



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nanopartícules lipídiques sòlides catióniques (cSLN) com a sistema d'elecció per a transfecció cel·lular de DNA/RNA

Anna Fàbregas Fernández

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES (cSLN) COM A
SISTEMA D'ELECCIÓ PER A TRANSFECCIÓ CEL·LULAR DE DNA/RNA

ANNA FÀBREGAS FERNÁNDEZ

Barcelona, 2015

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES (cSLN) COM A
SISTEMA D'ELECCIÓ PER A TRANSFECCIÓ CEL·LULAR DE DNA/RNA

Memòria presentada per Anna Fàbregas Fernández per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Director de Tesi

Director de Tesi

Prof. Dra. Montserrat Miñarro Carmona

Dr. Carles Suñé Negre

Tutor

Doctorand

Prof. Dra. Montserrat Miñarro Carmona

Anna Fàbregas Fernández

ANNA FÀBREGAS FERNÁNDEZ 2015

AGRAÏMENTS

En primer lloc, dono les gràcies als meus directors de tesi, la Prof. Dra. Montserrat Miñarro, del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, per acceptar la direcció de la tesi i donar-me accés al seu àmbit de coneixement, i al Dr. Carles Suñé, del Departamento de Biología Molecular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC-IPBLN), situat a Granada, per la mateixa raó, i a qui tinc que agrair haver pogut fer una estada i successives visites al seu laboratori, en què he adquirit i ampliat molts coneixements.

Agraeixo especialment al Prof. Dr. Josep M^a Suñé l'oportunitat de realitzar aquesta tesi en la línia de recerca sobre desenvolupament i control de sistemes d'alliberament de fàrmacs, i la seva disponibilitat i ajuda en tot moment en tot en el que l'he necessitat. Gràcies també al Prof. Dr. Josep Ramon Ticó pel seu interès, ànims i consells.

Quiero agradecer a la Dra. Noemí Sánchez su colaboración y ayuda en las técnicas de biología molecular. Gracias también por el mismo motivo a la Dra. Silvia Prieto, por su amabilidad, asistencia y paciencia, así como al resto de compañeros con quienes compartí laboratorio en el CSIC-IPBLN de Granada, por las atenciones recibidas. Asimismo, deseo resaltar mi agradecimiento al Prof. Dr. César Viseras y a la Prof. Dra. Pilar Cerezo de la Universidad de Granada por su hospitalidad, cercanía y trato amable durante mis visitas a Granada.

Pel que fa a tècniques instrumentals, dono les gràcies al personal dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) per assistir-me sempre amb professionalitat i bona disposició. També a la Dra. Dolors Pujol del Departament de Química Farmacèutica de la Universitat de Barcelona per la mateixa raó. Agraeixo igualment al Dr. Pau Martin de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB), així com al Dr. Josep Carilla del CSIC-IQAC la seva ajuda i disponibilitat.

Per últim, faig extensiva la meva gratitud a les persones del Servei de Desenvolupament del Medicament (SDM) que m'han assessorat i que m'han facilitat suport tècnic durant la realització d'aquest treball.

“Experiment is the only means of knowledge at our disposal. Everything else is poetry, imagination.”

– Max Planck

ÍNDEX

OBJECTIU	1
INTRODUCCIÓ	7
1. L'EVOLUCIÓ CAP A NOUS SISTEMES D'ALLIBERAMENT D'AGENTS TERAPÈUTICS: LA UNIÓ SINÈRGICA ENTRE LA FARMÀCIA GALÈNICA I LA BIOLOGIA MOLECULAR	9
2. CARACTERITZACIÓ DELS SISTEMES NANOPARTICULATS	15
3. MÈTODES DE PRESERVACIÓ DE NANOPARTÍCULES	16
4. TRANSFECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS PER MITJÀ DE SISTEMES NANOPARTICULATS	18
4.1 FÍSICO-QUÍMICA I ESTRUCTURA DELS ÀCIDS NUCLEICS: DNA I RNA	18
4.2 ESTRATÈGIES PER A LA REGULACIÓ GENÒMICA A PARTIR DE LA TRANSFECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	22
4.2.1 PDNA I REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	23
4.2.2 siRNA I REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	24
5. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES CATIÒNIQUES	26
5.1 NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES CATIÒNIQUES DE QUITOSAN-TRIPOLIFOSFAT.....	26
5.1.1 APLICACIONS TERAPÈUTIQUES	28
5.1.2 MÈTODES D'OBTENCIÓ.....	29
5.1.2.1 Obtenció per gelificació ionotròpica.....	30
5.1.3 NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN COM A SISTEMES VEHICULITZADORS ENFRONT D'ALTRES SISTEMES NANOESTRUCTURATS	31
5.1.4 MECANISME DE FORMACIÓ DE POLIPLEXOS QUITOSAN-TPP:DNA	33
6. NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES	34
6.1 NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES (SLN).....	34
6.1.1 SISTEMES PRECURSORS DE LES SLN. EMULSIONS O / W. MICROEMULSIONS	38
6.2 COMPOSICIÓ LIPÍDICA DE LES CSLN. LÍPIDS MATRICIALS, LÍPIDS CATIÒNICS I TENSIOACTIUS	39
6.3 ESTAT SÒLID I TRANSICIONS POLIMÒRFIQUES.....	42
6.4 INCORPORACIÓ DE L'AGENT TERAPÈUTIC EN SLN I CSLN	44
6.5 PRINCIPALS MÈTODES D'OBTENCIÓ. BREU DESCRIPCIÓ. AVANTATGES I DESAVANTATGES	46
6.5.1 HOMOGENEÏTZACIÓ EN CALENT A ALTA PRESSIÓ	47
6.5.2 HOMOGENEÏTZACIÓ EN FRED A ALTA PRESSIÓ.....	49
6.5.3 MICROEMULSIFICACIÓ EN CALENT.....	50
6.6 VEHICULITZACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS PER MITJÀ DE LIPOPLEXOS CSLN:PDNA I CSLN:siRNA. EFICIÈNCIA DE TRANSFECCIÓ	52
6.6.1 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ I POSSIBILITAT DE MODULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA	55
6.6.2 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ TCERG1 PER MITJÀ DE LIPOPLEXOS CSLN:PDNA I CSLN:siRNA.....	56
7. ESTAT ACTUAL I PERSPECTIVES DE FUTUR DELS MEDICAMENTS BASATS EN SISTEMES NANOESTRUCTURATS I ÀCIDS NUCLEICS	57

MATERIAL I MÈTODES	61
1. MATERIALS	63
1.1 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES CATIÒNIQUES DE QUITOSAN-TPP	63
1.2 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES	63
1.3 LIOFILITZACIÓ	64
1.4 ASSAJOS DE VIABILITAT I TRANSFECCIÓ CEL·LULAR	64
1.5 PLASMIDIS D'EXPRESSION EUCARIOTA.....	65
1.6 ELECTROFORESIS EN GEL D'AGAROSA	65
1.7 ANÀLISI DE PROTEÏNES PER <i>WESTERN-BLOT</i> (SDS-PAGE)	66
1.8 ANÀLISI DE PROTEÏNES PER BIOLUMINESCÈNCIA	66
1.9 siRNA	67
2. INSTRUMENTAL	67
3. MÈTODES	70
3.1 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP	70
3.2 DISSENY EXPERIMENTAL PER A L'ANÀLISI DE L'EFFECTE DELS PARÀMETRES OPERACIONALS EN LES CARACTERÍSTIQUES DE LES NANOPARTÍCULES	73
3.3 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES(cSLN).....	75
3.4 DETERMINACIÓ DE LA MIDA DE PARTÍCULA	78
3.5 DETERMINACIÓ DEL POTENCIAL ZETA	79
3.6 LIOFILITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES.....	81
3.7 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TEM, <i>TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY</i>)	82
3.8 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG (SEM, <i>SCANNING ELECTRON MICROSCOPY</i>)	84
3.9 MICROSCÒPIA DE FORÇA ATÒMICA (AFM, <i>ATOMIC FORCE MICROSCOPY</i>).....	85
3.9.1 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP PER AFM.....	86
3.9.2 CARACTERITZACIÓ DE cSLN I LIPOPLEXOS cSLN:PDNA PER AFM.....	87
3.10 DETERMINACIÓ DE PROPIETATS NANOMECÀNIQUES (MÒDUL DE YOUNG) DE LES cSLN PER MICROSCÒPIA DE FORÇA ATÒMICA NANOMECÀNICA QUANTITATIVA (AFM-QNM®).....	88
3.11 ESPECTROSCÒPIA DE FOTOELECTRONS PER EMISSIÓ DE RAIGS X (XPS, <i>X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY</i>)	89
3.12 CARACTERITZACIÓ TÈRMICA I ESTRUCTURAL DELS COMPONENTS DE PARTIDA I DE LES cSLN	91
3.12.1 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE RASTREIG (<i>DSC, DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY</i>)	91
3.12.2 ANÀLISI TERMOGRAVIMÈTRICA (<i>TGA, THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS</i>).....	92
3.12.3 DIFRACCIÓ DE RAIGS X (<i>XRD, X-RAY DIFFRACTION</i>)	93
3.12.4 ESPECTROMETRIA DE MASSES (<i>MS, MASS SPECTROMETRY</i>).....	95
3.12.5 ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE PROTÓ (<i>¹H-NMR, HYDROGEN NUCLEAR MAGNETIC RESSONANCE</i>)	96
3.12.6 ESTABILITAT DE LES cSLN A DIFERENTS TEMPERATURES DE CONSERVACIÓ	98
3.13 CULTIUS CEL·LULARS.....	98
3.13.1 MANTENIMENT DE CÈL·LULES HEK293T	98
3.13.2 MANTENIMENT DE CÈL·LULES HELA	99

3.13.3	ESTUDI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR EN PRESENCIA DE CSLN	100
3.14	TÈCNiques BIOMOLECULARS.....	102
3.14.1	OBTENCIÓ DELS PLASMIDIS	102
3.14.2	CAPACITAT D'UNIÓ A PDNA MITJANÇANT ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL.....	102
3.14.3	ESTABLIMENT DE L'EFICIÈNCIA ÒPTIMA D'UNIÓ CSLN:PDNA	104
3.14.4	ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL PER AVALUAR LA POSSIBLE INFLUÈNCIA DE LA MIDA DEL PLASMIDI EN L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE CSLN A DNA	105
3.14.5	INFLUÈNCIA DE LA FORÇA IÒNICA DEL MEDI DE CULTIU CEL·LULAR EN EL MANTENIMENT DEL POTENCIAL Z DE LES CSLN I L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ A PDNA/SIRNA.....	105
3.15	EXPERIMENTS DE TRANSFECCIÓ CEL·LULAR AMB LIPOPLEXOS CSLN:PDNA I CSLN:SIRNA: TÈCNiques I ANÀLISI.....	106
3.15.1	TRANSFECCIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS HEK293T I HELA	106
3.15.2	PLASMIDI PEFBOS-T7-TCERG1 [1-1098]	107
3.15.3	PLASMIDI NF-KB-C-FOS-LUC	108
3.15.4	PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ PEL POSTERIOR ANÀLISI DE PROTEÏNES PER IMMUNOBLOTTING (WESTERN-BLOT)	108
3.15.5	PREPARACIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS	109
3.15.6	MÈTODE PER A LA MANIPULACIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES.....	109
3.15.7	ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE TCERG1 MITJANÇANT ELECTROFORESI EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	111
3.15.8	PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ PEL POSTERIOR ANÀLISI DE PROTEÏNES PER BIOLUMINESCÈNCIA	113
3.15.9	ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE LUC MITJANÇANT ASSAIG DE BIOLUMINESCÈNCIA	114
3.15.10	TRANSFECCIÓ DE HEK293T I HELA AMB LIPOPLEXOS CSLN:SIRNA I VISUALITZACIÓ PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA CONFOCAL	115
3.15.11	CAPACITAT D'UNIÓ DE CSLN A SIRNA MITJANÇANT ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL. ESTABLIMENT DE L'EFICIÈNCIA ÒPTIMA D'UNIÓ CSLN:SIRNA	116
3.15.12	MICROSCÒPIA CONFOCAL PER A LA VISUALITZACIÓ DE LA TRANSFECCIÓ DE LIPOPLEXOS CSLN:SIRNA	119
	RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	123
1.	OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE D'OBTECCIÓ DE NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP	125
1.2	VISUALITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP.....	131
2.	OPTIMITZACIÓ DE LA FORMULACIÓ PER A LA MIDA DE PARTÍCULA I POTENCIAL Z DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES (CSLN).....	136
2.1	AVALUACIÓ DEL CONTINGUT EN OCTADECILAMINA.....	138
2.2	AVALUACIÓ DEL CONTINGUT EN POLOXAMER 188.....	141
2.3	AVALUACIÓ DEL CONTINGUT EN OCTADECILAMINA I POLOXAMER 188.....	142
3.	CARACTERITZACIÓ TÈRMICA I ESTRUCTURAL	145
3.1	ESPECTROSCÒPIA DE FOTOELECTRONS PER EMISSIÓ DE RAIGS X DE CSLN	145
3.2	CALORIMETRIA DE RASTREIG DIFERENCIAL DELS COMPONENTS DE LES CSLN (DSC).....	146
3.3	ANÀLISI TERMOGRAVIMÈTRICA DE LA FORMULACIÓ DE CSLN.....	149

3.4	CALORIMETRIA DE RASTREIG DIFERENCIAL DE LA FORMULACIÓ DE CSLN (DSC)	151
3.5	DIFRACCIÓ DE RAIGS X (XRD)	152
3.6	ESPECTROMETRIA DE MASSES (MS)	156
3.7	RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE PROTÓ (¹ H-NMR)	157
3.8	VISUALITZACIÓ DE CSLN PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TEM)	160
3.9	VISUALITZACIÓ DE CSLN PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG (SEM)	160
3.10	VISUALITZACIÓ DE CSLN PER MICROSCÒPIA DE FORÇA ATÒMICA (AFM)	161
4.	DETERMINACIÓ DE LES PROPIETATS NANOMECÀNiques (MÒDUL DE YOUNG) DE LES CSLN	163
5.	ESTABILITAT DE LA FORMULACIÓ DE CSLN A DIFERENTS TEMPERATURES DE CONSERVACIÓ	165
6.	ESTABILITAT DE LA FORMULACIÓ DE CSLN RECONSTITUÏDA A PARTIR DE PRODUCTE LIOFILITZAT	168
7.	ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL PER DETERMINAR L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE CSLN A PDNA	169
7.1	ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL PER AVALUAR LA INFLUÈNCIA DE LA MIDA I TIPUS DE PLASMIDI EN L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE CSLN A PDNA	171
8.	ESTABILITAT DE LES CSLN I MANTENIMENT DEL POTENCIAL Z DE LES CSLN EN FUNCIÓ DEL MEDI DE CULTIU CEL·LULAR	173
9.	ESTUDIS DE VIABILITAT CEL·LULAR	174
10.	TRANSFECCIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS HEK293T I HELA MITJANÇANT LIPOPLEXOS CSLN:PDNA	176
10.1	TRANSFECCIÓ DEL PLASMIDI NF-KB-C-FOS-LUC MITJANÇANT CSLN EN LÍNIA HEK293T	180
11.	EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE CSLN A siRNA MITJANÇANT ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL	182
11.1	TRANSFECCIÓ DE HEK293T AMB LIPOPLEXOS CSLN:siRNA I VISUALITZACIÓ PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA CONFOCAL	183
11.2	TRANSFECCIÓ DE HELA AMB LIPOPLEXOS CSLN:siRNA I VISUALITZACIÓ PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA CONFOCAL	187
	DISCUSSIÓ GLOBAL	191
	CONCLUSIONS	205
	REFERÈNCIES	209
	Annex I	225

OBJECTIU

Introducció a l'objectiu

Tot i la nombrosa quantitat de publicacions existents relatives a l'obtenció de nanopartícules de quitosan-tripolifosfat (en endavant, quitosan-TPP) per mitjà del mètode de la gelificació ionotròpica, amb molta variabilitat pel que fa a concentracions i ràtios dels components de la formulació, hi ha poca informació concreta respecte als paràmetres físics i operacionals del procés, i com la seva variació afecta la mida i potencial elèctric superficial de les nanopartícules obtingudes. Cal tenir en compte que els sistemes col·loïdals consistents en nanopartícules presenten una alta tendència a la formació d'agregats, fet que suposa un problema recurrent de complexa solució per a la formació i estabilitat de nanopartícules aïllades.

D'altra banda, si la suspensió de nanopartícules obtinguda és sotmesa a un procés de liofilització amb l'objectiu de concentrar-les i preservar-les, la formació d'agregats dificulta enormement la seva posterior redispersió, i afecta, per tant, la mida de partícula que s'obtindrà. Cal establir els punts crítics del procés directament implicats en l'eventual formació d'agregats.

Un altre punt important és que, si es té en consideració l'interval de mides de les nanopartícules de quitosan-TPP, és interessant analitzar fins a quin punt és possible obtenir un major percentatge de nanopartícules d'una mida determinada, en funció dels paràmetres físics aplicats en la reacció de síntesi. Aquesta informació pot contribuir positivament a l'establiment d'una metodologia d'obtenció sistemàtica i a una producció controlada.

Malgrat tot, i a causa de l'elevada polidispersió quant a diàmetre mitjà de les nanopartícules de quitosan-TPP, així com els desavantatges intrínsecs derivats tant del procés de purificació del quitosan com de la baixa robustesa del procés d'obtenció, en què petits canvis de les condicions experimentals poden derivar en notables diferències quant a la grandària de les nanopartícules obtingudes, es fa necessari disposar d'un sistema nanoestructurat alternatiu que suposi una millora quant a la variabilitat i reproductibilitat.

Les nanopartícules lipídiques sòlides catióniques (cSLN) es plantegen com a alternativa. Constitueixen un sistema coloidal format generalment a partir d'emulsions o/w (*oil in water*). L'única diferència respecte a una emulsió o/w és que en el cas de les cSLN, els lípids inicialment formadors de l'emulsió han

OBJECTIU

adquirir l'estat sòlid, formant per tant les nanopartícules pròpiament dites. Els components utilitzats poden determinar en part l'estabilitat quant a manteniment de l'estructura, propietats físico-químiques i toxicitat de les nanopartícules al llarg del temps.

En el cas de les cSLN, la càrrega positiva superficial ve donada per la presència d'un lípid catiònic. Tant aquest lípid catiònic com la presència del tensioactiu necessari en el procés de formació de les nanopartícules poden presentar efectes tòxics cel·lulars a determinades concentracions que cal avaluar. Aquestes nanopartícules formen els anomenats lipoplexos quan adsorbeixen en superfície els diferents tipus d'àcids nucleics per tal que puguin ser transfectats i, finalment, en funció del tipus d'àcid nucleic emprat, derivi en l'expressió proteica del gen a partir d'un DNA plasmídic (pDNA) o actui com a silenciador de l'expressió gènica a partir d'un RNA d'interferència (siRNA).

Objectiu

Els objectius que es fixen en aquest treball són els següents:

- Estudi i selecció de paràmetres operatius en l'obtenció de nanopartícules de quitosan-TPP pel mètode de gelificació ionotròpica.

Com a objectius específics es proposen els següents:

- Avaluació dels paràmetres físics operacionals per a l'obtenció de nanopartícules catióniques polimèriques de quitosan-TPP, per tal de determinar quins d'ells es constitueixen com a crítics pel que fa a la mida de partícula i potencial elèctric superficial.
 - Optimització, estandardització de les condicions del mètode d'obtenció i avaluació del seu rendiment.
- Estudi alternatiu amb nanopartícules catióniques lipídiques sòlides (cSLN), de diàmetre mitjà baix amb mínima variabilitat, a partir d'un mètode d'obtenció senzill i robust.

Com a objectiu específics es proposen els següents:

- Optimització d'una fórmula de cSLN, mitjançant l'estudi de la variació tant qualitativa com quantitativa dels diferents components. S'avaluaran les diferències quant a mida de partícula i potencial superficial obtingut

com a funció de la variació del lípid matricial. També es pretén reduir la quantitat tant del tensioactiu Poloxamer 188 com d'octadecilamina (lípid catiònic), amb l'objecte de minimitzar el grau de toxicitat cel·lular.

- Caracterització estructural i tèrmica dels components i de les cSLN obtingudes.
 - Estudis de viabilitat cel·lular en línies HEK293T i HeLa enfront cSLN amb la finalitat d'establir les concentracions que permetin assolir una menor toxicitat.
- Estudi de la utilitat de cSLN com a agents vehiculitzadors per a la transfecció cel·lular d'àcids nucleics.

Com a objectius específics es proposen els següents:

- Establiment de les concentracions respectives de cSLN i diferents plasmidis de DNA (pDNA) per aconseguir optimitzar la capacitat d'unió de les nanopartícules a aquest tipus d'àcid nucleic.
- Estudis de capacitat de transfecció de les cSLN unides a pDNA en cèl·lules HEK293T i HeLa.
- Anàlisi funcional de l'expressió de pDNA transfectat en línies cel·lulars HEK293T i HeLa.
- Establiment de les concentracions respectives de cSLN i siRNA per optimitzar la capacitat d'unió de les nanopartícules a aquest tipus d'àcid nucleic.
- Avaluació de la capacitat de transfecció de les cSLN unides a siRNA en cèl·lules HEK293T i HeLa.

INTRODUCCIÓ

1. L'EVOLUCIÓ CAP A NOUS SISTEMES D'ALLIBERAMENT D'AGENTS TERAPÈUTICS: LA UNIÓ SINÈRGICA ENTRE LA FARMÀCIA GALÈNICA I LA BIOLOGIA MOLECULAR

El disseny de les diverses formes farmacèutiques s'origina en funció de l'aplicació terapèutica a la que va dirigit el fàrmac. Com a principals factors a l'hora d'escollir una o altra forma farmacèutica es troben la classe de tractament, és a dir, si ha de ser local o sistèmic, la durada de l'acció terapèutica, l'edat del pacient, la via d'administració, entre molts altres factors.

Un cop absorbits, els fàrmacs administrats a través de les respectives formes farmacèutiques es distribueixen per tot l'organisme sense discriminació, en el sentit que no existeix una direccionalitat del fàrmac cap a un òrgan o teixit concret. Posteriorment a l'acció terapèutica, té lloc un procés de metabolització i finalment d'eliminació.

En els darrers temps, hi ha un interès creixent centrat en el desenvolupament de noves formes farmacèutiques. Per una banda, s'han desenvolupat formes farmacèutiques capaces de modificar l'alliberament del principi actiu, ja es tracti d'un fàrmac o de material biològic com per exemple DNA (*desoxyribonucleic acid*) o RNA (*ribonucleic acid*), de manera que aquest sigui retardat, perllongat o sostingut en el temps, i per altra banda que pugui arribar de forma específica a la diana terapèutica. En aquesta categoria de formulacions s'hi troben, entre d'altres, els liposomes o diverses classes de nanopartícules. Lògicament, es requereix de tecnologies innovadores que permetin la formulació d'aquestes noves formes farmacèutiques. Amb el desenvolupament de noves tècniques s'ha generat un ampli ventall de possibilitats, que han de ser adaptades en funció de les necessitats d'administració a determinats tipus cel·lulars de l'organisme i de les característiques de cada pacient en particular (Aulton, 2003).

Així doncs, el disseny de nous sistemes d'alliberament de formes farmacèutiques ha de tenir en compte com a principal finalitat aconseguir que el principi actiu s'alliberi en el lloc, amb la dosi i el ritme adequats. Els sistemes que poden acomplir amb aquest objectiu, com els liposomes, nanopartícules, microemulsions i altres, comparteixen determinades característiques pel que fa

INTRODUCCIÓ

a la mida, que es troba en l'interval nanomètric, la morfologia i la via d'administració. A la vegada, també tenen la seves pròpies especificitats, que els confereixen, a cadascun d'ells, uns determinats avantatges i desavantatges (Kreuter, 1994; Rostami *et al.*, 2014).

Un dels avantatges radica en l'augment de l'eficàcia del principi actiu i la reducció d'efectes secundaris. Un dels exemples pioners han estat les nanopartícules de 130 nm constituïdes per albúmina humana carregada amb paclitaxel (Abraxane®), en forma de pols per a suspensió per a perfusió intravenosa, dirigides al tractament de certes neoplàsies metastàtiques. Aquest fàrmac va ser aprovat l'any 2008 a Europa per la EMA (*European Medicines Agency*).

Immediatament després de l'administració, les nanopartícules donen lloc a complexos solubles de 10 nm, en què l'albúmina s'uneix a proteïnes de la membrana de les cèl·lules tumorals, fent que s'hi acumuli el fàrmac paclitaxel.

Aquesta formulació disminueix en gran mesura les reaccions d'hipersensibilitat associada als excipients d'altres formes farmacèutiques clàssiques que contenen paclitaxel solubilitzat (EMA, 2014).

El desenvolupament de sistemes nanoestructurats adequats per a l'ús previst requereix un coneixement el més ampli possible de les característiques de les nanopartícules des d'un punt de vista farmacèutic. Un aspecte rellevant i que suposa un avantatge és el relacionat amb la mida de partícula. L'escala nanomètrica està present en els sistemes biològics, i participa en molts processos cel·lulars. Quan el que es pretén és assolir la màxima biocompatibilitat entre el sistema biològic i els sistemes nanomètrics desenvolupats pel tractament de malalties, ja sigui per corregir un gen defectuós, evitar la replicació de genomes virals o provocar la mort controlada de cèl·lules canceroses, es torna rellevant assimilar-se en mida a l'escala nanomètrica. Això s'emmarca en la necessitat d'adaptació al context de l'organisme, en què la cèl·lula esdevé la unitat bàsica on tenen lloc les diverses reaccions i interaccions bioquímiques que regeixen els processos biològics. Per tant, resulta de vital importància poder influir sobre aquests en la seva escala natural, és a dir, amb partícules d'escala nanomètrica (Gupta *et al.* 2006).

Les nanopartícules constitueixen sistemes col·loïdals la grandària dels quals pot oscil·lar entre 10 i 1000 nm. Les nanopartícules poden estar formades per macromolècules molt variades, des de polímers de diverses classes fins a lípids, incloent en alguns casos diferents tensioactius i emulsionants. Tots aquests components confereixen unes propietats interfacials a aquests sistemes que en condicionaran el seu comportament posterior (Gupta *et al.*, 2006; Parveen *et al.*, 2012). Per aprofitar al màxim el seu potencial, és clau que els materials de síntesi siguin biodegradables. El principi actiu, ja sigui un fàrmac o material biològicament actiu com àcids nucleics (DNA o RNA), s'hi pot trobar associat per diversos mecanismes, entre els quals hi ha la dissolució, l'encapsulació i l'adsorció. Aquestes nanopartícules actuen en primer lloc, per tant, com a vehiculitzadores del principi actiu (Kreuter, 1994). Presenten una sèrie de característiques físiques que els confereixen avantatges enfront d'altres sistemes. Primer de tot, la seva petita mida, pel fet d'estar en consonància amb l'ordre de magnitud de les cèl·lules, els permet distribuir-se pels capil·lars, on es podran acumular –i amb elles el principi actiu que transporten– allà on s'hagi decidit prèviament que han de dur a terme l'acció terapèutica. Un altre avantatge en l'ús de materials biodegradables en els sistemes nanoestructurats és la possibilitat d'alliberament sostingut en el temps –de dies, o fins i tot de setmanes– del principi actiu en la diana terapèutica. Finalment, i no per això menys important, la funcionalització de la superfície de les nanopartícules confereix a aquests sistemes la capacitat de direccionar-los a un tipus cel·lular específic, de manera que es pot modificar, per tant, la seva biodistribució (Wong *et al.*, 2012). A més a més de la mida i l'àrea superficial –quant més petita sigui la partícula, entesa com a una esfera de volum determinat, major superfície relativa té–, presenten la propietat de mantenir-se en suspensió, de tal forma que el moviment *brownià* contraresta la tendència a la precipitació a causa de l'acció gravitatòria. Tampoc resulta de menor importància, a l'hora de dissenyar aquests sistemes de vehiculització de principis actius, tenir en consideració tant el mètode d'obtenció com el transport biològic al que estaran subjectes.

Les característiques de les nanopartícules es poden evidenciar de forma directa o indirecta mitjançant tècniques instrumentals, que comprenen des de tècniques d'anàlisi tèrmic, de difracció làser, anàlisi de superfícies i mètodes

INTRODUCCIÓ

espectroscòpics, fins a diversos mètodes de microscòpia per elucidar-ne la morfologia. També és possible aplicar tècniques per a l'estudi de l'alliberament *in vitro* del principi actiu (Gupta *et al.*, 2006).

Un cop dins l'organisme, pateixen mecanismes de degradació que diferiran en funció de la naturalesa del sistema nanoparticulat. El fet de presentar unes dimensions restringides a l'escala nanomètrica provoca que la degradació sigui més ràpida que no pas la d'altres sistemes com les microesferes. Quan la nanopartícula arriba al seu lloc de destí, és necessari l'alliberament del principi actiu. Aquest factor també serà depenent tant de les característiques de la nanopartícula com de l'entorn biològic, i pot ocórrer per mitjà d'algun dels següents mecanismes: desorció, difusió, erosió o un procés combinat d'aquests dos últims.

A més del mecanisme pel qual el principi actiu és físicament separat i, per tant, alliberat de la nanopartícula, l'entorn biològic determinarà els coeficients de difusió, la via i la taxa de degradació d'aquestes nanopartícules. En aquest context, és conegut que moltes nanopartícules arriben ràpidament al sistema reticle-endotelial (RES, *reticulo-endothelial system*) hepàtic, on té lloc una metabolització que pot donar lloc a metabòlits tòxics. Aquesta toxicitat s'afegeix a la pròpia que poden exhibir les nanopartícules en relació a la seva composició. L'ús de components que es troben implicats de forma natural en funcions biològiques afavoreix la biocompatibilitat i biodegradabilitat de les nanopartícules pel fet de no generar metabòlits tòxics (Weber *et al.*, 2014). Independentment de la composició, la citotoxicitat pot ser diferent enfront diversos tipus cel·lulars (Kreuter, 1994; Heidenreich, 2002; Severino *et al.*, 2014). Així, la toxicitat d'aquests sistemes és un altre factor clau a tenir en compte per tal de disminuir-la al màxim amb l'optimització de formulacions (Fàbregas *et al.*, 2014).

En l'ús concret de sistemes nanoestructurats per a vehiculització i transfecció d'àcids nucleics com a material biològicament actiu, amb la finalitat d'instaurar una teràpia gènica, s'introdueix DNA o RNA de forma controlada en cèl·lules diana. Aquesta transfecció té per objectiu sobre- expressar o suprimir la síntesi de proteïnes per curar o tractar determinades malalties que actualment

segueixen sent necessitats mèdiques no assolides, doncs ara per ara no són totalment curables, o només tractables, amb els fàrmacs convencionals actuals. És el cas del càncer, com a exemple de malaltia multifactorial i poligènica, o algunes malalties hereditàries monogèniques (Wang i Gao, 2014). En el primer cas, la teràpia gènica pot anar dirigida a manipular la genètica de la cèl·lula per induir-ne l'apoptosi. En el segon, el reemplaçament d'un gen defectuós o el silenciament gènic en cas de sobre-expressió en serien els objectius, sempre que es conegui la base genètica del trastorn. En qualsevol cas, és necessari disposar de vectors que puguin transportar cap a les cèl·lules afectades el material biològicament actiu, és a dir, DNA o RNA.

Abans del desenvolupament dels sistemes nanoparticulats, els estudis realitzats amb vectors virals modificats –retrovirus, adenovirus, lentivirus, herpesvirus, virus adeno-associat- van demostrar la seva alta eficiència com a agents de transfecció i regulació gènica. L'any 2012 l'EMA va aprovar el primer fàrmac per a teràpia gènica basat en l'ús de vectors virals, en aquest cas un serotip de virus adeno-associat modificat no replicatiu, el qual conté la variant LPL^{S447X} (lipoprotein lipasa) del gen LPL que codifica per a una forma clínicament favorable de l'enzim (Rip *et al.*, 2006). Es tracta de *alipogene tiparvovec* (Glybera®), en forma de suspensió per a injecció intramuscular, per al tractament de la deficiència de lipoprotein lipasa (LPLD), una malaltia monogènica hereditària relacionada amb l'alteració en el metabolisme de les lipoproteïnes que pot provocar greu afectació del pàncrees. El fàrmac s'injecta a les extremitats inferiors i és captat pels miòcits, on es promou l'expressió de la variant del gen sense que es produeixi replicació vírica. Malgrat la seva eficiència i especificitat, aquesta teràpia gènica ha d'anar acompanyada d'un tractament immunosupressor per no generar resposta immune enfront del virus adeno-associat modificat (Daya i Berns, 2008; EMA, 2012).

Les desavantatges presents en aquest tipus de sistemes -com l'alta immunogenicitat- i el risc d'una possible replicació viral, han anat fent decantar la recerca cap al desenvolupament de sistemes alternatius, com són els vectors no virals. Les molècules utilitzades per desenvolupar aquestes formulacions generen molt poca resposta immune i ostenten la categoria de compostos GRAS –*Generally Recognized As Safe*- és a dir, que es reconeixen com a no

INTRODUCCIÓ

tòxiques (Sosnik, 2013). Possibiliten diverses modificacions i admeten àcids nucleics (DNA o RNA transfectat) de mides variades, els quals es troben condensats en la nanopartícula gràcies a l'acció de molècules catióniques.

I el que és més important, es fa possible la funcionalització de la nanopartícula, en el sentit que es poden dissenyar per tal que arribin a un determinat teixit o cèl·lula diana.

En contraposició als sistemes virals d'administració gènica (Lentz *et al.*, 2012), l'eficiència de transfecció i, conseqüentment, de regulació gènica esdevé menor. Si bé a nivell de cultiu cel·lular aquesta eficiència pot ser entre moderada i alta, es redueix considerablement *in vivo*. Un cop la nanopartícula uneix l'àcid nucleic i es constitueix en vector no viral, el mecanisme d'alliberament a nivell cel·lular té lloc amb posterioritat a l'endocitosi, facilitada per la interacció electrostàtica o hidrofòbica entre el vector i la membrana cel·lular. En aquest punt, pren sentit l'ús de molècules carregades electropositivament que, a banda de la unió a DNA/RNA, poden unir-se també de forma iònica a la superfície de la cèl·lula, ja que aquesta presenta càrregues negatives proporcionades pels proteoglicans o alguns tipus de glicoproteïnes. Quant a l'eficiència de transfecció, les nanopartícules de menor diàmetre veuen facilitada la seva internalització cel·lular enfront d'altres de majors dimensions (Gupta *et al.*, 2006).

Com a polímers catiónics es poden mencionar la polietilenimina, el quitosan, la polilisina, els dendrímers, etc. En addició als polímers hi ha també lípids catiónics, en què el grup nitrogenat es troba protonat a pH fisiològic, entre els que hi ha el N-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamoni metil-sulfat (DOTAP), l'octadecilamina, el bromur de didecildimetilamoni (DDAB), l'esterquat o el dimetilaminoetà carbamoïl colesterol (DC-Chol). Totes aquestes molècules, tant polímers com lípids, exhibeixen àtoms carregats electropositivament, condició necessària i suficient per poder condensar el DNA/RNA. Junt amb la resta de característiques addicionals requerides, es poden constituir en sistemes no virals per a transfecció i regulació genòmica (Doktorovova *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2010).

2. CARACTERITZACIÓ DELS SISTEMES NANOPARTICULATS

La funcionalitat de les nanopartícules, ja siguin basades en polímers o lípids, dependrà de determinades característiques estructurals i morfològiques. Així, és important conèixer-ne les propietats per poder entendre i predir la respectiva funció i estabilitat enfront l'ús previst.

En funció de la conformació dels components de la nanopartícula i localització de la molècula d'interès terapèutic, es parla de nanoesferes o nanocàpsules. Les primeres són partícules matricials –conformen una massa sòlida-, en què les molècules d'interès estan adherides a superfície o incloses en la matriu. Les segones es descriuen com a sistemes vesiculars, on el component terapèutic està confinat a la cavitat que forma l'interior de la partícula (Rao i Geckeler, 2011).

Característiques estructurals

Les tècniques més àmpliament utilitzades que poden facilitar informació sobre l'estructura comprenen (Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015):

- Determinació de la mida de partícula per mètodes de difracció làser.
- Determinació de la càrrega superficial a través de l'obtenció del valor de potencial Z, per mitjà de tècniques electrocinètiques.
- Mètodes d'anàlisi tèrmica, com ara la calorimetria diferencial de rastreig (DSC) i l'anàlisi termogravimètric per avaluar l'estabilitat tèrmica.
- Mètodes espectroscòpics per a la determinació de la composició atòmica superficial, com l'espectroscòpia de fotoelectrons per emissió de raigs X-XPS i l'espectroscòpia infraroja amb transformada de Fourier (FTIR), per conèixer l'estructura i dinàmica molecular.
- Mètodes espectromètrics per a l'anàlisi de la composició molecular (espectrometria de masses-MS).

Aquesta llista no és exhaustiva, per la qual cosa aquestes tècniques es poden complementar amb d'altres com la ressonància magnètica i la difracció de raigs X, per tal d'elucidar o confirmar estructures, sempre en coherència amb el tipus de nanopartícula i característiques en estudi.

CARACTERÍSTIQUES MORFOLÒGIQUES

L'estudi morfològic dels sistemes nanoparticulats es realitza per mitjà de diferents tècniques de microscòpia, essent les més utilitzades les següents (Antoniou *et al.*, 2015; Fàbregas *et al.*, 2013; Vimal *et al.*, 2013) :

- Microscòpia electrònica de transmissió
- Microscòpia electrònica de rastreig
- Microscòpia de força atòmica
- Microscòpia confocal

Per a nanopartícules carregades amb fàrmacs o àcids nucleics, existeixen mètodes per a la determinació de les eficiències de càrrega i d'alliberament d'aquesta, així com estudis de citotoxicitat *in vitro* (Casagrande *et al.*, 2015; Katas i Alpar, 2006).

3. MÈTODES DE PRESERVACIÓ DE NANOPARTÍCULES

L'estabilitat dels sistemes nanoparticulats està influenciada per diversos factors. La distribució de mida de partícula acostuma a ser diferent en nanopartícules acabades de sintetitzar respecte les mateixes nanopartícules al cap d'un temps. Els sistemes d'obtenció que incorporen un procés d'agitació també n'afavoreixen l'agregació. En nanopartícules polimèriques, el pes molecular del polímer hi té una certa influència (Rampino *et al.*, 2013). Però inclús en absència d'agitació, les nanopartícules acaben agregant-se a causa de factors diversos (Kaloti i Bohidar, 2010; Morris *et al.*, 2011). Els mètodes de preservació poden contribuir al fenomen d'agregació entre nanopartícules aïllades.

Un cop fabricades, és possible assegurar una conservació a llarg termini de les característiques de les nanopartícules obtingudes de manera que puguin conservar les propietats físico-químiques. El mètode més utilitzat és la liofilització. El procés de liofilització permet l'eliminació de l'aigua present a la mostra per un procés de sublimació. L'eliminació d'aigua de la formulació de les

nanopartícules, seguint cicles convenientment adequats i l'addició de crioprotectors en quantitat suficient, permet no tan sols aconseguir la restitució de les nanopartícules amb les propietats fisico-químiques originals, sinó també preservar-les gràcies a l'absència de l'aigua necessària pel creixement bacterià.

Els crioprotectors, com el manitol i la trehalosa, i alguns tipus de polietilenglicol, afavoreixen a més a més la redispersió de les nanopartícules, afegides a les concentracions adequades a la mostra prèviament a la seva liofilització (Abdelwahed *et al.*, 2006). Així es minimitza un dels inconvenients de la liofilització, que és la probable formació d'agregats d'escala micromètrica.

Una altra tècnica, alternativa a la liofilització, és l'atomització o *spray-drying*, en la qual la dispersió aquosa de nanopartícules es transforma en producte sec (Freitas i Muller, 1998). No és un mètode massa utilitzat, ja que el procés de l'atomització provoca la formació d'agregats a causa de les altes temperatures, les forces de cisalla i per una probable fusió parcial dels components, en funció del tipus de nanopartícules de què es tracti. En aquest context, quan es vol aplicar l'atomització com a mètode de preservació en nanopartícules lipídiques, el més adequat és utilitzar lípids amb punts de fusió per sobre de 70°C. Altres aproximacions, com l'ús de barreges etanol-aigua enlloc d'aigua únicament com a medi de dispersió, o l'addició de carbohidrats per al manteniment de la mida de partícula, també s'haurien de tenir en compte en l'aplicació d'aquest mètode de preservació en nanopartícules lipídiques (Sinha *et al.*, 2010).

Quan les nanopartícules estan dissenyades per a administració parenteral, s'han de sotmetre a un procés d'esterilització (Ekambaram *et al.*, 2012). La producció en condicions asèptiques, la filtració, la irradiació per raigs gamma i l'esterilització final per calor són passos a seguir per tal d'obtenir un producte final estèril. Tot i això, les variables del procés han de ser àmpliament investigades quant a les conseqüències que poden implicar en les característiques de les nanopartícules (Mehnert i Mäder, 2012).

4. TRANSFECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS PER MITJÀ DE SISTEMES NANOPARTICULATS

Els àcids nucleics per sí mateixos presenten una extremadament baixa eficiència de transfecció tant *in vitro* com *in vivo* a causa de factors diversos, amb la qual cosa la seva administració tal qual per a transfecció i regulació genòmica es veu molt limitada (Dash *et al.*, 2011). A més, els àcids nucleics administrats directament són fàcilment degradables per part d'enzims (DNasa i RNasa).

L'ús de nanopartícules com a sistemes vehiculitzadors no virals per a transferència d'àcids nucleics contempla diversos avantatges. Els protegeix de la degradació proteolítica enzimàtica i de l'opsonització, i es pot aconseguir direccionar-los cap a les cèl·lules diana i modular el seu alliberament intracel·lular (Parveen *et al.*, 2012; Vercauteren *et al.*, 2012)

4.1 FÍSICO-QUÍMICA I ESTRUCTURA DELS ÀCIDS NUCLEICS: DNA I RNA

Dins les cèl·lules, els nucleòtids esdevenen components amb una contribució indispensable en les reaccions implicades en el manteniment i propagació de la vida. Són elements moleculars amb una àmplia versatilitat quant a característiques físico-químiques i diversitat estructural. A més de participar en reaccions de transferència d'energia a nivell cel·lular, són especialment rellevants pel fet de formar, en la seva forma polimèrica, els àcids nucleics. Aquestes molècules són les responsables de l'emmagatzematge i descodificació del codi genètic (Voet i Voet, 2004).

Absolutament tota la varietat de proteïnes (formades per seqüències variades d'aminoàcids que es pleguen amb diferents conformacions espacials) implicades en els processos cel·lulars (proteïnes estructurals, funcionals, factors de transcripció, enzims, etc...) provenen de la descodificació de la seqüència nucleotídica dels àcids nucleics. Malgrat que la replicació d'aquestes molècules durant el cicle cel·lular -que permet la formació de noves cèl·lules idèntiques a les progenitores- disposa de mecanismes que assegurin la

fiabilitat del procés, eventualment es produeixen errors (mutacions) que poden donar lloc a alteracions del funcionament cel·lular i que en alguns casos deriven en malalties.

Els nucleòtids es componen d'una base nitrogenada i d'un sucre, la ribosa, que es troba fosforilada. En cas que aquesta ribosa no estigui fosforilada es parla de nucleòsid. A la figura 1 es mostren els noms de les bases, els nucleòsids i nucleòtids existents.

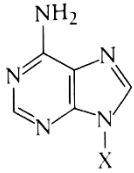
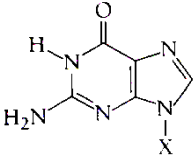
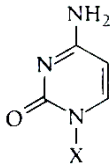
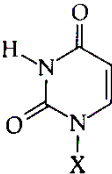
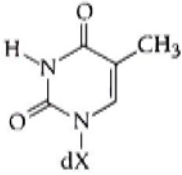
FÓRMULA BASE	BASE (X = H)	NUCLEÓSID (X = ribosa)	NUCLEÒTID (X = ribosa fosfat)
	Adenina Ade A	Adenosina Ado A	Àcid adenílic Adenosina monofosfat AMP
	Guanina Gua G	Guanosina Guo G	Àcid guanilínic Guanosina monofosfat GMP
	Citosina Cyt C	Citidina Cyd C	Àcid citidílic Citidina monofosfat CMP
	Uracil Ura U	Uridina Urd U	Àcid uridílic Uridina monofosfat UMP
	Timina Thy T	Deoxitimidina dThd dT	Àcid deoxitimidílic Deoxitimidina monofosfat dTMP

Figura 1. Estructures constituents dels àcids nucleics (DNA i RNA), amb les seves respectives denominacions abreujades (Voet i Voet, 2004).

INTRODUCCIÓ

A partir de la polimerització dels nucleòtids es formen el DNA, que és l'àcid desoxiribonucleic, i el RNA, que és l'àcid ribonucleic. Els noms provenen de la seva ubicació al nucli i de la naturalesa àcida de les molècules. En el DNA, la ribosa que conforma l'estructura ha perdut un àtom d'oxigen de l'hidroxil en posició 2', i per tant el sucre en aquest cas és la desoxiribosa.

Totes les cèl·lules contenen àcids nucleics que assegurin el seu funcionament i replicació, tant procariotes com eucariotes. Els virus també contenen a la seva estructura àcids nucleics per tal de poder-se replicar en la cèl·lula hoste.

A diferència de les cèl·lules procariotes, les cèl·lules eucariotes tenen el DNA confinat dins del nucli cel·lular (nDNA). Així mateix, també les mitocondries tenen DNA (mtDNA). En les cèl·lules procariotes, a més a més, existeix DNA cloroplastidial (ctDNA).

A la cèl·lula es poden trobar diverses categories d'àcids nucleics: nDNA, mtDNA, mRNA (RNA missatger), tRNA (RNA de transferència), etc., en dependència de la funció bioquímica, etapa de la divisió cel·lular o síntesi de proteïnes en què estiguin implicats (Russell, 1992).

Els àcids nucleics en solució aquosa exhibeixen càrrega negativa aportada pel grup fosfat unit al sucre. Aquesta propietat els confereix la capacitat d'unió a molècules de càrrega positiva per interacció electrostàtica, com en el cas de les nanopartícules catióniques dissenyades per al transport d'àcids nucleics.

El DNA del nucli cel·lular està format per nucleòtids units per enllaç fosfodièster en direcció 5' → 3' per formar cadenes que, mitjançant la complementarietat química que té lloc per mitjà de la formació de ponts d'hidrogen entre les diferents bases, es constitueixen en una estructura en doble hèlix (figura 2). Entre els nucleòtids successius també s'estableixen interaccions entre els orbitals pi (π) dels anells aromàtics presents a les bases (π -stacking), fet que confereix a l'estructura el nivell de més baixa energia des del punt de vista termodinàmic, i proporciona per tant màxima estabilitat al conjunt de l'estructura helicoidal. Aquesta estructura pot condensar-se en d'altres supraestructures. L'estat de condensació en què es trobi en el nucli dependrà de la fase del cicle cel·lular.

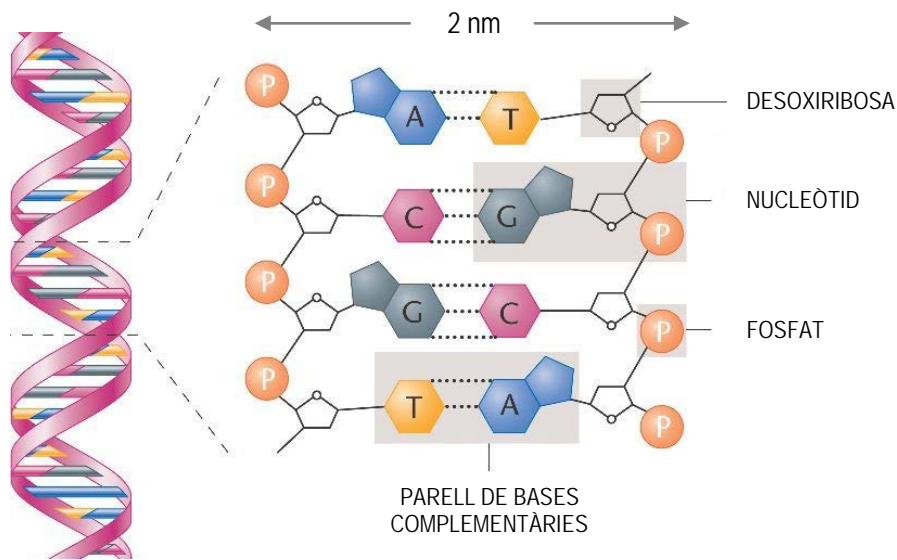


Figura 2. Estructura i composició de la doble hèlix de DNA (Klug *et al.*, 2003).

El procés de transcripció té lloc majoritàriament durant la fase G1 del cicle cel·lular, en el qual es sintetitza RNA en direcció 3' → 5' de cadena simple a partir del DNA nuclear, concretament de la cadena 5' → 3', que actua com a cadena motllo. Aquest RNA es diferencia del DNA en què la base és una desoxiribosa enlloc d'una ribosa, i les bases que s'enllacen per ponts d'hidrogen són citosina amb guanina, i adenina amb uracil, mentre que en el DNA l'adenina es complementa amb la timina (figura 3). El procés d'elongació s'inicia en determinades seqüències del DNA per l'acció de la RNA polimerasa. Aquest enzim requereix d'una petita seqüència preexistent de bases complementàries (*primer*) per poder iniciar el procés. Al mateix temps, l'enzim topoisomerasa modifica la topologia del DNA de manera que desfà la supraestructura condensada per a que el complex de transcripció es pugui anar desplaçant al llarg de la cadena, fins a arribar a una seqüència de bases indicadora de terminació de la transcripció, i on ocorre el desensamblatge del complex enzimàtic. El RNA de cadena simple resultat de la transcripció del DNA (mRNA) és sotmès a un procés de maduració (*splicing*), en què intervé un complex enzimàtic (*spliceosoma*), i que contempla l'eliminació dels introns (segments no codificants del DNA) i l'entroncament dels exons (segments

INTRODUCCIÓ

codificants). Posteriorment, un cop al citoplasma i a través de diversos processos, donarà lloc a RNA de transferència (tRNA) que finalment serà traduït a proteïnes en els ribosomes (Russell, 1992).

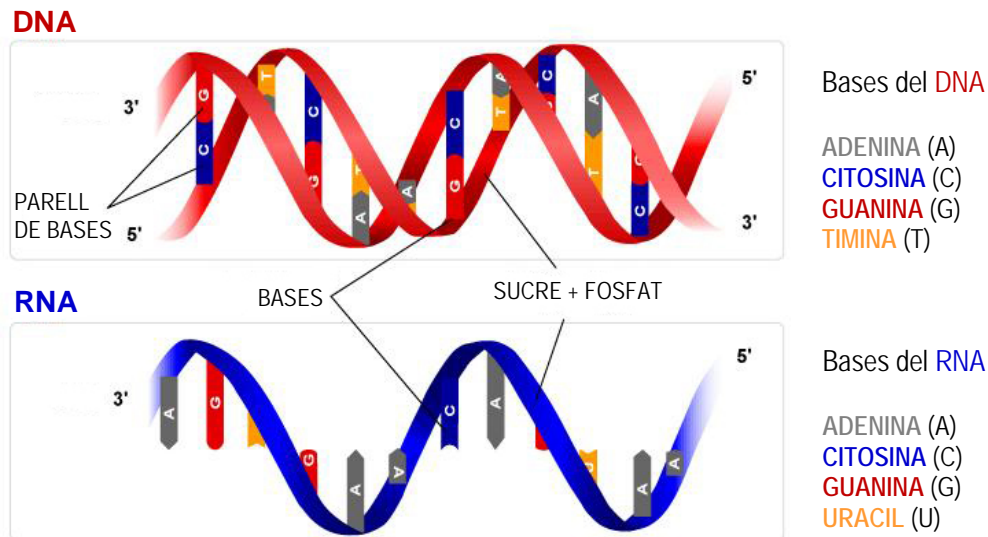


Figura 3. Molècules de DNA i RNA (PennState, Dept. Biol., Estats Units). En els quadres a la dreta s'indiquen les bases que conformen cadascuna d'elles.

4.2 ESTRATÈGIES PER A LA REGULACIÓ GENÒMICA A PARTIR DE LA TRANSFECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Des de fa alguns anys la teràpia gènica s'ha postulat com l'estratègia de futur per al tractament de determinades malalties incurables com el càncer, així com d'altres malalties genètiques. La vehiculització d'àcids nucleics terapèutics per mitjà de sistemes de transport no virals centra una part molt important de l'interès en recerca en nanobiomedicina. Es pot concloure a partir de nombrosos estudis la utilitat de diferents sistemes nanoparticulats per a la vehiculització tant de DNA com de RNA amb finalitats terapèutiques. En aquest context, l'esforç portat a terme des dels darrers anys no deixa d'augmentar, però encara continua sent un repte la millora tant de l'eficiència com la seguretat dels sistemes transportadors d'àcids nucleics (Scholz i Wagner, 2012).

4.2.1 pDNA I REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

El desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant ha permès donar resposta a l'interès dels genetistes per conèixer l'organització dels gens i la seva expressió. Aquesta tecnologia permet l'obtenció d'un o més gens de tots els que componen el genoma de la cèl·lula, en múltiples còpies: és el que s'anomena procés de clonació.

Per clonar un gen és necessari disposar d'un organisme hoste, on es pugui portar a terme aquesta replicació, i d'un vector de clonació: molècula de DNA amb capacitat replicadora que porta inserit un gen conegut o seqüència de DNA. Aquest conjunt constitueix un plasmidi. Els hostes acostumen a ser bacteris o llevats. Existeixen diversos tipus de vectors de clonació entre els que es troben els plasmidis (figura 4), els cosmidis i els bacteriòfags.

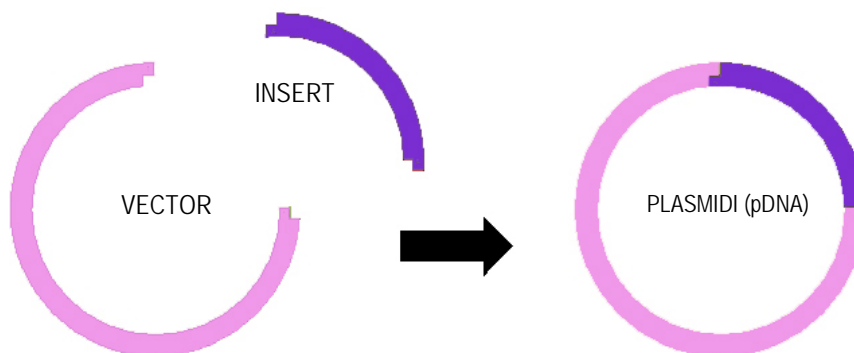


Figura 4. Exemple d'estructura plasmídica. El vector conté seqüències necessàries per a la replicació en cèl·lules hoste i posterior selecció de bacteris recombinants (The University of Queensland, Australia).

Els plasmidis estan constituïts per elements genètics extracromossòmics i amb capacitat autoreplicadora en cèl·lules procarïotes bacterianes. Estan formats per DNA circular de doble cadena, i en la seva seqüència disposen de les senyals d'origen de replicació, seqüències d'escissió per a enzims de restricció -gràcies als quals es talla el plasmidi per inserir la seqüència d'interès-, i elements addicionals, com ara gens de resistència a antibiòtics, per tal que es

INTRODUCCIÓ

puguin seleccionar aquells bacteris que hagin incorporat el plasmidi en el procés de transformació bacteriana.

La finalitat última de l'ús de plasmidis per a teràpia gènica és promoure la regulació genòmica de tal forma que s'aconsegueixi la restitució del funcionament del gen defectuós, ja sigui per falta d'expressió de la proteïna o per una proteïna defectuosa, a partir del transgen que constitueix l'insert del plasmidi.

En el context dels sistemes nanoparticulats per a transfecció d'àcids nucleics, cal tenir en compte diversos aspectes respecte al binomi nanopartícula-pDNA. El pDNA presenta una capacitat de condensació quan s'utilitzen nanopartícules catióniques com a sistema vehiculitzador que el fa apte per a assolir complexos nanopartícula-pDNA compatibles amb la possibilitat d'internalització per endocitosi. Posteriorment, el pDNA haurà de ser capaç d'escapar de l'endosoma sense patir degradació enzimàtica per part dels mecanismes dels que disposa la cèl·lula per evitar la intromissió d'elements estranys al seu sí, i arribar a travessar la membrana nuclear.

Finalment, cal remarcar que, a més del DNA plasmídic, existeixen altres sistemes de regulació genòmica fonamentats en el DNA, on s'hi inclouen els fragments de DNA transponibles per una banda, i per altra la generació d'oligodesoxinucleòtids antisentit (ODN) de cadena simple, per a la unió a mRNA i conseqüent bloqueig de la traducció (Wang i Gao, 2014; Scholz i Wagner, 2012).

4.2.2 siRNA I REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

A finals de la dècada de 1990 va aparèixer la tecnologia del iRNA (interfering RNA) com a nou sistema per a la regulació genòmica basada en el silenciament gènic. Aquesta estratègia, present en els éssers vius com a sistema inherent de regulació genòmica, es fonamenta en la capacitat que tenen les molècules sintètiques de iRNA - miRNA (microRNA), shRNA (short hairpin RNA) i siRNA (small interfering RNA)- per actuar a nivell post-

transcripcional i bloquejar la traducció de determinats mRNA a una proteïna concreta, en funció de la seqüència que continguin i que ha de ser complementària a la del mRNA d'un determinat gen (figura 5) (Haussecker, 2014). La tecnologia del siRNA està sent estudiada i aplicada àmpliament per molts grups de recerca com a mètode de regulació de l'expressió gènica, amb resultats prometedors (Haussecker, 2014; Lorenzer et al., 2015; Zhou et al., 2014). El siRNA és una molècula sintètica de doble cadena amb una llargada d'entre 20-25 parells de bases, complementàries a algun fragment del gen del qual es vol bloquejar l'expressió.

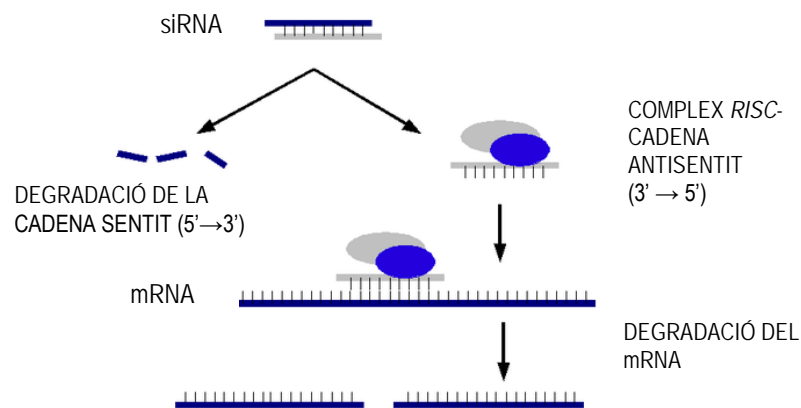


Figura 5. Mecanisme de funcionament d'un siRNA de 19 parells de bases. RISC fa referència a *RNA induced silencing complex*, un complex multiproteínic necessari per a l'acció del siRNA.

A nivell de transport per mitjà de nanopartícules, el siRNA, molt diferent quant a dimensions respecte a molècules de pDNA, no és necessari que presenti capacitat de condensació, ja que inclús més d'una molècula de siRNA pot unir-se a una sola molècula de transportador. A més, el recorregut intracel·lular del siRNA és menys complex, en el sentit que l'acció la porta a terme a nivell citoplasmàtic. El problema del siRNA radica en la protecció enfront la degradació per nucleases, donat que per la presència del grup hidroxil 2' de la ribosa és molt més sensible a l'acció d'aquests enzims que no pas el pDNA. Quan el sistema de vehiculització és l'adequat, contribueix a aquesta protecció per impediment estèric en la unió de les nucleases (Scholz i Wagner, 2012).

5. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES CATIÒNIQUES

Dins de l'ampli ventall de sistemes nanoparticulats (nanopartícules ceràmiques, magnètiques, metàl·liques...), les nanopartícules polimèriques constitueixen un dels grups més nombrosos i estudiats.

Les nanopartícules polimèriques estan constituïdes per polímers de naturalesa variada. Entre ells es troben l'àcid polilàctic (PLA), l'àcid poliglicòlic (PGA), l'àcid polilàctic-co-glicòlic (PLGA), poliecaprolactona i polimetil metacrilat.

Els mètodes de preparació de nanopartícules polimèriques s'engloben en dos grans grups: els que es fonamenten en la polimerització de monòmers i els que consisteixen en una dispersió del polímer (Mishra *et al.*, 2010).

El potencial terapèutic d'aquesta classe de nanopartícules radica en la possibilitat de modificació de la càrrega superficial i la funcionalització amb diferents lligands (Parveen *et al.*, 2012).

5.1 NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES CATIÒNIQUES DE QUITOSAN-TRIPOLIFOSFAT

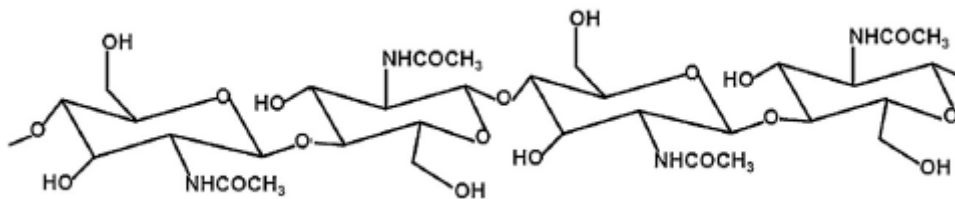
Les nanopartícules polimèriques basades en quitosan, concretament les nanopartícules polimèriques catióniques formades a partir de quitosan i tripolifosfat (quitosan-TPP) s'han constituït en un dels sistemes nanoestructurats més àmpliament tractats en estudis científics com a sistema no viral de transport d'agents terapèutics, ja siguin fàrmacs o àcids nucleics.

QUITINA I QUITOSAN

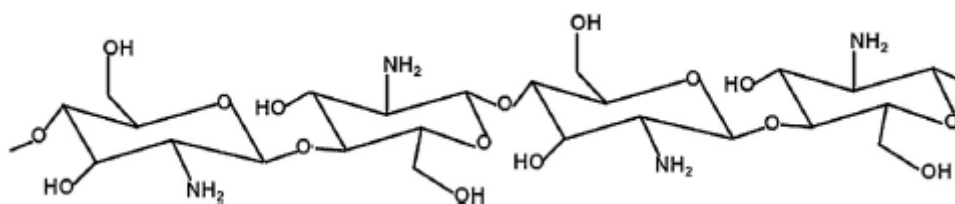
El quitosan és un biopolímer d'origen natural derivat de la quitina. La quitina és el segon biopolímer natural més important del món després de la cel·lulosa (Rinaudo, 2006). Ambdós polímers són biodegradables i biocompatibles, i es poden sotmetre a processos per donar lloc a diferents estructures d'ús terapèutic, com ara l'obtenció, juntament amb tripolifosfat sòdic (TPP), de

nanopartícules polimèriques catióniques com a vectors no virals per a l'alliberament de fàrmacs i transferència gènica (Anitha *et al.*, 2014; Bulmer *et al.*, 2012; Fan *et al.* 2012).

Tant la quitina com el quitosan són dos aminopolisacàrids lineals (figura 6). La quitina està constituïda per poli β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina. És sintetitzada en un alt nombre d'éssers vius. La principal font a nivell comercial són els exosquelets d'artròpodes com les gambes i els crancs. L'extracció comprèn un tractament amb carbonat càlcic seguit d'un tractament alcalí que té com a objectiu solubilitzar el contingut proteic. A partir del grau de puresa obtingut, la quitina es classifica en diferents categories d'acord als usos previstos. La quitina és pràcticament insoluble, aspecte que comporta certa problemàtica enfront el processat i usos posteriors (Pillai *et al.*, 2009; Rinaudo, 2006).



QUITINA



QUITOSAN

Figura 6. Estructura química de la quitina i el quitosan (Anitha *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓ

La quitina pot ser desacetilada, en estat sòlid, per tractament amb hidròxid sòdic (NaOH) o per hidròlisi enzimàtica a través de l'enzim quitina deacetilasa (Jayakumar *et al.*, 2010).

Quan s'assoleix un grau de desacetilació al voltant del 50% s'obté quitosan com a producte derivat, el qual és soluble en medi àcid. Està constituït per unitats de D-glucosamina i N-acetil-D-glucosamina distribuïdes aleatòriament, amb enllaços β -(1→4) Tanmateix, el grau d'acetilació de la quitina pot variar en funció del producte d'origen (el grau d'acetilació típic se situa al voltant del 90%) de manera que aquest fet, juntament amb les condicions experimentals, contribuirà a l'obtenció de diferents tipus de quitosan en funció del percentatge de desacetilació que presenten (Kumar, 2000).

Per tant, tot i tractar-se d'un polímer d'origen natural, el quitosan presenta alguns desavantatges: el grau de puresa del producte final pot variar notablement en funció del procés d'extracció i purificació, que també determinarà el seu pes molecular. L'altre factor important és el percentatge de desacetilació, que determinarà el grau de solubilitat (Younes *et al.*, 2014).

Les nanopartícules de quitosan-TPP presenten una mida de fins a 1000 nm i un potencial zeta positiu entre +20 mV i +60 mV (Calvo *et al.*, 1997). Atès que estan ideades per a la seva administració *in vivo*, no pot quedar cap resta de residu potencialment perillós del procés d'obtenció que pugui suposar un risc per a la seguretat de l'organisme en el que seran administrades. Per aquest motiu, el sistema d'obtenció es perfila com una característica crítica.

5.1.1 APLICACIONS TERAPÈUTIQUES

A nivell d'aplicacions nanobiomèdiques, cal destacar el potencial de nanopartícules basades en el polímer quitosan, que abasta un ampli ventall d'accions terapèutiques, entre les quals hi ha les següents (García-Fuentes *et al.*, 2012; Ramana *et al.*, 2014; Balan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014):

- Immunització mitjançant el transport d'antígens.
- Transport i alliberament de fàrmacs a nivell ocular, dèrmic i cerebral.
- Absorció de pèptids a través de mucoses (nasal / oral).
- Transport i alliberament de fàrmacs antineoplàstics.
- Transport i alliberament de material genètic.

Pel que fa al darrer punt, i en el context de la medicina actual i com ja s'ha comentat, la teràpia gènica s'està convertint en una alternativa real per al tractament i curació de determinades malalties. Hi ha dues aproximacions utilitzades per realitzar transfecció i regulació genòmica amb finalitats terapèutiques: l'ús de vectors virals amb una òptima eficiència de transfecció però alta immunogenicitat *in vivo* per una banda, i per altra banda, vectors no virals, entre els quals s'hi troben les nanopartícules polimèriques catióniques de quitosan-TPP com un dels més investigats. Els resultats obtinguts en l'ús de vectors no virals fins el moment són modestos, però un aspecte a favor té a veure amb la baixa toxicitat i immunogenicitat d'aquests sistemes (Dash *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2015).

El quitosan de baix pes molecular (LMW, de l'anglès *low molecular weight*) és el més adequat pel seu ús com a vector no viral per transfecció gènica, especialment pel que fa a l'eficiència de transfecció (Kong *et al.*, 2012).

És important posar de relleu que la variabilitat present en el quitosan de partida determinarà sens dubte les característiques de les eventuais nanopartícules derivades que s'obtinguin.

5.1.2 MÈTODES D'OBTENCIÓ

Existeixen una àmplia varietat de mètodes per a l'obtenció de diferents tipus de nanopartícules que contenen quitosan com a component matricial (Grenha, 2012):

- Emulsificació i entrecreuament
- Emulsificació per coalescència de gotícules
- Emulsificació per difusió de solvents

INTRODUCCIÓ

- Micel·lització reversa
- Complexació polielectrolítica
- Desolvatació
- Gelificació ionotròpica
- Gelificació ionotròpica modificada amb polimerització de radicals

De tots ells, el mètode de la gelificació ionotròpica és un mètode senzill, perfectament assequible a nivell tecnològic i el més freqüentment utilitzat per a l'obtenció de nanopartícules polimèriques de quitosan-TPP.

En l'obtenció de nanopartícules de quitosan-TPP per mitjà del mètode de la gelificació ionotròpica no es requereix l'addició de dissolvents orgànics a diferència d'altres mètodes, per la qual cosa s'evita el problema de l'eliminació crítica d'aquests residus, prèvia a l'administració en organismes vius (Dash *et al.*, 2011).

5.1.2.1 Obtenció per gelificació ionotròpica

Aquest mètode es basa en la capacitat del quitosan amb alt grau de protonació dels seus grups amino per formar hidrogels en presència de petites molècules de polianions (figura 7). Aquests últims actuen com a mediadors per a la formació d'entrellaçaments inter i intramoleculars per part de les molècules de quitosan.

Aquest mètode es pot dur a terme en un entorn totalment hidrofílic utilitzant tripolifosfat com a polianió per aconseguir l'entrecreuament del quitosan (Calvo *et al.*, 1997).

La formació de les nanopartícules té lloc de forma immediata després de l'addició gota a gota de la solució de tripolifosfat a la de quitosan solubilitzat en medi àcid, sota agitació mecànica i a temperatura ambient. L'agitació es manté un temps més per estabilitzar la suspensió i seguidament es filtra. El temps d'addició del tripolifosfat, la velocitat d'agitació i el temps total de reacció són variables del procés que influeixen en la distribució de grandària de partícula (Fàbregas *et al.*, 2013). Opcionalment, i amb posterioritat al filtrat, la suspensió

obtinguda es centrifuga per fer precipitar les nanopartícules, que poden resuspendre's posteriorment en aigua.

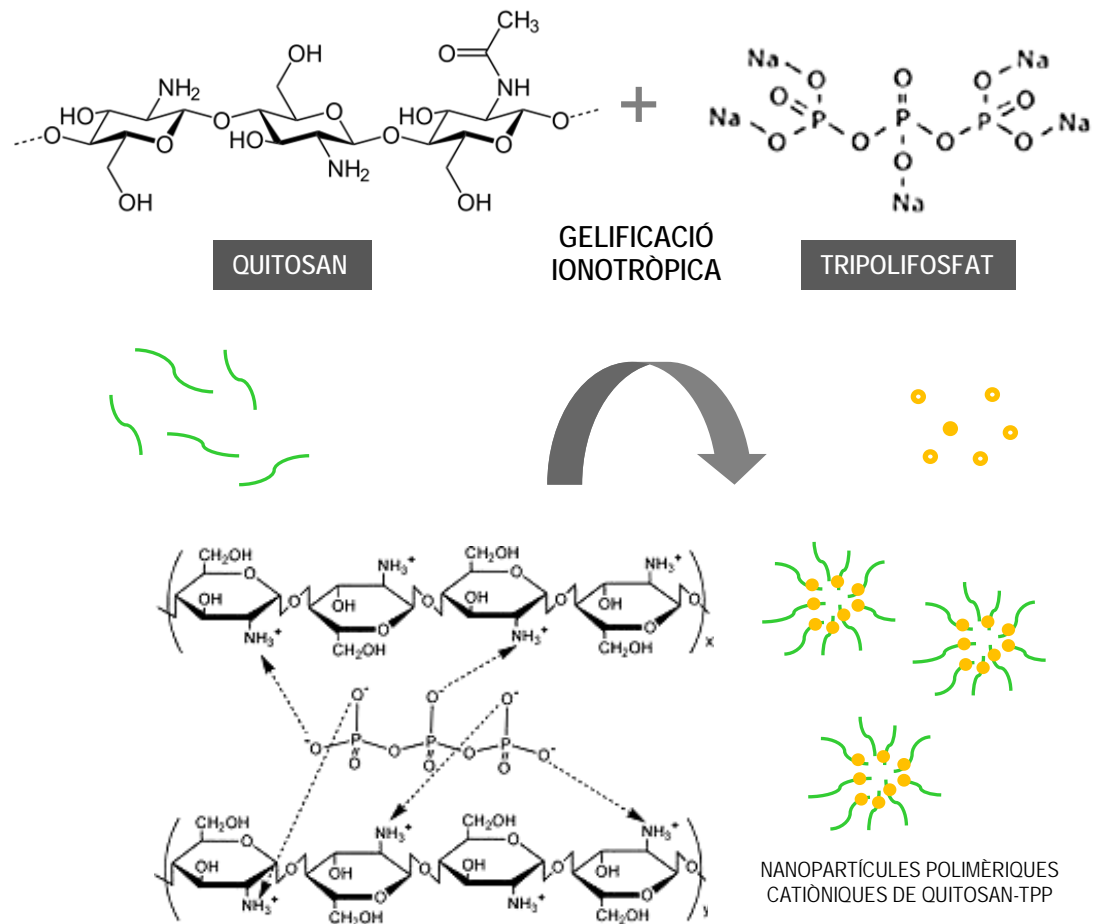


Figura 7. Entrecreuament de quitosan i tripolifosfat (gelificació ionotròpica) per donar lloc a nanopartícules polimèriques catióniques pel mètode de la gelificació ionotròpica.

5.1.3 NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN COM A SISTEMES VEHICULITZADORS ENFRONT D'ALTRES SISTEMES NANOESTRUCTURATS

Entre els avantatges concrets d'utilitzar el quitosan com a polímer en sistemes vehiculitzadors nanoparticulats, s'hi pot trobar la biocompatibilitat, l'activitat antimicrobiana intrínseca del quitosan (Dash *et al.*, 2011), la facilitat d'incorporació de diversos tipus de fàrmacs: antiinflamatoris, antibiòtics, antitrombòtics, esteroids, proteïnes, antineoplàstics, etc. i la possibilitat

INTRODUCCIÓ

d'alliberament controlat d'aquests. Com a agents de transfecció de DNA i RNA, aquestes nanopartícules són útils per la facilitat d'unió a aquestes molècules, i per tant com a aplicació per a teràpia gènica.

De forma anàloga a altres sistemes nanoparticulats i gràcies a les seves dimensions, les nanopartícules de quitosan poden travessar els capil·lars fins a penetrar els teixits, on s'hi espera que portin a terme l'acció terapèutica per a la qual han estat dissenyades (Mukhopadhyay *et al.*, 2012; Ragelle *et al.*, 2014; Vauthier *et al.*, 2013).

Un dels majors inconvenients que es pot atribuir a aquestes nanopartícules és la baixa capacitat de transfecció comparada amb vectors virals, malgrat totes les problemàtiques associats a aquests últims. Les causes són diverses. Durant el procés d'obtenció, poden aparèixer problemes relacionats amb fenòmens d'agregació. La mida de partícula, a vegades excessiva i conseqüència de la polidispersió de les nanopartícules, i els diferents mecanismes de captació i processat per part de la cèl·lula en són en part responsables, així com la càrrega superficial, que està implicada en l'habilitat per condensar adequadament el DNA o RNA i interaccionar amb la superfície cel·lular.

És clau, per tant, la capacitat de modulació tant de la mida de partícula com de la càrrega superficial de les nanopartícules de quitosan-TPP, ja que determinaran en gran mesura l'eficiència de transfecció. Tot i la dificultat associada a la variabilitat del quitosan, aquestes propietats haurien de poder ser modelables en el procés de fabricació, de forma que es generi un rendiment alt amb nanopartícules de característiques fàcilment reproduïbles i físicament estables al llarg del temps (Gan *et al.*, 2005).

L'aparició d'altres sistemes com les nanopartícules lipídiques sòlides, ha contribuït a superar algunes dels desavantatges inicialment detectats en l'ús de les nanopartícules polimèriques (de Jesús i Zuhorn, 2015).

5.1.4 MECANISME DE FORMACIÓ DE POLIPLEXOS QUITOSAN-TPP:DNA

La capacitat de les nanopartícules de quitosan-TPP per transferir material genètic ha estat demostrada *in vitro* i *in vivo* per nombrosos treballs d'investigació duts a terme al llarg dels darrers anys (Csaba, 2009; Mao, 2010). Tant l'afinitat per interaccionar electrostàticament i per tant unir-se a les càrregues negatives de molècules de pDNA/siRNA, de forma que es generen associacions anomenades poliplexos (Gan *et al.*, 2005), així com la facilitat per travessar la membrana cel·lular, confereixen a aquest tipus de nanopartícules les característiques adequades per a aquesta aplicació terapèutica. A més, s'afegeix el fet que, donada la capacitat tamponadora de pH del quitosan, es facilita el procés d'escapament endosomal després de l'endocitosi d'aquestes nanopartícules (García-Fuentes, 2012).

La unió entre les nanopartícules constituïdes per polímers, com les de quitosan-TPP, i l'àcid nucleic d'interès pot donar-se de dues formes:

- Un cop sintetitzades les nanopartícules, aquestes s'incuben amb l'agent a transfectar, DNA o RNA.
- Incorporació del DNA o RNA en alguna etapa durant la síntesi.

En ambdós casos, cal aconseguir la formació del poliplex, el complex en què es mantenen units l'agent a transfectar i la nanopartícula.

L'eficiència de càrrega de la nanopartícula vindrà definida per diferents variables, des del pes molecular del quitosan, la concentració tant de quitosan com de TPP fins a les variables operatives del mètode que influeixen la pròpia formació de les nanopartícules (Gan i Wang, 2007).

6. NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES

Constituïdes per components lipídics molt diversos, poden formar estructures variades: liposomes, vesícules multilaminars, vesícules unilaminars, nanopartícules lipídiques sòlides, transportadors lipídics nanoestructurats, etc. Ara per ara, les nanopartícules lipídiques es consideren com el millor sistema de transport de fàrmacs a nivell sistèmic (Lin *et al.*, 2012).

Les diverses estructures de les nanopartícules lipídiques venen determinades per la naturalesa dels components. Els lípids amfifílics tenen la capacitat de formar vesícules esfèriques, com els liposomes, en solució aquosa. Altres lípids, com els fosfolípids, poden estructurar-se de manera que es maximitzin les interaccions hidrofòbiques, en què s'expulsa l'aigua de la part lipídica.

Aquesta propietat és aprofitada en l'ús de lípids catiónics per a que exposin les seves càrregues presents en l'extrem hidrofílic, per tal que pugui tenir lloc la unió a DNA/RNA quan aquest és l'objectiu del sistema nanoestructurat (Bessodes i Mignet, 2013).

6.1 NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES (SLN)

Les nanopartícules lipídiques sòlides (SLN) estan formades per una matriu composta d'un o més lípids sòlids tant a temperatura ambient com fisiològica, dispersats en una solució aquosa amb un o diversos tensioactius que estableixen la formulació (Martins *et al.*, 2012).

Les SLN van ser introduïdes l'any 1991 com un sistema de transport de fàrmacs alternatiu als sistemes clàssics de vehiculització com les emulsions clàssiques, liposomes i micro i nanopartícules polimèriques. Les SLN combinen els avantatges dels sistemes tradicionals però en canvi eviten algunes dels seus majors desavantatges, com ara el fet que s'evita la necessitat d'utilitzar solvents orgànics en la seva producció (Abbasalipourkabir, 2011; Hou *et al.*, 2003). Es poden administrar a través de diverses rutes (tòpica, nasal, ocular, intravenosa, oral, etc). Altres avantatges de les SLN són la capacitat d'atrapar

al seu interior fàrmacs hidròfils o hidrofòbics en la matriu lipídica i permetre l'alliberament modificat (ja sigui sostingut o retardat), en funció dels lípids utilitzats en la formulació, i s'evita alhora la degradació prematura del fàrmac incorporat. Pel fet que els lípids constituents d'aquests sistemes són compatibles fisiològicament i reconeguts com a segurs, el risc de toxicitat aguda i crònica es redueix considerablement (Martins *et al.*, 2012).

Originàriament, les SLN van aparèixer com a resposta als problemes d'estabilitat de liposomes i nanoemulsions quant a la seva estabilitat i capacitat d'alliberament del principi actiu, i simultàniament per presentar una millor tolerància que les nanopartícules polimèriques (Doktorovova *et al.*, 2014). Els excipients, en aquest cas els components que constitueixen la nanopartícula, es consideren segurs, amb una toxicitat menor que la de certes nanopartícules polimèriques. Si bé tots els sistemes col·loïdals de transport de fàrmacs són aptes per a l'administració de fàrmacs poc solubles, la capacitat de perllongar l'alliberament de l'agent terapèutic i l'estabilitat de les formulacions en comparació amb d'altres sistemes, juntament amb la possibilitat de producció a gran escala per mitjà de mètodes segurs i robustos, donen a les SLN un marge superior de fiabilitat, i les transformen en un sistema nanoestructurat molt prometedor (Kumar i Randhawa, 2013). Així mateix, la producció a gran escala és cost-efectiva i precisa d'una tecnologia relativament simple si s'utilitza l'homogeneïtzació a alta pressió com a mètode de producció de SLN. Com a alternativa, també és factible la seva producció per mitjà de l'obtenció de microemulsions (Fadda *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014).

En funció del mètode de preparació i la composició, el diàmetre mitjà de les SLN oscil·la entre 50 i 300-400 nm (Bunjés, 2011).

Aquest sistema nanoestructurat permet, en el cas de SLN catióniques (cSLN), la unió a diferents tipus d'àcids nucleics, que faciliten el transport fins a cèl·lules diana, on poden actuar en la regulació de l'expressió gènica o a nivell post-transcripcional (Cortesi *et al.*, 2014; de Jesús i Zuhorn, 2015). Així doncs, quan s'utilitzen SLN com a vectors d'àcids nucleics, la superfície de les SLN ha d'estar carregada positivament mitjançant la incorporació de components

INTRODUCCIÓ

catiònics a la formulació de SLN. Per diferenciar-les de les SLN no catiòniques, s'acostuma a referir-se a les nanopartícules lipídiques sòlides catiòniques amb les sigles cSLN. A continuació, els àcids nucleics, amb una estructura carregada negativament, són capaços d'adsorbir-se a la superfície de les nanopartícules a través d'interaccions iòniques (Kumar i Randhawa, 2013; Pedersen *et al.*, 2006). Un aspecte clau és aconseguir unes cSLN amb la màxima càrrega positiva possible, es permet d'aquesta forma una unió òptima de l'àcid nucleic (Doktorovova *et al.*, 2011; Vighi *et al.*, 2010).

Les cSLN es sintetitzen a partir d'una gran varietat de components (figura 8). Les variacions qualitatives i quantitatives en la producció de cSLN han posat de relleu l'àmplia gamma de propietats que existeixen en aquest tipus de producte (Ekambaram *et al.*, 2012; Mehnert i Mäder, 2001; Müller *et al.*, 2000). La situació ideal és fer possible la vehiculització d'àcids nucleics a partir d'una formulació amb el mínim de components possible i sense comprometre les propietats que els fan adequats per a l'ús previst. Per tant, cal intentar optimitzar el procediment de síntesi pel que fa a aquests aspectes. Com en moltes altres situacions, activitats o processos, la innocuïtat d'una substància, en aquest cas dels excipients o lípids emprats, està relacionada amb les quantitats considerades alhora de formular aquests sistemes. Per això, quantitats excessives dels components de la formulació poden donar lloc a un major grau de toxicitat cel·lular (Abbasalipourkabir *et al.*, 2011; Heydenreich *et al.*, 2003; Vighi *et al.*, 2013). Aquest fet es pot resoldre amb l'estudi de com el component susceptible de causar una major toxicitat pot ser reduït en la fórmula de partida de manera que la viabilitat cel·lular no es vegi compromesa però mantenint les propietats de les cSLN.

S'ha demostrat que alguns lípids catiònics poden ser tòxics en certes proporcions, depenent de la seva estructura química (Tabatt *et al.*, 2004). El mateix s'aplica a concentracions de tensioactiu, ja que un excés podria conduir a la mort cel·lular per desintegració de la membrana (Severino *et al.*, 2011). Conseqüentment, cal evitar una gran quantitat de components en la fórmula. És per tot això que el desenvolupament de vectors no virals eficaços i biocompatibles per a la regulació genòmica segueix sent un repte, i fer-los tan simples com sigui possible ha de ser el primer pas del procés.

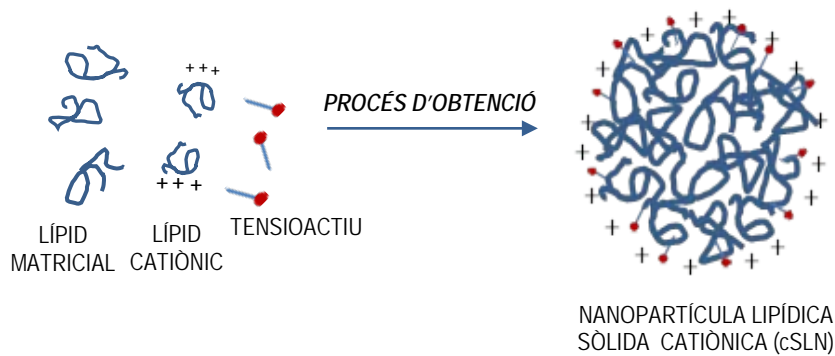


Figura 8. Formació de nanopartícules lipídiques sòlides catióniques a partir de precursors.

Tot i la bona tolerància fisiològica de les SLN, l'èxit al llarg dels anys com a sistema de transport de fàrmacs es pot considerar moderat, atenent al nombre de productes d'aquest tipus presents actualment al mercat (Haussecker, 2014; Wang i Gao, 2014). Una de les raons d'aquest fet és la inestabilitat física del sistema que pot provocar el fàrmac incorporat, així com les transicions polimòrfiques que pot patir la xarxa cristal·lina dels lípids de les SLN, fet característic de l'estat sòlid, i que pot acabar expulsant el fàrmac de la nanopartícula (Doktorovova *et al.*, 2011).

A aquest fet s'hi sumen alguns altres inconvenients que podrien dificultar l'aplicació efectiva d'aquestes noves formes de dosificació i que cal superar: Aconseguir un diàmetre de partícula òptim és difícil, amb tendència a la polidispersió i agregació durant l'emmagatzematge a curt i mig termini. A més, s'obté una baixa concentració de SLN, depenent de la metodologia de producció, encara que algunes tècniques, com ara la liofilització, ajuden a concentrar el producte final.

Malgrat tot, s'espera que la investigació actual en aquest camp avanci per tal de superar aquestes desavantatges. Cal també seguir ampliant el coneixement dels mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en la captació i internalització de cSLN per cèl·lules (Beddoes *et al.*, 2015; Zabner *et al.*, 1995).

6.1.1 SISTEMES PRECURSORS DE LES SLN. EMULSIONS O/W. MICROEMULSIONS

Les emulsions són un tipus de sistemes dispersos consistents en dos líquids immiscibles. Les gotes de líquid de la fase dispersa es troben en un medi líquid (fase contínua). Es poden distingir diverses classes d'emulsions, com ara oli en aigua (O/W), aigua en oli (W/O) i oli en oli (O/O).

Per dispersar dos líquids immiscibles es necessita un tercer component, és a dir, un agent emulsificador. L'elecció de l'emulsificador és crítica per a la formació de l'emulsió i la seva estabilitat a llarg termini.

Les emulsions es poden classificar en funció de la naturalesa del emulsificador o l'estructura del sistema. Els emulsificadors més efectius són els tensioactius no iònics, emprats per emulsificar oli en aigua o aigua en oli. A més, permeten l'estabilització de l'emulsió contra la floculació i la coalescència. Els tensioactius iònics es poden emprar també per aconseguir aquests tipus d'emulsions, però el sistema resultant és sensible a la presència d'electròlits. La barreja de diferents tipus de tensioactius (iònics amb no iònics, o diversos tipus de no iònics) millora la capacitat emulsificadora del sistema, així com la seva estabilitat.

Els polímers no iònics, com ara els *Pluronic*s, són més efectius en l'estabilització de les emulsions, però per contra dificulten el procés d'emulsificació, llevat que s'apliqui al procés una alta energia perquè es produeixi la formació de l'emulsió (Tadros, 2013).

Les emulsions O/W (oli en aigua) a partir de les quals deriven les SLN van ser introduïdes en clínica en la nutrició parenteral en la dècada dels 50 del segle passat. L'objectiu d'aquelles emulsions era reduir els efectes adversos a causa de l'administració; per exemple, el dolor i la inflamació en el lloc d'injecció.

El concepte de microemulsió es va introduir per primera vegada al començament de la dècada de 1940. Una emulsió és un sistema dispers cinèticament estable, però fonamentalment inestable des del punt de vista

termodinàmic, amb el resultat final de separació de fases. Quant a l'aspecte, les emulsions tenen una aparença lletosa. A diferència de les emulsions pròpiament, les microemulsions (també anomenades emulsions micel·lars) presenten més aviat un aspecte opalescent o translúcid (Tadros, 2013). Són termodinàmicament estables, òpticament isotròpiques i amb una mida de gotícula que pot ser controlada en el moment de la emulsificació (Garzón *et al.*, 2008). Resulten d'alt interès científic perquè poden constituir-se en vectors per transferència gènica o com a transportadors d'una àmplia varietat de fàrmacs.

Ambdues es diferencien també pel mètode d'obtenció; mentre que les emulsions requereixen d'un alt subministrament d'energia per a la seva formació, les microemulsions no són tan exigents des del punt de vista energètic (Lawrence i Rees, 2012).

6.2 COMPOSICIÓ LIPÍDICA DE LES CSLN. LÍPIDS MATRICIALS, LÍPIDS CATIÒNICS I TENSIOACTIUS

Existeixen diverses variables de la formulació que tenen incidència en la grandària de partícula i estabilitat del producte obtingut. Independentment de la influència del mètode de producció, és indiscutible la importància de la composició lipídica i dels emulsificadors utilitzats.

La composició lipídica (figura 9) de les SLN pot ser molt variable i variada (Doktorovova *et al.* 2014; Rostami *et al.*, 2014). Alguns dels lípids més comunament utilitzats són:

Triglicèrids (trilaurina, tripalmitina, tricaprina, trimiristina, tristearina, cocoglicèrids hidrogenats (Softisan® 142)).

Diversos tipus d'àcids grassos: Witepsol® W 35, Witepsol® H 35, Witepsol® H 42, Witepsol® E 85, Glyceryl monostearate (Imwitor®900) (Glyceryl behenate (Compritol® 888 ATO), Glyceryl palmitostearate (Precirol® ATO 5) àcid esteàric, palmític, decanoic, behènic, cetilpalmitat, Acidan N12 (Mehnert, 2012).

INTRODUCCIÓ

En el cas de les nanopartícules lipídiques sòlides catióniques (cSLN), cal que la seva composició contingui un o més lípids capaços d'assegurar la càrrega catiónica suficient per tal que la nanoestructura pugui interaccionar amb les càrregues negatives dels àcids nucleics. Aquests lípids són de tipus amfifílic (figura 10). La seva estructura ha de permetre que la part lipòfila repel·leixi l'aigua, mentre que la part hidròfila ha de poder quedar exposada de forma que les càrregues catióniques interaccionin electrostàticament amb els fosfats aniònics dels àcids nucleics. Aquesta conformació del lípid coincideix amb el seu estat termodinàmic de més baixa energia i, per tant, més estable (Bessodes i Mignet, 2013). Poden tenir una o dues cadenes alifàtiques, i una o més càrregues catióniques (Bondi i Capraro, 2010).

Un factor que contribueix al grau de toxicitat que poden exhibir les cSLN és el lípid catiónic utilitzat. Els lípids catiónics de dues cadenes alifàtiques semblen augmentar la viabilitat cel·lular a diferència del lípids catiónics d'una sola cadena alifàtica (Tabatt *et al.*, 2004).

Però la toxicitat no depèn únicament del lípid catiónic i de la seva contribució a la fórmula. També la quantitat de tensioactiu a la fórmula o el mètode de producció de les cSLN són variables a tenir en compte (Heidenreich *et al.*, 2003).

Els tensioactius (figura 11) són compostos que tenen la capacitat de disminuir la tensió superficial existent entre dos fases, ja siguin dos líquids o un líquid i un sòlid. Els tensioactius actuen permetent la formació d'una emulsió com a pas previ per a l'obtenció final de nanopartícules lipídiques sòlides. La capacitat emulsionant dels tensioactius i la seva concentració a la fórmula afecten la grandària de partícula que s'obté. El més freqüent és que amb una major quantitat de tensioactiu (o barreja de tensioactius) es poden aconseguir nanopartícules de menor grandària, ja que al disminuir la tensió superficial es provoca la separació de les partícules i s'incrementa la superfície (Ekambaram *et al.*, 2012). En la producció de SLN es poden utilitzar diferents tipus de poloxàmers i polisorbats, lecitina, fosfatidilcolina, taurocolats, etc. (figura 11).

S'ha constatat que determinats tensioactius poden modular les transicions polimòrfiques que tenen lloc en el nucli lipídic de les SLN, de forma que sigui possible una major estabilització de l'ordre cristal·lí (de Jesús i Zuhorn, 2015).

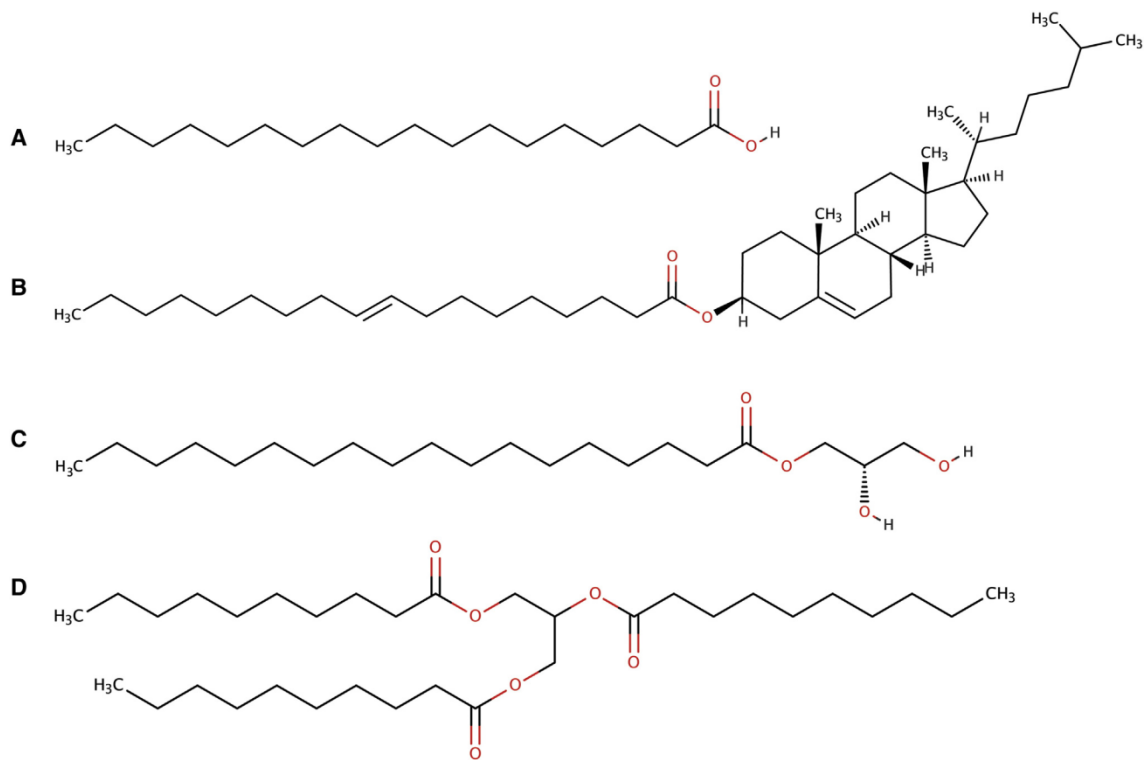


Figura 9. Exemples de lípids utilitzats en la producció de cSLN: àcid esteàric (A), colesterol oleat (B), monoestearat de gliceril (C) i tricaprina (D) (de Jesús i Zuhorn, 2015).

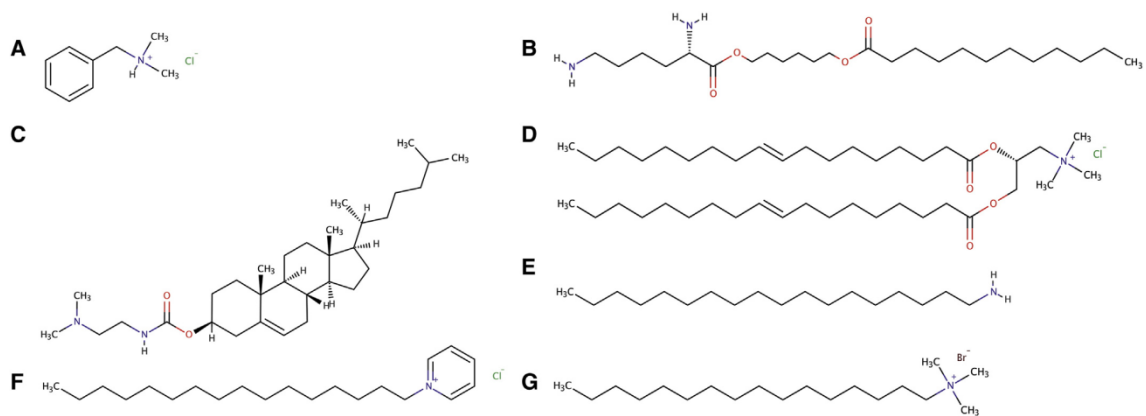


Figura 10. Estructures químiques de lípids catiónics en formulacions de cSLN: : a) clorur de benzalconi (A), 6-lauroxiexil lisinat (B), DC-Chol (C), DOTAP (D), octadecilamina (E), clorur de cetilpiridini (F) i cetrimida (G) (de Jesús i Zuhorn, 2015).

INTRODUCCIÓ

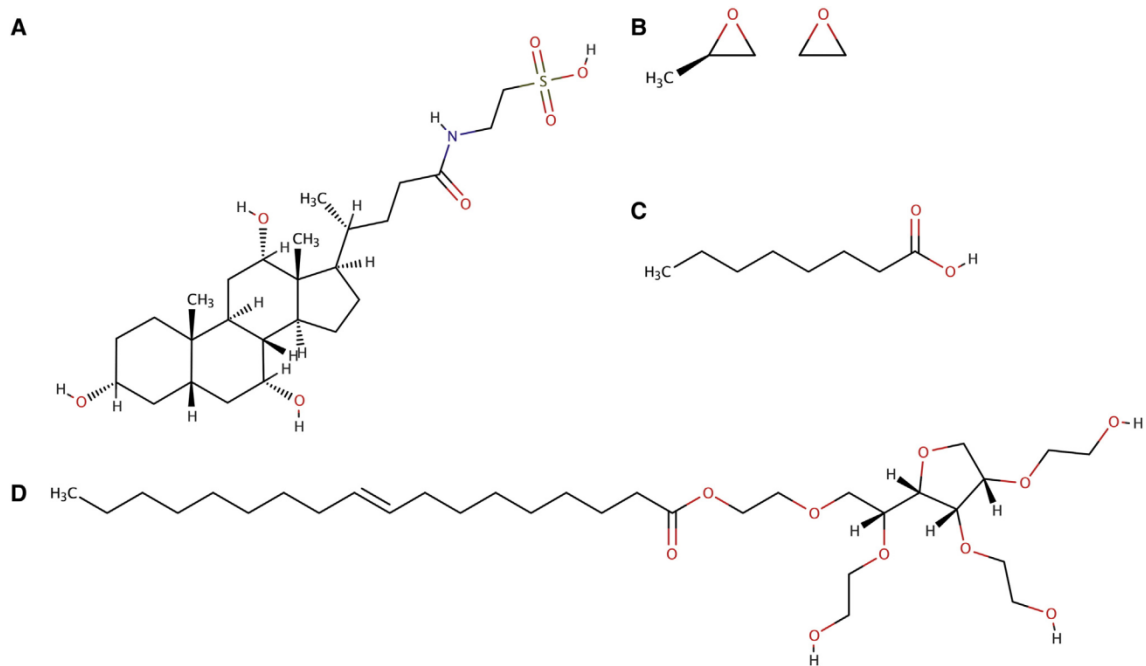


Figura 11. Estructures químiques corresponents a diferents tensioactius utilitzats en formulacions de cSLN: taurocolat (A), Poloxamer 188 (copolímer de bloc de polioxietilè–polioxipropilè)(B), àcid octanoic (C) i Polisorbat 80 (D) (de Jesús i Zuhorn, 2015).

6.3 ESTAT SÒLID I TRANSICIONS POLIMÒRFIQUES

La cristal·lització és el procés pel qual una massa fosa es converteix en un sòlid, en què les molècules entren primer en contacte i després s'orienten i interaccionen, conformant estructures ordenades.

Un aspecte a tenir en compte quan es sintetitzen nanopartícules lipídiques sòlides per encapsulació de fàrmacs és el fenomen de les transicions polimòrfiques que pateix l'estructura lipídica un cop cristal·litzada, i que pot acabar resultant en l'expulsió del fàrmac de dins de l'estructura de la nanopartícula (Bunjes, 2011).

Pel que fa als lípids, ha estat majoritàriament gràcies als estudis de difracció de raigs X que se n'ha pogut conèixer l'estructura cristal·lina. Altres tècniques

també hi han contribuït, especialment l'obtenció d'imatges per ressonància magnètica nuclear.

L'estat cristal·lí es caracteritza pel fet que els àtoms o molècules presenten estructures rígides tridimensionals, ordenades i repetibles. El conjunt d'aquesta estructura s'anomena xarxa espacial, i es caracteritza per unes distàncies reticulars concretes.

En el cas de barreges de diferents lípids, els cristalls que es formen contenen, per tant, molècules diferents que poden formar cristalls amb diferent estructura (Schoneitz *et al.*, 2013).

Un polimorf és una forma cristal·lina que, malgrat està constituïda per la mateixa composició química, presenta una estructura cristal·lina diferenciada. Els factors que influeixen en la formació d'un determinat polimorf són variats: puresa, temperatura, velocitats de refredament, etc. Un polimorf pot convertir-se en un altre sense abandonar l'estat sòlid sempre i quan el darrer presenti una major estabilitat termodinàmica, fet que constitueix les transicions polimòrfiques. Així, l'estructura cristal·lina sempre tendirà a la seva forma més estable. El canvi en l'estructura cristal·lina pot causar, en el cas de nanopartícules lipídiques sòlides emprades per a vehiculitzar fàrmacs en el seu interior, l'expulsió d'aquest. L'ús de determinats tensioactius o barreges de diferents lípids enlloc d'un de sol poden evitar o retardar les transicions polimòrfiques (Bunjies *et al.*, 1996; Westesen *et al.*, 1997). Tanmateix, alguns àcids grassos utilitzats com a lípids matricials tenen tendència a formar *supercooled melts* en comptes de suspensions de nanopartícules lipídiques sòlides pròpiament, les quals es fonen a temperatura fisiològica i, per tant, invaliden el seu ús inicialment previst com a agents terapèutics (Jenning *et al.*, 2000). És per això que la selecció dels lípids adients és un punt clau per a aquesta classe de sistemes nanoestructurats (Siekmann, 1994). Contràriament, les transicions polimòrfiques no representen un problema per a les cSLN en què els àcids nucleics es troben adsorbits en superfície, ja que pel que fa a aquesta unió, els canvis polimòrfics no haurien de tenir-hi efecte (Garti *et al.*, 1988).

6.4 INCORPORACIÓ DE L'AGENT TERAPÈUTIC EN SLN I CSLN

Les nanopartícules lipídiques sòlides incorporen fàcilment fàrmacs liposolubles, tot i que la incorporació de fàrmacs hidrosolubles també és possible amb l'ús de tensioactius adequats per a aquest sistema nanoestructurat (Ekambaram *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2000).

Pel que fa a la incorporació de l'agent terapèutic, pot donar-se per algun dels següents mecanismes (figura 12):

- Per encapsulació: L'agent terapèutic és dispersat en la matriu lipídica en el moment de la preparació de les SLN, i queda formant part del nucli lipídic un cop aquest solidifica a la seva respectiva temperatura de cristall:

- Homogèniament dispersat per la nanoestructura
- Forma una coberta
- Forma un nucli

-Per adsorció en superfície: L'agent terapèutic forma part de la coberta de la nanopartícula, i s'afegeix després de la seva formació. És el cas dels àcids nucleics, en què aquesta unió a la nanopartícula (en aquest cas una nanopartícula lipídica sòlida catiónica, cSLN) els protegeix de la degradació enzimàtica per DNases o RNases i n'augmenta al mateix temps la capacitat de transfecció cel·lular. Conseqüentment, els mètodes de producció per a un o altre presenten variabilitat.

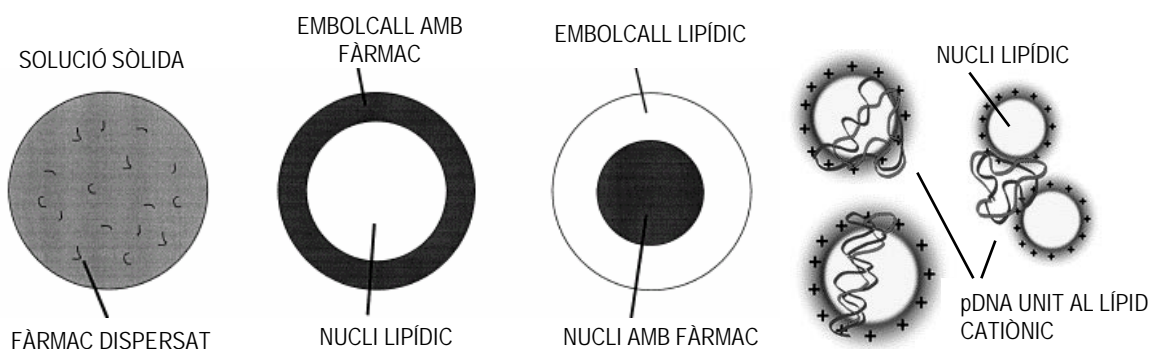


Figura 12. Diferents estructures SLN-agent terapèutic (Ekambaram *et al.*, 2012; Skandrani *et al.*, 2014).

Durant els darrers anys s'han assajat SLN carregades amb compostos diversos, amb la finalitat d'augmentar l'eficàcia i disminuir els efectes secundaris, entre els que destaquen els següents:

- Zanamivir: Inhibidor selectiu de les neuraminidases dels virus de la grip A i B (Shi *et al.*, 2014).
- Riluzol: Pel tractament de l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Bondi *et al.*, 2012).
- Àcid ferúlic: Component fenòlic natural amb acció antioxidant cel·lular (Bondi *et al.*, 2012).
- Camptotecina: Fàrmac citotòxic amb propietats antiproliferatives (Bondi *et al.*, 2012).
- Atazanavir: Inhibidor de la proteasa del HIV (Bondi *et al.*, 2012).
- Diminizen: Antiparasitari d'ús veterinari (Bondi *et al.*, 2012).
- Baicalina: D'origen vegetal, sembla mostrar activitat neuroprotectora (Zhang *et al.*, 2015).
- Ramipril: Agent antihipertensiu (Ekambaram i Sathali, 2012).
- Doxorubicina: Agent antineoplàstic intercalant (Fundarò *et al.*, 2000).
- Risperidona: Fàrmac antipsicòtic per a l'esquizofrènia (Silva *et al.*, 2012).
- Resveratrol: Compost fenòlic natural amb activitat antitumoral (Jose *et al.*, 2014).
- Adapalene: Retinoid d'aplicació tòpica per a afeccions acneiques (Jain *et al.*, 2014).
- Haloperidol: Agonista invers dopaminèrgic utilitzat com a antipsicòtic (Yasir *et al.*, 2014).
- Praziquantel: Antiparasitari per al tractament de l'esquistosomiasi (Ribeiro de Souza *et al.*, 2014).
- Etopòsid: derivat semi-sintètic de la podofilotoxina, emprat com a antineoplàstic (Athawale *et al.*, 2014).
- Saquinavir: antiretroviral per al tractament de la infecció per HIV (Kuo i Wang, 2014)

INTRODUCCIÓ

La biocompatibilitat quant a composició lipídica de les SLN fa possible el transport de fàrmacs cap a dianes terapèutiques fins el moment difícilment inassolibles (Gastaldi *et al.*, 2014). Diversos estudis han posicionat a les SLN com a sistema de transport de fàrmacs a través de la barrera hemato-encefàlica per actuar terapèuticament a nivell del cervell. D'altra forma, la majoria de fàrmacs són incapaços de travessar aquesta barrera.

Estudis recents han demostrat l'eficiència de SLN funcionalitzades amb anticossos monoclonals ancorats a superfície i carregades amb l'antiretroviral saquinavir per travessar la barrera hemato-encefàlica i arribar al cervell (Kuo i Shih-Huang, 2014).

Els estudis realitzats amb cSLN per a transferència de DNA/RNA per a teràpia gènica han demostrat l'eficiència d'aquest sistema per a vehiculització d'aquest tipus de biomolècules. Les cSLN estan capacitades per condensar DNA en la seva superfície per mitjà d'interaccions electrostàtiques fins el punt d'obtenir nanopartícules col·loïdals nanomètriques i transfectar cèl·lules de mamífer *in vitro*. Nombrosos plasmidis de DNA d'expressió en cèl·lules de mamífer units a cSLN han estat assajats com a vectors per a demostrar l'eficiència de transfecció i subseqüent regulació de l'expressió gènica (Bondi i Craparo, 2010).

6.5 PRINCIPALS MÈTODES D'OBTENCIÓ. BREU DESCRIPCIÓ. AVANTATGES I DESAVANTATGES

Els principals mètodes d'obtenció de SLN són l'homogeneïtzació a alta pressió, en calent i en fred, i la microemulsificació en calent (Müller *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2010). Existeixen també altres mètodes d'obtenció, però és important destacar que aquells en què s'utilitzen solvents orgànics i sonicació estan contraindicats en sempre que el mètode de fabricació d'aquestes nanopartícules estigui pensat per a l'establiment d'una sistemàtica productiva amb l'administració humana com a objectiu final.

Les tècniques per a l'obtenció de SLN són les següents (Battaglia *et al.*, 2014; Ekambaram, 2011; Kumar i Randhawa, 2013):

- Homogenització en calent o en fred a alta pressió
- Mètode d'evaporació de solvent
- Mètode d'emulsificació-difusió de solvent
- Mètode del fluid supercrític
- Mètode de microemulsificació en calent
- Mètode de la doble emulsió W/O/W
- Tècnica d'electrospray
- Tècnica de precipitació
- Ultrasonicació

Amb aquests mètodes es poden obtenir tant nanopartícules amb fàrmac o sense. Aquest últim cas en dóna necessàriament quan la síntesi de les nanopartícules té com a objectiu la unió a agents biològicament actius com DNA o RNA, el qual s'uneix en etapes posteriors a les SLN, en aquest cas cSLN.

6.5.1 HOMOGENEÏTZACIÓ EN CALENT A ALTA PRESSIÓ

Aquesta tècnica és utilitzada des de la dècada dels 50 del segle passat en la preparació de emulsions per a administració parenteral, per la qual cosa el procés no és nou. En aquest cas, el fet de disposar del *know-how* a nivell de la indústria farmacèutica facilita la producció de SLN a partir d'aquesta tècnica, on l'escalat no representa cap problema (Mehnert i Mäder, 2001).

En l'homogeneïtzació en calent a alta pressió (figura 13), el lípid o lípids constituents de les SLN es fonen fins a aproximadament 5-10 °C per sobre del seu punt de fusió. El fàrmac s'afegeix al producte fos, on s'hi solubilitza. Aquesta barreja és a continuació dispersada sota agitació en la solució aquosa que conté el tensioactiu i que també ha de trobar-se a la mateixa temperatura.

INTRODUCCIÓ

Amb l'agitació s'obté una pre-emulsió. Amb l'ajuda d'un homogeneïtzador, la pre-emulsió forma una nanoemulsió, que posteriorment és refredada a temperatura ambient. Així, el lípid recristal·litza al refredar-se i forma les nanopartícules lipídiques sòlides. Òbviament, i per poder mantenir la temperatura de la pre-emulsió uns 5-10 °C per sobre del punt de fusió dels lípids, cal que l'homogeneïtzador disposi d'un control de temperatura.

Un aspecte a considerar fa referència a l'augment de temperatura que pateix el producte durant l'homogeneïtzació. Per cada 500 bar de pressió, la temperatura augmenta uns 10°C. Normalment, les mostres es sotmeten a uns 3-5 cicles d'homogeneïtzació a 500-1500 bar. Si s'incrementa la pressió en cada cicle o bé el nombre de cicles, repercuteix en un increment de la mida de partícula, provocada per l'elevada energia cinètica a la que són sotmeses i que acaba provocant la coalescència (Mehnert i Mäder, 2012).

A l'hora de refredar la nanoemulsió obtinguda per mitjà del homogeneïtzador, cal tenir en consideració el punt de fusió dels lípids utilitzats. Si és proper a la temperatura ambient, caldrà refredar la nanoemulsió per sota d'aquesta temperatura per a que recristal·litzi. Com a alternativa, es pot procedir a la liofilització immediata (Muller *et al.*, 2000).

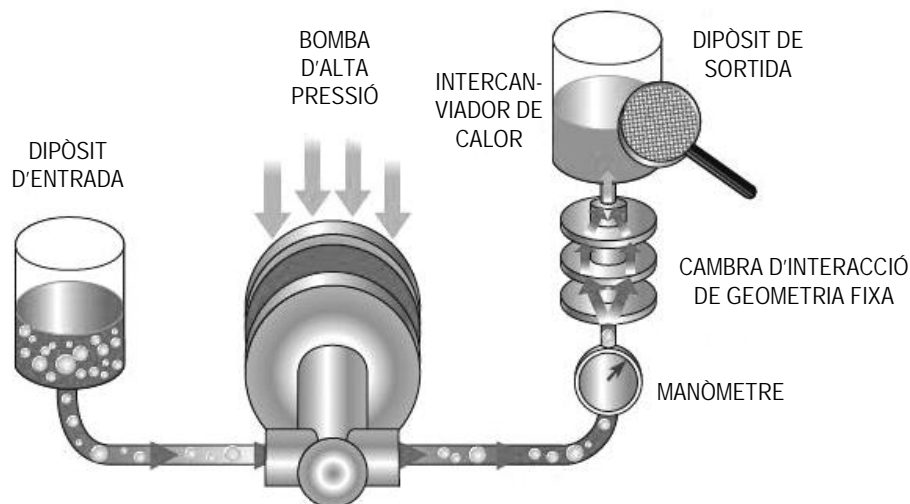


Figura 13. Procés d'emulsificació per mitjà d'un homogeneïtzador per a l'obtenció de SLN (Particle Sciences®Drug Development Services, per cortesia de Microfluidics, Estats Units).

6.5.2 HOMOGENEÏTZACIÓ EN FRED A ALTA PRESSIÓ

En l'homogeneïtzació en fred a alta pressió (figura 14) té lloc amb el lípid en estat sòlid: el lípid, que conté el fàrmac, es deixa refredar i a continuació es mòlt en un molí per aconseguir una grandària de partícula de l'ordre de 50-100 µm. La pólvora obtinguda es dispersa seguidament en la solució aquosa que conté el tensioactiu, de tal manera que s'origina una pre-suspensió, la qual és homogeneïtzada a temperatura ambient o inferior. Les forces de cavitació originades durant el procés d'homogeneïtzació provoquen la ruptura de les micropartícules en nanopartícules.

En comparació amb l'homogeneïtzació en calent a alta pressió, aquesta tècnica presenta alguns avantatges: pel fet de treballar amb el lípid en estat sòlid s'evita que, en cas que el fàrmac sigui hidròfil, aquest es distribueixi per la fase aquosa durant l'homogeneïtzació. Tanmateix, el procés d'homogeneïtzació provoca augments de temperatura de la mostra, per tant cal que el marge entre aquest augment i la temperatura de fusió del lípid es tingui en compte per a que el lípid no es fongui durant el procés. En aquest sentit, i com a mesura de precaució, quan l'objectiu és la incorporació de fàrmacs hidròfils a les SLN (Kumar i Randhawa, 2013), es pot substituir l'aigua de la solució per altres components en què el fàrmac hi sigui poc soluble, com polietilenglicol 600 (PEG 600). També és útil quan el fàrmac és termolàbil, ja que les temperatures de treball en podrien induir la degradació. Per últim, s'evita la recristal·lització de la nanoemulsió que es dona en l'homogeneïtzació en calent a alta pressió, ja que aquesta etapa pot ser problemàtica en cas que es produeixin *supercooled melts* (Müller *et al.*, 2000; Mehnert i Mäder, 2012).

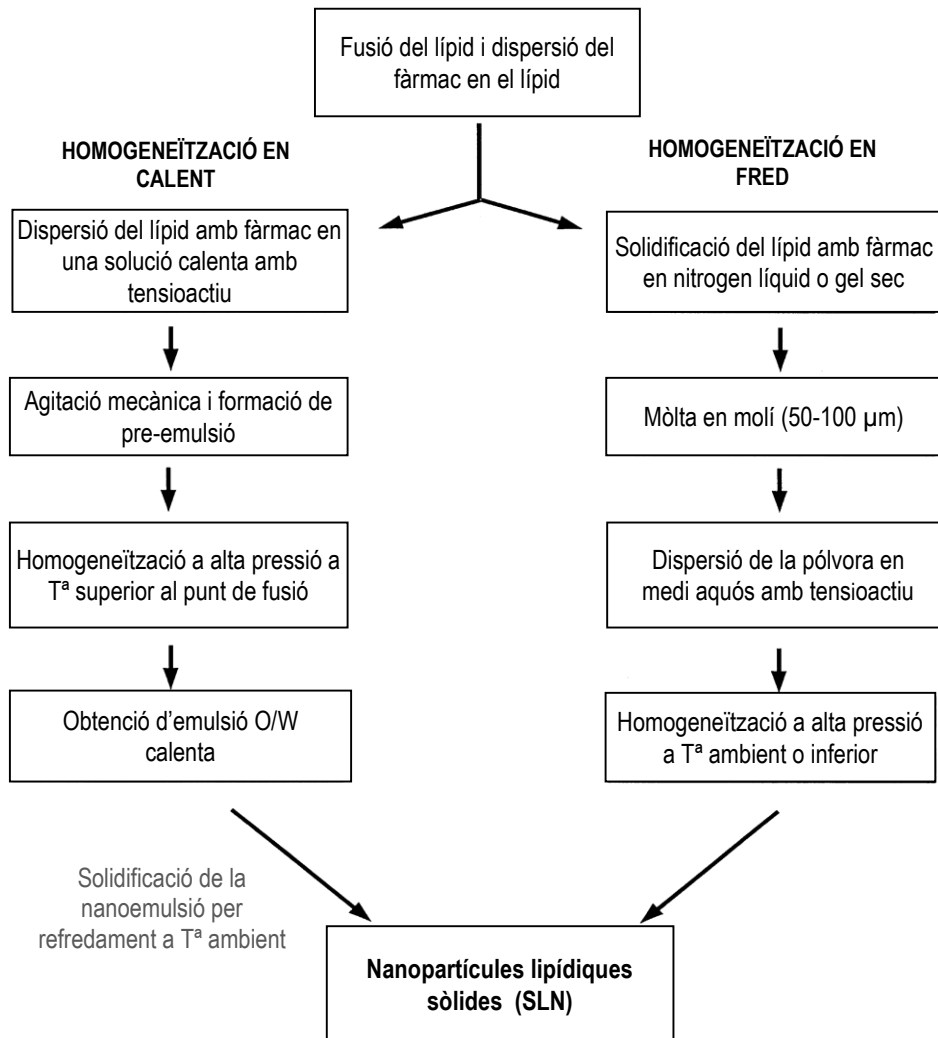


Figura 14. Esquema comparatiu de les diferents etapes en l'homogeneïtzació en calent i en fred a alta pressió (Mehnert i Mäder, 2012).

6.5.3 MICROEMULSIFICACIÓ EN CALENT

Per a la producció de SLN per mitjà de la microemulsificació en calent (Bondi et al., 2012), el lípid (o lípids) al que s'hi ha afegit el fàrmac i que es troba en estat sòlid a temperatura ambient, és escalfat fins aproximadament 5-10 °C per sobre del seu punt de fusió. Paral·lelament, el tensioactiu i l'aigua són escalfats fins assolir la mateixa temperatura. Seguidament, el lípid fos s'afegeix a la solució aquosa que conté el tensioactiu, sota agitació magnètica. S'obté una emulsió que es dispersa en aigua freda (al voltant de 2 °C) sota agitació magnètica, i té

lloc la solidificació del lípid per precipitació, donant lloc a una suspensió de nanopartícules lipídiques sòlides (figura 15).

Aquesta tècnica dóna lloc a suspensions estables però poc concentrades, ja que la relació entre el volum de la microemulsió obtinguda i el volum d'aigua necessari per refredar la microemulsió i formar les SLN és de l'ordre de 1:5 (Fàbregas *et al.*, 2014).

El gradient de temperatures afavoreix una ràpida cristallització del lípid i minimitza la formació d'agregats (Ekambaram *et al.*, 2011).

La concentració d'aquestes suspensions es pot aconseguir per mitjà de la seva liofilització.

D'igual forma que l'homogeneïtzació, i gràcies a la simplicitat del mètode, aquesta metodologia permet la transposició a escala industrial (Müller, 2000).

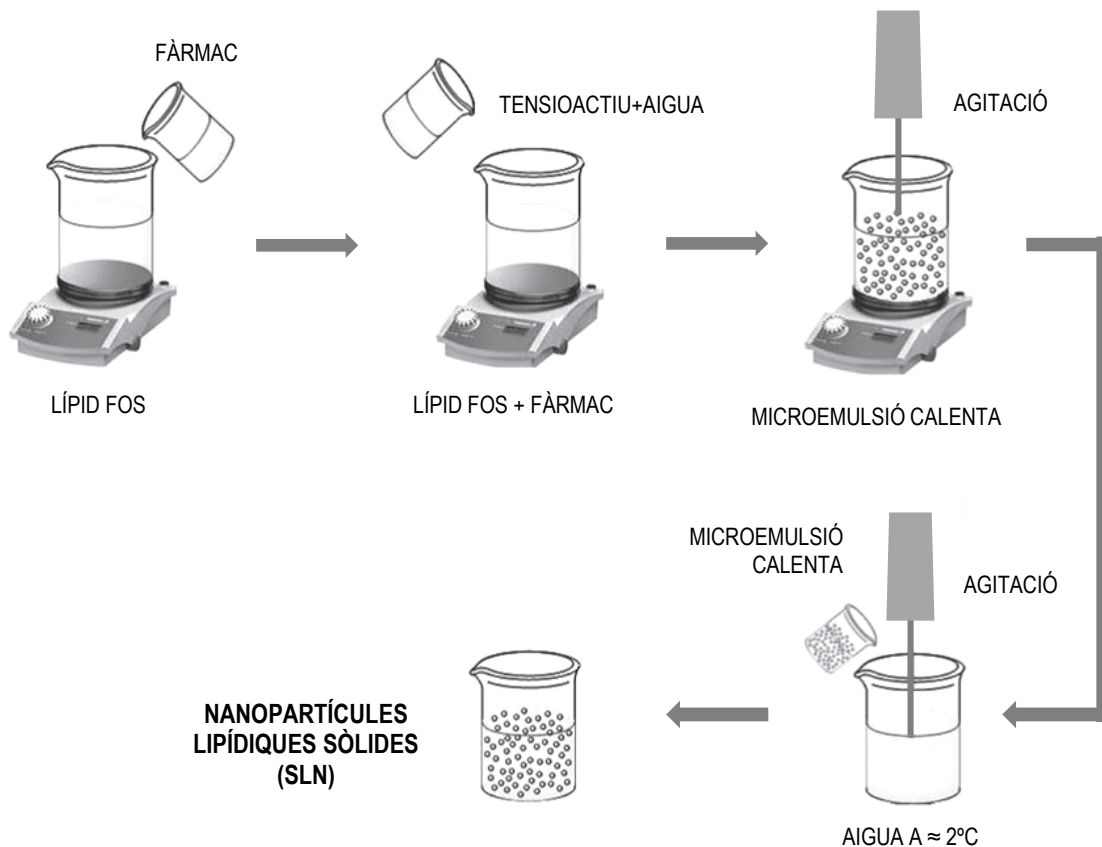


Figura 15. Diagrama esquemàtic per a l'obtenció de nanopartícules lipídiques sòlides pel mètode de la microemulsificació en calent (Modificat de Bondi *et al.*, 2012).

6.6 VEHICULITZACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS PER MITJÀ DE LIPOPLEXOS cSLN:PDNA I cSLN:siRNA. EFICIÈNCIA DE TRANSFECCIÓ

Les SLN catióniques (cSLN) es caracteritzen per contenir en la seva composició almenys un lípid catiónic, amb una o més cadenes alifàtiques, i que confereix càrrega positiva a les SLN derivades de l'emulsió O / W a través d'un àtom de nitrogen protonat per cada molècula de lípid (Doktorovova *et al.*, 2011). Aquestes cSLN s'han demostrat efectives en la unió a àcids nucleics, atès que aquests exhibeixen càrrega negativa en solució aquosa, de manera que la unió té lloc mitjançant enllaç iònic (Vighi *et al.*, 2007; Xue i Wong, 2011). A més, la unió confereix l'àcid nucleic protecció enfront de la degradació per DNasa I, amb la qual cosa s'afavoreix el transport a l'interior cel·lular (Doktorovova *et al.*, 2011). Les cSLN es converteixen en aquest cas en vectors no virals per a regulació de l'expressió gènica.

Atès doncs que el DNA, i el RNA en major grau, són susceptibles de degradació, la seva administració sense vehiculitzar resulta altament ineficient, fet que se suma a la tendència natural a aclariment (*clearance*) per part dels teixits. Hi ha vectors virals que són sistemes biològics derivats de virus naturals, capaços de transferir material genètic a les cèl·lules hoste. Tot i l'alta eficiència de transfecció, aquests sistemes presenten greus desavantatges: la recombinació viral i el risc d'una resposta immunitària o inflamatòria són aspectes fisiopatològics que els fan massa perillosos per al seu ús (El-Aneed, 2004). Per això, es fa indispensable disposar de vectors no virals prou eficients, com les cSLN, per poder emprar els àcids nucleics com a medicina molecular i ser transportats a dianes cel·lulars específiques. L'objectiu final és inhibir o reduir l'expressió de determinats gens o d'expressar proteïnes terapèutiques. Aquestes cSLN constitueixen sistemes multifuncionals amb característiques adequades a l'ús previst: impedeixen la degradació per DNAsas, l'opsonització per part del sistema immunitari, i alhora faciliten l'entrada cel·lular i una correcta metabolització lisosomal i alliberament de l'àcid nucleic allà on es pretén que realitzi l'acció terapèutica, ja sigui al nucli o al citoplasma (Bondi *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2012; de Jesús i Zuhorn, 2015; Kapoor *et al.*, 2012).

L'ús de cSLN com a vectors de DNA/RNA (figura 16) és preferible enfront dels sistemes estàndard de transport, com els lípids o polímers catiónics. S'ha pogut demostrar que poliplexos cSLN:pDNA administrats de forma intravenosa, amb un diàmetre inferior als 150 nm, amb càrrega superficial neutra, incrementen l'efecte de permeació i retenció (EPR, *enhanced permeation and retention*), efecte que es produeix en els llocs amb inflamació i en tumors sòlids, a causa de la pèrdua d'unió entre cèl·lules de l'endoteli vascular dels teixits afectats (Li i Szoka, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Quan això passa, és possible que partícules de petites dimensions puguin extravasar-se en aquests punts. En el cas dels lipoplexos cSLN:pDNA, la permeació del DNA cap a les cèl·lules és possible gràcies a la seva unió a cSLN. D'altra forma, l'alta càrrega aniònica de la membrana cel·lular ho impedeix en gran mesura (Bondi i Craparo, 2010).

La interacció entre la nanopartícula transportadora i la superfície cel·lular pot tenir lloc per diversos processos, i es pot dividir en etapes, que breument es poden resumir de la següent forma:

1. Aproximació i unió a la membrana cel·lular, per lliscament i posterior retracció mitjançada per fil·lopodis o macropinocitosi. La unió es dona com a resultat d'interaccions iòniques no específiques.
2. Endocitosi, que es pot donar per un mecanisme clatrina-depenent o caveolina-depenent.
3. Processament intracel·lular i escapament endosomal.
4. Entrada al nucli (en cas de pDNA) i expressió.

La cèl·lula disposa, doncs, de mecanismes variats per a la internalització de les nanopartícules. La ruta d'endocitosi clatrina-depenent sembla ser la predominant per a les SLN, en detriment de l'endocitosi caveolina-depenent o macropinocitosi (Martins *et al.*, 2012).

Després de la internalització per endocitosi, l'escapament endosomal és un punt crític per a l'acció terapèutica. L'endosoma ha d'alliberar el contingut abans que es fusioni amb lisosomes que en degradaran el contingut o el

INTRODUCCIÓ

reciclaran de retorn cap a la membrana cel·lular. Això dependrà en gran mesura dels components que constitueixen les nanopartícules transportadores. És important remarcar la susceptibilitat de les membranes dels diferents orgànuls cel·lulars enfront la pertorbació induïda per la presència de les nanopartícules, que pot diferir i afectar en conseqüència l'alliberament de l'agent terapèutic (Rehman *et al.*, 2013). En aquest context, la membrana nuclear esdevé una de les principals barreres en la transfecció de pDNA, amb una mida de porus per a transport passiu molt restringida (Bondi i Craparo, 2010). S'ha demostrat que la translocació nuclear de pDNA té lloc majoritàriament durant la fase M del cicle cel·lular (fase mitòtica), moment en què desapareix la membrana nuclear i es facilita la translocació de transgens (Akita *et al.*, 2004).

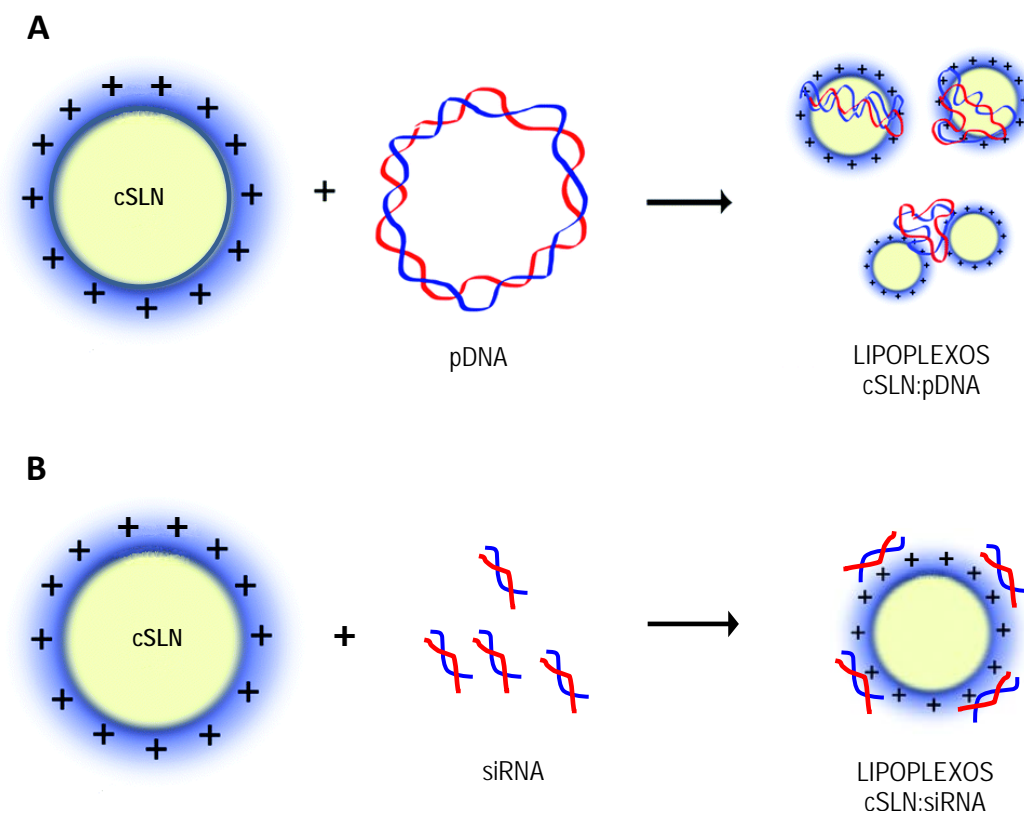


Figura 16. Possibles conformacions de lipoplexos cSLN:pDNA (A) i lipoplexos cSLN:siRNA (B) (Modificat a partir de Skandrani *et al.*, 2014).

6.6.1 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ I POSSIBILITAT DE MODULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Tant en la replicació com en la transcripció del material genètic hi ha implicades moltes proteïnes que interaccionen amb el DNA per tal de poder donar lloc a una nova cèl·lula o a altres proteïnes a partir de la descodificació del DNA. Algunes actuen com a enzims (per exemple, la RNA polimerasa, implicada en la transcripció del DNA) que, juntament amb d'altres proteïnes (factors de transcripció) fan possible tant la correcta modulació del cicle cel·lular i subseqüent generació d'una cèl·lula filla amb el genoma idèntic al de la cèl·lula parental, com l'expressió de proteïnes funcionals i estructurals per al correcte funcionament cel·lular.

Els factors de transcripció, com a proteïnes que són, estan formats per seqüències d'aminoàcids, que conformen l'estructura primària, units per enllaços amida, també anomenat enllaç peptídic en el cas de les proteïnes. Tenen dos extrems: carboxi i amino. La seqüència aminoacídica pot adoptar diverses conformacions a l'espai en funció dels aminoàcids que la componen i les interaccions entre els diferents àtoms dels aminoàcids (fulls beta, làmines alfa, etc.). Aquest nivell d'interacció constitueix l'estructura secundària, mentre que el plegament en l'espai tridimensional i que proporciona a les proteïnes la seva morfologia constitueix l'estructura terciària. L'assemblatge de diferents unitats proteiques per formar complexos moleculars conforma l'estructura quaternària.

Aquestes proteïnes presenten dominis, que són regions funcionals específiques d'interacció amb d'altres proteïnes per a la modulació dels diferents processos cel·lulars on estan implicades. Aquests dominis tenen unes característiques estructurals concretes pel que fa a la seqüència aminoacídica, i que es defineixen com a motius (Voet i Voet, 2004).

6.6.2 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ TCERG1 PER MITJÀ DE LIPOPLEXOS cSLN:PDNA I cSLN:siRNA

En el context dels factors de transcripció, TCERG1 (*Transcription Elongation Regulator 1*) (Suñé *et al.*, 1997) és una proteïna nuclear implicada en l'elongació de la transcripció i en els fenòmens d'*splicing* del pre-mRNA. Aquesta proteïna es compon de múltiples dominis, dels que tres d'ells són dominis WW (triptòfan-triptòfan) de la meitat amino-terminal. Sis dominis són motius FF (fenilalanina-fenilalanina) repetits en la meitat carboxi-terminal. TCERG1 s'associa a la RNA polimerasa II (RNAPII) hiperfosforilada, a elongadors de la transcripció i a components d'*splicing* a través dels seus dominis WW i FF. En funció d'aquestes i altres dades funcionals, que mostren els efectes de TCERG1 sobre l'*splicing* alternatiu de constructes amb un minigen reporter (Cheng *et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2008; Sánchez-Álvarez *et al.*, 2010), TCERG1 va ser proposat com un possible factor implicat en la coordinació entre l'elongació de la transcripció i l'*splicing*. Recentment s'ha demostrat que TCERG1 augmenta la taxa de transcripció *in vivo* per part de la RNAPII del gen *Bcl-x* per promoure l'*splicing* alternatiu de la isoforma proapoptòtica del gen *Bcl-X_S* (Montes *et al.*, 2012). TCERG1 s'ha postulat com un factor de transcripció implicat en la patogènesi de malalties neurodegeneratives, així com en la regulació de l'expressió gènica del HIV-1 (virus de la immunodeficiència humana tipus I) (Arango *et al.*, 2006; Coiras *et al.*, 2013; Holbert *et al.*, 2001). A la vista d'aquestes dades, la possibilitat de regulació de l'expressió de TCERG1 adquireix una especial rellevància.

Les estratègies per a la modulació de l'expressió d'aquest factor de transcripció comprenen l'ús de pDNA i siRNA combinat amb cSLN per formar els corresponents lipoplexos per a la respectiva transfecció cel·lular. La modulació de l'expressió de TCERG1 pot tenir lloc per sobre-expressió a partir de pDNA o per silenciament gènic a nivell citosòlic per bloqueig de la transcripció per mitjà de siRNA.

7. ESTAT ACTUAL I PERSPECTIVES DE FUTUR DELS MEDICAMENTS BASATS EN SISTEMES NANOESTRUCTURATS I ÀCIDS NUCLEICS

Des de la irrupció de la nanotecnologia per a aplicacions biomèdiques, només als Estats Units s'han generat més de 1000 patents de sistemes nanomètrics durant el període 1999–2008 (Mishra *et al.*, 2010).

A més a més, a dia d'avui ja existeixen en el mercat diversos medicaments que incorporen sistemes nanoestructurats, virals o no virals, de vehiculització de fàrmacs.

Actualment, els medicaments amb autorització de comercialització a Europa per part de l'EMA (*European Medicines Agency*) com als Estats Units (FDA, *Food and Drug Administration*) són els següents:

Abraxane®: Nanopartícules d'albumina carregades amb paclitaxel, per al tractament del càncer metastàtic de mama i pàncrees.

Caelyx®: Liposomes PEGilats (que contenen polietilenglicol -PEG- a la formulació) carregats amb doxorubicina, per al tractament del càncer de mama metastàtic, càncer d'ovari avançat, sarcoma de Kaposi en pacients amb la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) i mieloma múltiple.

MyoCet®: Liposomes no PEGilats carregats amb doxorubicina, per al tractament de càncer de mama metastàtic administrat conjuntament amb ciclofosfamida.

Com a medicaments constituïts per sistemes virals, únicament està aprovat el següent:

Glybera®: Teràpia gènica amb alipogene tiparvovec, en forma de plasmidi de DNA episòmic (no integratiu). És transfectat per mitjà d'un virus adeno-associat no replicatiu que actua per tant com a vector de transfecció. Indicat per al tractament de la deficiència de LPL.

Existeixen també diversos medicaments conformats exclusivament per àcids nucleics:

INTRODUCCIÓ

Vitravene®: Agent terapèutic constituït per l'àcid nucleic fomivirsen, una seqüència de 21 oligonucleòtids antisentit modificada resistent a nucleases. Fàrmac antiviral pel tractament de la retinitis causada per citomegalovirus (CMV) en individus immunocompromesos. Actualment està aprovat únicament per la FDA des del 1998. L'EMA va aprovar-lo inicialment el 1999, però l'any 2002 el va retirar per raons comercials.

Kynamro®: Constituït per l'àcid nucleic mipomersen, un oligonucleòtid antisentit modificat resistent a nucleases que actua unint-se al mRNA de l'apolipoproteïna B, bloquejant la traducció. Indicada per al tractament de la hipercolesterolèmia familiar. Aprovada inicialment tant per l'EMA com per la FDA el 2013, l'EMA va retirar-ne l'autorització de comercialització per l'abandonament del tractament d'una alta proporció dels pacients a causa dels efectes secundaris.

Altres medicaments formats per àcids nucleics per a indicacions terapèutiques variades es troben en fase de desenvolupament o en fase clínica, a l'espera dels resultats per a la decisió final d'aprovació per ser comercialitzats. Entre ells es troben :

- AVI9002 i AVI9003: Per a teràpia gènica antisentit amb oligòmers morfolino per al tractament de l'infecció pel virus de l'Ebola i de Marburg, respectivament, ambdós causants de febres hemorràgiques (Iversen *et al.*, 2012).
- Trabedersen: Oligonucleòtid antisentit que bloqueja l'expressió del TGF- β (factor de creixement tumoral beta), sobreexpressat principalment en gliomes i carcinomes pancreàtics (Jaschinski *et al.*, 2011).
- Talimogene laherparepvec (T-VEC): Vector constituït per un plasmidi de DNA que conté el gen del factor GM-CSF transfectat per mitjà d'un vector viral amb capacitat oncolítica (HSV-1, *Herpes simplex virus 1*). Està indicada pel tractament del melanoma (Goins *et al.*, 2014).

Fins el moment no existeixen en el mercat medicaments que combinin sistemes no virals de vehiculització amb àcids nucleics, per la qual cosa aquesta línia de

recerca de gran potencial té encara molt recorregut i justifica l'esforç a realitzar en aquest sentit.

L'esforç en la recerca portada a terme durant les últimes dècades quant a la utilització d'àcids nucleics com a medicines, gràcies als espectaculars avenços en la tecnologia del DNA recombinant, així com la possibilitat de transport d'aquests i altres molècules a la cèl·lula a partir del desenvolupament de nous sistemes de transport d'escala nanomètrica ha propiciat que la teràpia gènica hagi deixat de ser una hipòtesi i s'hagi començat a fer realitat.

Els cada cop més innovadors, específics i, al mateix temps, més necessaris tractaments per a algunes malalties d'alta complexitat converteixen els avenços en aquest camp en un procés lent i ple d'obstacles. En part també, i paradoxalment, a causa de l'enorme diversificació de possibilitats. Malgrat tot, es segueix aprofundint en el coneixement d'aquestes línies de recerca. L'objectiu últim és possibilitar de forma universal l'ús eficient d'aquestes noves metodologies terapèutiques en simbiosi entre la tecnologia farmacèutica i la bioquímica i biologia moleculars.

Les oportunitats que ofereixen les noves metodologies basades en el DNA recombinant són enormes, com també ho són els usos inadequats que se'n poden derivar. El seu desenvolupament i aplicacions han de regir-se sempre per la seva finalitat terapèutica a l'empara d'una normativa reguladora, que contempli els aspectes ètics i legals per assegurar-ne un ús i aplicacions segurs.

MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIALS

Tant els materials de partida, reactius i solucions, així com els equips utilitzats en la recerca experimental es presenten agrupats segons el procés en què han estat emprats.

1.1 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES CATIÒNIQUES DE QUITOSAN-TPP

L'obtenció de les nanopartícules polimèriques catiòniques de quitosan-TPP s'ha realitzat a partir de:

- Quitosan de baix pes molecular (LMW, *low molecular weight*), amb un grau de desacetilació del 75-85% (Sigma-Aldrich, Estats Units. Lot MKBK4182V).
- Solució reguladora preparada a partir de:
 - Àcid acètic glacial (Fagron Ibérica, Espanya. Lot L09120105).
 - Acetat sòdic 3-hidrat (Panreac, Espanya. Lot 0000376703).
- Per aconseguir l'entrecreuament del polímer s'ha utilitzat tripolifosfat sòdic (Panreac, Espanya. Lot 0000372382).
- Els filtratges s'han realitzat amb filtres de paper qualitatiu de 43-48 µm de mida de porus (Filterlab, Espanya).
- L'aigua utilitzada s'ha obtingut mitjançant un mòdul Milli-Q A10 (Millipore, França).

1.2 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES

L'obtenció de les nanopartícules lipídiques sòlides catiòniques s'ha realitzat a partir de:

- Lípids matricials: Àcid esteàric (Merck, Alemanya. Lot K39752861-949), Compritol® 888 ATO (Gattefossé, França. Lot 109444) i Precirol® ATO 5 (Gattefossé, França. Lot 115153).

MATERIAL I MÈTODES

- Com a lípid catiònic s'ha utilitzat octadecilamina (Acros Organics, Bèlgica. Lot A0307242)
- Com a tensioactiu s'ha utilitzat Poloxamer 188 (BASF, Alemanya. Lot 550003; Sigma-Aldrich, Estats Units. Lot SLBF9298V).
- Els filtratges s'han realitzat amb filtres de paper qualitius de 43-48 µm de mida de porus (Filterlab, Espanya).
- L'aigua utilitzada s'ha obtingut mitjançant un mòdul Milli-Q A10 (Millipore, França).

1.3 LIOFILITZACIÓ

S'han utilitzat les següents substàncies de càrrega:

- Mannitol (Fagron, Espanya. Lot L09060027).
- Trehalosa (Cargill-Cerestar, Estats Units. Lot 120608).

1.4 ASSAJOS DE VIABILITAT I TRANSFECCIÓ CEL·LULAR

Per als experiments de transfecció cel·lular s'han utilitzat els següents llinatges:

- Línia cel·lular HEK293T (llinatge procedent de cèl·lules renals d'un embrió humà, *Human Embryonic Kidney 293T*)
- Línia cel·lular HeLa (llinatge procedent de cèl·lules epitelials humanes d'un carcinoma cervical)
- Plaques de cultiu i lentilles (Nalge Nunc International, Estats Units),
- Lipofectamina (Invitrogen, Estats Units)
- Fosfat càlcic (Sigma-Aldrich, Estats Units)
- Medis de cultiu DMEM de diferents composicions (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Estats Units)

Reactius per a tincions cel·lulars:

- DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Invitrogen, Estats Units)
- Trypan Blue 0,4% (Gibco, Estats Units)

1.5 PLASMIDIS D'EXPRESSION EUCARIOTA

Els diferents plasmidis s'han obtingut en quantitat suficient mitjançant transformació bacteriana en *Escherichia coli* i purificació posterior amb el kit QIAGEN® Plasmid purification (Midi).

Plasmidis pEFBOS-T7-TCERG1 [591-1098]/[1-1098]

Plasmidis pEFBOS-GFP/ECFP-T7-TCERG1 [591-1098]

Plasmidi pEFBOS-GFP-T7-FF4FF5ΔSRPK1

Plasmidi pcDNA3-FLAG-LIN28B

Plasmidi NF-κB-c-fos-LUC

La quantificació s'ha portat a terme amb el següent equipament:

- Espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000) per a la quantificació i establiment del nivell de puresa d'àcids nucleics.

1.6 ELECTROFORESIS EN GEL D'AGAROSA

Els assajos de mobilitat electroforètica de pDNA i/o siRNA s'han portat a terme en gels d'agarosa, amb les següents característiques i components:

- Agarosa D-1 Media EEO al 0,8% (Pronadisa)
- Tampó TAE 1x (Tris acetat 40 mM, EDTA 1 mM)
- Tampó de càrrega amb un 0,25% (w/v) de blau de bromofenol, 0,25% (w/v) de xilenocianol FF i 30% (v/v) de glicerol.
- Marcador de pes molecular TriDye™ 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs).
- Bromur d'etidi (EtBr) com a mètode de tinció per a la visualització del DNA.
- RedSafe™, solució per a tinció de DNA (20,000x) (IntronBiotechnology, Inc., Corea del Sud).

1.7 ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN-BLOT (SDS-PAGE)

Per a la formació del gels, s'han utilitzat els següents components:

- Aigua bidestil·lada (Millipore Synthesis A10, França)
- Acrilamida al 30% (Sigma-Aldrich, Estats Units)
- Bisacrilamida al 1% (Biorad, Estats Units)
- Tampó TRIS-HCl 1.5 M a pH 8.8
- SDS al 10% (Fluka, Suïssa)
- Persulfat amònic al 10% (Gibco, Estats Units)
- TEMED (Amresco, Estats Units)

Les solucions, reactius i altres materials utilitzats es detallen a continuació:

- Tampó de lisi T7 (Hepes pH 7,9, NaCl i EDTA)
- Nonidet fosfat-40 (NP-40) (Sigma-Aldrich, Estats Units)
- Ditiotreitòl (DTT) (Sigma-Aldrich, Estats Units)
- Fenilmetil-sulfonil -fluorur (PMSF) (Applichem, Alemanya)
- Tampó SDS 10%
- Tampó Laemli (TRIS, glicina, i SDS)
- Membranes de nitrocel·lulosa (Amersham Biosciences, Estats Units)
- Llet desnatada al 5% p/v, PBS 1X i Tween 20 al 0,1% v/v.
- Anticossos anti-CDK9 (Rabbit sc-484 de Santacruz. 1:2000)
- Anticossos anti-T7 (Rabbit A190-117^a de Bethil (1:20000)

1.8 ANÀLISI DE PROTEÏNES PER BIOLUMINESCÈNCIA

- Kit comercial *Dual Luciferase Assay* (Promega, Estats Units)

1.9 siRNA

Oligonucleòtid de síntesi de doble cadena contra TCERG1 (Isogen Life Sciences, Països Baixos), modificat amb el fluoròfor Cy3 amb les seqüències següents:

Seqüència nucleotídica de la cadena *sense*:

5'- CY3GGAGUUGCACAAGAUAGUUTT -3' (21 nt)

Seqüència nucleotídica de la cadena *antisense*:

3'- TTCCUCAACGUGUUCUAUCA -5' (21 nt)

Les dues cadenes es subministren per separat. El tampó d'anellament de les cadenes de siRNA subministrades té la següent composició:

- 30 mM HEPES-KOH pH 7.4
- 100 mM KCl
- 2 mM MgCl₂
- 50 mM NH₄Ac

2. INSTRUMENTAL

Per a la síntesi i caracterització de les nanopartícules polimèriques catióniques de quitosan-TPP s'han utilitzat els següents equips:

- Balança analítica *Dual Range XS105* (Mettler-Toledo, Suïssa).
- Balança de precisió *Precisa 600C* (Precisa AG, Suïssa).
- Liofilitzador *Telstar L-3* (Azbil Telstar, Espanya).
- Difractor làser *Mastersizer 2000* acoblat a mòdul *Hydro 2000S* (Malvern Instruments, Regne Unit).
- Mesura del potencial Z en equip *Zetasizer Nano-Z* (Malvern Instruments, Regne Unit).
- Agitador magnètic amb placa calefactora *MR Hei-Tec* (Heidolph, Alemanya)
- Vòrtex *MS2 Minishaker* (Ika, Alemanya)
- Centrífuga *Digicen 20-R* (OrtoAlresa, Espanya)
- Microscopi electrònic de transmissió *Jeol H-800-MT* (Hitachi, Japó).

MATERIAL I MÈTODES

- Microscopi electrònic de rastreig FE-SEM *Jeol 7100* (Jeol, Japó)
- Evaporador de carboni al buit *Emitech 950 X* (Quorum Technologies, Regne Unit)
- Microscopi de força atòmica *Multimode 8 AFM* acoblat a un mòdul electrònic *Nanoscope III Electronics* (Bruker, Estats Units).

Per a la síntesi i caracterització dels components i de les pròpies nanopartícules lipídiques sòlides catióniques s'han utilitzat els següents equips:

- Balança analítica Dual Range XS105 (Mettler-Toledo, Suïssa)
- Difractor làser Mastersizer 2000 acoblat a mòdul Hydro 2000SM (Malvern Instruments, Regne Unit).
- Mesura del potencial Z en equip Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments, Regne Unit).
- Centrífuga *Digicen 20-R* (OrtoAlresa, Espanya)
- Placa calefactora *Agimatic* (P Selecta, Espanya)
- Bany termostàtic Polystat K6 amb termòstat Polystat cc3 (Huber, Alemanya)
- Agitador mecànic *Ultraturrax T25 Digital* (Ika, Alemanya)
- Microscopi electrònic de transmissió Jeol JEM 2100 LaB6 (Jeol, Regne Unit)
- Microscopi electrònic de rastreig FE-SEM Jeol 7100 (Jeol, Japó)
- Evaporador de carboni al buit *Emitech 950 X* (Quorum Technologies, Regne Unit)
- Microscopi de força atòmica *Multimode 8 AFM* acoblat a un mòdul electrònic *Nanoscope III Electronics* (Bruker, Estats Units).
- Espectroscopi de fotoelectrons *Multitechnique PHI 5500* (Physical Electronics)
- Calorímetre *DSC30* (Mettler-Toledo, Suïssa)
- Termobalança *TGA-851e* (Mettler-Toledo, Suïssa)
- Difractor de raigs X *PANalyticalX'Pert PRO MPD θ/θ*
- Espectròmetre de masses *ThermoFinnigan TRACE DSQ*
- Equip de ressonància magnètica nuclear Varian VNMRS-400F (Regne Unit)

Els assajos de retardament en gel d'agarosa han precisat dels següents elements:

- Estació Gel Doc (BioRad, Estats Units) amb el software Quantity One, per a la visualització i quantificació d'àcids nucleics.
- Cambra d'electroforesi Sub-Cell GT Cell (bioRad) i font d'alimentació

Per als estudis d'estabilitat a curt termini de les cSLN s'han utilitzat els següents equips:

- Nevera (LG, Corea del Sud)
- Estufes (Heraeus, Alemanya)

En l'anàlisi de proteïnes s'han utilitzat els equips següents:

- Cubeta per a Western-Blot i font d'alimentació (Bio-Rad, Estats Units).
- Agitador de plaques Stuart See-Saw Rocker SSL4
- Microcentrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R
- Cassette de revelat
- Reactius de revelat. (Western Lightning Chemiluminiscence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Estats Units)
- Revelador Agfa Curix 60
- Pel·lícula Agfa Curix RP2 Plus

En l'assaig de bioluminiscència s'han utilitzat els equips següents:

- Luminòmetre (Berthold Detection Systems, Alemanya)

En els estudi de viabilitat i transfecció cel·lular s'han utilitzat els components següents:

- Plaques M6 i M12 (Thermo Scientific Nunc, Estats Units)
- Cabina de flux laminar Faster BH-EN 2004
- Cambra a 37 °C al 5% CO₂ ThermoScientific Steri-Cycle CO₂ incubator Hepa Class 100
- Cambra Neubauer
- Microscopi de camp clar amb objectiu invertit Olympus CKX 41 (Olympus Corporation, Japó)
- Càmera fotogràfica acoplada Olympus DEE-D (Olympus Corporation, Japó)

- Microscopi confocal LEICA TCS SP5 amb software LAS-AF per a l'adquisició d'imatges.

3. MÈTODES

3.1 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP

Les nanopartícules de quitosan-TPP es sintetitzen (figura 17) utilitzant una modificació del mètode original de gelificació ionotròpica (Calvo et al. 1997), que es descriu a continuació:

- Dissolució del quitosan a una concentració del 0,2% p/v en una solució reguladora d'acetat ajustada a pH 5 amb una solució de NaOH al 10% (Gan et al. 2005, Nasti et al. 2009).

Per a això, es prepara la solució reguladora d'acetat a partir d'àcid acètic glacial i acetat sòdic 3-hidrat. Un cop ajustat el pH, es prenen, per exemple, 100ml, en els quals es dissolen 200 mg de quitosan, obtenint-se així la concentració al 0,2% p/v.

- La solució es sotmet a agitació magnètica durant 3 hores, fins a la completa dissolució del quitosan en la solució reguladora d'acetat.
- Filtratge de la solució a través de paper de filtre qualitatiu, per tal d'eliminar restes de quitosan que no hagin pogut ser solubilitzades.
- Preparació de la solució del polianió tripolifosfat sòdic (TPP) a una concentració de 0,84 mg / ml, amb aigua ultrapura.
- La síntesi es duu a terme afegint gota a gota 12 ml de la solució de TPP a 30 ml de la solució de quitosan solubilitzat, sota agitació magnètica suau. Les nanopartícules es formen espontàniament per gelificació ionotròpica (Vila *et al.* 2002; Carrillo *et al.*, 2014).
- La suspensió obtinguda es filtra per eliminar possibles agregats formats durant la reacció.

Una part de la suspensió obtinguda es distribueix en vials per a la seva liofilització i conservació, i a partir de la qual es realitza una presa d'imatges per microscòpia. Per tal d'avaluar la influència dels diversos paràmetres operacionals del mètode de gelificació ionotròpica en les propietats de les nanopartícules obtingudes i la seva tendència a la formació d'agregats, aquesta reacció de síntesi s'estudia en dues fases, sota diferents condicions experimentals.

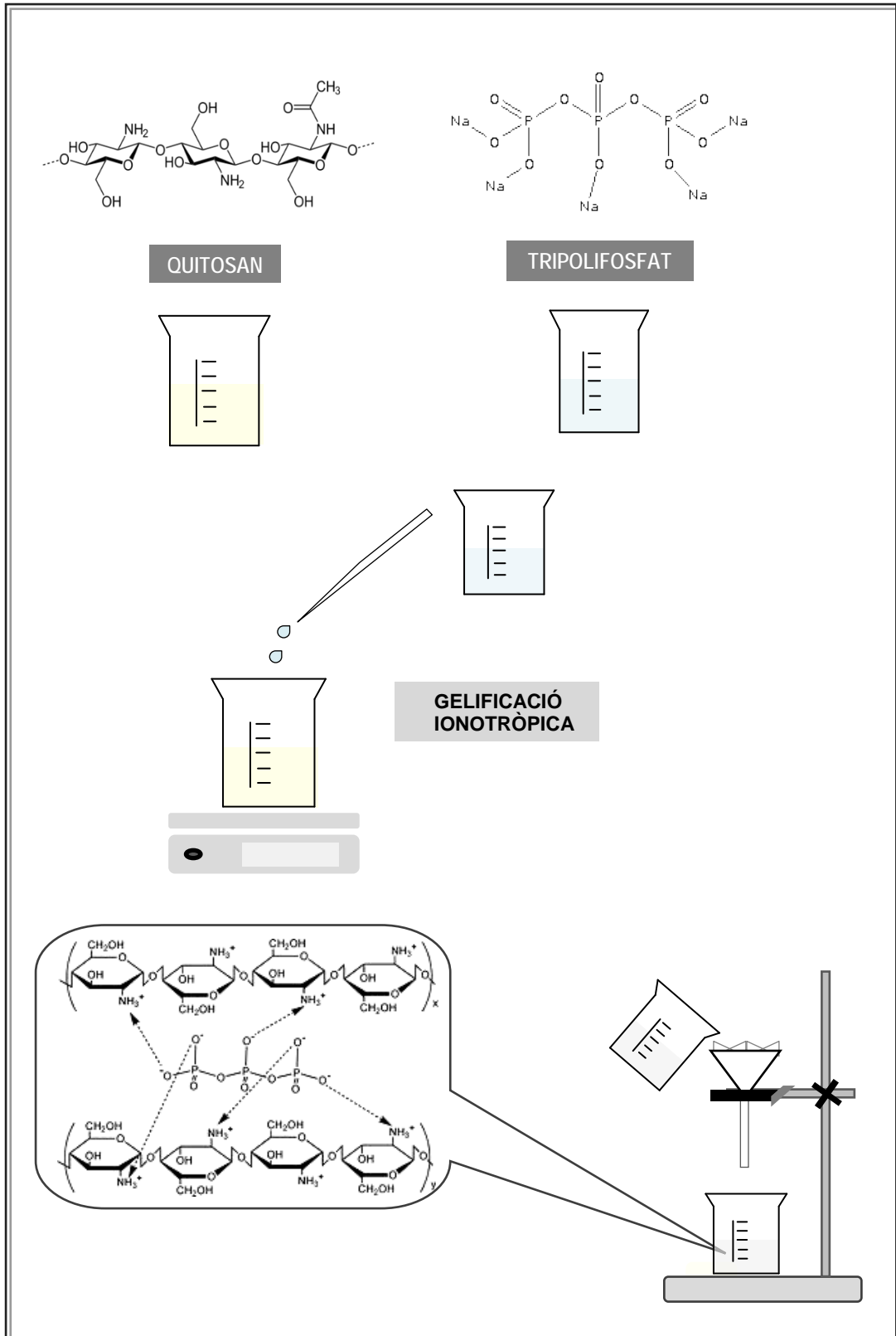


Figura 17. Procediment de la gelificació ionotròpica per a l'obtenció de nanopartícules de quitosan-tripolifosfat.

3.2 DISSENY EXPERIMENTAL PER A L'ANÀLISI DE L'EFECTE DELS PARÀMETRES OPERACIONALS EN LES CARACTERÍSTIQUES DE LES NANOPARTÍCULES

Els factors estudiats en un primera aproximació són els següents:

- Velocitat d'agitació durant la reacció de síntesi.
- Temps de reacció per a la síntesi de les nanopartícules.
- Temps transcorregut en l'addició de TPP a la solució de quitosan.
- Filtratge de la solució obtinguda immediatament després de la finalització del temps de reacció de síntesi. Aquest paràmetre s'avalua de forma qualitativa, amb l'única finalitat de valorar la possibilitat de retenció d'agregats microscòpics a través d'un paper de filtre amb un diàmetre de porus de l'ordre de micres. A partir del filtrat es procedirà a la mesura de la mida de partícula.

Es porta a terme un disseny factorial multinivell de tipus 2^k aleatoritzat, en què s'avaluen els quatre factors esmentats anteriorment a dos nivells (disseny 2^4). Es realitzen, per tant, un total de 16 experiments. A partir del resultat, es prioritza l'elecció de l'execució experimental en què la reacció de síntesi consumeixi menys temps, i en la qual la mida mitjana de partícula sigui acceptable.

Posteriorment, s'aplica un segon disseny experimental a partir dels resultats de l'anterior, en què es tenen en compte els factors següents:

- Velocitat d'agitació durant la reacció de síntesi.
- Temps de reacció per a la síntesi de les nanopartícules.
- Temps transcorregut en l'addició de TPP a la solució de quitosan.

També en aquest cas es realitza un nou disseny factorial multinivell de tipus 2^k aleatoritzat; en aquest cas s'avaluen els tres factors esmentats més amunt a dos nivells (disseny 2^3). El nombre d'experiments duts a terme és de 8.

A la taula 1 es mostra en detall el primer disseny experimental, amb les diferents combinacions.

Experiment	Velocitat d'agitació (rpm)	Temps de reacció per a la síntesi (min)	Temps transcorregut en l'addició de TPP (min)	Filtratge posterior a la síntesi
1	500	22	20	SÍ
2	700	22	10	SÍ
3	700	30	20	SÍ
4	500	30	20	SÍ
5	500	22	10	NO
6	500	22	20	NO
7	700	30	10	NO
8	500	30	10	NO
9	700	30	20	NO
10	700	22	20	SÍ
11	500	30	10	SÍ
12	500	30	20	NO
13	700	30	10	SÍ
14	700	22	10	NO
15	500	22	10	SÍ
16	700	22	20	NO

Taula 1. Disseny experimental 2⁴. Cadascun dels tres factors s'estudia a dos nivells. Rpm es refereix a revolucions per minut.

A la taula 2 es mostra de forma detallada el segon disseny experimental amb les diferents combinacions.

Experiment	Velocitat d'agitació (rpm)	Temps de reacció per a la síntesi (min)	Temps transcorregut en l'addició de TPP (min)
1	700	15	5
2	500	15	10
3	700	10	10
4	500	10	5
5	700	15	10
6	500	15	5
7	700	10	5
8	500	10	10

Taula 2. Disseny experimental 2³. Cadascun dels tres factors s'estudia a dos nivells.

Posteriorment, i després de fixar la resta de paràmetres, s'avalua la influència de la velocitat d'agitació sota la qual té lloc la reacció de gelificació ionotròpica, en l'interval entre 500 i 900 rpm. S'analitza la possible influència en la mida de partícula i els seus efectes en el rendiment en termes de distribució de l'esmentada mida obtinguda per a cada condició.

L'anàlisi estadística es realitza mitjançant l'aplicació *Statgraphics Centurion 5.6*.

3.3 SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES (CSLN)

La fórmula de partida es compon de 500 mg de lípid matricial, 800 mg del lípid catiònic octadecilamina i 400 mg de tensioactiu (Poloxamer 188). Com a primer pas per a l'optimització de la formulació, s'analitzen, en termes de mida de partícula resultant, els següents lípids matricials: Compritol® 888 ATO, Precirol® ATO 5 i àcid esteàric. Un cop triat el lípid matricial apropiat (en termes de mida de partícula), es duen a terme diversos experiments en què es modifica la quantitat d'octadecilamina i Poloxamer 188, mentre que la quantitat de lípid matricial es manté constant fins a aconseguir la formulació òptima.

Les cSLN s'obtenen mitjançant el mètode de microemulsificació en calent (Vighi *et al.*, 2010). Tots els components s'escalfen 5-10 °C per sobre dels seus respectius

MATERIAL I MÈTODES

punts de fusió. A continuació, la matriu lipídica s'aboca en la barreja composta pel lípid catiónic, l'aigua i el tensioactiu. Es forma una emulsió en calent per agitació de la mescla a 20000 rpm durant 10 minuts. Després, l'emulsió es dispersa immediatament en aigua refredada a 2-3 °C, a una ràtio aproximada de 1:5 (figura 25). Les cSLN es formen sota agitació a 20000 rpm durant 10 minuts. La suspensió es centrifuga a 15000 rpm durant 30 minuts per eliminar qualsevol excés de tensioactiu i després es filtra per al seu posterior anàlisi.

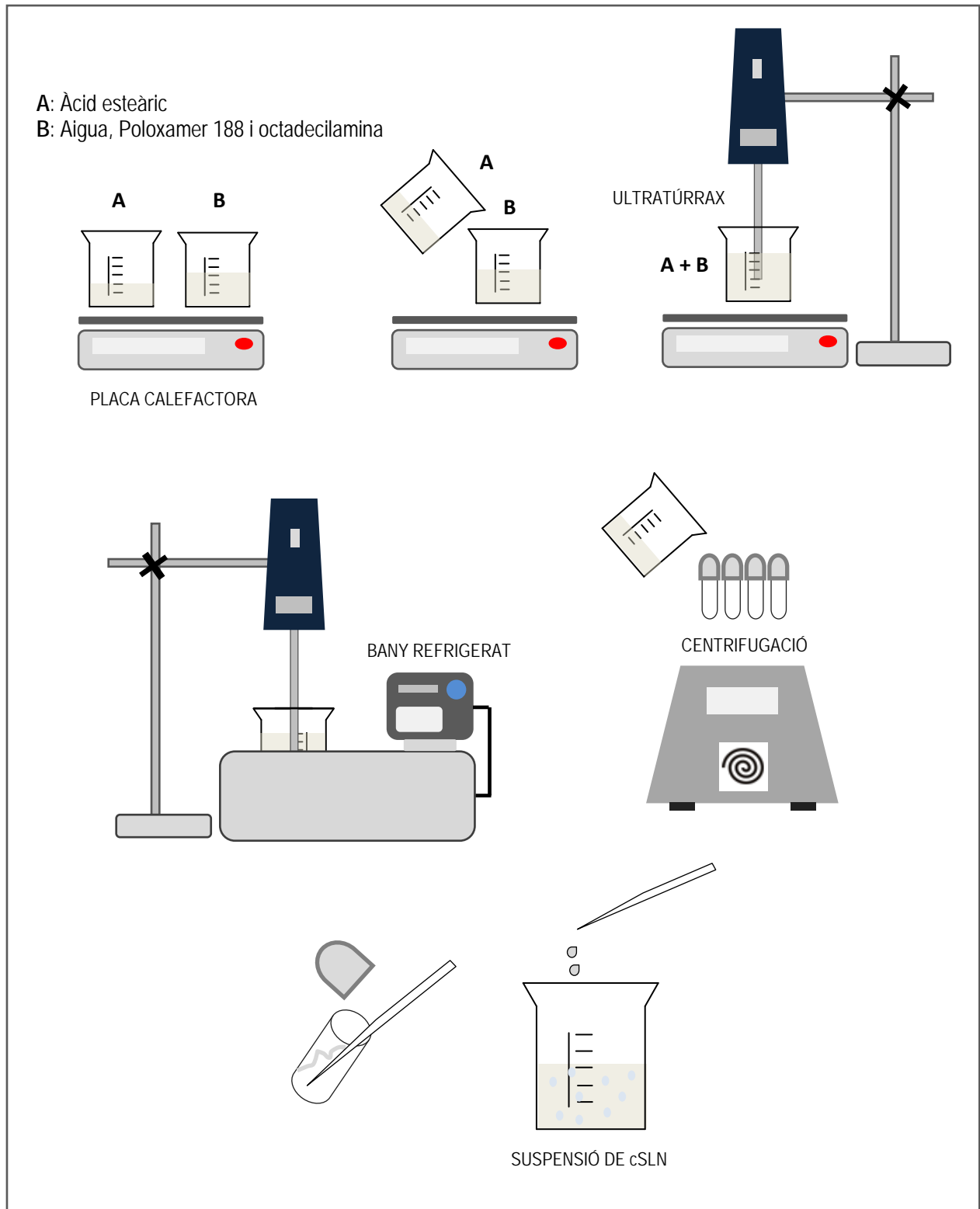


Figura 25. Obtenció de nanopartícules lipídiques sòlides catióniques per microemulsificació en calent.

3.4 DETERMINACIÓ DE LA MIDA DE PARTÍCULA

L'anàlisi de la mida de partícula té com a objectiu poder definir quantitativament la mida de les partícules, ja sigui com a funció del diàmetre, àrea o volum.

Els equips de determinació de mida de partícula faciliten resultats a partir d'una distribució de partícules tridimensionals que poden no ser perfectament esfèriques. Per tant, necessàriament cal procedir com si fossin esfèriques o adaptar la quantitat final mesurada a la d'una esfera equivalent (Skoog *et al.*, 2008).

En el cas de les nanopartícules d'aquest treball, la mida de partícula es dona com a diàmetre mitjà a partir de les àrees superficials mesurades. Aquest paràmetre es defineix estadísticament com a $D [3,2]$ (*surface weighted (or Sauter) mean diameter*) (Merkus, 2009).

Un dels mètodes més utilitzats per a la determinació de la mida de partícula és la dispersió de llum làser d'angle baix o difracció làser (figura 18). A partir del tractament matemàtic aplicat als angles de difracció generats quan la mostra s'exposa al feix de llum làser - teoria de la dispersió de Mie i teoria de la difracció de Fraunhofer, en el cas d'aquest treball-, s'infereix la distribució de mides de partícula (Skoog *et al.*, 2008).

En les nanopartícules de quitosan-TPP, així com en les cSLN, la mida de partícula es determina efectivament mitjançant difracció làser en un equip *Mastersizer 2000* acoblat a un mòdul *Hydro 2000SM* per al tractament de mostres en solució, fixat a una velocitat d'agitació de 800 rpm. Tant a causa del mètode d'obtenció de les nanopartícules, -molt poc concentrades-, com per la seva morfologia, el fet d'utilitzar un medi líquid on suspendre les nanopartícules i que aquestes hi siguin insolubles n'afavoreix el procés de mesura. Aquesta suspensió facilita una distribució més homogènia de les nanopartícules i ajuda a minimitzar eventuais forces de cohesió que es poden donar entre partícules i que poden facilitar la seva aglomeració. Tanmateix, la velocitat d'agitació aplicada al propi mòdul *Hydro 2000SM* per fer circular la mostra pot contrarestar aquesta avantatge, per la qual cosa esdevé un factor a tenir en compte.

Per a la mesura, totes les mostres s'analitzen per triplicat, i se n'utilitza una quantitat suficient fins a aconseguir-se l'obscuració adequada. Els resultats s'expressen com a diàmetre mitjà superficial ($D [3,2]$), en nanòmetres (nm).

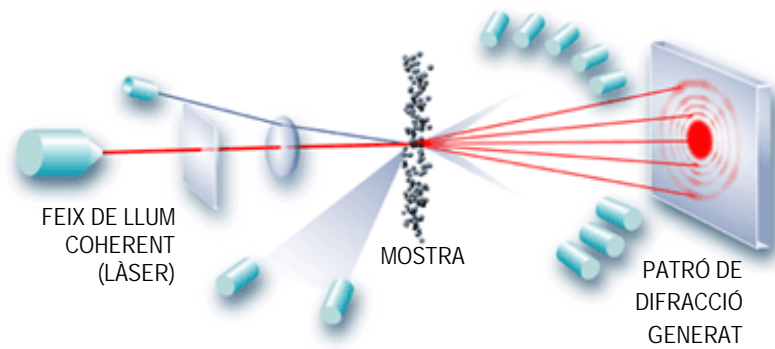


Figura 18. Fenomen de difracció de la llum làser (lesmat).

3.5 DETERMINACIÓ DEL POTENCIAL Z

La determinació del potencial zeta és un reflex de la càrrega elèctrica superficial de les nanopartícules. En el cas de nanopartícules catióniques lipídiques sòlides, interessa poder determinar la càrrega positiva en superfície que ha de permetre la unió d'àcids nucleics per interacció electrostàtica.

El model de la doble capa pretén explicar com actuen les forces d'atracció i repulsió en la proximitat de la superfície de la nanopartícula (figura 19).

Quan es considera una nanopartícula carregada positivament, aquesta atrau al seu voltant ions negatius (contra-ions). Aquests contra-ions constitueixen una capa rígida que envolta la nanopartícula, anomenada capa d'*Stern*. A continuació, es forma una altra capa on s'hi troben més ions negatius, així com d'altres de positius que intenten aproximar-se a la nanopartícula. En aquesta zona, s'estableix un equilibri dinàmic entre aquests dos tipus d'ions, i constitueix el que s'anomena capa de difusió. La quantitat d'ions positius va augmentant a mesura que creix la distància respecte de la nanopartícula, mentre que disminueix la d'ions negatius. Són els contra-ions negatius de la capa d'*Stern* i els de la capa de difusió els que donen nom al model de la doble capa. En el límit de la capa de difusió té lloc la mesura del potencial Z, entès com a potencial elèctric superficial i, per tant, el punt que dóna idea de la quantitat de càrrega, en aquest cas positiva, de la nanopartícula, i que és mesurada en milivolts (mV) (Adamson *et al.*, 1967).

Pel que fa al mètode instrumental, el valor de potencial Z es determina mitjançant microelectroforesi làser *Doppler* i dispersió electroforètica de la llum, en un equip *Zetasizer Nano-Z* (Malvern Instruments). La velocitat amb què les nanopartícules del límit de la capa de difusió es mouen entre els elèctrodes de la cèl·lula (figura 20) just després de l'aplicació d'un camp elèctric està relacionada amb el valor de potencial Z. Així doncs, a partir d'aquesta velocitat de mobilitat electroforètica es calcula el valor de potencial zeta.

Per a la mesura del potencial Z en nanopartícules polimèriques catióniques de quitosan-TPP i nanopartícules lipídiques sòlides catióniques (cSLN), totes les mostres s'analitzen per triplicat i els resultats s'expressen com a voltatge mitjà, en milivolts (mV).

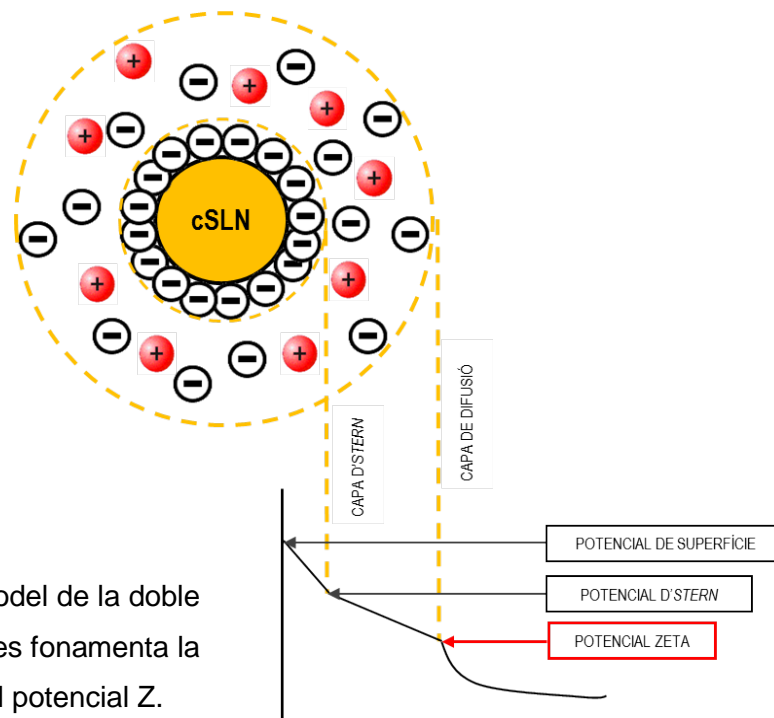


Figura 19. Model de la doble capa en què es fonamenta la mesura del potencial Z.

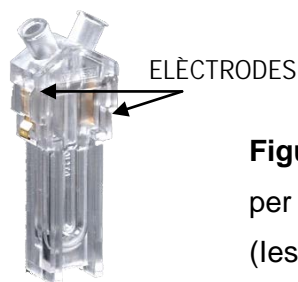


Figura 20. Tipus de cèl·lula utilitzada per a la mesura del potencial Z. (lesmat)

3.6 LIOFILITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES

El procés de liofilització consisteix en l'eliminació de l'aigua d'una mostra en condicions d'alt buit. La finalitat és la preservació de la mostra, ja que en absència d'aigua s'impossibilita el creixement bacterià que la podria malmetre. Primerament, cal la congelació de la mostra, l'aigua de la qual, en les condicions de buit aplicades durant el procés, s'elimina per sublimació: passa directament de l'estat sòlid a l'estat gasós. Aquesta etapa es coneix com a assecat primari. En funció de les característiques de la mostra, cal portar a terme un assecat secundari, la finalitat del qual és l'eliminació de les molècules d'aigua que no han estat congelades en la primera fase del procés de liofilització, pel fet de trobar-se fortament lligades a l'interior de la mostra (Hernández, 2003).

En el procés de liofilització de les nanopartícules de quitosan-TPP cal afegir un crioprotector, que en aquest cas ha estat el manitol. La funció principal en aquest tipus de producte és la d'actuar com a substància de càrrega, així com facilitar la redispersió posterior del liofilitzat.

Per a la liofilització de les nanopartícules de quitosan-TPP obtingudes, es procedeix com segueix: La suspensió filtrada amb les nanopartícules de quitosan-TPP es centrifuga a 12000 rpm a 15°C durant 10 minuts.

A continuació, es descarta el sobrenedant i es procedeix al rentat del *pellet*, que conté les nanopartícules precipitades, mitjançant aigua ultrapura. El procés de rentat es realitza per duplicat. El *pellet* és a continuació resuspès amb 2 ml d'una solució de manitol al 2% p/v, amb ajuda de vòrtex per facilitar la resuspensió de les nanopartícules.

Finalment, s'omplen els vials per liofilitzar.

La liofilització (figura 21) es porta a terme en condicions estàndard, en un liofilitzador Telstar L-3, amb una durada del procés de 48 hores. Temperatura de congelació: -47°C. Temperatura de calefacció: 40°C.



Figura 21. Imatge d'una suspensió de nanopartícules de quitosan-TPP abans i després del procés de liofilització.

Pel que fa a les cSLN, la liofilització directament a partir de la suspensió obtinguda, amb i sense crioprotector (trehalosa 5%, ràtio 1:1), segons l'assaig a realitzar. No s'aplica una temperatura d'escalfament per forçar l'assecat secundari per evitar qualsevol risc de fusió al tractar-se de components termolàbils, sinó que es deixa que les mostres liofilitzades acabin equilibrant-se per sí soles amb la temperatura ambient.

3.7 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TEM, *TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY*)

La microscòpia electrònica es fonamenta en l'ús d'un feix d'electrons per obtenir informació morfològica o estructural de materials.

La menor longitud d'ona dels electrons respecte la de la llum visible fa que els fenòmens de difracció tinguin lloc a una escala molt menor i la resolució d'imatge en aquest tipus de microscòpia és molt major que en la microscòpia òptica.

En la microscòpia electrònica de transmissió es prenen imatges generades a partir dels electrons que travessen una mostra, generats per una pistola d'electrons situada a dalt de tot de la columna de l'instrument (figura 22), i que es troba en condicions d'alt buit. Per tal de minimitzar les interaccions electró-matèria que provoquen l'atenuació dels electrons per part de la mostra, aquesta ha de preparar-se en fines làmines. Per a mostres sòlides dispersades en un solvent, cal dipositar una gota en una petita reixeta esfèrica revestida de carboni. Un cop seca, es pot visualitzar directament. Els electrons que travessen la mostra impacten sobre una pantalla de fòsfor i es genera llum que és processada per

generar la imatge, que és bidimensional i permet visualitzar tant la superfície com l'estructura interna del material estudiat (McMahon, 2007).

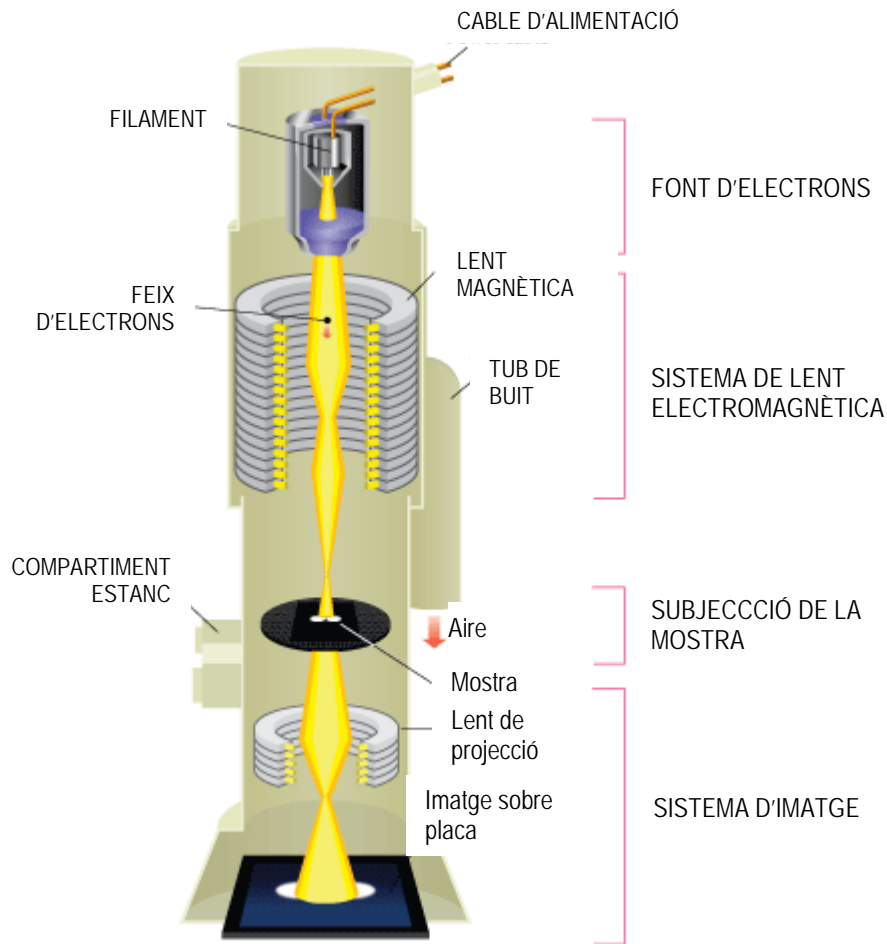


Figura 22. Microscopi electrònic de transmissió i les seves parts principals (Department of Physics, The Chinese University of Hong Kong).

Les mostres de nanopartícules pòlimeriques catióniques de quitosan-TPP s'observen en un microscopi Hitachi H-800-MT (Hitachi High-Technologies) a 200 kV, i les nanopartícules catióniques lipídiques sòlides en un microscopi JEOL JEM 2100 (LaB6), a 200 kV en mode TEM. Les imatges s'adquireixen amb una càmera Orius 1000 ccd (Gatan, Estats Units). Ambdues mostres es preparen en reixetes de coure revestides amb una pel·lícula de carboni perforat.

3.8 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG (SEM, *SCANNING ELECTRON MICROSCOPY*)

Aquesta modalitat de microscòpia electrònica dóna informació de la morfologia externa de les mostres visualitzades, generant imatges tridimensionals. El fonament de la tècnica (figura 23) consisteix en disparar un finíssim feix d'electrons d'una determinada energia (mesurada en keV) sobre una mostra, de forma que té lloc un escombratge de tota la seva superfície, tant en l'eix x com en el y. Per a això, la mostra ha de permetre la lliure circulació d'electrons. Si de forma natural això no és així, cal revestir-la amb una capa conductora del gruix adequat.

La mostra es troba en una cambra en la que s'ha fet el buit. La imatge es construeix a partir del patró d'escombratge generat fonamentalment per electrons retrodispersats i electrons secundaris, que són captats pels detectors de l'equip (Skoog *et al.*, 2008).

La preparació de mostres tant de nanopartícules de quitosan-TPP com de nanopartícules lipídiques sòlides catióniques (cSLN) per a la seva visualització per microscòpia electrònica de rastreig es realitza de la següent manera: una fina capa de la mostra liofilitzada es col·loca sobre una cinta circular de carboni de doble cara, la qual es diposita adherida en un portamostres (*stub*). L'excés de mostra s'elimina mitjançant una pistola d'aire comprimit. Posteriorment, es procedeix al seu recobriment amb un material conductor en un equip Equip Polaron ES100 (Polaron Instruments). El recobriment es realitza amb carboni (C), en atmosfera inert d'argó (Ar). Les imatges s'adquireixen mitjançant un microscopi electrònic de rastreig Hitachi S4300 d'emissió de camp (Hitachi High-Technologies), aplicant un flux d'electrons corresponent a una energia de 10 keV.

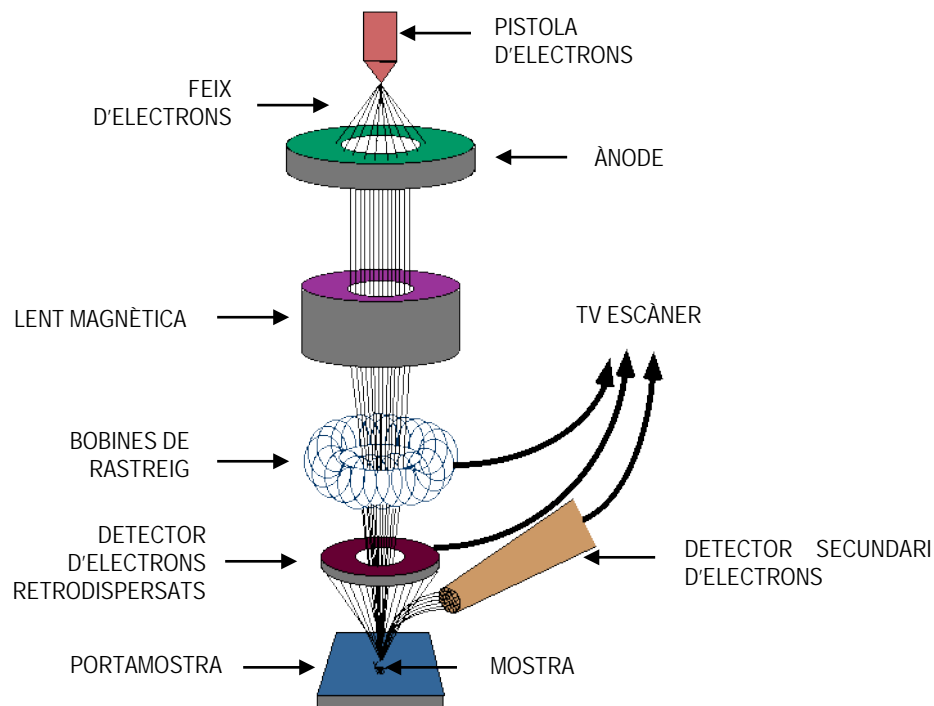


Figura 23. Estructura interna bàsica d'un microscopi electrònic de rastreig (Purdue University, Indiana, Estats Units).

3.9 MICROSCÒPIA DE FORÇA ATÒMICA (AFM, *ATOMIC FORCE MICROSCOPY*)

La tècnica de microscòpia de força atòmica permet assolir prou resolució per a la visualització d'àtoms aïllats i, per extensió de la superfície de qualsevol sòlid. Com a principal avantatge respecte d'altres tècniques microscòpiques, la mostra analitzada no és necessari que sigui conductora elèctrica. A més, no cal efectuar cap preparació prèvia de la mostra, i la visualització es realitza en condicions ambientals.

Tècnicament, les imatges són el resultat de mesurar la força rebuda per una sonda molt fina i transmesa en forma de deflexió d'un raig làser que impacta sobre una palanca (que actua, per tant, com a sensor de força) que sosté aquesta sonda. Aquest força, de poca intensitat i que es manté constant, és conseqüència de la proximitat d'aquesta a la superfície de la mostra. Per tal de poder determinar les característiques de la superfície, la sonda de la palanca es mou resseguint els contorns de la mostra (figura 24).

La tècnica d'AFM pot operar en diferents modes, en funció de si la punta entra o no en contacte amb la superfície de la mostra, i de com es produeix aquest contacte (continu o discontinu) (Binnig i Quate, 1986).

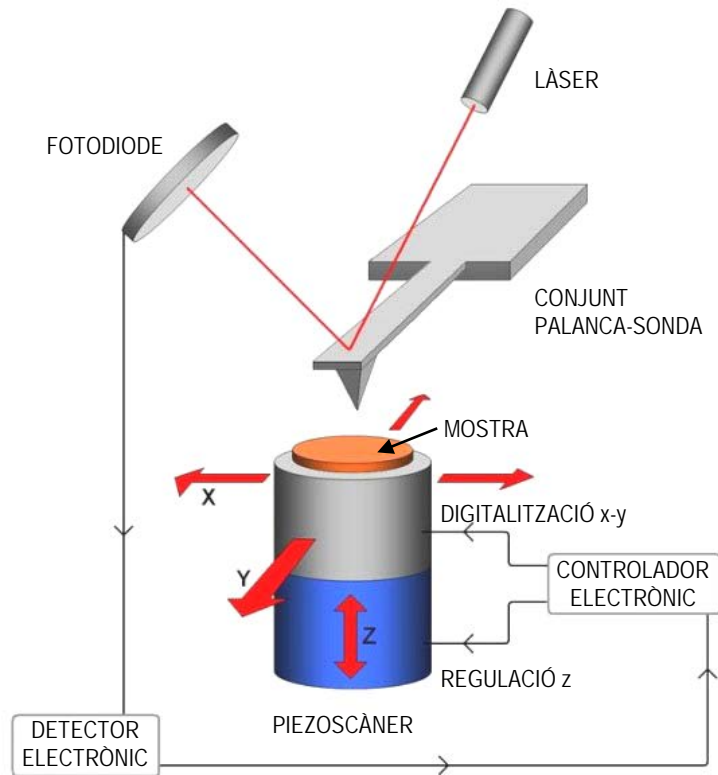


Figura 24. Il·lustració de les parts d'un microscopi de força atòmica (University of Virginia. School of Medicine, Estats Units)

3.9.1 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP PER AFM

Les imatges topogràfiques s'adquireixen a partir de mostres fresques obtingudes a partir de les condicions experimentals corresponents a cada velocitat d'agitació estudiada (500, 600, 700, 800 i 900 rpm), en un microscopi de força atòmica *Multimode 8 AFM* acoblat a un mòdul electrònic *Nanoscope III Electronics* (Bruker). S'utilitza el mode *peak force tapping* per a l'anàlisi de la superfície. Aquest mode d'imatge utilitza corbes de força individuals per detectar la presència de la superfície per deflexió de la palanca de la sonda. Aquesta deflexió, que es pot calcular com a força vertical aplicada, es manté constant i s'utilitza com un

senyal de realimentació per rastrejar la superfície de la mostra. Les sondes utilitzades són de sílice i rectangulars, amb un valor nominal de constant elàstica de 40 nN/nm (VistaProbes).

3.9.2 CARACTERITZACIÓ DE CSLN I LIPOPLEXOS CSLN:PDNA PER AFM

Es porta a terme una anàlisi morfològica de les cSLN i dels lipoplexos cSLN:pDNA per mitjà de microscòpia de força atòmica (AFM). Les imatges topogràfiques s'adquireixen en un equip Multimode 8 AFM acoblat a un mòdul Nanoscope V Electronics (Bruker), per mitjà del mode *peak force tapping*. Les corbes de força s'adquireixen a una freqüència de 2 kHz i s'apliquen 300 pN com a força vertical. Aquesta baixa força preserva tant la integritat de la mostra com de l'àpex de la sonda. Les sondes d'AFM es componen de palanques de nitrur de silici triangulars i una piràmide d'òxid de silici, amb un valor nominal de constant elàstica de 0,35 nN/nm (sondes SNL-10, Bruker).

La preparació de la mostra es realitza de la manera següent: Per a l'anàlisi morfològica de cSLN aïllades, la mostra liofilitzada es resuspèn en aigua ultrapura immediatament abans de ser visualitzada. Per a la visualització dels lipoplexos cSLN:pDNA, s'omet aquest pas. A continuació, 20 ml de la mostra d'interès s'aboquen en un portaobjectes de vidre pla, prèviament enganxat sobre un disc de tefló amb epoxi de dos components. Després de 2 minuts, la mostra s'esbandeix suaument amb aigua ultrapura i es realitzen les fotografies en líquid. Abans d'iniciar el procés d'adquisició d'imatges, les mostres es deixen estabilitzar durant 30 minuts per equilibrar tèrmicament la mostra i la sonda AFM amb el medi ambient, amb la finalitat de prevenir la deriva del piezoscanner. Les imatges s'adquireixen a 0,5 Hz i 768x768 píxels. La detecció i l'anàlisi de partícules es realitza utilitzant el programari d'anàlisi Nanoscope Analysis (Bruker).

3.10 DETERMINACIÓ DE PROPIETATS NANOMECÀNIQUES (MÒDUL DE YOUNG) DE LES CSLN PER MICROSCÒPIA DE FORÇA ATÒMICA NANOMECÀNICA QUANTITATIVA (AFM-QNM®)

Amb aquesta tècnica es quantifica el mòdul de Young de les cSLN per tal de caracteritzar-les des del punt de vista nanomecànic.

La nanomecànica quantitativa (QNM®) utilitza el mateix tipus d'instrumentació que l'AFM convencional, i es pot considerar com a una evolució del *tapping mode*. En aquest cas, la interacció entre la punta i la mostra és molt més suau; la força aplicada és molt menor, pel que pot arribar a ser de 10 pN. Punt a punt, la punta baixa, comprimeix la mostra i torna a pujar, generant una corba de força per a cada punt. Aquesta compressió que deforma la mostra es tradueix en la determinació de les propietats elàstiques del material estudiat. A partir d'aquestes dades s'obté tant la imatge com el valor del mòdul de Young. L'avantatge d'aplicar una força tant baixa és que es deforma molt menys la mostra, aspecte especialment important en el cas de mostres toves. Per altra banda, la punta es desgasta i s'embruta en un grau molt menor, amb la qual cosa millora la resolució de les imatges obtingudes (Giessibl, 2003).

Per a les cSLN, les imatges topogràfiques s'adquireixen en un equip Multimode 8 AFM acoblat a un mòdul Nanoscope V Electronics (Bruker), per mitjà del mode *Peak Force ScanAsyst mode*. El punt d'ajust es fixa a 2 nN i la força d'amplitud de pic és de 20-30 nm. Les sondes d'AFM es componen de palanques de nitrur de silici triangulars i una piràmide d'òxid de silici amb un valor nominal de constant elàstica de 0,35 nN/nm (sondes SNL-10, Bruker), radi de 8-10 nm i amb un límit de força de 10 nN.

La preparació de la mostra es realitza de la manera següent: A partir d'una mostra liofilitzada, es procedeix a ressupendre-la en aigua ultrapura immediatament abans de portar a terme l'experiment. S'aboquen 40 µl de la suspensió reconstituïda en una superfície de mica recentment escindida i enganxada a la superfície d'un disc de tefló. Es deixen transcórrer 10 minuts abans d'assecar la preparació amb nitrogen sec.

Les mostres es visualitzen en atmosfera oxidativa.

3.11 ESPECTROSCÒPIA DE FOTOELECTRONS PER EMISSIÓ DE RAIGS X (XPS, X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY) DE CSLN

Aquesta tècnica (figura 26) proporciona informació sobre la composició química quantitativa de la mostra. La mostra és sotmesa a irradiació amb raigs X (longitud d'ona entre 0,01-10 nm). L'espectre resultant representa l'energia cinètica dels fotoelectrons emesos, la qual és funció de l'energia d'enllaç (E_b). Al mateix temps, aquesta energia d'enllaç és característica per a cada àtom i orbital. Cal tenir en compte, doncs, que les energies d'enllaç dels electrons situats als orbitals 1s augmenten amb el número atòmic. Aquest fet s'explica perquè quan major càrrega positiva té el nucli, major és l'energia d'enllaç dels electrons de l'orbital 1s, que és el més proper al nucli atòmic.

Els raigs X que irradien la mostra es generen per bombardeig electrònic d'un metall. En resposta, els electrons dels orbitals més propers al nucli del metall són desplaçats emetent quanta de radiació X, i que espectralment es detecten com a sèries de línies d'emissió ($K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$ i/o $L\beta$). La línia d'emissió K és la que presenta una longitud d'ona més curta i, per tant, més energètica.

Així, un fotó d'energia coneguda ($E = h\nu$) d'un feix monocromàtic dels raigs X prèviament generats, incideix sobre la mostra problema i provoca l'emissió d'un fotoelectró, amb una energia cinètica determinada i característica segons s'esmenta anteriorment, de manera que es poden identificar i quantificar els elements químics presents a la mostra (Skoog *et al.*, 2008), fins a una profunditat d'uns 5-10 nm.

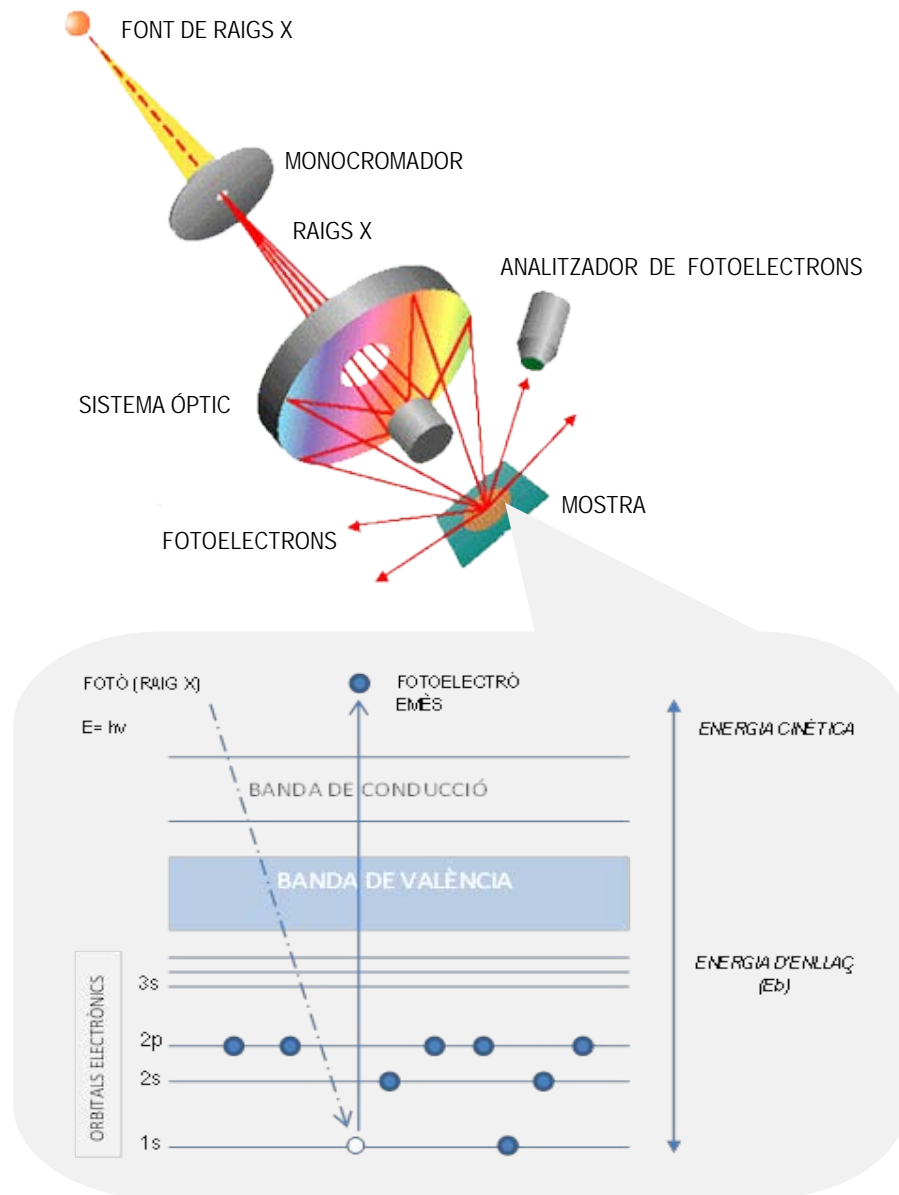


Figura 26. Estructura d'un espectròmetre d'electrons (NTT Advanced Technology, Japó).
 A la part inferior, detall ampliat de les transicions electròniques en la mostra com a resposta a la irradiació amb raigs X.

Per a les cSLN, és important la quantificació del percentatge de nitrogen en la seva superfície, ja que dóna informació sobre la càrrega positiva que permetrà la unió a àcids nucleics. En aquest cas, s'utilitza un equip Multitechnique PHI 5500 (Physical Electronics) amb una font de raigs X monocromàtica (alumini, línia K α de 1486,6 eV i 350 W), situada perpendicular a l'eix de l'analitzador i calibrada

utilitzant la línia de 3d5/2 d'Ag, amb una amplada total a la meitat del màxim (FWHM, *full-width at half maximum*) de 0,8 eV.

L'àrea analitzada consisteix en un cercle de 0,8 mm de diàmetre, i la resolució seleccionada per a l'espectre general consisteix en una energia de pas de 187,5 eV i 0,8 eV/pas; per als diferents elements en els espectres de perfil de profunditat, la resolució seleccionada és una energia de pas de 23,5 eV i 0,1 eV/pas. Una pistola d'electrons de baixa energia (menys de 10 eV) s'utilitza per ionitzar la superfície en cas necessari. Totes les mesures es realitzen en una cambra d'ultra-alt buit, entre 5×10^{-9} i 2×10^{-8} torr.

3.12 CARACTERITZACIÓ TÈRMICA I ESTRUCTURAL DELS COMPONENTS DE PARTIDA I DE LES CSLN

3.12.1 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE RASTREIG (DSC, DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY)

La calorimetria diferencial de rastreig consisteix en la mesura de la diferència de temperatura entre la mostra problema i un material de referència quan ambdós sistemes es sotmeten a un escalfament controlat (figura 27). La temperatura aplicada ha d'augmentar de forma lineal amb el temps. Aquest procediment provoca que la mostra presenti una diferència de temperatura respecte del material de referència. Tant la temperatura aplicada a la mostra com aquesta diferència de temperatures entre la de la mostra i el material de referència es representen gràficament, i s'obté un termograma diferencial característic d'aquella mostra. El termograma reflecteix els canvis induïts en la mostra com a conseqüència del programa de temperatura controlada aplicat, com ara canvis d'estat, descomposició, oxidació, etc., que seran funció de l'estructura de la mostra i de l'eventual interacció entre els seus components (Skoog *et al.*, 2008). Per a les cSLN, la calorimetria de rastreig diferencial s'utilitza per a l'avaluació de les possibles interaccions entre els components de la formulació, en un equip DSC-822e (Mettler-Toledo) amb un programa de temperatura que consisteix en una velocitat d'escalfament de 10 °C/min en el rang de 30 °C a 200 °C. Aquest instrument realitza la calorimetria de rastreig diferencial pel mètode de flux de calor: procedeix a la mesura de la diferència de temperatura entre les safates que

contenen la mostra i el material de referència, i la converteix en un senyal de flux de calor després d'un procediment de calibratge. Les mostres es pesen en recipients d'alumini amb capacitat per a 40 µl; com a referència s'utilitza un recipient buit. Un flux de nitrogen sec (50 ml / min) permet la realització de l'assaig en una atmosfera no oxidant.

Es realitza també una anàlisi del comportament tèrmic de cSLN liofilitzades amb i sense trehalosa al 5% de forma anàloga, a excepció del rang de temperatura estudiat, que en aquest cas és de 10 °C a 80 °C.

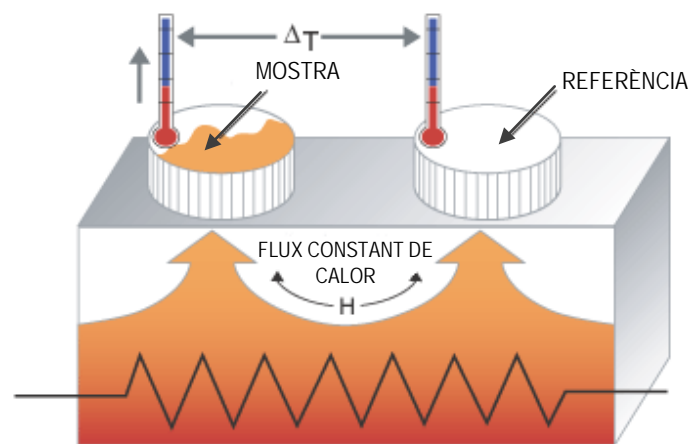


Figura 27. Fonament de la calorimetria diferencial de rastreig per flux de calor (Institut für Technische Chemie. Technische Universität Braunschweig, Alemanya).

3.12.2 ANÀLISI TERMOGRAVIMÈTRICA (TGA, THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS)

Aquest mètode d'anàlisi tèrmica té com a objectiu determinar canvis en la massa d'una mostra en funció de l'aplicació d'un programa de temperatura en atmosfera controlada. És útil per determinar pèrdues de massa a causa de reaccions de descomposició i oxidació, així com per poder identificar processos de desorció, sublimació i vaporització.

La representació del canvi de massa induït per algun d'aquests fenòmens s'anomena corba de descomposició tèrmica (Skoog *et al.*, 2008)

Per efectuar l'anàlisi es disposa d'una microbalança col·locada dins d'un forn (termobalança), amb una entrada i sortida d'aire, i un sistema de control de l'equip i processament de dades (figura 28).

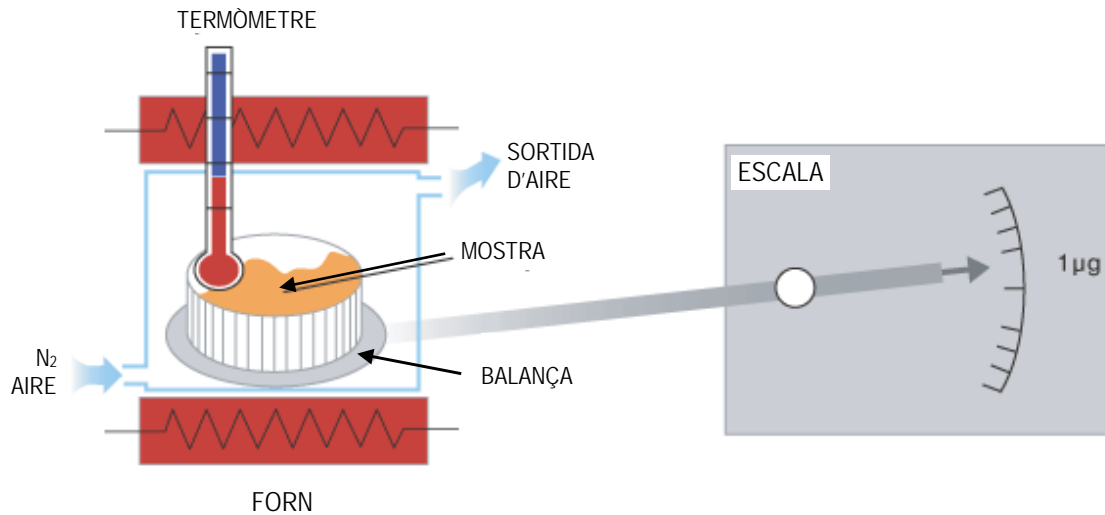


Figura 28. Fonament de la tècnica d'anàlisi termogravimètric (Institut für Technische Chemie. Technische Universität Braunschweig, Alemanya).

L'anàlisi termogravimètrica de les cSLN es realitza amb una termobalança Mettler-Toledo TGA-851e. S'analitzen dues mostres: cSLN liofilitzades amb trehalosa com a crioprotector i cSLN liofilitzades sense crioprotector. Per a cada experiment, la mostra es disposen gresol d'alumini de 70 ml, en atmosfera inert de nitrogen sec a un flux de 50 ml/min, en l'interval de 30 °C a 300 °C amb una velocitat d'escalfament de 10 °C/min.

3.12.3 DIFRACCIÓ DE RAIGS X (XRD, X-RAY DIFFRACTION)

És una tècnica àmpliament utilitzada per a la caracterització de sòlids cristal·lins. Es fonamenta en la generació d'interferències constructives producte de la interacció entre els raigs X monocromàtics incidents i una mostra amb estructura cristal·lina, que difracta la radiació incident. Aquests interferències es produeixen quan les condicions satisfan la llei de Bragg ($n\lambda = 2d \sin \theta$) (Chiakin i Lubensky,

2000). Per tal de conèixer l'estructura de la mostra, es realitzen escombratges d'angles 2θ amb l'objectiu de detectar totes les direccions de difracció. La detecció i processat dels raigs difractats per la mostra (patró de difracció) permeten la identificació de la substància present per comparació amb una referència (figura 29).

Els patrons de difracció de raigs X dels components a granel i d'una barreja fosa d'àcid esteàric i octadecilamina s'obtenen en un difractòmetre per a mostres sòlides PANalyticalX'Pert PRO MPD Θ/Θ , amb un radi de 240 mm en una configuració amb feixos convergents que donen lloc a raigs X monocromàtics, que incideixen en un mirall de focalització, i una geometria de transmissió amb les mostres planes interposades entre pel·lícules de baixa absorció. En aquest cas, les mostres polvoritzades analitzades s'intercalen entre pel·lícules de polièster de 3,6 micres de gruix. Les condicions experimentals són les següents: s'utilitza radiació $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), amb una potència de treball de 45 kV - 40 mA. Les esclatxes del feix incident defineixen una alçada de feix de 0,4 mm, amb 0,04 radiants Söller, tant en el feix incident com en el difractat. La longitud activa (obertura) del detector PIXcel és de $3,347^\circ$. Els escombrats $2\Theta/\Theta$ de 2 a 60° es realitzen amb una mida de pas $0,026^\circ$ i un temps de mesura de 200 segons per pas.

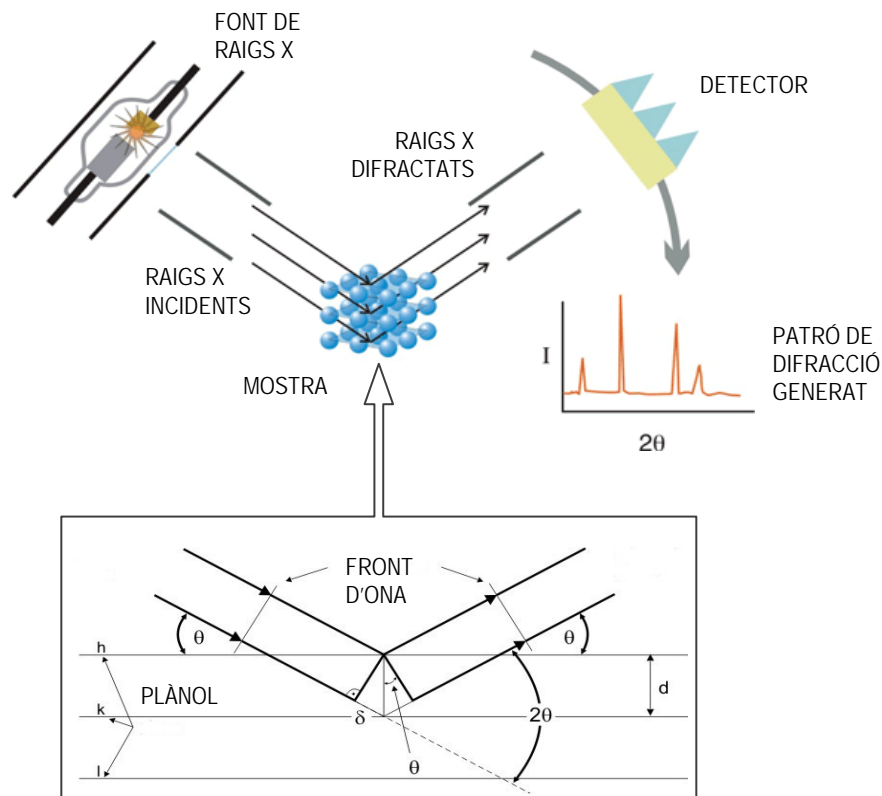


Figura 29. Fonament de la tècnica de difracció de raigs X. (Rensselaer Polytechnic Institute, Jonsson-Rowland Science Center, USA).

3.12.4 ESPECTROMETRIA DE MASSES (MS, MASS SPECTROMETRY)

En l'espectrometria de masses, els components d'una petita quantitat de mostra són transformats en ions gasosos per bombardeig amb electrons, fotons, o per altres medis. Els ions generats són dispersats en funció de la relació massa/càrrega (m/z), gràcies a l'existència d'un imant (figura 30). Aquesta dispersió és transformada en un senyal elèctric que un cop processat permet l'obtenció d'un espectre de masses. És necessari que el procés es realitzi en condicions de molt baixa pressió, ja que així s'afavoreix la producció i conservació dels ions (Skoog *et al.*, 2008).

Els eventuais compostos resultants derivats de la interacció de l'àcid esteàric i l'octadecilamina es determinen per mitjà d'espectrometria de masses d'ionització

per *electrospray* (ESI-MS). Una barreja (1:1) d'àcid esteàric i octadecilamina s'escalfa fins a superar en 5-10 °C el seu punt de fusió. A continuació, la mescla es deixa refredar a temperatura ambient i es polvoritza per obtenir una mida de grànul homogeni. L'anàlisi es realitza en un espectròmetre de masses ThermoFinnigan TRACE DSQ. La temperatura de la font ESI es fixa a 250 °C. La mostra s'ionitza amb una energia de 70 eV i s'introdueix utilitzant una sonda DEP. El control del procés i posterior anàlisi de dades es realitza mitjançant el programari Xcalibur 1.3.

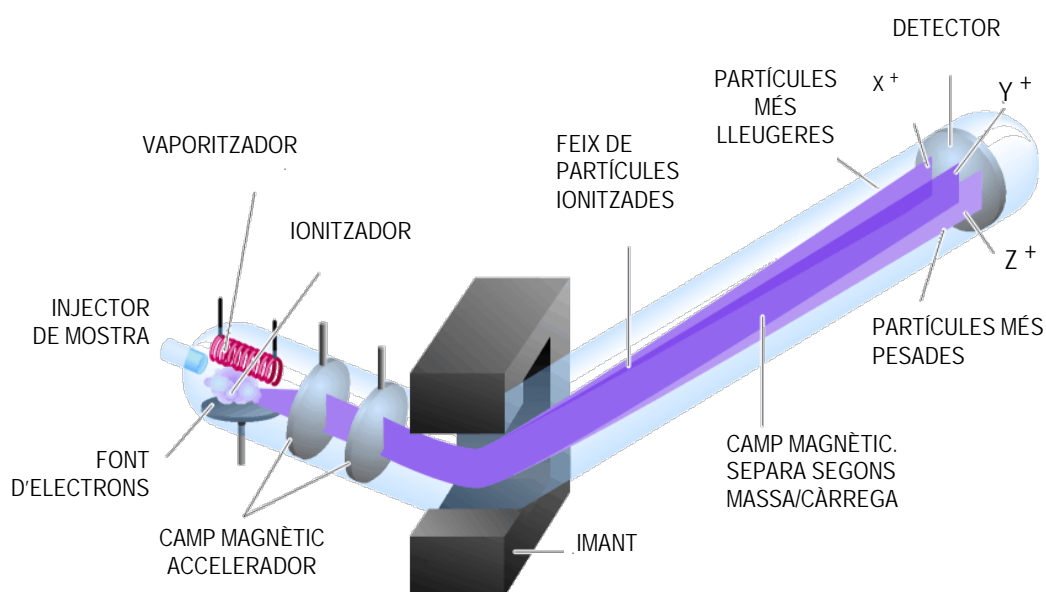


Figura 30. Estructura d'un equip d'espectrometria de masses (Atkins i Carey, 2002).

3.12.5 ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE PROTÓ (¹H-NMR, HYDROGEN NUCLEAR MAGNETIC RESSONANCE)

La ressonància magnètica nuclear de protó, aplicada junt amb d'altres tècniques complementàries, té com a objectiu la identificació i elucidació estructural de molècules.

Els seus fonaments (figura 31) resideixen en la capacitat d'alguns nuclis atòmics amb espín i moment magnètic de patir divisions dels nivells d'energia com a resposta a l'aplicació d'un camp magnètic intens. Aquest desdoblament dels

nivells energètics, induïts per la presència de l'esmentat camp magnètic, provoca l'absorció de radiació electromagnètica. Aquesta absorció és funció de l'entorn molecular, i per tant, de l'estructura molecular del compost en estudi.

En una RMN de protó, s'obté informació dels diferents d'hidrògens que conté la molècula, quant a nombre i tipus. L'entorn químic d'aquests hidrògens, entès com a grups funcionals dels que formen part o als que es troben propers, es coneix a partir de la seva posició a l'espectre obtingut.

La sonda constitueix un element important en aquesta tècnica espectroscòpica, ja que manté la mostra immobilitzada, i disposa d'una sèrie de bobines i turbines que són necessàries per a produir l'efecte de ressonància magnètica (Skoog *et al.*, 2008).

En aquest treball, els compostos resultants derivats de la interacció d'àcid esteàric i l'octadecilamina es pretenen confirmar per mitjà de ressonància magnètica nuclear de protó. Una barreja (1:1) d'àcid esteàric i octadecilamina s'escalfa fins a superar 5-10 °C el seu punt de fusió. A continuació, la mescla es deixa refredar a temperatura ambient i es polvoritza per obtenir una mida de grànul homogeni. Prèviament a l'assaig, una petita quantitat de la mostra es dissol en cloroform deuterat (CDCl_3). L'assaig consisteix en un experiment unidimensional de protó (^1H), adquirit a 298 K en un equip Varian VNMRS-400F, mitjançant una sonda ASW de quàdruple ressonància (apta per a experiments de protó, carboni, nitrogen i fósfor).

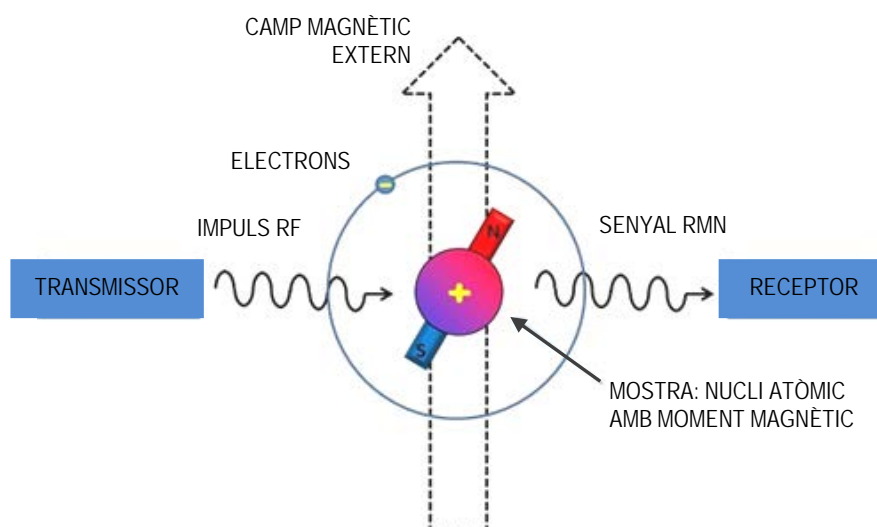


Figura 31. Fonament de la tècnica de ressonància magnètica nuclear. RF significa radiofreqüència (University of Turku, Finlàndia).

3.12.6 *ESTABILITAT DE LES cSLN A DIFERENTS TEMPERATURES DE CONSERVACIÓ*

Les cSLN obtingudes a partir de les formulacions optimitzades se sotmeten a diferents condicions de temperatura controlades durant un període de 7 dies per avaluar la influència d'aquest paràmetre sobre la mida de partícula i el potencial Z. L'exposició a diferents valors de temperatura té lloc en estufes i/o nevera calibrades amb termòmetres de referència, en què la temperatura fixada no es desvia més de ± 1 °C respecte el valor consigna.

Les temperatures estudiades són les següents:

- 4 °C → Temperatura de refrigeració.
- 25 °C → Temperatura ambient
- 37 °C → Temperatura fisiològica

Les cSLN produïdes es distribueixen en 21 vials que es reparteixen en grups de 7 en nevera i estufes a les condicions de temperatura esmentades. Diàriament durant una setmana, es pren un vial de cada condició, a partir dels quals es fa una mesura per triplicat de la mida de partícula i el potencial Z.

3.13 CULTIUS CEL·LULARS

3.13.1 *MANTENIMENT DE CÈL·LULES HEK293T*

A les 48h posteriors a la sembra en placa les cèl·lules arriben a un 80-90% de confluència, i es procedeix segons segueix per la ressembrada:

Fase de rentat de les cèl·lules

- Aspiració del medi.
- Addició de 2 ml d'una barreja de PBS i T/E 1 al 20% (en aquest cas, 4 ml de PBS i 1 ml de T/E)
- Aspiració ràpida dels 2 ml afegits.

Fase de ressebra

- Addició de 2 ml més de la barreja de PBS (*phosphate buffer saline* - tampó fosfat salí) i T/E (tripsina/estreptomicina) al 20% per aixecar les cèl·lules, ja que creixen adherides a placa. En aquest pas, cal comprovar si s'aixequen mitjançant l'ús del microscopi de camp clar. Les cèl·lules correctament aixecades estan en moviment i sense formar aglomerats. A més, si s'inclina la placa i s'observa a simple vista a contrallum, el fons ha d'aparèixer transparent, sense cap tipus de biofilm.
- Addició de 4ml de medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) complet. En total a la nova placa es tindrà per tant una dilució 1:6 respecte de la de partida (correspon a 4 ml DMEM i 2 ml de la barreja de PBS més T/E).
- Resuspensió de la cèl·lules mitjançant pipeteig i rotació de la placa.
- Aspiració de 1 ml de la resuspensió i sembra en una nova placa, en la qual s'han afegit 9 ml de DMEM. El volum total de la placa són 10 ml de medi que conté les cèl·lules.
- Incubació en cambra a 37°C, en una atmosfera de CO₂ del 5% i humitat relativa del 95%

3.13.2 MANTENIMENT DE CÈL·LULES HELA

A les 48h posteriors a la sembra en placa s'assoleix un 80-90% de confluència, i es procedeix segons segueix per a la ressebra:

Fase de rentat de les cèl·lules

- Aspiració del medi.
- Addició de 2 ml de PBS 1X.
- Aspiració del PBS afegit.

Fase de ressebra

- Addició d'1 ml de T/E per tripsinitzar i aixecar les cèl·lules. Atès que aquest tipus cel·lular creix fortament adherit a placa, cal mantenir a 37 °C uns minuts fins

observar amb el microscopi de camp clar que les cèl·lules efectivament s'han aixecat.

- Addició de 4 ml de medi DMEM complet. La nova placa serà una dilució 1:5 respecte de la de partida.
- Resuspensió de la cèl·lules mitjançant pipeteig i rotació de la placa.
- Aspiració de 1 ml de la resuspensió i portar-lo a una nova placa que conté 9 ml de medi DMEM enriquit.
 - Incubació en cambra a 37°C, en una atmosfera de CO₂ del 5% i humitat relativa del 95%.

3.13.3 *ESTUDI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR EN PRESENCIA DE cSLN*

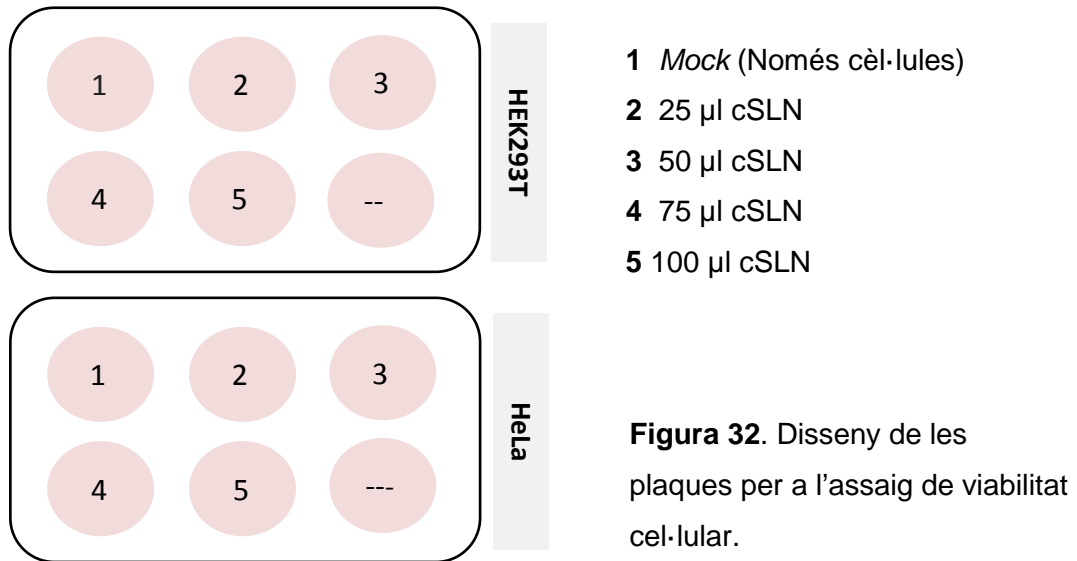
Els estudis de viabilitat cel·lular es realitzen sobre les línies cel·lulars HEK293T i HeLa.

Per al creixement de línies cel·lulars es disposa de càpsules Petri amb els dos tipus cel·lulars, HEK293T i HeLa. Aquestes cèl·lules es passen a una nova placa cada dos dies, temps que triguen a arribar a un 80-90% de confluència. El procediment es realitza en una cabina de flux laminar en condicions d'esterilitat.

El creixement té lloc en medi DMEM enriquit amb FBS (sèrum fetal boví). Existeixen diversos tipus de medis DMEM, en funció de les substàncies amb les quals està enriquit.

El medi DMEM *low glucose* és el més senzill, amb un mínim de components. Aquest, concretament, és el mitjà que es pren de partida per a l'enriquiment i per tant per obtenir el mitjà DMEM enriquit utilitzat pel creixement d'aquestes línies cel·lulars.

Diferents volums de cSLN resuspeses (25, 50, 75 i 100 µl) s'incuben en plaques M6 (figura 32) sembrades prèviament amb cèl·lules presents en 2 ml de medi de cultiu DMEM durant 48 h (confluència 80-90%).



La viabilitat cel·lular s'avalua comptabilitzant les cèl·lules vives per quadrants en una cambra de Neubauer (figura 33), en un microscopi de camp clar d'objectiu invertit.

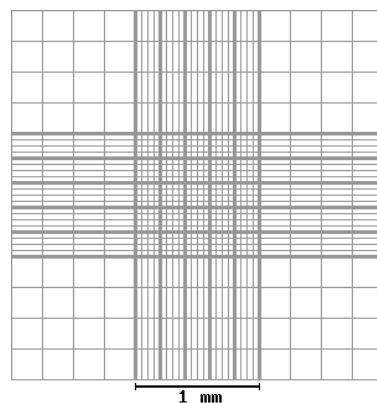


Figura 33. Estructura d'una cambra de Neubauer (Euskal Herriko Unibertsitatea, Espanya).

El nombre de cèl·lules viables es coneix a partir de la tinció amb el reactiu de blau de tripà, capaç de discriminar entre cèl·lules vives i mortes. En cèl·lules mortes el colorant travessa la membrana i tenyeix tot el contingut cel·lular de color blau, per la qual cosa es poden diferenciar de les cèl·lules vives.

Les imatges dels diferents quadrants a partir de les que es fa el comptatge s'adquireixen amb una càmera fotogràfica acoblada al microscopi.

- A partir de la placa M6, resuspendre cada plat amb pipeta per aixecar les cèl·lules.

MATERIAL I MÈTODES

- Agafar una alíquota de 10 µl i passar-la a un tub *ependorf*, on s'hi afegeixen 10 µl de la solució de tinció (dilució 1:2). Es barreja amb la pipeta.
- Es munta la cambra de Neubauer posant una goteta d'aigua als quatre extrems on descansarà el cobreobjectes, el qual es deixa caure amb cura i queda enganxat.
- S'agafen 10 µl de la barreja de cèl·lules i colorant i s'introdueixen per capil·laritat amb una pipeta en les dues cambres de Neubauer de les quals consta el portaobjectes per fer el comptatge.

3.14 TÈCNIQUES BIOMOLECULARS

3.14.1 *OBTENCIÓ DELS PLASMIDIS*

Els plasmidis purificats s'obtenen per transformació bacteriana en *Escherichia coli*, i posteriorment són purificats per mitjà d'un kit QIAGEN® *Plasmid purification* (Midi). Per saber la concentració del plasmidi, es pren 1 µl del DNA obtingut a partir de l'extracte per a la seva lectura espectrofotomètrica a 260 nm (màxim d'absorció del DNA) i a 280 nm (màxim d'absorció de l'enllaç peptídic de les proteïnes). La relació entre la lectura a 260 nm i a 280 nm indica el grau de puresa de la preparació. Es considera acceptable que la relació 260/280 sigui aproximadament 1,8. També es mesura la relació 260/230 (els fenols i altres compostos orgànics presenten absorència), que ha d'estar al voltant de 2.

3.14.2 *CAPACITAT D'UNIÓ A pDNA MITJANÇANT ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL*

La capacitat d'unió de pDNA i/o siRNA de les cSLN es determina per un assaig de retardament en gel (electroforesi en gel d'agarosa).

Els experiments de mobilitat electroforètica s'utilitzen per separar, mitjançant un corrent elèctric, molècules en funció de la mida i càrrega elèctrica a través d'una matriu, que en el cas de l'assaig de retardament és d'agarosa. La capacitat major

o menor de migració d'un compost o molècula des del pol negatiu (ànode) al positiu (càtode), vindrà donada per la càrrega que porti associada, així com del seu pes molecular. D'aquesta forma, les molècules migren cap al càtode quant més càrrega negativa tenen. En relació a la mida de la molècula, quant més petita més lluny i ràpid migrarà.

L'assaig d'electroforesi té lloc en una cubeta especial que conté el gel que està cobert amb tampó d'electroforesi. Les mostres es carreguen en el gel (figura 34), i es connecta la cubeta a la font d'alimentació per generar el corrent elèctric.

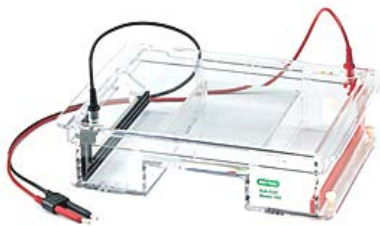


Figura 34. Exemple de cubeta d'electroforesi (Bio-Rad).

En l'assaig de retardament en gel, s'avalua si les cSLN, amb càrrega positiva, mostren capacitat d'unió a àcids nucleics (carregats negativament) i, per tant, retardar o retenir totalment la seva mobilitat electroforètica. Si les cSLN no són eficients pel que fa a la capacitat de retenció d'aquests àcids nucleics, aquests queden lliures, i enfront el corrent elèctric migren per la matriu d'agarosa cap al càtode, i s'observen en forma de bandes. Si per contra, les cSLN són capaces de retenir l'àcid nucleic per mitjà d'interacció electrostàtica, el DNA o RNA lliure és menor o inclús no se'n detecta (això serà funció del grau de retenció de les cSLN) i per tant en aquest darrer supòsit no hi ha migració cap a l'ànode i, consegüentment, no s'observen bandes en el gel (figura 35).

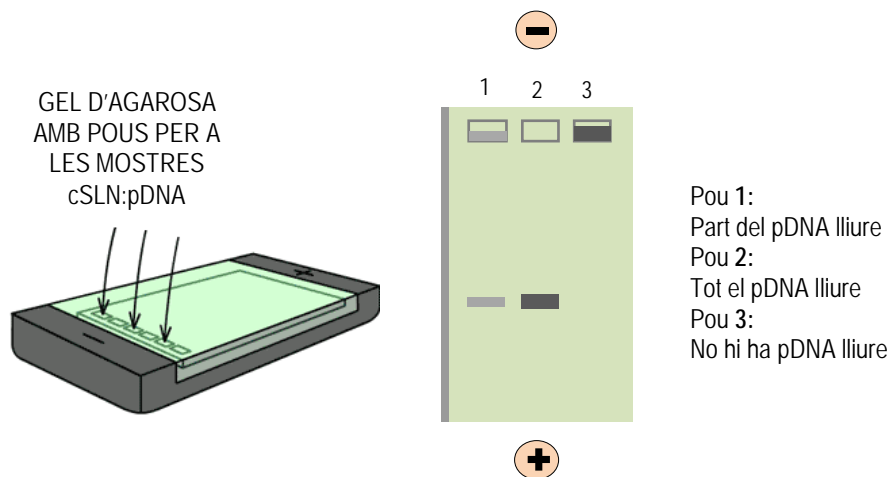


Figura 35. Exemple de gel d'agarosa carregat amb mostra de cSLN i pDNA. Segons l'eficiència d'unió de les cSLN al pDNA, aquest pot migrar pel gel totalment, parcialment, o no migra i es queda retingut al pou per les cSLN (Imatge de la cubeta: Stanford University, USA).

3.14.3 ESTABLIMENT DE L'EFICIÈNCIA ÒPTIMA D'UNIÓ cSLN:pDNA

Per portar a terme l'assaig de retardament en gel, es procedeix segons s'indica: Una suspensió de cSLN es barreja directament amb el plasmidi pEFBOS-ECFP-T7-TCERG1 [591-1098]. S'avaluen les següents proporcions de cSLN:pDNA: 80:1, 100:1, 150:1 i 200:1 w/w. La incubació es realitza durant 45 min a temperatura ambient (25 °C). A cada carril del gel d'agarosa, es carrega un volum de 20 µl de cada mescla, juntament amb 5 µl de tampó de càrrega. Els gels es visualitzen i quantifiquen en una estació GelDoc (BioRad) utilitzant l'aplicació Quantity One (BioRad).

Les condicions electroforètiques es fixen a un voltatge de 75 V durant un temps de 45 minuts.

Un cop establerta la ràtio òptima d'unió cSLN:pDNA, es porten a terme assajos de retardament en gel confirmatius amb altres dos plasmidis: pEFBOS-GFP-T7-FF4FF5ΔSRPK1 i pcDNA3-LIN28B.

3.14.4 *ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL PER AVALUAR LA POSSIBLE INFLUÈNCIA DE LA MIDA DEL PLASMIDI EN L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE cSLN A DNA*

Per avaluar la possible influència de la mida del plasmidi en la unió a pDNA es realitza una electroforesi segons les condicions establertes en l'apartat anterior.

S'utilitzen dos tipus de plasmidi: pEFBOS-GFP-T7-TCERG1 [591-1098] i pEFBOS-T7-TCERG1 [591-1098]. El primer porta inserit, a més de l'extrem C-terminal de TCERG1, la seqüència codificant per a la proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*), amb la qual cosa la mida total és superior al segon tipus de plasmidi. Al carril blanc s'hi carreguen 25 µl de la suspensió de cSLN. Els carrils restants es carreguen amb 25 µl de cSLN prèviament barrejats amb 1 µl de pDNA del tipus de plàsmid corresponent (concentració de pDNA: 1µg/µl).

El blanc de pDNA es carrega amb 0,3 µg del pDNA corresponent, juntament amb 4,7 µl d'aigua ultrapura i 5 µl de tampó de càrrega. Els dos carrils flanquejants del gel es carreguen amb 5 µl de marcador de pes molecular d'1 kb.

3.14.5 *INFLUÈNCIA DE LA FORÇA IÒNICA DEL MEDI DE CULTIU CEL·LULAR EN EL MANTENIMENT DEL POTENCIAL Z DE LES cSLN I L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ A PDNA/SIRNA*

L'assoliment i manteniment d'una càrrega superficial positiva són aspectes clau per permetre l'ús de cSLN com a vectors en la transferència d'àcids nucleics.

Els estudis d'aquest paràmetre en les formulacions sempre es realitzen en aigua, però cal tenir present que les cSLN un cop unides a àcids nucleics passen a trobar-se immerses en el medi de cultiu en què estiguin creixent les cèl·lules que posteriorment seran transfectades. Resulta d'interès conèixer la variació en el valor del potencial Z de les cSLN enfront diferents composicions de medis de cultiu, que poden arribar a ser molt complexes. Aquestes dades aporten, encara que indirectament, informació relativa a la força iònica del medi, especialment al pes que representen les càrregues negatives. Una major presència d'anions podria implicar, en el cas de cSLN ja unides a àcids nucleics, un desplaçament d'aquests en funció dels equilibris que eventualment es poguessin establir. Les conseqüències serien nefastes, ja que en aquest cas les cSLN no podrien realitzar la funció per la qual han estat ideades.

És per això que s'ha analitzat la variació en el valor de potencial Z de cSLN redispersades en diferents medis respecte a aigua, de forma que sigui indicatiu de la força iònica del medi i de la possibilitat major o menor que un cop unides les cSLN a àcids nucleics aquests vegin desplaçada la seva unió per part d'una quantitat suficient d'anions més petits.

La composició dels diferents medis analitzats és la següent:

- DMEM baix en glucosa + Aa NE + Glu
- DMEM baix en glucosa + FBS + P/S + Aa NE + Glu
- DMEM alt en glucosa + FBS + P/S + Higromicina
- DMEM alt en glucosa

3.15 EXPERIMENTS DE TRANSFECCIÓ CEL·LULAR AMB LIPOPLEXOS CSLN:PDNA I CSLN:SIRNA: TÈCNiques I ANÀLISI

3.15.1 TRANSFECCIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS HEK293T I HELA

Per als estudis de transfecció de pDNA per mitjà de cSLN (figura 36) s'han fet servir dos plasmidis d'expressió específics per a cèl·lules eucariotes de mamífer. Els experiments de transfecció es realitzen en plaques M6 o M12, segons el nombre de pous. En cadascun és possible establir condicions específiques per a la transfecció.

Com a controls de transfecció s'utilitzen dos agents de transfecció coneguts, concretament lipofectamina i fosfat càlcic. Tots dos compostos contenen a la seva fórmula àtoms ionitzables que els confereixen càrrega positiva, necessària per a la unió de l'àcid nucleic.

La transfecció amb lipofectamina es realitza seguint les indicacions del fabricant. Per a la transfecció amb fosfat càlcic es barreja un volum adequat (segons la mida de la placa de cultiu) de solució A (250 mM de CaCl_2) amb el DNA o siRNA, i a continuació s'afegeix un volum adequat de solució B (50 mM HEPES, 1,5 mM NaPO_4 , 140 mM NaCl ; ajustar pH a 7,5). Després de 2 minuts d'incubació, la barreja s'afegeix al pouet. Després d'aproximadament 48 h de la transfecció, les cèl·lules es recullen per als posteriors assajos.

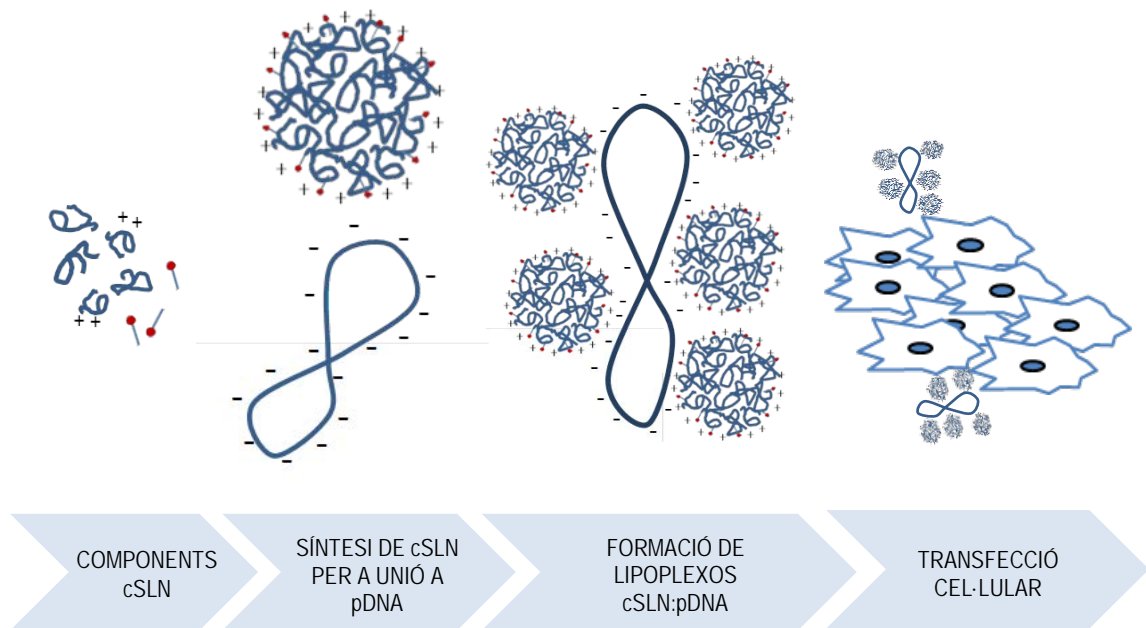


Figura 36. Representació esquemàtica dels passos de l'assaig de transfecció amb lipoplexos cSLN:pDNA (No està a escala).

3.15.2 PLASMIDI PEFBOS-T7-TCERG1 [1-1098]

Les línies cel·lulars utilitzades per a l'estudi de la capacitat de transfecció de lipoplexos cSLN:pDNA són HEK293T i HeLa. La transfecció té com a finalitat avaluar si les cSLN unides a pDNA són capaces de transfectar aquests tipus cel·lulars i sobreexpressar TCERG1.

Les cèl·lules eventualment transfectades es recuperen dels pous un cop transcorreguts els temps fixats per a la transfecció. A partir d'aquest punt es pot procedir a la seva lisi per obtenir un extracte citoplasmàtic, amb el que es realitza l'anàlisi *Western-Blot* per comprovar si existeix o no sobreexpressió del plasmidi codificant per a l'extrem carboxi-terminal del factor de transcripció TCERG1.

3.15.3 *PLASMIDI NF-KB-C-FOS-LUC*

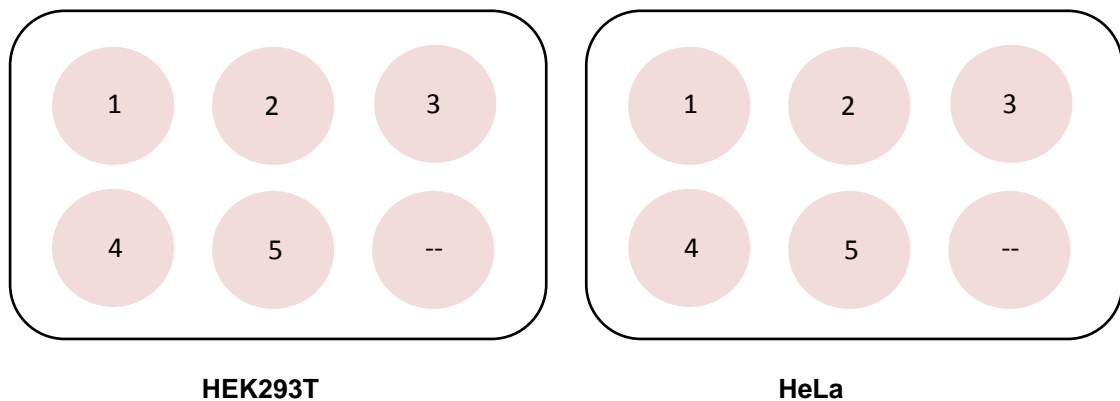
La línia cel·lular utilitzada per a l'estudi de la capacitat de transfecció de lipoplexos cSLN:pDNA és HEK293T. Com amb el plasmidi anterior, La transfecció té com a finalitat avaluar si les cSLN unides a pDNA són capaces de transfectar aquests tipus cel·lulars i sobreexpressar, en el cas d'aquest plasmidi, el gen codificant per a l'enzim de la luciferasa (LUC).

Amb l'extracte citoplasmàtic obtingut després de la transfecció es porta a terme un assaig de bioluminescència, amb el qual es determina si hi ha o no expressió del gen.

3.15.4 *PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ PEL POSTERIOR ANÀLISI DE PROTEÏNES PER IMMUNOBLOTTING (WESTERN-BLOT)*

El disseny de les plaques M6 (HEK293T i HeLa) és el que es mostra a la figura 37.

Quantitat sembrada a cada pou: 52 µl (50 µl de cSLN junt 2 µl de pDNA). Cada pou porta a més 2 ml de DMEM *low glucose*.



- 1 *Mock* (Només cèl·lules)
- 2 Només cSLN
- 3 Lipoplexos cSLN:pDNA 2h
- 4 Lipoplexos cSLN:pDNA 4h
- 5 Lipoplexos cSLN:pDNA 6h

Figura 37. Disseny de les plaques previ a la transfecció.

Paral·lelament, es porta a terme un assaig d'eficiència de càrrega en gel d'agarosa amb tres rèpliques de les barreges cSLN:pDNA utilitzades en la transfecció, amb la mateixa relació 25:1 v/v (concretament 25 µl cSLN i 1 µl pDNA, equivalent a 200:1 p/p cSLN:pDNA). Aquest assaig es fa al mateix temps que la transfecció per assegurar que les cSLN i pDNA utilitzat en aquest experiment són efectivament capaços d'unir-se electrostàticament amb una eficiència del 100%.

3.15.5 PREPARACIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS

Després de la transfecció, les cèl·lules de les línies HEK293T i HeLa es recuperen de la placa de cultiu i es centrifuguen 5 min a 1200 rpm a 4 °.

Al precipitat obtingut se li afegeix tampó de lisi T7 fred (20 mM Hepes pH 7,9, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet fosfat-40 (NP-40), 1 mM ditiotretol (DTT) i 1 mM fenilmetil-sulfonil -fluorur (PMSF) durant 30 minuts a 4 °.

Després d'aquest temps, el volum de lisat es centrifuga a 13200 rpm en microcentrífuga durant 5 minuts, i el sobrenedant és utilitzat com a extracte total.

3.15.6 MÈTODE PER A LA MANIPULACIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES

A partir dels extractes cel·lulars obtinguts de les línies HEK293T i HeLa transfectades amb cSLN:pDNA s'analitza si el gen codificant per a l'extrem carboxi-terminal de TCERG1 és capaç de sobre-expressar-se en aquestes cèl·lules.

Per a l'anàlisi de l'expressió proteica de TCERG1 s'utilitza l'*immunoblotting* o *Western-blotting*. L'*immunoblot* o *Western-blot* és una tècnica realitzada mitjançant SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic, combinada amb un immunoassaig posterior.

El principi electroforètic és anàleg a l'utilitzat en gels d'agarosa, En aquest cas però, es tracta de separar proteïnes en funció del seu pes molecular, i el procés presenta algunes particularitats, com ara l'existència de dos gels de poliacrilamida

amb diferents funcions: un gel concentrador (*stacking gel*) on es carreguen les mostres i s'alineen per començar a migrar totes alhora a través del gel separador (*separating gel*) en el qual, per tant, es realitza l'electroforesi (figures 38 i 39).

Un cop acabada aquesta, el gel és transferit a una membrana de nitrocel·lulosa mitjançant *electroblotting*, és a dir, un corrent elèctric travessa una *cassette* en la que es troben convenientment muntats el gel i la membrana. Aquest corrent provoca la transferència de les proteïnes del gel a la membrana.

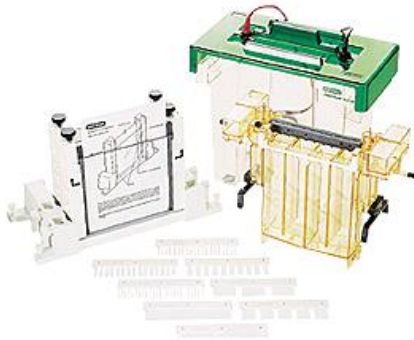


Figura 38. Exemple de cubeta vertical i accessoris d'electroforesi en gel de poliacrilamida (Bio-Rad).

La presència o absència de la proteïna expressada es determina per l'especificitat de determinats anticossos per unir-se amb la proteïna en estudi que es troba transferida a la membrana. Primerament, s'incuba la membrana amb un anticòs primari IgG contra la proteïna d'interès. Després, i per tal de poder visualitzar la unió de l'antigen (en aquest cas la proteïna) amb l'anticòs, s'incuba amb un anticòs secundari dirigit al fragment Fc de la IgG de l'espècie animal que ha originat l'anticòs primari (Wilson i Walker, 2000) i marcat de forma que es pugui detectar per autoradiografia.

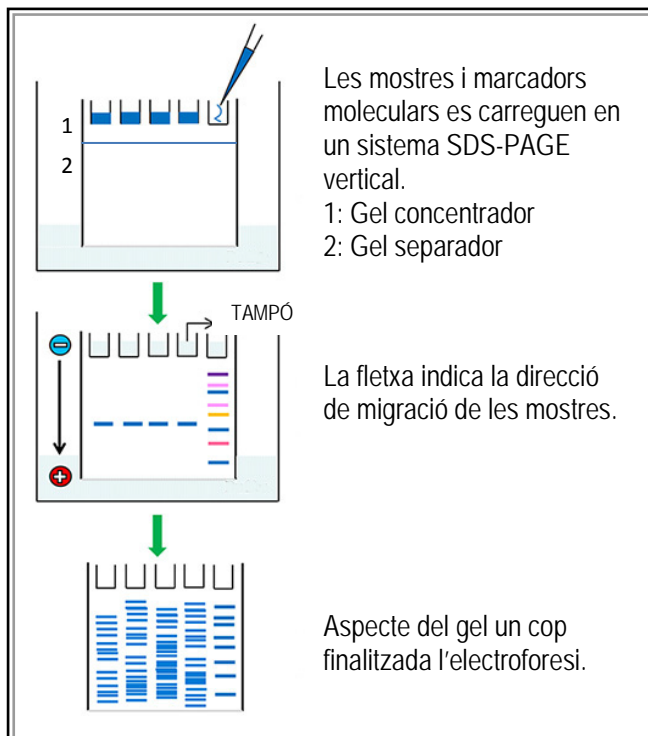


Figura 39. Representació gràfica d'una electroforesi en gel de poliàcrilamida (Sigma-Aldrich).

3.15.7 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE *TCERG1* MITJANÇANT ELECTROFORESI EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La concentració de *TCERG1* es determina mitjançant anàlisi Western-Blot, en SDS-PAGE al 10%.

Les mostres a analitzar es dilueixen en tampó SDS 5X i s'escalfen durant 5 minuts a 95 °C. En el gel es carreguen 15 ml de cada mostra més 3 ml de tampó de càrrega 5X. En total s'obtenen 12 tubs *ependorfs* amb mostres d'extractes cel·lulars. La composició dels gels s'indica a la taula 3.

Components	Gel concentrador (<i>stacking gel</i>)	Gel separador (<i>separating gel</i>)
DdH ₂ O	1,66 ml	1,35 ml
Acrilamida al 30%	0,556 ml	1,665 ml
Bisacrilamida a l 1%	0,433 ml	0,65 ml
Tampó TRIS-HCl 1.5 M a pH 8.8	0,416 ml	1,25 ml
SDS al 10%	33 µl	50 µl
Persulfat amònic al 10%	30 µl	30-50 µl
TEMED	3 µl	3,5 µl

Taula 3. Composició quantitativa dels gels concentrador i separador.

A aquests components s'afegeixen el tampó de càrrega (SDS 5X), marcadors de pes molecular i tampó Laemli per omplir la cubeta.

Després de la seva càrrega en el gel, l'electroforesi es porta a terme en tampó Laemli (25 mM TRIS, 192 mM de glicina, i 0,1% SDS), a un voltatge continu de 160 V. Des dels gels, les proteïnes es transfereixen a les membranes de nitrocel·lulosa mitjançant un sistema humit de transferència proteica en una solució que conté 25 mM TRIS, 192 mM de Glicina i 20% (v/v) de metanol, durant 1 hora a amperatge constant en una cambra refrigerada a 4 °C. Després de tenyir la membrana amb solució Ponceau, per comprovar que les proteïnes s'han transferit de forma homogènia, i rentar-la amb aigua destil·lada, es realitza el bloqueig durant dues hores en una solució que conté: llet desnatada al 5% p/v, PBS 1X i Tween 20 al 0,1% v/v.

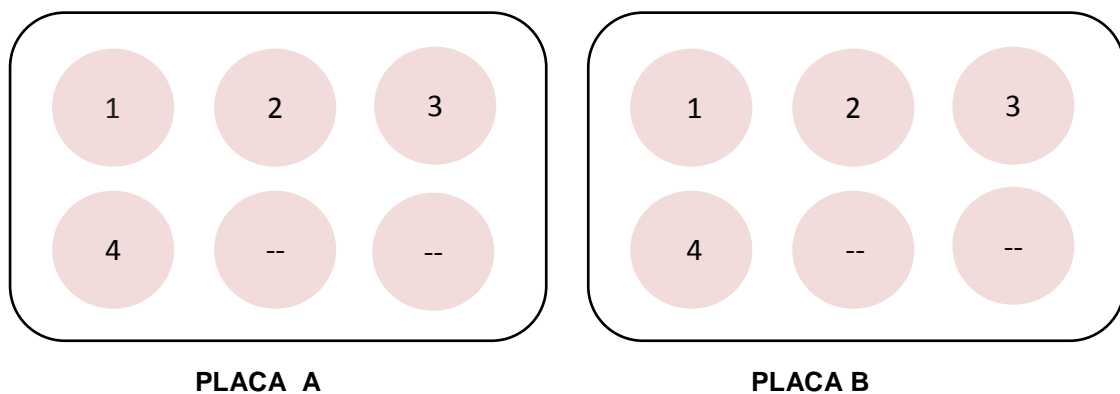
Un cop bloquejada, la membrana s'incuba amb l'anticòs primari durant 2 hores a temperatura ambient. A continuació, la membrana es renta amb la mateixa solució de bloqueig, tres vegades durant 10 minuts. Seguidament, s'incuba amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa durant 1 hora, i es torna a rentar amb la solució de bloqueig de la mateixa forma que després de la incubació amb l'anticòs primari. Els anticossos units es detecten per quimioluminescència (Perkin Elmer

Life Sciences, Estats Units), en què la llum emesa és captada per una pel·lícula fotogràfica.

Per al revelat de la membrana s'utilitza solució de revelat prèviament preparada, a partir dels reactius de revelat. Es col·loca la membrana en una *cassette* de revelat. En una habitació fosca, la membrana que es troba dins de la *cassette* de revelat s'exposa sota la pel·lícula fotogràfica durant un minut i seguidament es passa la pel·lícula pel revelador. Aquest pas es pot repetir en funció de si el temps d'exposició cal que sigui menor o major, la qual cosa depèn de de la intensitat d'expressió de la proteïna.

3.15.8 *PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ PEL POSTERIOR ANÀLISI DE PROTEÏNES PER BIOLUMINESCÈNCIA*

Diferents quantitats de plasmidi (100, 500, i 1000 ng), es barregen cadascuna amb 15 µl de cSLN, i es deixen incubar durant 45 minuts a temperatura ambient en una placa M6 (figura 40, placa A). En una altra placa, i com a control positiu, es transfecten les mateixes quantitats però substituint les cSLN per fosfat càlcic com a agent de transfecció (figura 40, placa B).



1. *Mock* (Cèl·lules amb cSLN)
2. Lipoplexos cSLN:pDNA (15 µl/100 ng)
3. Lipoplexos cSLN:pDNA (15 µl/500 ng)
4. Lipoplexos cSLN:pDNA (15 µl/1000 ng)

1. *Mock* (Cèl·lules amb fosfat càlcic)
2. Lipoplexos FC:pDNA (15 µl/100 ng)
3. Lipoplexos FC:pDNA (15 µl/500 ng)
4. Lipoplexos FC:pDNA (15 µl/1000 ng)

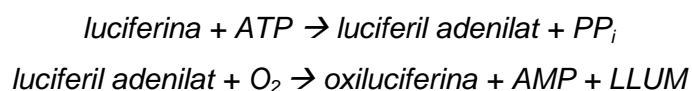
Figura 40. Disseny de les plaques per a la transfecció del plasmidi NF-κB-c-fos-LUC.

En aquestes plaques M6 s'hi han sembrat cèl·lules HEK293T el dia anterior per a que en el moment de la transfecció es trobin a un 80% de confluència. En ambdós casos es disposa d'un pou com a control negatiu, és a dir, que només conté cèl·lules amb el medi de transfecció però en absència de plasmidi. Just abans de transfectar les dues plaques M6 es retira el medi de creixement i es reparteixen a cada pou 500 µl de medi sense sèrum i sense antibiòtic, per evitar al màxim la competència de càrregues per a la unió a cSLN. Es deixen transcórrer 2 hores com a temps de transfecció, i un cop passat aquest temps, es torna a canviar el medi per un que contingui sèrum i antibiòtic. Al dia següent es realitza la lisi i posterior recuperació de l'extracte citoplasmàtic, a partir del qual es mesurarà la luciferasa obtinguda.

Tot l'assaig es fa per triplicat.

3.15.9 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE LUC MITJANÇANT ASSAIG DE BIOLUMINESCÈNCIA

La luciferasa és un enzim present en alguns éssers vius i que, en presència del substrat luciferina, és capaç de produir llum segons la reacció que es mostra a continuació:



Aquesta propietat és aprofitada per a la determinació de luciferasa derivada de l'expressió del gen Luc inserit en el vector plasmídic que en aquest cas s'ha utilitzat en l'estudi de transfecció. Si la transfecció ha estat eficient, el gen Luc podrà expressar-se donant lloc a l'enzim luciferasa, que podrà ser detectat amb aquest tipus d'assaig.

La concentració de luciferasa es determina per assaig de bioluminescència, amb ajuda del kit comercial *Dual Luciferase Assay* seguint les instruccions del fabricant, i un luminòmetre.

Per fer les mesures de luminescència, es prenen 20 µl de l'extracte cel·lular i es barregen amb 90 µl del reactiu LARII del kit, que funciona com a anàleg de la luciferina. Posteriorment es llegeixen al luminòmetre, que en funció de la quantitat de luciferina donarà un resultat de més o menys intensitat

3.15.10 TRANSFECCIÓ DE HEK293T I HELA AMB LIPOPLEXOS cSLN:siRNA I VISUALITZACIÓ PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA CONFOCAL

L'oligonucleòtid a transfectar per mitjà de cSLN està constituït per siRNA contra TCERG1. Consta de 21 parells de bases (bp) que es corresponen a la posició 2089-2107 bp en la seqüència nucleotídica de TCERG1.

Les cadenes *sense* (sentit) i *antisense* (antisentit) es subministren per separat. Aquest siRNA prové de DNA modificat, en què '5' correspon a la base pirimidínica uracil, que es troba en les molècules de RNA però no en les de DNA (en aquesta molècula el lloc de l'uracil l'ocupa la timina). A ambdós extrems 3' s'hi han introduït dues bases de timina que contribueixen a l'estabilització de la molècula. L'extrem 5' de la cadena *sense* s'inicia amb el marcador fluorescent Cy3.

PROTOCOL D'ANELLAMENT DEL siRNA

1. Els oligonucleòtids es subministren lliures de RNasa. No obstant això, donada l'extrema susceptibilitat del RNA enfront la degradació durant la manipulació a causa de la introducció de RNasa exògena, es realitzen tots els passos per a l'anellament sota condicions estèrils, en un ambient lliure de RNasa. Els oligonucleòtids de RNA, com els de DNA, no s'han de manipular sense guants. Així mateix, els reactius utilitzats (aigua i tampó d'anellament) han d'estar lliures de RNasa. S'utilitzen puntes de pipeta amb filtre.

2. Anellament del siRNA

-Es dissolen els oligonucleòtids a una concentració de 100 mM en aigua lliure de RNasa. Aquesta solució es pot mantenir congelada a -20 ° C.

-Es dilueix cada oligonucleòtid de RNA utilitzant el tampó d'anellament, fins a una concentració final de 50 mM.

-Es barregen 30 ml de cada solució d'oligonucleòtids de siRNA (cadena *sense* i *antisense*) i 15 ml de tampó d'anellament, obtenint-se així un volum total final de 75 ml. La concentració final del dúplex de siRNA és 20 mM.

-Es procedeix a la incubació de la solució durant un minut a 90 °C, després es deixa refredar a temperatura ambient (temps aproximat de 45 minuts) per a que tingui lloc l'anellament (figura 41). Passat aquest temps, es pot emmagatzemar a 4 °C fins al seu ús.

- El siRNA anellat es pot congelar de manera segura a -20°C. En qualsevol cas, no s'ha d'utilitzar després d'un màxim de cinc cicles de congelació-descongelació.

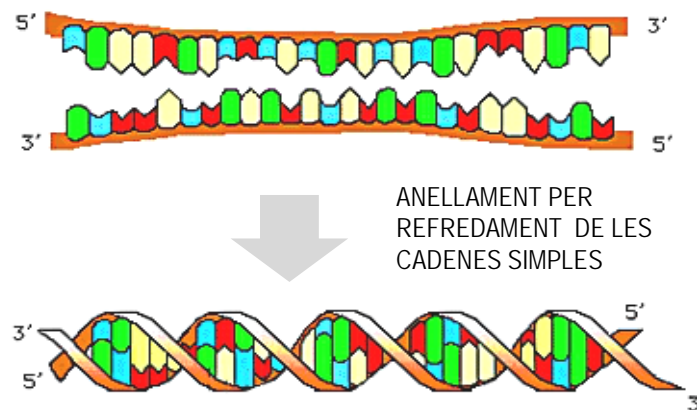


Figura 41. Procés d'anellament: dues cadenes simples es transformen en un dúplex (Malutan i Vilda, 2012).

3.15.11 CAPACITAT D'UNIÓ DE CSLN A SIRNA MITJANÇANT ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL. ESTABLIMENT DE L'EFICIÈNCIA ÒPTIMA D'UNIÓ CSLN:SIRNA

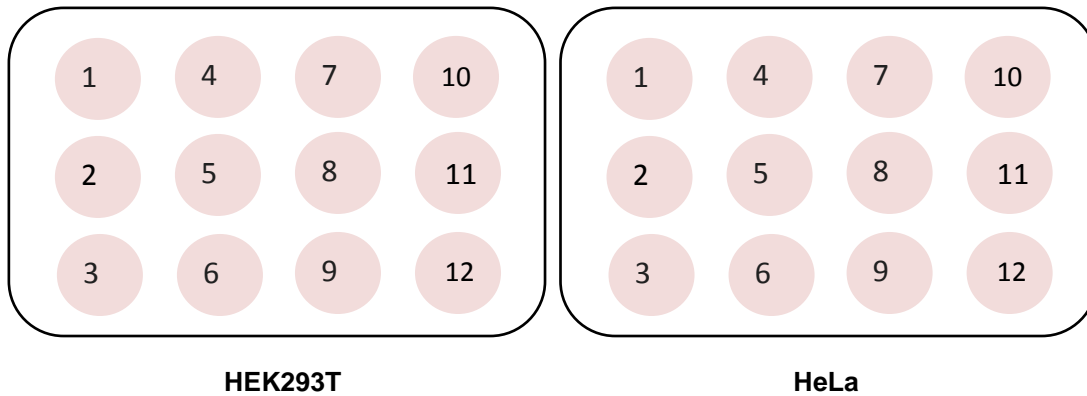
La capacitat d'unió de siRNA de les cSLN es determina per un assaig de retardament en gel (electroforesi en gel d'agarosa) de forma anàloga a l'avaluació de la capacitat d'unió del pDNA. Diferents volums d'una suspensió de cSLN es barregen amb siRNA (a partir de l'*stock* original a 20 mM), de forma que als pous que contenen la barreja, i un cop afegit el tampó de càrrega s'hi troben les següents quantitats:

- 12,5 µl de cSLN + 6 µl de siRNA
- 25 µl de cSLN + 6 µl de siRNA

La incubació es realitza durant 45 min a temperatura ambient (25 °C). A cada carril del gel d'agarosa, es carrega un volum variable de cada barreja o blanc, segons correspongui, juntament amb 5 µl de tampó de càrrega. Per a la formació del gel s'utilitza agarosa D-1 Media EEO al 0,8% en tampó TAE 1x (Tris acetat 40 mM, EDTA 1 mM) amb 0,5 g/ml de bromur d'etidi (EtBr) com a mètode de tinció per a la visualització del DNA. El tampó de càrrega es compon de 0,25% (w/v) de blau de bromofenol, 0,25% (w/v) xilenocianol FF i 30% (v/v) de glicerol. El marcador de pes molecular utilitzat és TriDye™ DNA Ladder 1 kb. Els gels es visualitzen i quantifiquen en una estació GelDoc utilitzant l'aplicació QuantityOne. Les condicions electroforètiques es fixen a un voltatge de 75 V durant un temps de 45 minuts.

Protocol de transfecció en HEK293T i HeLa per als ràtios cSLN:siRNA establerts a partir de l'assaig de retardament en gel

A partir de cultius cel·lulars HEK293T i HeLa es sembren plaques M12 per a que en el moment de la transfecció es trobin al 50% de confluència, segons la figura 42.



1. *Mock* (només cèl·lules sense transfectar)
2. Cèl·lules + 6 μ l siRNA
3. Cèl·lules + 6 μ l siRNA + lipofectamina
4. Cèl·lules + 5 μ l cSLN + 6 μ l siRNA
5. Cèl·lules + 7,5 μ l cSLN + 6 μ l siRNA
6. Cèl·lules + 10 μ l cSLN + 6 μ l siRNA
- (7,8, 9 i 10,11, 12: rèpliques de les condicions 4,5,6)

Figura 42. Disseny de les plaques per a la transfecció de siRNA anti-TCERG1.

Just abans de la transfecció es retira el medi de cultiu on han estat creixent les cèl·lules i s'afegeixen 800 μ l de medi sense sèrum ni antibiòtic.

Es testen diferents volums de la suspensió de cSLN; 5, 7,5 i 10 μ l per pouet. Es descarten assajos amb volums majors de cSLN en experiments previs, en què s'ha vist afectada l'adhesió de les cèl·lules als pouets.

La unió de 6 μ l de siRNA 100 nM als diferents volums de cSLN té lloc 45 minuts abans d'iniciar la transfecció. Abans d'afegir la barreja cSLN:siRNA a les cèl·lules, se li afegeixen 200 ml de medi de cultiu sense sèrum ni antibiòtic, i després es reparteix el volum pel pouet.

En paral·lel es posa un control de transfecció amb lipofectamina, de la que se n'afegeixen 2 μ l als 6 μ l de siRNA anti-TCERG1, cèl·lules amb només siRNA i finalment un altre control amb només cèl·lules (*mock*).

La transfecció té lloc durant un temps de 2 hores. A continuació es fixen les cèl·lules i es tenyeixen els nuclis amb DAPI.

3.15.12 *MICROSCÒPIA CONFOCAL PER A LA VISUALITZACIÓ DE LA TRANSFECCIÓ DE LIPOLEXOS CSLN:SIRNA*

A diferència de la microscòpia òptica, la microscòpia confocal elimina la llum reflectida o fluorescent procedent dels plans fora de focus. Presenta major resolució, major contrast, possibilitat d'obtenció d'imatges tridimensionals i imatges lambda si l'equip disposa de detector espectral per a presa d'imatges a diferents longituds d'ona. Per fer-ho, una petita àrea de la mostra en estudi és il·luminada preferentment amb làser, la qual travessa un diafragma i és reflectida per un mirall dicroic, i a continuació, amb l'ajuda d'un objectiu, s'enfoca en un punt sobre la mostra.

El punt il·luminat emet llum reflectida o fluorescència. Aquesta senyal lluminosa retorna pel mateix camí fins a ser enfocada en un detector, davant del qual es troba un segon diafragma que elimina les senyals lluminoses que no provenen del pla focal (figura 43).

S'utilitza un sistema de rastreig punt a punt i processat d'imatges per poder visualitzar tota la mostra.

Per a que la mostra emeti fluorescència, cal prèviament tenyir-la amb un o més fluorocroms, si el que es vol visualitzar de forma selectiva diferents components cel·lulars en un microscopi confocal que disposi de diferents fotomultiplicadors que permetin captar les longituds d'ona emeses pels diferents fluorocroms (Chapman, 1990).

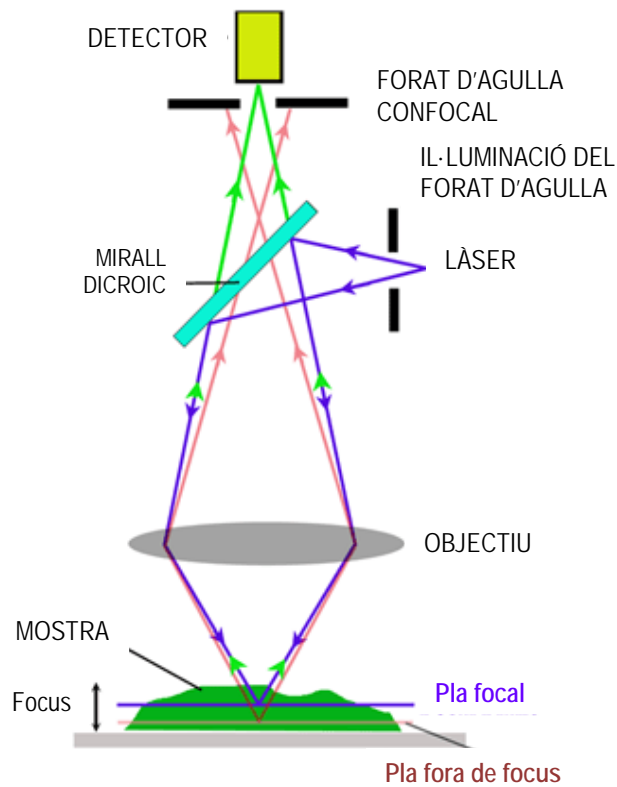


Figura 43. Bases estructurals del microscopi confocal (John Innes Centre, UK).

Per tal de poder visualitzar les cèl·lules i en concret els seus nuclis per microscòpia confocal, es fa una tinció amb DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Aquesta molècula s'uneix fortament a regions de DNA bicatenari (dsDNA, *double-stranded DNA*) riques en adenina i timina, i és capaç d'emetre fluorescència (figura 44). Presenta el màxim d'absorció a la regió ultraviolada de l'espectre electromagnètic ($\lambda_{\text{ex}} \sim 359 \text{ nm}$), i el seu màxim d'emissió a la regió visible blava ($\lambda_{\text{em}} \sim 461 \text{ nm}$).

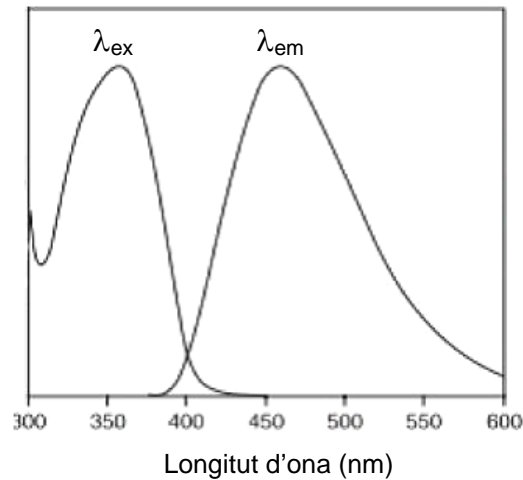


Figura 44. Espectres d'absorció i emissió del marcador DAPI unit a dsDNA.

Aquest marcador travessa la membrana cel·lular i és utilitzat per visualitzar cèl·lules vives.

En aquest cas concret, es tracta, per una banda, de visualitzar els nuclis i per altra, el siRNA marcat amb fluoròfor, posant de manifest si aquest últim es troba a l'interior cel·lular, i si s'ubica al citoplasma o al nucli. En aquest darrer supòsit, amb l'ajuda de diferents filtres es poden superposar els diferents plànols de fluorescència i deduir-ne la ubicació intracel·lular (Paddock *et al.*, 2001)

Es segueixen els passos següents, sempre tenint en compte que durant el protocol les cèl·lules no han de quedar seques en cap moment:

- Dilució de la solució mare DAPI en PBS en una relació 1:5000.
- Aspiració del medi cel·lular de les cèl·lules que han crescut sobre les lentilles.
- Rentat de les cèl·lules tres cops amb PBS.
- Fixació de les cèl·lules durant 10 minuts en una solució de formaldehid al 3,7%.
- Aspiració de la solució de fixació i rentats per triplicat de les cèl·lules, de 5 minuts cadascun, amb PBS.

MATERIAL I MÈTODES

- Permeabilització de les cèl·lules per immersió en una solució de Triton X-100 al 0,2%, durant 5 minuts.
- Aspiració de la solució de Triton. Rentat per triplicat de les cèl·lules, de 5 minuts cadascun, amb PBS.
- Incubació de les cèl·lules durant 1-5 minuts a temperatura ambient amb la solució de tinció DAPI preparada en el primer punt.
- Aspiració de la solució de tinció. Esbandit de les cèl·lules amb PBS, tres cops.

A partir d'aquí, es munten les lentilles on hi ha les cèl·lules adherides amb els nuclis tenyits sobre portaobjectes, agafant-les amb molta cura amb pinces per a que la lentilla no es trenqui.

Les cèl·lules es visualitzen en un microscopi confocal equipat amb una font de llum ultraviolada de conjunt de filtres.

Per una banda, és possible la visualització dels nuclis i, per tant, deduir a través de les imatges adquirides si la fluorescència a causa de la presència del siRNA marcat amb fluoròfor Cy3 ($\lambda_{ex} \sim 550 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} \sim 570 \text{ nm}$) s'emet des de la cèl·lula o no.

El fluoròfor CY3 emet a la regió visible vermella propera, mentre que els nuclis tenyits amb DAPI emeten a la regió visible blava. Si la senyal d'un i altre no co-localitzen, es pot deduir que els lipoplexos cSLN:siRNA es troben a la cèl·lula, però no dins dels nuclis.

RESULTATS i DISCUSSIÓ

1. OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE D'OBTENCIÓ DE NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP

El disseny factorial 2^4 aplicat (quatre factors a dos nivells) dóna el resultat per a 16 experiments. De les nanopartícules obtingudes es mesura la mida de partícula i el potencial Z. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 4.

Experiment	Velocitat d'agitació (rpm)	Temps de reacció per a la síntesi (min)	Temps transcorregut en l'addició de TPP (min)	Filtratge (43-48 μm)	Diàmetre mitjà superficial D[3,2] (nm)	Potencial Z (mV)
1	500	22	20	SÍ	248	40,7
2	700	22	10	SÍ	577	41,8
3	700	30	20	SÍ	251	41,4
4	500	30	20	SÍ	309	41,8
5	500	22	10	NO	18595	42,1
6	500	22	20	NO	30767	39,8
7	700	30	10	NO	361	39,7
8	500	30	10	NO	9909	41,1
9	700	30	20	NO	369	42,0
10	700	22	20	SÍ	118	41,1
11	500	30	10	SÍ	212	42,0
12	500	30	20	NO	6414	41,8
13	700	30	10	SÍ	164	41,5
14	700	22	10	NO	34402	40,1
15	500	22	10	SÍ	246	42,4
16	700	22	20	NO	1250	40,5

Taula 4. Per a cada experiment del disseny 2^4 , es mostren els resultats obtinguts per a la mida de partícula i potencial Z.

Respecte la mida de partícula, l'objectiu és l'obtenció de nanopartícules de la menor mida possible. Els resultats es sotmeten a un anàlisi de la variància (ANOVA) multifactorial. La taula ANOVA descomposa la variabilitat de la mida de partícula i el potencial Z en contribucions degudes a diversos factors. En funció dels resultats obtinguts en aquesta sèrie aproximativa d'experiments i a partir del resultat de l'ANOVA (taula 5), es descarta poder prescindir del filtrat de la suspensió obtinguda. Independentment de l'anàlisi estadístic, per a aquest factor concret es pot observar directament a partir de les dades que, si no es realitza aquest filtrat, s'obtenen agregats de nanopartícules que fan augmentar de forma considerable la mida mitjana de la mostra mesurada, ja que el que mesura l'equip són majoritàriament els agregats formats i no nanopartícules aïllades.

Anàlisi de la variància: Valor-P

FACTOR	Mida de partícula	Potencial Z
Velocitat d'agitació	0,4445	0,2983
Temps de síntesi	0,091	0,414
Temps addició TPP	0,5156	0,6371
Filtratge	0,0202	0,1176

Taula 5. Resultats derivats de l'anàlisi de la variància per a la variable mida de partícula.

Per a la mida de partícula, i donat que el valor-P per al factor filtratge és menor que 0,05 es conclou que aquest factor contribueix de forma estadísticament significativa a la mida de partícula. La resta de factors presenten un valor-p major a 0,05 i es conclou que no afecten de forma estadísticament significativa a la mida de partícula amb un nivell de confiança del 95% (taula 5).

Pel que fa a potencial Z, tots els valors-p calculats per als diversos factors són majors a 0,05. Es conclou que aquests factors no afecten de forma estadísticament significativa a la variabilitat observada per als valors de potencial Z obtinguts amb un nivell de confiança del 95% (taula 5).

A partir de les dades experimentals dels valors de potencial Z, es pot afirmar que la càrrega superficial adquirida és la corresponent a nanopartícules fortament catióniques (valors majors de 30 mV).

Per altra banda, el temps de reacció també és important rebaixar-lo al màxim per optimitzar el procés d'obtenció.

Com que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els valors de les mitjanes a 30 minuts i a 22 minuts es planteja una reducció del temps de reacció que, lògicament, ha de portar de forma intrínseca a una reducció del temps d'addició de la solució TPP i avaluar, aquest cop tenint en compte tots els factors, quins afecten de forma significativa el valor de mida de partícula i potencial Z obtinguts.

Aquesta segona sèrie d'experiments es realitza segons un disseny factorial 2^3 .

Els resultats del disseny experimental 2^3 en termes de mida de partícula i potencial Z obtinguts es mostren a la taula 6.

Experiment	Velocitat d'agitació (rpm)	Temps de reacció per a la síntesi (min)	Temps transcorregut en l'addició de TPP (min)	Diàmetre mitjà superficial D[3,2] (nm)	Potencial Z (mV)
1	700	15	5	127	40,3
2	500	15	10	296	39,8
3	700	10	10	278	39,7
4	500	10	5	156	40,3
5	700	15	10	131	40,3
6	500	15	5	227	39,9
7	700	10	5	208	39,8
8	500	10	10	113	39,3

Taula 6. Per a cada experiment del disseny 2^3 , es mostren els resultats obtinguts per a la mida de partícula i el potencial Z.

Pel que fa als resultat de mida de partícula, es porta a terme una anàlisi de la variància (ANOVA), amb la finalitat de determinar la contribució dels factors en estudi i si les diferències observades són estadísticament significatives. Atès que el P-valor per al factor velocitat d'agitació durant la síntesi és de 0,0094 es conclou, amb un nivell de confiança del 95%, que hi ha diferències estadísticament significatives en la mida de partícula obtinguda respecte a aquest factor.

Els altres dos factors en estudi (temps per a la reacció de síntesi i temps transcorregut en l'addició de la solució de TPP) no influeixen de manera estadísticament significativa, d'acord al resultat de l'anàlisi realitzada.

Per als valors de potencial Z, el test ANOVA realitzat no mostra diferències estadísticament significatives com a resultat dels factors estudiats (taula 7).

Anàlisi de la variància: Valor-P

FACTOR	Mida de partícula	Potencial Z
Velocitat d'agitació	0,0094	0,2557
Temps de síntesi	0,6358	0,3314
Temps addició TPP	0,1672	0,2557

Taula 7. Resultats derivats de l'anàlisi de la variància per a la variable potencial Z.

S'han realitzat fins ara experiments sota dues condicions diferents de velocitat d'agitació. Aquest factor ha resultat significatiu pel que fa a la seva contribució a la mida de partícula.

Per a aquesta raó, es planteja a continuació avaluar un interval més ampli de velocitats (500 rpm a 900 rpm) en què aquest factor pugui ser determinant per obtenir una menor mida de partícula. Per portar a terme aquestes proves, es fixen prèviament els dos factors restants (temps de reacció per a la síntesi i temps d'addició de la solució de TPP).

Pel que fa a la síntesi per gelificació ionotròpica a aquestes diferents velocitats d'agitació (interval entre 500 rpm i 900 rpm), la mida mitjana de partícula i el

potencial Z obtinguts per a cada condició es mostren a la taula 8, calculats a partir dels resultats de tres replicats.

Rpm	Diàmetre mitjà superficial (nm)			Potencial Z (mV)				
	Replicat			Valor mitjà	Replicat			Valor mitjà
500	214	207	203	208	41	38	41	39,8
600	207	151	196	185	41	40	42	41,0
700	190	193	121	156	40	41	40	40,3
800	206	159	132	166	40	43	41	41,2
900	231	223	197	217	40	43	42	41,8

Taula 8. Resultats de mida de partícula i potencial Z en funció de la velocitat d'agitació durant la reacció de síntesi.

En aquest punt, els altres paràmetres es fixen en els seus valors òptims pel que fa a temps emprat en la reacció de síntesi, és a dir, una reacció de síntesi de 10 minuts de durada, i 5 minuts emprats en l'addició de la solució de TPP. Així s'assegura que no influeixen de manera estadísticament significativa en els valors mitjans de mida de partícula i potencial Z obtinguts.

Els resultats també són analitzats mitjançant un test ANOVA (taula 9) per a la mida de partícula i potencial Z per a ambdues variables. El p-valor obtingut és major que 0,05, pel que no hi ha diferències estadísticament significatives derivades del factor velocitat d'agitació.

Anàlisi de la variància: Valor-P

<i>Font</i>	Mida de partícula	Potencial Z
Entre grups	0,1908	0,5540

Taula 9. Anàlisi de la contribució de les diferents velocitats d'agitació a la mida de partícula i al potencial Z.

D'això es desprèn que la velocitat d'agitació aplicada pot ser qualsevol de les analitzades. Aquesta anàlisi fa referència exclusivament al diàmetre mitjà superficial de les nanopartícules ($D[3,2]$) i té en compte les nanopartícules formades fora de l'interval nanomètric, el que implica que el valor s'ha calculat tenint en compte mides majors a causa de la formació d'agregats.

El procés d'anàlisi és anàleg per als valors del potencial Z. Atès que el p-valor obtingut és major que 0,05, es conclou que no hi ha diferències estadísticament significatives entre les diferents velocitats d'agitació avaluades.

Quan s'analitza el rendiment de la reacció de síntesi, entès com el percentatge de nanopartícules la mida de les quals es troba en l'interval aproximat entre 100-300 nm per a cada velocitat d'agitació, s'obtenen els valors que es mostren a la taula 10.

Interval (nm)	Velocitat d'agitació durant la síntesi per gelificació ionotròpica				
	500 rpm	600 rpm	700 rpm	800 rpm	900 rpm
% de nanopartícules respecte del total per a cada interval					
91-105	3,82	4,93	5,70	5,82	3,96
105-120	4,25	5,44	6,23	6,37	4,42
120-138	4,56	5,76	6,53	6,66	4,75
138-158	4,72	5,87	6,57	6,68	4,95
158-182	4,74	5,78	6,35	6,43	4,99
182-209	4,61	5,48	5,90	5,93	4,89
209-240	4,34	5,01	5,26	5,23	4,64
240-275	3,95	4,40	4,49	4,39	4,26
275-316	3,46	3,72	3,68	3,53	3,76
Rendiment (%)	38,45	46,37	50,70	51,04	40,63

Taula 10. Percentatge de nanopartícules per a cada interval de mesura.

Els valors per a cada velocitat d'agitació corresponen al percentatge mitjà de nanopartícules per a cada interval. La representació gràfica d'aquests valors exhibeix el perfil que es mostra a la figura 45. Els valors de rendiment obtinguts per a 700 rpm i 800 rpm són pràcticament iguals, presentant la velocitat de 800 rpm un rendiment lleugerament més alt en aquesta sèrie d'experiments. Per

tant, la reacció de síntesi cal portar-la a terme preferentment a 800 rpm. En canvi, les restants velocitats d'agitació estudiades resulten en un rendiment notablement menor i es descarten per ser aplicades en la reacció de síntesi.

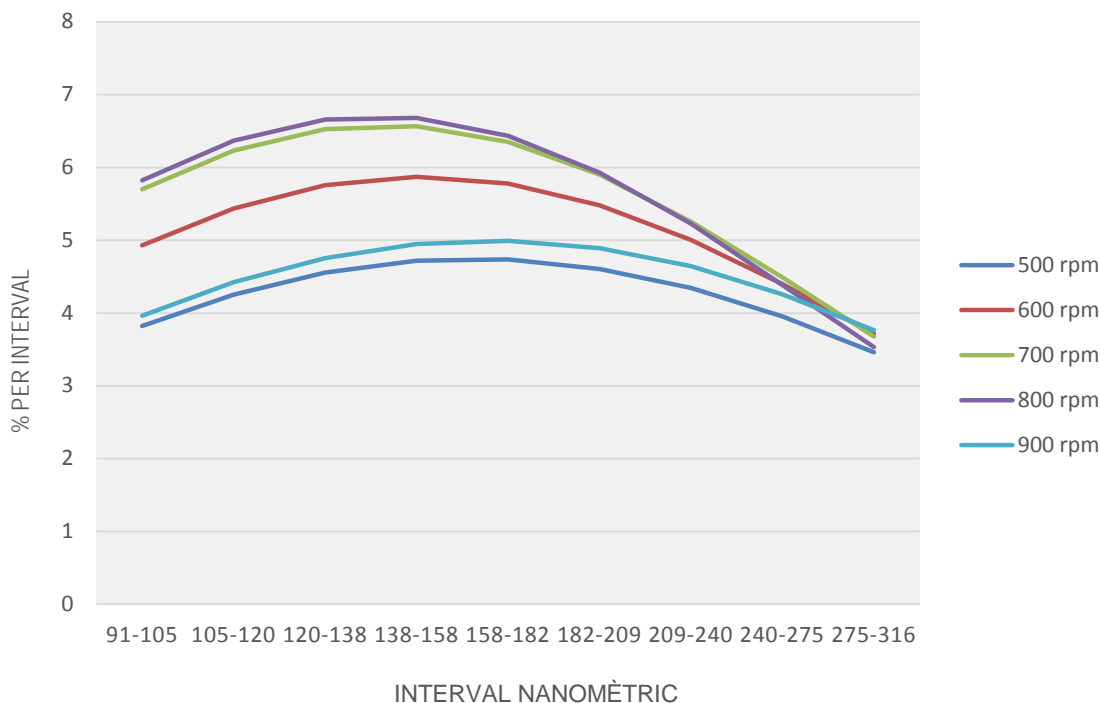


Figura 45. Representació gràfica dels percentatges de nanopartícules obtingudes per a cada velocitat d'agitació.

1.2 VISUALITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES DE QUITOSAN-TPP

Les nanopartícules de quitosan-TPP obtingudes sense optimització del mètode es van observar mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM) i microscòpia electrònica de rastreig (SEM).

A les figures 46 i 47 es poden observar tant nanopartícules aïllades com nanopartícules agregades, amb una gran disparitat de mides apreciables a la figura 46, aproximant-se en alguns casos al límit de l'escala nanomètrica.

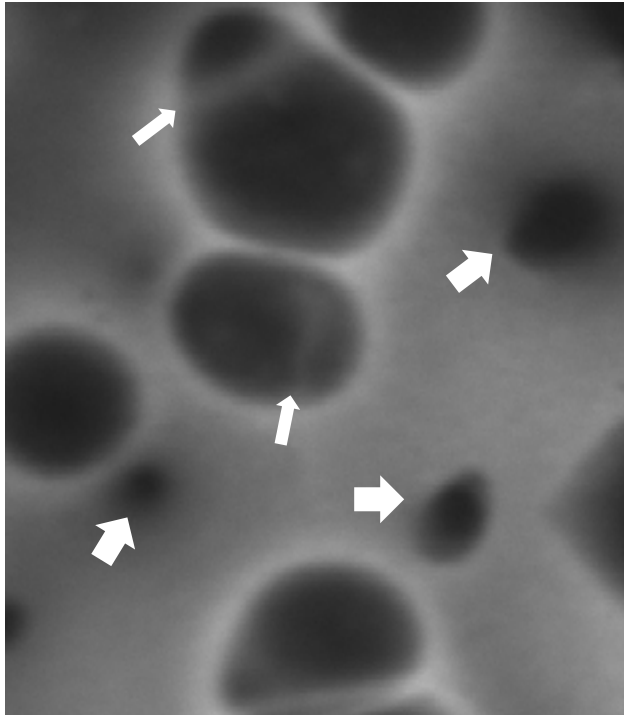


Figura 46. Imatges de nanopartícules de quitosán-TPP adquirides mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. La fletxa ampla assenyala nanopartícules aïllades, mentre que l'estreta assenyala algunes zones d'unió entre nanopartícules agregades.

1 μm

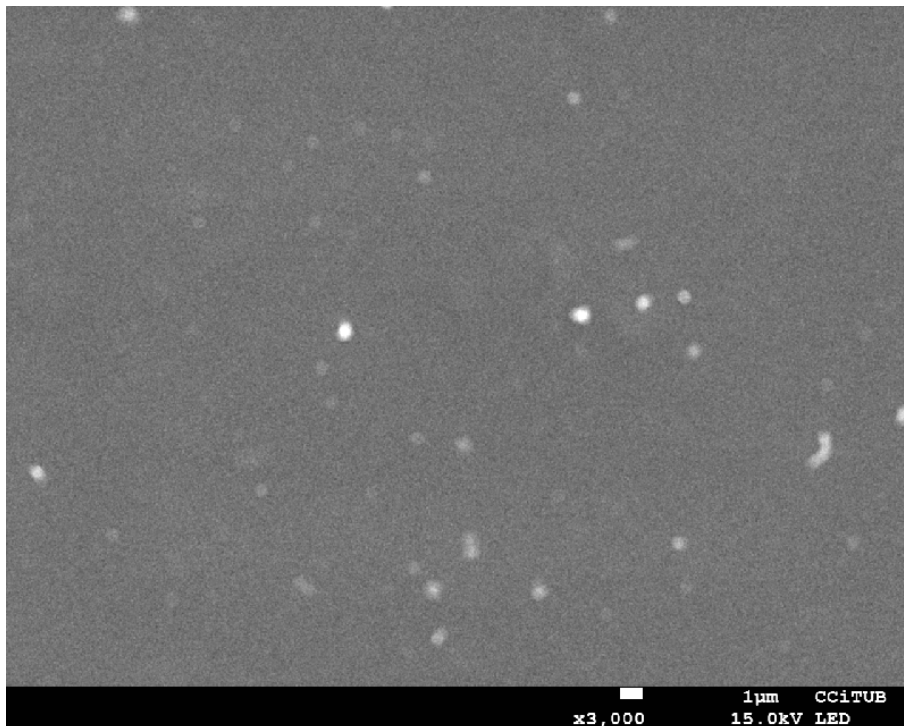


Figura 47. Imatges de nanopartícules de quitosan-TPP adquirides mitjançant microscòpia electrònica de rastreig, on es poden apreciar nombroses nanopartícules aïllades.

Per a les nanopartícules obtingudes en cada condició d'agitació durant l'estudi d'optimització del mètode, es porta a terme una anàlisi topogràfica mitjançant microscòpia de força atòmica (AFM). S'observen imatges de nanopartícules aïllades, que mostren una morfologia similar en tots els casos. Això indica que les variacions en les condicions experimentals no són suficients per alterar la seva morfologia. A les figures 48 i 49 s'observen imatges en diferents angles per a una millor avaluació de la definició de la seva superfície i morfologia. La figura 48 permet visualitzar l'alçada i amplada de partícules aïllades. En aquestes mostres visualitzades per AFM, no s'aprecien diferències en la mida de partícula, que sí s'observen en les imatges obtingudes per TEM de nanopartícules obtingudes sense optimitzar els paràmetres del procés d'obtenció (figura 47).

Dels experiments realitzats, es dedueix que la mida mitjana de les nanopartícules de quitosan-TPP obtingudes està influenciat per la velocitat d'agitació a la qual té lloc la reacció de síntesi, sota les condicions experimentals aplicades. Contràriament, els valors de potencial Z obtinguts no es veuen afectats de manera significativa per cap dels factors estudiats.

Pel que fa a la distribució del diàmetre mitjà superficial a les diferents velocitats d'agitació entre 500 i 900 rpm, es deriva que el major rendiment s'obté a 800 rpm, en l'interval entre 105 i 209 nm. A partir d'aquestes observacions, s'obre l'opció al control de la mida de partícula obtingut si s'aplica un ajustament de la velocitat d'agitació durant la reacció de síntesi.

La morfologia de les nanopartícules obtingudes no es veu afectada per variacions en els factors analitzats, de manera que les característiques de la seva superfície són essencialment les mateixes sota totes les condicions.

El fet que la mida de partícula i fenòmens d'agregació en l'obtenció de nanopartícules polimèriques catióniques de quitosan-TPP es vegi condicionada per lleugeres modificacions en la velocitat d'agitació, junt amb la variabilitat afegida en funció del quitosan de partida (pes molecular i grau de desacetilació) fa recomanable l'estudi de sistemes nanoestructurats alternatius amb components que mostrin menys variabilitat de partida junt amb mètodes més robustos d'obtenció.

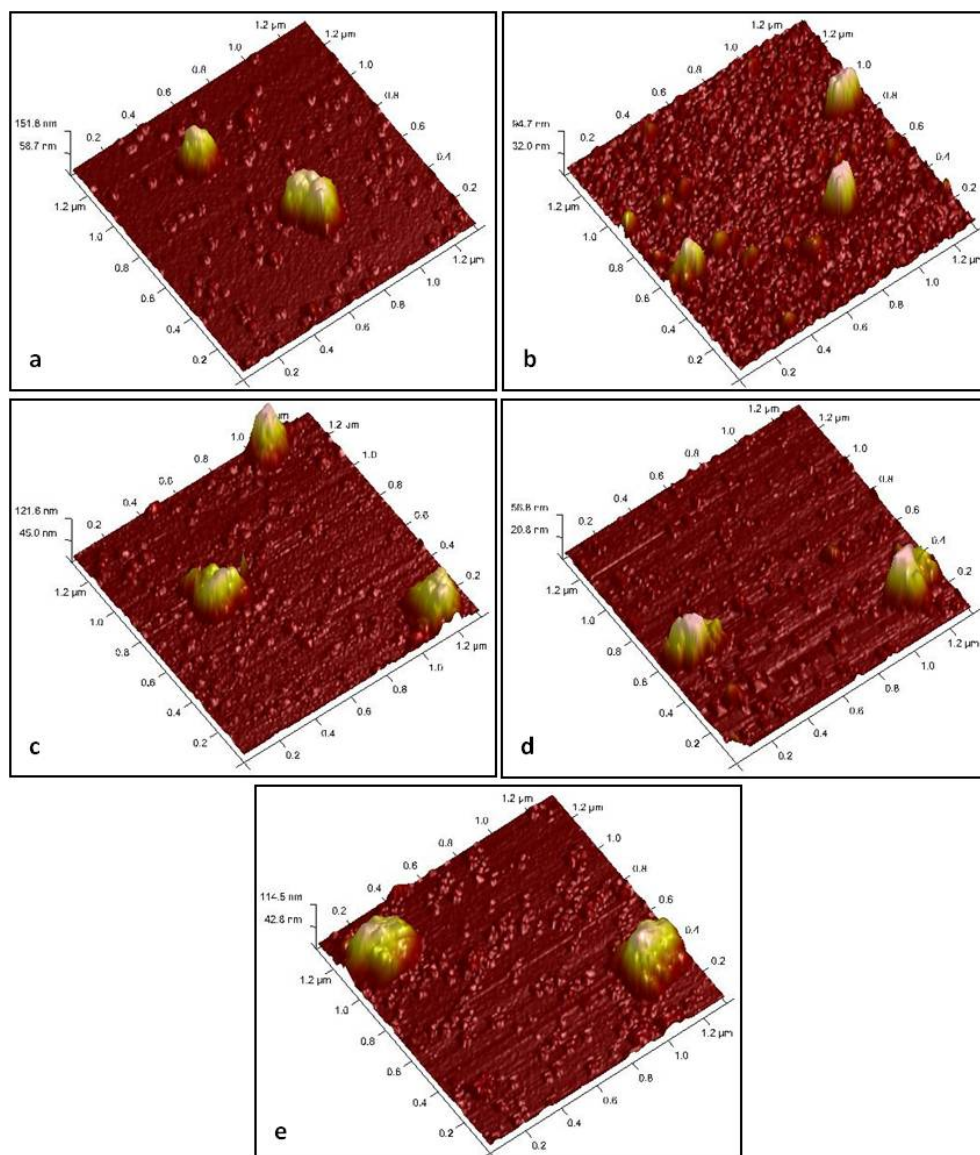


Figura 48. Imatges tridimensionals de nanopartícules aïllades de quitosan-TPP adquirides mitjançant microscòpia de força atòmica, per a cada condició de velocitat d'agitació (500 rpm-a, 600 rpm-b, 700 rpm-c, 800 rpm-d i 900 rpm-e).

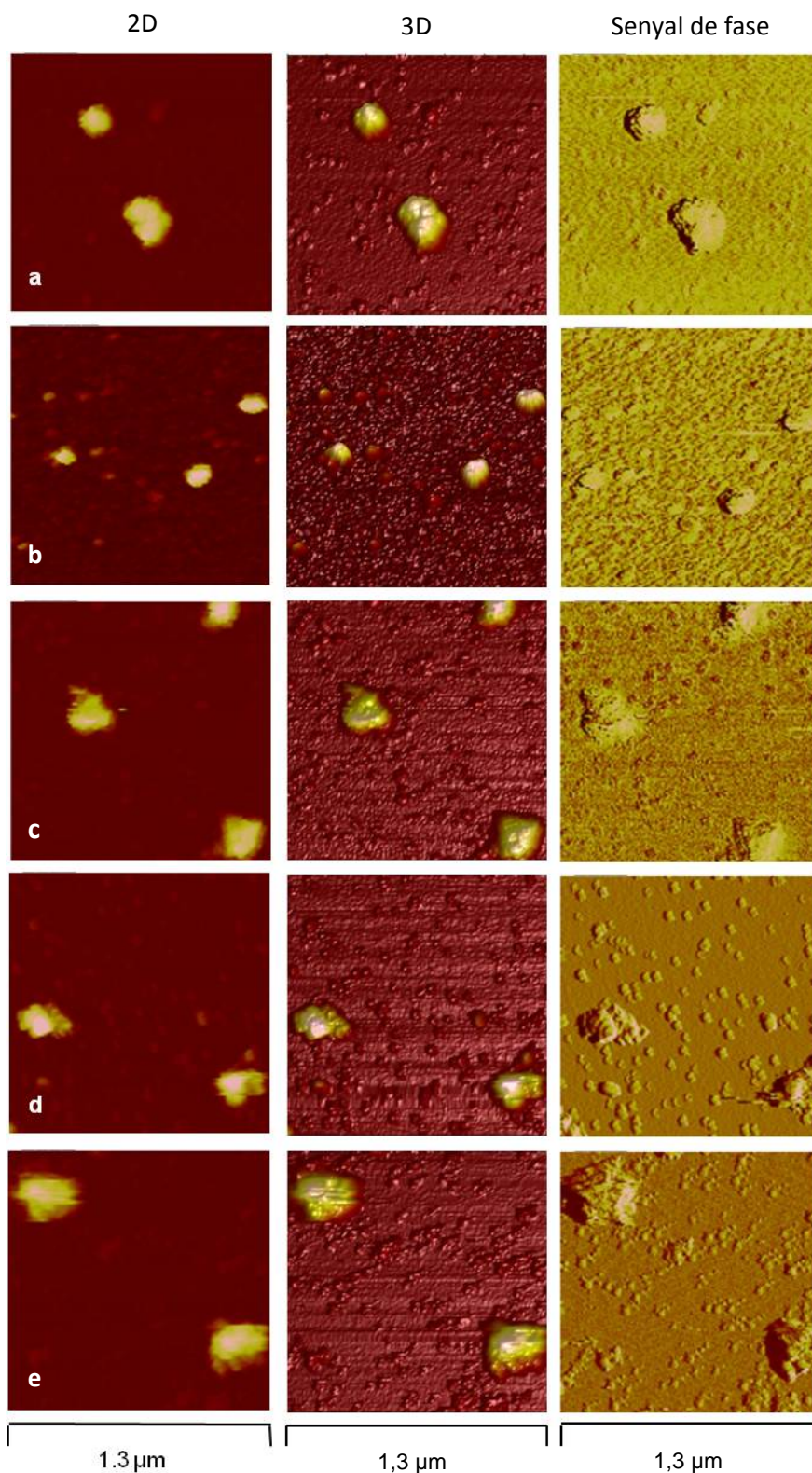


Figura 49. Imatges frontals de nanopartícules de quitosan-TPP adquirides mitjançant microscòpia de força atòmica, en diverses maneres de visualització (2D, 3D i senyal de fase), per a cada condició de velocitat d'agitació (500 rpm-a, 600 rpm-b , 700 rpm-c, 800 rpm-d i 900 rpm-e).

2. OPTIMITZACIÓ DE LA FORMULACIÓ PER A LA MIDA DE PARTÍCULA I POTENCIAL Z DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES SÒLIDES CATIÒNIQUES (cSLN)

Les nanopartícules lipídiques sòlides catióniques s'han obtingut per microemulsificació en calent, a partir de 500 mg d'àcid esteàric, 400 mg del tensioactiu Poloxamer 188 i 800 mg del lípid catiònic octadecilamina.

Per procedir a l'optimització de la fórmula, s'avalua primerament la influència del lípid matricial utilitzat en la síntesi de les nanopartícules sobre la mida i potencial Z obtinguts.

Com s'observa a partir dels valors de la taula 11, les cSLN constituïdes amb àcid esteàric com a lípid matricial presenten una superfície mitjana (diàmetre mitjà) de 122 nm. Aquesta mida de partícula permet la internalització de cSLN mitjançant endocitosi. L'àcid esteàric és el lípid amb la desviació estàndard més baixa entre les diferents mesures ($5,77 \times 10^{-4}$ enfront de 21,94 i 58,02 per al ATO Compritol® 888 i Precirol® ATO 5, respectivament), i es pot considerar com un indicador de l'estabilitat estructural de les cSLN.

Pel que fa al potencial zeta, tant l'àcid esteàric i el Precirol® ATO 5 donen valors per sobre de 40 mV, un potencial superficial més que suficient per aconseguir una unió eficient a DNA. No obstant això, les cSLN que contenen Compritol® 888 ATO tenen un potencial zeta de 19,60 mV, un valor relativament baix en comparació amb la resta, que podria comprometre la interacció cSLN-DNA en termes d'eficiència d'unió. La composició de la diferent matriu lipídica i les seves respectives interaccions amb octadecilamina i Poloxamer 188 han d'explicar les diferències observades en els valors de potencial zeta, com a resultat dels canvis estructurals derivats de l'ús d'un o altre en la síntesi de cSLN.

	Mida de partícula (nm)		Potencial Z (mV)	
	Mitjana	SD	Mitjana	SD
Compritol® 888 ATO	181	21,94	19,6	2,227
Àcid esteàric	122	5,77 x 10 ⁻¹	42,03	0,723
Precirol® ATO 5	236,1	58,02	47,9	0,721

Taula 11. Valors de mida de partícula i de potencial Z per a cSLN formades a partir de diferents lípids matricials. SD significa desviació estàndard.

La composició òptima per a les cSLN és, en aquest cas i pel que fa al lípid matricial, la presència d'àcid esteàric, ja que són les que presenten una mida de partícula menor i un potencial Z de més de 40 mV. Aquest valor de càrrega superficial indica que les nanopartícules són fortament catióniques (figura 50).

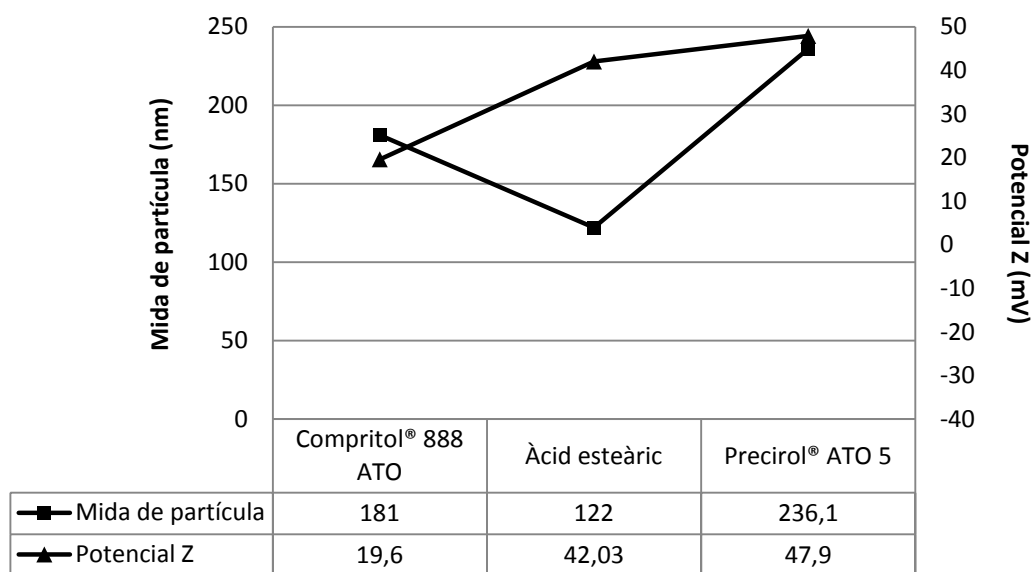


Figura 50. Representació gràfica en què s'observa la relació entre mida de partícula i potencial Z per a les cSLN formades a partir de diferent lípids matricials.

2.1 AVALUACIÓ DEL CONTINGUT EN OCTADECILAMINA

En un primer bloc d'experiments, la mida de partícula i potencial Z es mesuren en cSLN obtingudes a partir de diverses concentracions d'octadecilamina: 200, 400, 600, 700 i 800 mg (taula 12 i figura 51). El lípid matricial utilitzat és àcid esteàric (500 mg) per considerar-se el lípid òptim segons l'apartat anterior, i la concentració de tensioactiu es manté en 400 mg, la mateixa quantitat present en la fórmula utilitzada en els estudis anteriors.

En tots els casos, les mides de partícula obtingudes es troben per sota de 150 nm. El potencial zeta, però, es considera acceptable (≥ 25 mV) en les formulacions amb 600, 700 i 800 mg d'octadecilamina. Encara que les formulacions amb 600 i 700 mg d'octadecilamina tenen un potencial zeta inferior a la mostra amb 800 mg d'octadecilamina, la càrrega positiva es considera suficient per a la unió a DNA.

Contingut en octadecilamina	Mida de partícula (nm)		Potencial Z (mV)		% cSLN 100-150 nm	
	Mitjana	SD	Mitjana	SD	Mitjana	SD
200 mg	119	0	-35,53	2,41	65,79	0,22
400 mg	127,67	1,53	3,53	0,36	65,61	2,37
600 mg	143	1	27,93	0,47	78,37	0,42
700 mg	138,33	23,18	26,87	1,25	68,02	0,97
800 mg	121,67	$5,77 \times 10^{-1}$	42,03	0,72	64,18	0,21

Taula 12. Valors obtinguts per a la mida de partícula, el potencial Z i el percentatge de cSLN obtingudes en l'interval entre 100 i 150 nm per a diferents quantitats d'octadecilamina.

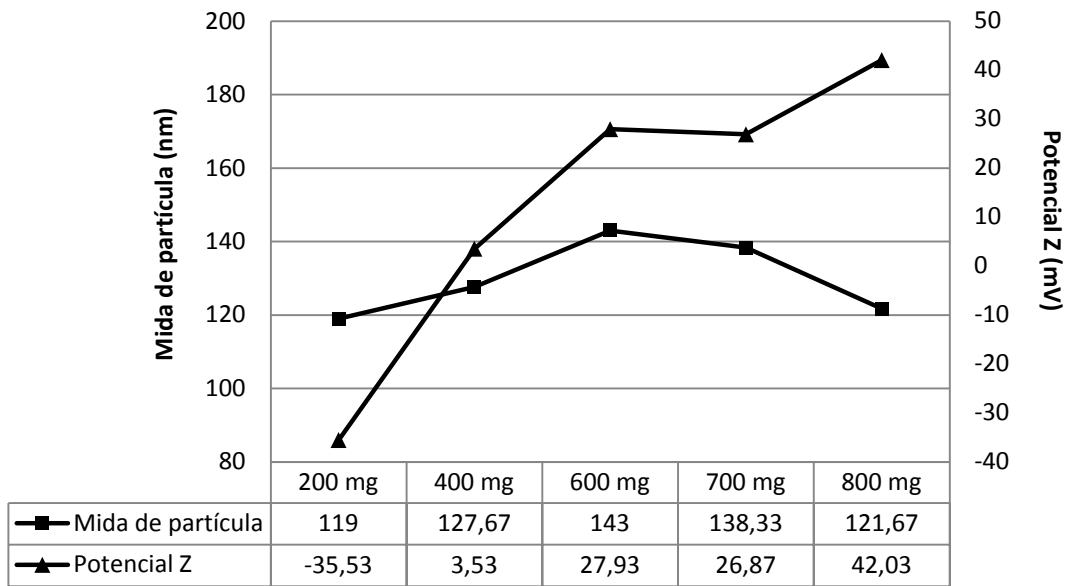


Figura 51. Representació gràfica de la relació entre els valors de mida de partícula (eix primari) i potencial Z (eix secundari) quant s'utilitzen diferents quantitats d'octadecilamina per a la síntesi de cSLN.

Si s'avalua el percentatge de nanopartícules obtingudes dins l'interval entre 100 i 150 nm de diàmetre mitjà, se n'obté un major percentatge en la formulació que conté 600 mg d'octadecilamina (figura 52).

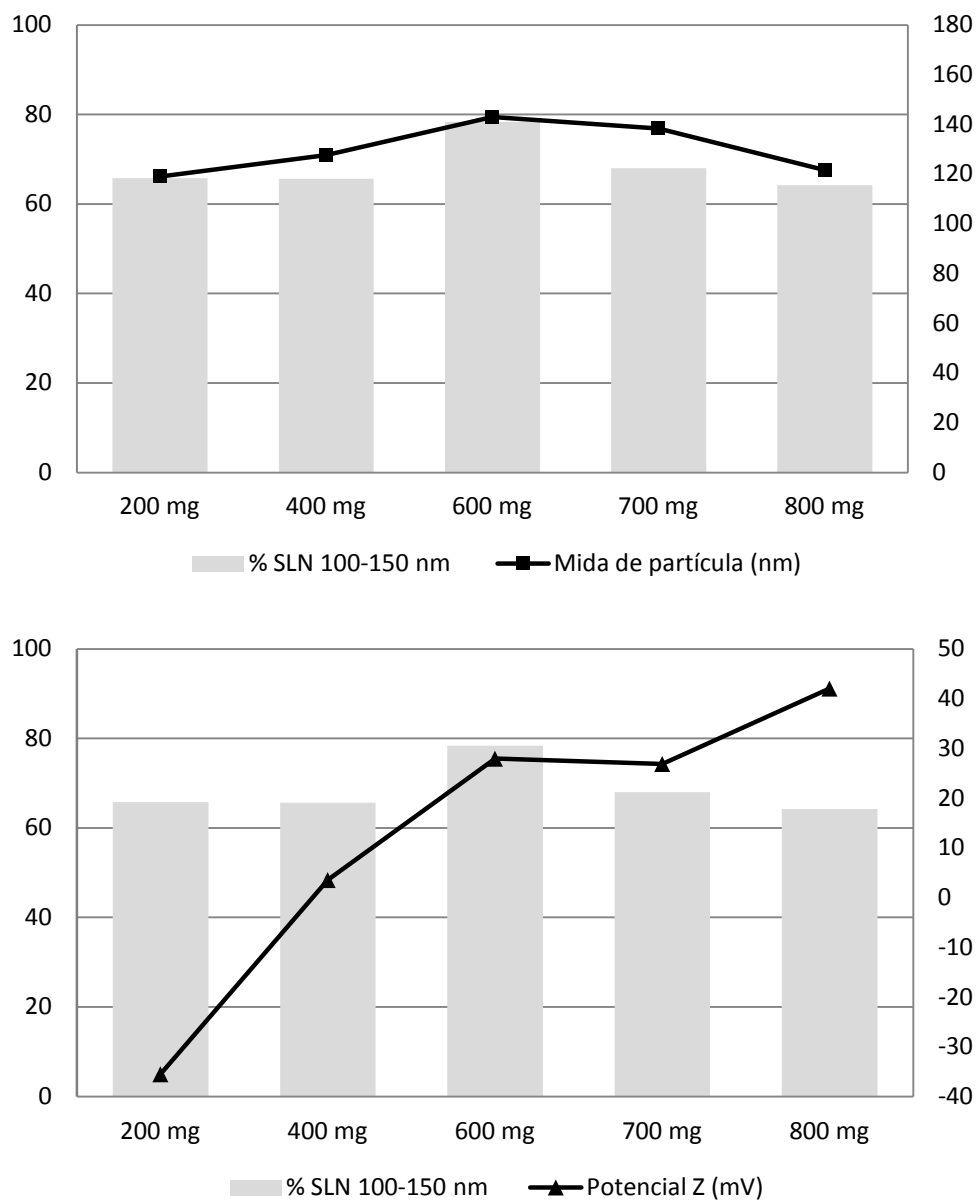


Figura 52. Representació gràfica dels percentatges de cSLN obtingudes en l'interval entre 100 i 150 nm en relacionats amb la mida de partícula (gràfic superior, eix secundari) i el potencial Z (gràfic inferior, eix secundari) en funció de la quantitat d'octadecilamina a la fórmula.

2.2 AVALUACIÓ DEL CONTINGUT EN POLOXAMER 188

En els experiments d'avaluació de la influència de la concentració de Poloxamer 188, la quantitat d'octadecilamina es fixa en 800 mg, com en la fórmula original, sense introduir-hi modificacions per al moment.

Les formulacions amb 100 mg i 400 mg de Poloxamer 188 mostren una superfície mitjana per sota de 150 nm. Per als valors de potencial zeta mesurats, totes les formulacions es consideren acceptables per a la unió a DNA (taula 13 i figura 53).

Contingut en Poloxamer 188	Mida de partícula (nm)		Potencial Z (mV)		% cSLN 100-150 nm	
	Mitjana	SD	Mitjana	SD	Mitjana	SD
90 mg	155,67	35,3	34,87	2,08	63,1	3,13
100 mg	124,33	10,12	33,4	1,41	68,43	3,57
400 mg	121,67	5,77 $\times 10^{-1}$	42,03	0,72	64,18	0,21

Taula 13. Valors per a mida de partícula, potencial Z i % de cSLN obtingudes en l'interval entre 100 i 150 nm per a diferents quantitats de Poloxamer 188.

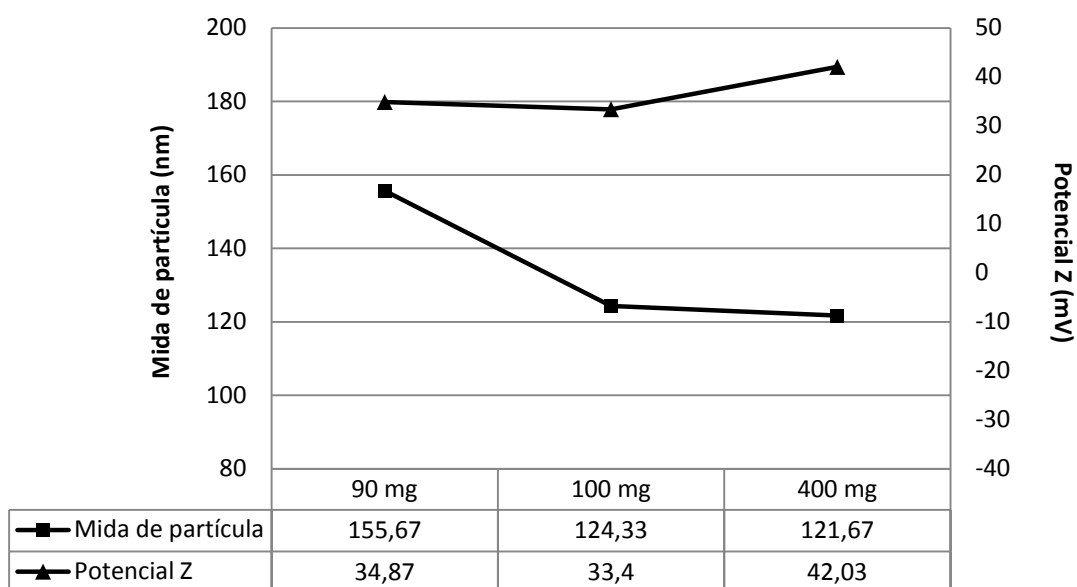


Figura 53. Representació gràfica de la relació entre els valors de mida de partícula i potencial Z quant s'utilitzen diferents quantitats de Poloxamer 188 per a la síntesi de cSLN.

Si s'avalua el percentatge de nanopartícules obtingudes dins l'interval entre 100 i 150 nm de diàmetre mitjà, se n'obté un major percentatge en la formulació que conté 100 mg de Poloxamer 188 (figura 54).

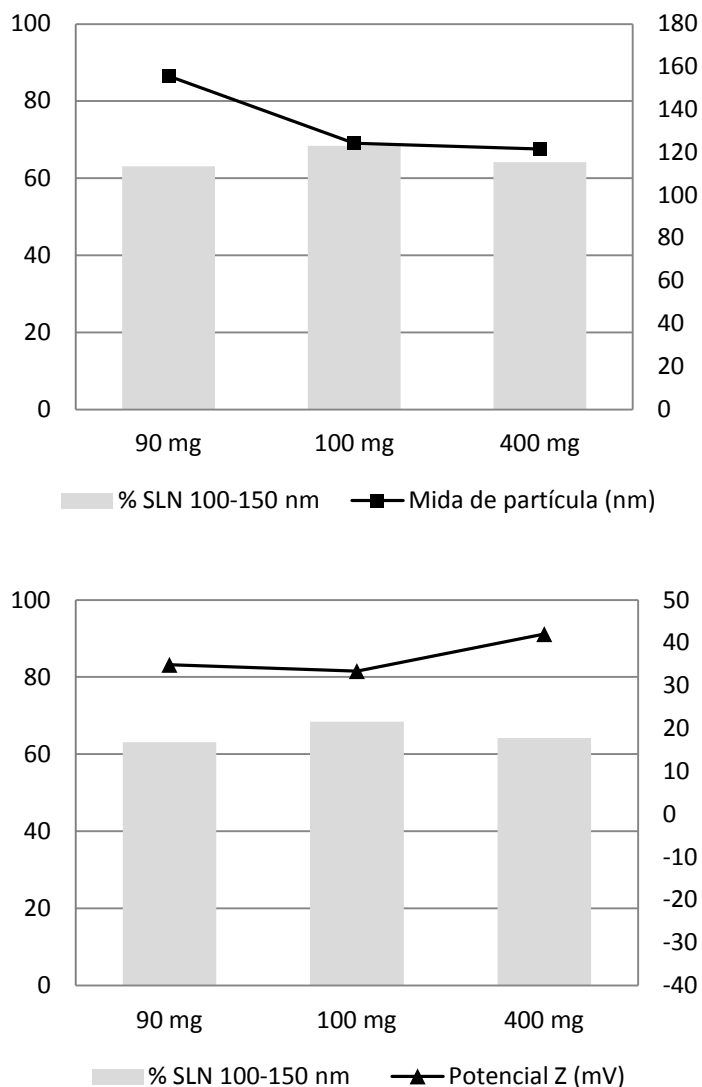


Figura 54. Representació gràfica dels percentatges de cSLN obtingudes en l'interval entre 100 i 150 nm relacionats amb la mida de partícula (gràfic superior, eix secundari) i el potencial Z (gràfic inferior, eix secundari) en funció de diferents quantitats de Poloxamer 188 a la fórmula.

2.3 AVALUACIÓ DEL CONTINGUT EN OCTADECILAMINA I POLOXAMER 188

Per a formulacions de cSLN obtingudes a partir de fórmules amb variació de la quantitat tant de l'agent tensioactiu com de l'octadecilamina, totes resulten en cSLN amb una mida mitjana de partícula inferior a 150 nm i valors de potencial Z per sobre de 25 mV. En tots els casos el potencial zeta es considera suficient per a la unió a DNA (taula 14 i figura 55).

Contingut en octadecilamina/ Poloxamer 188	Mida de partícula (nm)		Potencial Z (mV)		% cSLN 100-150 nm	
	Mitjana	SD	Mitjana	SD	Mitjana	SD
600 mg 100 mg	124,67	0,58	32,6	1,35	69,16	0,6
600 mg 400 mg	143	1	27,93	0,47	78,37	0,42
800 mg 100 mg	124,33	10,12	33,4	1,41	68,43	0,21
800 mg 400 mg	121,67	5,77x10 ⁻¹	42,03	0,72	64,18	0,22

Taula 14. Valors obtinguts per a la mida de partícula, el potencial Z i el percentatge de cSLN obtingudes en l'interval entre 100 i 150 nm per a diferents quantitats tant d'octadecilamina com de Poloxamer 188.

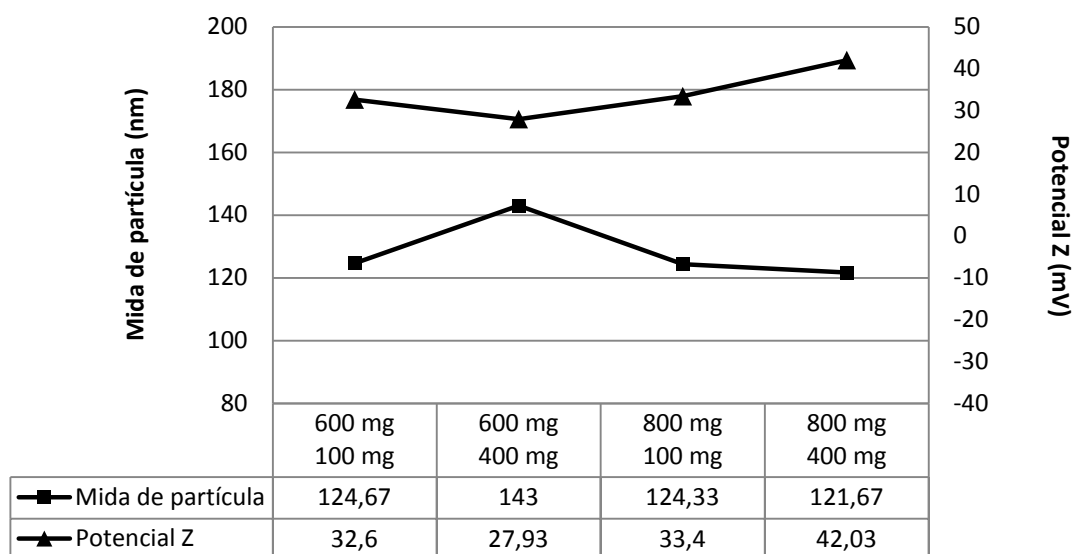


Figura 55. Representació gràfica de la relació entre els valors de mida de partícula i potencial Z quant s'utilitzen diferents quantitats d'octadecilamina i Poloxamer 188 per a la síntesi de cSLN.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Si s'avalua el percentatge de nanopartícules obtingudes dins l'interval entre 100 i 150 nm de diàmetre mitjà, se n'obté un major percentatge en la formulació que conté 600 mg d'octadecilamina i 400 mg de Poloxamer 188 (figura 56).

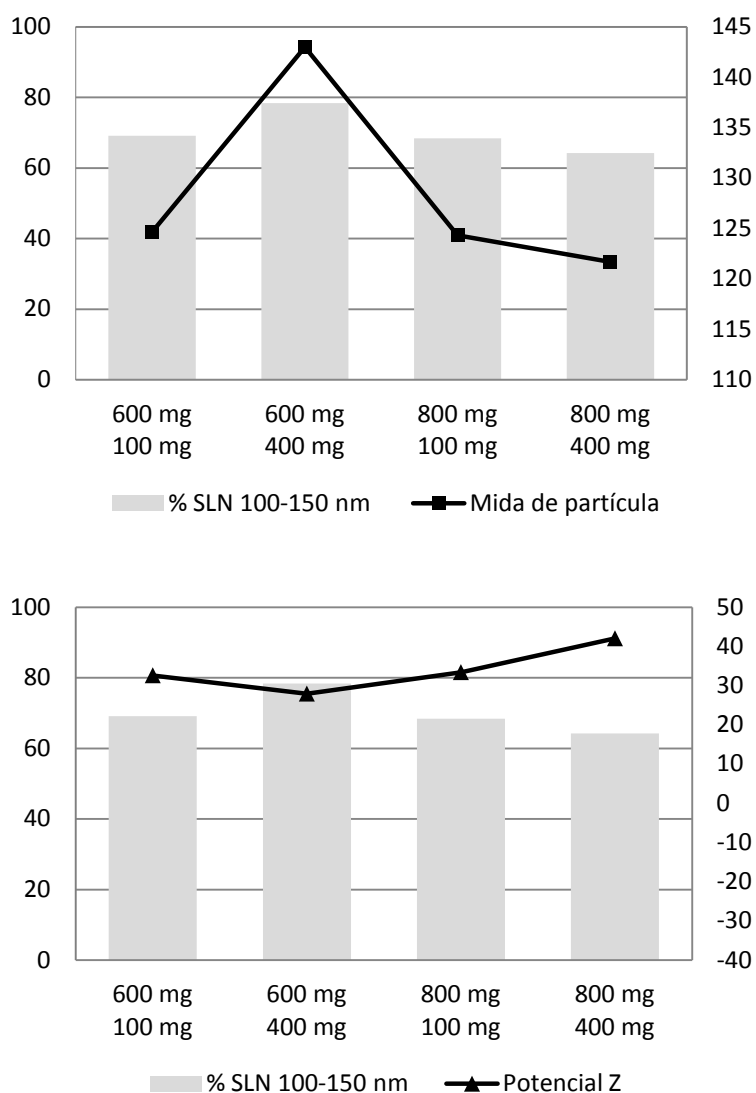


Figura 56. Representació gràfica dels percentatges de cSLN obtingudes en l'interval entre 100 i 150 nm relacionats amb la mida de partícula (gràfic superior, eix secundari) i el potencial Z (gràfic inferior, eix secundari).

Com s'observa a la figura 56, qualsevol d'aquestes quatre formulacions poden ser utilitzades per a l'objectiu previst. La fórmula amb 600 mg i 100 mg d'octadecilamina i tensioactiu, respectivament, es tria com a fórmula òptima. Les desviacions estàndard per a la mida de partícula i potencial Z són 0,58 i 1,35 respectivament, valors que indiquen una baixa dispersió per a ambdós paràmetres. Aquesta formulació suggereix que és possible reduir la quantitat de tensioactiu i octadecilamina un màxim del 75% i 25%, respectivament, per obtenir cSLN amb el menor diàmetre mitjà possible, amb una càrrega de

superfície en què les nanopartícules obtingudes es consideren fortament catióniques.

A la taula 15 es s'indica a mode de resum la composició òptima de la formulació, a partir de la qual es porten a terme les caracteritzacions posteriors, així com els assajos de viabilitat cel·lular i transfecció de pDNA i siRNA.

Formulació de nanopartícules lipídiques sòlides catióniques	
MÈTODE D'OBTENCIÓ	
Microemulsificació en calent	
COMPONENTS	
Àcid esteàric	500 mg
Octadecilamina	600 mg
Poloxamer 188	100 mg
Aigua	145 ml

Taula 15. Mètode d'obtenció i components de les cSLN.

3. CARACTERITZACIÓ TÈRMICA I ESTRUCTURAL

3.1 ESPECTROSCÒPIA DE FOTOELECTRONS PER EMISSIÓ DE RAIGS X DE cSLN

El resultat de l'espectroscòpia de fotoelectrons per emissió de raigs X mostra els recomptes d'electrons com una funció de l'energia d'enllaç (E_b) dels diferents elements presents a la superfície (aproximadament 5-10 nm de profunditat) i es mesuren en eV (electró-volt). Com es pot veure a la figura 57, les energies d'enllaç per als electrons en els primers orbitals augmenten amb el nombre atòmic com a resultat de la càrrega nuclear.

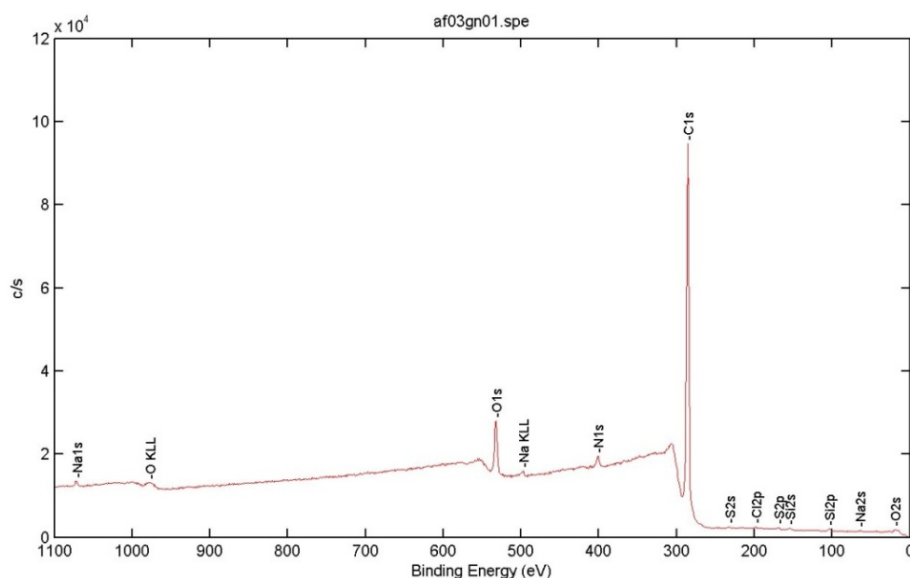


Figura 57. Espectre resultant on es mostren les energies d'enllaç dels electrons de diferents àtoms presents a la superfície de les cSLN.

L'energia d'enllaç dels electrons 1s del nitrogen apareix a 400 eV, i confirma la presència d'àtoms de nitrogen de l'octadecilamina responsables de donar a les cSLN els valors de potencial Z observats. El percentatge d'àtoms de nitrogen a la superfície de les cSLN és de 2,2% (taula 16). La presència de nitrogen carregat positivament és condició necessària i suficient per a la capacitat d'unió de DNA de les cSLN.

C1s	N1s	O1s
89.5	2.2	7.0

Taula 16. Composició atòmica (en %) de la superfície de les cSLN.

3.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE RASTREIG DELS COMPONENTS DE LES CSLN (DSC)

El comportament tèrmic és analitzat a través de DSC. S'obtenen termogrames (corbes DSC) de mostres individuals d'àcid esteàric i octadecilamina (figures 58 i 59, respectivament). Els pics endotèrmics corresponen a canvis que experimenta la mostra en funció de la temperatura aplicada.

Les corbes DSC de les mostres que contenen, per una banda, àcid esteàric i octadecilamina conjuntament, (figura 60), i per altra banda una barreja d'àcid esteàric, octadecilamina i Poloxamer 188 (figura 61) presenten un pic exotèrmic amb una entalpia de 62,10 mJ com una mesura de l'energia transferida. Aquest resultat és possiblement consistent amb una reacció de neutralització, és a dir, una reacció àcid-base exotèrmica entre el grup carboxílic de l'àcid esteàric i l'amina primària de l'octadecilamina, immediatament després que les dues substàncies aconseguen l'estat líquid, fet que es podria relacionar amb el primer pic endotèrmic. La presència de Poloxamer 188 no indueix canvis significatius en la reacció, tot i que, en aquest cas, disminueix l'entalpia a 42,40 mJ, indicant una menor transferència d'energia. Un segon pic de fusió apareix després de la reacció exotèrmica. Aquest resultat pot ser compatible amb la presència de d'amines secundàries i terciàries en el material de partida, amb diferent punt de fusió, i que ja s'aprecia en la mostra que conté només octadecilamina (figura 59), amb la qual cosa es pot descartar que la presència dels altres components de la formulació estiguin implicats en l'aparició d'aquest pic.

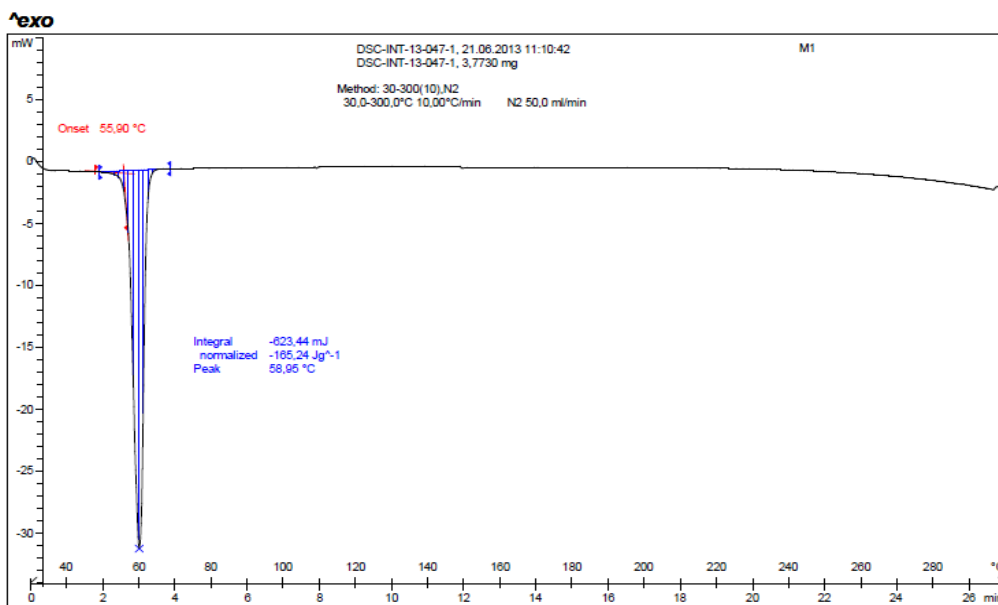


Figura 58. Corba DSC resultant d'una mostra d'àcid esteàric.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

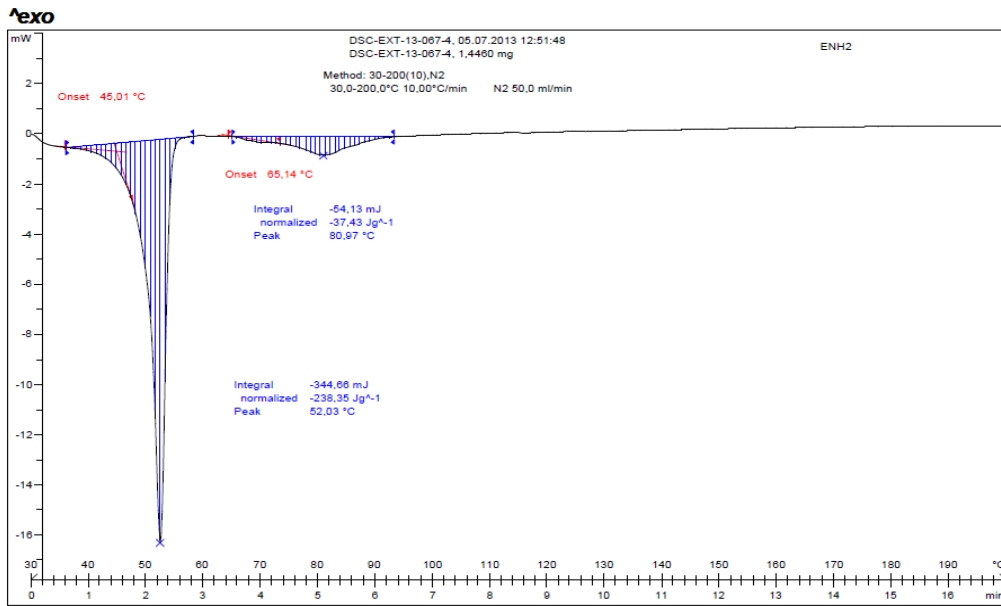


Figura 59. Corba DSC resultant d'una mostra d'octadecilamina.

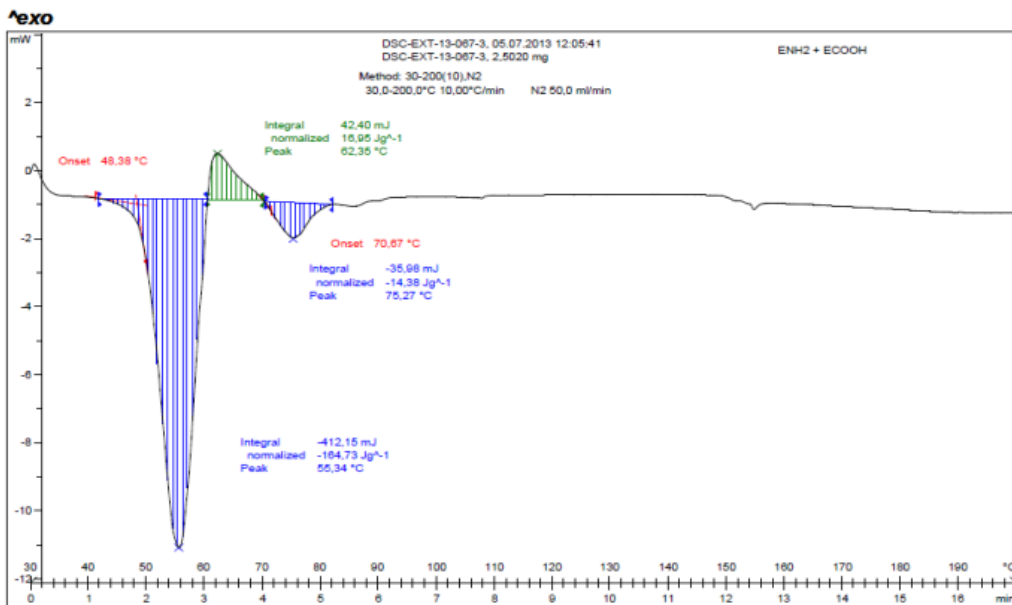


Figura 60. Corba DSC resultant d'una barreja d'àcid esteàric i octadecilamina.

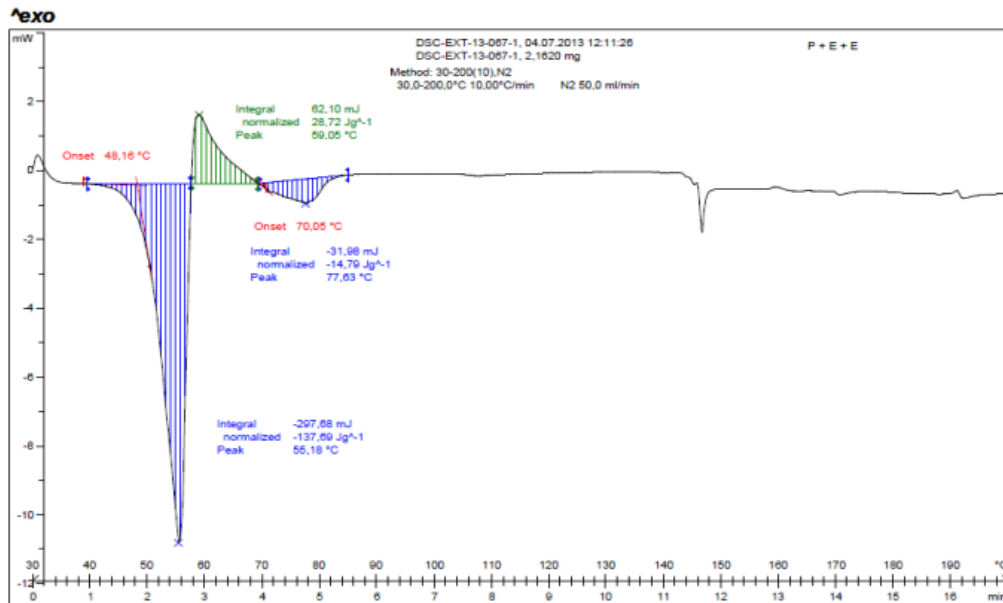


Figura 61. Corba DSC resultant d'una barreja d'àcid esteàric, octadecilamina i Poloxamer 188.

3.3 ANÀLISI TERMOGRAVIMÈTRICA DE LA FORMULACIÓ DE CSLN

La termogravimetria realitzada sobre mostres liofilitzades amb i sense trehalosa com a crioprotector durant el procés de liofilització posa de manifest diferències en funció de la presència o absència d'aquest sucre.

La corba termogravimètrica corresponent a la mostra liofilitzada amb trehalosa com a crioprotector evidencia una molt lleugera pèrdua de massa que queda estabilitzada cap els 140°C, possiblement a causa de la presència de molècules d'aigua fortament lligades a la trehalosa, i que no han estat eliminades completament al no realitzar-se un assecat secundari de la mostra. La formulació roman estable fins que, cap a 250°C es descomposa ràpidament (figura 62).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

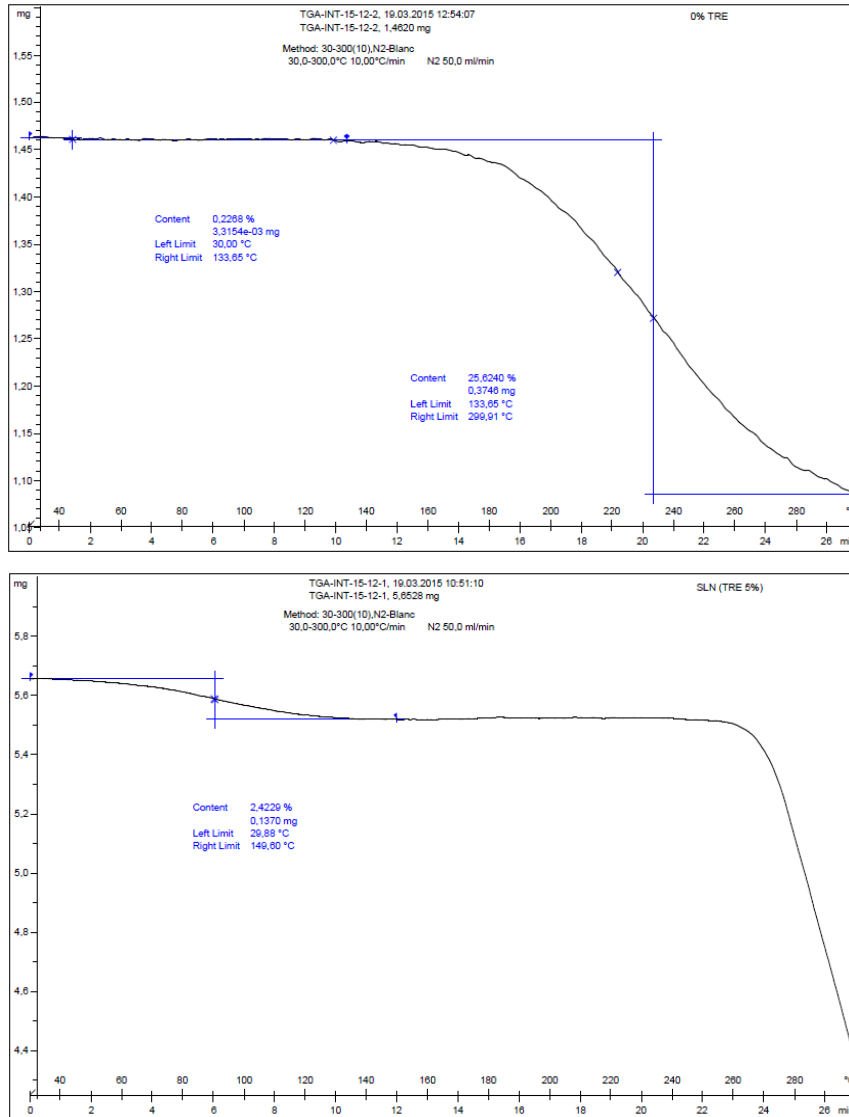


Figura 62. Corbes TGA corresponents a una mostra de cSLN liofilitzada en absència de trehalosa com a crioprotector (superior) i en presència de trehalosa (inferior).

En canvi, en la corba termogravimètrica de la mostra liofilitzada en absència de trehalosa no apareix una pèrdua de massa significativa possiblement atribuïble al fet de no haver-hi el sucre que reté molècules residuals d'aigua. La descomposició en aquest cas s'inicia cap als 135 °C, molt més per sota que en la mostra liofilitzada amb el crioprotector. Aquesta observació és concordant amb la possibilitat que l'absència de trehalosa acceleri l'oxidació dels components lipídics de les nanopartícules molt abans que no pas en la mostra liofilitzada amb trehalosa, on aquest component actua com a protector de la formulació.

3.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE RASTREIG DE LA FORMULACIÓ DE cSLN (DSC)

Si es porta a terme una anàlisi DSC sobre mostres de cSLN liofilitzades en presència o absència de trehalosa, es pot observar que el comportament tèrmic difereix d'una respecte de l'altra (figura 63). Com que l'única diferència entre les dues mostres és la presència de trehalosa, hi ha una alta probabilitat que les diferències detectades siguin causades majoritàriament per aquest fet.

Aquestes corbes confirmen el diferent comportament de les mostres prèviament posat de manifest amb l'anàlisi termogravimètrica efectuada.

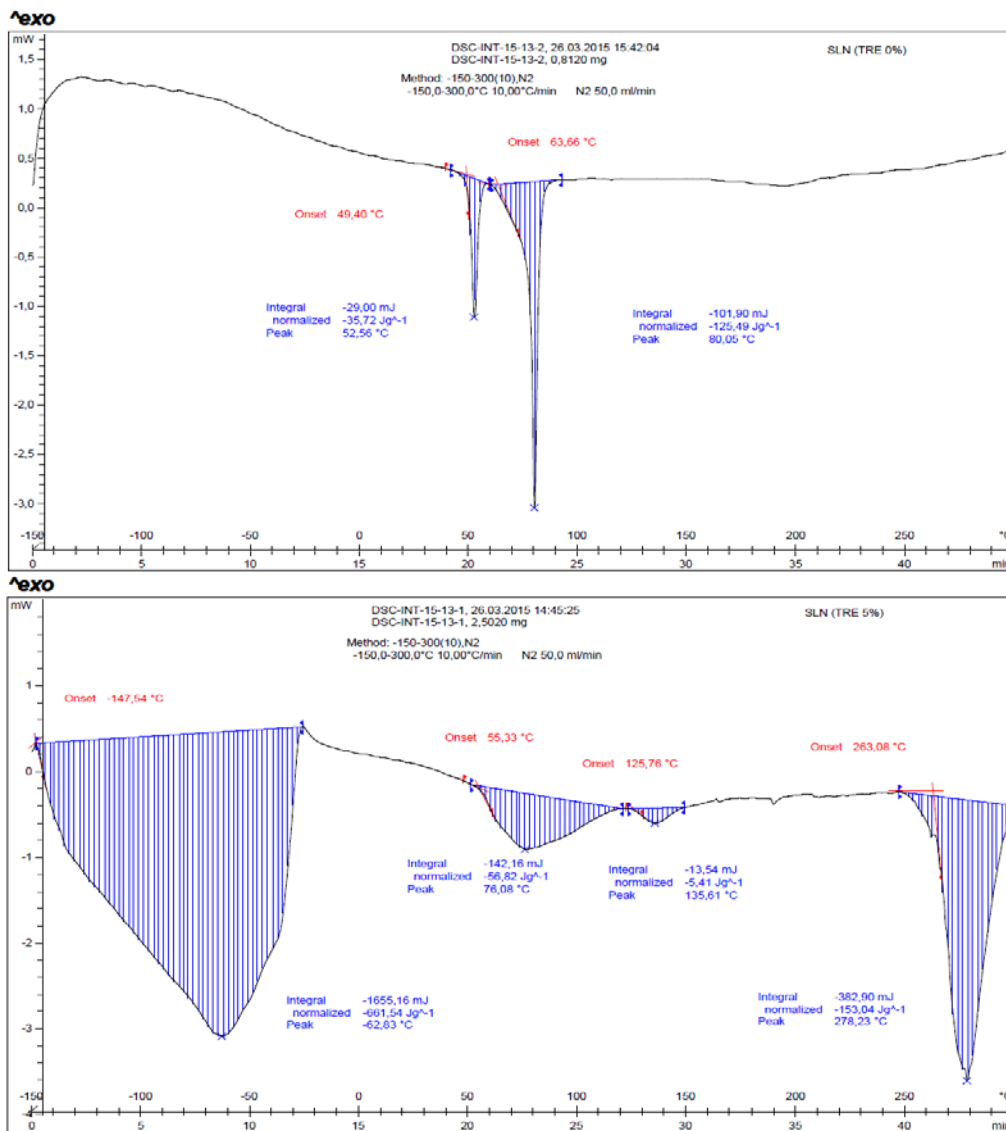


Figura 63. Corbes DSC corresponents a una mostra liofilitzada de cSLN en absència de trehalosa com a crioprotector (superior) i en presència de crioprotector (inferior).

La corba de la mostra liofilitzada amb trehalosa presenta un ampli pic endotèrmic amb el seu mínim a $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$, i que podria ser causat per diversos factors, inclosos factors atribuïbles a l'equip. En qualsevol cas, la resta de pics de la corba són diferents dels que es poden trobar a la mostra liofilitzada sense trehalosa. Així, aquest component indueix canvis significatius en el comportament tèrmic de la formulació per interacció amb la resta components, de tal manera que, tal i com s'observa a la corba TGA anterior, protegeix la formulació de la descomposició tèrmica.

3.5 DIFRACCIÓ DE RAIGS X (XRD)

S'obté el patró de difracció de raigs X per determinar si les interaccions observades a partir dels experiments de DSC impliquen la formació de noves entitats químiques, observable a partir de les intensitats de línia, que són característiques per a cada component en funció dels centres de reflexió atòmics. Si no hi ha interacció, els resultats per a l'àcid esteàric i l'octadecilamina (figures 64 i 65, respectivament) haurien de mostrar un patró de superposició quan s'analitza una barreja fosa dels dos components.

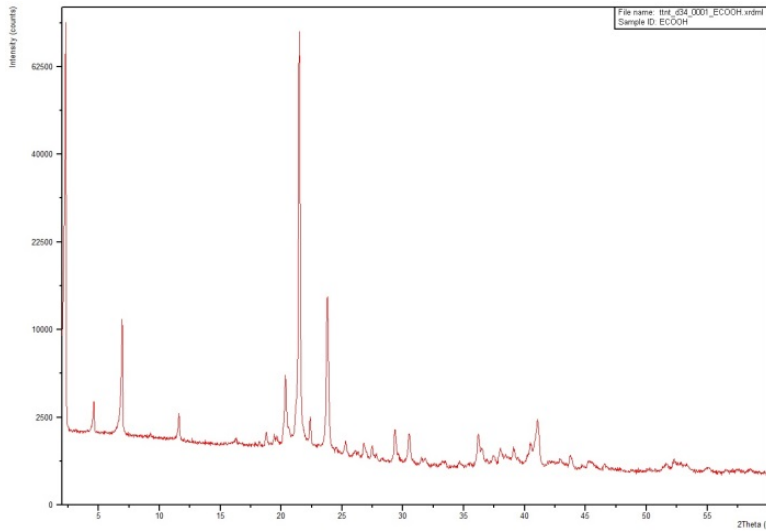


Figura 64. Patró de difracció obtingut per a l'àcid esteàric.

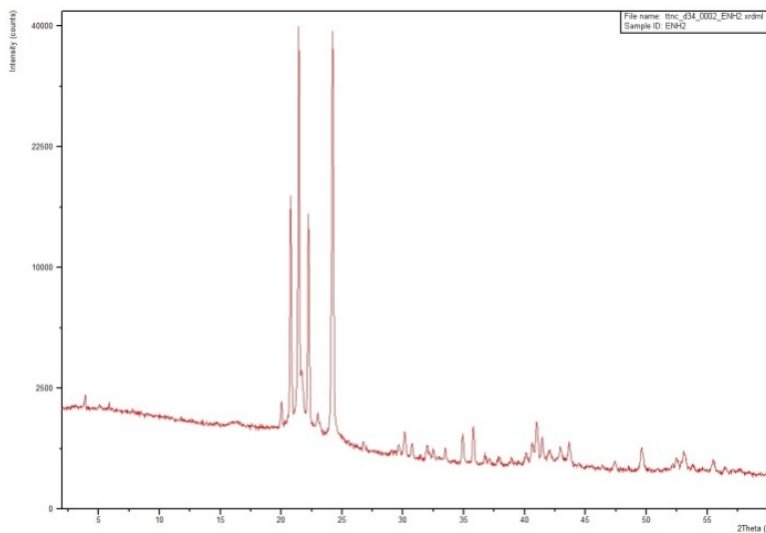


Figura 65. Patró de difracció obtingut per a l'octadecilamina.

Atès que els resultats per a les barreges foses d'àcid esteàric i octadecilamina no generen el patró de difracció que correspondria a la suma de les intensitats de línia d'una barreja de les dues substàncies (figura 66), es pot considerar que es produeix una interacció química entre l'àcid esteàric i la octadecilamina.

Si s'observen els tres diagrames de difracció en superposició (figura 67, gràfica A, i zones B i C amplificades), es pot observar clarament a partir de les regions ampliadades que el diagrama representat per una línia de color negre, i que es correspon a la barreja recristal·litzada d'àcid esteàric i octadecilamina no correspon a la suma algebraica dels diagrames de les dues substàncies per separat. Aquests resultats confirmen les dades termogràfiques. La formació d'aquesta sal (resultat de la reacció de neutralització àcid-base) implica

RESULTATS I DISCUSSIÓ

l'existència dels grups amino protonables necessaris per a la unió a DNA. Els valors del potencial Z són una constatació de la presència d'octadecilamina en la formulació per proporcionar suficient càrrega superficial positiva per a la unió a DNA.

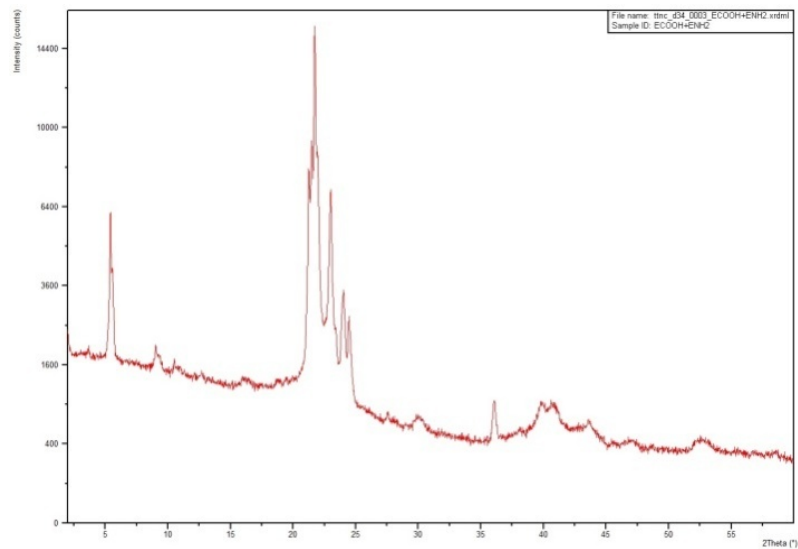


Figura 66. Patró de difracció d'una barreja (1:1) d'àcid esteàric i octadecilamina.

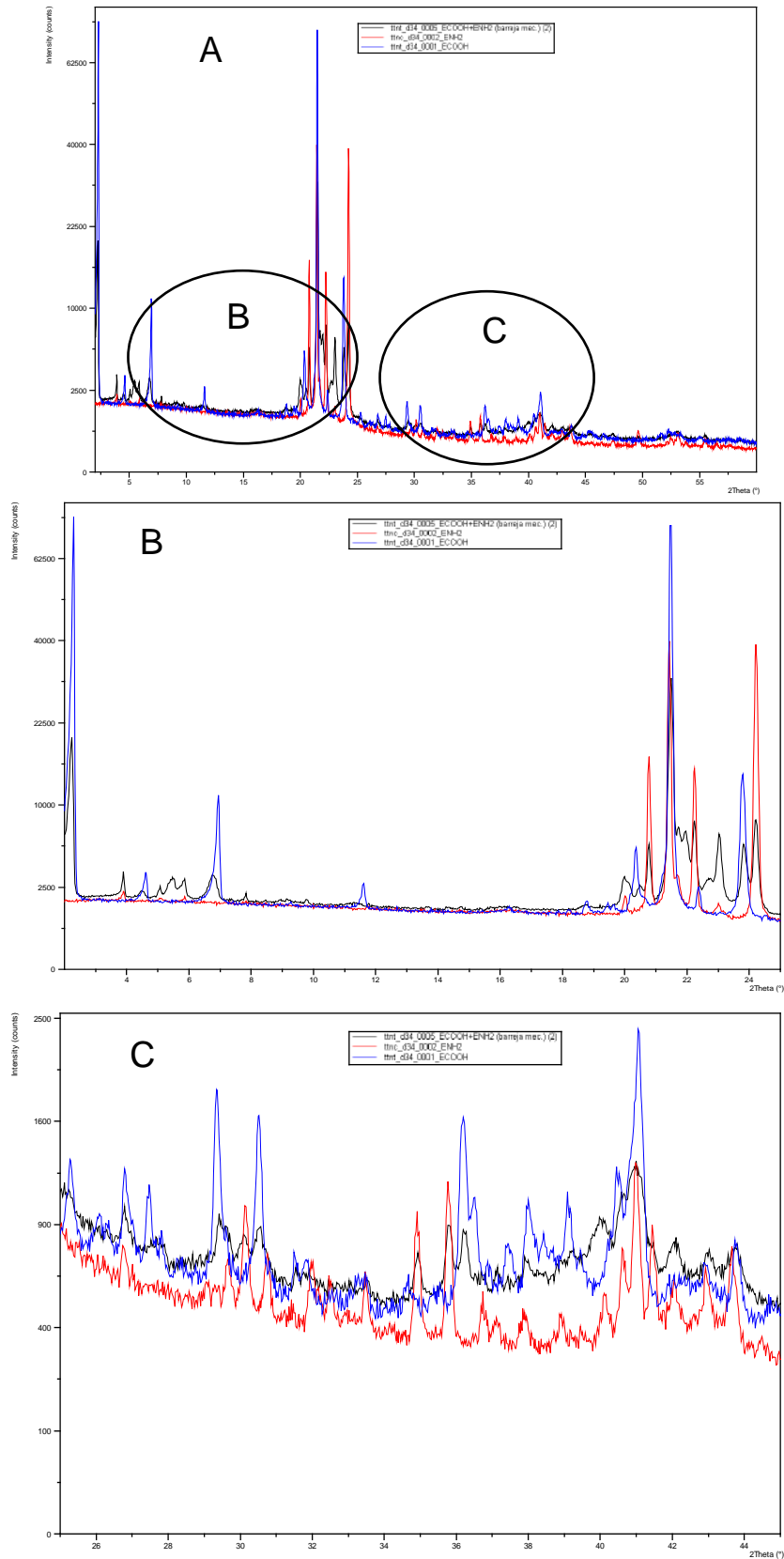


Figura 67. Gràfica superposada dels patrons de difracció (A) i ampliacions (B i C) en què es posa de manifest el patró resultant del a interacció entre l'àcid esteàric i l'octadecilamina (en negre).

3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSES (MS)

L'anàlisi d'espectrometria de masses dona evidència de la formació d'una sal, i ve a confirmar els resultats de DSC esmentats anteriorment. Com es mostra a les figures 68 i 69, els pics indiquen la relació de massa a càrrega (m/z) dels ions que resulten del procés de *electrospraying*. La mostra d'àcid esteàric (MW ≈ 284) es converteix en l'anió estearat (MW ≈ 283) amb una sola càrrega negativa (figura 68).

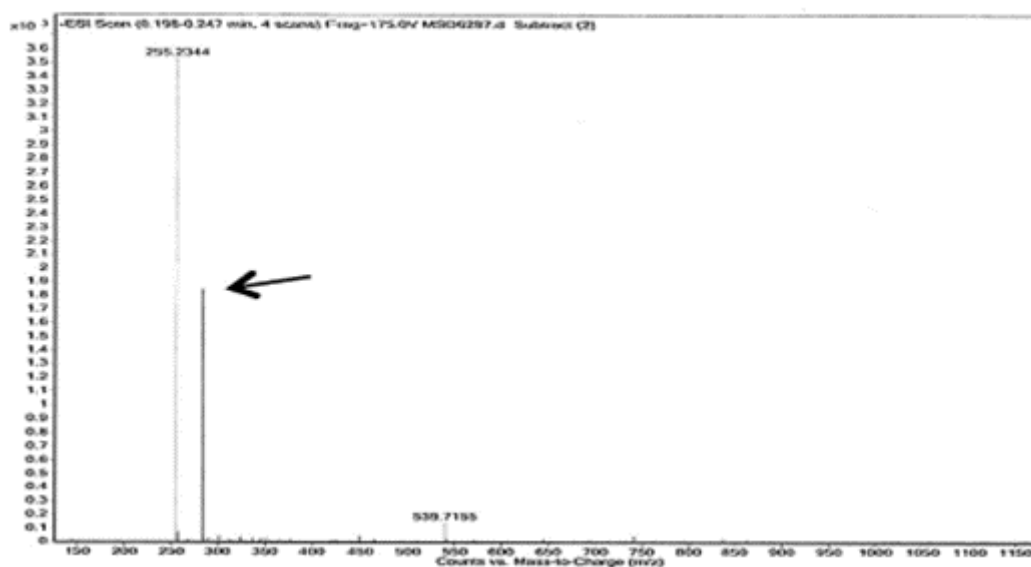


Figura 68. Espectre de masses resultant per a l'àcid esteàric.

En el cas de l'octadecilamina (MW ≈ 269), es converteix (figura 69) en la forma catiònica (MW ≈ 270). Si es té això en compte, els pics han d'aparèixer en 283 i 270 en l'eix X, tal com s'observa. Els pics addicionals a la figura 68 es poden atribuir a l'escissió de la molècula d'àcid esteàric en fragments més petits a causa de les condicions experimentals pròpies de la tècnica o a la presència d'impureses.



Figura 69. Espectre de masses resultant per a l'octadecilamina.

La hipòtesi de la formació d'un enllaç peptídic entre els grups carboxil i amina queda descartada en absència de catalitzadors, necessaris per disminuir l'energia d'activació de la reacció. Sense ells, es requeriria una temperatura molt més alta i un temps més llarg de reacció que l'aplicat a la barreja fosa recristal·litzada, que és aproximadament la mateixa temperatura aplicada durant el mètode de producció de cSLN.

3.7 RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR DE PROTÓ ($^1\text{H-NMR}$)

Els desplaçaments químics (figura 70) dels espectres de ressonància magnètica nuclear de protó obtinguts tant per a una barreja prèviament fosa i recristal·litzada d'àcid esteàric i octadecilamina com per a les dues substàncies separatament, indiquen que es produeix, per una banda, la protonació de l'amina primària de l'octadecilamina i, per altra banda, es produeix la pèrdua del protó de l'àcid esteàric. Aquestes dades reforcen les obtingudes per espectrometria de masses.

A partir de la figura 71 cal destacar, d'acord amb el que es menciona més amunt, que l'espectre de la barreja de les dues substàncies mostra un singlet

RESULTATS I DISCUSSIÓ

que integra per a tres protons a aproximadament 6 ppm, que es correspon amb la protonació de l'amina primària de l'octadecilamina (figura 70, II). Conseqüentment, en aquest espectre no es detecta el protó de l'àcid esteàric.

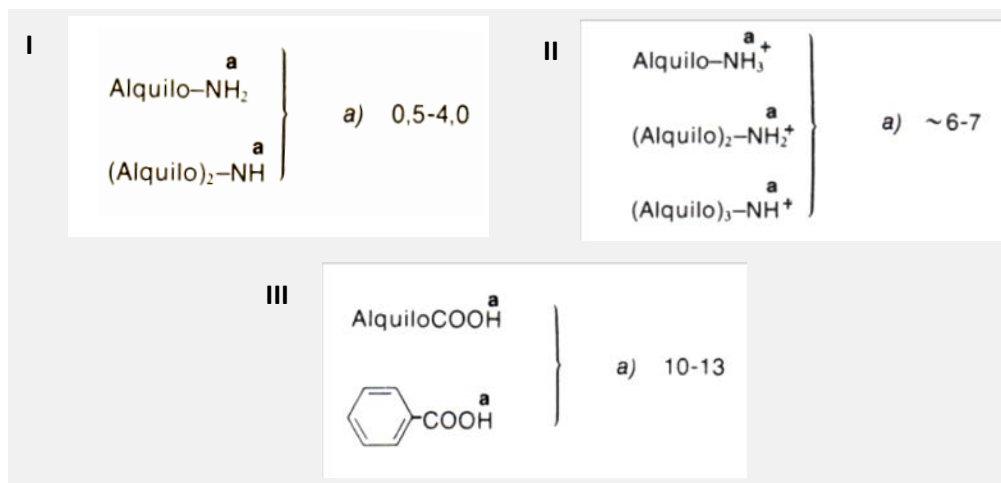


Figura 70. Desplaçaments químics (δ en ppm relatives a tetrametilsilà) de ^1H en amines alifàtiques (I), amines alifàtiques protonades (II) i àcids carboxílics alifàtics (III) (Pretsch et al. 1980).

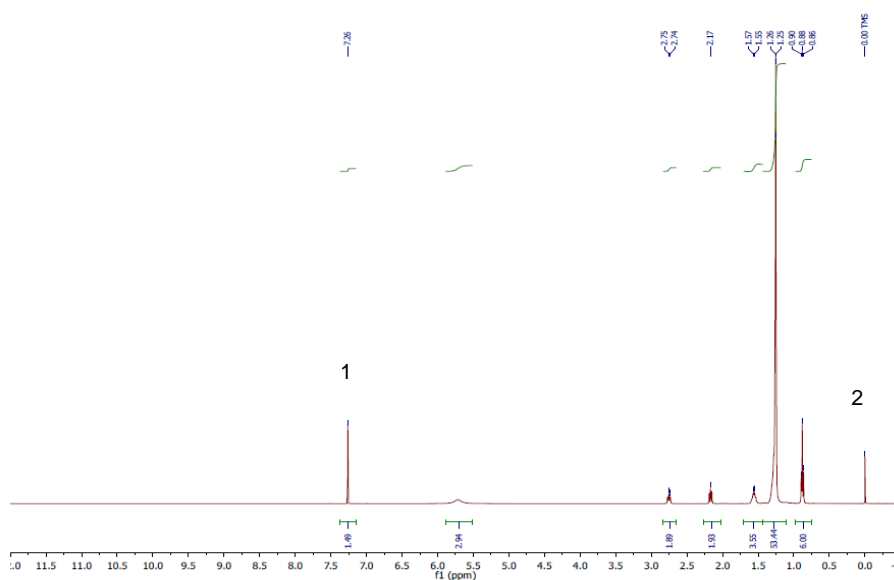


Figura 71. Espectre de ressonància magnètica nuclear de protó per a una barreja recristal·litzada d'àcid esteàric i octadecilamina. Apareixen identificats numèricament els singlets corresponents al cloroform deuterat utilitzat com a dissolvent (1) i al tetrametilsilà utilitzat com a patró intern (2).

Si s'analitza l'espectre de les dues substàncies per separat (figura 72), es demostra que, en el cas de l'àcid esteàric (figura 72, C) es detecta un singlet que integra per a un protó a aproximadament 11 ppm (figura 70, III). Per a l'octadecilamina, al tractar-se de la substància pura sense reaccionar amb l'àcid esteàric, no es detecta la protonació de l'amina (figura 72, B), que sí és detecta en la barreja (figura 72, A). En aquest cas, els protons del grup amino ressonen a un desplaçament químic similar al dels protons de la cadena alifàtica de la molècula (Figura 70, I).

En tots els espectres, s'identifiquen el cloroform deuterat (CDCl_3) emprat com a dissolvent, amb un desplaçament químic característic cap a 7,25 ppm, i el tetrametilsilà (Me_4Si), utilitzat com a patró intern i amb un desplaçament químic de 0 ppm.

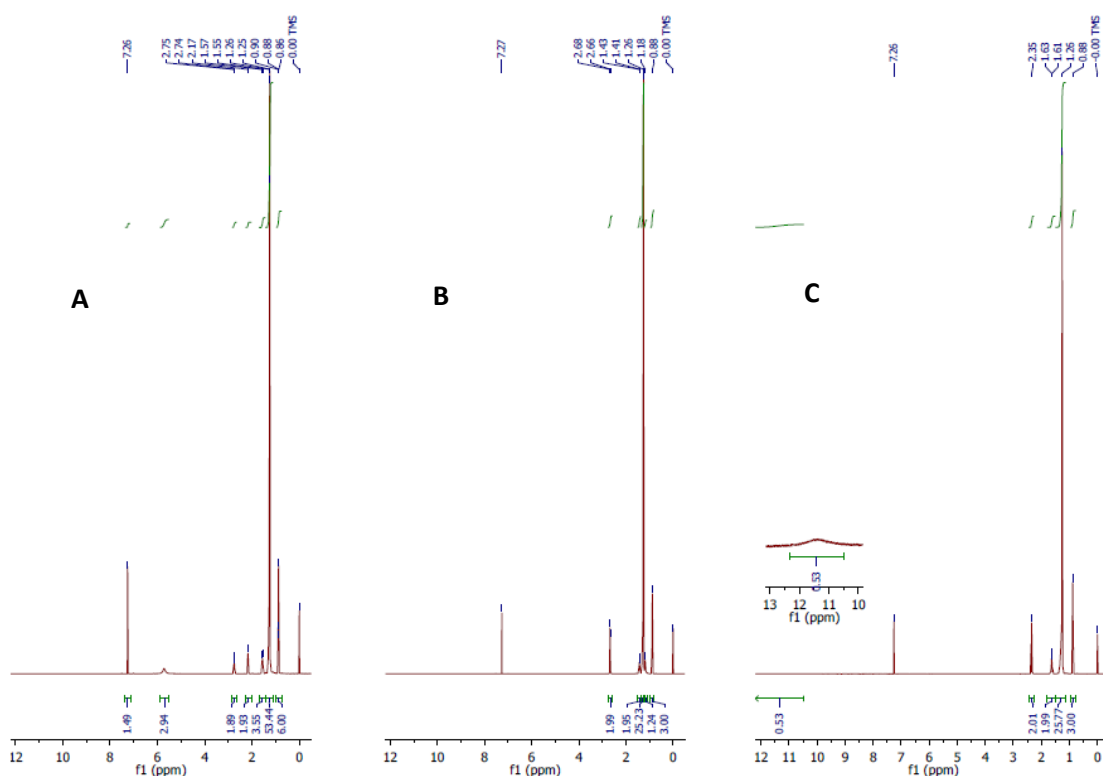


Figura 72. Espectres compilats de l'àcid esteàric (C), l'octadecilamina (B) i una barreja fosa recristal·litzada de les dues substàncies (A).

3.8 VISUALITZACIÓ DE cSLN PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TEM)

La microscòpia electrònica de transmissió permet la visualització de l'estructura de les nanopartícules lipídiques sòlides catióniques. Les imatges s'han obtingut a partir de cSLN provinents de la resuspensió d'un vial liofilitzat. A la figura 73 s'observen, a diferents escales, nanopartícules de diverses mides, dins de l'interval nanomètric, esfèriques i de contingut homogeni.

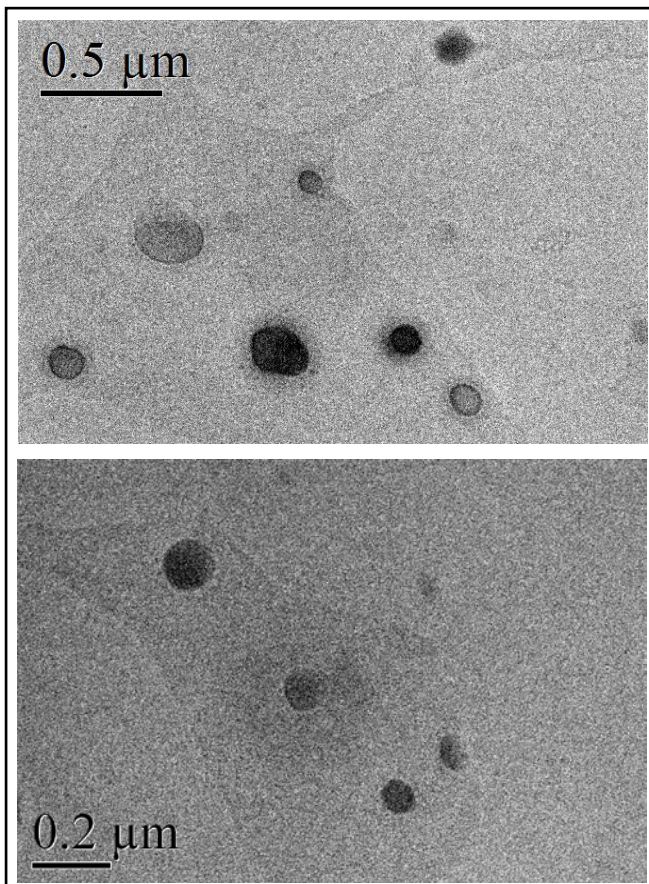


Figura 73. Micrografies realitzades amb microscopi electrònic de transmissió (TEM) de nanopartícules lipídiques sòlides catióniques.

3.9 VISUALITZACIÓ DE cSLN PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG (SEM)

La microscòpia electrònica de rastreig permet obtenir informació relativa a la superfície de les cSLN. En la figura 74 es pot observar la morfologia arrodonida de les nanopartícules. Es confirma que les seves dimensions es troben dins

l'interval de l'escala nanomètrica. Aquesta imatge s'obté a partir de cSLN reconstituïdes a partir d'una mostra liofilitzada.

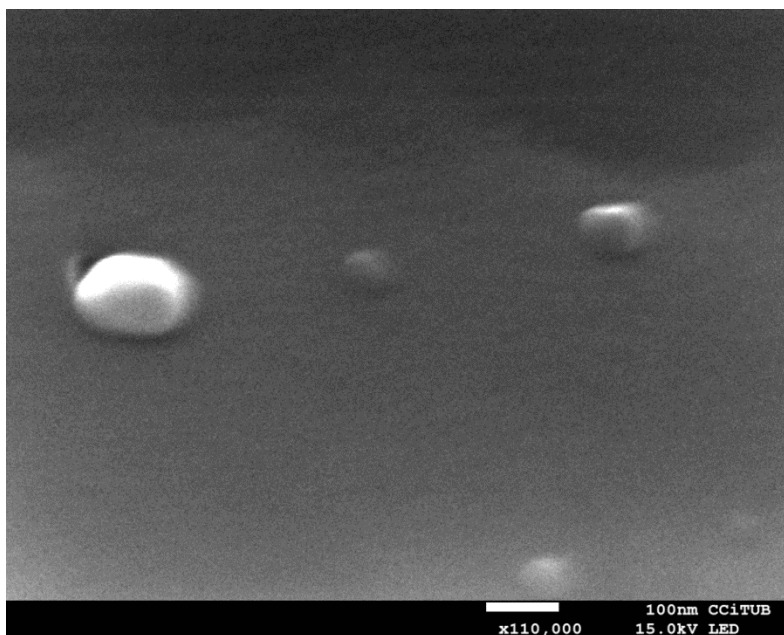


Figura 74. Micrografies realitzades amb microscopi electrònic rastreig d'emissió de camp (FE-SEM, *Field Emission Scanning Electronic Microscopy*) de nanopartícules lipídiques sòlides catióniques.

3.10 VISUALITZACIÓ DE CSLN PER MICROSCÒPIA DE FORÇA ATÒMICA (AFM)

La figura 75 mostra diverses imatges topogràfiques de microscòpia de força atòmica tant de cSLN aïllades (A), lipoplexos cSLN-pDNA en 2D (B) i 3D (C) i pDNA (D). El mètode de preparació de la mostra i les propietats exhibides per part de les cSLN no permeten la visualització de formes esfèriques, encara que les cSLN poden ser identificades. Pel que fa als lipoplexos, es pot observar l'estructura del pDNA en estat relaxat, amb el seu diàmetre típic d'aproximadament 2 nm.

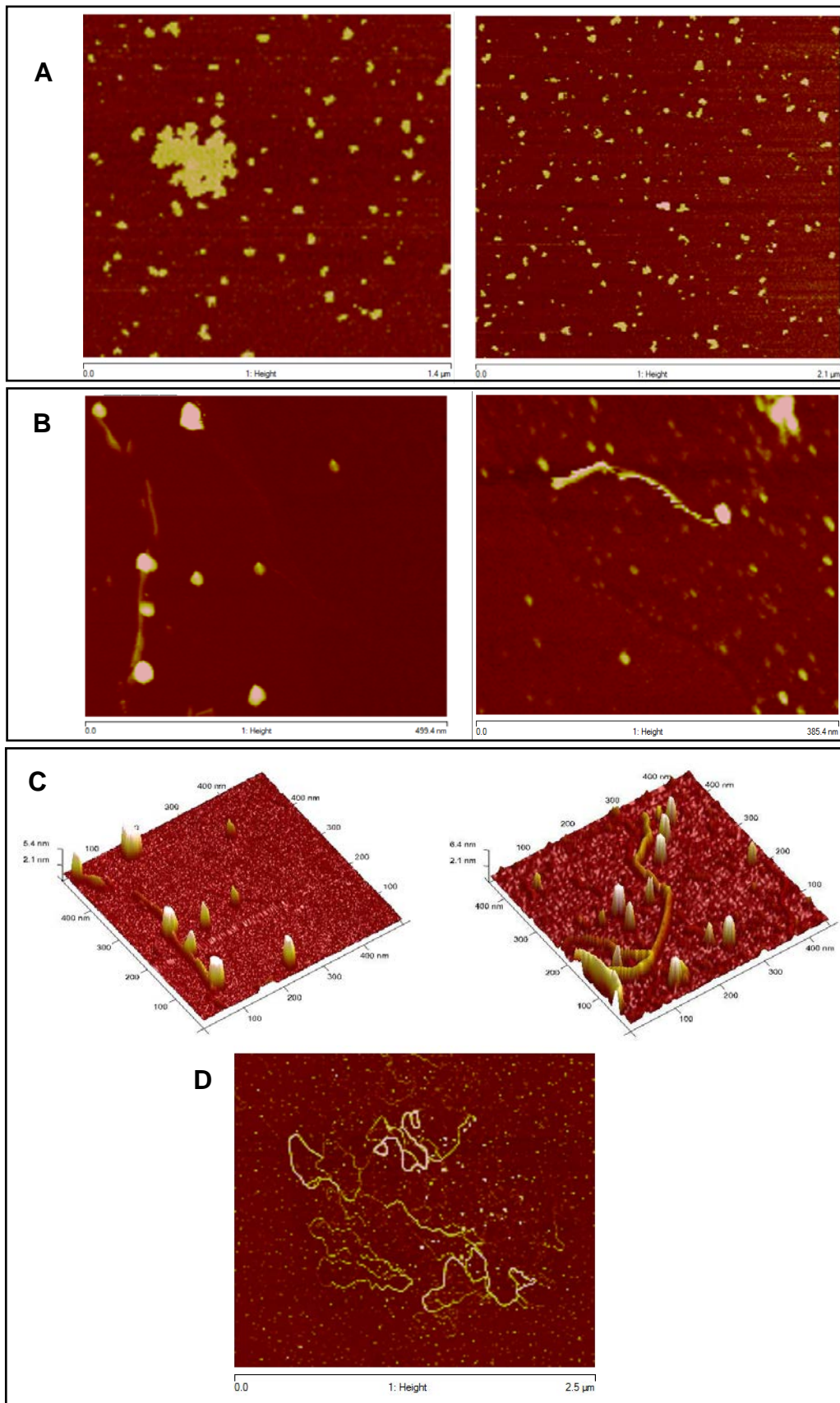


Figura 75. Imatges bidimensionals i tridimensionals de cSLN aïllades (A), lipoplexos cSLN:pDNA (B i C) i pDNA (D).

4. DETERMINACIÓ DE LES PROPIETATS NANOMECÀNIQUES (MÒDUL DE YOUNG) DE LES CSLN

La capacitat de deformació elàstica de les cSLN sintetitzades ve donada pel valor del mòdul de Young (en MPa) calculat a partir de les mesures realitzades per mitjà de microscòpia de força atòmica quantitativa.

Les cSLN demostren ser un sistema nanosestructurat amb propietats elàstiques.

Per a una mostra de 10 nanopartícules aïllades, les dades relatives a la mesura del mòdul de Young donen un valor mitjà de 191,4 MPa i una desviació estàndard de 70,3 MPa. Aquesta variabilitat es pot considerar alta enfront el valor mitjà que s'obté, però per altra banda entra dins de la normalitat si es té en compte la variabilitat a causa de la tècnica instrumental aplicada.

La figura 76 constitueix una imatge topogràfica a partir de la qual s'hi han identificat vàries cSLN, de les que s'ha calculat el mòdul de Young per a 4 nanopartícules aïllades. Els resultats obtinguts per a aquest paràmetre es troben detallats a la figura 77.

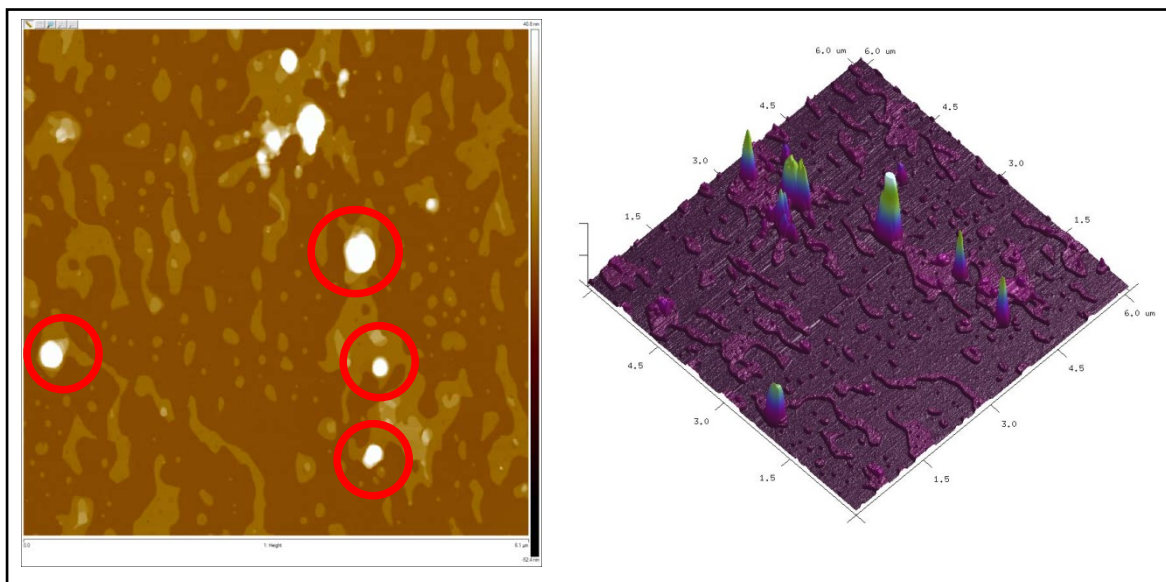
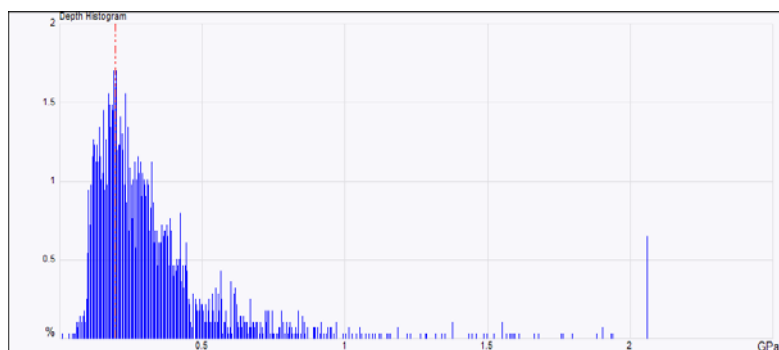
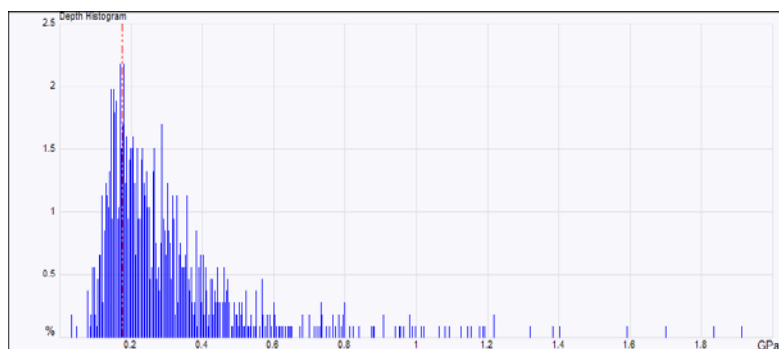


Figura 76. Topografia per AFM (6x6 micres, 512x512 píxels) de nanopartícules aïllades (esquerra) i vista en 3D de la mateixa imatge (dreta). S'ha calculat la deformació elàstica per a les nanopartícules encerclades.

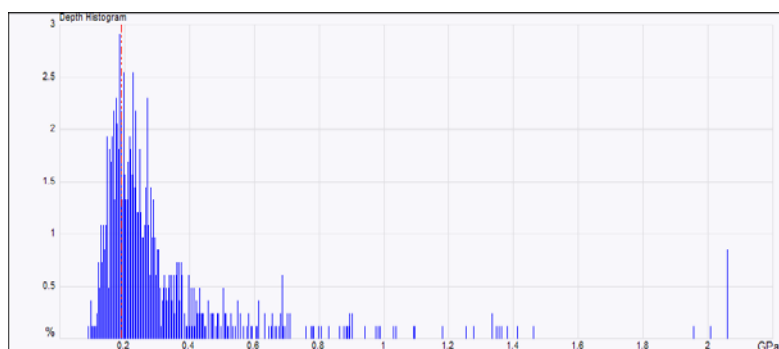
RESULTATS I DISCUSSIÓ



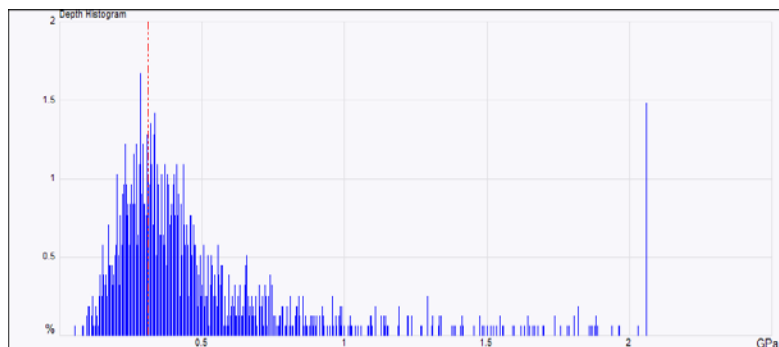
Mapa del mòdul de Young de la regió seleccionada. Valor mitjà: **194 MPa**



Mapa del mòdul de Young de la regió seleccionada. Valor mitjà: **175 MPa**



Mapa del mòdul de Young de la regió seleccionada. Valor mitjà: **191 MPa**



Mapa del mòdul de Young de la regió seleccionada. Valor mitjà: **309 MPa**

Figura 77. Mesures de deformació elàstica (calculada com a mòdul de Young) a partir de quatre nanopartícules aïllades (encerclades a la figura anterior).

El coneixement de les propietats nanomecàniques pot ser útil per establir una aproximació a la biosimilaritat en cas de poder-se demostrar que els valors d'elasticitat són similars als de les membranes cel·lulars i/o orgànuls cel·lulars. També facilita informació pel que fa a la capacitat de resistència física de les cSLN com a estructura i per tant la seva contribució a l'estabilitat des d'un punt de vista mecànic.

5. ESTABILITAT DE LA FORMULACIÓ DE cSLN A DIFERENTS TEMPERATURES DE CONSERVACIÓ

Els vials de cSLN acabades de sintetitzar s'analitzen quant a mida de partícula i potencial Z, durant 7 dies, amb els resultats que s'indiquen a la taula 17.

Dies	Diàmetre mitjà (nm)			Dies	Potencial Z (mV)		
	4 °C	25 °C	37 °C		4 °C	25 °C	37 °C
1	269	217	236	1	27,7	35,8	32,5
2	124	339	119	2	29,9	35,6	30,1
3	126	55194	113	3	27,1	24,0	31,6
4	237	40709	132	4	34,9	39,2	34,2
5	206	126742	121	5	38,6	37,0	35,2
6	65070	58070	122	6	34,2	43,7	40,2
7	86870	75887	282	7	29,9	31,6	27,3
Mitjana	21843	51023	161	Mitjana	31,7	35,3	33,0
SD	37507	44112	68	SD	4,2	6,2	4,1

Taula 17. Valors diaris, mitjana i desviació estàndard (SD) de la mida de partícula i potencial Z a diferents temperatures.

Els resultats es representen gràficament (figura 78), i mostren l'evolució d'aquesta formulació en les diferents temperatures en termes de mida de partícula (diàmetre mitjà en nm) i potencial superficial (potencial Z en mV). La mitjana i la desviació estàndard (taula 17) mostren que a 37 °C, aquestes nanopartícules pateixen la menor variació en mida de partícula i potencial Z.

Aquesta formulació de cSLN presenta un comportament tèrmic que resulta en un estat estable a 37 °C en comparació amb 25 °C i 4 °C, amb variacions discretes tant de la mida de partícula com del potencial Z. A aquesta temperatura la formulació és encara capaç durant una setmana de ser emprada per a la unió a àcids nucleics. No obstant això, la mida de partícula comença a augmentar el dia 7, juntament amb una petita disminució del valor de potencial Z. Donat que 37 °C correspon a la temperatura fisiològica a la que les cSLN serien administrades, aquestes dades han de considerar-se com un possible indicador de la biocompatibilitat, tot i que la influència d'altres variables com ara el comportament tèrmic després de la unió a àcids nucleics s'hauria d'avaluar en estudis posteriors.

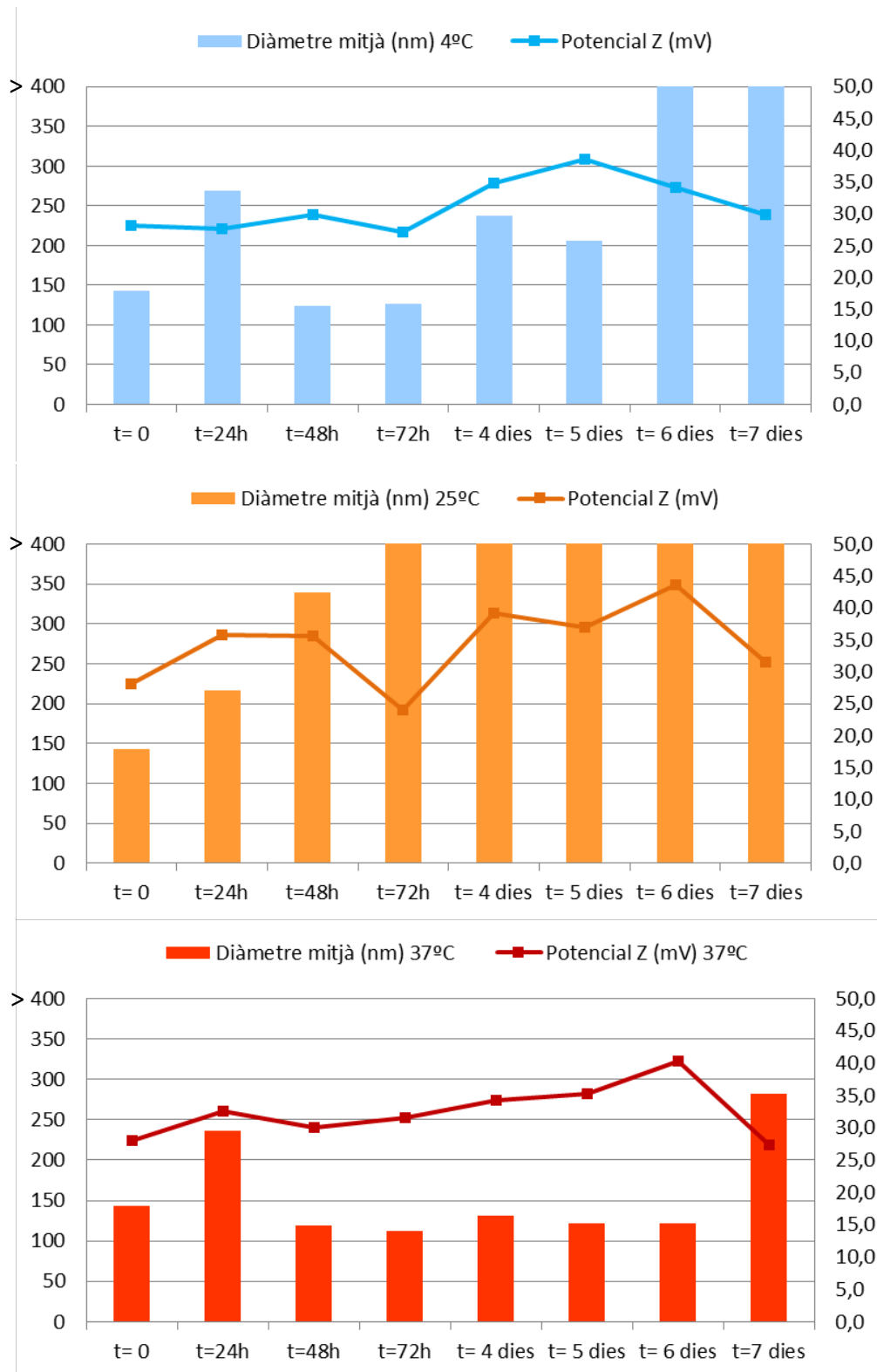


Figura 78. Representació gràfica de l'evolució dels valors de mida de partícula i potencial Z a diferents temperatures (4 °C, 25 °C i 37 °C) durant 7 dies.

6. ESTABILITAT DE LA FORMULACIÓ DE cSLN RECONSTITUÏDA A PARTIR DE PRODUCTE LIOFILITZAT

El procés de liofilització pot induir certs canvis en els sistemes nanoestructurats que poden traduir-se com un augment en la mida de partícula. Alguns dels assajos portats a terme amb la formulació de cSLN s'han fet a partir de producte liofilitzat reconstituït, pensat per al seu ús a molt curt termini, per la qual cosa cal avaluar si tant la mida de partícula com el potencial Z es troben dins d'uns límits acceptables per tal que les cSLN segueixin sent aptes per a l'ús previst.

Es realitzen mesures de mida de partícula i potencial Z a partir de vials amb cSLN liofilitzades, reconstituïts amb 3 ml d'aigua ultrapura, amb els resultats que s'observen a la taula 18.

Temps	Diàmetre mitjà superficial (D[3,2])	Potencial Z
	nm	mV
Abans 10 min	177	34,3
20 min	165	34,6
30 min	187	32,9
40 min	165	32,7
50 min	169	37,7
60 min	176	38,3
Valor mitjà	173	35,1
SD	8,5	2,4

Taula 18. Valors de mida de partícula i potencial Z a diferents temps després de la reconstitució de vials liofilitzats.

La mida de partícula resulta augmentada en referència a l'obtinguda a partir de cSLN acabades de sintetitzar. Si es prenen les dades dels primers 60 minuts, la mida mitjana de les cSLN és de 173 nm i el potencial Z de 35,1. Tot i l'augment detectat, però, tant la mida com el potencial Z mesurats es considera que

segueixen sent perfectament compatibles amb l'ús previst de la formulació fins a una hora després de la reconstitució del liofilitzat.

7. ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL PER DETERMINAR L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE cSLN A pDNA

La capacitat i l'establiment de la ràtio òptima d'unió a àcids nucleics de les cSLN optimitzades es porta a terme per mitjà d'un assaig de retardament en gel (electroforesi en gel d'agarosa), utilitzant el plasmidi pEFBOS-ECFP-T7-TCERG1 [591-1098].

En aquests experiments, es compara al mateix temps l'eficiència d'unió de les mostres de cSLN ressuspeses després d'un procés de liofilització en absència o presència de trehalosa al 5% com a crioprotector.

A la figura 79, es mostra el resultat d'eficiència d'unió al plasmidi pEFBOS-ECFP-T7-TCERG1 [591-1098] per a diferents quantitats de cSLN.

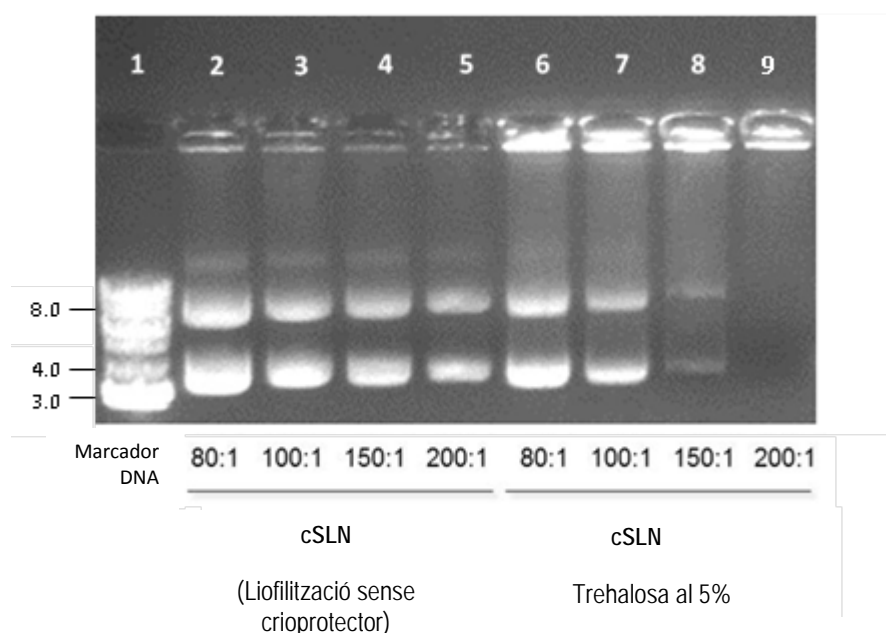


Figura 79. Proporcions de cSLN:pDNA utilitzades en l'assaig de retardament en gel (cSLN:pDNA p/p) per avaluar la capacitat d'unió a DNA. S'avalua l'eficiència d'unió de cSLN liofilitzades sense crioprotector (carrils 2-5) i amb crioprotector (carrils 6-9). Com a marcador de mida de DNA (carril 1, en parells de kilobases) s'utilitza una escala de DNA digerit (New England Biolabs).

Les cSLN liofilitzades en absència del crioprotector exhibeixen una baixa capacitat d'unió, d'acord amb la presència de DNA lliure en els gels, fins i tot amb l'augment de les proporcions del lípid catiónic, responsable de la unió a pDNA (Figura 79, carrils 2-5). A la figura 79 s'observa una alta eficiència en la unió a pDNA en mostres liofilitzades en presència del crioprotector. En aquestes mostres, s'aconsegueix un 100% d'unió amb la ràtio 200:1 (cSLN:pDNA) (Figura 79, carril 9). Les cSLN liofilitzades sense crioprotector no es redispersen completament. Aquesta redispersió incompleta pot causar que una part de la superfície potencial d'unió de les cSLN no quedi exposada per a la interacció iònica amb el DNA. D'altra banda, hi ha una altra raó que pot explicar la disminució en l'eficàcia d'unió: si la mostra no es dispersa bé a causa de l'absència de trehalosa, es pot esperar una menor quantitat de cSLN durant el mostreig, donat que es pot prendre una major quantitat d'aigua en relació amb les cSLN presents en aquesta mostra. En comparació, la solució obtinguda després de la redispersió de cSLN liofilitzades en presència de trehalosa és homogènia, completament opalescent i no mostra cap agregat visible. Sota aquestes condicions, s'obté una distribució uniforme de cSLN a la mostra. Aquest fet, doncs, pot afavorir una capacitat d'unió al DNA més gran que en cSLN liofilitzades sense el crioprotector. Aquesta situació es confirma i s'observa clarament en el resultat de l'assaig de retardament en gel de la figura 80, quan es comparen els carrils 3 i 5. Cal tenir en compte la influència d'altres forces electrostàtiques que poden actuar i afavorir la capacitat d'unió de cSLN a pDNA, com ara forces de Van der Waals entre les zones no polars de les molècules implicades. També es pot donar la possibilitat que, en absència de trehalosa, les cSLN no resisteixin prou bé el procés de liofilització i es desestructurin, perdent en conseqüència la capacitat d'unió a pDNA.

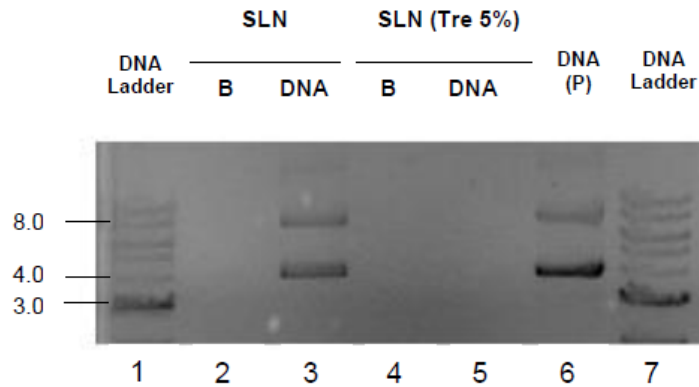


Figura 80. Assaig de retardament en gel de cSLN:pDNA (200:1 p/p). Es compara la capacitat d'unió de les cSLN liofilitzades amb i sense trehalosa al 5% com a crioprotector. B significa blanc (carril que conté només cSLN). La fila indicada com a DNA (P) es carrega únicament amb el plasmidi, i constitueix el control positiu. Com a marcador de mida de DNA (carrils 1 i 7, en parells de kilobases) s'utilitza una escala (*ladder*) de DNA digerit (New England Biolabs).

7.1 ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL PER AVALUAR LA INFLUÈNCIA DE LA MIDA I TIPUS DE PLASMIDI EN L'EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE CSLN A PDNA

S'avalua l'eficiència de càrrega a la relació 200:1 p/p (cSLN:pDNA) de dos plasmidis diferents quant a nombre de bases, i que contenen com a insert el fragment carboxi-terminal de TCERG1 [591-1098].

En funció dels resultats observats a la figura 81, es demostra que tant el plasmidi pEFBOS-T7-TCERG1 [591-1098] com el pEFBOS-GFP-T7-TCERG1 [591-1098] s'uneixen a cSLN amb una eficiència del 100% en la relació 200:1 (cSLN:DNA) p/p. Per tant, la mida quant a parells de bases no influeix en la capacitat d'unió.

Els carrils corresponents a cSLN:TCERG1 i cSLN:GFP-TCERG1 no presenten bandes, fet que suposa que el pDNA carregat ha quedat totalment retingut en el pou junt amb les cSLN per efecte de la interacció electrostàtica.

Les dues bandes que s'observen al carril TCERG1 corresponen a dues possibles conformacions del plasmidi a l'espai, que es manifesten en la diferent capacitat de migració en el gel d'agarosa.

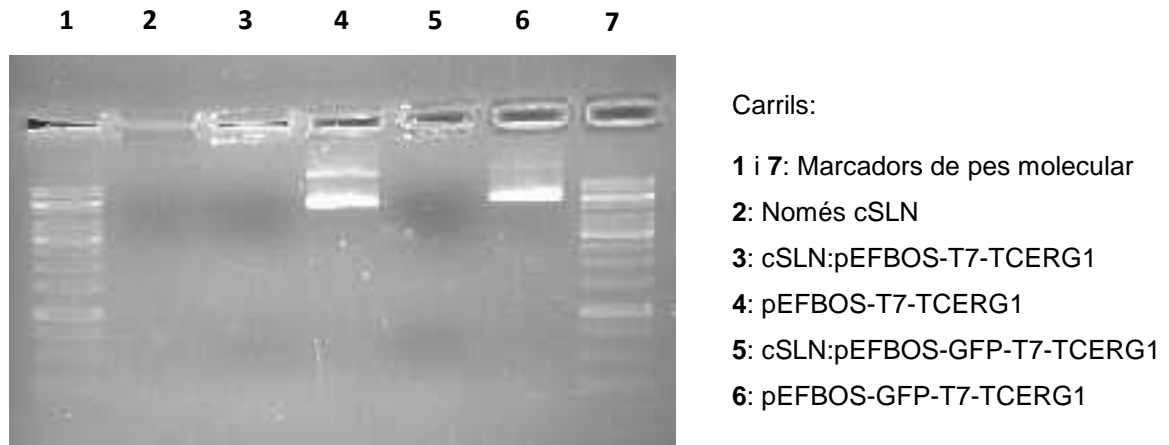


Figura 81. Electroforesi en gel d'agarosa per a l'avaluació de l'eficiència d'unió de pDNA a cSLN en funció de la mida del plasmidi.

Al mateix temps s'avalua l'eficiència d'unió per a altres dues construccions de pDNA que contenen inserts diferents, a la relació òptima cSLN:pDNA (200:1 p/p). A la figura 82 es mostra el resultat de l'assaig de retardament en gel per a aquests plasmidis.

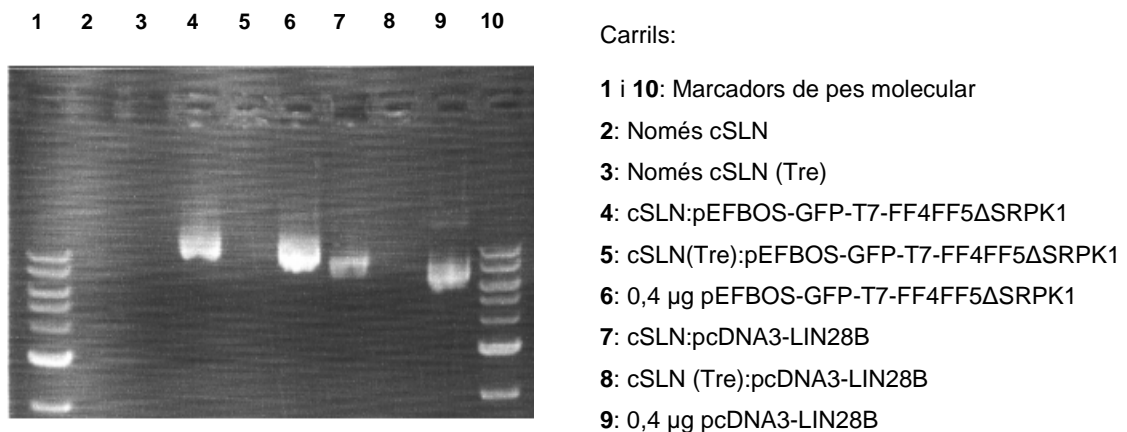


Figura 82. Assaig de retardament en gel pels plasmidis pEFBOS-GFP-T7-FF4FF5ΔSRPK1 (carrils 4, 5 i 6) i pcDNA3-LIN28B (carrils 7, 8 i 9).

A partir d'aquests resultats, es pot confirmar que els plasmidis pEFBOS-GFP-T7-FF4FF5ΔSRPK1 i pcDNA3-LIN28B també mostren una eficiència del 100% a la mateixa ràtio, sempre i quan els assajos es realitzin a partir de cSLN liofilitzades en presència de trehalosa.

8. ESTABILITAT DE LES CSLN I MANTENIMENT DEL POTENCIAL Z DE LES CSLN EN FUNCIÓ DEL MEDI DE CULTIU CEL·LULAR

A partir de vials liofilitzats, es porten a terme mesures de mida de partícula i potencial Z posteriorment a la seva reconstitució, fent ús de diferents composicions de medis de cultiu DMEM com a dispersant enlloc d'aigua ultrapura (taula 19), per tal de establir la possible influència en l'estabilitat dels paràmetres mesurats.

Medi de cultiu	Diàmetre mitjà (D[3,2]) (nm)	Potencial Z (mV)
DMEM baix en glucosa + Aa NE + Glu	295	3,49
DMEM baix en glucosa + FBS + P/S + Aa NE + Glu	519	-5,60
DMEM alt en glucosa + FBS + P/S + Higromicina	183	-5,38
DMEM alt en glucosa	280	4,17
CONTROL (Redispersió amb aigua ultrapura)	127	36,6

Taula 19. Valors de mida de partícula (en diàmetre mitjà) i potencial Z per a cSLN reconstituïdes en medis de cultiu de diferent composició. L'última filera conté dades del control.

A la vista dels resultats obtinguts, el medi de cultiu influeix de forma notable pel que fa als dos paràmetres. Els components del medi provoquen canvis en el diàmetre mitjà mesurat, en alguns casos afavorint la formació d'agregats que fan augmentar el valor mitjà de la mida de partícula. Per al potencial Z, tots els medis provoquen una disminució encara més gran en relació amb l'observada per a la mida de partícula respecte de les mesures efectuades sobre el control.

Fins i tot s'observen valors negatius per a aquest paràmetre. Tots els valors fan inviabilitats a les cSLN per a la seva unió a àcids nucleics, pel fet que la càrrega positiva desapareix o és marcadament insuficient. La força iònica dels medis de cultiu es postula com a responsable d'aquesta disminució en el potencial Z, pel fet que les càrregues positives de la superfície de les cSLN es veu contrarestatada per la unió a aquestes d'ions negatius presents al medi.

En funció d'aquests resultats, s'opta per seguir fent créixer el cultiu en medis enriquits, però en el moment immediatament previ a la transfecció, es substitueix per un medi no enriquit. D'aquesta forma es minimitza la possibilitat que les cSLN puguin veure's afectades pels ions presents en el medi. De fet, les cSLN es troben ja unides a àcids nucleics en el moment de la transfecció, així que caldria una elevada força iònica per desplaçar la unió d'aquests per part d'ions presents al medi.

9. ESTUDIS DE VIABILITAT CEL·LULAR

La viabilitat cel·lular es representa com a cèl·lules vives respecte del total de cèl·lules visualitzades. En la línia HEK293T (figura 83, gràfic superior) no s'observa cap efecte tòxic de les cSLN amb un volum d'assaig de 25 µl en l'assaig típic de viabilitat cel·lular (figura 84), i no es detecten canvis morfològics cel·lulars (dades no mostrades) en comparació amb el cultiu sense tractar després del temps d'incubació corresponent. A partir d'un volum de 50 µl de cSLN, la viabilitat comença a disminuir, per caure fins el 20% quan el volum assajat és de 100 µl de cSLN.

En la línia HeLa (figura 83, gràfic inferior), s'observa una lleugera disminució de la viabilitat cel·lular a mesura que s'augmenta la concentració de cSLN en comparació amb el control negatiu (blanc). Per a 25 µl de cSLN la mortalitat representa el 7%, mentre que quan el volum augmenta fins a 100 µl de cSLN es manté en el 30%.

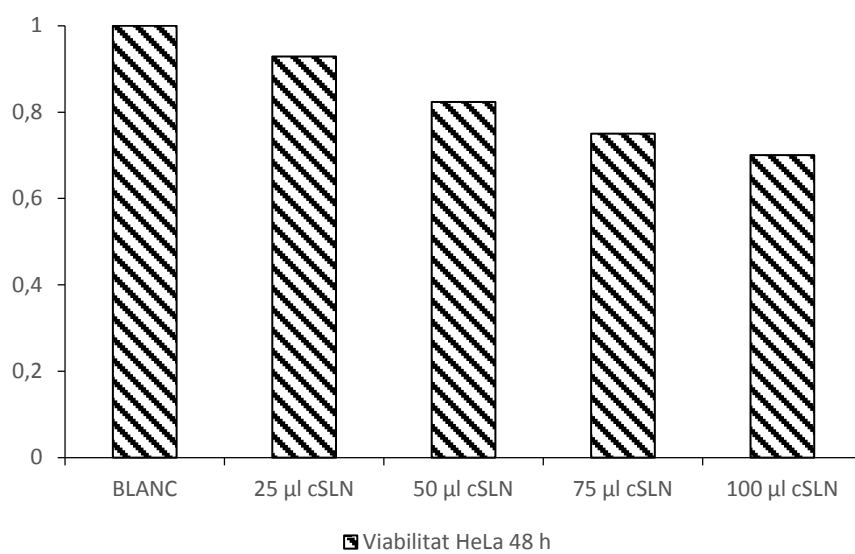


Figura 83. Gràfics en què es mostra la viabilitat (en tant per 1) a 48h de les línies cel·lulars HEK293T (superior) i HeLa (inferior) enfront diferents volums de cSLN.

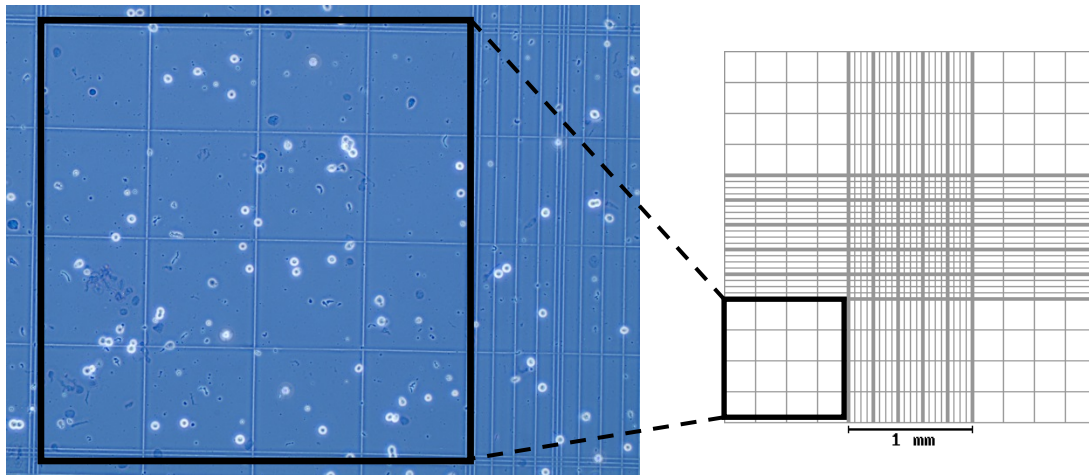


Figura 84. Encerclada en negre, àrea visualitzada en el microscopi de camp clar a partir de la qual es realitza el comptatge de cèl·lules vives (blanques amb el nucli blau) i mortes (blau fosc) sobre una cambra de Neubauer. La imatge correspon al quadrant inferior esquerra d'una mostra control de cèl·lules HEK293T.

10. TRANSFECCIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS HEK293T I HELA MITJANÇANT LIPOPLEXOS CSLN:PDNA

En l'estudi de la capacitat de transfecció es realitza en paral·lel un assaig d'eficiència de càrrega del plasmidi pEFBOS-T7-TCERG1 [1-1098] amb rèpliques de les barreges utilitzades en la transfecció. Es carreguen tres replicats idèntics: LP1, LP2 i LP3 (figura 85).

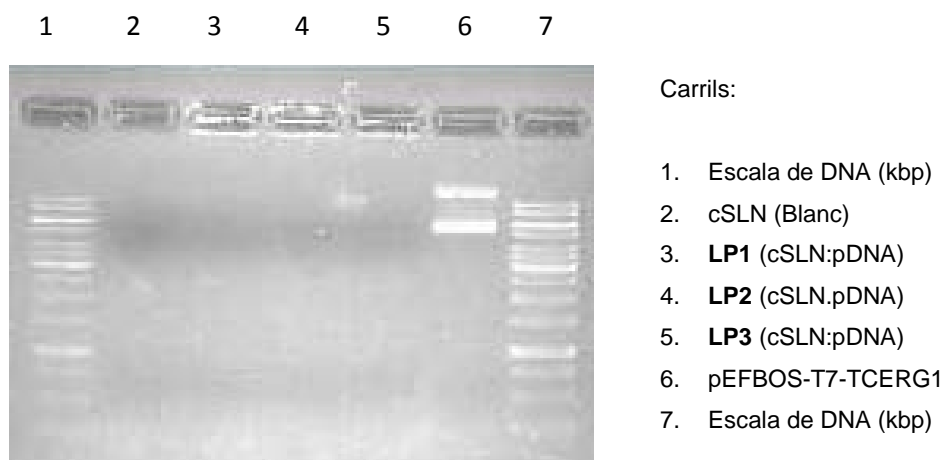


Figura 85. Electroforesi en gel d'agarosa de lipoplexos cSLN:pDNA.

A partir de l'assaig de retardament en gel es confirma que l'eficiència de càrrega dels lipoplexos que s'utilitzaran d'immediat en l'assaig de transfecció és del 100%, a la ràtio 200:1 p/p (cSLN:pDNA). A cap dels carrils carregats amb lipoplexos cSLN:pDNA s'observa cap banda, pel que es pot concloure que tot el DNA carregat en els pous és retingut en aquests mitjançant interaccions electrostàtiques per les cSLN.

L'eficiència de transfecció dels lipoplexos cSLN:pDNA s'avalua indirectament a través de l'anàlisi d'expressió proteica del gen TCERG1 inserit al plasmidi, per mitjà de la tècnica de *Western-Blot*. Si el pDNA ha estat transfectat, s'espera l'expressió del factor de transcripció TCERG1 (figures 86 i 87).

En la fase de detecció de la proteïna, l'anticòs anti-CDK9 és utilitzat com a control de càrrega, per tal d'assegurar la uniformitat en la quantitat de mostra carregada a cada carril i que, per tant, les diferències en la intensitat de les bandes a la part superior del gel (bandes detectades amb anticòs anti-T7) són resultat del diferent nivell proteic de TCERG1 i no a causa de variacions en la quantitat de mostra carregada a cada carril.

L'anticòs anti-T7 detecta l'expressió de l'epítop T7 unit a TCERG1 del plasmidi. Malgrat això, en el gel apareixen algunes bandes no relacionades amb l'expressió de TCERG1 al no correspondre's amb un pes molecular de 150 KDa. Aquestes bandes s'originen a causa d'un cert grau d'inespecificitat de l'anticòs (senyals de fons), que a més de reconèixer l'epítop T7 és capaç de reconèixer altres seqüències aminoacídiques no vinculades amb TCERG1.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Carrils:

1. *Mock* (Només cèl·lules. HEK293T a la figura 86 i Hela a la figura 87)
2. Només cSLN
3. 2 hores post-transfecció
4. 4 hores post-transfecció
5. 6 hores post-transfecció
6. Transfecció amb fosfat càlcic

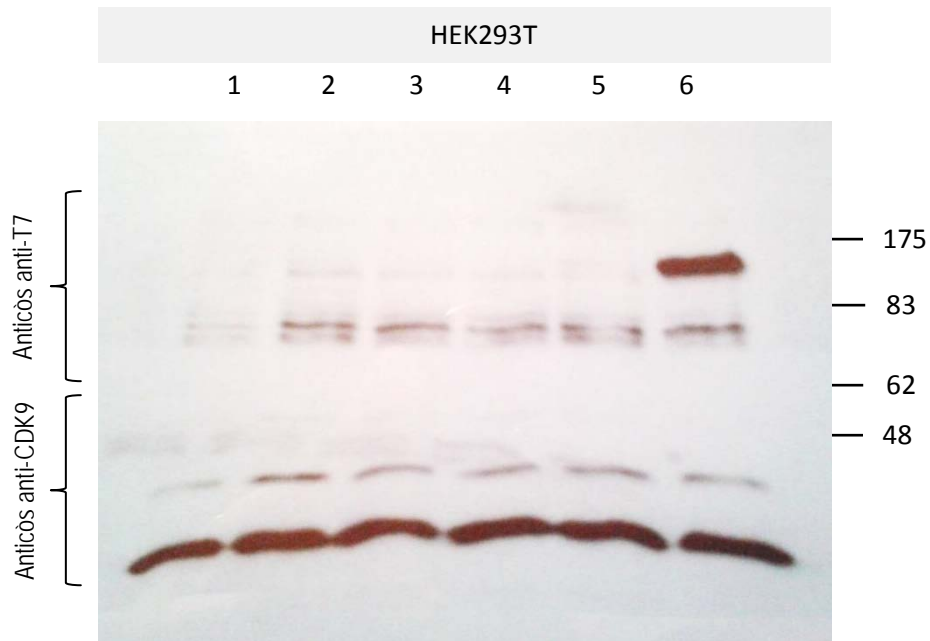


Figura 86. La banda fosca a la part superior dreta correspon a la sobre-expressió de TCERG1 (pes molecular de 150 kDa) en cèl·lules HEK293T transfectades amb fosfat càlcic. Les bandes a la part més inferior corresponen a l'expressió de CDK9. La resta de senyals són a causa de la inespecificitat dels anticossos. La numeració a la dreta correspon a kDa).

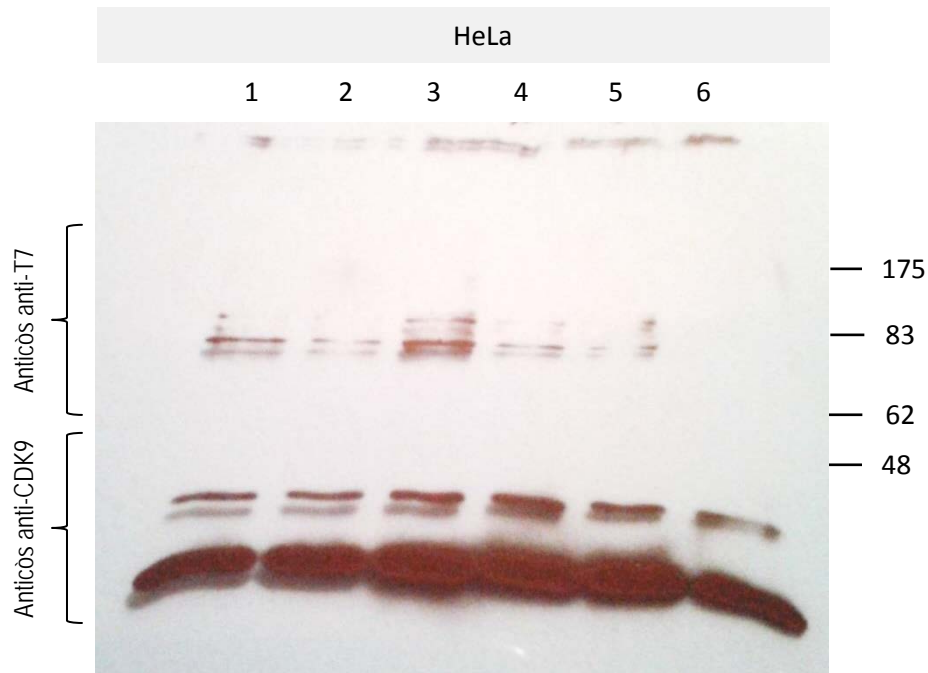


Figura 87. La banda corresponent a TCERG1 no apareix a 150 KDa al no existir sobre-expressió en HeLa. Les bandes a la part més inferior corresponen a l'expressió de CDK9. La resta de senyals apareixen a causa de la inespecificitat dels anticossos.

A partir de l'anàlisi *Western-Blot* (figures 86 i 87), i si es té en compte que TCERG1 apareix a 150 KDa, s'observa que la línia cel·lular HEK293T sobre-expressa TCERG1 únicament quan s'utilitza fosfat càlcic com a agent de transfecció, però no hi ha sobre-expressió amb cSLN. La línia cel·lular HeLa no sobre-expressa TCERG1 ni amb cSLN ni fosfat càlcic com a agents de transfecció. Aquestes dades confirmen que TCERG1 no pot ser sobre-expressat en aquest tipus cel·lular (dades no publicades).

La no sobre-expressió de TCERG1 en HEK293T per mitjà de cSLN com a agent de transfecció derivada de la interpretació de l'anàlisi *Western-Blot* pot originar-se per diverses causes:

- Els lipoplexos cSLN:pDNA no han aconseguit transfectar la línia cel·lular HEK293T.
- Els lipoplexos han aconseguit transfectar les cèl·lules però el pDNA no ha estat capaç d'alliberar-se de les cSLN per arribar íntegre al nucli per iniciar la transcripció i posterior traducció a TCERG1 en el citoplasma.

Únicament a partir del *Western-blotting* no és possible determinar si la causa de la no sobre-expressió és alguna de les mencionades anteriorment.

10.1 TRANSFECCIÓ DEL PLASMIDI NF-KB-C-FOS-LUC MITJANÇANT CSLN EN LA LÍNIA HEK293T

La línia cel·lular HEK293T és transfecta amb el plasmidi NF-KB-c-fos-Luc, que conté Luc com a gen reporter. Si el plasmidi transfecta les cèl·lules i aconsegueix expressar-se, la luciferasa és capaç de transformar, en presència d'ATP, el substrat luciferina en oxiluciferina excitada, que emet un fotó de llum i torna al seu estat fonamental.

La bioluminescència generada a partir dels fotons emesos és mesurada, i esdevé un reflex de la quantitat de l'enzim luciferasa expressat.

S'analitzen diferents quantitats de plasmidi transfectat amb 15 µl d'una suspensió de cSLN, i es compara amb la transfecció del plasmidi amb fosfat càlcic.

A la figura 88, es mostren els resultats de luciferasa expressada (en RLU, *relative light units*) en funció de diferents quantitats de plasmidi transfectat amb cSLN. Comparativament, l'expressió de luciferasa és major, per a les mateixes quantitats de plasmidi, quan s'utilitza fosfat càlcic (FC) com a agent de transfecció (figura 89).

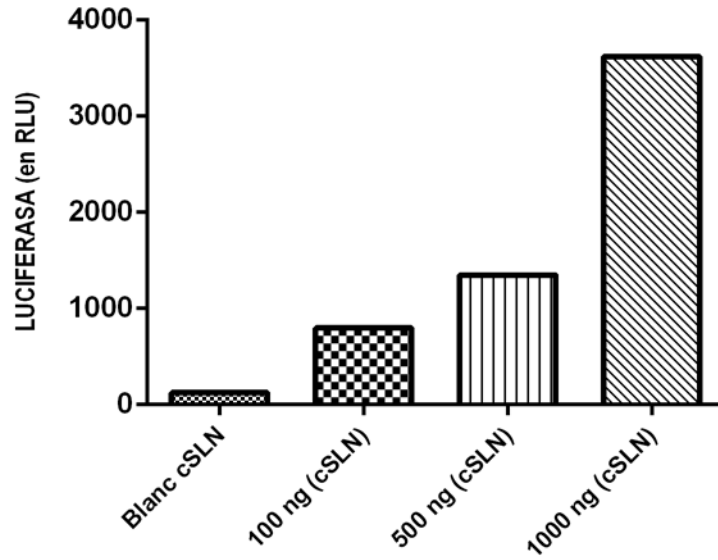


Figura 88. Assaig de bioluminescència emesa per conversió de luciferina a partir de l'enzim luciferasa i ATP, a partir de diferents quantitats de DNA plasmídic transfectat (en ng) amb cSLN.

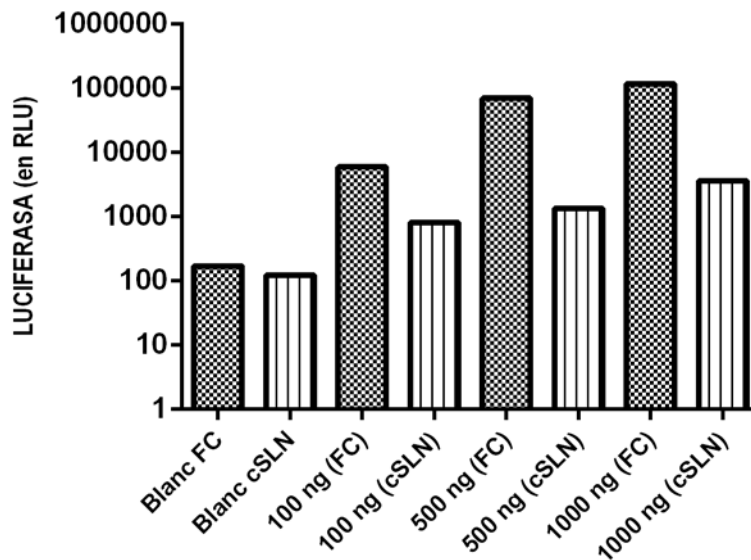


Figura 89. Assaig de bioluminescència emesa (en escala logarítmica per reduir els valors a un interval més fàcilment interpretable) per conversió de luciferina a partir de l'enzim luciferasa i ATP, a partir de diferents quantitats de plasmídic transfectat (en ng), tant amb fosfat càlcic (FC) com amb cSLN.

Aquesta diferència en l'eficiència de transfecció entre fosfat càlcic i cSLN es pot evidenciar encara millor en la figura 90. L'eficiència de transfecció del fosfat càlcic, entesa com a quantitat de bioluminescència emesa, és notablement major que l'obtinguda amb l'ús de les cSLN, inclús quan s'augmenta la quantitat de plasmidi fins a 10 vegades més (columna 4).

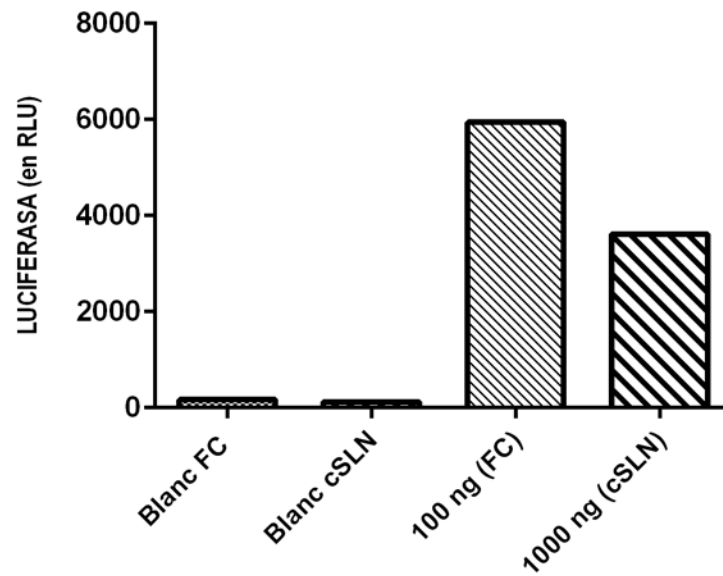


Figura 90. Comparativa de bioluminescència emesa per conversió de luciferina a partir de l'enzim luciferasa i ATP, per a diferents quantitats tant de plasmidi com d'agent de transfecció.

En qualsevol cas, es demostra que les cSLN tenen capacitat de transfectar DNA plasmídic i que aquest és capaç d'arribar al nucli cel·lular per ser transcrit, i posteriorment traduït al citoplasma de la cèl·lula.

11. EFICIÈNCIA D'UNIÓ DE CSLN A siRNA MITJANÇANT ASSAIG DE RETARDAMENT EN GEL

De forma anàloga al pDNA, per a l'oligonucleòtid constituït per siRNA avalua l'eficiència de càrrega per mitjà d'un assaig de retardament en gel (figura 91).

A un volum fix de siRNA (6 μ l) s'hi afegeixen diferents volums d'una suspensió de cSLN per tal d'establir la relació òptima dels dos components que permet una retenció del 100% del siRNA per part de les cSLN.

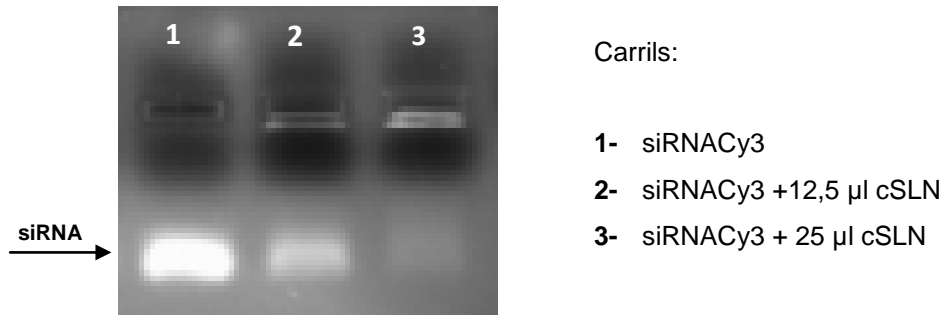


Figura 91. Electroforesi en gel d'agarosa i capacitat d'unió de cSLN a siRNA a diferents ràtios.

A partir de l'assaig de retardament en gel, es determina que amb un volum de 25 μ l de cSLN s'aconsegueix la unió del 100% de 6 μ l d'una solució de siRNA.

11.1 TRANSFECCIÓ DE HEK293T AMB LIPOPLEXOS CSLN:siRNA I VISUALITZACIÓ PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA CONFOCAL

En aquest cas, amb la microscòpia confocal els nuclis cel·lulars s'observen en color blau (tinció DAPI). A través del canal vermell s'observen punts que corresponen al siRNA marcat amb el fluoròfor Cy3. Com a control de transfecció s'utilitza lipofectamina. Paral·lelament, es realitza un assaig per tal de comprovar que aquest agent de transfecció funciona correctament i que les cèl·lules transfectades augmenten amb el temps d'exposició a l'agent (figura 92).

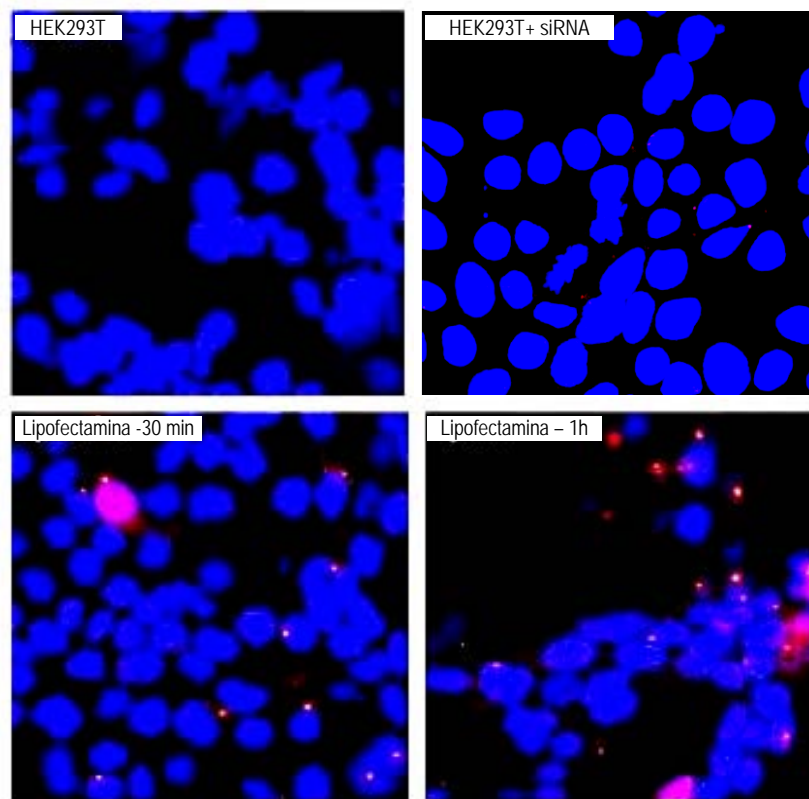


Figura 92. Assaig de transfecció amb lipofectamina a temps curts (30 minuts -1 hora).

L'assaig realitzat amb control de lipofectamina (el volum afegit és de 2 μ l) mostra que el siRNA es troba a les cèl·lules, en més quantitat al cap d'una hora que als 30 minuts. Aquest assaig es realitza per comprovar prèviament que el siRNA és capaç de transfectar aquestes cèl·lules utilitzant un agent de transfecció conegut.

A continuació, es realitza un assaig de transfecció utilitzant cSLN. Es testen tres volums diferents de cSLN (5, 7,5 i 10 μ l), per tal d'analitzar si a nivell de transfecció s'observen diferències en aquest sentit. La durada del temps de transfecció és de 2 hores. S'han hagut de descartar assajos amb volums majors en experiments previs, en què s'ha vist afectada l'adhesió de les cèl·lules als pouets. Un altre factor addicional implicat en la modificació de la viabilitat cel·lular en presència de cSLN:siRNA pot haver estat el procés de fixació de les cèl·lules per a la seva observació per microscopi confocal.

Les imatges obtingudes per microscòpia confocal després de realitzar la transfecció cel·lular amb cSLN:siRNA, sembrant diferents volums de cSLN i deixant incubar durant 2 hores es mostren a la figura 93.

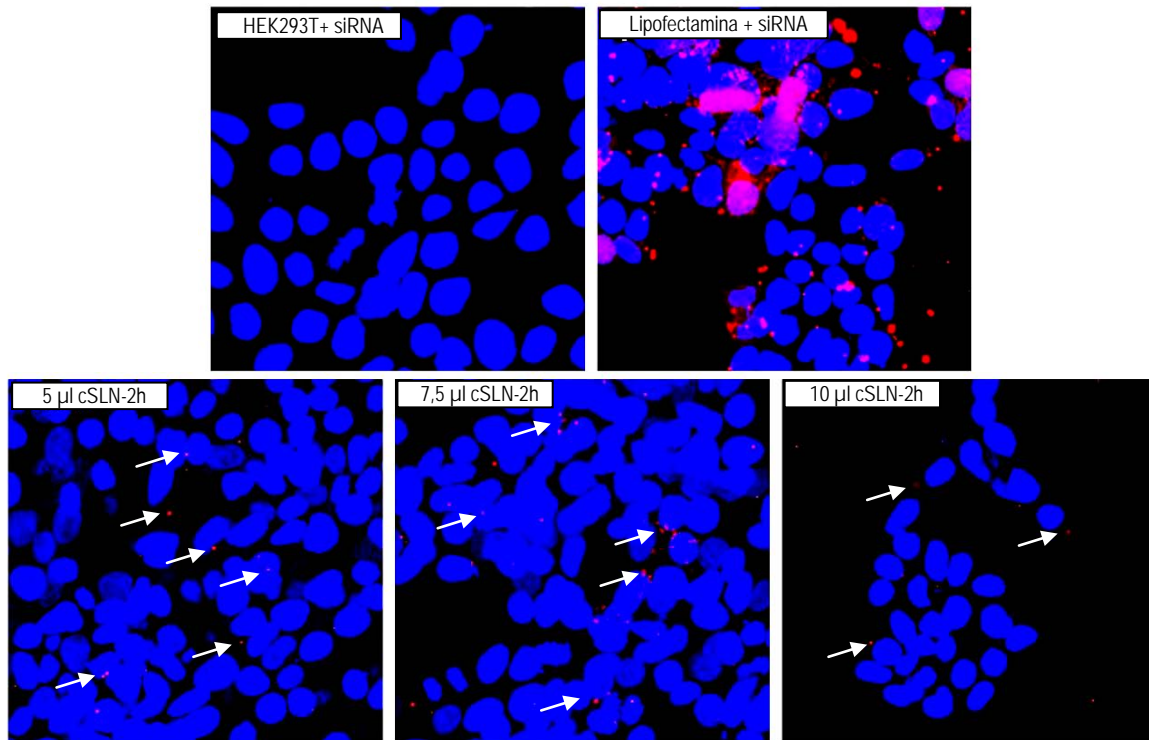


Figura 93. Incubació de cèl·lules HEK293T utilitzant diferents volums de cSLN. Les imatges de la fila superior corresponen al controls de cèl·lules HEK293T amb siRNA i HEK293T amb siRNA juntament amb lipofectamina com a agent de transfecció. A la fila inferior, resultats de l'assaig de transfecció portat a terme amb 5, 7,5 i 10 µl de cSLN durant 2 hores. Les fletxes blanques indiquen algunes de les senyals emeses des de les cèl·lules pel siRNA transfectat amb cSLN.

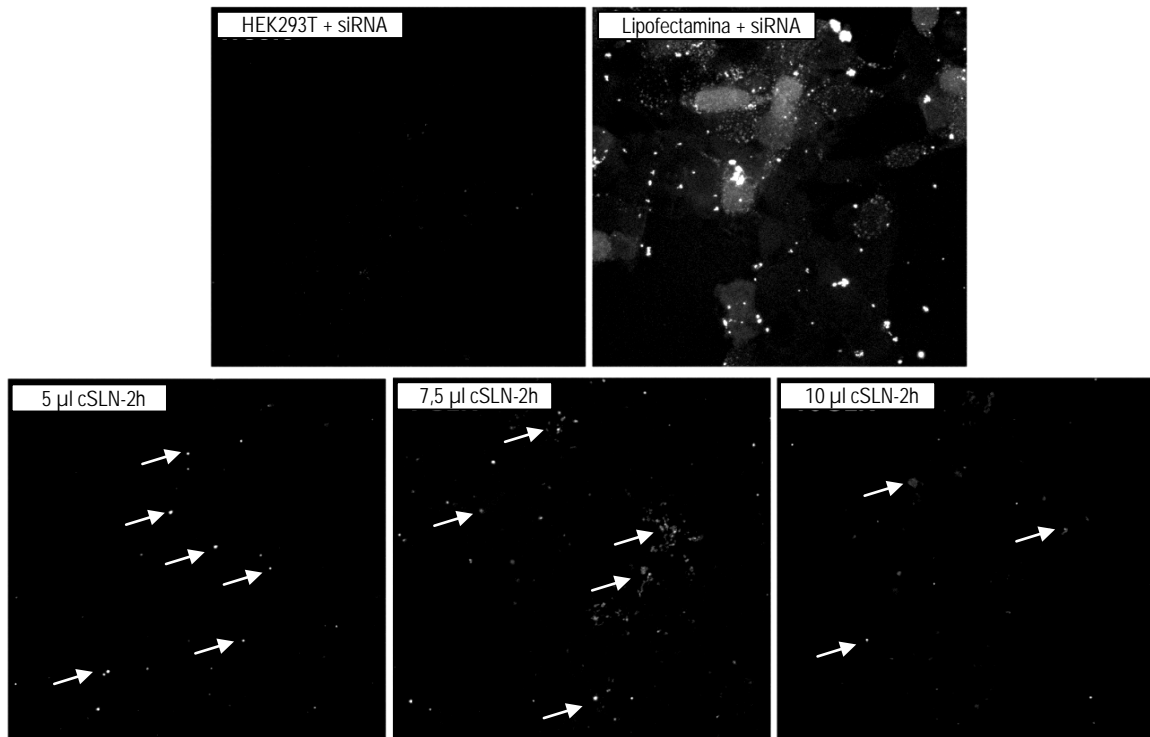


Figura 94. Incubació de cèl·lules HEK293T utilitzant diferents volums de cSLN (Els controls, volums i temps són els mateixos que a la figura 93). Es visualitza únicament la senyal corresponent al fluoròfor Cy3 unit a siRNA, en forma de senyal sobre el fons negre. Les fletxes indiquen alguns dels punts corresponents a siRNA.

La visualització de les mostres amb el canal vermell permet diferenciar més clarament i de forma exclusiva la senyal emesa pel fluoròfor Cy3 (figura 94). Es pot observar que en el control de HEK293T i siRNA (sense agent de transfecció) pràcticament no es visualitza res amb el canal vermell. Aquest fet és indicatiu de que no es produeix transfecció detectable del siRNA per sí sol. En el control amb lipofectamina sí s'observen cúmuls de siRNA. Inclús es poden observar cúmuls que co-localitzen amb el nuclis.

En relació a les cèl·lules en què s'han utilitzat com a agent de transfecció les cSLN, el siRNA ja es pot visualitzar en forma de senyal única i homogènia quan s'utilitza un volum de 5 µl de cSLN. La major quantitat de siRNA s'observa amb 7,5 µl de cSLN, un cop es deixa transcórrer el temps màxim fixat per a l'assaig,

és a dir, 2 hores. En canvi, quan el volum addicionat al pou de la placa és de 10 µl, deixen d'observar-se cúmuls i, a més, les cèl·lules es desenganxen de la placa amb la tinció DAPI. Molt possiblement es produeix una inducció de la toxicitat cel·lular o bé en aquestes condicions les cèl·lules no resisteixen bé el procés de fixació.

11.2 TRANSFECCIÓ DE HELA AMB LIPOPLEXOS cSLN:siRNA I VISUALITZACIÓ PER MITJÀ DE MICROSCÒPIA CONFOCAL

En aquest cas l'assaig de transfecció es realitza en la línia cel·lular HeLa, i es tria com a volum òptim utilitzar 7,5 µl de cSLN per portar a terme l'assaig, amb una durada del temps de transfecció de 2 hores.

Anàlogament a HEK293T, els nuclis cel·lulars s'observen en color blau (tinció DAPI). A través del canal vermell s'observen punts que corresponen al siRNA marcat amb el fluoròfor Cy3.

Com a control de transfecció s'utilitza també lipofectamina.

A la figura 95, es mostren les imatges obtingudes per microscòpia confocal després de realitzar la transfecció cel·lular amb cSLN:siRNA, i lipofectamina com a control, un cop sembrats diferents volums de cSLN i durant una incubació de 2 hores. La figura 96 permet visualitzar únicament els senyals corresponents al fluoròfor Cy3 unit al siRNA.

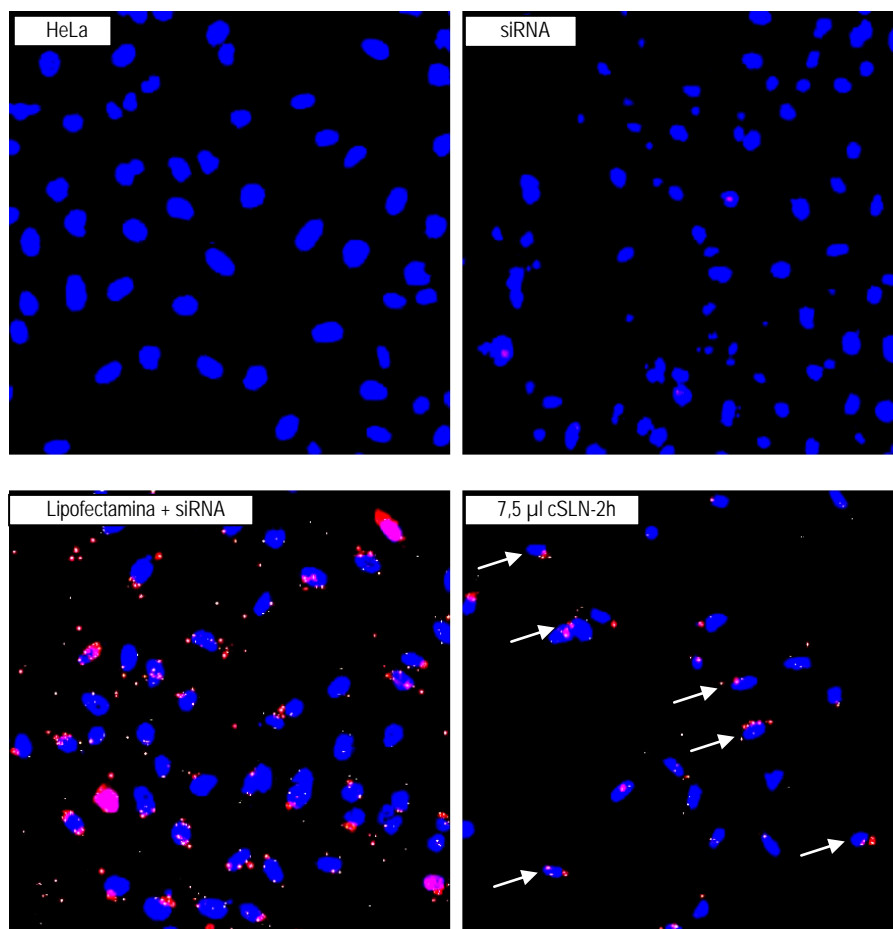


Figura 95. Incubació de cèl·lules HeLa utilitzant 7,5 µl de cSLN. La imatge superior correspon a cèl·lules HeLa i siRNA. A la filera inferior, control amb lipofectamina (esquerra) i transfecció amb cSLN:siRNA (dreta). Les fletxes blanques indiquen algunes de les senyals emeses des de les cèl·lules pel siRNA transfectat amb cSLN.

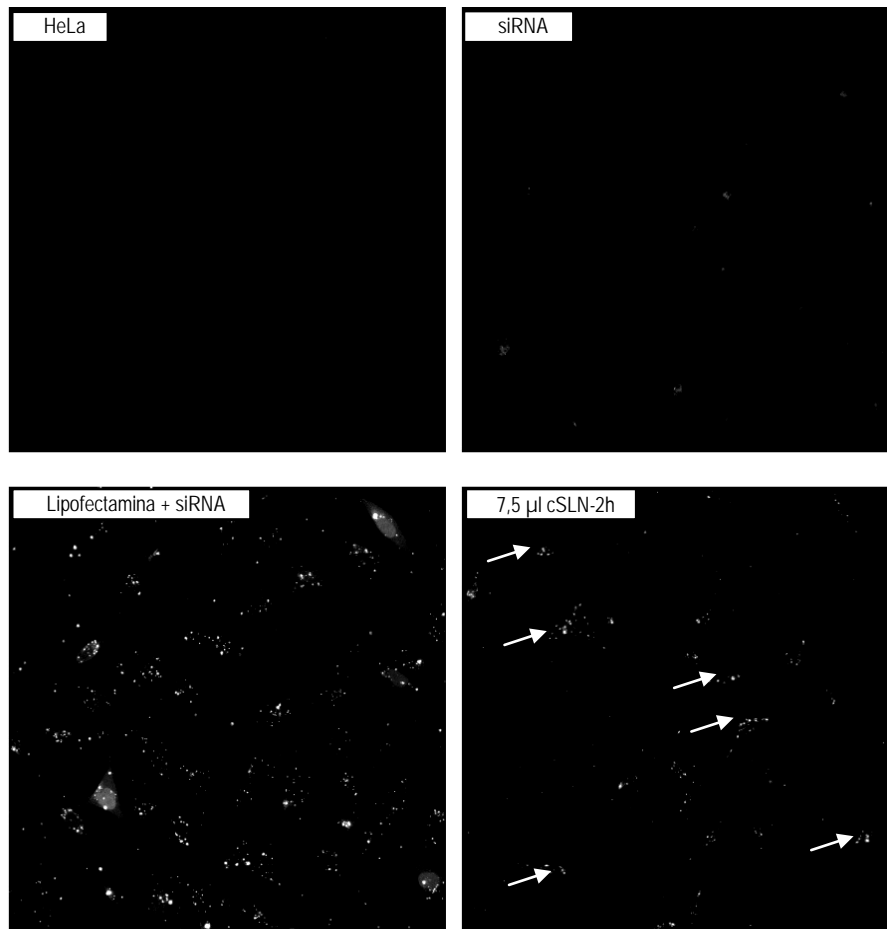


Figura 96. Incubació de cèl·lules HeLa amb cSLN:siRNA (els controls, volums i temps són els mateixos que a la figura 95). Es visualitza únicament la senyal corresponent al fluoròfor Cy3 unit a siRNA.

En la visualització pel canal vermell (figura 96), es pot observar un control negatiu de cèl·lules HeLa on no apareix cap senyal al tractar-se únicament de cèl·lules. A les cèl·lules transfectades amb siRNA (sense agent de transfecció) es pot observar algun senyal molt escàs. En el control amb lipofectamina, en canvi, s'originen grans agregats de siRNA. El senyal del fluoròfor, igual que en el cas de HEK293T, co-localitza en alguns nuclis amb el senyal blau de tinció nuclear. Com en el cas de HEK293T, la transfecció amb lipofectamina origina grans agregats de siRNA, En relació a les cèl·lules en què s'ha utilitzat com a agent de transfecció 7,5 µl de cSLN, el siRNA es pot visualitzar sense

problemes a les cèl·lules. A diferència del control amb lipofectamina, les cSLN originen un senyal única i homogènia. Si es comparen les intensitats dels senyals per a aquesta mateixa condició entre HeLa i HEK293T, es pot comprovar que en HeLa la capacitat de transfecció és visiblement més elevada, la qual cosa indicaria que aquesta línia cel·lular presenta una capacitat major per a ser eficientment transfectada amb els lipoplexos cSLN:siRNA utilitzats en aquests assajos.

DISCUSSIÓ GLOBAL

Aquesta secció pretén la discussió de forma conjunta i integrada dels diferents aspectes tractats en la secció prèvia de resultats.

La mida de les nanopartícules de quitosan-TPP és altament susceptible a variacions dels paràmetres del mètode de la gelificació ionotròpica, tal i com descriuen alguns autors (Fan *et al.*, 2012; Fàbregas *et al.*, 2013). Aquesta variabilitat té com a conseqüència la dificultat per aconseguir l'obtenció de nanopartícules de quitosan-TPP amb un grau de polidispersió baix i una estabilitat acceptable. El quitosan de baix pes molecular ha demostrat segons alguns treballs ser el més indicat en alguns casos (Romøren *et al.*, 2003; Strand *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009), tot i que altres autors no han pogut establir una relació entre l'ús de quitosan de baix pes molecular i una eficiència de transfecció i posterior regulació gènica millorada (Zhao *et al.*, 2006; Köping-Höggård *et al.*, 2004).

A partir dels dissenys experimentals per a l'avaluació dels paràmetres operacionals que influeixen en les característiques de mida de partícula -entesa com a diàmetre mitjà superficial-, i potencial Z de nanopartícules de quitosan-TPP, es determina que, quan les nanopartícules polimèriques catióniques de quitosan-TPP s'obtenen a partir del mètode de gelificació ionotròpica, la mida mitjana està influenciada per la velocitat d'agitació a la qual té lloc la reacció de síntesi, sota les condicions experimentals aplicades. No tenen influència estadísticament significativa els altres dos factors estudiats: temps de reacció de síntesi i temps d'addició del TPP a la solució de quitosan solubilitzat.

Per contra, els valors de potencial Z no es veuen afectats de forma significativa per cap dels tres factors en estudi, essent per tant comparables en totes les condicions experimentals.

En relació a la distribució del diàmetre mitjà superficial a les diferents velocitats d'agitació aplicades durant el procés d'obtenció -entre 500 i 900 rpm-, el major rendiment s'obté a 800 rpm, en l'interval entre 105 i 209 nm. Això és important, ja que fins a cert punt aquest fet permet mantenir la mida de partícula obtinguda dins d'un interval determinat, simplement amb l'ajust de la velocitat d'agitació durant la reacció de síntesi.

Cal ressaltar el fet que, tot i la solubilització que presenta el quitosan de baix pes molecular en medi àcid, el filtratge posterior a la síntesi esdevé un pas necessari per a l'eliminació d'agregats micromètrics. Aquests poden tenir la causa en una excessiva concentració de nanopartícules per falta d'homogeneïtat de la suspensió (Vauthier *et al.*, 2008). Amb el filtratge també s'eliminen eventuais micropartícules, que poden formar-se a causa de les diferents llargàries del polímer. Els agregats de nanopartícules de quitosan-TPP s'han pogut observar per TEM, com també ho han fet altres autors (Gan *et al.*, 2005).

La morfologia de las nanopartícules obtingudes no es veu afectada per variacions en els factors analitzats, per la qual cosa les característiques de la superfície, clarament observable per microscòpia de força atòmica, són essencialment les mateixes sota totes les condicions, podent-se aconseguir per tant nanopartícules aïllades similars en qualsevol de les condicions de velocitat d'agitació aplicades.

El mètode, tot i ser tècnicament senzill i eficaç pel que fa a la possibilitat d'obtenció efectiva de nanopartícules de quitosan-TPP, es demostra clarament influenciable per petites variacions experimentals, raó per la qual la baixa robustesa del mètode, sumada a la variabilitat del quitosan com a polímer, i donada la millor tolerància de SLN enfront nanopartícules polimèriques (Doktorovova *et al.*, 2014), fa que sigui convenient la cerca d'un sistema alternatiu robust per a l'obtenció de nanopartícules, a partir de components amb menys variabilitat i que superin les avantatges de les nanopartícules polimèriques catióniques pensades per al transport i transfecció cel·lular amb àcids nucleics per a regulació de l'expressió gènica.

Les nanopartícules lipídiques sòlides catióniques (cSLN) es perfilen com a sistema d'elecció per al seu ús com a vectors per a transfecció cel·lular d'àcids nucleics i posterior regulació genòmica.

S'assagen inicialment com a lípids matricials Compritol® 888 ATO, Precirol® ATO 5 i àcid esteàric, ja que la composició de la matriu lipídica ha mostrat tenir influència en el diàmetre mitjà superficial de les SLN en general (Ekambaram *et al.*, 2012).

En base als resultats, el lípid matricial finalment escollit és l'àcid esteàric, amb el que s'aconsegueixen cSLN de menor diàmetre i amb un potencial Z acceptable. L'octadecilamina i Poloxamer 188 completen la formulació, actuant com a lípid catiònic i tensioactiu, respectivament. Respecte a la preservació per liofilització d'aquestes cSLN, es constata que, malgrat el lleuger augment de mida de partícula que s'observa, el diàmetre, així com el potencial positiu es mantenen en valors plenament acceptables per a l'ús previst. Per això resulta fonamental poder obtenir en la síntesi el menor diàmetre possible, de cara al probable augment d'aquest si la formulació es sotmet a un procés de liofilització. Aquesta agregació produïda per la liofilització és un aspecte inherent que afecta en menor o major grau als sistemes nanoparticulats (Bozdag et al., 2005; Vauthier *et al.*, 2008). Alguns lípids utilitzats com a lípids matricials poden presentar tendència a formar *supercooled melts* en comptes de suspensions de nanopartícules lipídiques sòlides pròpiament. Donat aquest cas, aquestes nanopartícules es fondrien a temperatura fisiològica, invalidant-ne el seu ús inicialment previst com a agents terapèutics (Jennings *et al.*, 2000). Aquest no sembla ser el cas, però, de les formulacions que contenen àcids grassos com pot ser l'àcid esteàric, mentre que sí que pot succeir en el cas d'alguns triglicèrids (Bunjes, 2011).

Un dels problemes generals en l'ús de sistemes no virals per a transfecció gènica és l'eventual toxicitat dels components que els constitueixen. En aquest sentit, la formulació de partida utilitzada per a la síntesi de cSLN (500 mg d'àcid esteàric, 800 mg d'octadecilamina i 400 mg de Poloxamer 188) donava lloc a nanopartícules que en estudis previs a la realització d'aquest treball provocaven una alta citotoxicitat en la línia cel·lular HEK293T.

La causa pot radicar en diversos factors. Els lípids catiònics com l'octadecilamina poden provocar toxicitat cel·lular, tot i que la quantitat en la fórmula és determinant, i també està fortament vinculada al tipus cel·lular assajat (Fàbregas *et al.*, 2014). El cas contrari, és a dir, un defecte en la quantitat de lípid catiònic pot impossibilitar l'assoliment de la càrrega superficial positiva suficient per a l'enllaç iònic amb el DNA o RNA. Al mateix temps, una quantitat excessiva de tensioactius, en aquest cas Poloxamer 188, també pot sumar efectes tòxics i provocar-los per ell mateix, amb el resultat probable de desintegració de la membrana cel·lular. Ara bé, una concentració massa baixa

de Poloxamer 188 impedeix la formació de l'emulsió prèvia a la formació de les cSLN. Per aquests motius, s'inicia una optimització de la fórmula utilitzada originalment, de tal manera que es pugui arribar a la combinació que permeti una màxima viabilitat cel·lular, amb conservació d'una mida de partícula al voltant dels 130 nm de diàmetre mitjà, i un valor de potencial Z superior a 30 mV, característic de nanopartícules fortament catióniques i en conseqüència, aptes per al transport d'àcids nucleics units a través d'interaccions electrostàtiques. Aquesta combinació ha de permetre la màxima reducció possible dels components manifestament tòxics, mantenint sempre la mateixa quantitat d'àcid esteàric, que actuaria merament com a excipient. Per a cada combinació d'experiments, es mesuren tant la mida de partícula com el potencial zeta. S'aconsegueix reduir l'octadecilamina un 25% en la fórmula definitiva optimitzada, de forma que dels 800 mg inicials es passa a 600 mg, i es conserva la càrrega positiva superficial per sobre de 30 mV. Pel que fa al tensioactiu, es passa dels 400 mg inicials a 100 mg en la fórmula final, amb una reducció, per tant, del 75%. Les quantitats de partida en la fórmula optimitzada queden fixades en 500 mg d'àcid esteàric, 600 mg d'octadecilamina i 100 mg de Poloxamer 188. Efectivament, les cSLN sintetitzades pel mètode de microemulsificació en calent, i posteriorment liofilitzades, mostren no ser citotòxiques per a les línies cel·lulars HEK293T i HeLa. Aquests resultats però, no es poden fer extensius a altres línies cel·lulars. Diversos autors han constatat el diferent grau de citotoxicitat en dependència del tipus cel·lular en estudi per a una mateixa formulació de cSLN (Doktorovova *et al.*, 2014).

L'estabilitat estructural i tèrmica, així com d'altres característiques morfològiques i fisico-químiques, s'avaluen per mitjà de diverses tècniques instrumentals. A través de la espectroscòpia de fotoelectrons per emissió de raigs X es confirma que la càrrega superficial determinada a partir dels valors de potencial Z és el resultat de la presència de nitrogen en superfície, provinent del grup amino del lípid catiónic. El percentatge de nitrogen en superfície és del 2,2%, valor que es troba en consonància amb el que altres autors també han pogut determinar per a cSLN similars a les d'aquest treball (Vighi *et al.*, 2007). Aquest percentatge, doncs, resulta suficient per a l'adsorció d'àcids nucleics en superfície i es troba en correspondència directa amb els valors de potencial Z observats.

La presència a la fórmula d'un àcid carboxílic com l'àcid esteàric i una amina com l'octadecilamina fa que sigui plausible una reacció química entre aquests dos grups funcionals quan ambdues substàncies assolixen l'estat líquid durant la formació de l'emulsió, en el procés que condueix posteriorment a la formació de cSLN. Hi ha dues reaccions possibles entre aquests dos grups. Per una banda, una reacció àcid-base, amb la consegüent formació de l'anió estearat per part de l'àcid esteàric i la protonació de l'amina primària del lípid catiònic. Els dos ions poden llavors formar una unió electrostàtica en el sí de la matriu de la nanopartícula. Això podria ser extensible a l'ús d'altres àcids grassos similars com l'àcid palmític per ser emprats com a lípids matricials, pel fet de presentar el carboxil com a grup funcional. Caldrien evidències per demostrar que aquesta interacció facilita l'obtenció de cSLN d'un diàmetre mitjà menor per efectes de compactació a l'espai derivada de la interacció electrostàtica.

L'altra reacció teòricament possible és una reacció entre els dos grups funcionals per formar un enllaç amida, que implicaria la formació d'enllaços covalents i l'alliberament d'aigua. Aquesta darrera possibilitat, però, requereix d'altres temperatures, al voltant de 150-200 °C durant un període d'hores (Valeur i Bradley, 2008). Donat que el mètode de microemulsificació en calent no implica temperatures tant elevades i que el temps emprat per a la formació de l'emulsió és de minuts, és altament improbable la generació d'un enllaç amida entre l'àcid carboxílic i l'amina.

El patró de difracció de raigs X indica que la barreja de les dues substàncies no comporta un patró que pugui ser interpretat com la suma algebraica dels patrons de les dues substàncies per separat, sinó que es genera un patró compatible amb la generació d'entitats químiques diferents de les de partida. Amb les tècniques d'anàlisi tèrmica, concretament les corbes DSC indiquen que, efectivament, entre l'àcid esteàric i l'octadecilamina és possible que tingui lloc una reacció química. En la corba DSC de la barreja tant de les dues substàncies com també en presència de Poloxamer 188 apareix un pic exotèrmic que no apareix en les corbes DSC de les substàncies analitzades per separat. Aquest pic indica que hi ha una interacció entre els dos components. Un cop descartada la impossibilitat química de formació d'una amida sota les condicions experimentals fixades, una reacció exotèrmica àcid-base sembla ser el fet més probable de la interacció entre l'àcid esteàric i l'octadecilamina.

De fet, quan s'analitza per espectrometria de masses una barreja fosa i posteriorment recristal·litzada de les dues substàncies, es posa clarament de manifest la desprotonació de l'àcid gras i la protonació de l'amina, reforçant doncs la hipòtesi de la formació de la sal. Es confirma aquest fet amb una ressonància magnètica nuclear de protó, en què definitivament es pot observar que, mentre que el lípid matricial i el catiònic per separat no estan ionitzats, la barreja recristal·litzada de les dues substàncies sí dóna lloc a la desprotonació de l'àcid gras i protonació de l'amina.

Aquesta reacció no neutralitza la totalitat dels grups amina protonats, doncs a nivell de la superfície de les nanopartícules es mantenen carregats positivament els suficients grups com per dotar la nanopartícula de càrrega positiva suficient per donar lloc als potencials Z observats, claus per a l'adsorció posterior de DNA i RNA.

L'anàlisi termogravimètric de cSLN a partir d'un liofilitzat posa de manifest que la presència de trehalosa les protegeix de la degradació tèrmica de manera manifestament significativa enfront les cSLN liofilitzades en absència d'aquest sucre. Aquesta dada resulta important en vistes a la conservació del liofilitzat.

Les imatges de cSLN aconseguides a partir de microscòpia electrònica de transmissió i de microscòpia electrònica de rastreig mostren nanopartícules esfèriques, de morfologia homogènia, i mida comparable a l'obtinguda per determinació de la mida de partícula per difracció làser.

Un altre aspecte a tenir en compte de les cSLN és la seva capacitat de deformació elàstica, mesurada com a mòdul de Young. La resistència a la deformació de l'estructura i, per tant, el grau de similitud que pugui tenir aquesta amb les membranes biològiques quant a propietats nanomecàniques, pot implicar una major o menor biocompatibilitat i en conseqüència tenir impacte en la funcionalitat de les cSLN. Existeixen diversos treballs en què la determinació del mòdul de Young de diverses estructures biològiques es relaciona amb les seves propietats i funcionalitat (Thomasy *et al.*, 2014; Tracqui *et al.*, 2011), però fins el moment no hi ha treballs que pugin vincular la biocompatibilitat de les cSLN en base a aquest factor. En qualsevol cas, la determinació del mòdul de Young de diverses cSLN aïllades mostra, per a aquest paràmetre, resultats que caldria tenir en compte de cara a la seva

afinitat per a interaccionar des del punt de vista mecànic amb les estructures cel·lulars.

Sense deixar de banda l'aspecte de la biocompatibilitat, les cSLN desenvolupades en aquest treball han estat sotmeses a estudis d'estabilitat tèrmica a tres temperatures diferents. Resulta de molt interès que la major estabilitat tèrmica, entesa com a manteniment de la mida de partícula i potencial Z de les cSLN, es manté pràcticament intacta a 37°C fins a 7 dies després de la síntesi, a diferència de les altres dues condicions estudiades, en què la formació d'agregats a les poques hores després de la síntesi les fa inviables per a l'ús previst. Alguns sistemes nanoestructurats s'han definit des del punt de vista termodinàmic com a sistemes metastables, fet que podria estar relacionat amb els resultats observats (López-León *et al.*, 2005). El fet que a temperatura fisiològica aquestes cSLN mantinguin les propietats principals que les fan aptes per al transport i transfecció d'àcids nucleics és una dada rellevant per a la seva eventual administració. No cal perdre de vista, però, que aquests estudis d'estabilitat tèrmica són preliminars i limitats a les cSLN, i que les dades d'estabilitat dels lipoplexos a aquesta temperatura o inclús en plasma aportaria més informació en relació a la biocompatibilitat. Estudis d'estabilitat tèrmica d'altres autors realitzats en d'altres formulacions de cSLN confirmen la influència del factor temperatura en aquests sistemes, especialment en el manteniment de la mida de partícula (del Pozo-Rodríguez *et al.*, 2009).

Un cop caracteritzades les cSLN i demostrada la seva idoneïtat quant a característiques fisico-químiques, es procedeix als estudis d'eficiència de càrrega de pDNA. Diferents quantitats d'una suspensió de cSLN són avaluades per assaig de retardament en gel enfront una quantitat fixa de pDNA, per tal d'establir la ràtio òptima cSLN:pDNA. La relació òptima s'obté a 200:1 cSLN:pDNA p/p, equivalent a 25:1 cSLN:DNA v/v, amb una concentració de DNA de 1 µg/µl. A aquesta relació s'assegura que tot el pDNA carregat queda retingut per part de les cSLN en el pou del gel d'agarosa en el qual es realitza l'assaig de retardament en gel. Aquesta relació és la que s'utilitzarà amb posterioritat en tots els assajos que impliquin lipoplexos cSLN:pDNA. En aquest assaig, en què les cSLN són resuspeses a partir de producte liofilitzat, es posa

de manifest la importància en l'addició de trehalosa com a crioprotector durant la liofilització; únicament amb aquesta condició de procés s'aconsegueix que, a la ràtio anteriorment esmentada, tot el pDNA quedi retingut. En cas contrari, les cSLN no són capaces de mostrar el màxim poder de retenció de pDNA. La raó pot radicar en una redispersió no homogènia que impliqui una presa de mostra en què les cSLN no estiguin per tant, homogèniament distribuïdes, essent possible el cas que no s'estigui addicionant al pou la quantitat teòrica de cSLN esperades. També és una hipòtesi parcialment raonada pel fet que les cSLN liofilitzades en absència de trehalosa hagin patit un cert grau de desestructuració, i de forma anàloga al cas anterior, no s'estiguin carregant en el pou del gel les quantitats teòriques de cSLN viables, sinó que aquestes siguin inferiors.

Per raons tècniques, no ha estat possible la realització d'assajos de retardament en gel amb suspensions de cSLN immediatament sintetitzades, raó per la qual tots els estudis esmentats en referència a l'eficiència de càrrega estan referits a cSLN resuspeses després d'un procés de liofilització.

Amb la ràtio òptima d'unió de cSLN a pDNA ja establerta, els assajos portats a terme amb plasmidis de diferents tipus confirmen que aquests mantenen la mateixa capacitat òptima d'unió a les nanopartícules i que, com era esperable, les diferents construccions no veuen modificada la seva eficiència de càrrega. Això pot ser explicable pel fet que els plasmidis adquireixen conformacions espacials condensades en diversos graus, independentment de la composició de la seqüència nucleotídica, amb els grups fosfats exposats suficientment com per possibilitar de forma òptima la interacció electrostàtica amb les càrregues positives de les amines de les cSLN. En qualsevol cas, i a diferència dels autors els estudis dels quals estableixen ràtios òptimes d'unió de les respectives formulacions desenvolupades a partir únicament d'un únic plasmidi (Delgado *et al.*, 2012, He *et al.*, 2013), es demostra la robustesa d'aquestes cSLN per carregar diversos tipus de plasmidis sempre a la mateixa relació 200:1 cSLN:pDNA (p/p).

Els experiments de transfecció cel·lular impliquen l'addició dels lipoplexos cSLN:pDNA al medi de cultiu pel creixement cel·lular. La gran versatilitat de medis quant a la composició i la força iònica que poden exhibir no deixa de ser una variable que pot modificar l'afinitat de les cSLN per a la unió al pDNA. La

força iònica del medi pot influir en els valors de potencial Z de les cSLN que posteriorment s'hauran d'unir a pDNA, que podria ser desplaçat per competició d'ions presents en el medi de cultiu per la unió al grup amino del lípid catiònic. Per avaluar-ho, s'ha realitzat la mesura d'aquest paràmetre per a diversos medis enriquits i sense enriquir. Els medis enriquits, molts dels quals amb anions en la seva composició, provoquen efectivament una disminució notable de la càrrega positiva superficial de les cSLN quan s'incuba una mostra de nanopartícules liofilitzades en cada medi de cultiu estudiat. Aquestes observacions han de ser tingudes en compte, de manera que, per una banda, la unió de les cSLN a àcids nucleics sempre ha de ser prèvia a la seva addició al medi de cultiu. Per altra banda, el medi addicionat al cultiu durant el temps establert per a la transfecció, ha de ser un medi bàsic no enriquit. Així, es minimitza l'acció que un medi enriquit pot tenir pel que fa a la competició dels diferents ions per la unió al pDNA. Pel que fa a la mida de partícula observada un cop resuspeses les cSLN en cada medi, es constaten diferències en aquest paràmetre, tot i que no se'n poden derivar afirmacions concloents respecte a l'efecte que determinats components poden tenir per provocar les variacions en el diàmetre mitjà observat.

Els estudis de viabilitat de la formulació de cSLN enfront les línies cel·lulars HEK293T i HeLa mostren resultats similars pel que fa al grau de toxicitat induït. Com és d'esperar, el grau de citotoxicitat està clarament relacionat amb el volum de cSLN utilitzat en cada assaig. Un augment gradual d'aquest volum es tradueix en una disminució també gradual de la viabilitat cel·lular. Es pot establir un volum de 25 µl a 48 hores com a límit en què no s'observa toxicitat cel·lular ni canvis morfològics. Aquests resultats però, són únicament representatius per a aquestes dues línies cel·lulars concretes. Com demostren alguns estudis (Miglietta *et al.*, 2000; Severino *et al.*, 2015), el grau de citotoxicitat de cSLN depèn en part de la línia cel·lular, tot i que fins ara no sembla que s'hagi pogut establir una explicació raonada per a aquest fet, ja que pot estar induïda per múltiples factors específics de cada línia cel·lular. Això representa un impediment en relació a l'aplicabilitat de les cSLN de forma independent al tipus cel·lular, i representa un repte a superar en el futur.

Amb posterioritat a la caracterització de les cSLN, i els respectius estudis d'estabilitat tèrmica i en medi de cultiu, així com estudis de viabilitat, es comencen a portar a terme les proves de transfecció cel·lular amb lipoplexos. Com a primer pas per a l'avaluació de la capacitat dels lipoplexos cSLN:pDNA per transfectar les línies HEK293T i HeLa, s'analitza la sobre-expressió del fragment de gen del factor de transcripció TCERG1 per mitjà d'un anàlisi *Western-Blot*, que permet la identificació de la proteïna d'interès, en aquest cas TCERG1.

A la vista dels resultats obtinguts, es pot concloure que, si bé les cèl·lules HEK293T sobre-expressen TCERG1, només ho fan quan l'agent de transfecció és fosfat càlcic, però no en el cas en què s'utilitzen les cSLN. Aquesta situació pot ser causada per factors diversos. Una baixa eficiència de transfecció en pot ser en part responsable, però tampoc es pot descartar que la transfecció hagi tingut lloc però els lipoplexos cSLN:pDNA no hagin alliberat de forma convenient el pDNA per tal que aquest pugui arribar al nucli cel·lular per transcriure's a RNA. En el cas de HeLa, els resultats estan en consonància amb la impossibilitat d'aquesta línia cel·lular per sobre-expressar TCERG1 tot i utilitzar agents de transfecció alternatius com la lipofectamina. Ara bé, si es torna a agafar com a model cel·lular la línia HEK293T per ser transfectada amb un plasmidi codificant per al gen Luc, que codifica per a l'enzim luciferasa, els resultats són diferents. En aquesta darrera situació, es constata que hi ha una relació directa entre la quantitat de plasmidi transfectat mitjançant cSLN i l'expressió de Luc, entesa com a quantitat de bioluminescència emesa. Tanmateix, els resultats pel que fa a luminescència són comparativament majors quan l'agent de transfecció és fosfat càlcic. Això és indicatiu que l'eficiència de transfecció de les cSLN no és equiparable a la del fosfat càlcic. En aquest darrer experiment, i en contraposició a l'anàlisi de l'expressió gènica de TCERG1 en HEK293T, es demostra que les cSLN sí poden, en el cas del plasmidi que conté el gen de la luciferasa, transfectar de forma suficientment eficient aquesta línia cel·lular i que el pDNA, un cop internalitzats els lipoplexos, té capacitat suficient per alliberar-se de la nanopartícula, i arribar a travessar la membrana nuclear per allà ser transcrit i finalment traduït al citoplasma.

En tot cas, és important ressaltar en relació als resultats obtinguts que els assajos de transfecció amb el plasmidi de TCERG1 són els primers que es van realitzar, i que després s'han anat optimitzant les condicions.

Si es parteix de la premissa de la capacitat de condensació del pDNA a la llum dels resultats obtinguts quant a l'eficiència de càrrega de pDNA per part de les cSLN a la ràtio òptima de treball de 200:1 cSLN:pDNA p/p, es descarta que la diferent llargària dels dos plasmidis (el que conté el fragment de TCERG1 i el que conté Luc) sigui la causa d'una baixa eficiència de transfecció per impossibilitat estèrica d'internalització dels lipoplexos. A partir d'això, una hipòtesi plausible de la falta de senyal en l'anàlisi *Western-Blot* de l'expressió de TCERG1 en HEK293T pot ser la dificultat en travessar la segona barrera que es troba el pDNA un cop alliberat de les cSLN, i és travessar la membrana nuclear. En el cas de la transfecció del plasmidi amb el gen Luc com a insert, es pot arribar a postular com a hipòtesi que una alta proporció de cèl·lules es trobin en la fase M, i que en aquestes circumstàncies el pDNA pugui accedir de forma molt més directa a la maquinària transcripcional (Akita *et al.*, 2004) com a pas previ a la traducció que donarà lloc a la proteïna codificada en el plasmidi.

Un cop finalitzats els estudis de transfecció de pDNA, el proper pas és l'establiment de la ràtio òptima d'eficiència de càrrega cSLN:siRNA, que s'estableix en 25 µl de cSLN per a carregar el 100% de 6 µl de siRNA marcat amb fluoròfor, a partir d'una solució *stock* original a 20 mM. A partir d'aquesta proporció es porten a terme assajos de transfecció cel·lular en HEK293T i HeLa. A la vista dels resultats obtinguts per a diferents temps de transfecció i emprant com a control d'eficiència lipofectamina com a agent de transfecció, el qual es compara amb les cSLN, queda patent que les cSLN mostren una eficiència menor de transfecció respecte la lipofectamina. Per a les cSLN, la major eficiència de transfecció a les dues hores es produeix amb un volum de 7,5 µl. Quan s'utilitzen volums majors de cSLN en aquest assaig, deixa d'observar-se la senyal del fluoròfor indicativa de que ha tingut lloc la transfecció dels lipoplexos cLSN:siRNA, possiblement a causa d'una inducció de la toxicitat cel·lular dels lipoplexos o a causa de la baixa resistència que han mostrat les cèl·lules durant el procés de fixació en aquestes condicions.

La línia cel·lular HeLa resulta ser la més fàcilment transfectada en comparació amb la línia HEK293T per a les mateixes condicions experimentals. Així, es posa de manifest la variabilitat en la capacitat de transfecció dels lipoplexos en funció de la línia cel·lular de què es tracti. Alguns autors han establert una relació entre el component catiónic i la seva eficiència per transfectar determinats tipus cel·lulars (Vighi *et al.*, 2011). Gràcies a la presència del fluoròfor, es pot corroborar la baixa eficiència de transfecció dels lipoplexos cSLN:siRNA. Per altra banda, la internalització es produeix sense formar agregats, a diferència del que succeeix amb la lipofectamina com a agent de transfecció.

És un fet generalitzat i constatat que els sistemes no virals per a transfecció d'àcids nucleics i regulació de l'expressió gènica que estan en desenvolupament segueixen presentant una menor eficiència de transfecció que els sistemes virals (Yin *et al.*, 2014). Tot i la necessitat de millora en aquest sentit, les cSLN constitueixen un model factible i millorable com a sistema de transport i transfecció de DNA/RNA, i es demostra que el seu ús com a sistemes transportadors és prou robust com per aconseguir la transfecció cel·lular de material genètic per a l'expressió o eventual silenciament de determinats gens causants de malalties diverses.

CONCLUSIONS

1. S'han definit i seleccionat els paràmetres operatius concrets per a l'obtenció de nanopartícules de quitosan-TPP, tot conclouent que els paràmetres crítics a considerar són la velocitat d'agitació durant la reacció de síntesi, el temps d'addició de la solució de TPP i el temps de reacció de síntesi, els quals influeixen en la mida de partícula i el potencial Z.
2. A partir dels paràmetres estudiats, s'han aconseguit optimitzar les condicions experimentals i estandarditzar el mètode d'obtenció per gelificació ionotròpica: temps de reacció 10 min, temps d'addició de TPP durant els 5 primers minuts i velocitat d'agitació 800 rpm, amb filtratge posterior.
3. S'ha aconseguit obtenir una fórmula de cSLN optimitzada des del punt de vista qualitatiu pel que fa a la tria del lípid matricial (àcid esteàric), i des del punt de vista quantitatiu pel que fa a la reducció màxima de la quantitat d'octadecilamina com a lípid catiònic (600 mg), de Poloxamer 188 (100 mg) com a tensioactiu i d'àcid esteàric (500 mg), amb la finalitat de reduir l'eventual toxicitat cel·lular induïda per aquests components. Es manté una mida de partícula acceptable i un potencial Z suficientment positiu.
4. S'han aconseguit cSLN amb capacitat per mantenir l'estabilitat a una setmana quant a mida de partícula i potencial Z a temperatura fisiològica (37 °C).
5. S'ha pogut establir la quantitat màxima permesa de cSLN (25 µl) en cultius cel·lulars HEK293T i HeLa que indueixi una mínima toxicitat cel·lular.
6. A partir de la formulació de cSLN dissenyada com a sistema de transport d'àcids nucleics, ha estat establerta la relació cSLN:pDNA (200:1 p/p) que afavoreix una eficiència de càrrega òptima.
7. S'ha aconseguit expressar el gen de la luciferasa en cèl·lules HEK293T a partir de la transfecció de lipoplexos que contenen aquest gen. L'expressió del gen ha demostrat ser proporcional a la quantitat de pDNA transfectat.

CONCLUSIONS

8. A partir de la formulació de cSLN dissenyada com a sistema de transport d'àcids nucleics, ha estat establerta la relació cSLN:siRNA (25:6 v/v) que afavoreix una eficiència de càrrega òptima en aquests lipoplexos.

9. La capacitat de transfecció de lipoplexos cSLN:siRNA ha estat demostrada en cèl·lules HEK293T i HeLa, a diferents temps i amb diferents volums de cSLN.

10. Tot i la demostrada capacitat de transfecció dels lipoplexos, aquesta és susceptible de ser millorada en posteriors formulacions, especialment per a la transfecció de lipoplexos amb pDNA.

REFERÈNCIES

A

Abbasalipourkabar, R., Salehzadeh, A. & Abdullah, R., 2011. Cytotoxicity Effect of Solid Lipid Nanoparticles on Human Breast Cancer Cell Lines. *Biotechnology*, 10(6).

Abdelwahed, W. et al., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *2006 Supplementary Non-Thematic Collection*, 58(15), pp.1688–1713.

Adamson, A.W., Gast, A.P. & others, 1967. *Physical chemistry of surfaces*, Interscience publishers New York.

Akita, H. et al., 2004. Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 9(3), pp.443–451.

Anitha, A. et al., 2014. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 39(9), pp.1644–1667.

Antoniou, J. et al., 2015. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan--tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, pp.137–146.

Arango, M. et al., 2006. CA150 expression delays striatal cell death in overexpression and knock-in conditions for mutant huntingtin neurotoxicity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(17), pp.4649–4659.

Athawale, R.B. et al., 2014. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 68(2), pp.231–40.

Atkins, R.C. & Carey, F.A., 2002. *Organic chemistry: a brief course*, McGraw-Hill.

Aulton, M.E., 2004. *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*, Elsevier.

B

Balan, V. & Verestiuc, L., 2014. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal*, 53, pp.171–188.

Battaglia, L. et al., 2014. Techniques for the Preparation of Solid Lipid Nano and Microparticles.

Beddoes, C.M., Case, C.P. & Briscoe, W.H., 2015. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in colloid and interface science*, 218C, pp.48–68.

REFERÈNCIES

Bessodes, M. & Mignet, N., 2013. Lipids for nucleic acid delivery: synthesis and particle formation. In *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery*. Springer, pp. 67–84.

Binnig, G. & Quate, C.F., 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), pp.930–933.

Bondi, M.L. et al., 2007. Novel cationic solid-lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery. *Journal of drug targeting*, 15(4), pp.295–301.

Bondi, M.L. & Craparo, E.F., 2010. Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art. *Expert opinion on drug delivery*, 7(1), pp.7–18.

Bondi, M.L., Di Gesù, R. & Craparo, E.F., 2012. Lipid nanoparticles for drug targeting to the brain. *Methods in enzymology*, 508, pp.229–51.

Bozdog, S., Dillen, K., Vandervoort, J., & Ludwig, A. (2005). The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(6), 699–707.

Bulmer, C., Margaritis, A. & Xenocostas, A., 2012. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochemical engineering journal*, 68(0), pp.61–69.

Bunjes, H., 2011. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(5), pp.405–411.

Bunjes, H., Westesen, K. & Koch, M.H.J., 1996. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 129(1–2), pp.159–173.

C

Calvo, P. et al., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), pp.125–132.

Carrillo, C. et al., 2014. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(6), pp.775–783.

Chaikin, P.M. & Lubensky, T.C., 2000. *Principles of condensed matter physics*, Cambridge Univ Press.

Cheng, D. et al., 2007. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Molecular cell*, 25(1), pp.71–83.

Coiras, M. et al., 2013. Transcription elongation regulator 1 (TCERG1) regulates competent RNA polymerase II-mediated elongation of HIV-1 transcription and facilitates efficient viral replication. *Retrovirology*, 10(1), pp.1–18.

Cortesi, R. et al., 2014. Cationic lipid nanosystems as carriers for nucleic acids. *New biotechnology*, 31(1), pp.44–54.

Csaba, N., Köping-Höggård, M. & Alonso, M.J., 2009. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International journal of pharmaceutics*, 382(1–2), pp.205–214.

D

Dash, M. et al., 2011. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), pp.981–1014.

Daya, S. & Berns, K.I., 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), pp.583–93.

Delgado, D. et al., 2012. Dextran–protamine–solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. *International journal of pharmaceutics*, 425(1–2), pp.35–43.

Doktorovova, S. et al., 2011. Cationic solid lipid nanoparticles (cSLN): Structure, stability and DNA binding capacity correlation studies. *International journal of pharmaceutics*, 420(2), pp.341–349.

Doktorovova, S., Souto, E.B. & Silva, A.M., 2014. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 87(1), pp.1–18.

E

Ekambaram, P. & Abdul, H.S.A., 2011. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril. *Journal of young pharmacists : JYP*, 3(3), pp.216–20.

Ekambaran, P., Abdul Hasan Sathali, A. & Priyanka, K., 2012. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 1(2), p.80.

El-Aneed, A., 2004. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 94(1), pp.1–14.

EMA (European Medicines Agency). Disponible a <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Amb accés el 25 de maig de 2015.

F

Fàbregas, A. et al., 2014. A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1-2), pp.270–279.

Fàbregas, A. et al., 2013. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan--tripolyphosphate nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 446(1), pp.199–204.

Fadda, P. et al., 2013. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: influence of microemulsion microstructure. *International journal of pharmaceutics*, 446(1-2), pp.166–75.

Fan, W. et al., 2012. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(0), pp.21–27.

FDA (Food and Drug Administration) Disponible a <http://www.fda.gov>. Amb accés el 25 de maig de 2015.

Freitas, C. & Müller, R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. *International journal of pharmaceutics*, 168(2), pp.221–229.

Fundarò, A. et al., 2000. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 42(4), pp.337–43.

G

Gan, Q. et al., 2005. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2–3), pp.65–73.

Gan, Q. & Wang, T., 2007. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(1), pp.24–34.

Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M.J., 2012. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Drug Delivery Research in Europe*, 161(2), pp.496–504.

Garti, N. & Sato, K., 1988. *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*, M. Dekker.

Garzón S., M.D.L. et al., 2008. Preparation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39(4), pp.50–66.

Gastaldi, L. et al., 2014. Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 87(3), pp.433–44.

Giessibl, F.J., 2003. Advances in atomic force microscopy. *Reviews of Modern Physics*, 75(3), pp.949–983.

Goins, W.F. et al., 2014. Engineering HSV-1 vectors for gene therapy. In *Herpes Simplex Virus*. Springer, pp. 63–79.

Grenha, A., 2012. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *J Drug Target*, 20(4), pp.291–300.

Gupta, R.B. & Kompella, U.B., 2006. *Nanoparticle technology for drug delivery*, Taylor & Francis New York.

H

Haussecker, D., 2014. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*.

He, S.-N. et al., 2013. Ternary nanoparticles composed of cationic solid lipid nanoparticles, protamine, and DNA for gene delivery. *International journal of nanomedicine*, 8, pp.2859–69.

Hernández Peñaranda, A., 2003. *Microbiología Industrial*, EUNED.

Heydenreich, A. V et al., 2003. Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres—effects on particle size, physical stability and cell toxicity. *Particulate Systems: Papers from the Fourth European Symposium on Particulate Systems*, 254(1), pp.83–87.

Holbert, S. et al., 2001. The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), pp.1811–1816.

Hou, D. et al., 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24(10), pp.1781–1785.

REFERÈNCIES

I

Iversen, P.L. et al., 2012. Discovery and early development of AVI-7537 and AVI-7288 for the treatment of Ebola virus and Marburg virus infections. *Viruses*, 4(11), pp.2806–2830.

J

Jain, A.K. et al., 2014. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 121, pp.222–9.

Jaschinski, F. et al., 2011. The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF- β 2. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(12), pp.2203–13.

Jayakumar, R. et al., 2010. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology advances*, 28(1), pp.142–50.

Jenning, V., Thünemann, A.F. & Gohla, S.H., 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International journal of pharmaceutics*, 199(2), pp.167–177.

De Jesus, M.B. & Zuhorn, I.S., 2015. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 201, pp.1–13.

Jose, S. et al., 2014. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *International journal of pharmaceutics*, 474(1-2), pp.6–13.

K

Kaloti, M. & Bohidar, H.B., 2010. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan-sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 81(1), pp.165–73.

Kapoor, M., Burgess, D.J. & Patil, S.D., 2012. Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *Recent Progress in Non-Viral Gene Delivery*, 427(1), pp.35–57.

Katas, H. & Alpar, H.O., 2006. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 115(2), pp.216–225.

Klug, W.S., Cummings, M.R. & others, 2003. *Concepts of genetics.*, Pearson Education, Inc.

Kong, F. et al., 2012. Phosphorylatable short peptide conjugated low molecular weight chitosan for efficient siRNA delivery and target gene silencing. *International journal of pharmaceuticals*, 422(1–2), pp.445–453.

Köping-Höggård, M. et al., 2004. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene therapy*, 11(19), pp.1441–1452.

Kreuter, J., 1994. *Colloidal drug delivery systems*, CRC Press.

Kumar, S. & Randhawa, J.K., 2013. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), pp.1842–1852.

Kuo, Y.-C. & Shih-Huang, C.-Y., 2014. Solid lipid nanoparticles with surface antibody for targeting the brain and inhibiting lymphatic phagocytosis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), pp.1154–1163.

Kuo, Y.-C. & Wang, L.-J., 2014. Transferrin-grafted cationic solid lipid nanoparticles for targeting delivery of saquinavir to the brain. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(3), pp.755–763.

L

Lawrence, M.J. & Rees, G.D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 45(1), pp.89–121.

Lentz, T.B., Gray, S.J. & Samulski, R.J., 2012. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiology of disease*, 48(2), pp.179–88.

Li, W. & Szoka, F.C., 2007. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical research*, 24(3), pp.438–449.

Lin, P.J.C. et al., Influence of cationic lipid composition on uptake and intracellular processing of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, (0).

Liu, C. et al., 2011. Novel cationic 6-lauroxyhexyl lysinate modified poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol) nanoparticles enhance gene transfection. *Journal of colloid and interface science*, 354(2), pp.528–535.

López-León, T. et al., 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of colloid and interface science*, 283(2), pp.344–351.

Lorenzer, C. et al., 2015. Going beyond the liver: Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 203C, pp.1–15.

M

Malutan, R. & Vilda, P.G., 2012. *Thermodynamics of Microarray Hybridization*, INTECH Open Access Publisher.

Mao, S., Sun, W. & Kissel, T., 2010. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Chitosan-Based Formulations of Drugs, Imaging Agents and Biotherapeutics*, 62(1), pp.12–27.

Martins, S. et al., 2012. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *International journal of pharmaceutics*, 430(1–2), pp.216–227.

McMahon, G., 2007. *Analytical instrumentation: a guide to laboratory, portable and miniaturized instruments*, Chichester [etc.]: Wiley.

Mehnert, W. & Mäder, K., 2012. Solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp.83–101.

Mehnert, W. & Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Lipid Assemblies for Drug Delivery*, 47(2–3), pp.165–196.

Merkus, H.G., 2009. *Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality*, Springer Science & Business Media.

Miglietta, A. et al., 2000. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 210(1-2), pp.61–67.

Mishra, B., Patel, B.B. & Tiwari, S., 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), pp.9–24.

Montes, M. et al., 2012. Functional coupling of transcription and splicing. *Gene*, 501(2), pp.104–117.

Morris, G.A. et al., 2011. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), pp.1430–1434.

Mukhopadhyay, P. et al., 2012. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37(11), pp.1457–1475.

Müller, R.H., Mäder, K. & Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), pp.161–177.

O

Oliveira, A.V.V., Silva, G.A. & Chung, D.C., 2015. Enhancement of chitosan-mediated gene delivery through combination with phiC31 integrase. *Acta biomaterialia*, 17, pp.89–97.

P

Paddock, S., Fellers, T.J. & Davidson, M.W., 2001. *Confocal microscopy*, Springer.

Parveen, S., Misra, R. & Sahoo, S.K., 2012. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(2), pp.147–166.

Pearson, J.L. et al., 2008. Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing. *The Journal of biological chemistry*, 283(12), pp.7949–7961.

Pedersen, N. et al., 2006. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62(2), pp.155–162.

Pillai, C.K.S., Paul, W. & Sharma, C.P., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), pp.641–678.

Del Pozo-Rodríguez, A. et al., 2009. Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), pp.181–189.

Pretsch, E. et al., Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos (1980) Alhambra.

R

Ragelle, H. et al., 2014. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 176, pp.54–63.

Ramana, L.N. et al., 2014. Evaluation of chitosan nanoformulations as potent anti-HIV therapeutic systems. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(1), pp.476–84.

Rampino, A. et al., 2013. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *International journal of pharmaceutics*, 455(1-2), pp.219–28.

Rao, J.P. & Geckeler, K.E., 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Special Issue on Composites*, 36(7), pp.887–913.

REFERÈNCIES

- Ravi Kumar, M.N., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), pp.1–27.
- Rehman, Z. ur, Zuhorn, I.S. & Hoekstra, D., How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: Recent advances. *Journal of Controlled Release*, (0).
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), pp.603–632.
- Rip, J. et al., 2006. AAV1-LPL(S447X) gene therapy reduces hypertriglyceridemia in apoE2 knock in mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1761(10), pp.1163–8.
- Romøren, K. et al., 2003. The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International journal of pharmaceutics*, 261(1), pp.115–127.
- Rostami, E. et al., 2014. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 181, pp.56–61.
- Russell, P.J., 1992. *Genetics* Third Edit., HarperCollins.

S

- Sánchez-Alvarez, M. et al., 2010. Differential effects of sumoylation on transcription and alternative splicing by transcription elongation regulator 1 (TCERG1). *The Journal of biological chemistry*, 285(20), pp.15220–15233.
- Schoenitz, M. et al., 2013. Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: A feasibility study. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 49(August).
- Scholz, C. & Wagner, E., 2012. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: Common and different tasks for synthetic carriers. *Journal of Controlled Release*, 161(0), pp.554–565.
- Severino, P. et al., 2011. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 86(1), pp.125–130.
- Severino, P. et al., 2015. Sodium alginate-cross-linked polymyxin B sulphate-loaded solid lipid nanoparticles: Antibiotic resistance tests and HaCat and NIH/3T3 cell viability studies. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 129, pp.191–7.
- Severino, P. et al., 2014. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). *European journal of medicinal chemistry*, 81, pp.28–34.

- Shah, R.M. et al., 2014. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *Journal of colloid and interface science*, 428, pp.286–94.
- Shi, L.-L. et al., 2014. Optimization of process variables of zanamivir-loaded solid lipid nanoparticles and the prediction of their cellular transport in Caco-2 cell model. *International journal of pharmaceutics*, 478(1), pp.60–69.
- Siekmann, B. & Westesen, K., 1994. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3(3), pp.159–175.
- Silva, A.C. et al., 2012. Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 436(1-2), pp.798–805.
- Sinha, V.R. et al., 2010. Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) -Trends and Implications in Drug Targeting. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(3), pp.212–238.
- Sipoli, C.C. et al., 2015. Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. *Biochemical Engineering Journal*, 94, pp.65–73.
- Skandrani, N. et al., 2014. Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging. *Nanoscale*, 6(13), p.7379.
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T., 2008. *Principios de análisis instrumental*, Cengage Learning Editores.
- Sosnik, A., 2013. Reversal of multidrug resistance by the inhibition of ATP-binding cassette pumps employing “Generally Recognized As Safe” (GRAS) nanopharmaceuticals: A review. *Advanced drug delivery reviews*, 65(13-14), pp.1828–51.
- De Souza, A.L.R. et al., 2014. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of the schistosomiasis treatment. *International journal of pharmaceutics*, 463(1), pp.31–37.
- Strand, S.P. et al., 2010. Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31(5), pp.975–987.
- Suñe, C. et al., 1997. CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Molecular and cellular biology*, 17(10), pp.6029–6039.

T

Tabatt, K. et al., 2004. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), pp.155–162.

Tadros, T.F., 2013. *Emulsion formation and stability*, Weinheim: Wiley-VCH.

Tan, S. et al., 2011. Adsorption of chitosan onto carbonaceous surfaces and its application: Atomic force microscopy study. *Nanotechnology*, 22(15).

Thomasy, S.M. et al., 2014. Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: epithelium to endothelium. *Acta biomaterialia*, 10(2), pp.785–91.

Tracqui, P. et al., 2011. Mapping elasticity moduli of atherosclerotic plaque in situ via atomic force microscopy. *Journal of structural biology*, 174(1), pp.115–23.

V

Valeur, E. & Bradley, M., 2009. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society reviews*, 38(2), pp.606–631.

Vauthier, C., Zandanel, C. & Ramon, A.L., 2013. Chitosan-based nanoparticles for in vivo delivery of interfering agents including siRNA. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(5), pp.406–418.

Vercauteren, D. et al., 2012. On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: mechanisms and methods. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), pp.566–81.

Vighi, E. et al., 2011. Structural investigation and intracellular trafficking of a novel multicomposite cationic solid lipid nanoparticle platform as a pDNA carrier. *Therapeutic Delivery*, 2(11), pp.1419–1435.

Vighi, E. et al., 2013. Design flexibility influencing the in vitro behavior of cationic SLN as a nonviral gene vector. *International journal of pharmaceutics*, 440(2), pp.161–169.

Vighi, E. et al., 2010. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 389(1–2), pp.254–261.

Vighi, E. et al., 2007. Re-dispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors: Characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(2), pp.320–328.

Vighi, E. et al., 2012. The role of protamine amount in the transfection performance of cationic SLN designed as a gene nanocarrier. *Drug delivery*, 19(1), pp.1–10.

Vimal, S. et al., 2013. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. *Acta tropica*, 128(3), pp.486–93.

Voet, D. & Voet, J.G., 2004. Biochemistry. Hoboken. *John Wiley & Sons*, 1, p.591.

W

Wang, D. & Gao, G., State-Of-The-Art Human Gene Therapy: Part I. Gene Delivery Technologies. *Discovery Medicine*, 18(97), pp.67–77.

Weber, S., Zimmer, A. & Pardeike, J., 2014. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 86(1), pp.7–22.

Wilson, K. & Walker, J.M., 2000. *Principles and techniques of practical biochemistry*, Cambridge University Press.

Wong, H.L. et al., 2007. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 59(6), pp.491–504.

X

Xue, H.Y. & Wong, H.L., 2011. Tailoring nanostructured solid-lipid carriers for time-controlled intracellular siRNA kinetics to sustain RNAi-mediated chemosensitization. *Biomaterials*, 32(10), pp.2662–2672.

Y

Yang, X. et al., 2009. Low molecular weight chitosan in DNA vaccine delivery via mucosa. *International journal of pharmaceutics*, 375(1–2), pp.123–132.

Yang, Y. et al., 2014. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology advances*, 32(7), pp.1301–16.

Yasir, M. & Sara, U.V.S., 2014. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: in vitro drug release and pharmacokinetics evaluation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(6), pp.454–463.

Yin, H. et al., 2014. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 15(8), pp.541–555.

Younes, I. et al., 2014. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International journal of food microbiology*, 185, pp.57–63.

Z

Zabner, J. et al., 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), pp.18997–19007.

Zhang, J. et al., 2006. Design of Nanoparticles as Drug Carriers for Cancer Therapy. *Cancer Genomics Proteomics*, 3(3-4), pp.147–157.

Zhao, X. et al., 2006. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 112(2), pp.223–8.

Zhou, Y., Zhang, C. & Liang, W., 2014. Development of RNAi technology for targeted therapy--a track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 193, pp.270–81.

Annex I

Aquesta tesi doctoral es complementa amb 2 articles científics publicats i 2 contribucions a congressos (annex 1):

ARTICLES

Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles

Fàbregas A, Miñarro M, García-Montoya E, Pérez-Lozano P, Carrillo C, Sarrate R, Sánchez N, Ticó JR, Suñé-Negre JM

International Journal of Pharmaceutics (2013) (Índex d'impacte: 3,650)
Volum: 446, Número: 1-2, Pàgines: 199-204

A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid

Fàbregas A, Sánchez-Hernández N, Ticó JR, García-Montoya E, Pérez-Lozano, Suñé-Negre JM, Hernández-Munain C, Suñé C, Miñarro M

International Journal of Pharmaceutics (2014) (Índex d'impacte: 3,650)
Volum: 473, Número: 1-2, Pàgines 270-279

CONTRIBUCIONS A CONGRESSOS

SEFIG (2013)

Efecto de los Componentes de la formulación en el tamaño de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN).

A. Fàbregas, M. Miñarro, E. García-Montoya, P. Pérez-Lozano, N. Sánchez, C. Carrillo, R. Sarrate, J.M. Suñé-Negre, J.R. Ticó

NANOBIO&MED (2014)

Thermal stability of a cationic solid lipid nanoparticleS (cSLN) formulation as a possible biocompatibility indicator

A. Fàbregas, M. Miñarro, E. García-Montoya, P. Pérez-Lozano, J.M. Suñé-Negre, J.R. Ticó