estudio del trabajo que aquí se presenta se ha llevado a cabo con uno de estos polielectrolitos: el HTMA-PFP, que fue previamente sintetizado y caracterizado en el laboratorio.

➤ **Caracterización**

El HTMA-PFP es un CPE catiónico que se solubiliza en agua de forma parcial. Su nomenclatura corresponde con el término bromuro de poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo] fluoreno-fenileno} y su estructura está formada por dos partes (Figura 5). Una es de carácter hidrofóbico, compuesta por una cadena principal aromática, responsable de la fluorescencia, y cadenas laterales alquílicas. Mientras que la otra es de carácter hidrofílico, compuesta por aminas cuaternarias catiónicas. Esta última es la encargada de que se produzcan interacciones electrostáticas y facilita la solubilidad del polielectrolito en agua.

Gracias a la estructura que presenta, este polielectrolito es capaz de interactuar electrostáticamente de forma inespecífica con especies poseedoras de carga opuesta. Dichas interacciones pueden detectarse mediante estudios de variación de absorción y fluorescencia [6].

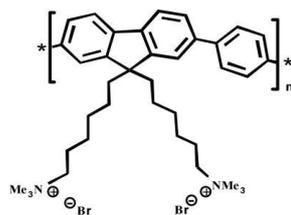


Figura 5. Estructura del HTMA-PFP.

Además, es un buen donador de transferencia de energía para aceptores sobre una gran parte del espectro visible. Esto se debe a su gran rendimiento cuántico fluorescente y la banda de emisión entre 390 y 500 nm, también se ha demostrado que es un aceptor de energía del triptófano de las proteínas [6].

Una de las características a tener en cuenta es el cambio que se produce en el comportamiento de dicho polielectrolito dependiendo del medio en el que se encuentre [28]:

- Cuando se encuentra en agua, se auto-ensambla formando agregados debido a las interacciones hidrofóbicas entre sus cadenas. Esto produce un aumento en el mecanismo de transporte de energía intercatenaria, que hace que su intensidad de emisión disminuya y, tanto el espectro de absorción como el de emisión, se desplacen al rojo.
- Cuando se encuentra en una mezcla de disolventes, que permiten la solvatación tanto de sus componentes polares como de los hidrófobos (por ejemplo, 2-propanol:agua), el desplazamiento hacia el rojo no se produce y, por tanto, tampoco forma agregados.
- Cuando se encuentra en solución de tampón fosfato, sí se produce un desplazamiento hacia el rojo, así como también una ampliación en la banda de excitación y una mayor resolución en la estructura vibracional del espectro de emisión. Todo ello viene acompañado, además, de una disminución en la absorbancia y en el rendimiento cuántico de fluorescencia. Esto se explica porque especies aniónicas contenidas del tampón pueden interactuar electrostáticamente con el polielectrolito, formando complejos neutrales que son menos solubles y forman agregados.

➤ **HTMA-PFP como marcador fluorescente**

Se ha evaluado el potencial del HTMA-PFP como marcador de membrana con modelos de membranas lipídicas, encontrándose que, debido a la presencia de las aminas cuaternarias catiónicas, presenta una alta afinidad con membranas formadas por lípidos aniónicos. Además, presenta un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y gran foto-estabilidad [6].

Se han obtenido resultados positivos en su interacción con vesículas lipídicas que modelizan células, pues se incorpora rápidamente y con facilidad a su bicapa, quedando incrustado en ella y mostrando una alta fluorescencia y estabilidad, lo que permite una buena visualización al microscopio fluorescente. Además, la interacción no perturba ni la morfología ni el contenido de la vesícula, la cual conserva su integridad estructural. De igual forma se ha demostrado su capacidad para marcar bacterias y células (Figura 6) [28-29].

Todo ello hace pensar que el acoplamiento de este polielectrolito con liposomas termosensibles, permitiría la obtención de nanopartículas multifuncionales que combinarían la función de transporte y liberación controlada de fármacos, con la de bioimagen.

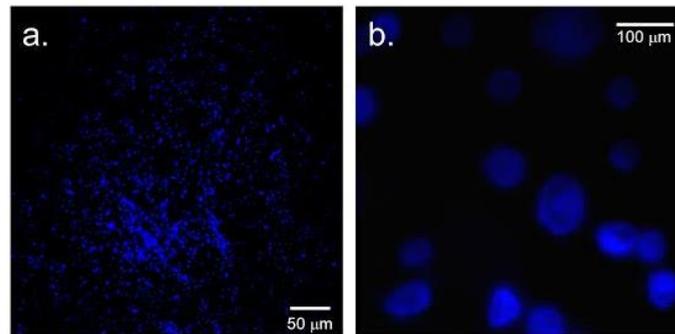


Figura 6. (a) Imágenes de microscopía de fluorescencia de bacteria *E. coli* y (b) células HeLa, tras la adición de HTMA-PFP y la irradiación con luz UV.

3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El trabajo que se presenta tiene como objetivo el uso de liposomas y CPEs como base para la preparación de nanopartículas multifuncionales, que lleven a cabo funciones tales como: transporte y liberación controlada de fármacos y bioimagen. El lípido elegido para la fabricación de liposomas es el DPPG por su temperatura de transición y su carga negativa. El CPE seleccionado ha sido el HTMA-PFP por su carga positiva, sus propiedades fotofísicas y su capacidad para marcar la membrana celular.

En concreto, el trabajo persigue conseguir los siguientes objetivos:

- ✓ Caracterización de liposomas termosensibles formados por DPPG: capacidad para transportar y liberar fármacos de formas controlada, usando como modelo la carboxifluoresceína.
- ✓ Análisis de la interacción entre el polielectrolito HTMA-PFP y las vesículas liposomales de DPPG con el objetivo de formar nanopartículas multifuncionales.
- ✓ Evaluación de las posibles aplicaciones de las nanopartículas para transportar, liberar fármacos y marcar células, en transporte y liberación de fármacos y en bioimagen.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

Para la formación de los liposomas se ha utilizado como fosfolípido sintético el 1,2-dipamitoil-sn-glicero-3-fosforac-(1-glicerol) sal de amonio (DPPG) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), y los reactivos químicos HAuCl_4 y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ para la formación de nanopartículas de oro (AuNPs) que se adquirieron de Sigma-Aldrich. En el caso del CPE catiónico HTMA-PFP ($M_n[\text{g/mol}] = 4170$; $M_w[\text{g/mol}] = 8340$), este se ha obtenido y caracterizado por los miembros del laboratorio. El lote del polímero neutro, poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilofluoreno-fenileno]} se sintetizó mediante la reacción de acoplamiento de Suzuki, utilizando Pd(II) como catalizador, y se trató con trimetilamina en fase gaseosa para obtener el polielectrolito deseado. Las soluciones stock de HTMA-PFP se prepararon en DMSO con una concentración final de $3.65 \cdot 10^{-4}$ M (en unidades repetidas) y se almacenaron a -20 °C. Las sondas fluorescentes 5(6)-carboxifluoresceína (CF) y 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), y el "quencher" ácido 9,10-antraquinona-2,6-disulfónico (AQS) se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se disolvieron en DMSO (1.25 M), dimetilformamida (DMF) (1 mM) y agua MQ (5 mM), respectivamente, antes de su uso. El tampón fosfato (50 mM NaCl 100 mM, pH 7.3) se preparó con agua que estaba dos veces destilada y desionizada utilizando el equipamiento Milli-Q (Millipore, Madrid).

4.2. MÉTODOS

➤ *Formación de vesículas unilamelares grandes (LUVs)*

En primer lugar, se disolvieron los lípidos de DPPG en cloroformo y se secó dicho disolvente con argón (Ar), formándose una fina película lipídica de color blanquecino en el fondo del vial. A continuación, se resuspendió la película de lípidos con tampón fosfato (TP 50 mM NaCl 100 mM, pH 7.3) hasta alcanzar la concentración deseada de lípido, por encima de la temperatura de transición de fase del mismo, que es entre 41 y 42 °C. Se agitó en el vórtex durante 2 minutos para favorecer la resuspensión. A partir de los MLVs obtenidos, se prepararon LUVs por extrusión a presión a través de filtros de policarbonato de 0,1 micras (Nucleopore, Cambridge, MA, USA). Para caracterizar la transición de fase de los LUVs formados se añadió una alícuota de DPH/DMF a una concentración final de 1:500 sonda:lípido y se incubó durante 1 hora a 50 °C.

➤ *Formación de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)*

Los GUVs formados estaban compuestos por DOPC y se prepararon mediante el método de electroformación usando cámaras de teflón hechas a medida que contienen un electrodo de Pt. Se separaron $1,2$ μL de una solución de lípido 1 mM en cloroformo en cada lado del electrodo de Pt. La eliminación de trazas de disolvente orgánico se llevó a cabo mediante deshidratación al vacío. A continuación, los electrodos secados se hidrataron con 450 μL de una solución de sacarosa 200 mM en agua purificada Milli-Q. Posteriormente, se aplicó un voltaje de 7 V y una señal de frecuencia de 10 Hz durante 2 h, seguido por una señal de frecuencia de 1 Hz durante 30 min. Después de la formación de GUVs, la muestra se recogió de las cámaras y se transfirió a los pocillos de una placa de plástico de micro-deslizamiento, conteniendo aproximadamente 500 μL de preparación. Para observar

mejor los GUVs en el microscopio, se añadieron previamente 400 μL de una solución de glucosa 200 mM a los pocillos con el fin de depositar los 50 μL de GUVs en el fondo de la cámara. Las muestras se conservaron durante 2 a 10°C antes de la visualización en el microscopio.

➤ **Preparación de vesículas liposomales fluorescentes**

Las alícuotas de HTMA-PFP en DMSO se añadieron externamente a la suspensión de vesículas unilamelares grandes (LUVs) preparadas anteriormente. En todos los casos la proporción de DMSO en la muestra acuosa fue siempre menor que 1% (v/v). El HTMA-PFP se adicionó a los LUVs bien cuando estos se encontraban a una temperatura superior a la de transición de fase del DPPG o bien a temperatura ambiente (25°C). La temperatura de adicción dependió en cada caso de si se requería analizar el comportamiento de las vesículas liposomas fluorescentes en fase gel o en fase fluida. Tras la adición se dejaron incubar las muestras durante 10 minutos antes de realizar la medida.

➤ **Preparación de nanopartículas de oro (AuNPs)**

Se preparó una disolución de 20 mL de HAuCl_4 1 mM con agua Milli-Q y se calentó en agitación hasta llegar a la ebullición. A esta disolución se le añadió otra preparada anteriormente de 2 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ 38.8 mM con agua Milli-Q. Dicha mezcla se dejó en agitación e hirviendo durante 10 min hasta adquirió un color rojo para, posteriormente, ser enfriada a temperatura ambiente.

➤ **Espectros de absorción y fluorescencia**

Las mediciones de absorción se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón). Las mediciones de fluorescencia se realizaron en cubetas de cuarzo de 10 mm x 10 mm utilizando un espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (PTI, Birmingham, Nueva Jersey, EE. UU) en interfaz con una célula Peltier. Las longitudes de onda de emisión y de excitación que se emplearon en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

	CF	HTMA-PFP
Espectro de emisión	λ_{ex} : 492 nm	λ_{exc} : 380 nm
	λ_{em} : 500-550 nm	λ_{em} : 390-500 nm
Espectro de excitación	λ_{ex} : 370-515 nm	λ_{exc} : 300-410 nm
	λ_{em} : 520 nm	λ_{em} : 417 nm

Tabla 1. Longitudes de onda de emisión y excitación empleadas.

➤ **Mediciones de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario**

La anisotropía en estado estacionario $\langle r \rangle$ se define por la ecuación 1:

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{VV} - GI_{VH})}{(I_{VV} + 2GI_{VH})} \quad (1)$$

donde I_{VV} e I_{VH} corresponden a las intensidades de fluorescencia recogidas con el polarizador de excitación orientado en posición vertical y el de emisión en posición vertical y horizontal, respectivamente. Estas medidas se obtuvieron utilizando polarizadores Glan-Thompson incorporados en el espectrofluorímetro. Las muestras (LUVs de DPPG marcados con DPH) fueron excitadas a 360 nm y la emisión se recogió a 430 nm. El factor G ($G = I_{HV}/I_{HH}$) corrige los sesgos de transmisividad introducidos por el sistema de detección.

➤ **Medidas de la liberación del contenido de las vesículas inducida por polímeros**

Los LUVs de DPPG se prepararon con CF retenida en su interior acuoso con una concentración 40 mM en un tampón fosfato 50 mM NaCl 100 mM. La CF no encapsulada se eliminó utilizando una columna de filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, SW, EU) eluida con tampón fosfato 50 mM NaCl 100 mM. La rotura de la membrana y con ello la liberación de la CF que se encontraba en el interior, fueron ensayadas sometiendo las vesículas a diferente rango de temperaturas (entre ellas la temperatura de transición de fase del DPPG, $T_c = 41$ °C). Por otro lado, se incorporó a las vesículas HTMA-PFP. La rotura total de las vesículas y la liberación de la CF se realizó con TritonX-100 10%.

➤ **Medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS)**

El tamaño de los agregados poliméricos en tampón, así como el de los LUVs en ausencia y presencia de HTMA-PFP fueron analizados por DLS utilizando un Brookhaven 90 Plus Nanoparticle Size Analyzer equipado con un láser de diodo rojo 35 mV ($\lambda = 640$ nm) como fuente de luz, con un ángulo de dispersión de 90° para las medidas de tamaño. Los LUVs de DPPG se analizaron también en ausencia y presencia del polímero y por encima de la temperatura de transición lipídica. Todas las mediciones fueron realizadas en cubetas desechables. Las mediciones se realizaron por triplicado.

➤ **Medidas de potencial Z**

La medida del potencial Z se determinó utilizando un Brookhaven 90 Plus Nanoparticle Size Analyzer, el mismo instrumento con el que se estableció el tamaño de las partículas, pero utilizando celdas distintas. Este parámetro nos da una idea de la estabilidad de la partícula analizada y de la carga del ambiente que la rodea. Para que las partículas sean estables el valor del potencial debe ser inferior a, aproximadamente, -20 mV o superior a +20 mV. El signo del potencial nos da una idea de la carga de su entorno.

➤ **Experimentos de desactivación de la fluorescencia (“quenching”)**

La emisión de fluorescencia del HTMA-PFP fue estudiada en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de AQS. El análisis de Stern-Volmer se aplicó a los datos de “quenching” de fluorescencia de acuerdo con la ecuación 2:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

donde I_0 y I representan las intensidades de fluorescencia en estado estacionario en ausencia y presencia del “quencher”, respectivamente, y $[Q]$ representa la concentración del “quencher”. K_{SV} es dependiente de la naturaleza del proceso de “quenching”, pudiendo representar la constante de asociación para la formación de complejos o la velocidad de “quenching” ($K_{SV} = k_q\tau_0$), donde k_q es la constante de velocidad bimolecular del proceso de “quenching” y τ_0 es la vida media de fluorescencia. Para el “quenching” dinámico (controlado por difusión), k_q puede ser tan alto como $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Si k_q es mayor a dicho valor, generalmente indica un “quenching” estático mediante la formación de un complejo entre el fluoróforo y el “quencher”.

➤ **Medidas del coeficiente de partición**

Los cambios en la intensidad de fluorescencia del HTMA-PFP en función de la concentración del lípido se usaron para estimar el coeficiente de partición de polielectrolito entre la membrana lipídica y la fase acuosa (K_p), el cual se define en términos de concentración molar como:

$$K_p = \frac{n_L/V_L}{n_W/V_W} \quad (3)$$

donde n_i representa los moles de compuesto en la fase i y V_i representa el volumen de la fase i . La fase es acuosa o lipídica. La cuantificación de K_p se realizó acorde con:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{max} [L]}{1/(K_p\gamma) + [L]} \quad (4)$$

donde ΔI ($\Delta I = I - I_0$) representa la diferencia entre las intensidades de fluorescencia (o las áreas de emisión del espectro) del polielectrolito medidas en presencia (I) y ausencia (I_0) de las vesículas lipídicas, $\Delta I_{max} = I_{\infty} - I_0$ es el valor máximo de esta diferencia una vez el valor límite se alcanza (I_{∞}) al aumentar la concentración de lípidos $[L]$, γ es el volumen molar del fosfolípido (para el DPPG en fase fluida el valor es de 0.7 M^{-1}).

➤ **Medidas de microscopía**

Las imágenes de microscopía de fluorescencia se adquirieron con un microscopio invertido Leica DMI 3000B equipado con una fuente de luz compacta Leica EL6000 y una cámara digital Leica DFC3000G. Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo de 63x con 0.7 de magnificación y filtros DAPI (Ex BP 350/50, Em: BP 460/50). La adquisición de datos se controló manualmente y el procesamiento de datos con la aplicación Leica Suite AF6000 Module Systems. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se adquirieron mediante un microscopio Jeol 1011 (Jeol, Japón), trabajando a 80 kV. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de estas sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón y dejándolas secar al aire previamente a su visualización. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara Gatan Erlangshen ES500W.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. LIPOSOMAS DE DPPG

Como se comentó en el apartado de Objetivos, el DPPG ha sido seleccionado como base para fabricar las nanopartículas termosensibles. Por eso, lo primero que se hizo fue caracterizar el comportamiento de LUVs preparados con este lípido, antes de incluir el polielectrolito. El primer paso fue determinar la transición de fase del lípido en las condiciones de trabajo. A continuación, se caracterizó su tamaño y carga y, finalmente, se exploró la capacidad de los liposomas para encapsular y liberar compuestos hidrofílicos como modelos de fármaco.

5.1.1. Caracterización de la transición de fase

Existen varias metodologías que permiten explorar la transición de fase de un lípido, como la calorimetría diferencial de barrido, la espectroscopía de infrarrojo, la anisotropía de fluorescencia o los barridos de dispersión de luz. En este estudio se han seleccionado los dos últimos métodos.

- **Anisotropía de DPH**

La anisotropía de fluorescencia (r) representa el grado de polarización de la emisión de fluorescencia que, a su vez, está relacionado con la velocidad y libertad de movimiento de las moléculas fluorescentes. Para poder utilizar esta técnica es necesario, previamente, incorporar en la bicapa lipídica una sonda fluorescente o fluoróforo, dado que los lípidos no son fluorescentes. En este trabajo se ha utilizado el difenilhexatrieno (DPH), el cual no fluoresce en agua, pero sí que lo hace en la membrana lipídica. La anisotropía de fluorescencia se basa en la existencia en la molécula de dipolos con orientaciones específicas respecto a la estructura del fluoróforo. Esto provoca que al irradiar con luz polarizada de una longitud de onda adecuada una disolución de fluoróforos, no todos tengan la misma probabilidad de ser excitados. Solo aquellos cuyo dipolo sea paralelo al vector eléctrico, serán excitados de forma preferencial (fotoseleccionados) frente al resto de fluoróforos. De igual forma, la fluorescencia se producirá en una dirección preferencial con respecto al eje molecular del fluoróforo y esto provoca que la emisión esté polarizada. El grado de polarización de la fluorescencia dependerá, entre otros, de la libertad de movimiento del fluoróforo. Si su libertad está restringida la polarización (anisotropía) será muy alta (el máximo posible es 0,4) y ésta disminuirá si el ambiente en el que reside se hace más fluido (desordenado). En las transiciones de fase lipídicas ocurre precisamente esto, a una temperatura determinada se pasa de una situación en la que las cadenas lipídicas están muy ordenadas a otra en la que aumenta enormemente su movilidad. Si determinamos la anisotropía de un fluoróforo en estas condiciones, se observará una bajada brusca que coincide justo con la T_c . Este experimento se muestra en la siguiente gráfica (Figura 7A) para el DPH incorporado en LUVs de DPPG. A una temperatura próxima a 42°C hay un cambio drástico en la anisotropía. Si se analiza la primera derivada (Figura 7B) se observa más claramente el valor de T_c .

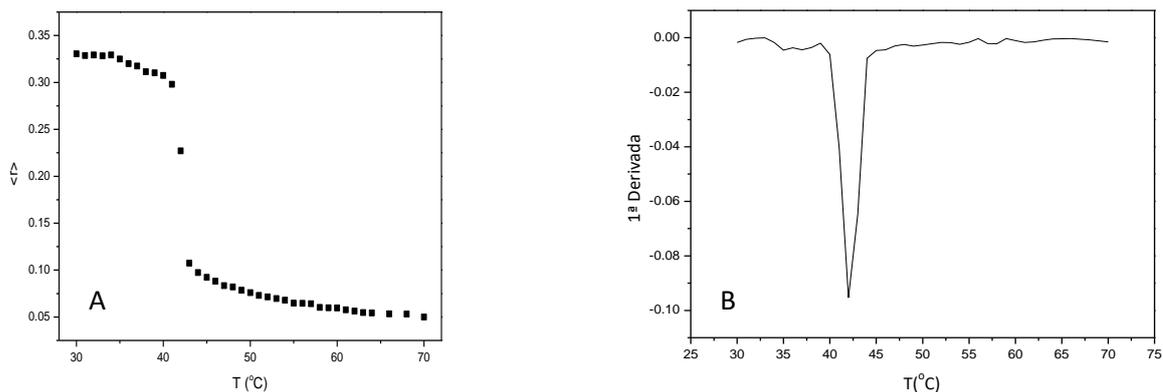


Figura 7. (A) Medidas de anisotropía de fluorescencia del DPH en estado estacionario (λ_{ex} : 360 nm, λ_{em} : 430 nm) en función de la temperatura de LUVs de DPPG (1 mM); (B) primera derivada.

▪ **Dispersión de luz**

Otra manera de determinar la transición de fase lipídica es recogiendo la luz dispersada por una suspensión de LUVs en función de la temperatura. La fase gel es más compacta y, por eso, dispersará mucho más la luz que una bicapa que se encuentra en fase fluida. La luz dispersa se puede recoger en un espectrofotómetro convencional o en un fluorímetro. En este caso, se ha utilizado un fluorímetro y se ha irradiado una suspensión de LUVs de DPPG a una longitud de onda (430 nm) en la que no hay absorción de luz por parte de la muestra. A continuación, se recoge un espectro entre 425 nm y 435 nm, en función de la temperatura, de manera que se puede medir la luz de 430 nm (luz dispersada) que llega al detector. Este experimento se muestra en la Figura 8, donde se representa el máximo de intensidad del espectro en función de la temperatura. Se observa como la luz dispersa disminuye bruscamente al producirse la transición de fase, a una temperatura que coincide con la determinada en el experimento anterior de anisotropía.

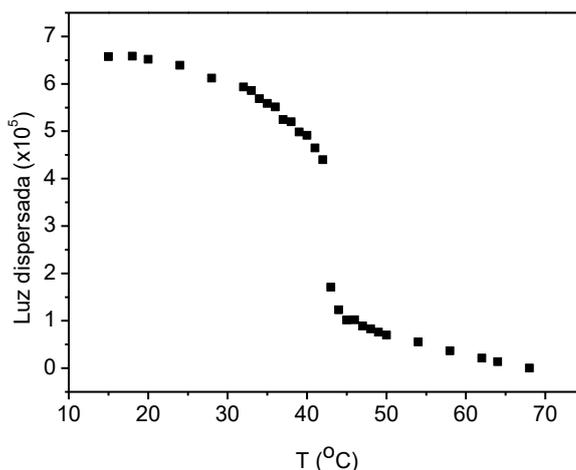


Figura 8. Luz dispersada por los liposomas de LUVs de DPPG (1 mM) tanto en fase gel o fluida en función de la temperatura (λ_{ex} : 430 nm).

▪ **Radio hidrodinámico**

Con el fin de caracterizar el tamaño de los liposomas, se llevaron a cabo experimentos de DLS tanto a temperatura ambiente como a una temperatura superior a la T_c del lípido. Gracias a esta técnica se obtiene información sobre la distribución de tamaños de macromoléculas en solución en rango de submicrómetros. Los resultados obtenidos mostraron que, cuando los liposomas se encontraban en un estado de fase fluida presentaban un tamaño ligeramente superior a los que se encontraban en fase gel (Tabla 2). Esto se debe a que, en fase fluida la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas aumenta y aparecen ondulaciones en la superficie de los liposomas, siendo la bicapa mucho menos compacta que en fase gel. Todo ello tiene como consecuencia un aumento en el tamaño final de la vesícula.

Muestra	Temperatura (°C)	r (nm)
LUVs DPPG (fase gel)	25	77 ± 2
LUVs DPPG (fase fluida)	60	81 ± 2

Tabla 2. Radio hidrodinámico de LUVs de DPPG (1 mM) en fase gel y fase fluida.

Es importante conocer el tamaño de los liposomas, pues posteriormente se adicionará el polielectrolito HTMA-PFP, el cual puede o no variar el tamaño de dichas vesículas y la consistencia de su bicapa lipídica.

▪ **Potencial Z**

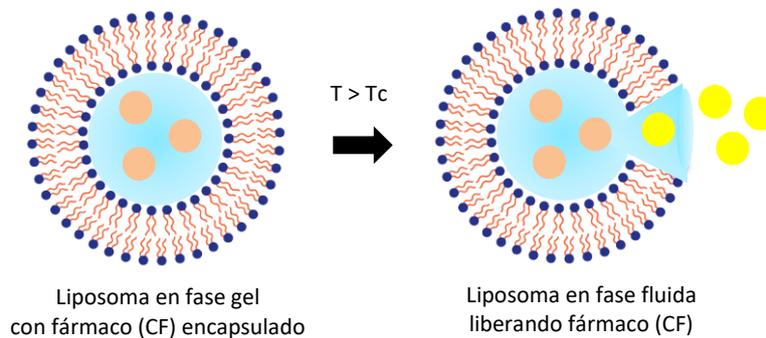
Para la caracterización de la estabilidad de los liposomas que se han empleado y la carga del entorno que los rodea, se llevó a cabo la medida del potencial Z, obteniendo un valor de alrededor de -22 ± 3 mV. Esto nos sugirió que las vesículas formadas con el DPPG poseen cierta estabilidad, pues valores entre los -20 y +20 mV son propios de las partículas inestables con tendencia a agregar. Además, presentan un entorno cargado negativamente, lo cual nos asegura la presencia de fuerzas de repulsión que impiden que los liposomas interactúen y se produzca dicha agregación.

Especialmente relevante es conocer la carga, puesto que posteriormente se incorporará el HTMA-PFP, el cual está cargado positivamente. Por lo que al presentar estos liposomas un entorno con carga negativa, se asegura así una interacción electrostática más probable con el polielectrolito.

5.1.2. Capacidad para encapsular y liberar compuestos hidrofílicos

Para evaluar la capacidad de encapsulación y liberación del contenido almacenado en el interior de los liposomas de DPPG, se utilizó la carboxifluoresceína (CF) como simulador de fármaco. Es un fluoróforo que cuando se encapsula en la cavidad acuosa de los liposomas, su fluorescencia disminuye debido a un proceso de "autoquenching" (elevada concentración del fluoróforo). En el momento en el que se produce la rotura de la

vesícula liposomal o la bicapa se hace más permeable (por ejemplo, al alcanzar la T_c), la CF comienza a salir de la vesícula diluyéndose y aumentando su intensidad de fluorescencia. El proceso queda representado en el siguiente esquema:



Esquema 1. Representación del proceso de liberación del fármaco (CF).

La CF se encapsuló en liposomas de DPPG como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de liberación de CF se calculó, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Liberación} = \frac{I - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} \cdot 100 \quad (5)$$

donde I corresponde a la intensidad medida en los diferentes tiempos, I_{\min} corresponde a la intensidad inicial e I_{\max} corresponde a la intensidad una vez se ha producido la lisis con TritónX-100.

Para evaluar el comportamiento de la CF encapsulada en función de la temperatura y su posible salida del liposoma, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de la CF a diferentes temperaturas. Se comenzó por una temperatura de 30°C y se fue aumentando hasta alcanzar los 58°C. Se pudo observar que, en un principio, no hubo diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia entre los 30°C y los 40°C (Figura 9A). Esto sucede porque dichas temperaturas son inferiores a la T_c , por lo que la bicapa lipídica del liposoma se mantiene en fase gel, obteniendo valores de intensidad de fluorescencia no muy elevados con respecto a temperaturas superiores debido al fenómeno de “autoquenching”. Sin embargo, cuando se alcanzaron los 42°C, hubo un incremento significativo de la intensidad. Puesto que esta temperatura corresponde con la T_c del DPPG, lo que ocurrió es que la integridad de la bicapa se comenzó a ver comprometida y los lípidos que la forman presentaron movilidad. Dicha movilidad facilita la formación de poros u otras vías de escape para la CF almacenada en su interior, de forma que ésta comenzó a salir del liposoma. Entre los 42 y los 58°C se produjo un incremento progresivo de la intensidad de fluorescencia debido a que, con la salida de la CF, el “autoquenching” que se estaba produciendo desaparece provocando que la fluorescencia aumente. En la Figura 9B se muestra claramente como la salida de la CF es fundamentalmente inducida por el cambio de fase gel a fase fluida. Este experimento sugiere que los liposomas de DPPG pueden ser utilizados como transportadores de fármacos cuya liberación puede ser desencadenada aumentando la temperatura por encima de temperaturas fisiológicas.

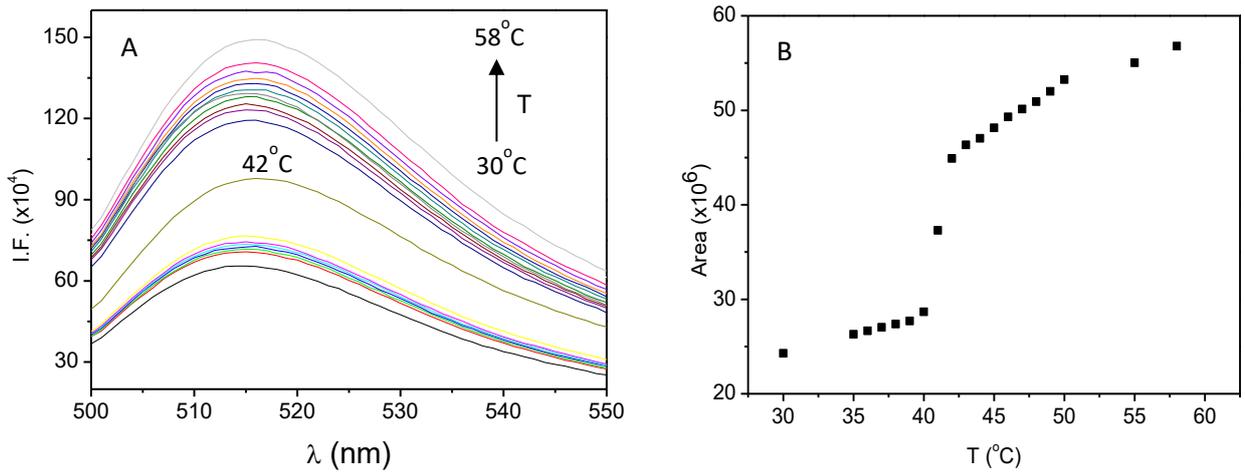


Figura 9. (A) Espectros de emisión de fluorescencia de la CF encapsulada en LUVs de DPPG (0.5 mM) (λ_{exc} : 492 nm, λ_{em} : 500-550 nm) a distintas temperaturas; (B) dependencia con la temperatura de la intensidad de fluorescencia medida bajo el área del espectro de la CF encapsulada en LUVs de DPPG.

También se exploró como influye el tiempo en la liberación de la CF a diferentes temperaturas. Se evaluó en dos periodos diferentes, a los 30 y 70 minutos, siendo comparados ambos con los resultados obtenido tras la adición de TritónX-100 para inducir la lisis de las vesículas. Se pudo observar que hasta los 40°C no hubo diferencias significativas para ambos tiempos, sin embargo, a partir de dicha temperatura, durante el periodo de 70 min, la CF presentó una intensidad máxima de fluorescencia superior al otro periodo. En comparación, tras la adición de TritónX-100, se observó que en ambos casos la liberación de la CF distaba mucho de ser completa, quedando parte de ella retenida en los LUVs (Figura 10).

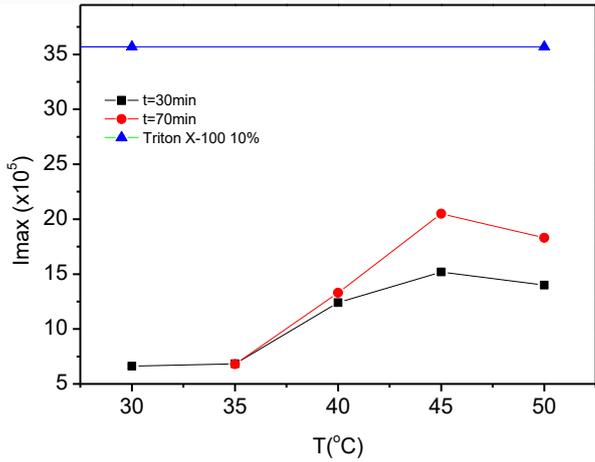


Figura 10. Intensidad máxima de fluorescencia de la CF encapsulada en LUVs de DPPG (0.5 mM) en función de la temperatura en distintos periodos de tiempo (λ_{exc} : 492 nm, λ_{em} : 500-550 nm).

Esto nos indica que, a temperatura inferiores a la T_c del DPPG, el liposoma se mantiene estable independientemente del tiempo que pase, mientras que una vez se supera dicha temperatura, el tiempo sí es

determinante en la liberación. De modo que cuanto mayor sea el periodo al que se somete el liposoma a dichas temperaturas, mayor liberación se produce.

Dicha liberación se evaluó, además, empleando periodos de tiempo más cortos (entre 50 y 600 segundos). Los resultados mostraron similitudes a lo comentado anteriormente. A partir de la T_c es cuando se observa una mayor liberación de CF, siendo similar a su máximo de liberación a diferentes tiempos. En este caso la diferencia aparece en temperaturas inferiores a 40°C , puesto que en el periodo más largo de tiempo (600 segundos), la liberación se produce antes que en el resto y en el más corto (50 segundos) se produce después (Figura 11). Lo que puede ocurrir es que, al estar los liposomas expuestos a la temperatura en periodos de tiempo más prolongados, aumenta la probabilidad de liberación, llegando a producirse la salida de la CF en temperaturas inferiores a la de transición de fase. Éstas pueden corresponder con temperaturas de pre-transición en la que la organización de la bicapa comienza a presentar irregularidades, a pesar de que los lípidos no se encuentran todavía en fase fluida.

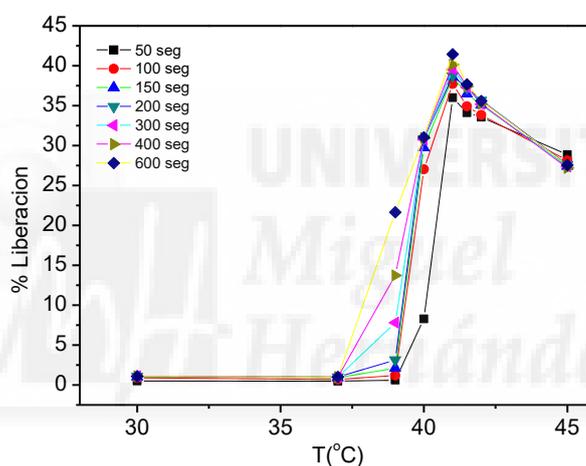


Figura 11. Porcentaje de liberación de CF encapsulada en LUVs de DPPG (0.5 mM) a varios tiempos, en función de la temperatura.

5.2. NANOPARTÍCULAS DE DPPG CON HTMA-PFP

Una vez estudiado el comportamiento de las vesículas liposomales en diferentes condiciones, se procedió a la adición del HTMA-PFP, con el fin de poder obtener la nanopartícula fluorescente deseada.

5.2.1. Caracterización del HTMA-PFP en tampón

Antes de estudiar la interacción del HTMA-PFP con los lípidos de los liposomas, es importante conocer su comportamiento cuando se encuentra en el mismo medio que se ha empleado para el estudio y la manipulación de los liposomas. Se trata del tampón fosfato (50 mM NaCl 100 mM, pH 7.3).

La absorbancia y fluorescencia del HTMA-PFP en tampón fueron evaluadas obteniendo resultados que confirmaban lo que se ha comentado en Antecedentes. Se produjo un desplazamiento hacia el rojo de los espectros y una disminución en la absorbancia y la fluorescencia al comparar con disolventes orgánicos más adecuados [28]. Las Figuras 12A y 12B representan los espectros obtenidos en tampón. En el inset de la Figura 12B se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo. Este comportamiento confirma la formación de agregados en el tampón que se originan debido a las interacciones entre los esqueletos hidrocarbonados del polímero y a la presencia de especies aniónicas en el tampón, que pueden interactuar electrostáticamente con el HTMA-PFP. Se forman así complejos neutrales que son menos solubles y forman agregados que van creciendo con el tiempo, reduciendo su señal de fluorescencia.

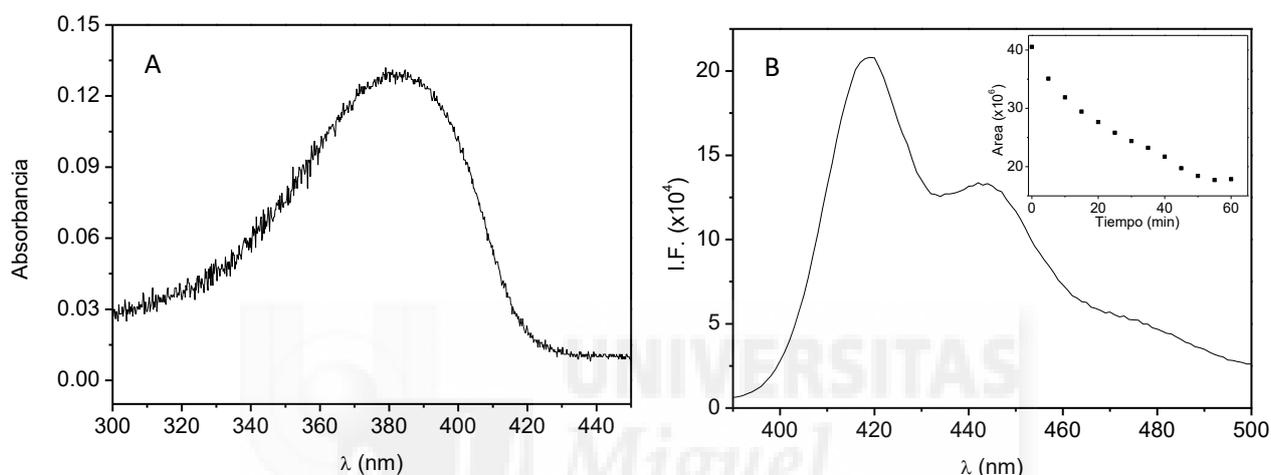


Figura 12. (A) Absorbancia del HTMA-PFP (1.5 μM) en tampón; (B) emisión de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) en tampón (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm). Inset: área de emisión de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) en tampón en función del tiempo.

5.2.2. Interacción del HTMA-PFP con liposomas de DPPG

Una vez explorado el comportamiento del HTMA-PFP en tampón se procedió a estudiar su interacción con liposomas de DPPG. Como primer paso se exploró su afinidad, para lo que se llevaron a cabo experimentos para el análisis del coeficiente de partición (K_p).

Para dicho análisis se prepararon LUVs de DPPG en concentraciones crecientes a los que se les adicionó el HTMA-PFP (1.5 μM) en fase gel y se llevó a cabo un análisis de la fluorescencia (Figuras 13A y 13B). Lo que se observó es que a medida que aumenta la concentración del LUVs, se produce un incremento en dicha fluorescencia y un desplazamiento al azul. Esto indica que los agregados de HTMA-PFP formados en tampón se rompen al entrar en contacto con la membrana, confirmando la interacción.

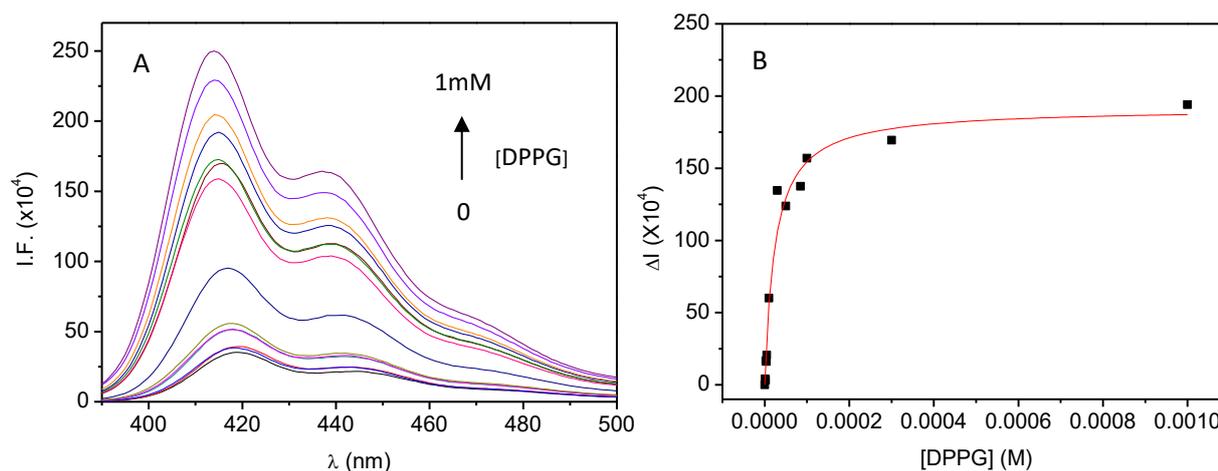


Figura 13. (A) Espectros de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) en concentraciones crecientes de LUVs de DPPG (desde 0.001 mM hasta 1 mM) en tampón (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm); (B) incremento de la intensidad de fluorescencia del HTMA-PFP en función de la concentración del lípido.

A partir de los datos de la Figura 13B y utilizando la ecuación 4, se pudo obtener el coeficiente de partición del HTMA-PFP en LUVs de DPPG en fase gel ($K_p = 5.2 \pm 1.0 \times 10^4$), el cual fue comparado con el valor obtenido en fase fluida en un estudio previo ($K_p = 4.8 \pm 1.3 \times 10^4$). El valor obtenido en ambas fases es similar. Esto nos permite establecer que la afinidad por los liposomas es alta e igual en ambos casos, lo cual indica que la atracción electrostática es la primera responsable de la interacción entre el polielectrolito y los liposomas.

Que la afinidad sea igual en ambos casos resulta ventajoso, pues de esa forma nos aseguramos de que, cuando se someta la nanopartícula formada por el liposoma y el polielectrolito a temperaturas superiores a la T_c , la interacción entre ambas especies no se perderá. Este experimento nos permitió seleccionar las concentraciones adecuadas de polímero y liposoma para formar la nanopartícula. Dichas concentraciones fueron 1.5 μM de HTMA-PFP y 0.5 mM de lípido, con objeto de asegurar que todo el polielectrolito añadido se incorporaba en el liposoma.

5.2.3. Caracterización de nanopartículas fluorescentes

5.2.3.1. Estabilidad con el tiempo

Además de conocer si el polielectrolito interacciona con el liposoma, también es importante saber la estabilidad que éste tiene y cómo afecta el paso del tiempo a dicha interacción. Para ello, se han realizado estudios de fluorescencia del HTMA-PFP en función del tiempo (Figura 14). Los resultados mostraron que, independientemente del tiempo que transcurra, la fluorescencia del HTMA-PFP no disminuye. Esto indica que, a diferencia de los agregados poliméricos, las nanopartículas son estables.

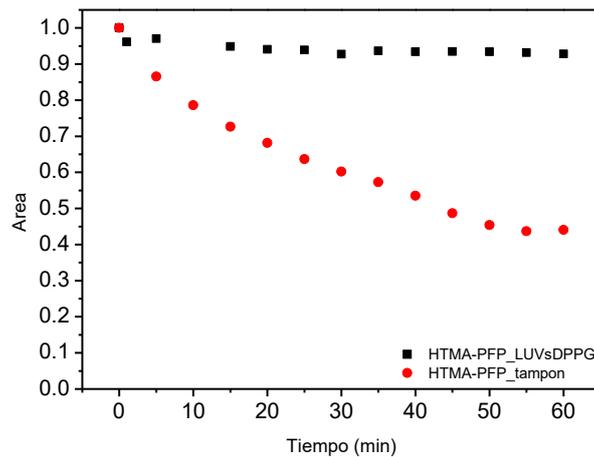


Figura 14. Fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) en LUVs de DPPG (0.5 mM) en tampón en función del tiempo (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm).

5.2.3.2. Comportamiento termotrópico

▪ *Dispersión de luz*

Con el fin de evaluar si la incorporación del polielectrolito en el liposoma afecta la transición de fase gel a fase fluida del DPPG, se hicieron experimentos de análisis de luz dispersa en función de la temperatura. En la Figura 15 se puede observar que, no hubo diferencias significativas con los liposomas que no llevan incorporado el HTMA-PFP, pues la transición de fase no se vio modificada, presentando cooperatividad en ambos casos, y tampoco se vio alterada la temperatura a la que se produce. Esto resulta ventajoso, pues uno de los objetivos es conseguir que al incorporar el polielectrolito el comportamiento de la nanopartícula no se vea modificado, así como tampoco se altere el proceso de transporte y liberación del fármaco que alberga. Sin embargo, se observó que los liposomas que llevaban incorporados el HTMA-PFP presentaron unos valores de intensidad de luz dispersada mayores a lo que no lo poseían. Una posible explicación es que, al intentar el haz de luz atravesar el liposoma con el HTMA-PFP insertado en su bicapa lipídica, se produce un impedimento mayor de su paso, que tiene como consecuencia una mayor dispersión.

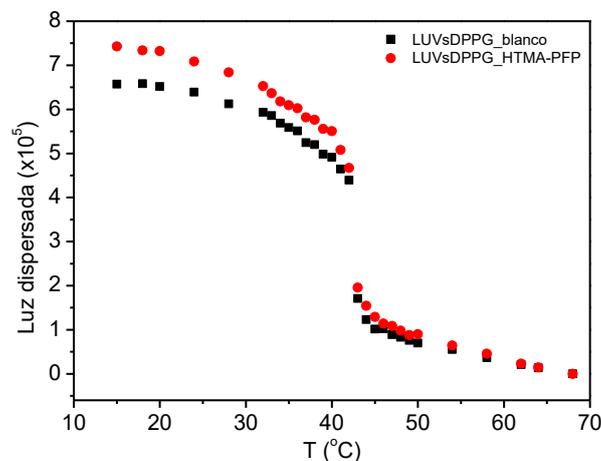


Figura 15. Efecto sobre la luz dispersada por los LUVs de DPPG (0.5 mM) con y sin el HTMA-PFP (1.5 μM) incorporado (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm).

▪ **Fluorescencia del HTMA-PFP**

A continuación, se estudió si la propia fluorescencia del polielectrolito puede ser utilizada para explorar el comportamiento termotrópico de la nanopartícula.

Para dicho estudio, se adicionó el HTMA-PFP a una muestra de LUVs de DPPG en tampón y se recogieron los espectros de fluorescencia dentro de un rango de temperaturas comprendido entre los 15 y los 58°C. Se observó que a medida que aumentaba la temperatura, se producía un leve desplazamiento hacia longitudes de onda menores, es decir, hacia el azul (Figura 16A). Además, también se observó un aumento prolongado de su fluorescencia a partir de, aproximadamente 33°C, hasta alcanzar valores considerablemente superiores, que se estabilizaron sobre los 42°C (Figura 16B). Este resultado refleja que la fluorescencia del HTMA-PFP es sensible a cambios del estado físico de la membrana del DPPG. A alrededor de 33°C tiene lugar la pre-transición y ocurre un cambio conformacional en las cabezas lipídicas, aunque las cadenas hidrocarbonadas permanecen en fase gel. Dicho cambio conformacional permite una mejor solubilización del polímero en la bicapa lipídica hasta alcanzar la fase fluida, lo que se traduce en un aumento de la señal de fluorescencia y un desplazamiento del espectro hacia el azul al romperse aún más los agregados poliméricos.

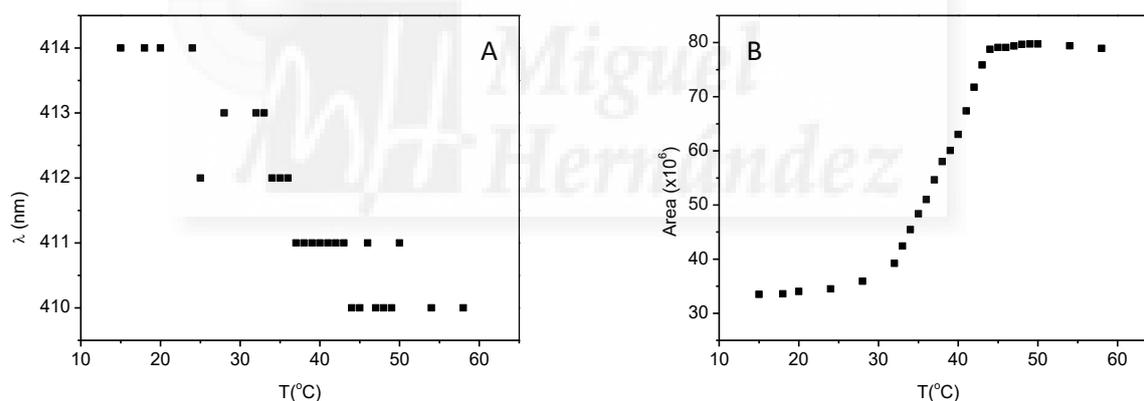


Figura 16. (A) Posición del máximo de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μ M) en LUVs de DPPG (0.5 mM) en tampón en función de la temperatura (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm); (B) intensidad de fluorescencia máxima en función de la temperatura.

5.2.3.3. Radio hidrodinámico

Puesto que la adición del HTMA-PFP contribuye a la incorporación de otro componente a la nanopartícula, el tamaño de esta puede verse modificado con respecto al correspondiente liposoma. Para dicho estudio, las nanopartículas se analizaron mediante medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) tanto en fase gel como en fase fluida y se compararon todos los resultados (Tabla 3). Mediante esta técnica se pudo comprobar si las cadenas del polímero están interaccionando con los lípidos y no se forman agregados en el tampón.

Muestra	Temperatura (°C)	r (nm)
DPPG	25	77 ± 2
DPPG + HTMA-PFP	25	76 ± 1
DPPG	60	81 ± 2
DPPG + HTMA-PFP	60	82 ± 2

Tabla 3. Radio hidrodinámico de LUVs de DPPG (0.5 mM) con y sin HTMA-PFP (1.5 μM) en fase gel y fase fluida.

Los resultados obtenidos mostraron que en ausencia del polielectrolito se obtuvo un radio de 81 nm para el lípido en fase fluida y de 77 nm para el lípido en fase gel, que es compatible con el tamaño de los liposomas esperado. En presencia del HTMA-PFP se obtuvieron tamaños similares tanto en fase fluida como en fase gel, lo que confirma que todas las cadenas del polielectrolito están interactuando con los lípidos del liposoma, incorporándose en la bicapa.

5.2.3.4. Potencial Z

El potencial Z (explicado en el apartado de resultados de liposomas de DPPG) se estudió para tener una idea de la estabilidad de la nanopartícula al adicionarle el polielectrolito. En estudios previos se comprobó que los liposomas poseían un entorno cargado negativamente, obteniendo un potencial Z de -22 ± 3 mV. El HTMA-PFP está cargado positivamente, con lo que se consideró que la probabilidad de interacción entre ambos sería alta.

Una vez llevada a cabo la incorporación del polielectrolito, se obtuvo un valor de potencial Z de alrededor de -21 ± 2 mV. Esto nos sugirió que las nanopartículas fluorescentes poseen cierta estabilidad. Además, comparando con los valores obtenidos antes de incorporarlo, se pudo comprobar que a pesar de la presencia del HTMA-PFP el potencial Z de la nanopartícula no se ve modificado. Este resultado podría sugerir que el polielectrolito, tras interactuar con la bicapa, se incorpora en su interior en vez de permanecer en la superficie.

5.2.3.5. Localización del HTMA-PFP

Con el fin de confirmar la localización del HTMA-PFP en la vesícula lipídica, se realizaron experimentos de “quenching” con AQS, un conocido desactivador de la fluorescencia del HTMA-PFP. Este “quencher” es soluble en agua y no es capaz de incorporarse en la membrana lipídica de DPPG, de forma que desactivará la fluorescencia del HTMA-PFP solo si éste está en la superficie de la membrana lipídica o próximo a ella.

Para la realización del experimento se prepararon LUVs de DPPG en tampón a los que se le adicionó el HTMA-PFP. A continuación, se realizaron adiciones crecientes de AQS (5 mM) y se midió la señal de fluorescencia tras cada adición. En paralelo se realizó el mismo estudio con el polielectrolito directamente en tampón. El análisis de dicho experimento se llevó a cabo mediante diagramas de Stern-Volmer (hasta 10 μM para LUVs

de DPPG conteniendo HTMA-PFP) (Figura 17). El ajuste de Stern-Volmer (ver ecuación 2) fue lineal en el rango de concentración estudiado y los valores de $K_{SV} = 2.63 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, en el caso de los LUVs de DPPG, y $K_{SV} = 3.96 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, en el caso del tampón, fueron obtenidos de la pendiente de dicho ajuste. Con ello se pudo comprobar que, en el caso del tampón con el HTMA-PFP, se produce un “quenching” muy evidente, obteniendo un valor superior al del HTMA-PFP incorporado a los liposomas. En este segundo caso al no producirse un “quenching” tan pronunciado, se pudo establecer que el HTMA-PFP se encuentra localizado en el liposoma de tal forma que no queda muy accesible al AQS.

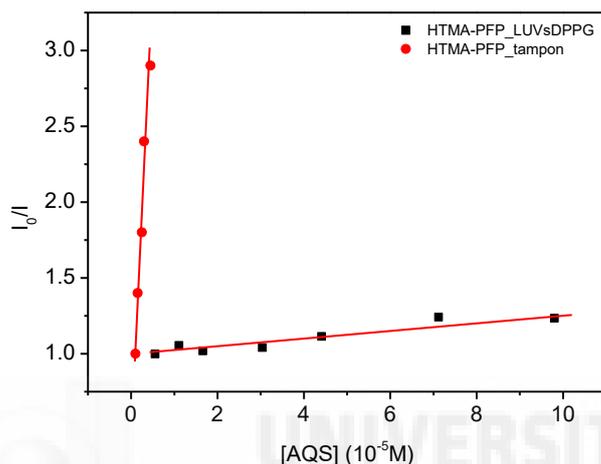


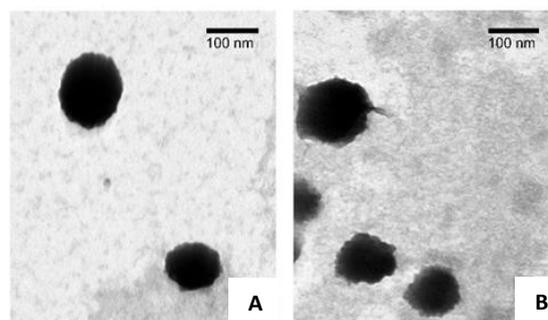
Figura 17. Diagrama de Stern-Volmer para el “quenching” con AQS del HTMA-PFP (1.5 μM) en LUVs de DPPG (0.5 mM) y en tampón.

Tras dicho análisis y con los resultados obtenidos se pudo establecer que el HTMA-PFP se encuentra insertado en la bicapa lipídica, estando poco accesible para su interacción con el AQS. Sin embargo, a pesar de que el “quenching” no es muy pronunciado, sí que se produce un “quenching” muy leve, lo que hizo suponer que el polielectrolito se encuentra insertado, pero en la parte más externa de la bicapa.

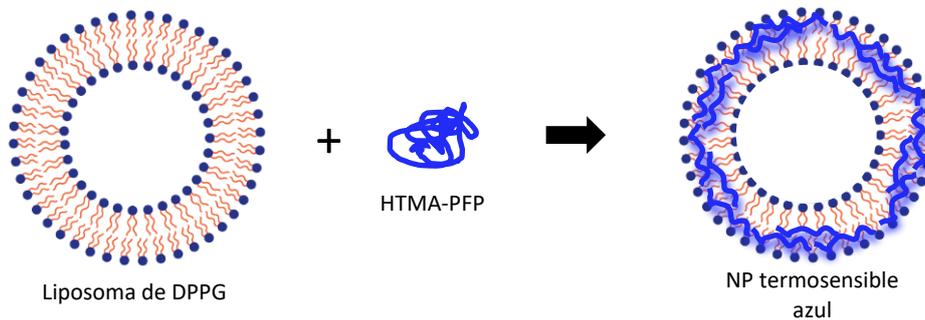
5.2.3.6. TEM

Una vez confirmada mediante el “quenching” con AQS la localización del HTMA-PFP en el liposoma, se procedió a analizar la nanopartícula mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 18). Los resultados mostraron que la incorporación del polímero en el liposoma apenas modifica su tamaño y morfología, confirmando que se embebe en la bicapa en vez de permanecer en forma de agregados que interaccionan con la superficie.

Figura 18. (A) Imagen de la nanopartícula formada por LUVs de DPPG sin y (B) con HTMA-PFP obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.



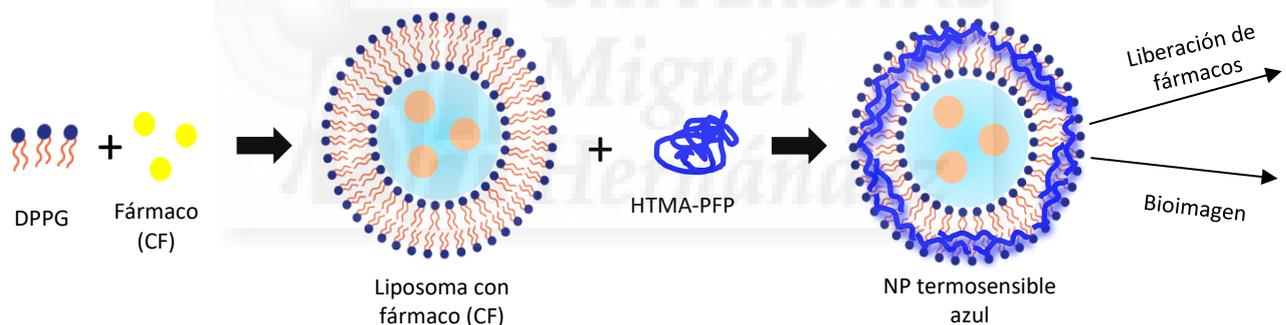
Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, se pudo proponer un esquema representativo de la nanopartícula sintetizada:



Esquema 2. Representación de la formación de la nanopartícula termosensible fluorescente.

5.3. APLICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOIMAGEN

Una vez realizada la caracterización de las nanopartículas termosensibles fluorescentes, se procedió al análisis de éstas respecto a la capacidad de liberación de su contenido y su aplicación para bioimagen. Como modelo de fármaco se utilizó la CF y se realizó un análisis del comportamiento de las vesículas liposomales, cuando llevaban ya incorporado el HTMA-PFP y almacenada la CF, al producirse la liberación según el siguiente esquema:



Esquema 3. Representación del proceso de formación de la nanopartícula termosensible fluorescente con el fármaco encapsulado.

5.3.1. Liberación de fármacos

La liberación del fármaco con la temperatura se exploró siguiendo la evolución de la fluorescencia del HTMA-PFP y de la CF en función de la temperatura.

5.3.1.1. Fluorescencia del HTMA-PFP

Con la finalidad de conocer si la fluorescencia del HTMA-PFP se modificaba de alguna forma al poseer los liposomas la CF encapsulada, se sometió a las nanopartículas a un barrido de temperaturas, desde 15 a 58°C. Los resultados se compararon con los obtenidos en ausencia de CF. La Figura 19A muestra que por debajo de la T_c la fluorescencia del HTMA-PFP es menor cuando los LUVs poseen CF en su interior. Sin embargo, una vez superada

la temperatura de transición de fase del DPPG, la fluorescencia en ambos casos es similar. Al evaluar la longitud de onda en función de la temperatura, se vio un desplazamiento hacia longitudes de onda menores (hacia el azul) a partir de la pre-transición, que fue similar en ausencia y presencia de CF (Figura 19B).

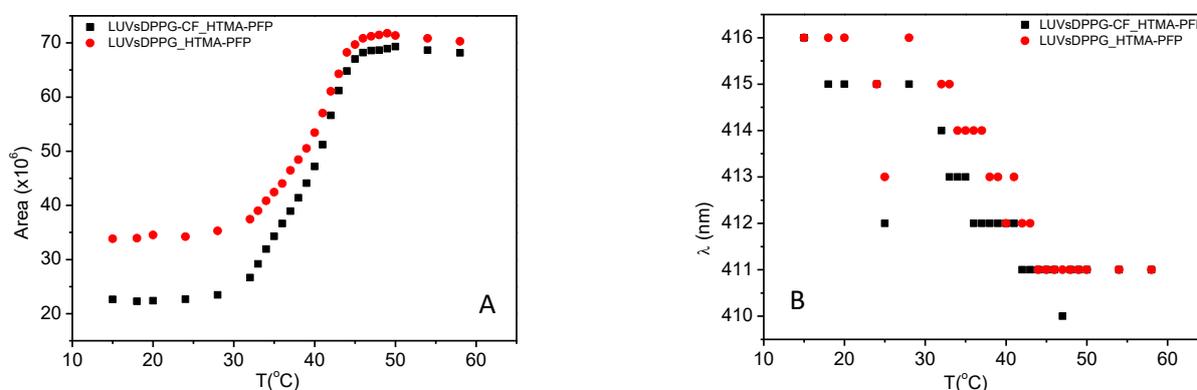
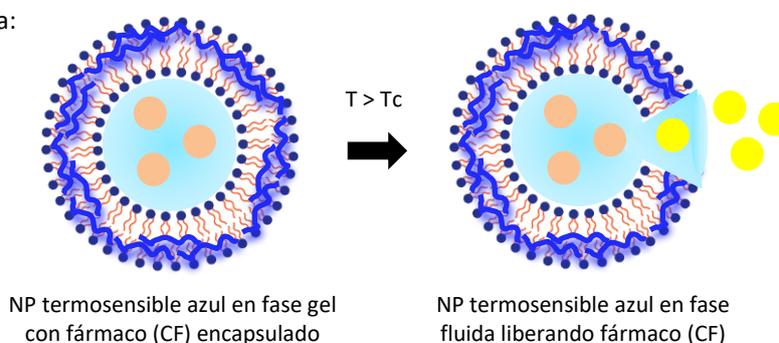


Figura 19. (A) Área de la fluorescencia y (B) posición del máximo de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) en LUVs de DPPG (0.5 mM) en tampón con y sin CF encapsulada en función de la temperatura (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm).

Este resultado se puede interpretar si consideramos que la CF puede actuar como aceptor de energía del HTMA-PFP, dado que absorbe donde emite el polielectrolito. Cuando la CF está encapsulada, podría ocurrir transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre ambos, por lo que la fluorescencia del HTMA-PFP disminuye con respecto a los observado en ausencia de CF. A temperaturas próximas a la T_c se induce la liberación de la CF y ésta se aleja del HTMA-PFP, reduciendo el fenómeno del FRET e igualando la fluorescencia de la nanopartícula en ausencia de CF.

5.3.1.2. Fluorescencia de la CF

El experimento anterior indica que la CF se está liberando de la nanopartícula a temperaturas próximas a la T_c . Para confirmar este resultado se monitorizó la fluorescencia de la CF en función de la temperatura, como se hizo previamente con los liposomas de DPPG en ausencia de HTMA-PFP. Si realmente el fármaco es liberado de la nanopartícula a una temperatura superior a la T_c , se observará un aumento de la intensidad, como se refleja en el siguiente esquema:



Esquema 4. Representación del proceso de liberación del fármaco (CF) de la nanopartícula termosensible fluorescente.

Para ello, se recogió el espectro de la CF a diferentes temperaturas (Figura 20) y se pudo comprobar que, la liberación del fármaco tiene lugar a una temperatura superior a la T_c , aunque una pequeña fracción es liberada entre 37 y 40°C a diferencia de lo ocurrido en ausencia de HTMA-PFP. Esto sugiere que el polielectrolito incorporado en la bicapa aumenta ligeramente la permeabilidad de ésta, induciendo antes la liberación.

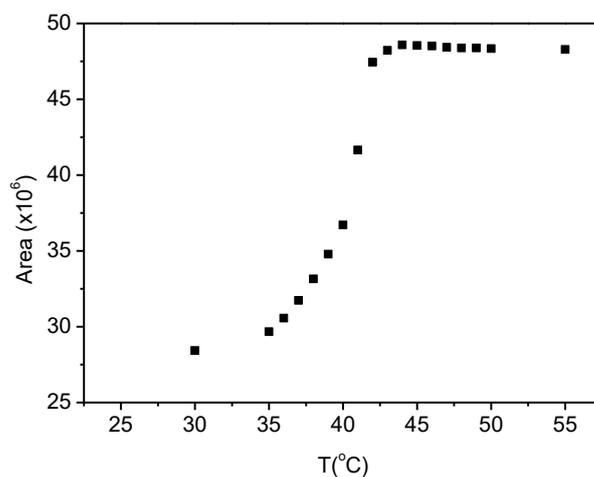


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre el espectro (área) de fluorescencia de CF encapsulada en nanopartículas (λ_{ex} : 492 nm, λ_{em} : 500-550 nm).

También se evaluó el efecto del tiempo de incubación (50 – 600 segundos) sobre la liberación de la CF a distintas temperaturas. Los resultados confirman que, la liberación comienza a producirse un poco antes de alcanzar la temperatura de transición de fase y que el porcentaje liberado aumenta con el tiempo de incubación. Una vez los LUVs se encuentran en fase fluida es cuando se observa una mayor liberación, siendo similar su máximo de liberación en todos los periodos de tiempo ensayados (alrededor del 30%) (Figura 21).

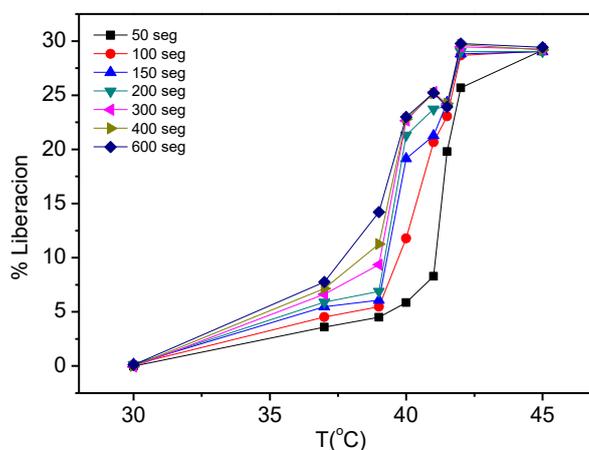


Figura 21. Porcentaje de liberación de CF encapsulada en LUVs de DPPG (0.5 mM) en tampón con el HTMA-PFP (1.5 μ M).

Por tanto, la incorporación del HTMA-PFP sí que tiene repercusión en la liberación del fármaco, pues la salida de éste se produce a temperaturas inferiores a la T_c del DPPG, cuando los liposomas se encuentran en un estado de pre-transición de fase.

Puesto que la liberación solo alcanzó valores sobre el 30%, se realizó un estudio a lo largo de varios días para comprobar si finalmente la CF se liberaba por completo con el transcurso de periodos de tiempo más largos (Figura 22). Se encontró que, al pasar varios días sí que se producía una mayor liberación, aunque no se obtenían los valores alcanzados al inducir la lisis de las vesículas con TritonX-100 10%.

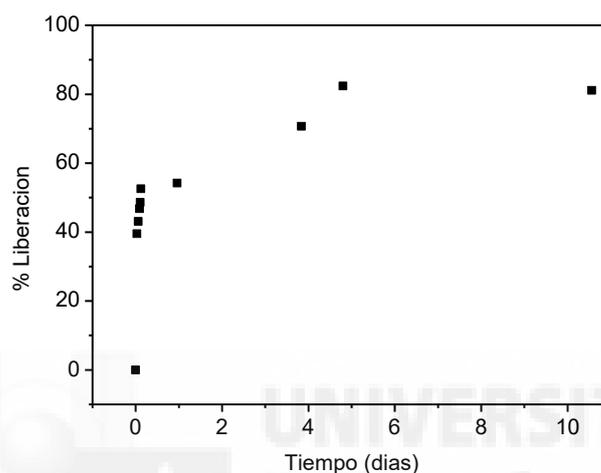


Figura 22. Liberación de la CF encapsulada en LUVs de DPPG (0.5 mM) a 30°C durante varios días (λ_{ex} : 492 nm, λ_{em} : 500-550 nm).

Los resultados anteriores muestran la capacidad de las nanopartículas fluorescentes para transportar y liberar fármacos de manera controlada. El hecho de que la liberación comience a producirse a temperaturas fisiológicas puede ser en ciertos casos un inconveniente. Esta limitación podría mejorarse incorporando en el liposoma fosfolípidos que presenten temperaturas de transición mayores de 42°C, como por ejemplo el DSPG, cuya T_c está próxima a 50°C. La combinación de DPPG y DSPG en un mismo liposoma desplazaría la T_c hacia valores más altos y, por tanto, desplazaría también la temperatura a la cual el fármaco comienza a liberarse.

5.3.2. Bioimagen

Una vez evaluado el uso de las nanopartículas en la vehiculización de fármacos, se procedió a estudiar su capacidad para marcar fluorescentemente células, de forma que pudieran ser simultáneamente utilizadas como herramientas en bioimagen y transporte. Para ello se utilizaron como primera aproximación vesículas lipídicas gigantes (GUVs) compuestas de DOPC, que simulaban la membrana celular y que fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia antes y después de la adición de las nanopartículas. Este experimento se comparó con uno similar en el que se añadía directamente el polielectrolito HTMA-PFP a las GUVs. La figura 23 muestra los resultados correspondientes a este experimento. En ella se observan las GUVs bajo contraste de fase, previamente a la adición de las nanopartículas fluorescentes o el polímero (Figura 23A), y la imagen de

fluorescencia al excitar con luz UV, tras la adición de las nanopartículas (Figura 23B), y tras la adición del polielectrolito (Figura 23C).

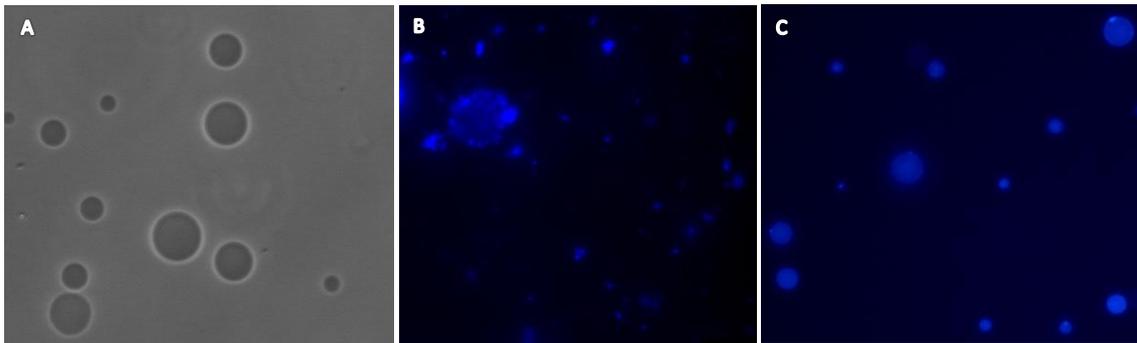


Figura 23. Imágenes de microscopía óptica de GUVs de DOPC. De izquierda a derecha: contraste de fase (A), excitación en el UV (DAPI) tras adición de nanopartículas fluorescentes (B) y excitación en el UV tras la adición del polielectrolito (C).

Los resultados sugieren que el marcaje es más efectivo cuando se añade el polielectrolito sólo, que cuando forma parte de la nanopartícula. Esto podría explicarse porque el HTMA-PFP es inestable en tampón, mientras que se estabiliza al incorporarse a las nanopartículas, reduciendo su afinidad por las GUVs.

Con objeto de comprobar si este comportamiento también ocurría en células reales, se llevó a cabo un experimento utilizando células colorrectales cancerosas, en vez de GUVs, y se exploró la capacidad de las nanopartículas para marcar dichas células. Las células fueron suministradas por el Dr. Alberto Falcó, miembro de nuestro Instituto. En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos en este experimento. La imagen de la izquierda corresponde a las células en presencia de las nanopartículas fluorescentes, observadas bajo contraste de fase. A la derecha, la imagen corresponde al mismo campo pero tras ser excitado con luz UV. Estos resultados indican que las nanopartículas tienen la capacidad de marcar las células y, por tanto, presentan multifuncionalidad al ser capaces tanto de transportar fármacos y liberarlos, como de marcar la región con la que interaccionan. De esta forma, una vez alcanzado el sitio apropiado, se podría inducir la liberación aplicando una fuente de calor.

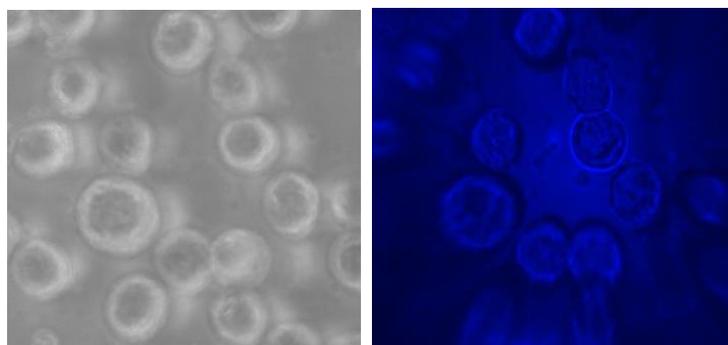
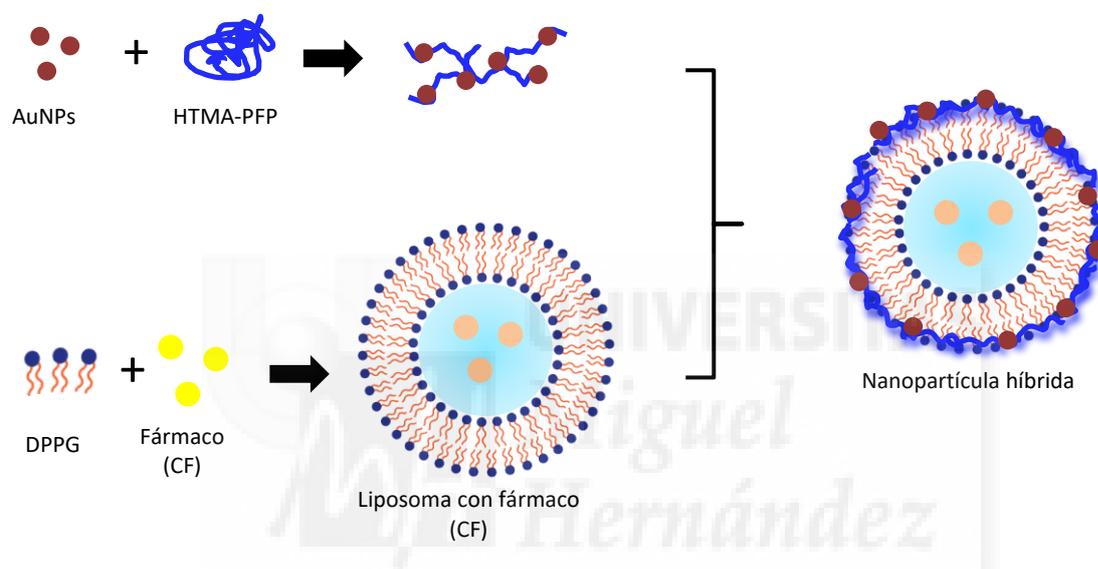


Figura 24. Imágenes de microscopía ópticas de células colorrectales cancerosas observadas tras la adición de nanopartículas fluorescentes, bajo contraste de fase (izquierda) y al excitar con luz UV (derecha).

5.4. NANOPARTÍCULAS FOTOTÉRMICAS: RESULTADOS PRELIMINARES

Una de las propiedades de las nanopartículas de oro (AuNPs) es su capacidad para transformar la energía recibida en calor tras ser irradiadas. Por tanto, pueden actuar como fuentes de calor local si se incorporan en una nanopartícula de mayor tamaño. Con este objetivo se han realizado una serie de ensayos preliminares con objeto de evaluar si las nanopartículas fabricadas en este estudio pueden ampliar su funcionalidad al incorporar en ellas AuNPs, creando así nanopartículas híbridas fototérmicas que potencialmente puedan liberar medicamentos tras ser irradiadas con luz de frecuencia apropiada.

El esquema de la nanopartícula que se pretende fabricar es el siguiente:



Esquema 5. Representación del proceso de formación de la nanopartícula termosensible fluorescente con AuNPs incorporadas.

En estos primeros ensayos se han fabricado AuNPs y se ha estudiado su interacción con HTMA-PFP, con objeto de formar complejos que puedan incorporarse en los liposomas. La Figura 25 muestra cómo se afecta la absorción de las AuNPs tras la adición del polímero (A), así como la fluorescencia de éste al añadir AuNPs (B). El hecho de que disminuya el espectro de absorción y aparezca un segundo máximo hacia el rojo indica que una población de AuNPs está agregando, posiblemente formando complejos con los polímeros. La formación de complejos es soportada por los espectros de fluorescencia del HTMA-PFP, donde se muestra una pérdida de señal tras adiciones crecientes de AuNPs, y por experimentos de DLS, donde se han medido estructuras que tienen ~232 nm de diámetro.

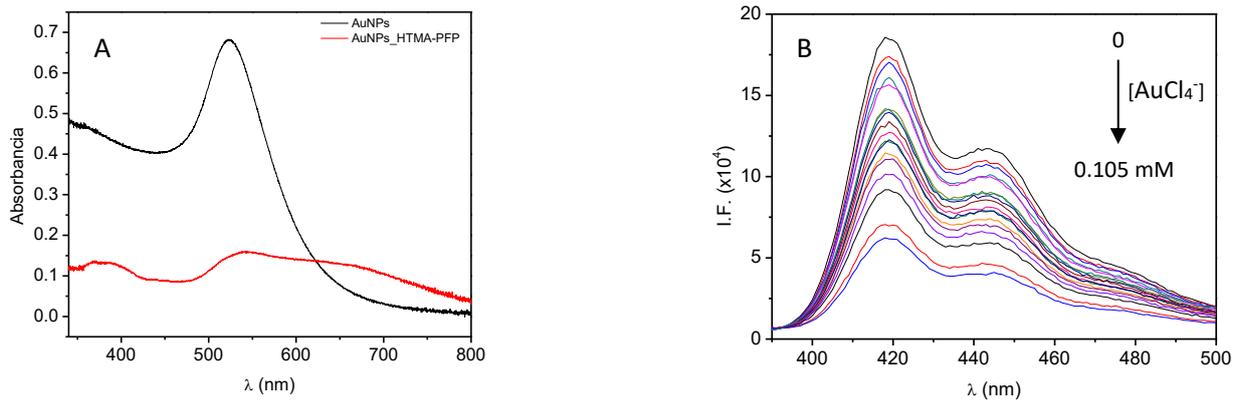


Figura 25. (A) Absorbancia del HTMA-PFP (1.5 μM) con y sin AuNPs en tampón; (B) emisión de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) con concentraciones crecientes de AuNPs (expresado como AuCl_4^- de partida, desde 0 hasta 0.105 mM) en tampón (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm).

Finalmente se han hecho ensayos en los que se ha añadido el complejo AuNPs/HTMA-PFP a liposomas de DPPG y se han recogido espectros del complejo en ausencia y presencia de los liposomas. El hecho de que aumente la fluorescencia y se desplace hacia el azul es indicativo de que el polímero está interaccionando con el liposoma, sugiriendo la formación de nanopartículas que incluyen AuNPs en su composición y que, por tanto, al irradiarlas podrían ser utilizadas como fuentes de calor para inducir una transición de fase gel-fluida, liberando cualquier fármaco que pudiera estar encapsulado en su interior.

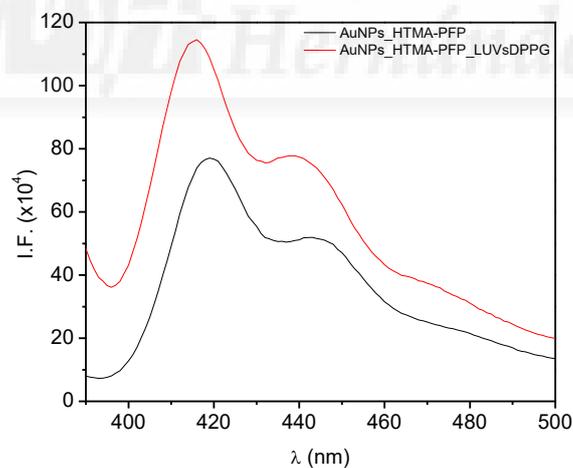


Figura 26. Emisión de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) con AuNPs en tampón con y sin LUVs de DPPG (0.5 mM) (λ_{exc} : 380 nm, λ_{em} : 390-500 nm).

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA

- ✓ En este trabajo se han desarrollado nanopartículas fluorescentes combinando liposomas termosensibles de DPPG con polielectrolitos conjugados fluorescentes de HTMA-PFP y se ha explorado la capacidad de las nanopartículas para marcar células, transportar y liberar fármacos de manera controlada.
- ✓ Se ha caracterizado el tamaño, estabilidad y carga, así como el comportamiento termotrópico de los liposomas de DPPG en las condiciones de trabajo, determinando una temperatura de transición de fase gel a fase fluida de $\sim 42^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Se ha demostrado la capacidad del liposoma para encapsular fármacos hidrofílicos, utilizando como modelo de fármaco la carboxifluoresceína (CF). Igualmente, se ha demostrado que es posible inducir la liberación del fármaco aumentando la temperatura por encima de valores fisiológicos.
- ✓ Utilizando cambios en la fluorescencia del HTMA-PFP, se ha confirmado la incorporación del polielectrolito en la membrana de los liposomas, dotando a éstos de propiedades fluorescentes. Las nanopartículas así formadas han sido caracterizadas en cuanto a tamaño, estabilidad, carga, localización de sus componentes y morfología.
- ✓ Se ha demostrado que las nanopartículas mantienen la capacidad para transportar y liberar fármacos, sin embargo, se ha observado que la liberación en presencia del polielectrolito se inicia a temperaturas ligeramente inferiores a las encontradas en ausencia de polielectrolito, probablemente debido a que la incorporación de éste perturba la bicapa lipídica, aumentando su permeabilidad.
- ✓ La capacidad de las nanopartículas para marcar células se ha explorado en modelos de membrana y células de cáncer colorrectal. Los resultados han demostrado que las nanopartículas presentan baja afinidad por los modelos celulares, probablemente debido a su alta estabilidad, pero sí son capaces de marcar con detalle la membrana de las células tumorales
- ✓ Experimentos preliminares han mostrado que es posible incorporar nanopartículas de oro en las nanopartículas termosensibles, mejorando sus prestaciones y generando así nanopartículas híbridas que serían a su vez fotosensibles, pudiendo liberar fármacos tanto por efecto de la temperatura como por acción de la luz.

Se concluye que las nanopartículas desarrolladas son multifuncionales y prometen ser de gran utilidad como vehículo de transporte, liberación controlada y monitorización mediante bioimagen. Sin embargo, es necesario mejorar ciertos aspectos, como desplazar la temperatura a la cual se inicia la liberación, y profundizar más en otros, como la posible liberación inducida por luz o la funcionalización de su superficie para dirigir el transporte hacia sitios específicos del organismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lanio, M.E.; Luzardo, M.C.; Laborde, R.; Sánchez, O.; Cruz-Leal, Y.; Pazos, F.; Tejuca, M.; Alonso, M.E.; Fernández, L.E.; Álvarez, C. Las vesículas liposomales: Obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev.Cub.Física* 2009, 26, 23-30.
2. Mary Lee, Rachel. Liposomes as a carriers for drug delivery. Honors Thesis 2010.
3. Sabín Fernández, Juan D. Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Tesis doctoral 2007.
4. Pu, K.Y.; Liu, B. Fluorescent conjugated polyelectrolytes for bioimaging. *Advanced Functional Materials* 2011, 21(18), 3408-3423.
5. Kahveci, Z.; Vázquez-Guilló, R.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. New red-emitting conjugated polyelectrolyte: Stabilization by interaction with biomolecules and potential use as drug carriers and bioimaging probes. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016, 8, 1958-1969.
6. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Esquembre, R.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Selective interaction of a cationic polyfluorene with model lipid membranes: Anionic versus zwitterionic lipids. *Materials* 2014, 7, 2120-2140.
7. Pu, K. Y.; Liu, B. Fluorescent conjugated polyelectrolytes for bioimaging. *Advanced Functional Materials* 2011, 21 (18), 3408-3423.
8. Zhu, C.; Liu, L.; Yang, Q.; Lv, F.; Wang, S. Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis and therapy. *Chemical Reviews* 2012, 112, 4687-4735.
9. Kim, I. B.; Shin, H.; Garcia, A. J.; Bunz, U. H. F. Use of a folate-PPE conjugate to image cancer cells in vitro. *Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 815-820.
10. Ngo, A. T.; Karam, P.; Cosa, G. Conjugated polyelectrolyte-lipid interactions: opportunities in biosensing. *Pure Appl. Chem.* 2011, 83, 43-55.
11. Faraji, A. H.; Wipf, P. Nanoparticles in celular drug delivery. *Bioorganic & Medical Chemistry* 2009, 17, 2950-2962.
12. Slepishkin, V.A.; Simoes, S.; Dazini, P.; Newman, M.S.; Guo, L.S.; Pedroso de Lima, M.C.; Duzgunes, N. Sterically stabilized pH-sensitive liposomes, intracelular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272 (4), 2382-2388.
13. Bisby, R.H.; Mead, C.; Christopher G. Morgan, C.G. Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis. *Photochem Photobiol.* 2000, 72(1), 57-61.
14. Ito, A.; Tanaka, K.; Kondo, K.; Shinkai, M.; Honda, H.; Matsumoto, K.; Saida, T.; Kobayashi, T. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Sci* 2003, 94(3), 308-313.
15. Paasonen, L.; Laaksonen, T.; Johans, C.; Yliperttul, M.; Kontturi, K.; Urtti, A. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. *Journal of controlled release* 2007, 122(1), 86-93.
16. Lajunena, T.; Nurmia, R.; Kontturia, L.; Viitalac, L.; Yliperttulaa, M.; Murtomäkic, L.; Urttia, A. Light activated liposomes: Functionality and prospects in ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2016, 244, 157-166.

17. GuhaSarkar, S.; More, P.; Banerjee, R. Urothelium-adherent, ion-triggered liposome-in-gel system as a platform for intravesical drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2017, 245, 147-156.
18. Belhadja, Z.; Yinga, M.; Caoa, X.; Hua, X.; Zhanb, C.; Weia, X.; Gaoa, J.; Wanga, X.; Yanc, Z.; Lua, W. Design of Y-shaped targeting material for liposome-based multifunctional glioblastoma-targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2017, 255, 132-141.
19. Gómez-Mascaraque, L.G.; Casagrande Sipoli, C.; de La Torre, L.G.; López-Rubio, A. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. *Food Chem.* 2017, 233, 343-350.
20. Cerna, A.; Marcusc, D.; Tropshad, A.; Barenholza, Y.; Goldblum, A. New drug candidates for liposomal delivery identified by computer modeling of liposomes' remote loading and leakage. *Journal of Controlled Release* 2017, 252, 18-27.
21. Pippa, N.; Meristoudi, A.; Pispas, S.; Demetzos, C. Temperature-dependent drug release from DPPC:C12H25-PNIPAM-COOH liposomes: Control of the drug loading/release by modulation of the nanocarriers' components. *International Journal of Pharmaceutics* 2015, 485(1-2), 374-382.
22. Lu, T.; ten Hagen, T.L.M. Inhomogeneous crystal grain formation in DPPC-DSPC based thermosensitive liposomes determines content release kinetics. *Journal of Controlled Release* 2016, 247, 64-72.
23. Ricci, M.; Oliva, R.; Del Vecchio, P.; Paolantoni, M.; Morresi, A.; Sassi, P. DMSO-induced perturbation of thermotropic properties of cholesterol-containing DPPC liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2016, 1858(12), 3024-3031.
24. Nassar, P.M.; Almeida, L.E.; Tabak, M. Binding of dipyrindamole to DPPG and DPPC phospholipid vesicles: Steady-state fluorescence and fluorescence anisotropy decay studies. *Langmuir* 1998, 14(24), 6811-6817.
25. Vollhardt, D.; Fainerman, V.B.; Siegel, S. Thermodynamic and textural characterization of DPPG phospholipid. *The Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104(17), 4115-4121.
26. Grigoriev, D.; Miller, R.; Wustneck, R.; Wustneck, N.; Pison, U.; Mohwald, H. A novel method to evaluate the phase transition thermodynamics of langmuir monolayers. Application to DPPG monolayers affected by subphase composition. *The Journal of Physical Chemistry B* 2003, 107(51), 14283-14288.
27. Riske, K.A.; Barroso, R.P.; Vequi-Suplicy, C.C.; Germano, R.; Henriques, V.B.; Lamy, M.T. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 2009, 1788(5), 954-963.
28. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Use of the conjugated polyelectrolyte poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium)hexyl]-fluorene-phenylene} bromide (HTMA-PFP) as a fluorescent membrane marker. *Biomacromolecules* 2013, 14, 1990-1998.
29. Kahveci, Z.; Vázquez-Guilló, R.; Mira, A.; Martínez, L.; Falcó, A.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Selective recognition and imaging of bacterial model membranes over mammalian ones by using cationic conjugated polyelectrolytes. *The Royal Society of Chemistry* 2016.