



TÍTULO

NANOPARTÍCULAS BI-MAGNÉTICAS CON APLICACIÓN EN BIOMEDICINA

AUTOR

José M^a Páez Muñoz

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2018

Tutora	María Luisa García Martín
Co-Tutor	José Becerra Ratia
Instituciones:	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Málaga
Curso	Máster Oficial en Biotecnología Avanzada (2016/2017)
ISBN	978-84-7993-545-0
©	José M ^a Páez Muñoz
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2017



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciadore (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
- **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
- **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
- *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
- *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Nanopartículas bi-magnéticas con aplicación en biomedicina.

Máster en Biotecnología Avanzada (Curso 2016-2017)

Trabajo Fin de Máster

Autor: José M^a Páez Muñoz

Tutor principal: María Luisa García Martín

Co-Tutor: José Becerra Ratia





El presente Trabajo Fin de Máster titulado “*Nanopartículas bi-magnéticas con aplicación en biomedicina.*” ha sido realizado por **José M^a Páez Muñoz** en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (Bionand) bajo la dirección de la **Dra. María Luisa García Martín** y co-tutorizado por el **Prof. José Becerra Ratia**.

Los tutores afirman que el trabajo ha sido realizado y redactado por el mencionado alumno bajo su tutela, y autorizan su presentación y defensa pública.

Tutor: María Luisa García Martín

Firma

En Málaga, a 6 de diciembre de 2017

Agradecimientos.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. María Luisa García Martín por permitirme formar parte de su grupo y por proporcionar medios para poder realizar este trabajo. Su capacidad de dirección del trabajo, así como sus conocimientos y experiencia en la materia han permitido que pueda llegar hasta el final del mismo.

Por otro lado, me gustaría agradecer con especial atención, al Dr. Carlos Caro Salazar que ha sacrificado parte de su tiempo para formarme en todos los aspectos relacionados con la investigación realizada, así como para atender a todas las dudas que se me presentaban y a supervisar mi trabajo cuando me encontraba inseguro con el mismo. Además ha conseguido que hasta un Ingeniero Químico como yo pueda desempeñar un trabajo de investigación en temas relacionados con cultivos celulares.

Por último, y sin restar importancia, me gustaría agradecer a mis padres todo el apoyo que he recibido ya que sin su ayuda, y sin sus consejos no hubiese podido cursar este Máster, que me ha hecho crecer como persona y como investigador.

Resumen

Hoy en día, una de las herramientas fundamentales de diagnóstico clínico son las técnicas de imagen médica, entre las que destaca imagen por resonancia magnética nuclear (MRI), por su gran versatilidad, por la variedad de información que proporciona y, sobre todo, por tratarse de una técnica no ionizante. En algunos casos es fundamental el uso de agentes de contraste (AC) para aumentar la especificidad diagnóstica. Hasta el momento, los agentes de contraste disponibles para uso clínico son en su mayoría complejones Gd. Sin embargo, estos compuestos presentan algunas limitaciones, como por ejemplo su toxicidad en pacientes con insuficiencia renal. De hecho, a mediados de este año 2017 la Agencia Europea del Medicamento retiró todos los agentes de contraste basados en Gd que utilizaban como complejantes compuestos lineales, dejando sólo para uso clínico los macrocíclicos, por su mayor estabilidad. Por ello, cada vez se hace más evidente la necesidad de desarrollar una nueva generación de ACs para MRI con propiedades mejoradas.

Una opción muy prometedora son las nanopartículas magnéticas, que presentan un gran potencial tanto como agentes de contraste para MRI, como para el transporte y liberación controlada de fármacos.

En este trabajo se han estudiado nanopartículas bi-magnéticas, “core-shell”, como una nueva alternativa para el desarrollo de agentes de contraste para MRI. Para ello se sintetizaron diferentes nanopartículas y se realizó la caracterización físico-química de las mismas tras la funcionalización con PEG-Gallol mediante intercambio de ligando. Después se midieron sus relajatividades de T_1 y T_2 a bajo (1.5 T) y alto campo (9.4 T), se realizaron estudios de citotoxicidad, de biodistribución en modelos murinos, y por último se evaluaron los posibles efectos secundarios mediante estudios histológicos.

Palabras clave: nanotecnología, nanopartículas bimetálicas, nanopartículas bi-magnéticas, “core-shell”, MRI.

Abstract

Nowadays, one of the fundamental tools in clinical diagnosis are medical imaging techniques, among which nuclear magnetic resonance (MRI) image stands out for its great versatility, the variety of information it provides and, above all, its non-ionizing nature. In some cases, the use of contrast agent (CA) is essential to increase the diagnostic specificity. Up to now, the contrast agents available for clinical use are mostly Gd chelates. However, these compounds have certain limitations, such as their toxicity in patients with renal insufficiency. In fact, towards the middle of this year 2017, the European Medicines Agency withdrew all Gd-based contrast agents that use linear chelates, keeping for clinical use only those that use macrocyclic chelates, due to their greater stability. Therefore, is becoming increasingly evident that there is a need for the development of a new generation of ACs for MRI with improved properties.

A very promising option are the magnetic nanoparticles, which exhibit great potential both as MRI contrast agents and as vehicles for control drug release.

In this work, bi-magnetic nanoparticles (“core-shell”) have been studied as a new alternative for the development of MRI contrast agents. Thus, different nanoparticles were synthesized and characterized physico-chemically after its functionalization with PEG-Gallol by ligand exchange. Then T_1 and T_2 relaxivities were measured at low (1.5 T) and high (9.4 T) magnetic fields, cytotoxicity and *in vivo* biodistribution studies were carried out, and finally possible side effects were evaluated by histological studies.

Keywords: nanotechnology, bimetallic nanoparticles, bi-magnetic nanoparticles, core-shell, MRI.

Índice

Introducción.....	7
Nanopartículas.....	7
Nanopartículas bimetálicas.....	8
Magnetismo. Magnetismo a nanoescala.....	9
Superparamagnetismo.	10
Bi-Magnetismo.	10
Síntesis de nanopartículas magnéticas.....	11
Funcionalización de nanopartículas.	13
Aplicaciones en biomedicina.....	14
MRI.....	15
Objetivos.....	17
Materiales y metodología.	18
Síntesis y funcionalización de nanopartículas.	18
Síntesis de nanopartículas aCZ.....	19
Síntesis de nanopartículas aC.....	19
Síntesis de nanopartículas cCZsM.....	20
Síntesis de nanopartículas cCsZ.	21
Síntesis de nanopartículas cMZsC.....	21
Síntesis del ligando PEG-Gallol de 3 KDa.....	22
Intercambio de ligando.	22
Caracterización de nanopartículas.	23
Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).....	23
Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering: DLS).....	23
Plasma acoplado inductivamente (Inductively Coupled Plasma: ICP).	24
Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR).	24
Relajatividad in vitro.	24
Ensayo de citotoxicidad in vitro.	25
Ensayo de MTT.....	25
Ensayos in vivo mediante MRI.	26
Histología hígado, riñón y bazo.....	27
Resultados y discusión.	28
Síntesis de partículas bimetálicas.	28
Caracterización.	29
FTIR.....	29
Tamaño de las nanopartículas.....	30

Potencial-Z	32
Relajatividad.....	33
Ensayo de citotoxicidad in vitro.....	35
Ensayos in vivo.....	36
Posibles efectos secundarios: Control de peso e histología de los órganos principales..	39
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	44

Introducción.

Se define nanotecnología como la ciencia encargada de estudiar materiales cuyas dimensiones, o al menos una de ellas, se sitúa por debajo de los 100 nanómetros.^{1,2} Pero estos materiales no se diferencian exclusivamente en sus dimensiones, sino en las propiedades que adquieren al pasar a la escala nanométrica, que son complemente distintas con respecto a la escala macroscópica.^{1,3}

Esta diferencia viene determinada por dos factores. El primero de ellos corresponde a un aumento del área superficial en el caso de materiales que se encuentran en la escala nanométrica, afectando a la reactividad química y a sus propiedades eléctricas. El segundo de los factores viene determinado por el predominio de los efectos cuánticos, que afectan a las propiedades eléctricas y magnéticas del material.

Estos materiales se pueden clasificar, dependiendo del número de dimensiones dentro de la escala nanométrica, en: nanopelículas, si únicamente una de sus dimensiones se encuentra en la escala nanométrica, nanotubos en el caso de presentar dos dimensiones dentro de dicha escala y nanopartículas, cuando todas sus dimensiones se encuentran por debajo de los 100 nanómetros.^{4,5}

Nanopartículas

Como se ha mencionado, una nanopartícula es un material cuyas tres dimensiones presentan un tamaño inferior a los 100 nanómetros. Debido a las propiedades que presentan este tipo de materiales resultan muy atractivos para varios campos de la industria, como son el de la electrónica, que emplea nanopartículas metálicas en la fabricación de discos de memoria, la industria del transporte, que usa nanopartículas de carbono para reforzar los neumáticos de los vehículos, además de otros usos como la presencia de nanopartículas en catalizadores para la eliminación de compuestos tóxicos.

De acuerdo a su naturaleza, las nanopartículas pueden clasificarse en:

- Orgánicas: subdivididas principalmente en liposomas, dendrímeros, micelas poliméricas y fullerenos (nanomateriales de carbono). Este tipo de partículas son empleadas para el transporte de fármacos, scaffolds y biosensores.
- Inorgánicas: se consideran principalmente aquellas que estén compuestas por un metal u otro compuesto inorgánico de forma primaria como pueden ser los materiales cerámicos. Un ejemplo de estas partículas son las nanopartículas magnéticas, empleadas

como agente de contraste para imagen por resonancia magnética, y las nanopartículas de oro, empleadas principalmente como biosensores y como agentes de contraste en tomografía computarizada.⁶

Nanopartículas bimetálicas.

Se trata de un tipo de partículas metálicas que están compuestas por varios elementos y cuyas propiedades dependen de la distribución de los elementos metálicos a lo largo de su estructura.

Este trabajo tiene como objetivo comparar dos tipos de estructura de las nanopartículas bimetálicas, las tipo “*alloy*”, en las que ambos elementos se encuentran distribuidos por la nanopartícula, y las “*core-shell*”, partículas compuestas por una nanopartícula núcleo, o “*core*” al que, mediante un segundo proceso de síntesis se le incorpora un recubrimiento (“*shell*”) compuesto de otro metal.

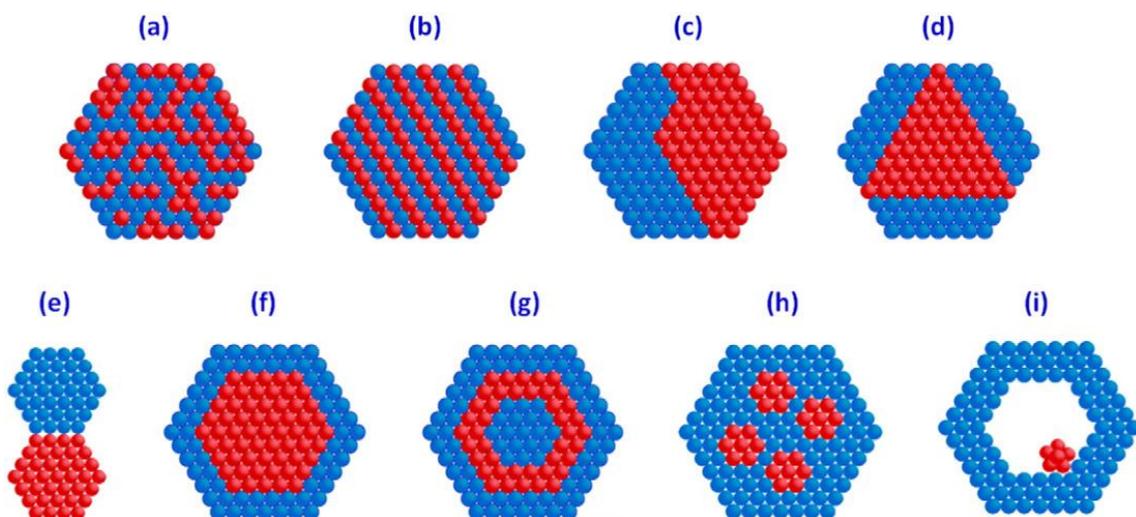


Figura 1: Tipos de estructura de partículas bi-metálicas.⁷

Magnetismo. Magnetismo a nanoescala.

El comportamiento de los materiales en presencia de un campo magnético externo viene determinado por su estructura. A nivel atómico, este comportamiento depende del momento angular de los orbitales y a la ordenación de los electrones. Así, en función de si los orbitales se encuentran ocupados por electrones apareados o no, los materiales pueden ser de dos tipos: diamagnéticos, que presentan sus orbitales atómicos ocupados, y paramagnéticos, que tienen orbitales con electrones desapareados.⁸

Ambos materiales carecen de momento magnético neto en ausencia de campo magnético, y el estado de sus orbitales es el determinante de su comportamiento frente un campo magnético externo. Bajo un campo externo los electrones de los elementos diamagnéticos se orientan en sentido contrario al campo incidente produciendo una repulsión. Al contrario, los electrones desapareados de los elementos paramagnéticos se orientan en el mismo sentido que el campo magnético incidente,

Otros tipos de materiales presentan un magnetismo que no viene determinado únicamente por el efecto atómico. En estos tipos de materiales los átomos se organizan formando dominios magnéticos. La organización de los átomos en dichos dominios va a determinar el tipo de comportamiento magnético del material.

Si los momentos atómicos de los elementos que conforman los dominios magnéticos se encuentran ordenados de forma antiparalela, el material se denomina antiferromagnético, presentando un momento magnético nulo y unas propiedades similares a los diamagnéticos en ausencia de un campo magnético externo. En caso contrario, es decir, si los orbitales se encuentran ordenados de forma paralela dentro de un dominio magnético, el material se denomina ferromagnético.

Los momentos magnéticos de estos materiales, bajo la presencia de un campo externo se alinean en la dirección del campo magnético externo y, tras cesar dicho campo el material mantiene dicha alineación, es decir mantiene una magnetización remanente. Este grupo lo componen elementos como el hierro, cobalto y el níquel, entre otros, y algunas de sus aleaciones, además de ciertas tierras raras como el gadolinio.⁸⁻¹⁰

Dependiendo de la temperatura, los átomos que componen este tipo de materiales van cambiando su posición en el espacio, modificando la ordenación de sus orbitales. Cuando se alcanza una determinada temperatura, denominada temperatura de Curie o temperatura de bloqueo, pierden la ordenación paralela de sus orbitales, volviendo a tener propiedades paramagnéticas.

Superparamagnetismo.

Como se ha mencionado anteriormente, las propiedades magnéticas varían con la estructura del material. Cuando se reduce significativamente el tamaño de las partículas ferromagnéticas, entrando a escala nanométrica, las propiedades magnéticas de estas partículas cambian, dando lugar a otro tipo de materiales, denominado superparamagnéticos. Esto se debe a que, al reducir el tamaño de los materiales a escala nanométrica, las nanopartículas resultantes están formadas por un dominio magnético único que se va a orientar siguiendo el campo magnético externo (figura 2).

Por encima de la temperatura de Curie, los materiales superparamagnéticos presentan comportamientos muy similares a los materiales paramagnéticos, pero con un momento magnético mucho mayor. Esto se observa en las curvas de magnetización de ambos materiales, en los que se aprecia que en los materiales superparamagnéticos presentan una mayor susceptibilidad magnética muy superior a los paramagnéticos.

Por debajo de la temperatura de bloqueo, la curva de magnetización presenta una histéresis que resulta similar a la curva de magnetización de los materiales ferromagnéticos.¹¹

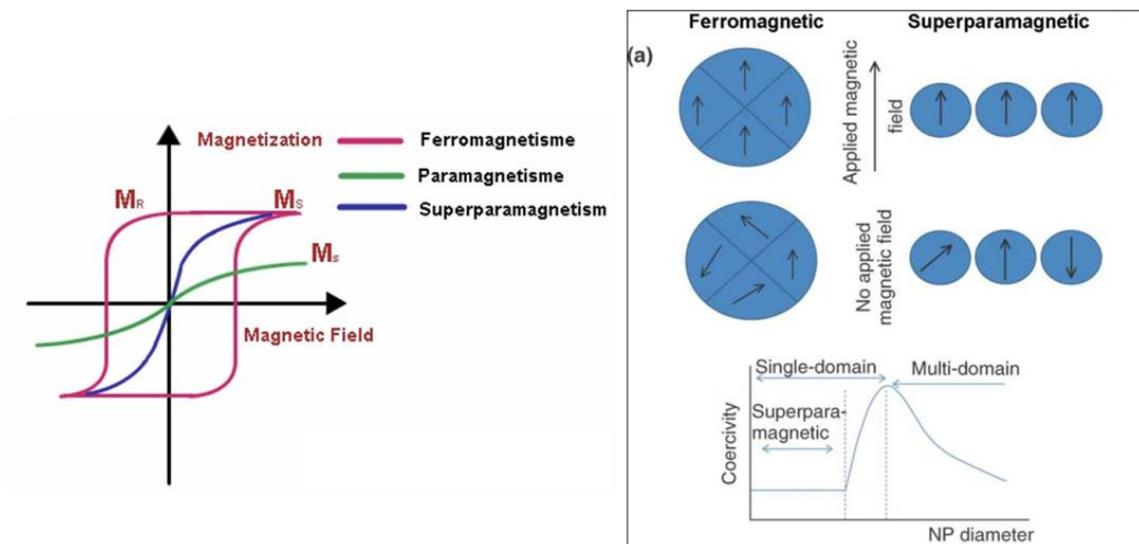


Figura 2: Comparación de la curva de magnetización de distintos tipos de material, ferro, para y superparamagnéticos (izquierda). Efecto de la exposición a un campo magnético de partículas ferromagnéticas y superparamagnéticas (derecha)

Bi-Magnetismo.

Se denomina bi-magnetismo al fenómeno que ocurre en nanopartículas metálicas, “core-shell”. La presencia de la “shell” permite la modificación de diferentes propiedades de la

nanopartícula. En este caso, la presencia de otro tipo de elementos en la partícula produce una alteración en la respuesta de la partícula ante un campo magnético externo. En la figura 3, se muestra un ejemplo de un tipo de propiedad modificada por la adición de la “shell”, la magnetización.

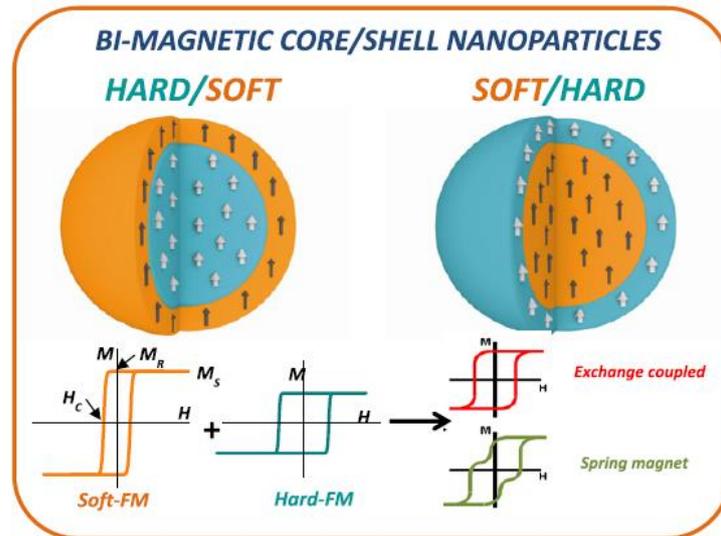


Figura 3: Esquema del efecto sobre el ciclo de histéresis de magnetización de una nanopartícula bi-magnética.¹²

Síntesis de nanopartículas magnéticas.

Existen dos tipos de rutas de síntesis de nanopartículas, los métodos físicos, o top-down, y los métodos químicos, o bottom-up.

Los métodos físicos se caracterizan por partir de un material macroscópico y realizarle tratamientos físicos como la nanolitografía, empleada para la elaboración de microchips, el grabado en seco del material o la ablación por láser, entre otras. A pesar de su desarrollo durante los últimos años y su aplicación en el campo de la electrónica, estas técnicas presentan una serie de desventajas. Este tipo de técnicas presentan un límite de tamaño de elaboración, tienden a ser lentas, requieren equipos costosos, y principalmente se limitan a trabajar con estructuras 2D.

Por otro lado, se encuentran los métodos químicos o bottom-up. Este tipo de técnicas parte de unos precursores metálicos que, mediante una serie de reacciones dan lugar a las nanopartículas. Este tipo de técnicas, si bien son algo más complejas que las físicas suelen

presentar mayor reproducibilidad, mayor capacidad de ser escalables a condiciones industriales y requieren procesos de purificación más simples que los métodos top-down.¹³ A continuación, se describe una serie de técnicas bottom-up, entre las que se encuentra la descomposición térmica, técnica empleada en este trabajo.

- Proceso sol-gel. El proceso sol-gel se basa en una serie de reacciones de polimerización en las que se incluyen cuatro etapas: hidrólisis del precursor metálico, policondensación de la solución a un gel, secado del disolvente y, finalmente, una descomposición térmica del precursor orgánico. El tamaño de las partículas producidas viene determinado por la temperatura, la composición y el pH del medio.^{14,15}

- Proceso Hidrotermal. Se trata de una variante del proceso solvotermal, en el que se emplea como disolvente agua en lugar de un disolvente orgánico. En este proceso se aprovecha la solubilidad de los compuestos inorgánicos en agua a altas temperaturas y presión con el objetivo de sobresaturar el medio y formar nanocristales insolubles. El aumento de estas variables no sólo modifica la solubilidad de las partículas, sino que afecta a la reactividad de los compuestos, dando lugar a estructuras que no pueden formarse a bajas temperaturas. Durante este tipo de síntesis, junto con la temperatura y la presión en el autoclave, se requiere controlar otras variables tales como la presión de vapor del agua y el tiempo de reacción. Este proceso evita tener que emplear disolventes orgánicos y posteriores postratamientos, como puede ser la calcinación; además, permite obtener partículas con gran potencial magnético.^{15,16}

- Co-precipitación. Este método consiste en realizar una precipitación simultánea debido a la adición de cationes y aniones, normalmente solubles, en condiciones específicas de pH. Para controlar el proceso de síntesis por tanto, es necesario tener en cuenta los valores de pH, además de la concentración de reactivos e iones y la temperatura de trabajo. La síntesis más común por este método es la formación de Fe_3O_4 , mediante la co-precipitación de reactivos ferroso (Fe^{2+}) y férricos (Fe^{3+}) en relación 1:2 en atmósfera inerte.^{15,16}

- Descomposición térmica. Se trata del método de síntesis que se ha seguido a lo largo del presente trabajo. En este método se parte de un precursor orgánico de un metal en solución orgánica, sometido a altas temperaturas, con un agente surfactante. Para controlar el proceso de síntesis es necesario conocer el tiempo y temperatura de reacción, la concentración de los reactivos, la naturaleza del disolvente y de los surfactantes, así como otras variables como el uso de una atmósfera inerte. A partir de este método se obtienen nanopartículas con un tamaño uniforme y alta cristalinidad.^{15,16}

Funcionalización de nanopartículas.

Tras la síntesis de las nanopartículas es necesario que ésta reciba un tratamiento de funcionalización. La funcionalización consiste en la modificación de los elementos de la superficie de las partículas, así como la introducción de grupos funcionales para garantizar su estabilidad o para proporcionarles nuevas funciones, como puede ser la de reconocimiento específico de una diana molecular. Para aplicaciones *in vivo* una de las propiedades que hay que considerar es la posible toxicidad de los metales que componen las nanopartículas.^{17,18}

Además de la toxicidad de los elementos metálicos hay que tener en cuenta que, debido a la estructura superficial de la partícula de carácter hidrofóbico, las partículas tienden a agregarse en medios acuosos formando complejos de partículas, lo que modifica las propiedades de las mismas, debido al incremento del tamaño, y en el caso de su uso *in vivo*, esta agregación podría tener consecuencias perjudiciales para el organismo receptor.

Por último, hay que señalar que la funcionalización de las nanopartículas puede ser realizada con el objetivo de aportarle una tarea específica, como puede ser que actúen como biosensor, que distribuyan un determinado fármaco o que permitan fijarse a un determinado tipo celular.

Hay dos tipos de estrategias para realizar la funcionalización de las nanopartículas. La primera de ellas se denomina funcionalización directa, donde el ligando es bi-funcional, es decir, uno de los grupos del ligando interacciona con la superficie de la partícula, mientras que el segundo grupo es el que proporcione la función deseada. Este tipo de síntesis, si bien suele preferirse porque se produce en una misma etapa, tienen el inconveniente que puede producirse impedimento estérico sobre la superficie del material.

El segundo método se denomina proceso posfuncionalización. En este método, en primer lugar se une a las nanopartículas un agente quelante y, en una etapa posterior el grupo funcional es fijado sobre el mismo. El problema que presenta este método es que requiere que el grupo funcional tenga una gran afinidad con la superficie de la partícula, impidiendo que pueda ser utilizado para formar clústeres independientes de ligando.

Una variación de este método es el intercambio de ligando. En este caso, las partículas poseen un agente surfactante en su superficie y, mediante una mayor afinidad a la superficie por parte del ligando comparada con el surfactante, el ligando funcional desplaza a dicho compuesto y recubre la nanopartícula.¹⁸

Aplicaciones en biomedicina.

Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas presentan gran utilidad en diversos campos de la industria, siendo el campo de la nanomedicina uno de los que se encuentra actualmente más en desarrollo. Este trabajo se centra en el estudio de nanopartículas magnéticas y sus posibles aplicaciones en el campo de la medicina, que se comentan a continuación:

- **Diagnostico.** Las nanopartículas metálicas, en función de su tamaño, reactividad y propiedades magnéticas pueden servir como una herramienta excelente en el diagnóstico de diversas patologías, entre ellas el cáncer. Estas nanopartículas pueden ser utilizadas in vivo como agentes de contraste para MRI. Si dichas nanopartículas son además dirigidas de manera específica a algún receptor expresado en la superficie de las células diana (células tumorales, por ejemplo), se podría llevar a cabo imagen molecular por resonancia magnética (mMRI).

Dado que en este trabajo se han realizado estudios de las nanopartículas como posibles agentes de contraste de MRI, esta técnica será descrita en un apartado posterior.

- **Terapia.** La mayoría de los tratamientos específicos contra el cáncer son de amplio espectro, pudiendo afectar a células sanas además de las células tumorales. Por lo tanto, una de las vías de actuación que se intenta seguir a la hora de buscar nuevos tratamientos es la obtención de estrategias más específicas, dirigidas a las células tumorales. En este sentido, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las nanopartículas son muy prometedoras ya que permiten la funcionalización con multitud de ligandos que en principio permitirían un direccionamiento más específico y eficiente, que contribuiría a reducir significativamente los efectos negativos secundarios.

- **Liberación controlada de fármacos.** Aprovecha la capacidad de las nanopartículas de transportar fármacos y simultáneamente ser dirigidas a una diana concreta. Este direccionamiento puede llevarse a cabo según se comenta en el apartado anterior, o bien mediante la aplicación de campos magnéticos externos. Una vez alcanzada la diana, la liberación del fármaco puede realizarse mediante un cambio de pH del medio o mediante un cambio en la temperatura, por ejemplo.

- **Hipertermia.** Esta técnica permite aprovechar la capacidad magnética de las nanopartículas y el efecto que produce la aplicación de un campo magnético sobre las

mismas. En este caso se pretende utilizar la energía generada por las oscilaciones producidas en las partículas en dicho campo con el fin de transformarla en energía calorífica. Esta energía permitirá aumentar la temperatura en la región de interés produciendo una apoptosis de las células tumorales.^{5,17}

MRI

La imagen por resonancia magnética (MRI) es una técnica no invasiva que permite obtener imágenes de los órganos internos de un cuerpo a partir de señal de ^1H del agua de los tejidos. Algunas de las ventajas que presenta la MRI frente a otras técnicas de imagen *in vivo* son su naturaleza no ionizante, su excelente calidad de imagen y su gran versatilidad, que permite obtener tanto información morfológica como funcional.^{16,17,19}

La MRI se basa en la interacción entre un campo magnético y los momentos magnéticos de los átomos de la muestra. Dichos momentos atómicos, como se describió en el apartado de magnetismo, se encuentran orientados aleatoriamente en todas direcciones en ausencia de un campo magnético externo, lo que hace que el momento magnético global sea nulo. Sin embargo, en presencia de un campo magnético, los espines de los átomos de la muestra se reordenan a lo largo de la dirección del campo magnético incidente (por convención se considera que es el eje z en las coordenadas espaciales), generando así una magnetización neta a lo largo de esta dirección.

Para poder cuantificar dicha magnetización es necesaria la aplicación de un pulso de radiofrecuencia para llevar la magnetización del eje z al plano x - y . Después del pulso de radiofrecuencia, la magnetización vuelve al equilibrio siguiendo el proceso de relajación magnética. Ésta se divide en dos tipos, relajación longitudinal, también denominada relajación espín-red o relajación T_1 , que describe el proceso de recuperación de la magnetización a lo largo del eje z , determinado por la transferencia de energía al entorno; y por otro lado está la relajación transversal o relajación T_2 , también conocida como relajación espín-espín, que viene determinada, además de por la transferencia de energía, por la pérdida de coherencia de los espines al interactuar entre sí.

Ambos tiempos de relajación, T_1 y T_2 , son característicos de cada tejido o muestra, y la MRI saca partido de las diferencias en estos tiempos de relajación entre tejidos adyacentes para generar contraste. Este tipo de contraste corresponde al contraste intrínseco, ya que se

basa exclusivamente en las propiedades magnéticas del agua de los tejidos. Pero además, estas diferencias intrínsecas en los tiempos de relajación pueden aumentarse mediante el uso de agentes de contraste, generando así un contraste añadido, contraste extrínseco, que ayuda a mejorar el diagnóstico.¹⁹

Objetivos.

El objetivo que se planteó para la realización de este trabajo fin de máster fue el de obtener partículas bimetálicas que sean capaces de mostrar gran potencial magnético, con el fin de ser empleadas como agentes de contraste para MRI. Para alcanzar este objetivo se plantearon varios objetivos secundarios:

- Síntesis, funcionalización y caracterización de nanopartículas magnéticas con diferente composición elemental y estructural. Para facilitar su comparación, el rango de tamaño se estableció en 9-10 nanómetros.
- Evaluación del potencial de las nanopartículas como agente de contraste mediante la medida de las relajatividades a 1.5 T y 9.4 T.
- Estudios de citotoxicidad en cultivos de células C6 (glioma de rata).
- Estudios de farmacocinéticas y biodistribución de las nanopartículas *in vivo* en ratones mediante técnicas de MRI semicuantitativas y cuantitativas.

Materiales y metodología.

Los reactivos empleados durante el transcurso de la fase experimental fueron obtenidos de distintas casas comerciales (Sigma-Aldrich®, Acros Organics®, Fisher Scientific® y Alfa-Aesar®). Éstos se emplearon tal y como vienen de fábrica, sin realizarles ningún tratamiento específico.

Se emplearon como reactivos de síntesis: hierro (III) acetilacetato, cobalto (III) acetilacetato, manganeso (II) acetilacetato, cinc (II) acetilacetato, ácido oleico, oleilamina, poli-etilenglicol de 3kDa, ácido gálico, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), dicitclohexil carbodiimida (DCC), trietilamina y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro (MTT).

Los disolventes que se emplearon fueron agua ultrapura milliQ, dimetil-éter, 1,2 hexanodecandiol, acetona, etanol, tolueno, cloroformo, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM), tampón fosfato salino (PBS) y dimetil sulfóxido (DMSO).

El medio de cultivo empleado, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), se enriqueció con suero bovino fetal al 10% y se le adicionaron los antibióticos estreptomicina y penicilina en proporción 1:1 al 1%

La línea celular utilizada fue C6 (célula tumoral de glioma de rata) cedida gentilmente por la Dra. Pilar López Larrubia (IIBM, Madrid).

Síntesis y funcionalización de nanopartículas.

Durante la realización de este trabajo se sintetizaron 15 partículas distintas, de ellas se seleccionaron 5, por tener una distribución de tamaño similar, lo que permite comparar sus propiedades eliminando esta variable, siendo tres de ellas de conformación core-shell. El protocolo empleado para la síntesis de las partículas fue el descrito por Shouheng Sun, et al.²⁰

Se empleó la descomposición térmica para la síntesis de las nanopartículas. En este caso se usaron como precursores de la síntesis los compuestos acetilacetados de los metales que se querían en la estructura química en la partícula. Tras la síntesis se obtuvieron unas nanopartículas suspendidas en disolventes orgánicos, pero no en condiciones fisiológicas, condición indispensable para que se puedan emplear en estudios *in vivo*. Para subsanar este problema se les realizó a las partículas un proceso de intercambio de ligando, empleando el

ligando PEG-Gallol como medio de funcionalización. La adición de este ligando produjo una mejora en la solubilidad de las nanopartículas en disolventes acuosos.

Síntesis de nanopartículas aCZ.

Para la síntesis de la nanopartículas se prepararon inicialmente dos soluciones distintas. La primera contenía 0.8 mmol de $\text{Co}_{(\text{acetil acetinado})}$ (205 mg), 0.2 mmol de $\text{Zn}_{(\text{acetil acetinado})}$ (52.58 mg) en 20 ml de fenil éter, junto a 2.58 gramos (10 mmol) de 1,2 hexanodecandiol, 5 ml de ácido oleico y otros 5 ml de oleilamina. Todo ello se llevó a 140°C en una atmósfera inerte de N_2 .

Por otro lado se diluyeron 0.706 gramos de $\text{Fe}_{(\text{acetil acetinado})}$ en 10 ml de fenil éter.

Tras alcanzar los 140°C se vertió la segunda en forma de goteo y se llevó a 268°C en atmósfera de N_2 y aplicando un reflujo en la columna. Permaneció a esa temperatura durante 60 minutos y, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Tras la síntesis, fue necesario eliminar los reactivos sobrantes. Para este proceso, se adicionó etanol a la suspensión de nanopartículas para provocar su precipitación, a continuación, se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las partículas en tolueno y se volvió a llevar a centrifugación. El lavado con tolueno se realizó 3 veces.

Síntesis de nanopartículas aC

Para la síntesis de partículas de ferrita de cobalto se empleó el mismo procedimiento del caso anterior, únicamente modificando la composición de las disoluciones precursoras. La primera, contuvo 1 mmol de Co (acetil acetinado) (0.257 gramos), en 20 ml de fenil éter, junto a 2.58 gramos (10 mmol) de 1,2 hexanodecandiol, 5 ml de ácido oleico y otros 5 ml de oleilamina. La segunda solución fue igual a la que se empleó para hacer las partículas de ferrita de cobalto y cinc, una disolución que contuvo 2 mmol de Fe (acetilacetinado) en 10 ml de fenil éter.

Siguiendo el procedimiento descrito, se llevó la primera solución a 140°C y se añadió la segunda en forma de goteo para homogenizar la adición. Tras la adición, se llevó a 268°C en atmósfera inerte de nitrógeno y bajo una corriente de reflujo en la columna de destilación. Tras 60 minutos se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

El proceso de lavado y centrifugación realizado fue similar al usado para las nanopartículas anteriormente descritas.

Síntesis de nanopartículas cCZsM.

Esta síntesis se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en la elaboración de un “core” o núcleo, metálico de una ferrita de cobalto y cinc, similar a la partícula aCZ, y un “shell” o recubrimiento, conformado por ferrita de manganeso. Para la síntesis del “core” se volvieron a preparar dos disoluciones. La primera compuesta por 0.6 mmol de Co (acetil acetinado) (0.257 gramos), 0.4 mmol de Zn (acetilacetinado), en 20 ml de fenil éter, junto a 2.58 gramos (10 mmol) de 1,2 hexanododecandiol, 5 ml de ácido oleico y otros 5 ml de oleilamina. Para la segunda se volvió a usar el mismo tipo de disolución que para el caso anterior, es decir, se introdujeron en 10 ml de fenil éter y 2 milimoles de Fe acetil acetinado.

Al igual que en los casos anteriores se llevó a 140°C la primera disolución, en atmósfera de N₂ y se añadió la segunda mediante goteo. Posteriormente se llevó a 268°C y se dejó durante 30 minutos estable a esa temperatura. Tras esto último, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El proceso de lavado del “core” y centrifugación fue similar al usado para las nanopartículas anteriormente descritas. Tras el lavado se secó el disolvente con el rotavapor con el objetivo de obtener el compuesto sólido.

En la segunda etapa se preparó el “shell” de ferrita manganeso. En esta etapa se empleó el mismo procedimiento que para la obtención del “core”, con la única diferencia del empleo de las partículas obtenidas en lugar de uno de los precursores acetilacetinados.

Se prepararon dos disoluciones, la primera contuvo 50 mg de las nanopartículas sintetizadas en el paso anterior, junto con 372 mg de Mg_(acetil acetinado), junto con el resto de reactivos empleados en las síntesis anteriores. La segunda, correspondiente a la disolución de partículas de Fe_(acetil acetinado) en fenil éter, fue igual a que la se preparó en el apartado anterior.

De forma similar a lo descrito en los otros procedimientos de síntesis, se llevó la primera disolución a los 140°C y se adicionó por goteo la disolución de hierro. Posteriormente se llevó a 268°C en atmósfera inerte y se dejó estable durante 60 minutos. Por último, se dejó

enfriar a temperatura ambiente y, mediante centrifugación, se lavó con tolueno siguiendo un proceso similar al usado para las nanopartículas anteriormente descritas.

Síntesis de nanopartículas cCsZ.

La síntesis de las partículas de “*core*” de ferrita de cobalto con un “*shell*” de ferrita de cinc fue similar a las descritas en los apartados anteriores. En este caso se empleó como núcleo partículas que han seguido el mismo protocolo de síntesis que las aC, con la diferencia de que se mantuvieron a 268°C durante 30 minutos, en lugar de 60.

Para la síntesis de estas partículas se emplearon 50 mg de partículas precursoras y se introdujeron en la disolución de 20 ml de fenil éter, 5 ml de oleilamina, 5 ml de ácido oleico, junto con 10 mmoles de 1,2 hexanodecandiol y 1 mmol de Zn (acetil acetinado).

Esta disolución se llevó a 140°C en atmósfera de nitrógeno y se añadió por goteo una disolución compuesta por 2 mmol de Fe (acetil acetinado) en 10 ml de fenil éter. Al igual que en casos anteriores se llevó a 268°C durante 60 minutos y se dejó enfriar a posteriori a temperatura ambiente.

El proceso de lavado y centrifugación es similar al usado para las nanopartículas anteriormente descritas.

Síntesis de nanopartículas cMZsC.

Esta última síntesis presenta un protocolo similar a las cCZsM. En primer lugar, se sintetizó el “*core*” de ferrita de manganeso y cinc y, en una segunda etapa reaccionó con los compuestos acetilacetinados para formar el “*shell*” de ferrita de cobalto.

Para la primera síntesis se prepararon dos disoluciones, siendo la primera de 0.6 mmol de Mn (acetilacetinado), 0.4 mmol de Zn (acetilacetinado), manteniendo las concentraciones de los demás reactivos igual que en los casos anteriores y una segunda que volvió a estar compuesta por 2 mmol de Fe (acetilacetinado) en 10 ml de fenil éter.

Al igual que en las síntesis anteriores se llevó a 140°C en atmósfera inerte, se adicionó la segunda por goteo y se elevó la temperatura hasta los 268°C donde se dejó estable durante 60 minutos. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente se retiró el disolvente con centrifugación y se secó el resto de las partículas.

Durante la síntesis del “*shell*”, se siguió un planteamiento similar que para la síntesis de las partículas cCZsM, solo que se empleó cobalto en lugar de manganeso. Al igual que para el

resto de las síntesis, tras la síntesis de las partículas se realizó una serie de lavados con tolueno.

Síntesis del ligando PEG-Gallol de 3 KDa.

La síntesis del ligando siguió el protocolo propuesto por Pernía-Leal, et al.²¹ En un matraz de tres bocas se añadieron, 8,824 g (2,94 mmol) de polietilen glicol (PEG) de 3kDa, 0,5 g de ácido gálico (2,94 mmol) y 71,836 mg (0,588 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como precursores, se disolvieron en 200 ml de tetrahidrofurano anhidro (THF) en una atmósfera de N₂. En un baño de hielo se añadió, gota a gota y en agitación constante, para mantener la homogeneidad del medio, una segunda solución compuesta por 3,03 g (14,7 mmol) de N,N'-dicilohexilcarbodiimida (DCC) disueltos en 50 ml de THF. A continuación, se colocó un globo de nitrógeno para mantener la atmosfera inerte y se dejó en el baño toda la noche.

Como subproducto de reacción se va a producir urea que deberá ser eliminada mediante una filtración de la solución producto. Para finalizar, mediante el uso del rotavapor se eliminó el tetrahidrofurano.

Intercambio de ligando.

La reacción del intercambio de ligando se realizó en tres pasos. En primer lugar, se introdujeron en un embudo de decantación 5 ml de tolueno, 1 ml de la solución de nanopartículas, 0,5 ml del ligando PEG-Gallol en cloroformo al 0.1 M y 100 µl de trietilamina. Se agitó con el fin de homogeneizar la suspensión. Se adicionó H₂O y acetona en proporciones 1:2. El objetivo de dicha adición consistió en cambiar a fase acuosa las nanopartículas mediante la ayuda de la acetona, pues va a permitir la precipitación de las nanopartículas. En el embudo de decantación se observó la formación de dos fases, una orgánica formada por tolueno y ligando sin reaccionar y, una acuosa al fondo del embudo de decantación que contendrá las partículas con el ligando PEG-Gallol. El proceso de adición de agua y acetona se repitió hasta que se pudieron distinguir las dos fases de forma correcta y se pudo observar que en la fase superior, la que contiene el tolueno, quedó lo más transparente posible, indicando que apenas contenía nanopartículas. A continuación, se recogió la fase acuosa y se eliminó gran parte del agua, la acetona y las trazas de tolueno

que pudiera contener, mediante el rotavapor. Debe evitarse que se evapore toda el agua, pues podría producirse aglomeración de partículas.

Para finalizar, se realizó la purificación de las partículas mediante centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos en filtros PALL® de tamaño de poro de 100 kDa. El objetivo de esta etapa fue eliminar el exceso de ligando que no ha reaccionado, y que podría ser tóxico, mediante la adición de agua para lavar dicho exceso. Este proceso de filtrado, por tanto, se repitió hasta que todo el filtrado quedó transparente.

Para finalizar, se resuspendieron las partículas que quedaron en el filtro en agua.

Caracterización de nanopartículas.

Tras la síntesis y la funcionalización de las partículas se realizó un proceso de caracterización físico-química de las mismas para seleccionar la nanopartícula óptimas para estudios *in vivo*.

Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras se llevaron a la unidad de microscopía de Bionand, donde se obtuvieron imágenes mediante el microscopio Tecnai G² 20 TWIN (FEI ®) operando a un voltaje de aceleración de 100 kV. La preparación de las muestras se realizó añadiendo una gota de la disolución de la nanopartícula sintetizada sobre una rejilla de cobre revestida de carbono y se dejó a evaporar el disolvente, agua, durante la noche.

Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering: DLS)

Mediante el uso del Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®), se midieron los valores del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas y su potencial-Z. El objetivo de esta prueba es conocer las condiciones hidrodinámicas de las partículas cuando se vayan a introducir en un ser vivo.

Las medidas del tamaño hidrodinámico se realizaron mediante el uso de cubetas de plástico ZEN 0118 y las correspondientes medidas de potencial-Z se realizaron en cubetas DTS1070 de plástico con electrodos acoplados.

En ambas mediciones las partículas fueron resuspendidas en PBS con el objetivo de conocer las condiciones de las partículas en medios aptos para el estudio *in vitro*.

Plasma acoplado inductivamente (Inductively Coupled Plasma: ICP).

La concentración de elementos metálicos se analizó por espectroscopía de masas de alta resolución de plasma acoplado inductivamente (Inductively Coupled Plasma High Resolution Mass Spectroscopy: ICP-HRMS) mediante Element XR (Thermo Fisher®), a través de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR).

Las medidas de espectroscopía de infrarrojos se llevaron a cabo en el rango de la radiación infrarroja cercana-media, concretamente desde 700 a 3500 nm de longitud de onda, mediante FTIR-4100 (Jasco®) en las instalaciones de Bionand. El objetivo era conocer si el intercambio de ligando ha sido satisfactorio, comparando los espectros de las partículas tras el intercambio de ligando, con el espectro del ligando sintetizado.

Para el análisis de infrarrojos se requirió el secado de la muestra.

Relajatividad *in vitro*.

La relajatividad transversal *in vitro* (r_2). se calculó a dos campos magnéticos diferentes, 1,5 T (Bruker Minispec) y 9,4 T (Bruker Biospec), utilizando diferentes concentraciones de nanopartículas, entre 1 y 0.1 mM, en condiciones fisiológicas, a 310 K. El T_2 se determinó usando la secuencia Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). El r_2 en campo alto (9,4 T) se midió en un sistema Bruker Biospec MRI equipado con gradientes de campo de 400 mT m⁻¹ y un resonador de detección en cuadratura de 40 mm de diámetro a 298 K. Los valores T_2

se determinaron utilizando una secuencia CPMG de 64 ecos (valores TE de 7,5 ms a 640 ms). Se dibujaron regiones de interés (ROI) sobre la primera imagen de la secuencia de imágenes, se extrajeron los valores medios de intensidad dentro de dichos ROIs y se ajustaron a las siguientes ecuaciones:

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-TR/T_1})$$

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-TE/T_2}$$

Donde M_z y M_{xy} son las intensidades de la señal a tiempo TR o TE, y M_0 es la intensidad de la señal en el equilibrio.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

Se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en líneas celulares C6, de glioma de rata, mediante los siguientes ensayos:

Ensayo de MTT

El ensayo de citotoxicidad de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro (MTT) permite medir la actividad metabólica celular mediante un método colorimétrico basado en la capacidad de las células vivas de reducir el reactivo MTT a cristales insolubles de formazan, que presentan un color violeta.

La línea celular C6 fue sembrada en una placa de 96 pocillos con una densidad de 10^4 células por pocillo en 200 μ l de medio de cultivo por pocillo, y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en la atmósfera. Transcurridas 24 horas se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo con concentraciones crecientes de nanopartícula (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml). Se incubaron las células 24 horas en condiciones similares a las descritas anteriormente, y pasado este tiempo, se añadió el MTT a una concentración de 0,5 mg/ml en una suspensión constituida por medio fresco de cultivo (95%) y PBS (5%). Se incubó a las mismas condiciones durante 2 horas y luego se eliminó el medio. Los cristales violetas de formazan fueron disueltos con 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia fue medida a 550 nm a través del lector de placa

Dynatech MR 7000 de la marca Biochrom®. Como control negativo se usaron células sin ningún tipo de tratamiento, y como control positivo se usó 20 µl de Tritón X-100 al 10%.

Ensayos *in vivo* mediante MRI.

Para los ensayos *in vivo* de las nanopartículas se utilizaron ratones macho de la cepa balb/c. Todos los experimentos de MRI se llevaron a cabo en un equipo Bruker Biospec 94/20USR, equipado con gradientes de 400 mT/m y un resonador de detección en cuadratura diseñado para imagen de cuerpo de ratón. Este estudio fue realizado bajo los protocolos éticos de experimentación animal del gobierno de Andalucía, de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 53/2013, de 8 de febrero de 2013. El objetivo del ensayo fue observar la farmacocinética de las partículas a tiempo corto y largo. Para ello se tomaron imágenes a las 0, 1, 24 horas y a una semana después de la inyección de las partículas cMZsC.

Las partículas fueron inyectadas intravenosamente a través de la vena de la cola del ratón, que fue canulada antes de posicionar al animal en el equipo de MRI. El animal anestesiado se colocó al en la cama específica para ratones del equipo de MRI. La respiración y la temperatura del animal se monitorizaron a través del equipo Small Animal Monitoring and Gating Systems, acoplado al software PC-SAM 32 v8.02. Durante todo el experimento la temperatura se mantuvo entre 36 y 37.5°C.

Una vez realizada la calibración del equipo de MRI, se obtuvieron imágenes coronales ponderadas en T_2 y mapas de T_2 , que se utilizaron como referencia a tiempo 0. Posteriormente se inició el protocolo de obtención de imágenes para la farmacocinética a tiempo corto. En dicho protocolo se tomó una serie de imágenes, una cada 25 segundos, que permitió medir las cinéticas de entrada de las nanopartículas a diversos órganos, fundamentalmente hígado y riñón. La concentración de partículas inyectadas fue de 150 µg en 100 µl de PSB, aproximadamente 5 mg por kilogramo de animal.

Para finalizar se realizó un mapa de relajatividad T_2 y una segunda imagen coronal del abdomen, tras una hora de la inyección.

Las cinéticas a largo plazo se siguieron mediante imagen cuantitativa, es decir, mediante la determinación de los valores de T_2 de los distintos tejidos con mapas de T_2 *in vivo*.

Para la obtención de imágenes T_2 de alta resolución se usó un turbo-RARE con control de movimiento respiratorio (TE = 16 ms, TR= 1000ms, 4 medias, 156 µm de resolución en

plano y 1 nm de grosor de corte). Las medidas cuantitativas de T_2 fueron realizadas usando una secuencia eco de espín multi-eco (TEs desde 7 ms a 448 ms, TR = 3500 ms, FOV = 4cm, tamaño de matriz = 192 x 192, grosor de corte = 1 nm). Las cinéticas a tiempos cortos se siguieron usando una secuencia dinámica turbo-RARE con los mismos parámetros indicados antes, pero con sólo 1 “scan” por imagen y menor resolución (128x128) para mejorar la resolución temporal (1 imagen cada 30 segundos). El esquema de adquisición fue el siguiente: imagen ponderada en T_2 , T_2 cuantitativa, inyección intravenosa de las nanopartículas, cinética de 1 hora, T_2 cuantitativa y ponderada en T_2 . Al cabo de 1 hora, las cinéticas fueron analizadas de manera semi-cuantitativa usando la siguiente expresión:

$$RE = - \left| \frac{I_t - I_0}{I_0} \times 100 \right|$$

donde RE es el módulo del aumento relativo de señal, I_t es la intensidad de señal a tiempo t tras la inyección de las nanopartículas, e I_0 es la intensidad de la señal antes de la inyección.

Las cinéticas a largo plazo se midieron utilizando los mapas de T_2 cuantitativos a diferentes tiempos. Todos los cálculos de cinéticas, a tiempo corto y largo, se hicieron a partir de los valores promedio dentro de regiones de interés (ROIs) trazadas sobre hígado, riñón, bazo y músculo.

Histología hígado, riñón y bazo.

La tinción de los órganos se llevó a cabo por técnicas estandarizadas y ampliamente usadas en investigación y clínica.

En primer lugar, el animal fue anestesiado con Isoflurano 5% inhalado. Una vez dormido el animal, se le extrajo toda la sangre para determinación de la concentración de nanopartículas en plasma sanguíneo por relajatividad magnética. Después de sacrificar al animal, el hígado, bazo y los riñones fueron extraídos y fijados en paraformaldehído 4% durante 48 horas. Posteriormente, se incluyó el tejido fijado en parafina, se cortó con un grosor de 8 μ m de grosor, y se realizó la tinción de cortes adyacentes con azul de Prusia y hematoxilina-eosina.

Resultados y discusión.

Síntesis de partículas bimetalicas.

Como se mencionó en el apartado de metodología, se realizó la síntesis de 15 nanopartículas por descomposición térmica. Todas las partículas sintetizadas fueron bimetalicas y su selección para los experimentos posteriores se realizó en base a criterios de tamaño, evitando esta variable en los resultados obtenidos. Se seleccionaron aquellas que tuviesen un tamaño medio en torno a 9 nm siendo el objetivo comparar distintos materiales y conformaciones de partículas. En la Tabla 1 se han recogido las características de las 5 partículas seleccionadas. El tamaño que se recoge en la tabla corresponde al obtenido por microscopía electrónica de transmisión.

Tabla 1: Listado de nanopartículas sintetizadas.

	Fórmula	Tamaño (nm)	Conformación
aCZ	$\text{Co}_{0.8}\text{Zn}_{0.2}\text{Fe}_2\text{O}_4$	9.1 ± 0.6	Alloy
aC	CoFe_2O_4	9.2 ± 0.9	Alloy
cCZsM	$\text{Co}_{0.6}\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{MnFe}_2\text{O}_4$	8.5 ± 0.7	Core-Shell
cCsZ	$\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{ZnFe}_2\text{O}_4$	10.9 ± 1.1	Core-Shell
cMZsC	$\text{Mn}_{0.6}\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{CoFe}_2\text{O}_4$	9.1 ± 0.6	Core-Shell

Durante la realización del trabajo se analizaron las propiedades y aplicabilidad de tres nanopartículas tipo core-shell y dos tipo “alloy”. Aproximadamente todas las partículas rondaron los 9 nm, exceptuando cCsZ que presenta casi 2 nm superior a la media, pero se aceptó por tener conformación core-shell.

El objetivo de dicha selección es la comparación de las distintas nanopartículas que presentan distinta composición y/o conformación en función del mismo tamaño de partícula, una de las propiedades que más influyen en la variación de las características y comportamiento *in vivo* de las nanopartículas.

Caracterización.

FTIR

Se obtuvieron espectros infrarrojos para cada una de las partículas y del ligando sintetizado con el fin de conocer si el ligando se había fijado de forma correcta en las partículas. En la figura 4 se recogen los espectros de las partículas tras el intercambio de ligando y la del ligando PEG-Gallol.

Observando el espectro del ligando se detectan varias regiones de interés. La primera de ellas corresponde al pico localizado a 1100 cm^{-1} , correspondiente al enlace C-O tipo éter del polietilenglicol. En todos los espectros se observa que esta señal aparece en mayor o menor medida, representando la presencia del PEG en las nanopartículas. Por otro lado, se reconoce una región entre 3000 y 2700 cm^{-1} que corresponden al enlace C-H del grupo funcional alquilo. La última región que se puede analizar son la serie de señales que se recogen entre la región de los 1400 y los 1200 cm^{-1} , que puede implicar la presencia del anillo aromático del ácido gálico.

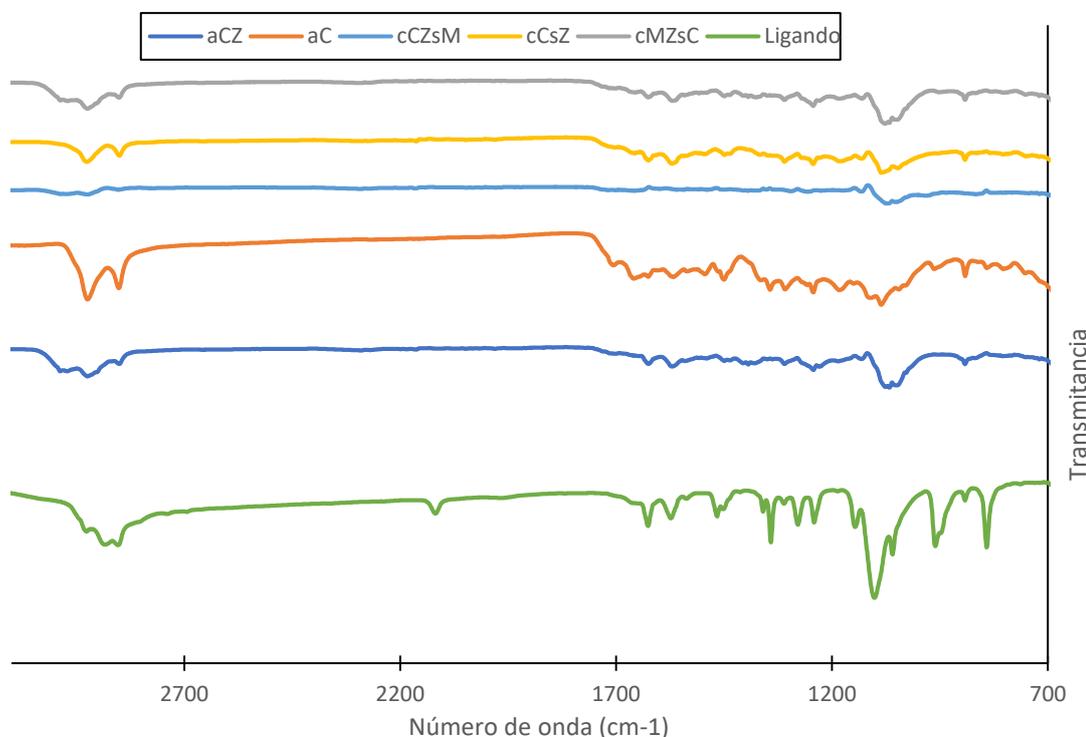
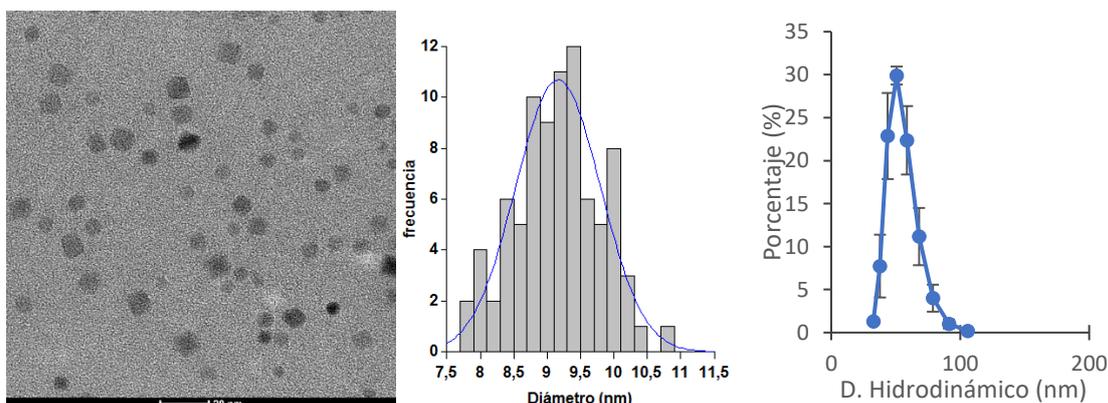


Figura 4: Composición de los valores obtenidos del FTIR de las partículas funcionalizadas con el ligando, para su comparación.

El objetivo de este análisis fue conocer si el ligando se ha fijado correctamente o no a la superficie de las nanopartículas. La presencia de varias regiones que presentan similitud a los enlaces tipo éter, los correspondientes del ácido gálico y a los de las cadenas radicales del polietilenglicol, dan una idea cualitativa de que el ligando se ha fijado en todos los tipos de partículas de una forma eficiente. Si bien se aprecia una diferencia en la intensidad de la señal entre las distintas partículas, la técnica FTIR no es una técnica cuantitativa, además de que por motivos logísticos, la cantidad de nanopartícula medida en cada caso no pudo ser la misma.

Tamaño de las nanopartículas.

Se analizó el tamaño de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión y el tamaño hidrodinámico mediante DLS. El tamaño del núcleo metálico es importante para las propiedades magnéticas, mientras que el tamaño hidrodinámico es importante para su uso en aplicaciones biológicas. Como se puede apreciar en las imágenes de microscopía, las partículas se encuentran bastante dispersas, sin agregados, gracias a la gran estabilidad que presentan. Se observa una homogeneidad elevada tanto en la forma como en el tamaño de las mismas. Esto se hace evidente en la gráfica de distribución de tamaños, dando una desviación típica de tamaños en torno al 10% del valor medio, y a la forma esferoide de todas ellas.



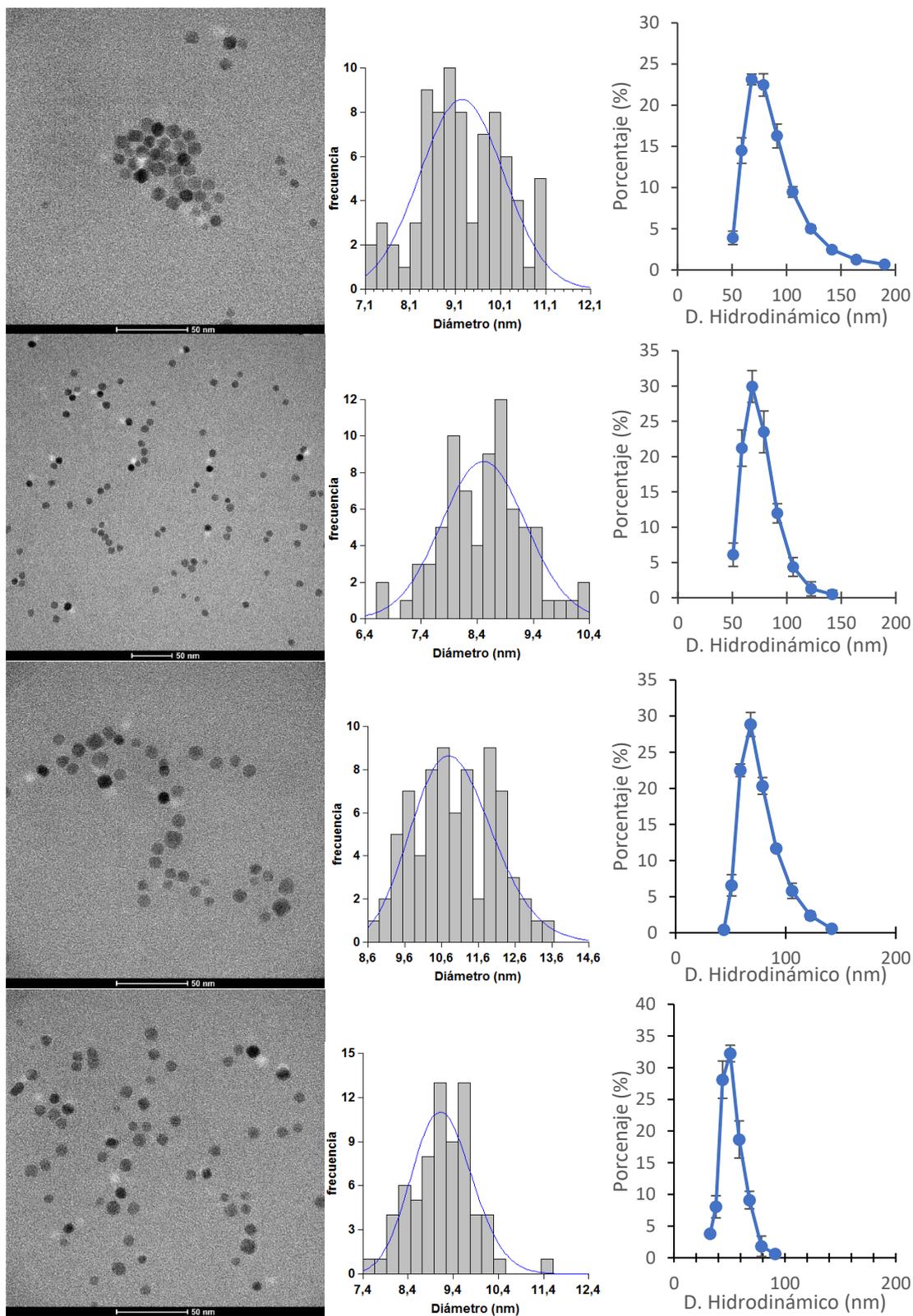


Figura 5: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (izquierda), distribución de tamaño de partículas (centro), distribución de tamaño hidrodinámico (derecha), de las partículas aCZ, aC, cCZsM, cCsZ y cMZsC

En la figura 6 se recoge como ha variado el diámetro hidrodinámico a lo largo de una semana, con el fin de conocer si las partículas tienen a aglomerarse con el paso del tiempo.

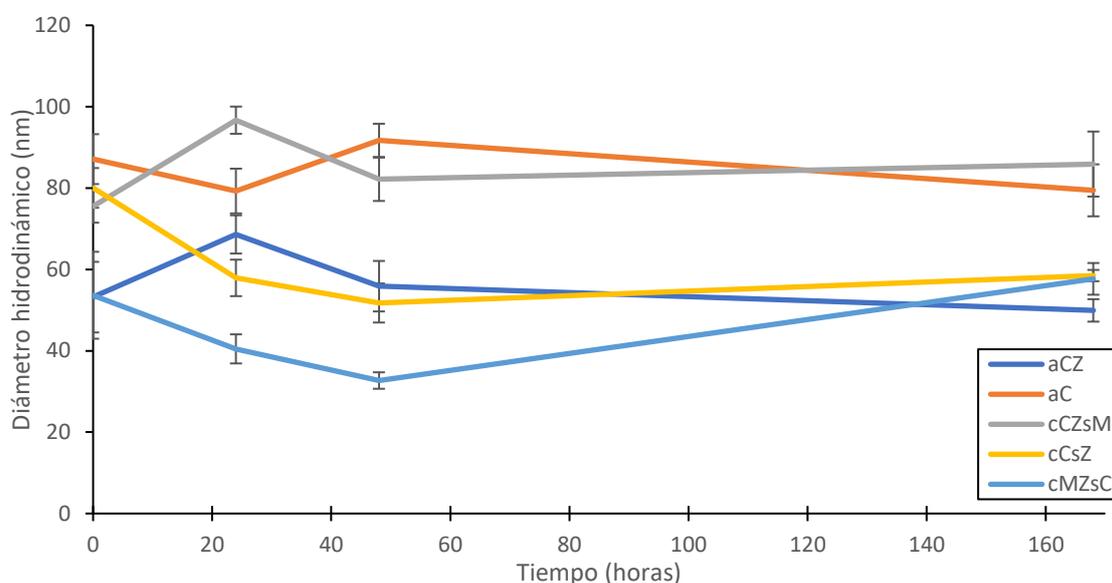


Figura 6: Variación del valor del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas a lo largo del tiempo.

Como se puede observar, las medidas a la semana son aproximadamente similares a las que se obtuvieron inicialmente, con ligeras fluctuaciones durante las medidas intermedias a las 24 y 48 horas. El motivo de estas fluctuaciones es el error intrínseco en la medida del equipamiento.

De acuerdo con los resultados mostrados, las partículas muestran un tamaño de partícula superior a 50 nm. Este tamaño es en principio adecuado para aplicaciones *in vivo* de este estudio, teniendo en cuenta, que como se dice en la introducción, las nanopartículas por debajo de 10 nm son rápidamente excretadas por la filtración glomerular de los riñones y que las partículas por encima de 100 nm son rápidamente retiradas del torrente sanguíneo por el SFM. De hecho hay trabajos que muestran que que las nanopartículas con tamaños superiores a 50 nm son retiradas rápidamente del torrente sanguíneo por el SFM, de tal forma que el tamaño idóneo para aplicaciones biomédicas en experimentos *in vivo* se situaría entre 15 y 50 nm.²²

Potencial-Z

El objetivo de medir el potencial Z es conocer la carga neta de las nanopartículas tras realizar el intercambio de ligando. En la tabla (3) se recogen los valores de la carga neta de

las distintas muestras en PBS y se observa que, exceptuando las nanopartículas cCsZ, todas presentan unos valores de potencial ligeramente negativos en condiciones fisiológicas. A pesar de estos valores próximos a 0, las nanopartículas no tienen tendencia a agregar debido a impedimento estérico por el ligando que se encuentra anclado fuertemente a la superficie de la nanopartícula.

Tabla 3: Valores de potencial Z.

Nanopartícula	Potencial Z
aCZ	-0.08 ± 0.28
aC	-0.10 ± 0.09
cCZsM	-0.15 ± 0.12
cCsZ	0.15 ± 0.17
cMZsC	-1.16 ± 1.90

Relajatividad

El estudio de la relajatividad permite conocer las propiedades magnéticas de las nanopartículas, así como de su capacidad para poder ser empleados como agentes de diagnóstico. Se analizaron los valores de la relajatividad longitudinal, r_1 , y transversal, r_2 , a 1.5 y a 9.4 T con el fin de valorar el efecto de las composición de las diferentes nanopartículas y su comportamiento a campos clínico y preclínico.

Los resultados obtenidos a partir de estas medidas de relajatividad sugieren que hay varias partículas con potencial para ser empleados como agentes de contraste, siendo las aC y las cMZsC, las que presentan mayores valores de r_2 , con valores por encima de $200 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ a 1.5 T y de $300 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ a alto campo. Los valores de r_1 fueron muy bajos en todos los casos, es decir, estas nanopartículas son todas potenciales agentes de contraste para T_2 .

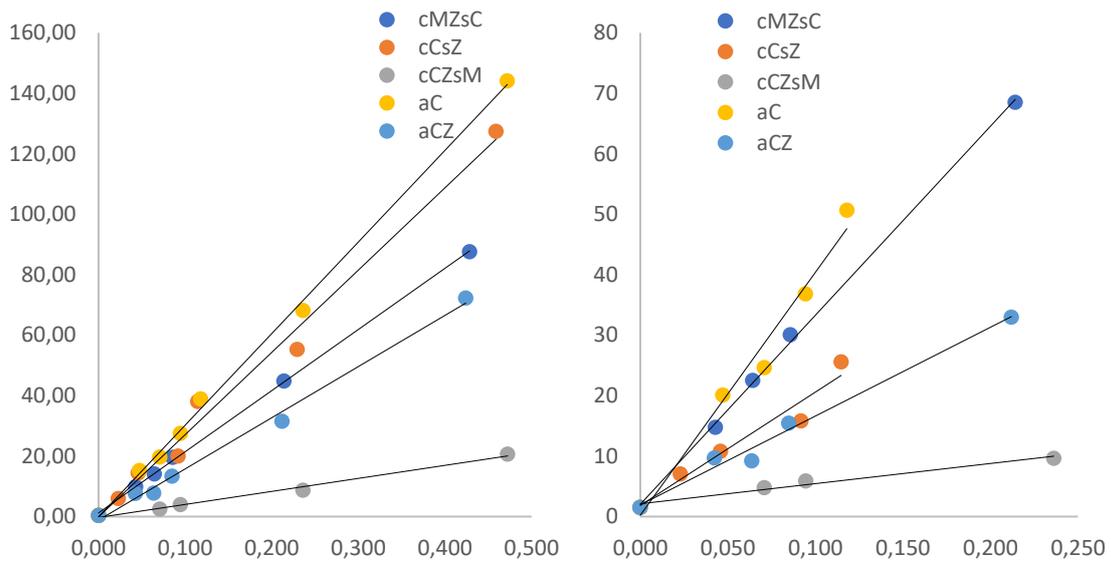


Figura 7: Valores de relajatividad a a) campo bajo (1.5 T) y b) campo alto (9.4 T)

Tabla 4: Valores de relajatividad a campo bajo y alto.

Nanopartícula	Relajatividad (r_2) a 1.5T	Relajatividad (r_2) a 9.4 T
aCZ	169.3	156.77
aC	289.69	401.61
cCZsM	42.76	36.29
cCsZ	244.07	199.28
cMZsC	202.28	303.92

Las imágenes ponderadas en T2 de la figura 8 muestran la diferencia de contraste obtenida para la misma concentración de las distintas nanopartículas. En estas imágenes se puede apreciar que las partículas aC, cCsZ y cMZsC son las que ofrecen mejor contraste, lo que está de acuerdo con las relajatividades medidas.

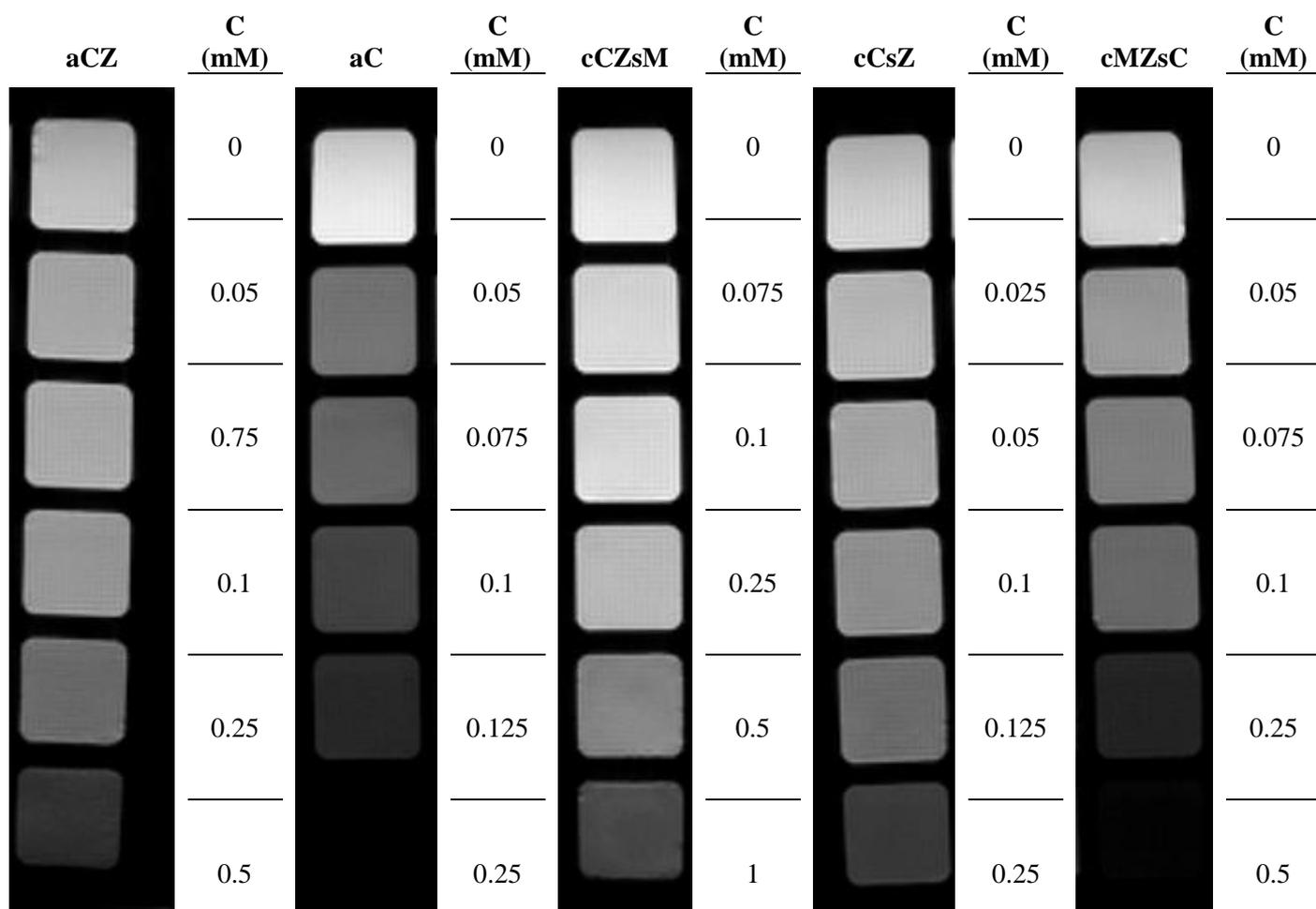


Figura 8: Imágenes phantom de las nanopartículas aCZ, aC, cCZsM, cCsZ y cMZsC.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

En la figura 9 se encuentran representados los valores viabilidad celular a distintas concentraciones de nanopartículas en cultivos de células C6.

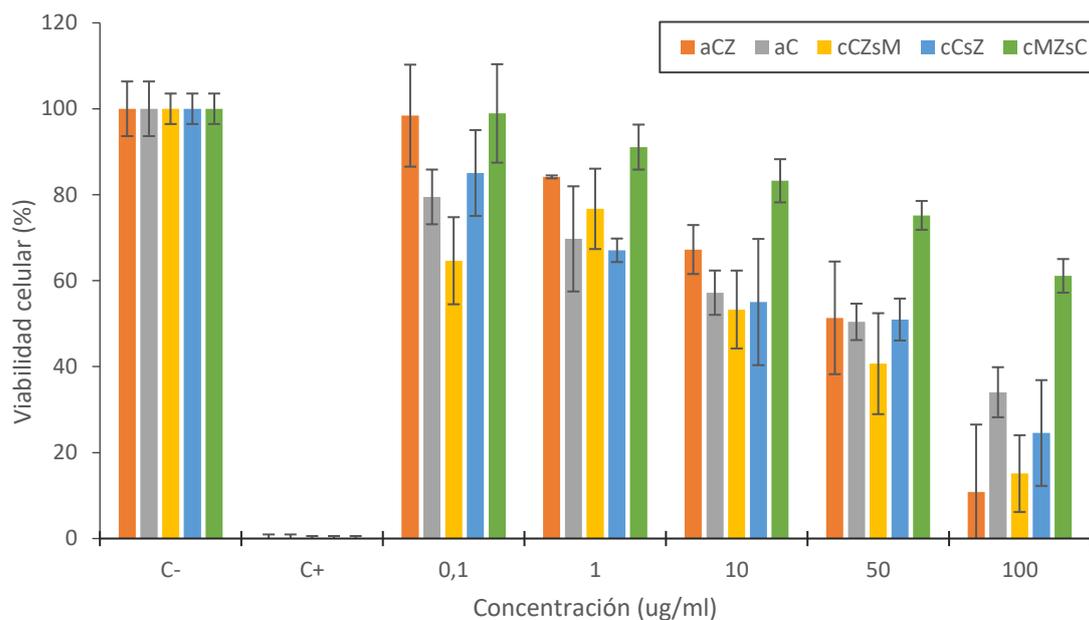


Figura 9: Valores de viabilidad celular de las células de la línea celular C6 de glioblastoma de rata ante distintas concentraciones de las nanopartículas de estudio.

Como puede observarse, hay partículas que muestran una citotoxicidad elevada, incluso en concentraciones muy bajas (0.1 y 1 µg/ml). Este resultado podría explicarse por una liberación intracelular de iones que resultan tóxicos. A 1 µg/ml se aprecia que únicamente dos nanopartículas, las aCZ y las cMZsC, no presentan una diferencia significativa de viabilidad debido a la concentración de las nanopartículas. Al aumentar la concentración de las mismas, únicamente las cMZsC se mantienen por encima del umbral del 80% de viabilidad celular hasta llegar a los 50 µg/ml donde el efecto se vuelve significativo.

Por tanto, para los estudios *in vivo* se optó por las nanopartículas cMZsC debido a sus propiedades magnéticas en T₂ y a que a concentraciones bajas, que serán las utilizadas *in vivo*, no presentan citotoxicidad.

Ensayos *in vivo*.

Como se mencionó en el apartado anterior, las partículas seleccionadas para los estudios *in vivo* fueron las cMZsC, debido a que son las que presentan mejor estabilidad en medios biológicos, mayor relajatividad y menor citotoxicidad.

Como se puede observar en la Figura 10, una parte de las nanopartículas es rápidamente captadas por el hígado (Fig. 10b), alcanzando una variación relativa de señal del 30%, que se mantiene hasta el final del estudio dinámico de una hora. En los riñones también se observa una variación importante de señal, en torno al 20%, que es máxima a los 5 minutos

y después va disminuyendo, a medida que las nanopartículas van siendo eliminadas del torrente sanguíneo por el hígado. Puesto que las nanopartículas tienen tamaños por encima del límite de exclusión glomerular, el oscurecimiento observado en los riñones se debe al paso de las nanopartículas por los capilares sanguíneos de los mismos, para volver después al torrente sanguíneo al no poder ser excretadas, es decir, la variación de señal observada refleja la presencia de las nanopartículas en el torrente sanguíneo, según está descrito en varios estudios.^{23,24} En el caso del músculo, como se esperaba, no se observa variación significativa de señal, ya que las nanopartículas no se extravasan y por tanto no se acumulan en este tejido.

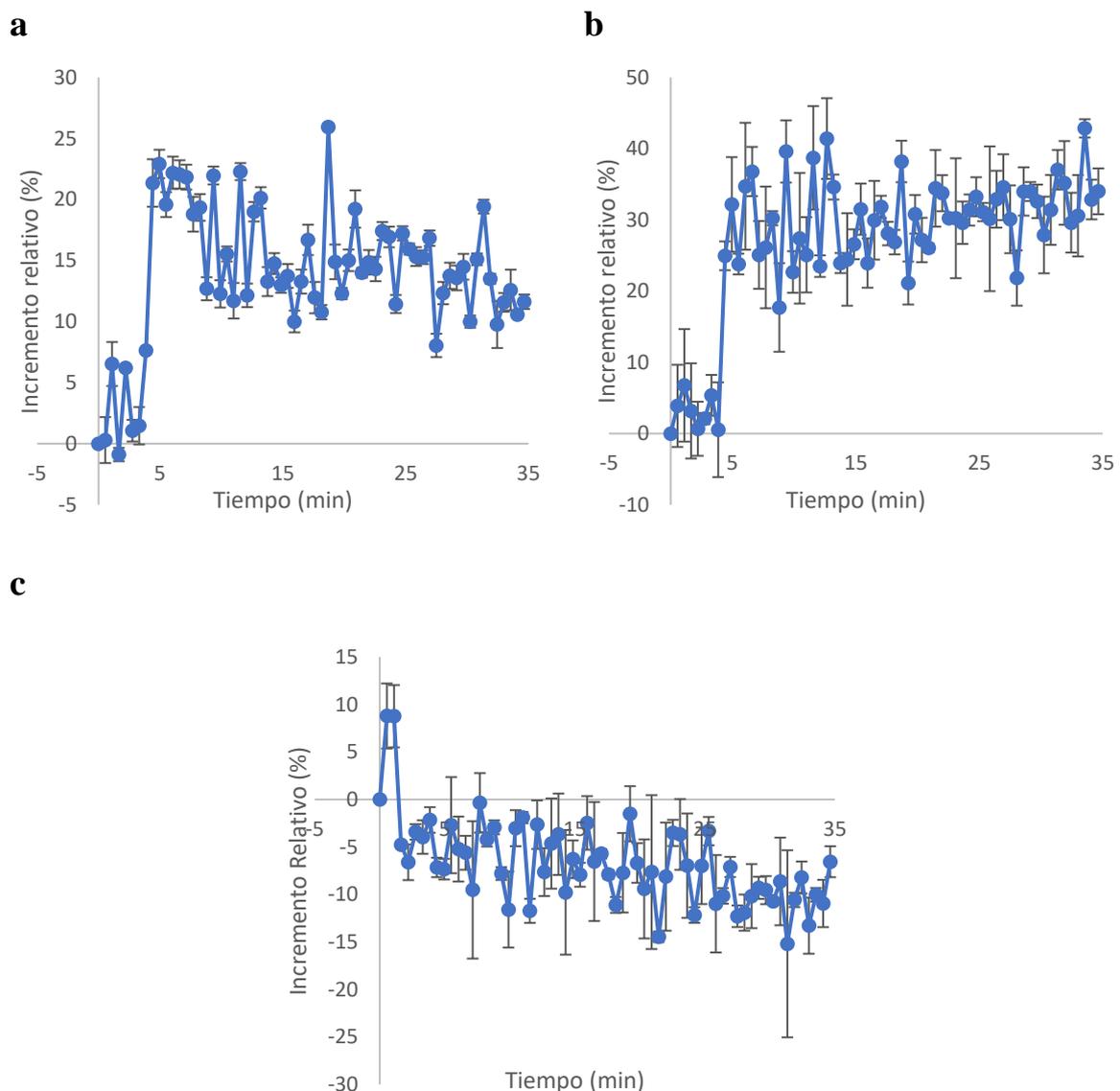


Figura 10: Farmacocinética a tiempo corto de las nanopartículas cMZsC en: a) Riñones, b) Hígado, c) Control (Músculo)

Tras analizar la farmacocinética de tiempo corto, procedimos a realizar experimentos de farmacocinética de tiempo largo. De esta forma, analizando los mapas T_2 (Tabla 5), y como puede verse también reflejado de manera cualitativa en las imágenes ponderadas de T_2 de la Figura 11, se observa una disminución máxima de T_2 1 hora después de la administración de las nanopartículas, tanto en hígado como en riñón. A las 24 horas se observa una recuperación parcial en riñón e hígado, y al cabo de una semana es prácticamente total en los riñones, indicando que no hay niveles significativos de nanopartículas circulantes, mientras que aún queda algo presente en el hígado, que las ha ido retirando del torrente sanguíneo y donde permanecen hasta ser metabolizadas o excretadas por vía fecal. En el caso del músculo, y de acuerdo con los datos obtenidos en la farmacocinética de tiempo corto, no se observa ningún cambio en el contraste.

Tabla 5: Variación de los tiempos de relajación, T_2 , a 0, 1, 24 horas y una semana de la inyección de las nanopartículas.

Tiempo (h)	ΔT_2 riñón (ms)	ΔT_2 hígado (ms)	ΔT_2 músculo (ms)
0	0	0	0
1	-8.2 ± 1.3	-9.8 ± 1.1	-0.2 ± 0.6
24	-3.0 ± 1.1	-2.4 ± 1.0	-0.9 ± 0.4
168	-1.6 ± 0.4	-4.4 ± 0.4	-0.8 ± 0.7

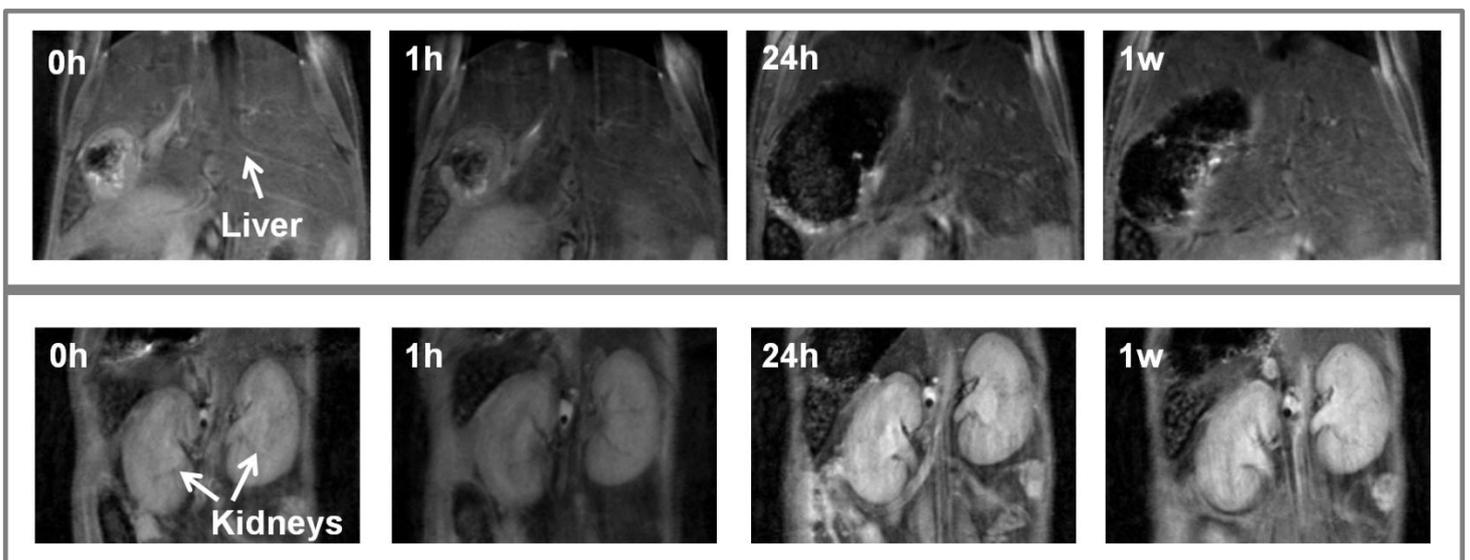


Figura 11: Imágenes de resonancia magnética de imagen (MRI) de hígado (arriba) y riñón (abajo) a tiempo 0 y tras 1 hora, 24 horas y 1 semana de la inyección de las partículas.

Posibles efectos secundarios: Control de peso e histología de los órganos principales.

Una evaluación de los efectos secundarios producidos por la administración de nanopartículas puede realizarse mediante el seguimiento del incremento del peso corporal del ratón. Un descenso significativo en el peso del ratón nos indicaría que éste posee algún tipo de malestar o un daño interno, llegando incluso a usarse como criterio de eutanasia si el animal pierde más de un 20% del peso corporal durante un periodo prolongado.

De acuerdo con la figura 12 donde se compara el incremento relativo del peso de los ratones empleados en los experimentos, con el peso de los ratones control se observan una serie de diferencias. Hay que tener en cuenta que los animales sujetos a experimentación suelen tener una pérdida de peso, especialmente el primer día debido al estrés que reciben (anestesia, manipulación...), y a partir de este punto lo normal es que lo recuperen si no ha habido efectos tóxicos y al cabo de una semana o menos alcancen el peso del grupo control. Los ratones del estudio perdieron en torno a un 4% en las primeras 24 horas, continuando con esta pérdida de peso hasta un 8% tras 48 horas de la administración de las nanopartículas. Como puede observarse, la ganancia de peso es muy lenta y paulatina, no recuperando su peso normal incluso a la semana.

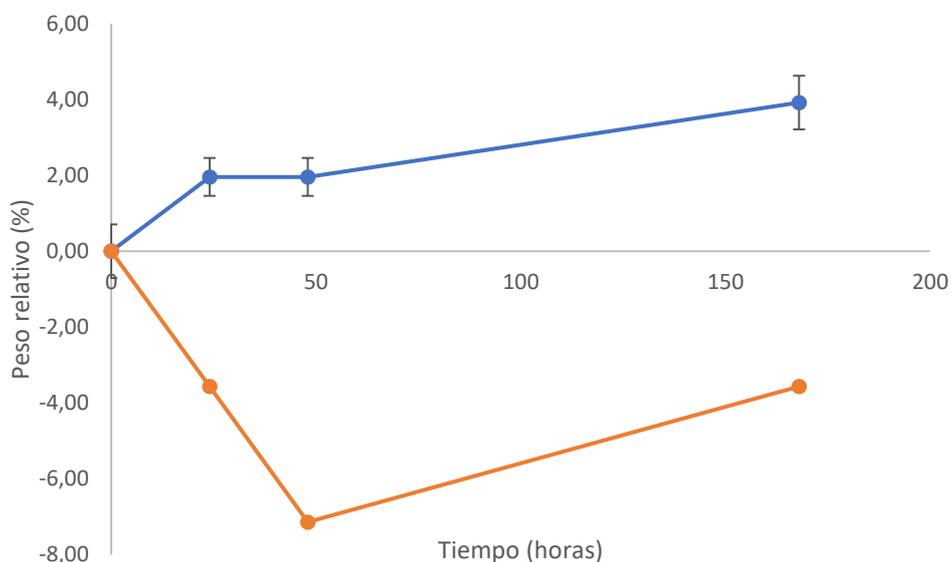


Figura 12: Variación relativa del peso del ratón control (azul) y sujeto (naranja)

Esto puede indicar que existe algún efecto tóxico derivado de la administración de las nanopartículas. Para verificar esta hipótesis y esclarecer esta pérdida de peso, se realizó un análisis histológico del riñón y del hígado. Para ello se utilizaron dos tinciones,

hematoxilina-eosina y azul de Prusia. La primera nos sirve para evaluar posibles daños celulares y la segunda para determinar la presencia de nanopartículas en estos tejidos.

En las imágenes de riñón no se aprecian evidencias de daño celular relacionado con la inyección de las nanopartículas, sin embargo sí se aprecia un cierto deterioro de las células hepáticas. En la imagen tomada de la tinción hematoxilina-eosina se observan daños similares a los que se pueden observar en un hígado con hepatitis, con la aparición de las vacuolas citosólicas y pérdida de densidad celular.

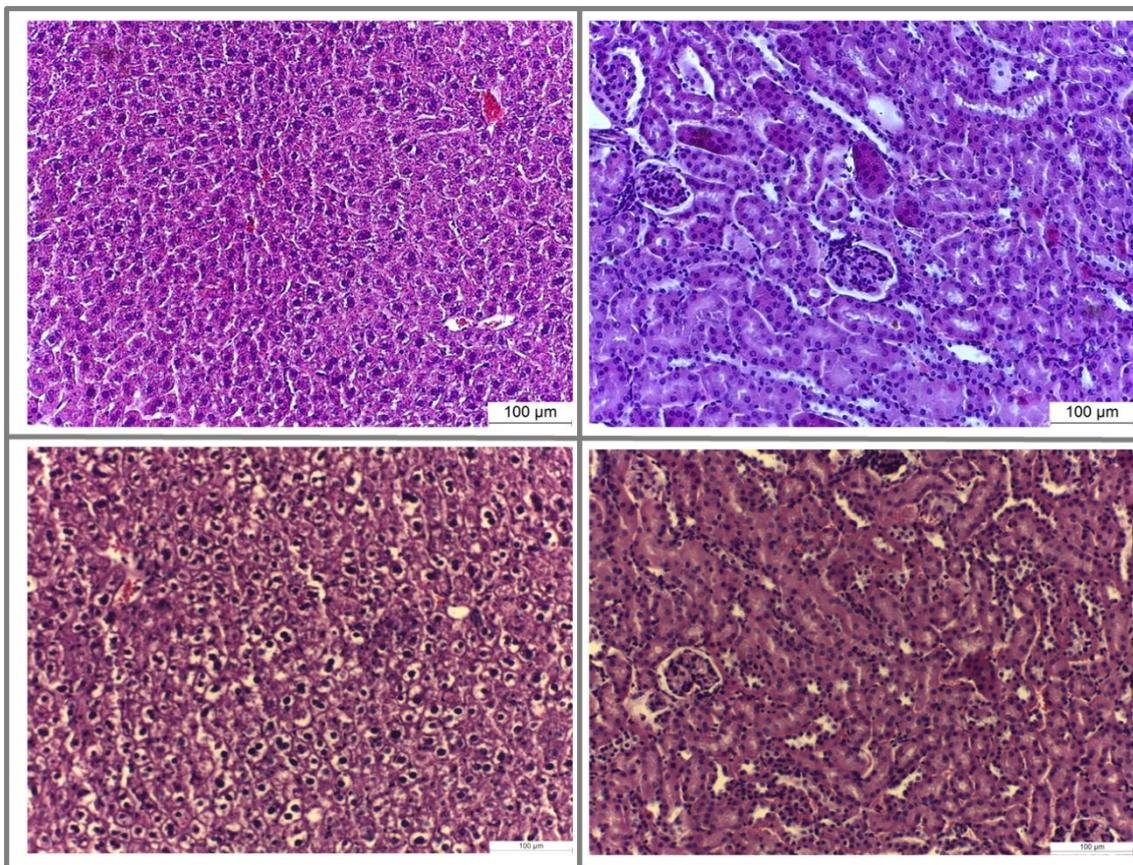


Figura 13: Imágenes de histología de hígado (izquierda) y riñón (derecha) sobre tinción hematoxilina-eosina. Las imágenes superiores corresponden a órganos control, mientras que las imágenes inferiores corresponden al ratón del estudio.

Cabe destacar además, que en la tinción de “azul de Prusia”, figura 14, no se han observado acumulación de nanopartículas tras 1 semana, lo que nos lleva a hipotetizar que han sido metabolizadas y que como resultado de ello se han liberado elementos tóxicos que han afectado a los hepatocitos circundantes. El hierro probablemente se ha incorporado al metabolismo normal del organismo (por ello no se observa en las imágenes de azul de

Prusia) sin producir efectos nocivos, pero el resto de los metales podrían haber causado los daños tisulares observados.

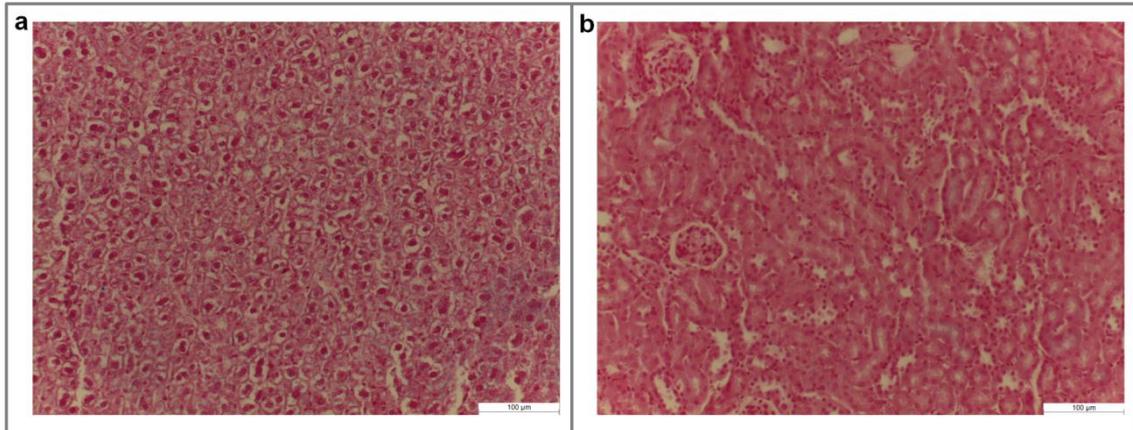


Figura 14: Imágenes de histología de a) Hígado, b) Riñón, en la tinción Azul de Prusia.

Conclusiones.

En este trabajo se han empleado nanopartículas bimetálicas en distintas conformaciones, sintetizadas mediante protocolo basado en el sistema de descomposición térmica, para su uso como agentes de contraste para diagnóstico. Para ello se han analizado distintos parámetros físico-químicos de las mismas, así como las propiedades que presentan en ambientes biológicos.

Se analizaron 5 nanopartículas que presentan un tamaño similar, con el fin de descartar un efecto en las propiedades en función del mismo. Esto dejaba la comparación de las nanopartículas en función de la composición química, así como de su estructura. De acuerdo con los resultados obtenidos se pueden extraer una serie de conclusiones:

- Se ha conseguido realizar una síntesis que ha producido unas partículas de tamaño similar, en torno a los 9-10 nm. El valor de las relajatividades en T_2 , principalmente de las partículas aC y cMZsC, indican que son potenciales agentes de contraste para MRI.
- Se ha realizado de forma correcta la síntesis orgánica del ligando PEG-Gallol y, de acuerdo con la información obtenida del FTIR, se puede afirmar que el intercambio de ligando se realizó correctamente, permitiendo la funcionalización de las nanopartículas.
- El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas, especialmente las aCZ, las cCsZ y las cMZsC, las hace muy prometedoras en su uso en experimentos *in-vivo*.
- A partir de los datos de la prueba de citotoxicidad se descartaron todas las nanopartículas para su posterior uso exceptuando la cMZsC debido a que, aunque presentaba una diferencia significativa entre los valores de viabilidad a altas concentraciones, no se apreciaban efectos citotóxicos a las concentraciones utilizadas *in vivo*.
- Se estudiaron las farmacocinéticas *in vivo* de las nanopartículas cMZsC mediante MRI y se demostró que permanecían en el torrente sanguíneo una hora después de la inyección y que al cabo de una semana habían sido eliminadas, según se refleja en las imágenes dinámicas y en los valores de T_2 determinados por las imágenes cuantitativas.
- Un descenso en el peso del animal indicó un posible daño en el animal debido a la administración de las nanopartículas. Los cortes histológicos del hígado demostraron daños. Este daño puede ser causado por la metabolización de las nanopartículas, liberando algunos componentes tóxicos.

De acuerdo con los resultados del estudio, se han obtenido unas nanopartículas “core-shell” muy estables en medios biológicos por la funcionalización con un ligando hidrófilo, con un tamaño hidrodinámico óptimo para su uso *in vivo*, además de unas propiedades magnéticas muy buenas, con un r_2 muy elevado y con una baja citotoxicidad *in vitro*. Como agentes de contraste *in vivo* han demostrado ser muy eficientes, produciendo una variación muy importante de señal con muy poca cantidad de nanopartículas. Sin embargo, presentan el inconveniente de haber producido una cierta toxicidad en el hígado, probablemente debido a la liberación de elementos tóxicos durante su metabolización, por lo que para su uso *in vivo* es necesario llevar a cabo modificaciones en su estructura y/o composición, encaminadas a evitar dichos efectos adversos.

Bibliografía

1. The Royal Society. Invigorate The Royal Society. <http://invigorate.royalsociety.org/ks5/what-could-nano-do-for-you/why-is-nanotechnology-important.aspx#why>. Accessed September 25, 2017.
2. Rameshkumar P, Ramaraj R. Gold nanoparticles deposited on amine functionalized silica sphere and its modified electrode for hydrogen peroxide sensing. *J Appl Electrochem*. 2013;43(10):1005-1010. doi:10.1007/s10800-013-0589-3.
3. Nanowerk. Nanotechnology Introduction - the significance of the nanoscale. http://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnology_1a.php. Accessed September 25, 2017.
4. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):MR17-MR71. doi:10.1116/1.2815690.
5. Bhatia S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*.; 2016. doi:10.1007/978-3-319-41129-3.
6. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*. 2008;26(8):425-433. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.005.
7. Zaleska-Medynska A, Marchelek M, Diak M, Grabowska E. Noble metal-based bimetallic nanoparticles: The effect of the structure on the optical, catalytic and photocatalytic properties. *Adv Colloid Interface Sci*. 2016;229:80-107. doi:10.1016/j.cis.2015.12.008.
8. Galloway JM. Biotemplating arrays of nanomagnets using the biomineralisation protein Mms6. *Thesis Leeds*. 2012.
9. Goldman A. *Handbook of Modern Ferromagnetic Materials*. Springer US; 1999.
10. Chikazumi S, Graham CD (Chad D., Chikazumi S. *Physics of Ferromagnetism*. Oxford University Press; 1997.
11. Benz M. Superparamagnetism : Theory and Applications. *Superparamagnetism Theory Appl*. 2012:1-27.
12. López-Ortega A, Estrader M, Salazar-Alvarez G, Roca AG, Nogués J. Applications of exchange coupled bi-magnetic hard/soft and soft/hard magnetic core/shell nanoparticles. *Phys Rep*. 2015;553:1-32. doi:10.1016/j.physrep.2014.09.007.
13. Cunningham A, Bûrgi T. *Amorphous Nanophotonics*.; 2013. doi:10.1007/978-3-642-32475-8.
14. Technique S. Sol-Gel Deposition. *Ceramics*. 2006:2-5. doi:10.1002/jbm.10280.
15. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. *Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes*. Vol 105.; 2005. doi:10.1021/cr030063a.
16. El-Hammadi MM, Arias JL. Iron oxide-based multifunctional nanoparticulate systems for biomedical applications: a patent review (2008 – present). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(6):691-709. doi:10.1517/13543776.2015.1028358.
17. Egea-Benavente D. Nanopartículas magnéticas como agentes de contraste duales para. 2016.
18. Subbiah R, Veerapandian M, Yun KS. Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences. *Curr Med Chem*. 2010;17(36):4559-4577.
19. *Workshop de Imagen Preclínica Multimodal*.; 2013.
20. Shouheng Sun, * †, Hao Zeng †, David B. Robinson †, et al. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. 2003. doi:10.1021/JA0380852.
21. Leal MP, Muñoz-Hernández C, Berry CC, García-Martín ML. In vivo pharmacokinetics of T2 contrast agents based on iron oxide nanoparticles:

- optimization of blood circulation times. *RSC Adv.* 2015;5(94):76883-76891. doi:10.1039/C5RA15680G.
22. Ruiz-Briones P. Nanopartículas Magnéticas para Tratamiento y Diagnóstico de Cáncer.
 23. Pernia Leal, M., et al., Shedding light on zwitterionic magnetic nanoparticles: limitations for in vivo applications. *Nanoscale*, 2017. 9(24): 8176-8184.
 24. Pernia Leal, M., et al., In vivo pharmacokinetics of T2 contrast agents based on iron oxide nanoparticles: optimization of blood circulation times. *RSC Advances*, 2015. 5(94): 76883-76891.