

Inés Serrano Sevilla

Desarrollo de nanocápsulas  
polisacarídicas para el transporte  
de agentes terapéuticos y estudio  
de sus interacciones con sistemas  
biológicos

Director/es

Martínez de la Fuente, Jesús  
De Matteis, Laura

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE NANOCÁPSULAS  
POLISACARÍDICAS PARA EL TRANSPORTE DE  
AGENTES TERAPÉUTICOS Y ESTUDIO DE SUS  
INTERACCIONES CON SISTEMAS BIOLÓGICOS

Autor

Inés Serrano Sevilla

Director/es

Martínez de la Fuente, Jesús  
De Matteis, Laura

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2020



**DESARROLLO DE NANOCÁPSULAS  
POLISACARÍDICAS  
PARA EL TRANSPORTE DE AGENTES TERAPÉUTICOS  
Y ESTUDIO DE SUS INTERACCIONES  
CON SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
por la Universidad de Zaragoza

Inés Serrano Sevilla

Directores:

Jesús Martínez de la Fuente  
Laura De Matteis



Programa de doctorado en Bioquímica y Biología Molecular  
Zaragoza, 2020



D. Jesús Martínez de la Fuente, investigador científico titular del ICMA-CSIC del grupo de Biofuncionalización de Nanopartículas y Superficies de la Universidad de Zaragoza y Dña. Laura De Matteis, investigadora del mismo grupo

INFORMAN:

Que Inés Serrano Sevilla, graduada en Biotecnología y con título de Máster en Biología Molecular y Celular, ha realizado en el grupo de Biofuncionalización de Nanopartículas y Superficies de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección el trabajo descrito en la presente memoria, que lleva por título “Desarrollo de nanocápsulas polisacarídicas para el transporte de agentes terapéuticos y estudio de sus interacciones con sistemas biológicos”, y que presenta para optar al grado de Doctor con mención de Doctorado Internacional.

Zaragoza, 2020

Dr. Jesús Martínez de la Fuente

Dra. Laura De Matteis



# Agradecimientos

Parece mentira que después de escribir tantísimas hojas de esta tesis ahora llegue a esta parte y no sepa ni cómo empezar. Va a ser muy difícil expresar todo el agradecimiento que siento por todas las personas que me han acompañado y apoyado durante esta etapa de mi vida, sin las cuales ahora no estaría escribiendo estas líneas.

Por supuesto, agradecer a mis directores de tesis, **Jesús Martínez de la Fuente y Laura De Matteis**, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias **Jesús** por ser un jefe tan cercano, incluso desde la lejanía de tus viajes. Me has enseñado a intentar dar siempre el 200 % de mí. A **Laura**, gracias por guiarme durante todos estos años con tanta dedicación, incluso cuando ya no trabajabas en el INA. Me has inculcado valores muy importantes, como la perseverancia, la formalidad y la rigurosidad tanto en lo que hacemos como en lo que decimos los científicos. Además, me has enseñado a gestionar mejor el tiempo y a saber priorizar en momentos críticos de estrés.

Gracias también a todos los compis de labo, cada uno a su manera hacen de este grupo una gran familia.

Empiezo con el equipo capsulero, también conocido como “pequeñas capsutopos” por la gran agudeza visual de todas ellas. A **Sonia**, gracias por todos los favorcillos que me has hecho estos años (quedamos en que te escribiría un capítulo de tu tesis en recompensa, pero ahora que sé lo que es, mejor lo cambiamos por otra cosa jajaja). Ha sido muy divertido trabajar contigo, aún recuerdo la semana fantástica en la que nos quedamos sin jefa y no hubo ningún percance...guiño guiño. A **María pequeña**, que es todo corazón, ternura y generosidad. Curiosamente fuiste mi maestra cuando llegué y mi querida alumna cuando volviste. Conseguiste difundir mi apodo, “Nessie”, y lo voy a echar mucho de menos.

A todos los que estabais en el grupo cuando llegué hace ya 6 años y ya no estáis, gracias por acogerme cálidamente e iniciarme en el mundo nano. **Isa, Elena, Miriam. Ana Claro**, fue un placer tenerte como tutora al inicio. **Yuli**, siempre he admirado tu energía, fuerza interior y positivismo. Gracias por preocuparte por mí cuando viniste de estancia, por tu comprensión y disposición para ayudar en todo momento. **Graz**, gracias por transmitirme tu pasión por las celulitas y por enseñarme a hacer mi primera fijación con tanta ilusión. **Clarita**, aunque no coincidimos mucho tiempo en el INA me alegro de haberte visto en otras ocasiones por Zgz, eres un encanto de persona. **Xabico**, qué guay era cuando estabas por el labo y animabas el ambiente con tu buen rollo. Además, hemos

compartido excursiones, partidos, piscineo, cenas, visitas en calidad de comercial...gracias por todos esos momentos. Aún tenemos pendiente ese partido de tenis en el que voy a reventarte.

A los que empezasteis conmigo formando el grupo "INAFiltrados": **Sandra, Lou, Vito, Álvaro**, cuántas risas cayeron esos primeros meses. Gracias también a todos los que habéis ido pasando por el grupo desde mi llegada, durante más o menos tiempo, y desafortunadamente os habéis ido: **Eva, Marcos, David, Lou, Teresa, Arantxa, Sona, Ilaria** (bueno, tú sí que has vuelto y en calidad de jefaza ;)), **David, Oihane, Guillermo, Alfredo, Francesca, Chiara, Inés B., Fran, Lydia, Rodrigo, Sara B., Paula, Vanesa, Carmen, Belén, Agustín, Florencia, Joaquín, Tom, Mark...** De una manera u otra habéis dejado huella en mí y guardo muy buenos recuerdos de vosotros.

A todos los becarios, tanto de la "stress office" como del despacho de refugiados, ahora convertido en la "fresh office". Gracias a mis compis de despacho, **Bea, Lily, Sonia, Álvaro** y **Rafi**, por todos esos viajes y planes que hemos hecho juntos fuera del labo, al final hemos cumplido bastante bien la lista de "planes por hacer", sobre todo **Raramjim** que consiguió llevar a su equipo de baloncesto a la victoria. **Bea**, eres para mí una gran amiga y confidente, has sabido escucharme y aconsejarme en los momentos más difíciles. Espero que ya me hayas perdonado el desliz de haber pasado tus células en vez de las mías jajaja. **Lily**, menos mal que te tenemos a ti para revivir las anécdotas graciosas con todo lujo de detalles, flipo con tu memoria. Hemos compartido penas y frustraciones, pero también grandes momentos de felicidad, en Marruecos y Cuba entre muchos otros. **Soni**, te he mencionado antes, ya vale de protagonismo jajaja. **Álvaro**, a la vez empezamos nuestras andaduras por el INA y a la vez las acabaremos. Ha sido un placer compartir la experiencia del doctorado contigo y poder trabajar mano a mano en el laboratorio. Gracias por todos los buenos momentos. **Rafi**, el canario del grupo, aunque ya medio maño, siempre fiel a su tierra y enseñándonos un poquito de la cultura de los guanches. Gracias por preocuparte siempre por mí y acceder a quitar el aire acondicionado cuando hacía fleje de pelete, aunque tú te estuvieras asando como un pollo.

Gracias a la "fresh office": **Vito, Francesca, Héctor, Regi, Alba, Edu** y **Yilian**. Gracias por el cariño que me habéis mostrado y los buenos ratos que me habéis hecho pasar. Me gustaría haber estado más tiempo con vosotr@s, pero cuando pienso en el frío que habéis pasado en ese despacho doy gracias por haber estado en el mío jajaja.

A **Silvia, Isa** y **Gabi**, aunque estéis un poco más desperdigad@s he tenido el placer de compartir con vosotr@s muchos cafés, comidas, cenas... **Sil**, siempre tan cariñosa y loca a partes iguales, seguiremos comunicándonos en balleno ;). **Isa**, gracias por hacerme sentir menos lenta cuando comemos juntas, también ha sido genial compartir bailoteos contigo y ¡espero que aprendamos a bailar con los sables algún día! **Gabi**, eres un crack

y una de las personas más valientes que conozco, es genial poder hablar contigo de cualquier cosa.

A **María M.**, mi tercera directora extraoficial. Ha sido un privilegio poder aprender de una gran científica y persona como tú. Gracias por guiarme con tanto interés y dedicación durante la parte más “bio” de la tesis, por preocuparte siempre por mí y por enseñarme a quitar importancia a las cosas que no la merecen. **Scott**, gracias por estar siempre de buen humor y ver el lado positivo de todo. Tu apoyo ha sido fundamental durante toda la tesis, y más aún durante la última etapa. **Ralu**, de ti guardo el mejor regalo, sin el cual no habría sobrevivido al frío del INA: la batamanta!! Gracias por ser tan cercana y dicharachera. **Laura A.**, gracias por enseñarme a trabajar con las células dendríticas, por contarme tu experiencia como post-doc y por preguntarme cómo llevo el final de la tesis cada vez que nos vemos. **Lucía**, “la psicóloga” del grupo, gracias por escucharme y aconsejarme en los momentos más difíciles. Has sido una inspiración para mí desde aquel seminario en el que nos explicaste cómo había sido tu carrera y me entraron ganas de seguir tus pasos (voluntariado + post-doc en Australia = top). **Rafa**, fuiste para mí como un padre durante los días que estuvimos de congreso en Grecia, no por tu edad (demasiado joven ;) ) sino por tu compañerismo y preocupación por mí. **Vale**, eres genial, me encanta tu forma de ver la vida, gracias por transmitir siempre esa tranquilidad y por alegrar los cafés con tus divertidas anécdotas. **Vanessa**, gracias por todas las muestras de cariño y apoyo que me has dado, qué bien me está viniendo tu consejo “ármate de paciencia” para aguantar el largo final de la tesis. **Íñigo**, tú sí que tienes paciencia con nosotros... Gracias por solucionar todos los problemillas técnicos que han ido surgiendo, aunque como bien dices a veces te llevemos como geisha por arrozal jajaja. A las administrativas más majas y eficaces que puede haber, **Mari Carmen** (alias MC), **Cristina Sierra** y **Marta Fajes**, gracias por vuestra ayuda e infinita paciencia para solucionar los problemas con el dichoso “papeleo”.

A las nuevas adquisiciones de este año: **Zsuzsa**, **Elena**, **Andrés**, **Isabel** y **Beatriz Torres**. Aunque no he podido coincidir mucho con vosotros parecéis gente estupenda y sé que el grupo se queda en muy buenas manos.

Gracias también a los miembros de la empresa Nanoimmunotech (**Carlitos**, **Sara P.**, **José María**, **Sara R.**, **Alberto**, **Inés**, **Chema**, **M<sup>a</sup> Antonieta**) por acogerme tan atentamente durante mis visitas, unas veces para usar el DLS y otras como vecina que en vez de pasar a pedir un poco de sal pasa a buscar reactivos para llevar al INA jajaja.

Me gustaría agradecer al grupo de Julián Pardo por hacerme sentir una más cuando me tocaba hacer experimentos en el CIBA. A todos aquellos con los que he podido compartir laboratorio y comidas: **Pilar**, **Llpsy**, **Maykel**, **Iratxe**, **Marcela**, **Ariel** y muy especialmente a **Laura Comas** por toda su ayuda y paciencia durante mis primeros pasos en el mundo de la citometría y con los experimentos que fueron viniendo después, así como por su enorme simpatía y bondad.

A los técnicos de los servicios de citometría y microscopía confocal del CIBA (**Javier Godino, César Vallejo y María Royo**), así como a los técnicos de los servicios de microscopía electrónica del INA (**Rodrigo Fernández y Carlos Cuestas**). Gracias por vuestra disposición, amabilidad y toda la ayuda y consejos que me habéis dado con los experimentos.

I also had the privilege to meet and work in an excellent group in London, the Pancrew. First of all, thank you **Prof. Steve Pereira** for accepting me in your lab and for your kindness. I am especially grateful to **Dr. Pilar Acedo**, who guided and helped me throughout the whole stay with dedication and empathy. You have been a very important support for me, both inside and outside the lab, and I am proud of considering you my mentor. Also, thank you **Ismahan, Andrés** and **Andrea** for helping me with some experiments and for being so nice people. Andrea, it was wonderful to share this experience with you and get lost together each time that we went out from our rooms, you were the best neighbor! **Navya** and **Sonal**, you are the sweetest students, I wish you luck and happiness in your next steps. Thank you very much to the rest of the Pancrew (**Alex, Peter, Diana, Johannes, Khadra, Shahida** and **Ponni**), who warmly welcomed me into their group and made me feel at home during the 3 months I spent in London.

No puedo olvidarme de agradecer a mis queridas Amebas: **Vicky, Muri, Pirulera, Luiso, Martus y AnaRo**. Aunque estemos desperdigadas por el mundo siempre estáis ahí para compartir alegrías y penas. El coronavirus nos ha fastidiado nuestro último viaje pero sé que volveremos a vernos pronto, y mientras tanto a tope con las videoconferencias.

**Raquel**, desde aquel fantástico año del erasmus has sido un pilar muy importante en mi vida. Ha sido una suerte poder seguir juntas en Zaragoza desde entonces y aunque no sabemos dónde pararemos el año que viene sé que seguiremos igual de unidas.

A mi familia, gracias por haberme sabido escuchar en los momentos difíciles y por haberme cuidado tan bien. A todos mis abuel@s, tí@s y prim@s. En especial a **la mother, tía Salo** y **abuelica Angelines**, los pilares de esta familia matriarcal. Siempre están ahí ofreciéndose a ayudarte en lo que necesites y preparadas para repartir leches a quien me toque la moral. A mi **tío Miguel**, gracias por contagiarme tu pasión por la ciencia y mantenerme informada de los avances científicos en la biomedicina. Eres un divulgador “a la inversa”, transmitiendo conocimiento de ciudadano a científica. A mis hermanos, **chano Jaimo, chano Juano** y **tochi**. Cada uno a vuestra manera, me habéis dado ánimos y fuerzas para seguir adelante. A **Miriam**, por interesarse por mí y por mi tesis cada vez que nos vemos, admiro cómo sabes encontrar siempre el lado positivo de la vida.

Dani, aún no me creo la suerte que he tenido de conocerte y tenerte a mi lado durante estos últimos años. La etapa más chunga de la tesis ha sido mucho más llevadera gracias a tu constante apoyo y cariño. Gracias por hacerme reír y saber sacarme una sonrisa en los momentos de agobio.

# Índice

<b>Abstract</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	3
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1. Nanotecnología aplicada a la biomedicina .....	5
2. Nanomateriales para el transporte de principios activos .....	7
3. Nanotransportadores poliméricos .....	10
4. <b>Objetivos</b> .....	17
5. Referencias.....	18
<b>Capítulo 2. Desarrollo de nanocápsulas de quitosano y estudio de su interacción con sistemas biológicos</b>	
1. Introducción .....	27
2. Resultados y discusión .....	33
2.1. Optimización del método de síntesis de NCs de quitosano.....	33
2.2. Preservación de las NCs en forma sólida mediante agentes crioprotectores .....	39
2.3. Toxicidad e internalización de las NCs en células Vero.....	42
2.4. Marcaje fluorescente de las NCs.....	45
2.4.1. Fluoróforos seleccionados para el marcaje de las NCs .....	45
2.4.2. Encapsulación de fluoróforos.....	46
2.4.3. Funcionalización de la superficie con fluoróforos.....	53
2.4.4. Doble marcaje: encapsulación y funcionalización de la superficie .....	56
2.5. Internalización de las NCs marcadas fluorescentemente en células .....	57
2.6. Internalización de las NCs marcadas fluorescentemente en <i>Hydra vulgaris</i> .....	61
2.7. Biodistribución de las NCs marcadas fluorescentemente en ratones .....	64
3. Conclusiones.....	66
4. Materiales y Métodos .....	67
5. Agradecimientos .....	74
6. Referencias.....	75
<b>Capítulo 3. Funcionalización de la superficie de NCs de quitosano</b>	
1. Introducción .....	83
2. Resultados y discusión .....	87

2.1. Optimización de la funcionalización de la superficie .....	87
2.1.1. Método de funcionalización.....	87
2.1.2. Caracterización de las nanocápsulas funcionalizadas.....	89
2.1.3. Efecto de la funcionalización con PEG en sistemas biológicos .....	91
2.2. Funcionalización con trimanósido.....	96
2.2.1. Modulación de la respuesta de macrófagos .....	102
2.2.1.1. Internalización en macrófagos .....	102
3. Conclusiones.....	105
4. Materiales y métodos .....	105
5. Agradecimientos y colaboraciones .....	110
6. Referencias.....	111

#### **Capítulo 4. Transporte de TFDs en NCs de quitosano para terapia antimicrobiana**

1. Introducción .....	117
2. Resultados y discusión .....	119
2.1. Síntesis de nanocápsulas de quitosano cargadas con TFD.....	119
2.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación y carga de TFD .....	120
2.3. Estabilidad de las NCs cargadas con TFD en medios biológicos.....	124
2.4. Actividad <i>in vitro</i> de las TFD-NCs contra <i>S. aureus</i> .....	127
3. Conclusiones.....	128
4. Materiales y métodos .....	129
5. Agradecimientos .....	132
6. Referencias.....	132

#### **Capítulo 5. Transporte de siRNA en NCs y evaluación *in vitro* del silenciamiento génico y la localización intracelular**

1. Introducción .....	137
2. Resultados y discusión .....	142
2.1. Encapsulación de siRNA en NCs recubiertas de quitosano .....	142
2.2. Encapsulación de siRNA en NCs recubiertas de xantano .....	145
2.3. Evaluación del silenciamiento génico en células HeLa-GFP .....	145
2.3.1. Citometría de flujo .....	146
2.3.2. Western Blot .....	153
2.3.3. RT-qPCR.....	155
2.4. Internalización de siRNA-NCs en células HeLa .....	157
2.4.1. Marcaje fluorescente de las NCs y el siRNA.....	158
2.4.2. Colocalización en células HeLa .....	160
3. Conclusiones.....	178

4. Materiales y métodos .....	178
5. Agradecimientos .....	185
6. Referencias.....	186
<b>Capítulo 6. Aplicación de la tecnología de internalización fotoquímica para el silenciamiento génico</b>	
1. Introducción .....	193
2. Resultados y discusión .....	197
2.1. Tratamiento de PCI dirigido a endolisosomas.....	197
2.1.1. Citotoxicidad del fotosensibilizador TPPS2a .....	197
2.1.2. Citotoxicidad de TPPS2a combinado con NCs.....	198
2.1.3. Silenciamiento de GFP tras el tratamiento con NCs y PCI.....	200
2.1.4. Colocalización del siRNA con lisosomas tras el fototratamiento .....	202
2.2. Tratamiento de PCI dirigido a mitocondrias .....	206
2.2.1. Citotoxicidad del fotosensibilizador BPD-MA y combinación con NCs .....	206
2.2.2. Silenciamiento de GFP tras el tratamiento con NCs y PCI.....	208
2.2.3. Colocalización del siRNA con mitocondrias tras el fototratamiento .....	209
3. Conclusiones.....	212
4. Materiales y métodos .....	213
5. Agradecimientos .....	215
6. Referencias.....	215
<b>Capítulo 7. Encapsulación de nanopartículas de oro en NCs de quitosano para administración oral</b>	
1. Introducción .....	219
2. Resultados y discusión .....	222
2.1. Optimización de la encapsulación de AuNPs .....	222
2.2. Influencia del recubrimiento de las AuNPs en su encapsulación.....	226
2.3. Protección ante fluidos gastrointestinales simulados.....	230
2.4. Biocompatibilidad e internalización en células epiteliales colorrectales.....	233
3. Conclusiones.....	238
4. Materiales y métodos .....	238
5. Agradecimientos .....	244
6. Referencias.....	244
<b>General conclusions</b> .....	249
<b>Conclusiones generales</b> .....	253
<b>Lista de publicaciones</b> .....	257
<b>Abreviaturas</b> .....	259



# Abstract

The use of nanocarriers for the delivery of therapeutic agents in the human body allows to overcome many of the current limitations of pharmacotherapy. Nanocarriers may increase the local concentration of the drug and achieve a stronger therapeutic response, allowing to reduce the dose and frequency of administration and, consequently, the side effects and economic cost of the treatment.

Among the different types of nanocarriers that have been investigated during the last decades, polymeric nanocapsules are an optimal nanocarrier due to their great versatility, stability and ease of functionalisation. In this thesis, polymeric nanocapsules have been developed and their potential for the loading and delivery of several active agents with biomedical applications has been evaluated.

After an appropriate optimisation of the synthesis, encapsulation and characterisation methods, the obtained nanocapsules have demonstrated a great capability to encapsulate, in an efficient and stable way, transcription factor decoys (TFD) for antibacterial therapy, small interfering RNA (siRNA) for gene silencing, gold nanoparticles for oral administration and fluorophores for *in vitro* and *in vivo* tracking of the nanocapsules. An effective strategy has also been established to functionalise the nanocapsules by binding polyethylene glycol (PEG), trimannoside and DY-780 molecules to their surface in a highly controlled manner.

In addition to the synthesis and physico-chemical characterisation of all these types of nanocapsules, their interaction with biological systems has been investigated, mainly regarding the cellular toxicity, efficacy of the delivered biomolecule and intracellular localisation. It has been shown that nanocapsules effectively protect the loaded active agent against degradation and instability in biological media. They also increase drastically the internalisation of the delivered agent into the cells in an extremely fast way compared to other nanocarriers described in the literature.

In conclusion, the promising results obtained demonstrate the potential of these nanocapsules as drug nanocarriers for biomedical applications.



# Resumen

El uso de nanotransportadores para vehiculizar los agentes terapéuticos en el cuerpo humano permite superar muchas de las limitaciones actuales de la farmacoterapia. Los nanotransportadores permiten incrementar la concentración local de principio activo y alcanzar una mayor respuesta terapéutica, lo que permite reducir la dosis y la frecuencia de administración y, en consecuencia, los efectos secundarios y el coste económico del tratamiento.

Entre los distintos tipos de nanotransportadores que se han investigado durante las últimas décadas, las nanocápsulas poliméricas constituyen un nanotransportador óptimo debido a su gran versatilidad, estabilidad y facilidad de funcionalización. En esta tesis se han desarrollado nanocápsulas poliméricas y se ha evaluado su potencial para la incorporación y el transporte de diversos agentes activos con aplicaciones biomédicas.

Tras una apropiada optimización de los métodos de síntesis, encapsulación y caracterización, las nanocápsulas obtenidas han demostrado una gran capacidad para encapsular, de forma eficiente y estable, señuelos de factores de transcripción (TFD) para terapia antibacteriana, RNA interferente pequeño (siRNA) para silenciamiento génico, nanopartículas de oro para administración oral y fluoróforos para el seguimiento *in vitro* e *in vivo* de las nanocápsulas. También se ha establecido una efectiva estrategia para funcionalizar las nanocápsulas mediante la unión a su superficie, de forma altamente controlada, de moléculas de poli(etilenglicol) (PEG), trimanósido y DY-780.

Además de la síntesis y caracterización físico-química de todos estos tipos de nanocápsulas, se ha investigado su interacción con sistemas biológicos, principalmente en relación a la toxicidad celular, eficacia de la biomolécula transportada y localización intracelular. Se ha demostrado que las nanocápsulas protegen eficazmente al agente activo encapsulado frente a la degradación e inestabilidad en medios biológicos. También aumentan drásticamente la internalización del agente transportado en las células de una forma extremadamente rápida en comparación con otros nanotransportadores descritos en la literatura.

En conclusión, los prometedores resultados obtenidos demuestran el potencial de estas nanocápsulas como nanotransportadores de principios activos para aplicaciones biomédicas.



# Capítulo 1

## Introducción

### 1. NANOTECNOLOGÍA APLICADA A LA BIOMEDICINA

La nanotecnología es el área de conocimiento dedicada al diseño y desarrollo de nanomateriales, con numerosas aplicaciones como la medicina, la agricultura, la electrónica, las energías renovables, la ecología o la industria textil, entre otras muchas [1,2]. Sorprendentemente, no existe todavía un consenso universal sobre la definición de nanomaterial, pudiendo encontrarse en literatura opiniones divergentes al respecto [3]. Algunas organizaciones defienden que un nanomaterial, para ser considerado como tal, debe poseer al menos una de sus dimensiones con un tamaño inferior a 100 nm [4–6]. Sin embargo, comúnmente se utiliza el prefijo "nano" para incluir también estructuras que exceden de 100 nm y son inferiores a un micrómetro, generalmente de unos pocos cientos de nanómetros, especialmente en el campo de la administración de fármacos [7,8]. De hecho, varios productos nanotecnológicos con tamaños superiores a 100 nm, principalmente con aplicación en nanomedicina, han sido aprobados por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) y están disponibles comercialmente, como Abraxane (130 nm) y Myocet (180 nm) [9,10].

Como consecuencia de su pequeño tamaño, los nanomateriales poseen propiedades y funciones nuevas o mejoradas, en comparación con las de sus homólogos de tamaño macroscópico [11]. Conforme se reduce el tamaño de los materiales, aumenta la relación superficie/volumen. Por ello, la cantidad de átomos en la superficie de los nanomateriales puede representar hasta el 90 % de su masa total, dando como resultado una mayor reactividad e incluso la aparición de nuevas características ópticas, electrónicas, magnéticas y químicas [2]. Por ejemplo, las nanopartículas de oro dan lugar a un fenómeno óptico llamado resonancia de plasmón superficial (SPR) que las hace muy útiles para algunas aplicaciones biomédicas, como la terapia fototérmica o los sensores ópticos [12,13]. Otro ejemplo son los quantum dots, que son nanoestructuras semiconductoras con propiedades fluorescentes, por lo que son muy interesantes como biosensores y agentes de contraste para imagen [14,15]. También las nanopartículas magnéticas pueden utilizarse como agente de contraste en técnicas de imagen por

resonancia magnética (IRM, MRI en inglés), gracias a sus distintas propiedades magnéticas cuando su tamaño es nanométrico [16,17].

Por otro lado, el rango de tamaños de los nanomateriales es similar al de las macromoléculas y algunas entidades biológicas, como el ácido desoxirribonucleico (DNA, 2 nm de grosor y 10-100 nm de longitud), las proteínas (5-50 nm de diámetro) o los virus (aproximadamente 100 nm), y más pequeño que el de bacterias (1-2  $\mu\text{m}$ ) y células eucariotas (10-100  $\mu\text{m}$ ) (Figura 1) [18,19]. Esto facilita la interacción entre los nanomateriales y el cuerpo humano, lo que ha aumentado el interés científico por la aplicación de la nanotecnología a la salud y ha supuesto una gran revolución en el campo de la medicina, surgiendo así la rama de la nanomedicina [7].

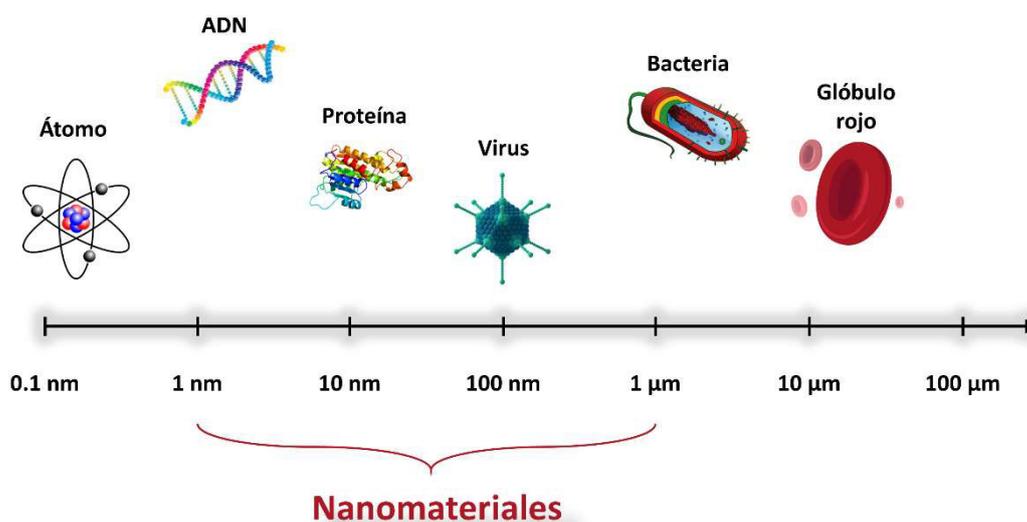


Figura 1. Escala de tamaño que compara las dimensiones de los nanomateriales con el de algunas macromoléculas y entidades biológicas.

Según la Fundación Europea de la Ciencia (ESF, por sus siglas en inglés), “la nanomedicina utiliza herramientas de tamaño nanométrico para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, así como para obtener una mayor comprensión de la compleja fisiopatología subyacente a la enfermedad. El objetivo final es mejorar la calidad de vida” [20]. Las tres áreas principales de la nanomedicina incluyen: 1) diagnóstico mediante nanobiosensores [21] e imagen [22], 2) terapia basada en el nanotransporte de fármacos [23,24] y en la medicina regenerativa [25] y 3) prevención de enfermedades mediante el desarrollo de vacunas [26] y algunos cosméticos, como la crema solar con nanopartículas que bloquean los rayos ultravioletas [7] (Figura 2). En el ámbito de la nanomedicina aplicada al tratamiento de enfermedades, esta tesis se centra en el desarrollo de nanopartículas que sirvan como vehículo para transportar principios activos en el cuerpo humano.

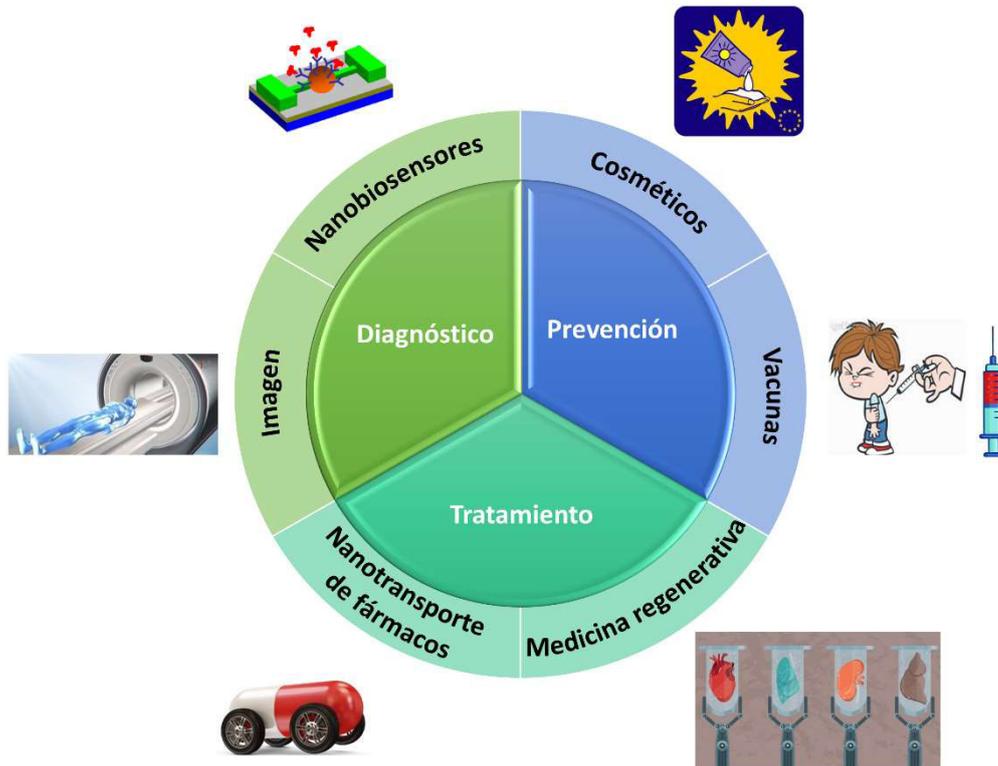


Figura 2. Principales áreas de la nanomedicina, que incluyen el diagnóstico (imagen y nanobiosensores), prevención (cosméticos y vacunas) y tratamiento (medicina regenerativa y nanotransporte de fármacos).

## 2. NANOMATERIALES PARA EL TRANSPORTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS

Un nanotransportador es un nanomaterial utilizado como un vehículo para otra sustancia, por ejemplo, un principio activo o un biomarcador [27,28]. El uso de nanotransportadores permite superar muchas de las limitaciones actuales de la farmacoterapia.

En primer lugar, la baja solubilidad en medio acuoso de algunos principios activos limita su biodisponibilidad y dificulta su uso terapéutico [29]. Se estima que entre el 40 y el 70 % de los nuevos compuestos químicos que entran en los programas de desarrollo de fármacos poseen una solubilidad acuosa insuficiente para permitir una absorción gastrointestinal que asegure la eficacia terapéutica [30]. La encapsulación de estos principios activos en nanotransportadores con una superficie hidrofílica permite aumentar su solubilidad acuosa y, a la vez, mejorar su estabilidad química. Este es el caso del paclitaxel, un compuesto anticancerígeno cuya baja solubilidad en agua aumentó considerablemente al ser incorporado a una nanopartícula basada en albúmina, lo que permitió su aprobación para uso clínico bajo el nombre comercial Abraxane® en 2005 [31]. En segundo lugar, el nanotransportador puede proteger al principio activo frente a la degradación enzimática y evitar su rápida excreción. Esto prolonga el tiempo de circulación en sangre y modifica el perfil farmacocinético en favor de la biodisponibilidad del principio activo [32]. En tercer lugar, la nanotecnología puede

ayudar a solucionar uno de los principales problemas de la farmacoterapia: la falta de selectividad para tratar la zona afectada por la patología sin dañar los órganos y tejidos sanos [33,34].

La biodistribución del principio activo puede ser mejorada mediante distintas estrategias de vectorización, que pueden ser activas o pasivas [35]. La vectorización pasiva se basa en la acumulación de los nanotransportadores en el tejido patológico gracias al aumento de la permeabilidad de la vasculatura, lo que permite su extravasación en ese lugar. Esta permeabilidad alterada se produce específicamente en las áreas afectadas por algunas patologías, como los tumores o las infecciones, pero no en los tejidos sanos, lo que reduce los efectos adversos del tratamiento [36]. Este efecto se conoce como efecto de permeabilización y retención (EPR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el transporte de principios activos no siempre puede beneficiarse del efecto EPR, ya que éste depende de numerosos factores. Por ejemplo, en el caso de tumores depende de la diversidad del microambiente tumoral, la heterogeneidad entre tumores, el flujo sanguíneo y el desorden de los vasos sanguíneos [37,38]. Por ello, actualmente se buscan estrategias que aumenten la afinidad del nanotransportador por su sitio diana de forma activa. La principal estrategia para conseguir una vectorización activa consiste en la unión de ligandos específicos al nanotransportador, de forma que puedan ser reconocidos selectivamente por sus receptores en la superficie de las células de interés. A pesar de que se está investigando la unión de ligandos muy variados, entre ellos anticuerpos, ácido fólico, transferrina, péptidos, lectinas y carbohidratos [39–43], actualmente no hay ningún fármaco en el mercado que utilice la vectorización activa, aunque algunos se encuentran en ensayos clínicos [44,45].

Por último, los nanotransportadores pueden ser diseñados para liberar de forma controlada el principio activo que transportan en la zona y momento de interés al recibir un estímulo determinado. Estos estímulos pueden ser internos (pH [46,47], temperatura [46], enzimas específicas [48] o potencial redox [49]) o externos (exposición a un campo magnético o eléctrico [50,51], a ultrasonidos [52], o a radiación luminosa [53]). Por ejemplo, la diferencia de pH en algunos tejidos o compartimentos intracelulares puede desencadenar la liberación del principio activo transportado por nanopartículas sensibles al pH, aumentando la biodisponibilidad en el sitio diana [47].

Todas estas ventajas proporcionadas por el uso de nanotransportadores permiten alcanzar una mayor concentración local de principio activo y una mayor respuesta terapéutica, lo que permite disminuir la dosis y la frecuencia de administración y, en consecuencia, los efectos secundarios y el coste económico del tratamiento [54].

En las últimas décadas, se han desarrollado muchos tipos de nanotransportadores para la administración de agentes terapéuticos o de diagnóstico, gracias a las importantes ventajas que ofrecen en función de sus propiedades físico-químicas. El tipo de nanotransportador y el proceso de formulación deben elegirse teniendo en cuenta

el objetivo terapéutico y la vía de administración, ya que las propiedades físico-químicas del nanotransportador van a determinar su comportamiento *in vitro* e *in vivo* [55].

El impresionante progreso en la ciencia de materiales y farmacéutica ha permitido el desarrollo de una amplia gama de nanotransportadores con diferentes tamaños, estructuras y propiedades de superficie, que pueden clasificarse en poliméricos, lipídicos o inorgánicos (Figura 3) [28,56,57].

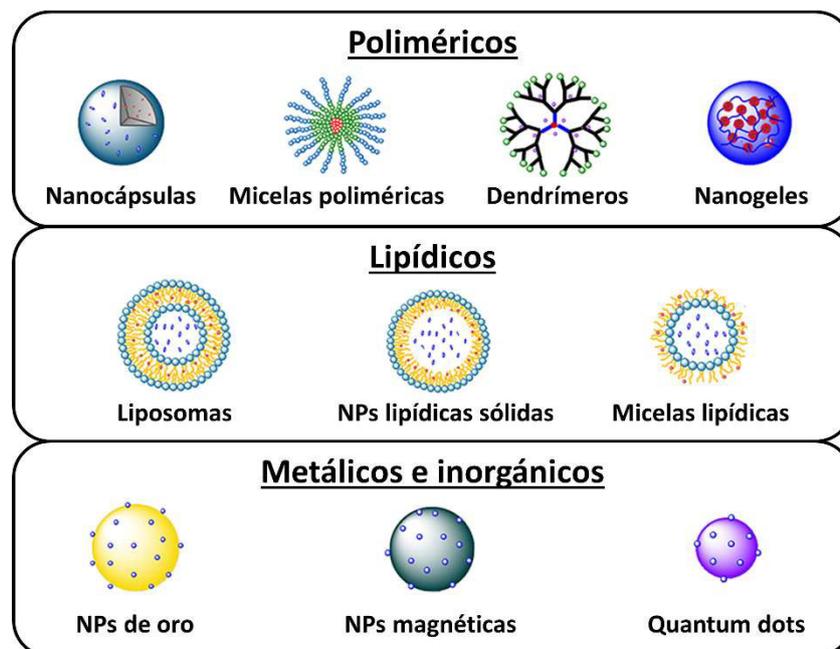


Figura 3. Clasificación de los principales nanotransportadores en poliméricos, lipídicos y metálicos e inorgánicos. Adaptado de Conriot *et al.* [28].

Los nanoliposomas fueron los primeros nanotransportadores desarrollados y aprobados. Su composición lipídica los hacía muy atractivos por su habilidad para fusionarse con las bicapas lipídicas y atravesar así las membranas celulares. Sin embargo, su rápida degradación en la circulación sanguínea y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) dio paso a una segunda generación de nanoliposomas con la superficie modificada para conseguir una mayor vida media en circulación [28,58,59].

Por otro lado, los nanomateriales inorgánicos también se han utilizado como nanotransportadores y, aprovechando sus propiedades magnéticas, ópticas y electrónicas, frecuentemente son usados para aplicaciones de terapia y diagnóstico simultáneos (también conocido como teragnóstico). No obstante, también poseen serias limitaciones, como la toxicidad y la ineludible modificación de la superficie, lo que puede aumentar el costo de procesamiento. [60,61]

Como alternativa a la inestabilidad de los liposomas surgieron también las nanopartículas (NPs) poliméricas. Entre las múltiples ventajas ofrecidas por los sistemas poliméricos nanométricos para la administración de principios activos destacan la

flexibilidad de los métodos de síntesis supramoleculares, la gran diversidad de polímeros respecto a sus propiedades y composición, su facilidad de funcionalización, su estabilidad y la posibilidad de modular el perfil de liberación del principio activo [62–64].

### 3. NANOTRANSPORTADORES POLIMÉRICOS

Los nanotransportadores poliméricos son adecuados para el atrapamiento y transporte de una amplia gama de agentes terapéuticos. La matriz polimérica previene la degradación del principio activo y puede liberarlo de forma controlada. El peso molecular y composición del polímero, así como la relación principio activo/polímero, pueden ser modificados para optimizar la duración y el grado de liberación del principio activo [65]. Además, las propiedades de superficie de este tipo de nanotransportador son especialmente importantes para aplicaciones biomédicas ya que pueden determinar el mecanismo de internalización en las células y su localización intracelular [66]. Por ello, frecuentemente se utilizan polímeros con grupos funcionales que permitan la modificación química de la superficie [59]. No obstante, la selección del polímero debe tener en cuenta no sólo sus propiedades funcionales, sino también su comportamiento biológico. Normalmente se prefieren los polímeros biocompatibles y biodegradables, con una baja toxicidad e inmunogenicidad y alta capacidad para degradarse en el cuerpo humano, evitando así su acumulación y la necesidad de retirarlos [67].

A pesar de la multitud de polímeros con potencial para aplicaciones biomédicas, sólo unos pocos han obtenido la aprobación de las autoridades sanitarias. Entre ellos, el quitosano, alginato, derivados de la celulosa, polietilenglicol (PEG) y el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) han sido aprobados por la FDA y otros organismos regulatorios para diferentes aplicaciones médicas [68–70].

La enorme variedad de nanotransportadores poliméricos descritos en la literatura hacen difícil establecer una clasificación sistemática de todos ellos. Atendiendo a su estructura, pueden diferenciarse cuatro grupos principales: micelas poliméricas, dendrímeros, nanogeles o nanocápsulas [28].

Las micelas poliméricas están compuestas por copolímeros bloque anfifílicos que pueden autoensamblarse formando sistemas esféricos flexibles bajo ciertas condiciones de concentración o temperatura (Figura 4) [71]. Son estructuras supramoleculares formadas por un núcleo interior hidrofóbico, rodeado y estabilizado en el agua por una corona exterior hidrofílica [72]. El núcleo hidrofóbico es idóneo para la incorporación de moléculas hidrofóbicas [73,74].

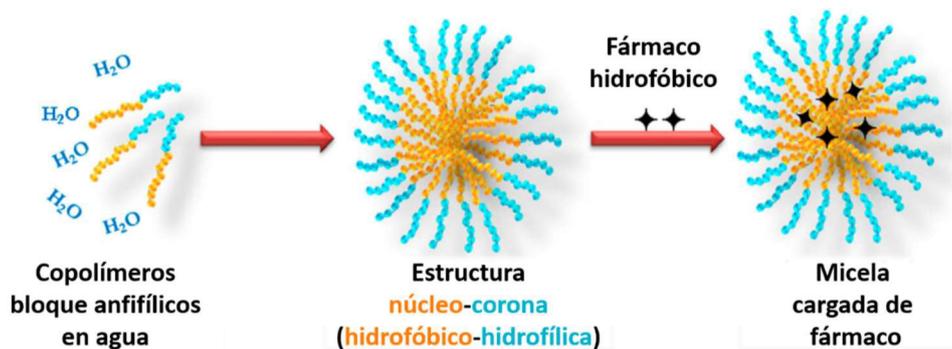


Figura 4. Estructura y proceso de formación de micelas poliméricas para la incorporación de fármacos hidrofóbicos. Adaptado de Hussein *et al.* [73].

A diferencia de las micelas, los dendrímeros son nanoestructuras esféricas hiper-ramificadas, formados por un núcleo central, monómeros ramificados y grupos periféricos funcionales [28,75], como se representa en la Figura 5. Los principios activos pueden incorporarse tanto en el núcleo interior como en la superficie ramificada, de forma covalente o electrostática [66,76,77]. Su gran número de grupos funcionales puede utilizarse para la conjugación de principios activos y para la vehiculización dirigida [72,78].

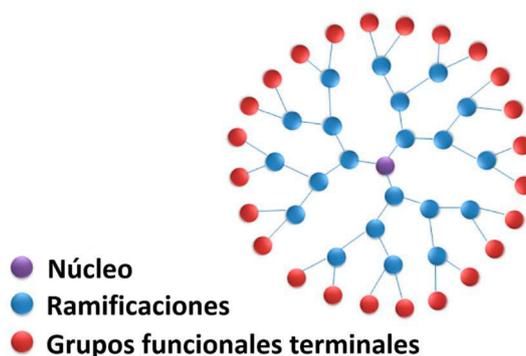


Figura 5. Estructura general de un dendrímero. Adaptado de Araújo *et al.* [75].

Otro tipo de nanotransportadores poliméricos son los nanogel (o nanopartículas de hidrogel), que consisten en redes tridimensionales altamente hidratadas de cadenas poliméricas entrecruzadas electrostática o covalentemente [79–81]. Para obtener los nanogel a menudo se utilizan polímeros capaces de hincharse en respuesta a estímulos ambientales (como la temperatura o el pH), permitiendo una liberación controlada del principio activo [82–84] (Figura 6).

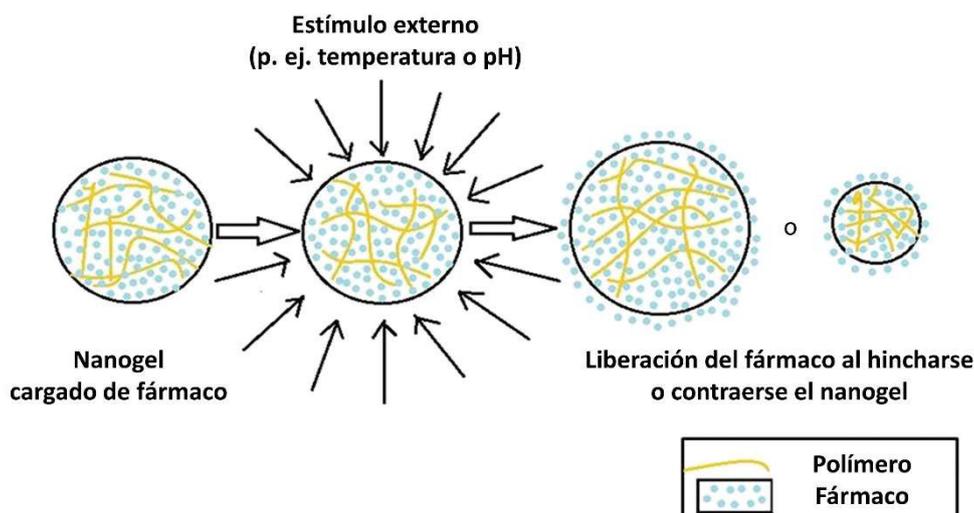


Figura 6. Liberación controlada del fármaco atrapado en el nanogel, en respuesta a un estímulo externo que provoca que el nanogel se hinche o se contraiga. Adaptado de Kendre *et al.* [85].

Además de las micelas poliméricas, los dendrímeros y los nanogeles, otros nanotransportadores muy importantes son las nanocápsulas, que son objeto de esta tesis. Las nanocápsulas están formadas por una cubierta polimérica que rodea un núcleo, que puede ser líquido o sólido, exhibiendo así una estructura de tipo núcleo-cubierta (*core-shell*) [27,86]. Aunque frecuentemente se utilizan para la encapsulación de principios activos en el núcleo, las nanocápsulas también pueden ser cargadas con el principio activo en la cubierta o incluso en la superficie mediante conjugación (Figura 7).

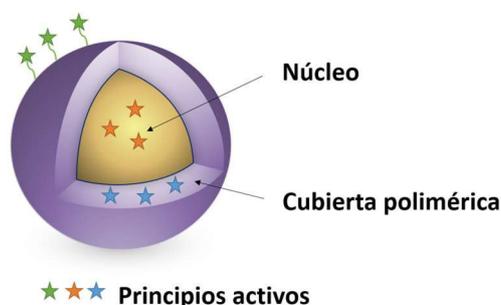


Figura 7. Estructura de una nanocápsula que posibilita el transporte de principios activos atrapados en su núcleo, cubierta polimérica, o unidos a su superficie.

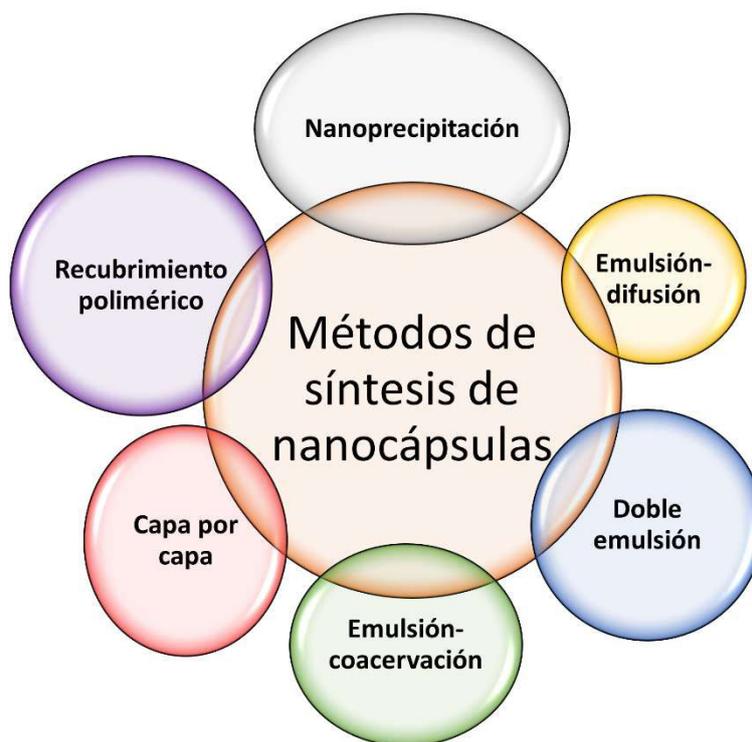
Las principales ventajas de las nanocápsulas poliméricas son la elevada capacidad de carga gracias a la compatibilidad del principio activo con el núcleo y el aumento de la estabilidad del principio activo. Cuando el principio activo se alberga en el interior de la nanocápsula, queda protegido por la cubierta polimérica, reduciendo así su degradación por factores externos, como el pH, la luz o las enzimas, a la vez que se evita su liberación masiva e indeseada (conocido como efecto *burst* en la literatura [87]) [72,88]. En este sentido, la liberación del principio activo encapsulado en el núcleo puede producirse de forma controlada a través de la cubierta polimérica, cuya permeabilidad puede variar en respuesta a estímulos específicos [89]. Sin embargo, las nanocápsulas también

pueden transportar el principio activo en su superficie o atrapado en la cubierta polimérica, según la compatibilidad de la sustancia activa con los distintos compartimentos de la cápsula [90].

En el campo de la administración de fármacos principalmente se han desarrollado nanocápsulas con un núcleo hidrofóbico y una cubierta hidrofílica [91]. El interior hidrofóbico permite mejorar el transporte de fármacos poco solubles en agua, mientras que el exterior hidrofílico confiere estabilidad al nanotransportador en medios de dispersión acuosos, como la sangre, y a la vez puede albergar principios activos hidrofílicos. Sin embargo, también se están investigando otras combinaciones núcleo-cubierta, por ejemplo, cápsulas con un núcleo hidrofílico para la encapsulación de moléculas hidrofílicas [92] o con una cubierta compuesta por polímeros anfifílicos formando una bicapa que permite atrapar moléculas hidrofóbicas (esta última denominada polimerosoma por su analogía con los liposomas) [93]. Otra variante son las nanocápsulas con múltiples cubiertas o multi-capa, que se fabrican alternando la deposición de polímeros cargados de forma opuesta sobre partículas coloidales que sirven de molde, seguido de la eliminación selectiva del molde [72].

Existe una gran variedad de métodos que pueden utilizarse para preparar nanocápsulas poliméricas, en función de las propiedades físico-químicas del polímero seleccionado y del compuesto activo que se desea encapsular [94]. La mayoría de los métodos de síntesis de nanocápsulas constan de dos etapas [95]. En la primera etapa se realiza una emulsión y en la segunda etapa se obtienen las nanocápsulas propiamente dichas al formarse la cubierta polimérica alrededor del núcleo de emulsión. En el caso de la nanoemulsión se necesita una fase disolvente y otra no disolvente, que generalmente se llaman fase orgánica y acuosa, respectivamente, ya que para la primera se suele utilizar un disolvente orgánico y para la segunda, agua.

Los métodos de síntesis de nanocápsulas se clasifican en dos categorías generales, según el procedimiento para obtener la cubierta polimérica: 1) a partir de polímeros preformados y 2) polimerización *in situ* de monómeros [96,97]. Aunque las técnicas de polimerización *in situ* confieren un alto grado de control sobre la estructura del polímero, generalmente son más complicadas que la emulsión con polímeros previamente preparados y además requieren de aditivos potencialmente tóxicos [98,99]. Dado que las nanocápsulas de esta tesis han sido sintetizadas a partir de un polímero preformado, en esta sección se describen los principales métodos para sintetizar nanocápsulas utilizando polímeros preformados (Figura 8).



**Figura 8. Principales métodos para sintetizar nanocápsulas poliméricas a partir de polímeros preformados.**

#### Método de nanoprecipitación

También llamado método de desplazamiento de disolvente o método de deposición interfacial, el método de nanoprecipitación fue inicialmente presentado por Fessi y colaboradores [100]. En este método, la fase orgánica contiene el polímero, el principio activo lipofílico, un aceite en el que sea soluble el principio activo y un surfactante lipofílico, disueltos en un disolvente o una mezcla de disolventes miscibles con agua [90,101]. Por otro lado, la fase acuosa contiene uno o más surfactantes disueltos. La adición de surfactantes mantiene la estabilidad de las suspensiones de nanopartículas durante más tiempo y su naturaleza y concentración influyen en el tamaño de las partículas obtenidas [96,101,102]. Al añadir la fase orgánica sobre la fase acuosa, lentamente y bajo agitación moderada, la rápida difusión del disolvente orgánico hacia la fase acuosa da lugar a la formación espontánea de núcleos de nanoemulsión, sobre cuya interfase precipita el polímero al desolvatarse, formando la cubierta de la nanocápsula. [59,91,99,103–105]

#### Método de emulsión-difusión

El método de emulsión-difusión se parece al de nanoprecipitación en el sentido de que se basa en la formación de una emulsión de aceite en agua con el polímero disuelto en la fase orgánica [91,103]. En cambio, en este método la emulsión no se produce de

forma espontánea sino utilizando técnicas de alta energía. Además, el proceso se realiza en dos etapas en vez de una, ya que una vez obtenida la emulsión se añade una fase adicional, la fase de dilución, que causa la difusión del disolvente orgánico fuera de los núcleos de nanoemulsión, resultando en la deposición del polímero alrededor de los núcleos y, por ende, en la formación de las nanocápsulas. [106–109]

#### Método de doble emulsión

La doble emulsión, también llamada “emulsión de emulsión”, se produce mediante dos etapas [110]. En primer lugar, se prepara una emulsión primaria para dispersar lo que constituirá la fase interna en la fase intermedia. En segundo lugar, esta emulsión primaria es dispersada en la fase externa mediante una segunda emulsión [111].

La doble emulsión puede clasificarse en dos tipos principales: emulsión agua-aceite-agua (w/o/w, en inglés) y aceite-agua-aceite (o/w/o) [110,112]. La emulsión w/o/w es la más utilizada para la encapsulación de principios activos ya que, a diferencia de otros métodos, permite la encapsulación de moléculas muy hidrofílicas, como los ácidos nucleicos o algunas proteínas, siendo esta una de las principales limitaciones de la emulsión simple de aceite en agua (o/w) [104,112].

#### Método de emulsión-coacervación

El proceso de emulsión-coacervación se presenta principalmente como una estrategia para preparar nanocápsulas a partir de polímeros naturales, como las proteínas y los polisacáridos de origen natural, aunque también pueden utilizarse polímeros sintéticos [90].

A diferencia de los métodos expuestos en los apartados anteriores, en este caso el polímero se disuelve en la fase acuosa. El primer paso consiste en la formación de una emulsión tipo aceite en agua (o/w) bajo agitación mecánica o ultrasonidos [91]. Después, se realiza un proceso de coacervación simple, que consiste en disminuir la solvatación del polímero [113,114], mediante modificación de la temperatura, adición de electrolitos (entonces denominado *salting-out*), como el cloruro de calcio o el sulfato de sodio, o adición de agentes de deshidratación, como el isopropanol [111,115]. La preparación de nanocápsulas mediante este método utiliza los núcleos de nanoemulsión como molde para la formación del coacervado, causando la precipitación del polímero de la fase continua de emulsión para formar un recubrimiento fino de polímero alrededor del núcleo de nanoemulsión, que da lugar a la cubierta de la nanocápsula. Finalmente, el proceso de coacervación puede complementarse con un paso adicional de entrecruzamiento del polímero, con el objetivo de obtener una cubierta polimérica más rígida.

### Método de recubrimiento polimérico

La principal diferencia de este método con los anteriores es que el polímero se añade después de haberse formado la nanoemulsión. Se pueden utilizar distintas estrategias para depositar una fina capa de polímero en la superficie de los núcleos de nanoemulsión preformados [90].

En el método de recubrimiento polimérico propuesto por Prego y colaboradores primero se prepara la nanoemulsión y después se mezcla con una solución acuosa de polímero para recubrirla [116]. En este caso, la formación de este recubrimiento está mediada por la interacción iónica entre los fosfolípidos de la nanoemulsión cargados negativamente y las moléculas del polímero de quitosano cargadas positivamente.

Por otro lado, también es posible partir de una nanoemulsión tipo agua en aceite. Este es el caso de Paiphansiri y colaboradores, que formaron este tipo de nanoemulsión mediante sonicación y después añadieron una solución de polímero disuelto en diclorometano a la fase orgánica continua de la nanoemulsión, provocando la precipitación del polímero mediante evaporación del disolvente [117].

Además, para aumentar la rigidez y compactación del recubrimiento, se puede entrecruzar las cadenas del polímero electrostática (si el polímero presenta carga electrostática) o covalentemente. Una de las técnicas de entrecruzamiento más utilizadas para la obtención de nanotransportadores con aplicaciones biomédicas es la gelificación iónica [81]. Este método se basa en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre las cadenas de polímero cargadas y un ion o poli-ion cargado de forma opuesta, que actúa como entrecruzador iónico. Los entrecruzadores iónicos más utilizados son los iones de bajo peso molecular, tales como las sales de sulfato y el cloruro de calcio, y entrecruzadores poli-iónicos como el tripolifosfato de sodio (TPP). La gelificación iónica ofrece ventajas, entre las que se incluyen unas condiciones de preparación suaves y procedimientos experimentales sencillos [66]. Por otro lado, el entrecruzamiento covalente puede utilizarse para mejorar la estabilidad coloidal de las nanocápsulas en entornos fisiológicos. Los entrecruzadores covalentes más frecuentemente utilizados son el glutaraldehído y el formaldehído, pero su uso en la administración de fármacos es limitado debido a su alta toxicidad [79–81].

### Método capa por capa (*layer-by-layer*)

El método de síntesis capa por capa fue desarrollado por Sukhorukov y colaboradores para la preparación de partículas coloidales mediante el autoensamblaje de polielectrolitos, también llamadas cápsulas de polielectrolitos [118]. Para ello, se requiere una partícula coloidal que actúe como molde para la adsorción, mediante atracciones electrostáticas irreversibles, de una capa de polímero a su alrededor, ya sea mediante incubación en una solución sobresaturada de polímero o disminuyendo la solubilidad del polímero [119]. Tras lavar para retirar el exceso de polímero, se repite

este proceso con un segundo polímero de carga opuesta, y así sucesivamente hasta conseguir múltiples capas de polímero depositadas de forma secuencial [120]. Como molde para la deposición de los polímeros pueden utilizarse desde núcleos de nanoemulsión, partículas inorgánicas, partículas orgánicas de látex o nanocristales del propio fármaco hasta agregados de proteínas, DNA en forma compacta o incluso células [121–125]. Opcionalmente, este núcleo molde puede ser eliminado al final del proceso, dando lugar a nanocápsulas vacías [119,126,127].

#### 4. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha consistido en desarrollar nanocápsulas poliméricas para la encapsulación y transporte de distintos agentes activos (biomoléculas y nanopartículas) y evaluar mediante ensayos *in vitro* su potencial para aplicaciones biomédicas.

El **capítulo 2** describe el procedimiento seleccionado para la síntesis de nanocápsulas (NCs) de quitosano, así como la investigación de algunos factores clave para su optimización. También se ha desarrollado un método para preservar las NCs durante su almacenaje a largo plazo mediante el uso de agentes crioprotectores. Las NCs obtenidas han sido caracterizadas mediante distintas técnicas para analizar sus propiedades físico-químicas y se ha evaluado su interacción con sistemas biológicos, en particular su toxicidad e internalización celular. Para ello, se ha optimizado el marcaje de las NCs con distintos fluoróforos.

El **capítulo 3** se ha centrado en la funcionalización de la superficie de las NCs de quitosano, primero con polietilenglicol (PEG) y después con trimanósido, para modular sus propiedades de superficie y se ha investigado el efecto de estos cambios en la interacción de las NCs con sistemas biológicos tras este proceso.

En el **capítulo 4** se ha llevado a cabo el atrapamiento en las NCs de quitosano desarrolladas de oligonucleótidos de DNA que actúan como señuelos de factores de transcripción (TFDs) para su aplicación en terapias antimicrobianas y la caracterización físico-química de los sistemas obtenidos en diferentes medios biológicos.

En el **capítulo 5** se han desarrollado NCs cargadas de RNA interferente pequeño (siRNA) y el método ha sido optimizado hasta alcanzar valores elevados de eficiencia de encapsulación y carga de siRNA. Además del recubrimiento de las NCs con quitosano, se ha explorado el recubrimiento con otro polímero distinto (xantano), con el objetivo de comparar su influencia sobre la eficiencia del silenciamiento génico, que ha sido evaluada *in vitro* mediante tres técnicas diferentes. Además, se ha analizado la localización intracelular de las NCs y el siRNA transportado por ellas mediante microscopía confocal.

En el **capítulo 6** se ha utilizado la novedosa tecnología de internalización fotoquímica (PCI), en combinación con las NCs cargadas de siRNA, para favorecer la liberación del

siRNA de los compartimentos intracelulares en los que se encuentra secuestrado y mejorar la eficiencia del silenciamiento génico.

En el **capítulo 7** se ha investigado la aplicación de las NCs de quitosano como plataforma para el transporte de nanopartículas de oro (AuNPs). Se ha estudiado la influencia del recubrimiento de superficie de las AuNPs sobre la eficiencia de encapsulación y se ha demostrado que la encapsulación mejora tanto la estabilidad de las AuNPs en medios gastrointestinales simulados como su internalización en células intestinales.

## 5. REFERENCIAS

1. Tsuzuki, T. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *Int. J. Nanotechnol.* **2009**.
2. Ramos, A.P.; Cruz, M.A.E.; Tovani, C.B.; Ciancaglini, P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 79–89.
3. Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y.S.; Dufresne, A.; Danquah, M.K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, *9*, 1050–1074.
4. European Commission Recomendación de la Comisión de 18 de Octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial. *D. Of. la Unión Eur.* **2011**, *696/EU*, 275/38-275/40.
5. Administration, D. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. *Biotechnol. Law Rep.* **2011**, *30*, 613–616.
6. ISO/TS 80004-1:2015(en), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms Available online: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en> (accessed on Oct 21, 2019).
7. Zare-Zardini, H.; Ferdowsian, F.; Soltaninejad, H.; Ghorani Azam, A.; Soleymani, S.; Zare-Shehneh, M.; Mofidi, M.; Rafati, R.; Ebrahimi, L. Application of Nanotechnology in Biomedicine: A Major Focus on Cancer Therapy. *J. Nano Res.* **2015**, *35*, 55–66.
8. Nobile, S.; Nobile, L. Nanotechnology for biomedical applications: Recent advances in neurosciences and bone tissue engineering. *Polym. Eng. Sci.* **2017**, *57*, 644–650.
9. Kaushik, A.; Jayant, R.D.; Nair, M. *Advances in Personalized Nanotherapeutics*; Kaushik, A., Jayant, R.D., Nair, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; ISBN 978-3-319-63632-0.
10. Bhardwaj, V.; Kaushik, A. Biomedical Applications of Nanotechnology and Nanomaterials. *Micromachines* **2017**, *8*, 298.
11. Roco, M. National Nanotechnology Initiative — Past, Present, Future. In; 2007; pp. 3-1-3–26.
12. Elahi, N.; Kamali, M.; Baghersad, M.H. Recent biomedical applications of gold

- nanoparticles: A review. *Talanta* **2018**, *184*, 537–556.
13. Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O.M.; Iati, M.A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29*, 203002.
  14. Park, Y.; Jeong, S.; Kim, S. Medically translatable quantum dots for biosensing and imaging. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2017**, *30*, 51–70.
  15. Wagner, A.M.; Knipe, J.M.; Orive, G.; Peppas, N.A. Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 44–63.
  16. Abd Elrahman, A.A.; Mansour, F.R. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles: Preparation, functionalization and biomedical application. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *52*, 702–712.
  17. Sun, C.; Lee, J.S.H.; Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1252–1265.
  18. de la Fuente, J.M.; Penadés, S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2006**, *1760*, 636–651.
  19. Liu, C.; Hu, G. High-throughput particle manipulation based on hydrodynamic effects in microchannels. *Micromachines* **2017**, *8*.
  20. ESF European science foundation policy briefing: ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine Available online: [http://archives.esf.org/fileadmin/Public\\_documents/Publications/Nanomedicine\\_01.pdf](http://archives.esf.org/fileadmin/Public_documents/Publications/Nanomedicine_01.pdf) (accessed on Oct 22, 2019).
  21. Bellan, L.M.; Wu, D.; Langer, R.S. Current trends in nanobiosensor technology. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2011**, *3*, 229–246.
  22. Mahmoudi, M.; Serpooshan, V.; Laurent, S. Engineered nanoparticles for biomolecular imaging. *Nanoscale* **2011**, *3*, 3007.
  23. Lombardo, D.; Kiselev, M.A.; Caccamo, M.T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, 1–26.
  24. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; Rodriguez-Torres, M.D.P.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 71.
  25. Zhang, L.; Webster, T.J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* **2009**, *4*, 66–80.
  26. Gheibi Hayat, S.M.; Darroudi, M. Nanovaccine: A novel approach in immunization. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 12530–12536.
  27. Zimmer, A.; Kreuter, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 61–73.
  28. Coniot, J.; Silva, J.M.; Fernandes, J.G.; Silva, L.C.; Gaspar, R.; Brocchini, S.; Florindo, H.F.; Barata, T.S. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for

- immune cell targeting and tracking. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 1–27.
29. Williams, H.D.; Trevaskis, N.L.; Charman, S.A.; Shanker, R.M.; Charman, W.N.; Pouton, C.W.; Porter, C.J.H. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 315–499.
  30. Neslihan Gursoy, R.; Benita, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 173–182.
  31. Desai, N. Increased Antitumor Activity, Intratumor Paclitaxel Concentrations, and Endothelial Cell Transport of Cremophor-Free, Albumin-Bound Paclitaxel, ABI-007, Compared with Cremophor-Based Paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 1317–1324.
  32. Su, C.; Liu, Y.; Li, R.; Wu, W.; Fawcett, J.P.; Gu, J. Absorption, distribution, metabolism and excretion of the biomaterials used in Nanocarrier drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 97–114.
  33. Kaplun, A.P.; Bezrukov, D.A.; Shvets, V.I. Rational design of nano- and micro-size medicinal forms of biologically active substances. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2011**, *47*, 711–717.
  34. Fernandez-Fernandez, A.; Manchanda, R.; McGoron, A.J. Theranostic Applications of Nanomaterials in Cancer: Drug Delivery, Image-Guided Therapy, and Multifunctional Platforms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *165*, 1628–1651.
  35. Lehner, R.; Wang, X.; Marsch, S.; Hunziker, P. Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9*, 742–757.
  36. Tamilvanan, S. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body. *Int. J. Pharm.* **2009**, *381*, 62–76.
  37. Hobbs, S.K.; Monsky, W.L.; Yuan, F.; Roberts, W.G.; Griffith, L.; Torchilin, V.P.; Jain, R.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 4607–4612.
  38. Ruoslahti, E.; Bhatia, S.N.; Sailor, M.J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 759–68.
  39. Irache, J.M.; Salman, H.H.; Gamazo, C.; Espuelas, S. Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 703–724.
  40. Lepenies, B.; Lee, J.; Sonkaria, S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1271–1281.
  41. Chaubey, P.; Mishra, B.; Mudavath, S.L.; Patel, R.R.; Chaurasia, S.; Sundar, S.; Suvarna, V.; Monteiro, M. Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against *Leishmania donovani*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 109–120.
  42. des Rieux, A.; Pourcelle, V.; Cani, P.D.; Marchand-Brynaert, J.; Pr eat, V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 833–844.

43. Salahpour Anarjan, F. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects* **2019**, *19*, 100370.
44. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–2387.
45. Ventola, C.L. Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. *P T* **2017**, *42*, 742–755.
46. Kim, J.-H.; Lee, T.R. Thermo- and pH-Responsive Hydrogel-Coated Gold Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3647–3651.
47. Du, J.-Z.; Du, X.-J.; Mao, C.-Q.; Wang, J. Tailor-Made Dual pH-Sensitive Polymer–Doxorubicin Nanoparticles for Efficient Anticancer Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17560–17563.
48. de la Rica, R.; Aili, D.; Stevens, M.M. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 967–978.
49. Luo, Z.; Cai, K.; Hu, Y.; Zhao, L.; Liu, P.; Duan, L.; Yang, W. Mesoporous Silica Nanoparticles End-Capped with Collagen: Redox-Responsive Nanoreservoirs for Targeted Drug Delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 640–643.
50. Hawkins, A.M.; Bottom, C.E.; Liang, Z.; Puleo, D.A.; Hilt, J.Z. Magnetic Nanocomposite Sol-Gel Systems for Remote Controlled Drug Release. *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1*, 96–100.
51. Ge, J.; Neofytou, E.; Cahill, T.J.; Beygui, R.E.; Zare, R.N. Drug Release from Electric-Field-Responsive Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 227–233.
52. Hussein, G.A.; Pitt, W.G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1137–1152.
53. Nomoto, T.; Fukushima, S.; Kumagai, M.; Machitani, K.; Arnida; Matsumoto, Y.; Oba, M.; Miyata, K.; Osada, K.; Nishiyama, N.; et al. Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3545.
54. Torchilin, V.P. *Nanobiomaterials Handbook*; Sitharaman, B., Ed.; Handbook of Experimental Pharmacology; CRC Press: Berlin, Heidelberg, 2016; Vol. 197; ISBN 9780429142383.
55. Mishra, B.; Patel, B.B.; Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 9–24.
56. Wilczewska, A.Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K.H.; Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64*, 1020–37.
57. Martinez, J.O.; Brown, B.S.; Quattrocchi, N.; Evangelopoulos, M.; Ferrari, M.; Tasciotti, E. Multifunctional to multistage delivery systems: The evolution of nanoparticles for biomedical applications. *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57*, 3961–3971.
58. Gálvez, P.; Ruiz, A.; Clares, B. El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: terapia celular, génica y nanomedicina. *Med. Clin. (Barc).* **2011**, *137*, 645–649.

59. Sur, S.; Rathore, A.; Dave, V.; Reddy, K.R.; Chouhan, R.S.; Sadhu, V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects* **2019**, *20*, 100397.
60. Sitharaman, B. *Nanobiomaterials Handbook*; Sitharaman, B., Ed.; CRC Press, 2016; ISBN 9780429142383.
61. Prasad, P.N. *Introduction to nanomedicine and nanobioengineering*; John Wiley & Sons, 2013; Vol. 50; ISBN 9781118093436.
62. Chen, W.; Meng, F.; Cheng, R.; Deng, C.; Feijen, J.; Zhong, Z. Advanced drug and gene delivery systems based on functional biodegradable polycarbonates and copolymers. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 398–414.
63. Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1147–1235.
64. Lassalle, V.; Ferreira, M.L. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 767–783.
65. Prabha, S.; Labhasetwar, V. Critical Determinants in PLGA/PLA Nanoparticle-Mediated Gene Expression. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 354–364.
66. Venditti, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *J. King Saud Univ. - Sci.* **2019**, *31*, 398–411.
67. Prajapati, S.K.; Jain, A.; Jain, A.; Jain, S. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *Eur. Polym. J.* **2019**, *120*, 109191.
68. Mansour, H.M.; Sohn, M.J.; Al-Ghananeem, A.; DeLuca, P.P. Materials for pharmaceutical dosage forms: Molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3298–3322.
69. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products Available online: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm> (accessed on Jan 20, 2020).
70. Buschmann, M.D.; Merzouki, A.; Lavertu, M.; Thibault, M.; Jean, M.; Darras, V. Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1234–1270.
71. das Neves, J.; Nunes, R.; Machado, A.; Sarmiento, B. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 53–70.
72. Kowalczyk, A.; Trzcinska, R.; Trzebicka, B.; Müller, A.H.E.; Dworak, A.; Tsvetanov, C.B. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 43–86.
73. Hussein, Y.; Youssry, M. Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: Enhanced Encapsulation of Hydrophobic Drugs. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*, 688.
74. Kwon, G.S.; Okano, T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *21*, 107–116.
75. Araújo, R.; Santos, S.; Igne Ferreira, E.; Giarolla, J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. *Molecules* **2018**, *23*, 2849.

76. Imae, T. Physicochemical Properties of Dendrimers and Dendrimer Complexes. In *Dendrimer-Based Drug Delivery Systems*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012; pp. 55–92 ISBN 9780470460054.
77. Tabatabaei Mirakabad, F.S.; Khoramgah, M.S.; Keshavarz F., K.; Tabar zad, M.; Ranjbari, J. Peptide dendrimers as valuable biomaterials in medical sciences. *Life Sci.* **2019**, *233*, 116754.
78. Pedziwiatr-Werbicka, E.; Milowska, K.; Dzmitruk, V.; Ionov, M.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M. Dendrimers and hyperbranched structures for biomedical applications. *Eur. Polym. J.* **2019**, *119*, 61–73.
79. Debele, T.A.; Mekuria, S.L.; Tsai, H.C. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *68*, 964–981.
80. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 83–99.
81. Wang, H.; Qian, J.; Ding, F. Recent advances in engineered chitosan-based nanogels for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6986–7007.
82. Kandil, R.; Merkel, O.M. Recent progress of polymeric nanogels for gene delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *39*, 11–23.
83. Hajebi, S.; Rabiee, N.; Bagherzadeh, M.; Ahmadi, S.; Rabiee, M.; Roghani-Mamaqani, H.; Tahiri, M.; Tayebi, L.; Hamblin, M.R. Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. *Acta Biomater.* **2019**, *92*, 1–18.
84. Chacko, R.T.; Ventura, J.; Zhuang, J.; Thayumanavan, S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 836–851.
85. Kendre, P.N.; Satav, T.S. Current trends and concepts in the design and development of nanogel carrier systems. *Polym. Bull.* **2019**, *76*, 1595–1617.
86. Singh, R.; Lillard, J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *86*, 215–223.
87. Vallet, M.; Doadrio, A.L. *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: Avances y perspectivas*; Vallet Regí, M., Doadrio Villarejo, A.L., Eds.; Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia de Farmacia: Madrid, 2006; ISBN 8493443018.
88. Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 185–199.
89. Szczepanowicz, K.; Bazylińska, U.; Pietkiewicz, J.; Szyk-Warszyńska, L.; Wilk, K.A.; Warszyński, P. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 678–691.
90. Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385*, 113–142.

91. Kapuścińska, A.; Olejnik, A.; Nowak, I. Nanocapsules as carriers of active substances. *Nanobiomaterials Galen. Formul. Cosmet.* **2016**, 175–199.
92. Vrignaud, S.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, 32, 8593–8604.
93. Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F.R.; Landfester, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 8572–8610.
94. Ahlin Grabnar, P.; Kristl, J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *J. Microencapsul.* **2011**, 28, 323–335.
95. Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* **2009**, 26, 1025–1058.
96. George, A.; Shah, P.A.; Shrivastav, P.S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *Int. J. Pharm.* **2019**, 561, 244–264.
97. Goto, P.L.; Vilela, J.M.C.; Andrade, M.S.; dos Santos, O.D.H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2013**, 34, 228–233.
98. Gharieh, A.; Khoee, S.; Mahdavian, A.R. Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, 269, 152–186.
99. dos Santos, P.P.; Flôres, S.H.; de Oliveira Rios, A.; Chisté, R.C. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, 53, 23–33.
100. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, 55, R1–R4.
101. Limayem Blouza, I.; Charcosset, C.; Sfar, S.; Fessi, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *Int. J. Pharm.* **2006**, 325, 124–131.
102. Ferranti, V.; Marchais, H.; Chabenat, C.; Orecchioni, A.; Lafont, O. Primidone-loaded poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *Int. J. Pharm.* **1999**, 193, 107–111.
103. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* **1998**, 15, 1056–1062.
104. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *AAPS PharmSciTech* **2005**, 6, E594–E604.
105. Mishra, B.; Patel, B.B.; Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, 6, 9–24.

106. Lee, M.-Y.; Min, S.-G.; You, S.-K.; Choi, M.-J.; Hong, G.-P.; Chun, J.-Y. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on physical properties of nanocapsules manufactured by emulsion–diffusion method. *J. Food Eng.* **2013**, *119*, 588–594.
107. Moinard-Checot, D.; Chevalier, Y.; Briançon, S.; Fessi, H.; Guinebretière, S. Nanoparticles for Drug Delivery: Review of the Formulation and Process Difficulties Illustrated by the Emulsion-Diffusion Process. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 2664–2681.
108. Moinard-Chécot, D.; Chevalier, Y.; Briançon, S.; Beney, L.; Fessi, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *317*, 458–468.
109. Zambrano-Zaragoza, M.L.; Mercado-Silva, E.; Gutiérrez-Cortez, E.; Castaño-Tostado, E.; Quintanar-Guerrero, D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion–diffusion method for food applications. *LWT - Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1362–1368.
110. Khadem, B.; Khellaf, M.; Sheibat-Othman, N. Investigating Swelling-Breakdown in Double Emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, 124181.
111. Khoee, S.; Yaghoobian, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2392–2399.
112. Iqbal, M.; Zafar, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 173–190.
113. Eghbal, N.; Choudhary, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT* **2018**, *90*, 254–264.
114. Timilsena, Y.P.; Akanbi, T.O.; Khalid, N.; Adhikari, B.; Barrow, C.J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 1276–1286.
115. De Matteis, L.; Alleva, M.; Serrano-Sevilla, I.; García-Embid, S.; Stepien, G.; Moros, M.; de la Fuente, J. Controlling Properties and Cytotoxicity of Chitosan Nanocapsules by Chemical Grafting. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 175.
116. Prego, C.; Fabre, M.; Torres, D.; Alonso, M.J. Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 549–556.
117. Paiphansiri, U.; Tangboriboonrat, P.; Landfester, K. Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets. *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 33–40.
118. Sukhorukov, G.B.; Donath, E.; Lichtenfeld, H.; Knippel, E.; Knippel, M.; Budde, A.; Möhwald, H. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *137*, 253–266.
119. Radtchenko, I.L.; Sukhorukov, G.B.; Möhwald, H. Incorporation of macromolecules into polyelectrolyte micro- and nanocapsules via surface controlled precipitation on colloidal particles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *202*, 127–133.
120. Agarwal, A.; Lvov, Y.; Sawant, R.; Torchilin, V. Stable nanocolloids of poorly soluble

- drugs with high drug content prepared using the combination of sonication and layer-by-layer technology. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 255–260.
121. Radtchenko, I.L.; Sukhorukov, G.B.; Möhwald, H. A novel method for encapsulation of poorly water-soluble drugs: precipitation in polyelectrolyte multilayer shells. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 219–223.
  122. Bago Rodriguez, A.M.; Binks, B.P. Capsules from Pickering emulsion templates. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *44*, 107–129.
  123. Zhang, Y.; Chi, C.; Huang, X.; Zou, Q.; Li, X.; Chen, L. Starch-based nanocapsules fabricated through layer-by-layer assembly for oral delivery of protein to lower gastrointestinal tract. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *171*, 242–251.
  124. Cui, J.; Fan, D.; Hao, J. Magnetic {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>}-embedded hybrid nanocapsules. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *330*, 488–492.
  125. Chen, Y.; Lin, X.; Park, H.; Greever, R. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2009**, *5*, 316–322.
  126. Liu, Y.; Yang, J.; Zhao, Z.; Li, J.; Zhang, R.; Yao, F. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *379*, 130–140.
  127. Belbekhouche, S.; Bousserhine, N.; Alphonse, V.; Le Floch, F.; Charif Mechiche, Y.; Menidjel, I.; Carbonnier, B. Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *181*, 158–165.

## Capítulo 2

# Desarrollo de nanocápsulas de quitosano y estudio de su interacción con sistemas biológicos

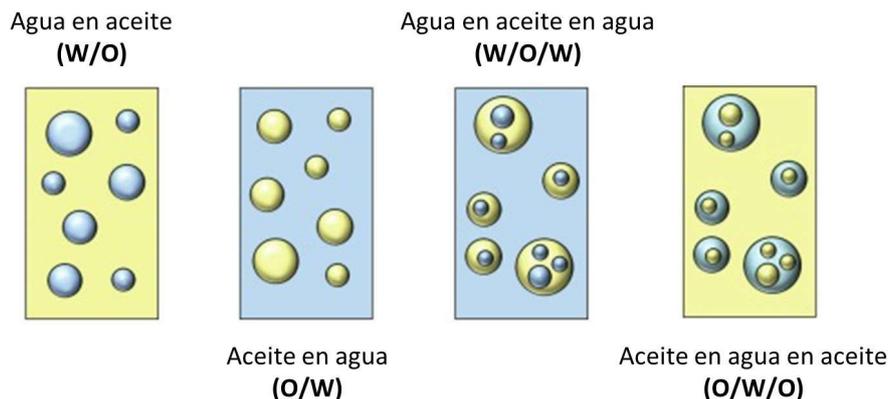
## 1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en el capítulo 1, existen distintos métodos para sintetizar nanocápsulas poliméricas. El método seleccionado va a determinar las propiedades físico-químicas de las nanocápsulas, las cuales influyen en sus interacciones con los sistemas biológicos. Teniendo en cuenta que las nanocápsulas de este trabajo han sido diseñadas para su aplicación como nanotransportadores de fármacos, es importante estudiar su toxicidad e internalización en las células. El marcaje fluorescente de las nanocápsulas es una herramienta muy útil para llevar a cabo estos estudios.

### 1.1. Síntesis de NCs recubiertas de quitosano

Las NCs son sistemas vesiculares, compuestas por un núcleo aceitoso o acuoso que se puede considerar como un reservorio en el que el fármaco está confinado, rodeado por una cubierta polimérica [1].

El núcleo de las NCs se puede obtener mediante un proceso de emulsión, que consiste en una dispersión de un líquido (fase dispersa) en forma de pequeñas partículas en el seno de otro líquido (fase continua) con el que no es miscible. Como representa la Figura 1, la emulsión puede ser directa (tipo “aceite en agua”, O/W), inversa (tipo “agua en aceite”, W/O) o múltiple (tipo “aceite en agua en aceite”, O/W/O, o “agua en aceite en agua”, W/O/W) [2,3].



**Figura 1. Tipos de nanoemulsiones según la disposición de las fases de agua y aceite. Adaptado de McClements *et al.* [3].**

La nanoemulsión es un tipo de emulsión en el que las partículas obtenidas tienen un rango de tamaño generalmente comprendido entre 20 y 600 nm [4,5]. El término nanoemulsión a menudo aparece en la literatura referido como miniemulsión [6], emulsión ultrafina [7] o emulsión submicrométrica [8,9], pero en esta tesis se prefiere utilizar la palabra “nanoemulsión” porque, además de dar una idea del tamaño nanométrico de las partículas, evita la confusión con el término “microemulsión”. Aunque a veces se confunden los términos “microemulsión” y “nanoemulsión” en algunos trabajos científicos, la principal diferencia entre ellos radica en que el primero es un proceso favorecido termodinámicamente mientras que el segundo no lo es [10]. Por esta razón, para obtener una nanoemulsión generalmente es necesario aportar energía al sistema, por ejemplo, en forma de calor o agitación [11].

Para generar nanoemulsiones se pueden utilizar diferentes estrategias, que pueden clasificarse en dos grupos: técnicas de emulsión de baja energía y de alta energía [10]. Las técnicas de alta energía, como los ultrasonidos, no son adecuados para encapsular moléculas frágiles como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos ya que pueden ocasionar la pérdida de funcionalidad de la molécula [12].

El método utilizado para la preparación de estas NCs es una técnica de baja energía descrita en la literatura como método de desplazamiento del disolvente. Consiste en una nanoemulsión espontánea de tipo “aceite en agua” originada por la difusión de un disolvente orgánico miscible en agua (etanol en este caso), desde la fase oleica hacia la fase acuosa cuando ambas son mezcladas [13].

Las características de las partículas obtenidas dependen de la espontaneidad del proceso de emulsión, que se ve afectado por la naturaleza de los componentes individuales de la mezcla de reacción, así como por la velocidad del proceso de mezcla [4,5]. Los componentes de las NCs de esta tesis fueron seleccionados para conseguir una emulsión espontánea, favorecida por la presencia de un surfactante hidrofílico no iónico en la fase acuosa (Tween 20®) y la combinación de un surfactante lipofílico no iónico

(Span 85®) y un aceite (ácido oleico) en la fase orgánica. No obstante, la separación de fases después de un cierto período de tiempo tras la preparación de nanoemulsiones es inevitable [14]. Dependiendo de la aplicación deseada, puede ser necesario un recubrimiento para aumentar la estabilidad de las partículas resultantes y mejorar las propiedades de la superficie.

Los recubrimientos más usados son de naturaleza polimérica, donde el polímero interactúa con la superficie de las partículas de nanoemulsión para originar una cubierta rígida y densa [10]. Esta interacción depende tanto del polímero como de la presencia y características físico-químicas de los surfactantes en la interfase de la nanoemulsión. Para las NCs de este capítulo se utilizó un recubrimiento de quitosano por ser uno de los polímeros naturales más ricos en grupos amino.

El quitosano es un polisacárido de naturaleza catiónica derivado de la deacetilación de la quitina, que puede extraerse del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, camarones, krill, etc.), insectos y de las paredes celulares de los hongos [15]. Su origen natural le confiere una gran biocompatibilidad y biodegradabilidad [16–20]. De hecho, el quitosano está actualmente aprobado por la FDA para ser aplicado como apósito para curar heridas y para uso dietético [21–23]. Es un polímero lineal que consiste en unidades repetidas de monómeros de N-acetil-glucosamina y N-glucosamina unidos por enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  [24]. Se sabe que tanto su grado de deacetilación como su peso molecular afectan significativamente a las propiedades de los materiales derivados [24,25]. Además, los grupos amino e hidroxilo presentes en las cadenas de quitosano facilitan su modificación química y, por lo tanto, la modulación de su estructura y propiedades funcionales [26]. Estos grupos amino primarios son también los responsables de la carga positiva que el quitosano exhibe predominantemente a pH ligeramente ácido (el  $pK_a$  de los grupos amino se encuentra en torno a 6.5 [27]).

Las interacciones entre el quitosano y los surfactantes no iónicos son generalmente débiles [28]. No obstante, en algunos casos como en las NCs de quitosano sintetizadas por Prego y colaboradores [29], si el polímero está cargado positivamente, el recubrimiento puede producirse simplemente al ponerlo en contacto con la nanoemulsión, debido a las interacciones electrostáticas que el polímero catiónico establece con los fosfolípidos del núcleo de nanoemulsión (cargados negativamente).

Sin embargo, existen estrategias para conseguir un recubrimiento más compacto y uniforme, como la gelificación iónica, que consiste en la adición de un ion multivalente capaz de entrecruzar electrostáticamente las cadenas de un polímero con carga opuesta [30]. Si además ese ion proviene de una sal como el sulfato de sodio, puede actuar como un reactivo de desolvatación que facilita el desplazamiento de la capa de solvatación que mantenía en estado coloidal al polímero. Esto favorece las interacciones entre las cadenas de polímero y entre el polímero y la superficie de las partículas de nanoemulsión, haciendo que la cubierta polimérica de las NCs sea más rígida [31].

En este trabajo de tesis se optimizó la síntesis y caracterización de NCs constituidas por un núcleo de nanoemulsión y una cubierta de quitosano, con el objetivo de obtener un nanotransportador dotado de múltiples compartimentos, donde puedan cargarse moléculas de interés con distintas propiedades físico-químicas. El núcleo de nanoemulsión permite la encapsulación tanto de moléculas hidrofóbicas como hidrofílicas, mientras que la cubierta de quitosano aumenta la estabilidad, previene la degradación del compuesto y ofrece grupos funcionales para una fácil modificación de la superficie, además de servir también de matriz donde pueden albergarse moléculas hidrofílicas, especialmente las de carga negativa, como los ácidos nucleicos.

El método de síntesis elegido permite la encapsulación del fármaco o molécula simplemente mediante su adición a la nanoemulsión o al quitosano durante la formación de las NCs. La principal ventaja, además de su simplicidad y bajo costo, consiste en ser un proceso completamente suave, lo que previene cualquier pérdida de funcionalidad de la molécula durante su encapsulación [5,32].

No obstante, una de las mayores limitaciones del uso de las nanopartículas es su inestabilidad físico-química cuando permanecen en suspensión mucho tiempo. Una estrategia para mejorar su estabilidad es eliminar el agua del sistema mediante liofilización. De hecho, muchos productos para aplicaciones farmacéuticas se conservan en forma sólida en vez de en suspensión líquida para prolongar su estabilidad.

## 1.2. Preservación de las NCs en forma sólida mediante agentes crioprotectores

La liofilización es un proceso ampliamente utilizado en la industria farmacéutica que consiste en la deshidratación de un producto a partir del congelado mediante sublimación y desorción a baja presión [33].

Las NCs son estructuras especialmente delicadas, ya que la fina cubierta polimérica que recubre el núcleo en estado líquido puede no soportar el estrés de la liofilización [34]. La etapa de congelación es considerada como la más agresiva y crítica durante la liofilización [35]. Durante esta etapa, las NCs pueden romperse y liberar su contenido [36], no sólo debido a la cristalización del agua de la solución, sino también por la posible solidificación del aceite del interior que puede provocar un aumento de volumen, seguido de la ruptura de la cubierta [35].

La adición de crioprotectores y lioprotectores ayuda a proteger la muestra del estrés que suponen los procesos de congelación y liofilización, durante los cuales las nanopartículas pueden verse dañadas o agregadas [37,38]. Aunque también se ha reportado el uso de surfactantes [38,39], los crioprotectores más populares encontrados en literatura para la liofilización de nanopartículas poliméricas son azúcares: trehalosa, sacarosa, lactosa, maltosa, glucosa y manitol, entre otros [40]. El mecanismo protector de estos excipientes se basa en la formación de una matriz amorfa

del azúcar en agua. La matriz amorfa puede formar puentes de hidrógeno con las nanopartículas, actuando como sustituta del agua, de forma que se evitan los efectos dañinos de los cristales de hielo [37,39].

Hay muchos parámetros de la formulación implicados en el éxito de la liofilización: la composición de las NCs (tipo de polímero, tipo y concentración de aceites y surfactantes), el tipo y concentración de los crioprotectores, las interacciones entre el crioprotector y las NCs y la modificación de la superficie de las NCs [40]. Por ello, el proceso de liofilización debe ser optimizado para cada tipo de NC. En esta tesis se ha realizado una optimización inicial del proceso de liofilización de NCs vacías, aunque el método desarrollado podría requerir modificaciones menores en función del tipo de molécula encapsulada en trabajos futuros.

### 1.3. Marcaje fluorescente de nanopartículas

Durante la última década ha crecido el interés por las moléculas y nanoestructuras fluorescentes debido a su gran potencial en áreas como la biología y la bioquímica, siendo muy atractivas para aplicaciones de bioimagen, sensores, diagnóstico y terapia [41,42]. Las nanopartículas fluorescentes se pueden clasificar en dos grupos: nanopartículas inorgánicas intrínsecamente fluorescentes, como los quantum dots, y nanopartículas no fluorescentes a las que se les ha incorporado un fluoróforo, como las poliméricas y las nanocápsulas. Las NCs poliméricas permiten tanto la funcionalización de su superficie con fluoróforos como la encapsulación de fluoróforos en su interior. Gazon y colaboradores exploraron la posibilidad de combinar estas dos estrategias para conseguir un doble marcaje de la misma nanopartícula, capaz de emitir fluorescencia a dos longitudes de onda distintas [42].

La longitud de onda de emisión del fluoróforo seleccionado para marcar las nanopartículas debe ir acorde a la aplicación deseada. Existe una amplia variedad de fluoróforos orgánicos con longitudes de onda de emisión entre 300 y 1000 nm. La mayoría de ellos emite fluorescencia en los rangos ultravioleta (300-400 nm) o visible (400-700 nm) del espectro electromagnético, aunque algunos son capaces de hacerlo en la región cercana al infrarrojo (NIR, 700-1400 nm) [43]. La primera ventana de la región NIR (700-1000 nm) es muy importante para aplicaciones de imagen *in vivo* por dos razones principales. En primer lugar, los tejidos biológicos absorben menos la luz NIR que la luz visible, por lo que los fotones NIR pueden penetrar más profundamente en el tejido que los fotones con longitudes de onda visibles, permitiendo así el análisis de las estructuras más profundas. En segundo lugar, los tejidos presentan menos autofluorescencia en la región NIR en comparación con la región visible, lo que permite obtener una mayor relación señal-fondo [41,44,45]. Sin embargo, el rendimiento cuántico (que es el cociente del número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos) de los fluoróforos que emiten en el rango NIR es significativamente menor que el de los fluoróforos que emiten en el rango visible [46–48]. Por esta razón, los

fluoróforos NIR suelen reservarse especialmente para aplicaciones *in vivo*, mientras que para aplicaciones *in vitro* la fluorescencia en el espectro visible es comúnmente utilizada.

En la mayoría de estudios de internalización celular, se suele utilizar la fluorescencia de las nanopartículas (ya sea una cualidad intrínseca o adquirida tras un marcaje fluorescente) para determinar su grado de internalización y su localización mediante técnicas como la citometría de flujo o la microscopía confocal.

#### 1.4. Toxicidad e internalización celular de nanopartículas de quitosano

Una de las ventajas del quitosano por el hecho de ser un polímero catiónico es que sus cargas positivas favorecen la interacción electrostática con la membrana celular, que posee una carga neta negativa, facilitando su aproximación e internalización en las células [1]. Estas cargas positivas derivan de los grupos amino en su forma protonada presentes en la estructura del quitosano, que además le confieren propiedades mucoadhesivas porque favorecen las interacciones electrostáticas con la carga negativa de la mucina, lo que resulta en una mejor interacción con los tejidos de la mucosa y con las células epiteliales [49,50]. Además, está descrito en la literatura que el quitosano puede promover el transporte paracelular a través del epitelio intestinal mediante la regulación de las uniones estrechas (“tight junctions”) de las células intestinales [51,52]. Por estas razones, el quitosano es especialmente valorado para aplicaciones donde es posible una administración oral, pulmonar, intranasal, vaginal o rectal [53–55].

A pesar del gran desarrollo actual en el campo de la química de polímeros, existe un número limitado de polímeros que sean aptos para aplicaciones biomédicas debido a los estrictos requerimientos en cuanto a toxicidad y biocompatibilidad [13].

Cada vez es más frecuente el uso de polímeros naturales para recubrir los nanotransportadores debido a su elevada biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad [56,57]. Entre ellos, el quitosano ya está aprobado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para uso dietético y como apósito para heridas [21] y ha sido utilizado durante las últimas dos décadas para multitud de aplicaciones, como el desarrollo de nanotransportadores de liberación controlada, vacunas, ingeniería de tejidos, suplementos alimenticios y formulaciones mucoadhesivas [21,58–60].

En este capítulo se describe la optimización del proceso para sintetizar NCs recubiertas de quitosano. Además, se ha desarrollado un método para preservar las NCs en estado sólido utilizando agentes crioprotectores, lo que permite mejorar la estabilidad de las NCs a largo plazo. Las NCs han sido caracterizadas en términos de tamaño, morfología, composición y potencial zeta, ya que las propiedades físico-químicas del nanotransportador van a determinar su comportamiento *in vitro* e *in vivo* [61]. Para poder evaluar las interacciones de las NCs con sistemas biológicos mediante técnicas basadas en fluorescencia, se ha optimizado el marcaje de las NCs con una serie de fluoróforos y se ha puesto a punto un abanico de NCs con distintas propiedades

fluorescentes. Gracias al trabajo conjunto con distintos grupos colaboradores, se estudiaron la toxicidad y la capacidad de internalización de las NCs tanto en cultivos celulares como en animales de distinta complejidad.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Optimización del método de síntesis de NCs de quitosano

Se eligió un método de nanoemulsión para sintetizar los núcleos de las NCs, seguido de un proceso de gelificación iónica para formar el recubrimiento de quitosano alrededor de cada núcleo. A partir de los métodos descritos en literatura, se evaluó el impacto de los tratamientos de sonicación y gelificación iónica en las propiedades de las NCs obtenidas con el fin de optimizar el protocolo de síntesis primando aspectos como la simplicidad y suavidad del proceso.

Para generar los núcleos de nanoemulsión se utilizó como base de partida el procedimiento descrito por Bouchemal y colaboradores, con algunas modificaciones [5]. Este procedimiento se basa en una nanoemulsión producida mediante el método de emulsión espontánea de aceite en agua. Para ello, sobre una fase acuosa que contiene un surfactante hidrofílico (Tween® 20) se añade, gota a gota y bajo agitación magnética, una fase orgánica constituida por un aceite (ácido oleico) y un surfactante lipofílico (Span® 85) disueltos en un disolvente miscible en agua (en nuestro caso etanol absoluto). Al añadir la fase orgánica sobre la acuosa, el disolvente orgánico difunde en la fase acuosa y se produce la nanoemulsión, generándose micelas de aceite estabilizadas gracias a la presencia de ambos surfactantes [5,62]. Estos núcleos de nanoemulsión forman el compartimento interior de las NCs.

Tras 15 minutos de agitación continua para asegurarnos de que el sistema alcance el equilibrio, se añade el quitosano y se induce el entrecruzamiento de sus cadenas mediante gelificación iónica. Como se ha descrito anteriormente, este proceso consiste en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre los grupos amino protonados del quitosano y un ion multivalente de carga negativa que actúa de gelificante. El agente gelificante seleccionado para estas NCs es una disolución de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sobre la que se añade la disolución anterior bajo sonicación. Al aumentar la fuerza iónica de la disolución, disminuye la solubilidad del quitosano, favoreciendo su deposición alrededor de los núcleos de nanoemulsión. Además de aumentar las interacciones entre el polímero y la superficie de los núcleos, la función principal del  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  es penetrar en la red de quitosano y producir interacciones entre las cadenas del polímero. Según Tavares y colaboradores, los iones sulfato divalentes no solo actúan como puentes entre los grupos amino protonados del quitosano, sino que desplazan el agua de hidratación de las cadenas, favoreciendo la interacción hidrofóbica entre ellas [63].

La concentración de la muestra final, una vez lavada mediante ultracentrifugación para eliminar el exceso de reactivos, se determinó a partir de su peso seco obtenido mediante liofilización de una alícuota. El Esquema 1 representa los distintos pasos del método de síntesis para la producción de NCs recubiertas de quitosano.



Esquema 1. Método de síntesis para la obtención de nanocápsulas recubiertas de quitosano.

Para analizar la morfología de las NCs obtenidas, éstas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión de campo claro (BF-TEM, Figura 2a) y microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, Figura 2b). La Figura 2b además muestra la distribución de tamaños estimada mediante ESEM. La gráfica representa el número de cápsulas en función del diámetro medido, representadas como porcentajes del número total de cápsulas medidas. Debido a la sensibilidad de la muestra ante estas técnicas por tratarse de un material blando, fue necesaria una fijación previa, deshidratación, tinción con tetróxido de osmio e inclusión en resina. Por lo tanto, lo que se observa en las imágenes es un corte ultrafino del bloque de resina en el que las NCs se incluyeron.

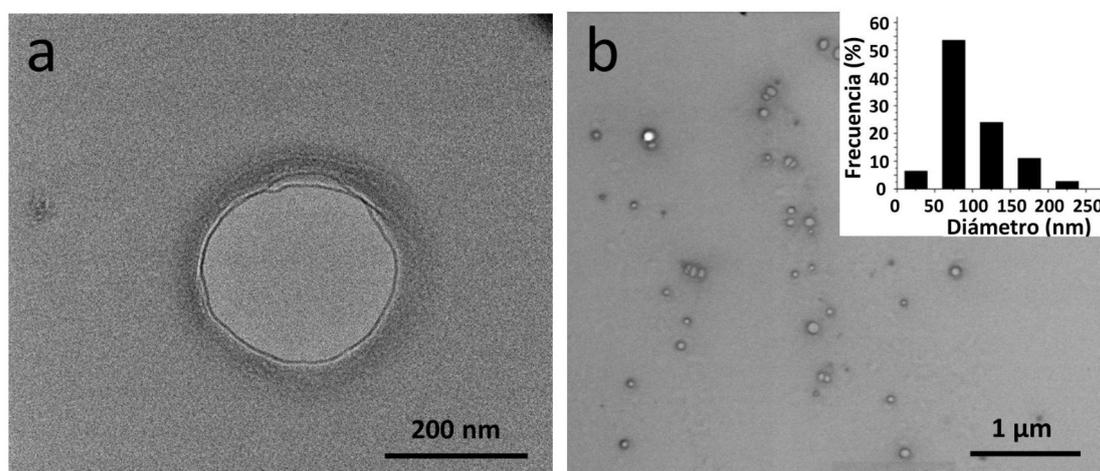


Figura 2. Caracterización morfológica de las NCs mediante BF-TEM (a) y ESEM (b) a partir de una sección del bloque de resina epoxi en el que se incluyeron las NCs. La gráfica representa el análisis del recuento de frecuencia de la distribución de tamaños estimada a partir de las imágenes de ESEM.

Las NCs mostraron una morfología esférica y un tamaño bastante homogéneo. El diámetro medio calculado en base a las imágenes de ESEM es de  $104 \pm 16$  nm. Además, debido a que se realizó una tinción con osmio para aumentar el contraste del polímero, en las imágenes se puede apreciar un halo más oscuro alrededor de cada NC, que probablemente corresponde a la capa externa de surfactante y de quitosano que recubre cada núcleo de nanoemulsión. En la literatura está generalmente aceptado que tanto la morfología como el tamaño de las nanopartículas juegan un papel muy importante en su interacción con las células y tejidos biológicos [64]. La morfología esférica se ha asociado en algunos trabajos con una mayor internalización celular en comparación con otras morfologías como la cilíndrica o la de disco [65,66]. En cuanto al tamaño, debido a las numerosas discrepancias en la literatura, no existe un criterio único sobre el tamaño más apropiado para favorecer o disminuir (según la aplicación específica de cada nanopartícula) las interacciones con las células. Mientras que en algunas publicaciones se concluye que cuanto menor es el tamaño de la nanopartícula, mayor es la internalización celular [67], Yin y colaboradores demostraron que existía un rango de tamaños óptimo para la internalización de sus nanopartículas poliméricas (100-200 nm), mientras que tamaños inferiores (50 nm) y superiores (500 y 1000 nm) resultaban en una menor internalización en células Caco-2.

Por otro lado, se midió el potencial zeta de las NCs a pH 6 y resultó ser positivo ( $+26.3 \pm 2.9$  mV, promedio de varios lotes), lo que muy probablemente refleja la existencia de grupos catiónicos en la superficie de la nanocápsula a este pH. Estos grupos catiónicos sólo pueden provenir de los grupos amino protonados del quitosano (cuyo pKa se encuentra en torno a 6-6.5 [28]), ya que el resto de componentes de la NC son aniónicos (ácido oleico) o no iónicos (surfactantes). Además, en la literatura frecuentemente se reportan potenciales zeta positivos exhibidos por nanocápsulas recubiertas de quitosano y se atribuyen a la presencia de este polímero en la superficie [9,68].

Con el objetivo de optimizar la síntesis de las NCs, se evaluó si el tratamiento de gelificación iónica era imprescindible para la formación de las NCs o podía ser suprimido para simplificar el protocolo de síntesis.

Los resultados indicaron que las NCs sintetizadas omitiendo el paso de adición de sulfato de sodio presentaban un potencial zeta negativo ( $-26 \pm 7$  mV), lo que indicaba que el recubrimiento polimérico no se estaba produciendo de la misma forma que en presencia de la sal. Esto podría deberse a que la conformación adoptada por el quitosano no permitía la exposición de los grupos amino en la superficie de la NC o a que la debilidad de las interacciones del quitosano disperso en la fase acuosa con los núcleos de nanoemulsión no posibilitaba la formación y consolidación del recubrimiento polimérico de las NCs.

Está ampliamente descrito en literatura que la adsorción de quitosano sobre vesículas o nanoemulsiones cargadas negativamente provoca una inversión del potencial zeta,

pasando de negativo a positivo, debido a que las cargas negativas son neutralizadas y la carga neta se vuelve positiva [9,28,69,70]. Teniendo en cuenta que el potencial zeta de los núcleos de nanoemulsión, en ausencia de quitosano, es negativo ( $-30 \pm 5$  mV) y que en presencia de quitosano, sin el tratamiento de gelificación iónica, no se produce la inversión del potencial zeta a valores positivos, claramente la gelificación iónica era un proceso imprescindible para obtener NCs con un adecuado recubrimiento de quitosano que permitiera la exposición de los grupos amino hacia el exterior de las NCs.

Como se ha descrito en la introducción, los grupos amino del quitosano son los responsables de muchas de las interesantes propiedades del quitosano, como su facilidad para internalizar en las células o su mucoadhesividad, además de servir como grupo funcional para modificar fácilmente la superficie de las NCs [1,19,50]. Por todas estas razones, la exposición de los grupos amino en la superficie de la NC era un objetivo fundamental para continuar con el desarrollo e investigación de las NCs, por lo que se decidió mantener la gelificación iónica en el protocolo.

Después, se analizó otro aspecto importante para la optimización de la síntesis: la sonicación durante la adición de las NCs a la solución de sulfato de sodio. La eliminación de la etapa de sonicación en el proceso de síntesis podría representar una ventaja en cuanto a la viabilidad del proceso para futuras aplicaciones que requieran una manufacturación a escala industrial. Las NCs obtenidas sustituyendo la sonicación por una agitación suave (nsCS-NC) se caracterizaron en términos de potencial zeta, composición química y diámetro hidrodinámico, y se compararon con las sonicadas (sCS-NC).

Para evaluar el efecto de la sonicación en las propiedades de superficie de las NCs, se midió el potencial zeta de varios lotes y se calculó el promedio. Ambas cápsulas mostraron un potencial positivo cuando se midieron en una solución de KCl 10 mM pH 6, con valores en el mismo rango ( $+26.3 \pm 2.9$  mV en el caso de las sCS-NC y  $+23.1 \pm 5.2$  mV en el caso de las nsCS-NC), lo que indica que en ambos casos los grupos amino están expuestos en la superficie exterior de la cubierta de quitosano.

Para confirmar la presencia de quitosano y estudiar si existían diferencias en la composición química entre los dos tipos de NCs, éstas fueron analizadas mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR). La Figura 3a-d incluye los espectros FTIR de cada uno de los componentes individuales de las NCs (quitosano, ácido oleico, Tween® 20 y Span® 85) y en la Figura 3e se muestra la comparativa de los espectros FTIR de sCS-NC y nsCS-NC, que demuestra que la ausencia o inclusión de sonicación no estaba afectando significativamente a la interacción química entre los núcleos de nanoemulsión y la capa de quitosano ya que es posible reconocer la presencia de quitosano en ambos casos, así como de los otros tres componentes de las NCs, con una intensidad relativa similar en los dos casos. El espectro FTIR del quitosano muestra picos a 3362, 1655 y 1540  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a las bandas características

de las aminas (en superposición con la banda de los hidroxilos que forman puentes de hidrógeno), amidas I y amidas II, respectivamente [71–73]. Estos picos permiten diferenciar la presencia del quitosano de la del resto de componentes de la NC ya que son específicos del espectro del quitosano y aparecen en los espectros de las sCS-NC y nsCS-NC.

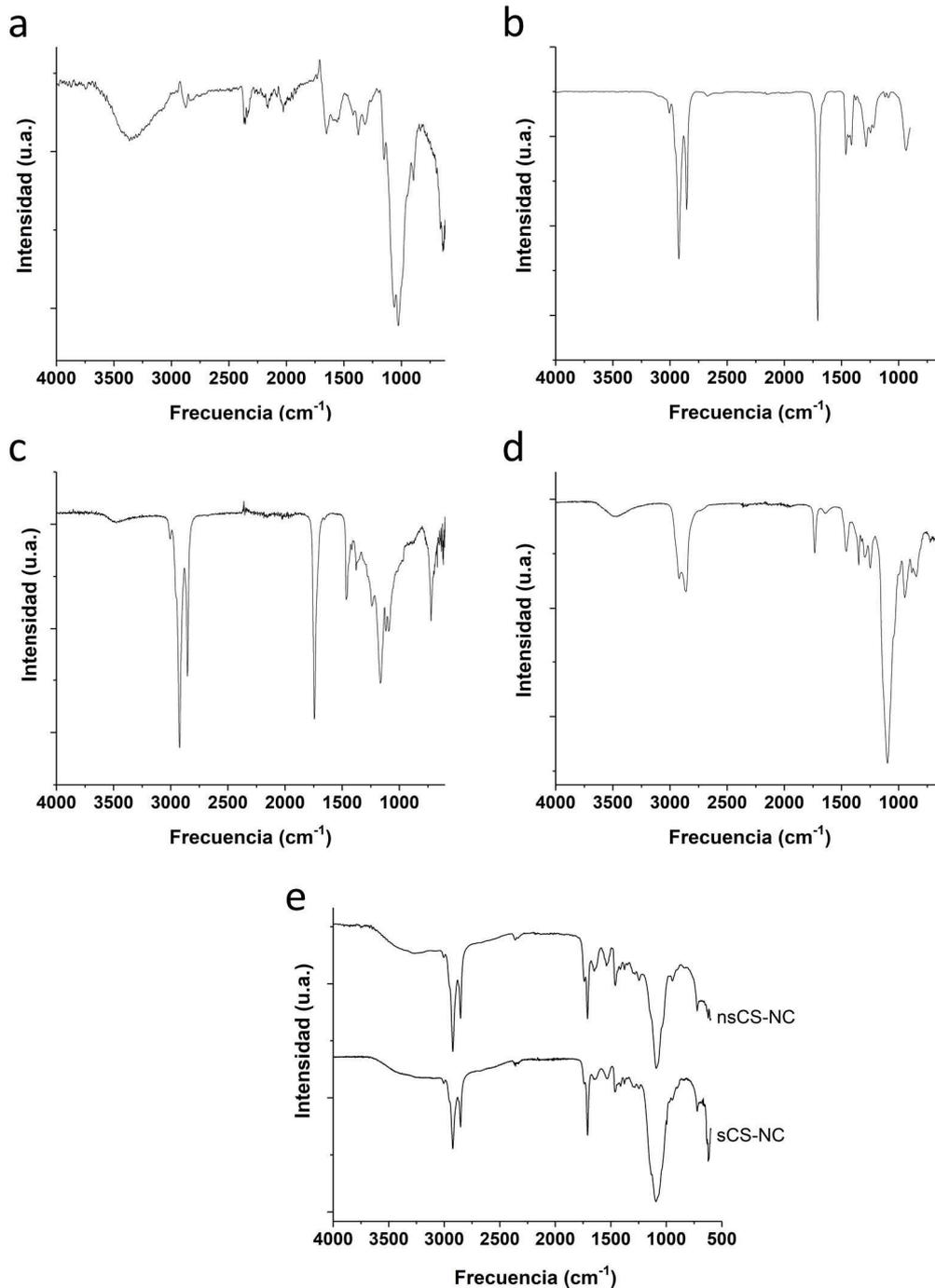
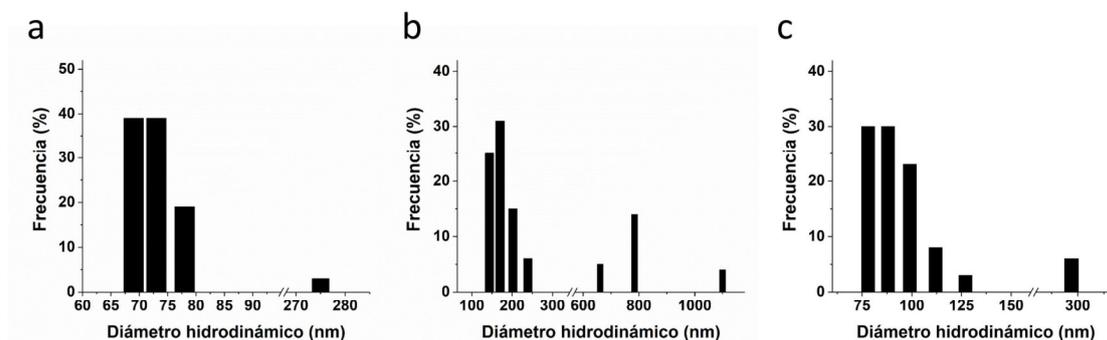


Figura 3. Análisis FTIR de quitosano (a), ácido oleico (b), Span85 (c) y Tween 20 (d). Comparativa de los espectros FTIR de NCs sonicadas (sCS-NC) y no sonicadas (nsCS-NC) (e).

La Figura 4 incluye la distribución de tamaños determinada mediante DLS de los núcleos de nanoemulsión obtenidos justo antes de añadir el quitosano (a), las NCs obtenidas por sonicación (sCS-NC, b) y las NCs no sonicadas obtenidas por agitación (nsCS-NC, c).



**Figura 4. Distribución de tamaños analizada mediante DLS y expresada como porcentajes de los diámetros hidrodinámicos de núcleos de nanoemulsión antes del recubrimiento de quitosano (a), sCS-NC (b) y nsCS-NC (c).**

El diámetro hidrodinámico de las NCs recubiertas con quitosano (Figura 4b,c) resultó ser mayor que el de los núcleos de nanoemulsión, cuya distribución de tamaños se encuentra entre 65 y 80 nm (Figura 4a). Este aumento de tamaño se atribuyó a la presencia de una capa de quitosano alrededor de cada núcleo de nanoemulsión, como se apreció mediante microscopía electrónica (descrito previamente). Un incremento de tamaño similar, de entre 100 y 200 nm, fue observado por Calvo y colaboradores al recubrir con quitosano una nanoemulsión de aceite en agua y fue atribuido a la misma causa [9]. Sin embargo, en el caso de las NCs sonicadas (Figura 4b), el diámetro hidrodinámico final fue mayor que en la muestra no sonicada (Figura 4c). Las NCs sonicadas muestran una población mayoritaria con tamaños comprendidos entre 150 y 250 nm, pero contiene un porcentaje significativo (20-25 %) de cápsulas con un diámetro mucho mayor (650-1100 nm) que podría deberse a fenómenos de agregación, lo que indica una menor estabilidad de esta muestra en suspensión acuosa. En el caso de las NCs no sonicadas, cuya población mayoritaria posee diámetros de entre 75 y 125 nm, se detecta una menor presencia de agregados, de menor diámetro (alrededor de 300 nm) y en menor porcentaje (5-10 %), lo que podría considerarse aceptable para muchas aplicaciones futuras.

Finalmente, teniendo en cuenta que los resultados de la caracterización de las NCs sonicadas y no sonicadas demostraban que la calidad de las NCs obtenidas sin sonicación era muy satisfactoria, se decidió sustituir el proceso de sonicación por agitación a la hora de sintetizar NCs para el resto de experimentos.

## 2.2. Preservación de las NCs en forma sólida mediante agentes crioprotectores

Uno de los mayores obstáculos que limita el uso de las nanopartículas es su inestabilidad físico-química cuando permanecen en suspensión mucho tiempo, especialmente durante las fases de distribución y almacenaje de los productos farmacéuticos. Para mejorar la estabilidad a largo plazo de estos sistemas, una opción frecuentemente utilizada en la industria farmacéutica es eliminar el agua. El proceso más utilizado para ello es la liofilización, que consiste en la deshidratación de una muestra congelada mediante sublimación y desorción en condiciones de vacío.

Generalmente es necesario añadir agentes crioprotectores y lioprotectores que protegen a la muestra del estrés que suponen los procesos de congelación y liofilización. La inmovilización de las nanopartículas en una matriz amorfa de crioprotector puede evitar la agregación y protegerlas del estrés mecánico de los cristales de hielo [34]. Los crioprotectores más utilizados para la liofilización de nanopartículas poliméricas y lipídicas son azúcares [40].

Los experimentos reportados aquí sobre la primera optimización de las condiciones de liofilización de las NCs de quitosano se desarrollaron en las instalaciones de la empresa Kuecept Ltd (Londres, Reino Unido) bajo la supervisión de la Dra. Cristina Freire y la Dra. Doroty Codoni.

Con el objetivo de encontrar un agente crioprotector y unas condiciones de liofilización adecuadas para las NCs, se probaron varios azúcares crioprotectores y varias concentraciones tanto de azúcar como de NCs. En concreto, se prepararon suspensiones de NCs a 5 y 10 mg/mL mezcladas con trehalosa, lactosa ó manitol al 5 ó 10 % (w/v), se congelaron y se liofilizaron. Las concentraciones de azúcar se seleccionaron de acuerdo a la literatura, donde concentraciones del 5-10 % suelen ser suficiente para proteger las NCs, aunque en algún caso también se reporta que fue necesario alcanzar un 30 % [40]. La concentración de nanopartículas también juega un papel importante durante la liofilización, ya que se ha visto que cuanto mayor es la concentración de nanopartículas poliméricas, mejor es la calidad del producto liofilizado [74].

Una indicación de la buena calidad de la liofilización es que el producto de la liofilización, llamado torta, sea poroso y no se haya comprimido. En la Figura 5 se muestran fotos de las tortas obtenidas tras liofilizar las NCs con los azúcares crioprotectores.



**Figura 5. Fotos de las tortas obtenidas tras liofilizar las NCs sin crioprotector o tras la adición de azúcares crioprotectores.**

Las NCs liofilizadas en ausencia de azúcares colapsaron totalmente, quedando evidenciada la necesidad de añadir agentes crioprotectores. Por el contrario, las muestras con trehalosa y lactosa presentaban liofilizados porosos, pero se habían comprimido parcialmente. Sin embargo, las muestras con manitol presentaban un aspecto óptimo, tanto en porosidad como en volumen.

Tras la liofilización, las muestras fueron reconstituidas añadiendo el volumen inicial de agua. La reconstitución en agua de las NCs con trehalosa y lactosa requirió agitación constante durante 20 h y aun así no se consiguió una reconstitución adecuada ya que a simple vista podían observarse filamentos en suspensión y no fue posible la disolución total de los precipitados ni tras resuspender con pipeta. Por el contrario, con las muestras liofilizadas con manitol se consiguió una resuspensión homogénea de forma instantánea, por lo que se seleccionó este crioprotector para continuar el estudio.

Además de proporcionar un liofilizado poroso con un tiempo de reconstitución breve, una adecuada liofilización debe mantener las características físico-químicas iniciales de la muestra (tamaño, estado de agregación, carga superficial...). Para evaluar la calidad de la liofilización, se determinó el diámetro hidrodinámico medio, el potencial Z y la osmolaridad de las muestras con distinta cantidad de manitol después de la reconstitución y se compararon con las NCs originales no liofilizadas (Tabla 1).

**Tabla 1. Caracterización físico-química (tamaño, potencial zeta y osmolaridad) de las NCs liofilizadas bajo distintas condiciones y posteriormente reconstituidas en el mismo volumen de agua.**

Concentración de NCs, % (w/v)	Concentración de manitol, % (w/v)	Ratio NCs:manitol	Diámetro medio, nm	Potencial zeta, mV	Osmolaridad, mOsm/L
0.5	No liofilizada	-	102.7	+17.4	10
0.5	5	1:10	127.4	+5.5	269
0.5	10	1:20	134.3	+3.6	534
1	5	1:5	299.3	+7.3	272
1	10	1:10	108.5	+2.3	536

La muestra liofilizada a 1 % de NCs con un 10 % de manitol presenta el tamaño más parecido a la muestra original (108.5 nm frente a los 102.7 nm de la original). Tras la liofilización de NCs a 0.5 % con un 5 ó 10 % de manitol también se obtienen diámetros medios aceptables (127.4 y 134.3 nm, respectivamente). Sin embargo, la muestra liofilizada a 1 % de NCs con sólo un 5 % de manitol agregó de forma notable (299.3 nm). Estos resultados sugieren que la concentración de NCs y de manitol son parámetros interdependientes, por lo que es necesario ajustar el ratio entre ellos para mantener el tamaño original de las NCs. Así, ratios de NCs:manitol de 1:10 (0.5 % NCs con 5 % manitol y 1 % NCs con 10 % manitol) y de 1:20 (0.5 % NCs con 10 % manitol) favorecen una liofilización de calidad, mientras que ratios 1:5 (1 % NCs con 5 % manitol) no incluyen suficiente crioprotector como para evitar la agregación de las NCs. Está descrito en la literatura que para formar una matriz amorfa que pueda estabilizar las NCs que se encuentran en ella, tiene que haber suficiente manitol molecularmente disperso, ya que si no la formación de cristales de hielo y manitol pueden ejercer fuerzas mecánicas que empujan a las NCs a formar agregados e incluso fusionarse entre ellas [34]. Los resultados indican que en el caso de nuestras NCs debe alcanzarse el ratio 1:10, como mínimo, ya que concentraciones de azúcar en exceso no parecen afectar de forma negativa al tamaño de la muestra. Esto concuerda con otros trabajos científicos, donde la calidad de la liofilización mejora a partir de cierta concentración de azúcar, normalmente entre 2 y 30 %, según la concentración de nanopartículas [39].

En cuanto al potencial zeta, se aprecia una ligera disminución tras la liofilización. En la bibliografía esto es explicado por las interacciones de tipo puente de hidrógeno que se podrían estar estableciendo entre el azúcar crioprotector y el quitosano, que alterarían el potencial de la capa de hidratación en la superficie de la nanocápsula [40].

Por último, la osmolaridad es un parámetro a tener en cuenta en algunos tipos de administración, como la intravenosa, en la que se recomienda ajustar la tonicidad del fármaco a la de la sangre para evitar fenómenos de hipotonicidad o hipertonicidad, que pueden acarrear daños celulares. Por ello, con un osmómetro se midió la osmolaridad de las muestras tras añadir el azúcar. La concentración de NCs apenas afecta a la osmolaridad, mientras que pequeños incrementos de manitol aumentan mucho la osmolaridad. La osmolaridad de las NCs originales sin azúcar era muy baja (10 mOsm/L), pero con un 5 % de manitol subió a 269-272 mOsm/L y con un 10 % a 534-536 mOsm/L. La osmolaridad del plasma humano está en torno a 300 mOsm y se recomienda no sobrepasar los 500 mOsm/L [75,76], por lo que concentraciones de manitol iguales o ligeramente superiores al 5 % pueden considerarse óptimas para aplicaciones que requieran administración intravenosa.

En conclusión, la adición de manitol, además de estabilizar y proteger la muestra durante el proceso de congelación y liofilización, aportaría los solutos necesarios para conseguir una formulación apta en el caso de una futura administración intravenosa.

### 2.3. Toxicidad e internalización de las NCs en células Vero

El desarrollo de nuevos materiales para aplicaciones biomédicas implica que su biocompatibilidad sea uno de los principales aspectos a evaluar. El orden lógico a seguir es comenzar estudiando la toxicidad e interacción biológica a nivel celular, ya que los métodos para la caracterización *in vitro* son más sencillos, baratos y evitan el sufrimiento animal, para después ampliar el alcance del estudio a organismos más complejos si los resultados previos han sido satisfactorios, siendo imprescindibles los estudios *in vivo* para asegurar la biocompatibilidad del material. De esta forma, se pueden determinar las dosis toleradas del nanomaterial, así como descartar o rediseñar los materiales que causen una elevada toxicidad.

En el caso de estudios celulares *in vitro*, la selección de la línea celular es importante y debe ir acorde a la aplicación final del nanomaterial. En este caso, las NCs han sido desarrolladas para el transporte de fármacos y durante su administración van a entrar en contacto con distintos tejidos sanos del cuerpo, que pueden variar en función de la vía de administración. Por ello, y en representación de células normales sanas, para el estudio de citotoxicidad se seleccionó la línea celular Vero, que son células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus* sp). Además, en los capítulos posteriores se describe la investigación de las interacciones de las NCs con otras células involucradas en cada aplicación concreta.

La citotoxicidad de las NCs de quitosano fue analizada en células Vero mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción en el interior de las células del compuesto MTT a cristales de formazán. La tasa de reducción del MTT depende de la actividad metabólica de las células y generalmente es directamente proporcional al número de células viables [77]. Para determinar a partir de qué concentración la viabilidad celular se veía afectada por la presencia de NCs, las células fueron incubadas durante 24 h con las NCs a distintas concentraciones, desde 0.01 mg/mL hasta 0.3 mg/mL (Figura 6).

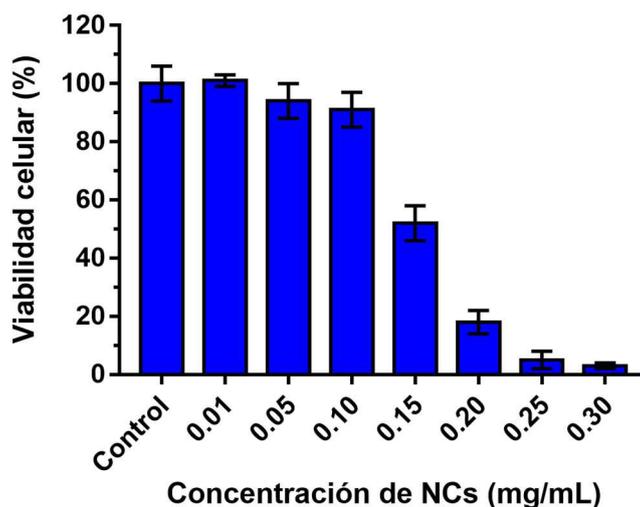


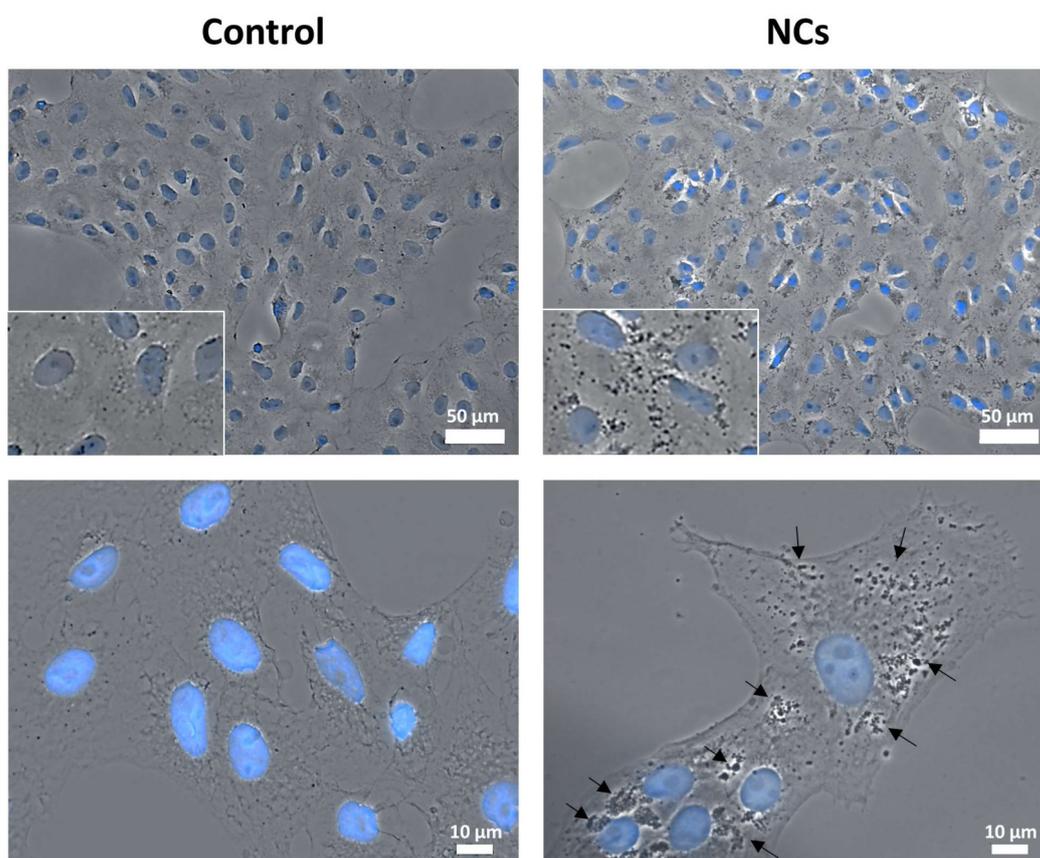
Figura 6. Viabilidad de células Vero incubadas con NCs durante 24 h.

En la Figura 6 se puede observar que para concentraciones comprendidas entre 0.01 y 0.1 mg/mL, la viabilidad celular se encuentra por encima del 90 %, a 0.15 mg/mL desciende al 50 % y a concentraciones mayores disminuye por debajo del 20 %.

Se ha establecido que la carga superficial y la composición están entre los factores físico-químicos más importantes que influyen en los efectos toxicológicos y las interacciones entre las partículas y las células [78]. Algunos estudios de viabilidad celular han demostrado que la citotoxicidad del quitosano es baja o inexistente [79,80]. De hecho, está aprobado por la FDA para uso dietético y como apósito para heridas [21]. Las nanocápsulas de quitosano de Chauhan y colaboradores mostraron una toxicidad en células Vero inferior al 20 %, a las concentraciones testadas mediante MTT [71]. Sin embargo, también existen publicaciones en las que nanopartículas basadas en quitosano ejercen efectos citotóxicos considerables, muy superiores a los observados en nuestras NCs [80,81]. Hay que tener en cuenta que en estos casos la citotoxicidad puede provenir de la propia estructura nanométrica del material, ya que las propiedades de un material pueden cambiar en su forma nanométrica con respecto a su forma macrométrica, o puede provenir del resto de componentes de la nanopartícula. Por ejemplo, las nanopartículas recubiertas con quitosano de Pradines y colaboradores mostraron una elevada toxicidad en células HeLa, pero demostraron que provenía de los componentes del núcleo de poli(isobutilcianoacrilato), ya que la citotoxicidad se mantenía al eliminar la cubierta de quitosano [80]. En el caso de nuestras NCs, la citotoxicidad podría también provenir del núcleo, donde se encuentran los surfactantes, ya que algunos surfactantes han sido relacionados con efectos tóxicos [82–84]. Además, la cantidad de surfactantes utilizada para sintetizar las NCs es casi 10 veces mayor que la de quitosano, lo que refuerza la hipótesis de que la modesta toxicidad esté principalmente causada por los surfactantes. No obstante, esta cuestión está siendo objeto de estudio en otra tesis del grupo.

Por otro lado, generalmente las nanopartículas con carga electrostática positiva son más citotóxicas que las de carga negativa. Por ejemplo, las nanocápsulas poliméricas de Łukasiewicz y colaboradores exhibían menos efectos desfavorables en la viabilidad de células HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) cuando estaban cargadas negativamente [85]. Además, cuanto mayor es la carga positiva, mayor citotoxicidad [16,86]. Este hecho está relacionado con la mayor interacción de las nanopartículas positivas con la membrana celular y su mayor internalización [81]. Por ello, una de las tareas más difíciles a la hora de diseñar un nanotransportador es controlar el equilibrio entre la internalización efectiva en la célula y la inducción de efectos citotóxicos.

Durante los ensayos de viabilidad celular se observó una elevada internalización de las NCs en las células, lo que podría estar asociado a su toxicidad. La Figura 7 muestra imágenes de células Vero incubadas durante 24 h con NCs a 0.05 mg/mL. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4 % y sus núcleos teñidos con DAPI.



**Figura 7. Internalización de las NCs en células Vero tras 24 h de incubación. Las células fueron fijadas y los núcleos teñidos con DAPI (azul). Las imágenes fueron adquiridas con objetivos 20X (fila de arriba) y 60X (fila de abajo). Las flechas señalan las vesículas intracelulares formadas.**

En la Figura 7 se puede distinguir la gran cantidad de vesículas intracelulares formadas tras 24 h de incubación con las NCs, mientras que en el control sin NCs la presencia de vesículas es mucho menor. Este ensayo proporcionó los primeros datos indicadores de la gran capacidad de estas NCs para entrar dentro de las células.

Para profundizar el estudio de internalización celular se decidió marcar las NCs con fluoróforos para poder visualizarlas directamente mediante microscopía de fluorescencia.

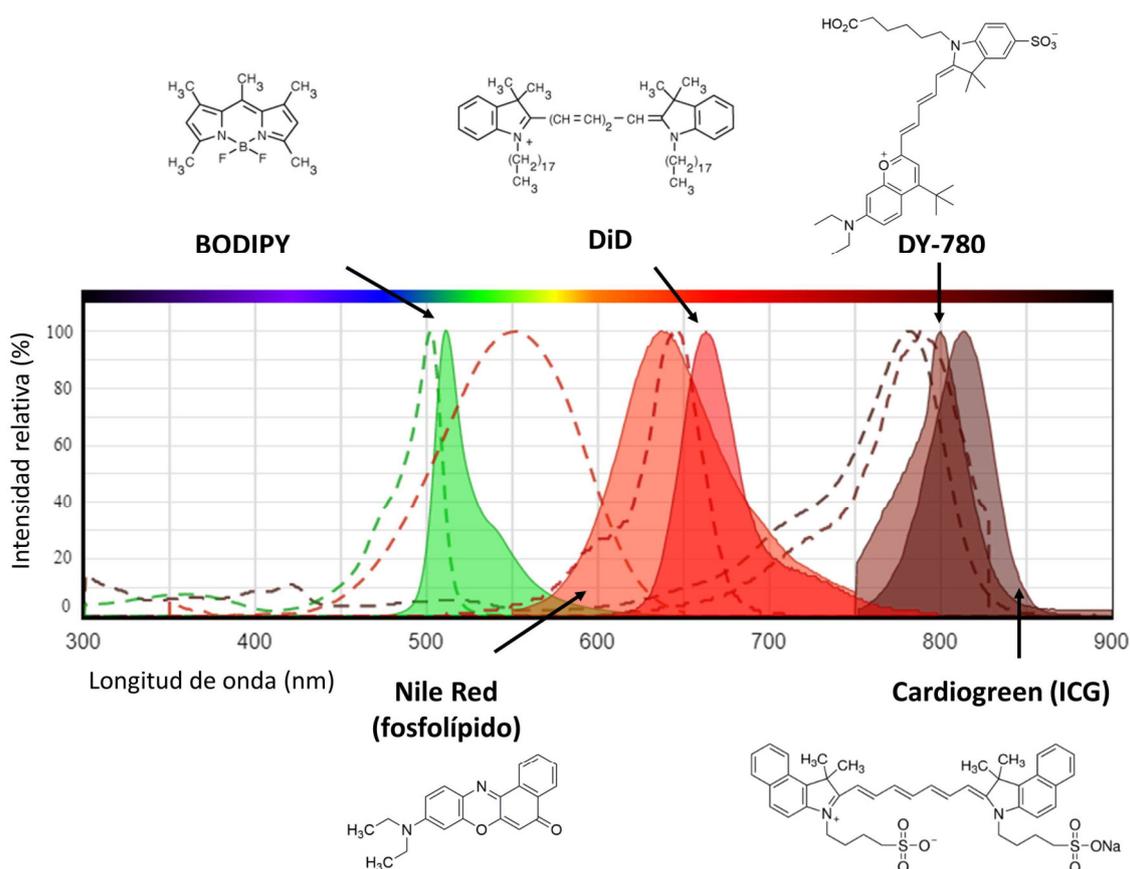
## 2.4. Marcaje fluorescente de las NCs

### 2.4.1. Fluoróforos seleccionados para el marcaje de las NCs

El amplio abanico de fluoróforos disponible en el mercado ha permitido seleccionar aquellos que poseen propiedades compatibles con las NCs. El grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad de la molécula fluorescente es uno de los principales factores a tener en cuenta para el marcaje de las NCs en los distintos compartimentos: cuanto más hidrofóbica, más favorable es su encapsulación en el núcleo lipídico, mientras que fluoróforos más hidrofílicos podrían ser atrapados en la capa hidrofílica de quitosano. Además, los grupos amino del quitosano ofrecen la posibilidad de unir covalentemente fluoróforos a la superficie de la NC.

Para la encapsulación en el núcleo de la nanocápsula, se seleccionaron moléculas fluorescentes con una estructura química hidrofóbica, como el Nile Red, el BODIPY (abreviatura de borodipirrometano) y el DiD, frecuentemente utilizados para marcar membranas, lípidos y otros compuestos lipofílicos [87–89]. Por otro lado, también se tuvo en consideración el espectro de fluorescencia de cada fluoróforo, seleccionando aquellos que se excitaban y emitían fluorescencia en las regiones del espectro que interesaban en cada ocasión o aplicación. Como ya se ha comentado previamente, para ensayos *in vivo* son más apropiadas las moléculas que emiten fluorescencia en la región espectral del infrarrojo cercano (NIR), en este caso el Cardiogreen (ICG) y el DY-780, debido a la baja absorbancia de los tejidos en esta región, mientras que para experimentos *in vitro* son válidos los compuestos que emiten fluorescencia en la región del visible. Además, en la selección de los fluoróforos a utilizar, también se han tenido en cuenta las limitaciones de los equipos con los que se iba a trabajar (por ejemplo, los láseres y filtros de fluorescencia disponibles en los microscopios o espectrofotómetros de fluorescencia) y se ha intentado minimizar los solapamientos entre fluorescencias en aquellos experimentos en los que se combinaran varias moléculas fluorescentes.

La Figura 8 reúne las estructuras moleculares y los espectros de excitación y emisión de todos los fluoróforos utilizados para marcar las NCs durante esta tesis. La gran variedad de fluoróforos ha posibilitado el desarrollo de un abanico de NCs con distinto marcaje fluorescente que pueden ser utilizadas en base a los requerimientos de cada aplicación concreta.



**Figura 8. Estructuras moleculares y espectros de fluorescencia de los fluoróforos BODIPY, Nile Red, DiD, DY-780 y Cardiogreen (ICG). Las líneas discontinuas representan los espectros de excitación y las líneas continuas los de emisión. Imagen de los espectros cortesía de AAT Bioquest.**

Las NCs han sido marcadas con los fluoróforos mencionados mediante distintos métodos. El primer método investigado fue la encapsulación de los fluoróforos en el interior de la NC, ya sea a través de su incorporación a los núcleos de nanoemulsión o embebidos en el recubrimiento de quitosano. Después, se estudió la posibilidad de unir covalentemente un fluoróforo a la superficie de las NCs utilizando los grupos amino del quitosano y un grupo funcional apropiado en la estructura de la molécula fluorescente. El proceso de funcionalización fue optimizado para conseguir el método de conjugación más eficiente y mejorar la emisión de fluorescencia de las NCs. Por último, se exploró el marcaje simultáneo de una misma NC con dos fluoróforos, uno encapsulado y otro unido a la superficie.

#### 2.4.2. Encapsulación de fluoróforos

Con el objetivo de utilizar las NCs en ensayos *in vitro*, los siguientes fluoróforos fueron encapsulados en el núcleo lipídico debido a su elevada hidrofobicidad: Nile Red (NR), BODIPY (BY) y DiD. Para ello, se añadió el fluoróforo disuelto en etanol a la fase orgánica justo antes de formar la nanoemulsión y se continuó la síntesis siguiendo el protocolo estándar. La cantidad de fluoróforo añadida se optimizó para cada fluoróforo según los

requerimientos de los experimentos posteriores (Nile Red 50  $\mu\text{g}$ , BODIPY 200  $\mu\text{g}$  y DiD 100  $\mu\text{g}$ ). Para analizar la fluorescencia de las NCs obtenidas se registró su espectro de fluorescencia utilizando un espectrofluorímetro (Figura 9). Cabe mencionar que la intensidad de fluorescencia se expresa generalmente en unidades arbitrarias ya que depende de la cantidad de luz que ilumina la muestra y cambia en función de muchos parámetros (potencia de la lámpara, eficiencia del monocromador de excitación, apertura de la rendija de excitación, etc.) que pueden variar si las medidas se realizan con instrumentos distintos o incluso con el mismo instrumento, pero en momentos distintos. El objetivo del ensayo era realizar una caracterización cualitativa tras la síntesis de cada tipo de NC para saber si los fluoróforos habían sido correctamente encapsulados, de forma que las NCs fueran capaces de emitir fluorescencia. Las diferentes NCs fueron medidas a concentraciones distintas y en días distintos, según los ensayos, ya que no se pretendía comparar las intensidades de fluorescencia entre ellas. Los espectros de fluorescencia de los fluoróforos libres han sido representados utilizando la herramienta Spectraviewer de ThermoFisher para facilitar la comparativa de las longitudes de onda de emisión máximas con los fluoróforos encapsulados (Nile Red, Figura 9a; BODIPY, Figura 9b; DiD, Figura 9c).

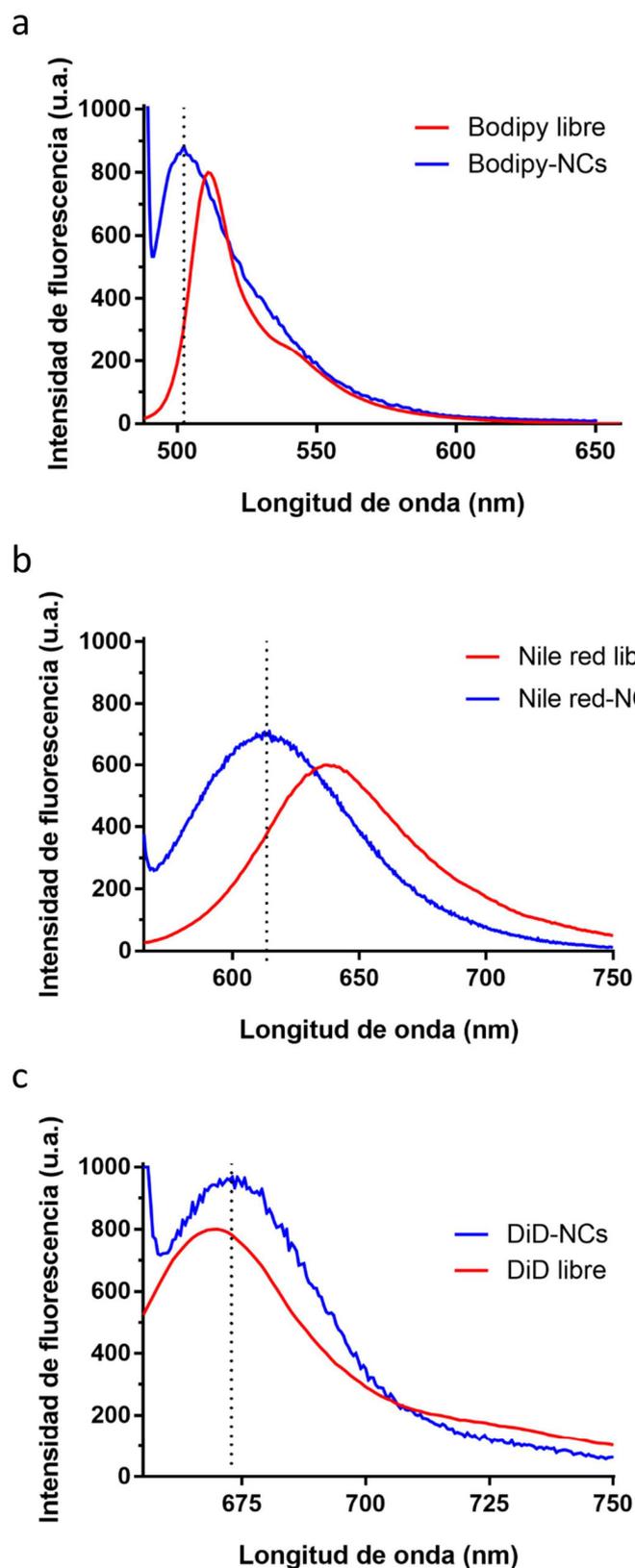


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia de los fluoróforos BODIPY (a), Nile Red (b) y DiD (c), libres (rojo) o encapsulados (azul). Los espectros de fluorescencia de los fluoróforos libres han sido representados utilizando la herramienta Spectraviewer de ThermoFisher®.

Tras el análisis, se observó que los tres tipos de NCs emitían fluorescencia, indicando que la encapsulación de estos tres fluoróforos había sido exitosa. Se puede observar que los picos de emisión de los fluoróforos encapsulados están ligeramente desplazados con respecto a los de los fluoróforos libres. Esto es debido al cambio en el entorno molecular del fluoróforo, ya que los fluoróforos son extremadamente sensibles a la polaridad de la matriz o del disolvente en el que se encuentran, la viscosidad, pH y fuerza iónica, así como a la presencia de surfactantes [48,90].

La Tabla 2 resume la caracterización mediante DLS y potencial zeta de las NCs, donde se reportan los valores medios de diámetro hidrodinámico y potencial zeta obtenidos a partir de distintos lotes de cada tipo de NC.

**Tabla 2. Caracterización del tamaño y potencial zeta de las NCs tras la encapsulación de distintos fluoróforos. Los datos reportados corresponden a las medias de las medidas de DLS y potencial zeta de varios lotes.**

Fluoróforos	Diámetro medio, nm	Potencial zeta, mV
Nile Red	130.9 $\pm$ 31.8	+23.7 $\pm$ 2.3
BODIPY	187.0 $\pm$ 32.2	+20.6 $\pm$ 3.8
DiD	150.8 $\pm$ 28.2	-24.5 $\pm$ 3.4

El diámetro hidrodinámico medio de las NCs cargadas de fluoróforo es en los tres casos mayor que el descrito previamente para las NCs vacías, que se encontraba en torno a 100 nm. La presencia de fluoróforo en el interior de las NCs podría ser responsable de este aumento de tamaño, debido a las posibles interacciones del fluoróforo con los componentes de la NC. En cuanto al potencial zeta, es positivo, como en el caso de las NCs vacías (+23.1 mV), tras la encapsulación de Nile Red (+23.7 mV) y de BODIPY (+20.6 mV), mientras que pasa a ser negativo tras la encapsulación de DiD (-24.5 mV). Las diferencias observadas llevan a pensar que cada fluoróforo interacciona de una forma distinta con la NC, pudiendo darse una modificación de la organización supramolecular, al menos en cuanto a la estructura de la capa exterior de polímero y al grado de exposición de los grupos amino del quitosano en la superficie.

Por otro lado, se intentó encapsular un fluoróforo apropiado para su uso *in vivo* por tener longitudes de onda de excitación y emisión en la primera ventana óptica de la región cercana al infrarrojo (700-1000 nm [43,44]): el Cardiogreen (ICG). A diferencia de los fluoróforos anteriores, el Cardiogreen presenta grupos hidrofílicos en su estructura, por lo que además de explorar su encapsulación en el núcleo de la NC mediante adición a la fase orgánica, también se exploró la posibilidad de encapsularlo en la cubierta hidrofílica de quitosano, ya que podría ser más favorable. Sin embargo, no se consiguió

detectar fluorescencia en ninguno de los dos casos al analizar las NCs en suspensión acuosa mediante espectrofluorimetría. Varias explicaciones podrían ser plausibles: 1) el fluoróforo no se ha encapsulado, 2) la cantidad de fluoróforo encapsulada es demasiado baja para poder detectar la fluorescencia emitida, 3) la fluorescencia está siendo *quencheada*, ya sea por los componentes del interior de las NCs o por la propia proximidad entre los fluoróforos en el interior de la NC (*self-quenching*).

Para investigar la primera hipótesis, se evaluó si el Cardiogreen había sido encapsulado. Para ello, se liberó el posible fluoróforo del interior de la NC utilizando un método de extracción con un disolvente orgánico (MeOH), basado en la mayor solubilidad y afinidad del fluoróforo por el disolvente, lo que favorece su separación de la NC. Posteriormente, se midió la emisión de fluorescencia del Cardiogreen liberado. La Figura 10 muestra los espectros de emisión del Cardiogreen extraído en MeOH tras su encapsulación en la fase orgánica o en el quitosano.

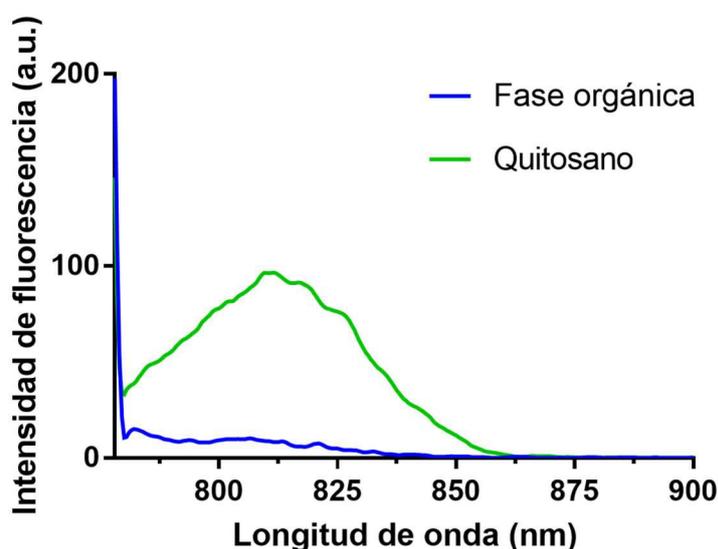


Figura 10. Espectros de fluorescencia del Cardiogreen extraído de las NCs en MeOH tras su encapsulación en la fase orgánica (azul) o en el quitosano (verde).

Como puede apreciarse en la gráfica, tras la extracción del Cardiogreen se registró emisión de fluorescencia en el caso de la encapsulación en el quitosano, lo que indica que el fluoróforo había sido encapsulado con éxito en el recubrimiento de la NC, pero no ocurría lo mismo en el caso de la encapsulación en la fase orgánica, cuya fluorescencia emitida apenas era detectable.

La segunda hipótesis barajaba que el Cardiogreen había sido encapsulado, pero no en la cantidad suficiente como para emitir fluorescencia de forma detectable mediante espectrofotometría. La cantidad de fluoróforo añadida durante el proceso de encapsulación en la fase orgánica había sido de 200  $\mu\text{g}$ . Para confirmar o descartar esta hipótesis, se incrementó la cantidad de Cardiogreen añadida a la fase orgánica hasta 80 veces (16 mg). No obstante, tampoco se detectó la señal de fluorescencia esperada al

medir las NCs en suspensión acuosa. Para comprobar que realmente se había encapsulado una gran cantidad de fluoróforo, el Cardiogreen encapsulado fue extraído en MeOH y cuantificado tras realizar un calibrado del fluoróforo de partida en este disolvente. La cantidad total encapsulada fue de 2.3 mg de Cardiogreen, lo que suponía una carga muy elevada de fluoróforo en las NCs (del 34 % en peso). Es importante destacar que el fluoróforo extraído fue diluido secuencialmente hasta encontrar el rango lineal que asegura el cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer para la cuantificación de moléculas en suspensión (Figura 11).

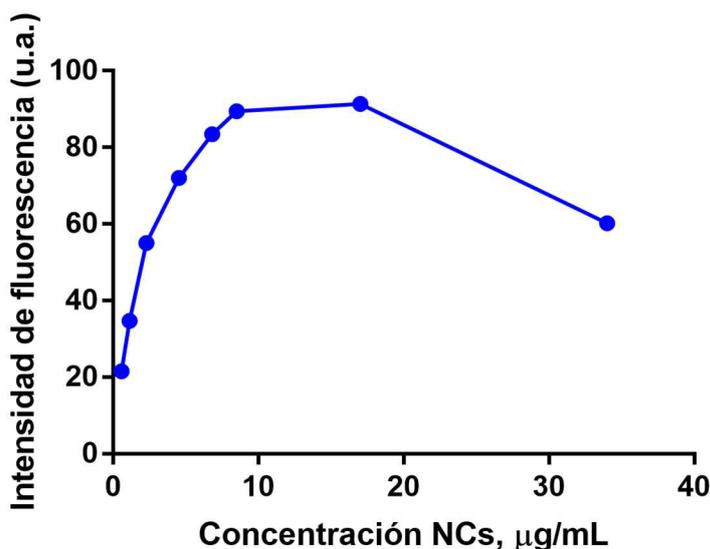


Figura 11. Fluorescencia emitida por el Cardiogreen extraído de las NCs a MeOH tras ser encapsulado en la fase orgánica.

Como se puede observar en la Figura 11, a partir de cierta concentración (2.3  $\mu\text{g/mL}$ ), el incremento de la intensidad de fluorescencia del Cardiogreen dejaba de ser lineal, evidenciando un fenómeno de *quenching*, lo que nos llevó a cuestionarnos la tercera hipótesis, relativa al posible *quencheo* de la fluorescencia de la molécula una vez incluida en la estructura de la NC.

El *quenching*, o atenuación de fluorescencia, se refiere a cualquier proceso que disminuya la intensidad de emisión de fluorescencia de una sustancia dada. Así como durante el fenómeno de *quenching* generalmente existe una molécula que emite fluorescencia (fluoróforo) y otra que la absorbe (*quencher*), el *self-quenching* es un tipo especial de *quenching* en el que las moléculas que generan fluorescencia y las moléculas que la extinguen son las mismas, siendo particularmente evidente a concentraciones elevadas de fluoróforo [91].

Dado que los espectros de excitación y emisión del Cardiogreen solapan sustancialmente (Figura 8), podría estar produciéndose *self-quenching* en el interior de las NCs debido al efecto de re-absorción de la fluorescencia y de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre dos moléculas iguales de fluoróforo (homoFRET).

Este fenómeno se produce cuando los fluoróforos están agregados o se encuentran muy cerca unos de otros, facilitando que parte de la energía radiativa emitida por una molécula sea transferida y absorbida por una molécula vecina, lo que disminuye la fluorescencia global detectada [92]. En el caso de nuestras NCs, es muy probable que las moléculas de fluoróforo estén muy próximas entre sí en el interior de las NCs y estén produciendo *self-quenching*. Teniendo en cuenta que las moléculas de fluoróforo se encuentran en un volumen muy reducido cuando están encapsuladas en el interior de la NC, es muy probable que el fluoróforo en el interior de las NCs esté siendo *quencheado* y por ello no se observe emisión de fluorescencia. Zhegalova y colaboradores estudiaron los efectos de *quenching* producidos al conjugar fluoróforos NIR a macromoléculas y, además del fenómeno de FRET, observaron otro mecanismo implicado en el *quenching* (denominado “acoplamiento fuerte”), caracterizado por la ausencia de fluorescencia debido a que la molécula excitada regresa rápidamente a un estado de menor energía emitiendo energía no radiativa cuando varias moléculas de fluoróforo están muy próximas y en orientaciones paralelas [92].

Para evaluar si el fluoróforo NIR utilizado para el marcaje de las NCs, además de no incrementar su intensidad de fluorescencia a partir de cierta concentración, llegaba a perder totalmente la fluorescencia a concentraciones elevadas, se midió el espectro de emisión de fluorescencia del Cardiogreen en MeOH a diferentes concentraciones (Figura 12).

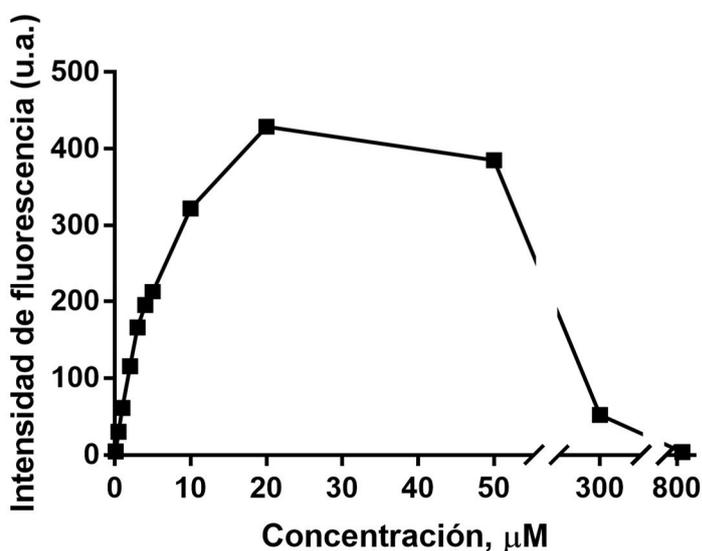


Figura 12. Fluorescencia del Cardiogreen (no encapsulado) en MeOH en función de su concentración.

La gráfica muestra que a concentraciones superiores a 10  $\mu\text{M}$  ya aparecen efectos de *quenching*, llegando a extinguirse de forma completa la fluorescencia a 800  $\mu\text{M}$ , lo que demuestra la gran sensibilidad de este fluoróforo ante fenómenos de *quenching*. Esta es una de las principales limitaciones de este fluoróforo reportadas en literatura, que

compromete su aplicación biológica en muchos casos, a pesar de estar clínicamente aprobado en humanos para imagen médica y diagnóstica [93,94].

Para evitar este problema, se descartó la encapsulación del Cardiogreen en el interior de la nanocápsula y nos planteamos marcar las NCs siguiendo una estrategia distinta: funcionalizar las NCs uniendo el fluoróforo covalentemente a su superficie.

### 2.4.3. Funcionalización de la superficie con fluoróforos

Los grupos amino del quitosano ofrecen la posibilidad de funcionalizar fácilmente la superficie de las NCs. El método de funcionalización utilizado se basa en la unión de la molécula homobifuncional suberato de bissulfosuccinimidilo (BS<sup>3</sup>) a través de sus grupos éster a un grupo amino del quitosano por un extremo y a un grupo amino del fluoróforo por el otro, actuando así de enlace entre la superficie de la NC y el fluoróforo. Dado que el Cardiogreen no posee grupos amino, se seleccionó un fluoróforo NIR que incluía en su estructura un grupo amino para llevar a cabo la funcionalización de las NCs: el DY-780 derivatizado con un grupo amino.

Tras la funcionalización, se midió la fluorescencia emitida por las NCs mediante espectroscopía de fluorescencia (Figura 13). La fluorescencia registrada se encontraba en la región NIR (intensidad máxima a 820 nm), lo que indicaba que las propiedades fluorescentes del DY-780 se habían conservado durante el proceso de funcionalización.

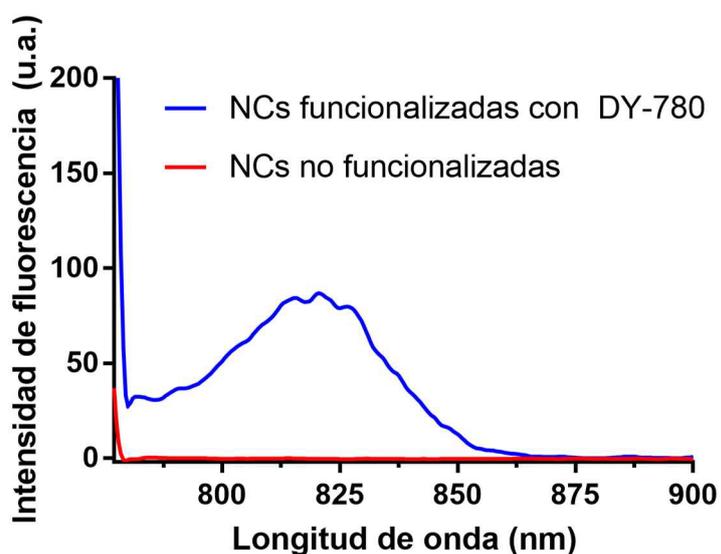


Figura 13. Fluorescencia emitida por las NCs sin funcionalizar (rojo) o funcionalizadas con DY-780 (azul).

Para investigar si la unión del DY-780 a los grupos amino estaba produciendo cambios en las propiedades de superficie de las NCs, se analizó su potencial zeta antes y después del proceso de funcionalización. El potencial zeta de las NCs disminuyó tras la funcionalización con DY-780 en la superficie (+28.6 ± 0.9 mV antes de funcionalizar, -14.9 ± 0.4 mV después), reflejando el cambio que había ocurrido en su superficie.

Una vez demostrada la posibilidad de marcar las NCs con fluorescencia en la región NIR a través de la funcionalización de su superficie con el fluoróforo DY-780, se procedió a optimizar el proceso de funcionalización con el fin de maximizar la fluorescencia emitida por las NCs tras el marcaje. Encontrar la cantidad adecuada de moléculas fluorescentes todavía representa un desafío para conseguir una conjugación eficiente en algunas aplicaciones como el marcaje múltiple de proteínas y otras macromoléculas, ya que la aglomeración de las moléculas de fluoróforo en la superficie da lugar a la disminución de la fluorescencia [92].

La cantidad de moléculas fluorescentes unidas a la nanocápsula es un parámetro muy importante: una cantidad demasiado baja no dará señal suficiente como para estar por encima del límite de detección del equipo de medida, mientras que una cantidad demasiado alta puede producir *quenching*, como se ha explicado anteriormente. En las NCs funcionalizadas con DY-780, podrían darse dos tipos de *quenching*: 1) entre varias moléculas fluorescentes unidas a distintas cápsulas, si la concentración de NCs es tan elevada que hace que se encuentren muy próximas en el espacio e interfieran; 2) entre varias moléculas fluorescentes unidas a la superficie de una misma cápsula, si están muy cerca unas de otras e interfieren entre sí.

Para evitar la primera posibilidad de *quenching*, es necesario encontrar el rango de concentración de NCs donde la fluorescencia cambia de forma lineal a la hora de medirla. Para evitar la segunda posibilidad, es necesario controlar de forma precisa las propiedades de la superficie de la NC. Con esta finalidad, se llevó a cabo una optimización de la funcionalización con DY-780 para encontrar las cantidades de reactivos que permitieran obtener mayor emisión de fluorescencia y evitar el *quenching*.

La determinación de la cantidad de grupos amino accesibles en la superficie de la NC fue fundamental para la optimización del protocolo de funcionalización. De hecho, uno de los inconvenientes del uso de enlazadores homobifuncionales como BS<sup>3</sup> es que pueden unir grupos amino entre diferentes NCs produciendo agregación si la cantidad de reactivos no está estrictamente controlada. Por esta razón, el número de grupos amino accesibles se utilizó como punto de partida para ajustar la cantidad de reactivos en los siguientes pasos del proceso.

La cuantificación de los grupos amino del quitosano expuestos en la superficie de las NCs se midió mediante el método espectrofotométrico basado en el uso del colorante Orange II [95]. En resumen, el método se basa en una interacción dependiente del pH entre grupos amino con carga positiva y el grupo -SO<sub>3</sub> del colorante Orange II. Este método espectrofotométrico es simple, barato y fácil, y sus ventajas más importantes sobre otros métodos alternativos, generalmente usados para la cuantificación de aminoácidos, consisten en el uso de una molécula con bajo impedimento estérico y en que la relación entre los grupos amino y el reactivo es en este caso de 1:1, lo que permite

una cuantificación directa y fiable [96]. El número de grupos amino en relación a la masa de NCs determinado mediante este ensayo fue de 200 nmol/mg NC.

Durante la optimización de la funcionalización, la cantidad de BS<sup>3</sup> siempre se mantuvo por debajo de los moles totales de grupos amino de las NCs para reducir la posibilidad de entrecruzamiento entre ellas. Se realizaron cuatro funcionalizaciones en paralelo partiendo del mismo lote de NCs, añadiendo 1, 5, 10 ó 15 nmol BS<sup>3</sup>/mg NC (Figura 14a). Para completar el proceso, se usó el doble de cantidad de fluoróforo que de BS<sup>3</sup> en todos los experimentos para asegurar la reacción con todos los grupos reactivos de BS<sup>3</sup> en la superficie. Una vez funcionalizadas, se midió la intensidad de fluorescencia de cada tipo de NC a cuatro concentraciones diferentes (3.4, 1.7, 0.85 y 0.43 mg/mL) para evaluar el efecto de quenching debido a la concentración de NC (Figura 14b).

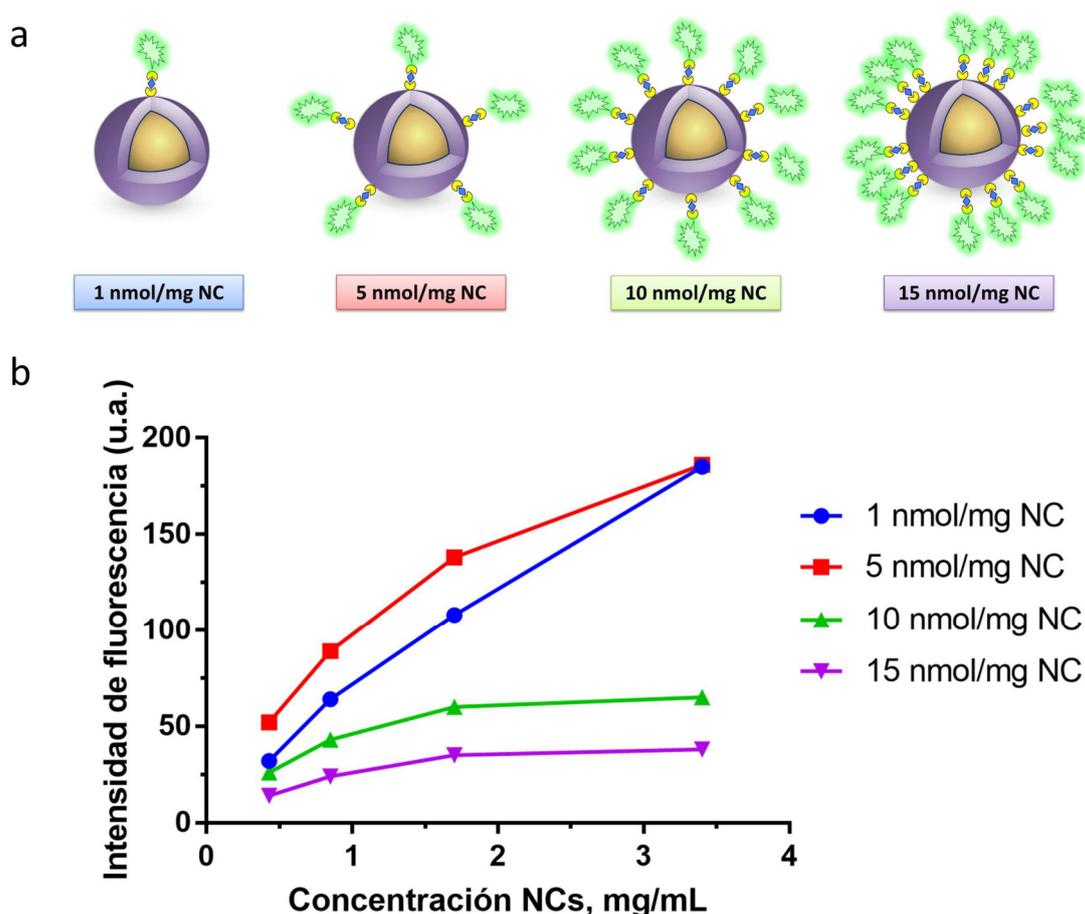


Figura 14. a) Esquema de las 4 cantidades de BS<sup>3</sup> utilizadas durante la optimización de la funcionalización de las NCs con DY-780 (cada NC dibujada representa 1 mg de NC). b) Fluorescencia emitida por cada una de las 4 muestras funcionalizadas, medida a 4 concentraciones de NCs distintas mediante espectroscopía de fluorescencia. El error asociado a la medida es inferior al 6 %.

Si comparamos la intensidad de fluorescencia entre las cuatro muestras para cada concentración, podemos observar que de 5 a 15 nmol BS<sup>3</sup>/mg NC la intensidad de fluorescencia disminuye a medida que aumenta la cantidad de fluoróforo en la superficie. Esto podría deberse al efecto de *quenching* entre varios fluoróforos por su

proximidad en la superficie de cada NC. De estos resultados se puede concluir que 10 y 15 nmol BS<sup>3</sup>/mg NC son cantidades demasiado altas para conseguir un marcaje eficiente porque en lugar de aumentar con la cantidad de fluoróforo, la fluorescencia disminuye. Entre las muestras con 1 y 5 nmol de BS<sup>3</sup>/mg NC, a bajas concentraciones de NCs, la segunda muestra una fluorescencia más alta, lo que significa que estamos reduciendo el efecto de *quenching*.

Con respecto al *quenching* ocasionado por una alta concentración de NCs, éste aparece reflejado claramente en la curva dibujada por las cuatro concentraciones diferentes de cada muestra, especialmente en las muestras con 10 y 15 nmol/mg, cuya fluorescencia apenas aumenta al subir la concentración. Sin embargo, conforme se disminuye la cantidad de fluoróforo unido a la superficie, disminuye este tipo de *quenching* y se observa un mayor rango de linealidad en las curvas.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se seleccionó la funcionalización con 1 nmol BS<sup>3</sup>/mg NC como la más eficiente ya que proporciona la señal de fluorescencia más alta a 3.4 mg/mL sin perder la linealidad en el rango de concentraciones ensayado.

La estrategia de funcionalización utilizada permite además llevar a cabo un doble marcaje de forma controlada uniendo un fluoróforo sobre la superficie de unas NCs que ya contengan otro fluoróforo encapsulado en su interior, obteniendo así NCs multifuncionales que pueden ser utilizadas en distintos tipos de ensayo.

#### 2.4.4. Doble marcaje: encapsulación y funcionalización de la superficie

Hasta ahora, se había puesto a punto un abanico de NCs marcadas fluorescentemente de manera que cada lote de NCs estaba marcado con un único tipo de fluoróforo, que podía ser especialmente adecuado para experimentos *in vitro* o para experimentos *in vivo*, según las propiedades de su espectro de fluorescencia, como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, cuando llegara el momento de relacionar los resultados *in vitro* con los resultados *in vivo*, éstos no serían del todo comparables, ya que las propiedades físico-químicas de las NCs cambian en función del fluoróforo con el que han sido marcadas y esto puede influir en su interacción con los sistemas biológicos. El uso de un tipo de NCs marcado con un fluoróforo que emita en la región del visible para los ensayos *in vitro* y de un tipo distinto marcado con un fluoróforo NIR para los ensayos *in vivo* podría incrementar la variabilidad entre resultados debida al uso de NCs con propiedades distintas.

Para solucionar este problema, se planteó la posibilidad de hacer un marcaje simultáneo de las NCs con dos fluoróforos distintos, uno que emitiera fluorescencia en la región del visible y otro en la región NIR, siendo una estrategia óptima y más precisa para realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando exactamente el mismo sistema. Para explorar esta posibilidad, se sintetizaron NCs cargadas de BODIPY siguiendo el protocolo descrito en el apartado de encapsulación de fluoróforos y posteriormente se

funcionalizó su superficie con DY-780 a través del enlazador BS<sup>3</sup>. Se decidió encapsular el BODIPY porque, a diferencia del Nile Red y del DiD, su espectro de fluorescencia no solapaba con el del DY-780 (Figura 8), evitando así posibles interferencias entre los dos fluoróforos. La Figura 15 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de las NCs con BODIPY encapsulado y DY-780 unido a la superficie.

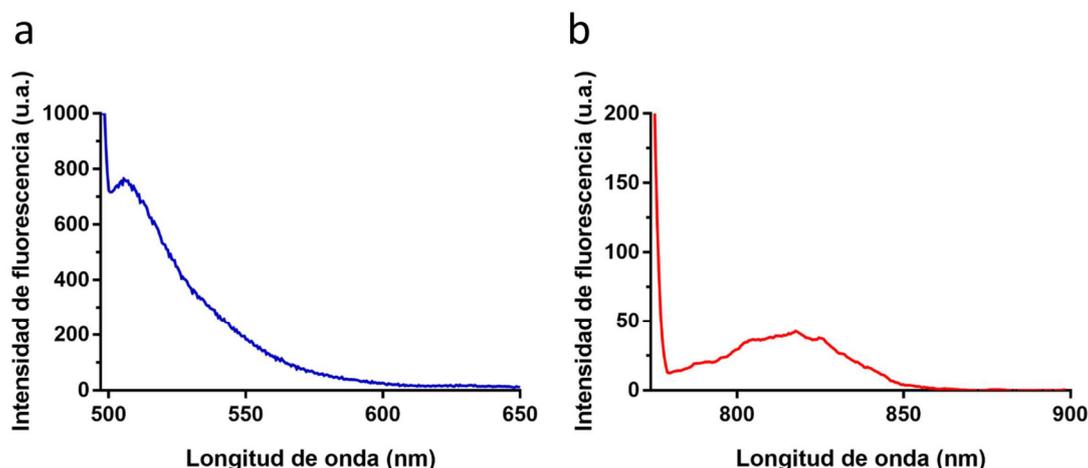


Figura 15. Espectro de emisión de fluorescencia de las NCs tras la encapsulación de BODIPY y posterior funcionalización con DY-780. La muestra fue excitada a 490 nm (a) y a 780 nm (b), consecutivamente.

Una vez funcionalizadas, las NCs emitían fluorescencia en las longitudes de onda del BODIPY ( $\lambda_{em}$  max = 506 nm, Figura 15a) y del DY-780 ( $\lambda_{em}$  max = 820 nm, Figura 15b), lo que indicaba que las propiedades fluorescentes de ambos fluoróforos se habían conservado perfectamente durante el proceso de doble marcaje.

El BODIPY es un fluoróforo adecuado para ensayos *in vitro*, pero no para ensayos *in vivo* porque no emite fluorescencia en la región NIR. Por otro lado, el DY-780 es adecuado para ensayos *in vivo* pero no es la mejor opción para los ensayos *in vitro* porque los fluoróforos NIR poseen rendimientos cuánticos relativamente bajos en comparación con los fluoróforos que emiten en la región del visible [97], por lo que la intensidad de fluorescencia emitida por el DY-780 es mucho más débil que la del BODIPY. Sin embargo, su combinación en la misma nanocápsula permite utilizar la fluorescencia del BODIPY para experimentos *in vitro* y la del DY-780 para *in vivo* usando las mismas NCs de partida.

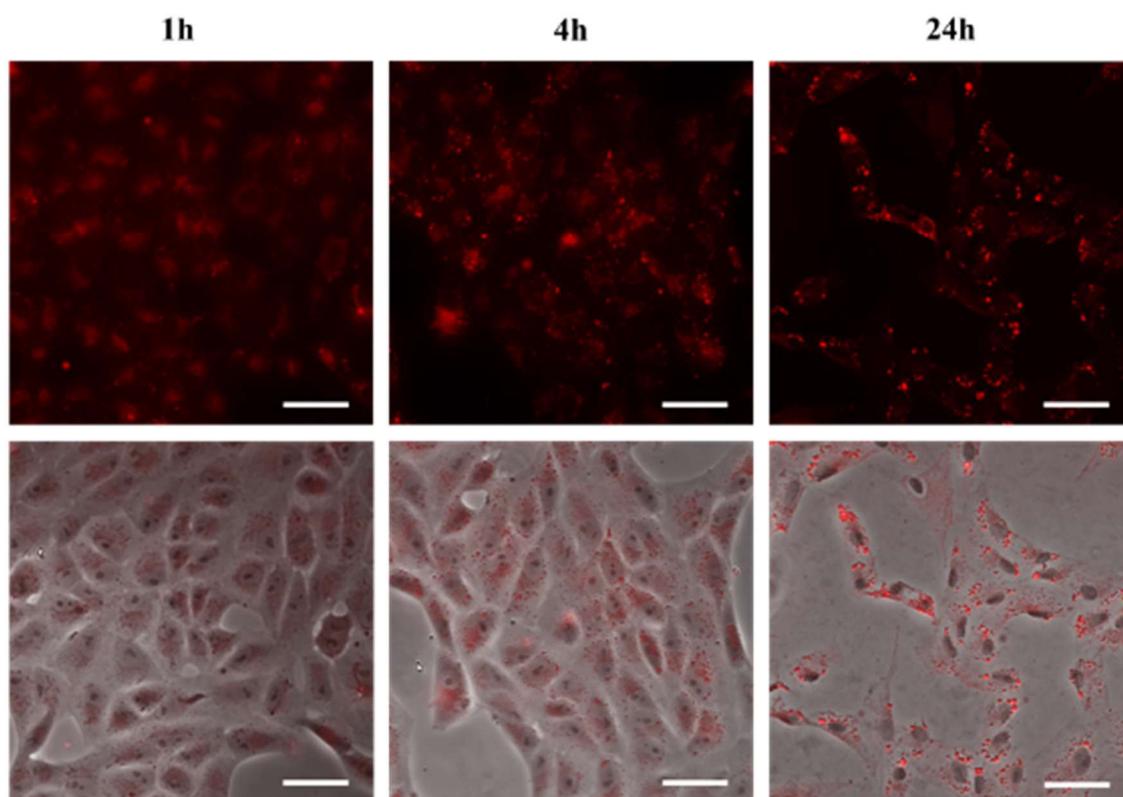
## 2.5. Internalización de las NCs marcadas fluorescentemente en células

La internalización de las nanopartículas en las células es un aspecto clave para conseguir un transporte eficiente del fármaco hasta el sitio diana. Si las nanopartículas no son internalizadas, el fármaco sólo podría entrar en las células si es previamente liberado de las nanopartículas, aunque esto favorecería su dispersión por los tejidos sanos adyacentes en vez de llegar principalmente a las células diana enfermas. De hecho, estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado que la concentración intracelular de

fármaco es mucho mayor cuando las nanopartículas son internalizadas y el fármaco se libera en el citoplasma de la célula [98,99].

Como se ha comentado anteriormente, mediante microscopía óptica de campo claro se había observado un aumento de vesículas intracelulares durante la incubación de células Vero con NCs vacías. No obstante, el desarrollo y optimización de NCs marcadas fluorescentemente permitió analizar con más detalle su internalización mediante microscopía de fluorescencia.

Para evaluar si la formación de vesículas intracelulares realmente se debía a que las NCs estaban siendo internalizadas, se sembraron células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) y se incubaron con NCs cargadas de Nile Red (Figura 16).

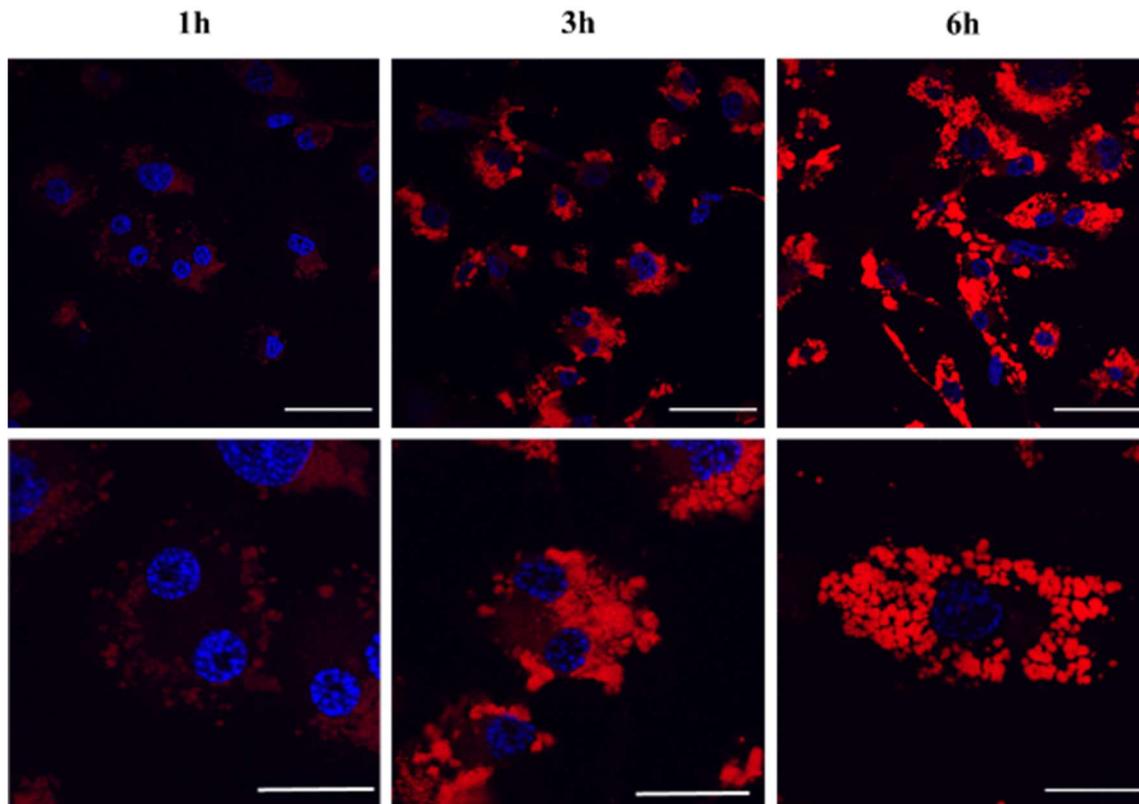


**Figura 16.** Internalización de NCs cargadas de Nile Red (rojo) en células Vero tras ser incubadas a 50  $\mu\text{g/mL}$  durante 1, 4 y 24 h. Las células de las imágenes a 1 h y 4 h estaban vivas, mientras que a 24 h estaban fijadas. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia. Arriba: fluorescencia en el canal rojo. Abajo: superposición del canal rojo con el canal de campo claro. Escalas: 50  $\mu\text{m}$ .

Para hacer un seguimiento a lo largo del tiempo de las NCs marcadas fluorescentemente, se tomaron imágenes de las células vivas tras 1 h y 4 h de incubación, donde ya podía observarse fluorescencia en el interior de las células. Se observó que tras 1 h ya aparecían algunas vesículas intracelulares fluorescentes, aunque tras 4 h aumentaba considerablemente la cantidad y el tamaño de estas vesículas. Tras 24 h de incubación, las células fueron fijadas con PFA 4 % y observadas sobre un

portaobjetos para mejorar la calidad de la imagen. La fluorescencia punteada sugiere que el Nile Red se encuentra en el interior de vesículas.

La internalización y destino final de las nanopartículas en las células depende en gran medida del tipo celular [98]. Por ejemplo, los fagocitos profesionales consumen rápidamente partículas relativamente grandes (tradicionalmente asociadas al rango micrométrico, aunque también se ha demostrado la fagocitosis de partículas nanométricas [100]), mientras que las células endoteliales fagocitan preferiblemente partículas de un orden de magnitud más pequeño [64]. Con objeto de completar el estudio de endocitosis y probar una línea celular distinta, se evaluó la interacción de las NCs con células dendríticas. A diferencia de las células Vero, que son células epiteliales de riñón, las células dendríticas son células inmunitarias con capacidad fagocítica, ya que una de sus principales funciones es la de capturar y digerir las partículas sólidas que se encuentran en el medio que las rodea con el fin de eliminarlas y llevar a cabo la presentación antigénica. Además, las células dendríticas expresan receptores de manosa y N-acetilglucosamina, como el DC-SIGN, que podrían reconocer los residuos acetilados del quitosano y favorecer su internalización [101,102]. Las células dendríticas utilizadas se obtuvieron mediante diferenciación a partir de la línea celular THP-1 (monocitos humanos de leucemia aguda). Los monocitos THP-1 poseen una débil capacidad fagocítica y una baja expresión de DC-SIGN, mientras que aumenta considerablemente al diferenciarse a células dendríticas. Para ello, se optimizó un protocolo de diferenciación basado en la incubación de las células THP-1 con varios factores de diferenciación (PMA y IL-4) durante 5 días. Una vez diferenciadas a células dendríticas, fueron incubadas con NCs cargadas de Nile Red (NR-NCs) durante 1 h, 3 h ó 6 h, lavadas, fijadas con PFA 4 % y observadas mediante microscopía confocal (Figura 17).



**Figura 17.** Internalización de NCs cargadas de Nile Red (rojo) en células dendríticas tras ser incubadas a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 1, 3 y 6 h. Las células fueron fijadas y sus núcleos teñidos con DAPI (azul). Imágenes adquiridas con un microscopio confocal. Escalas: 50  $\mu\text{m}$  (arriba) y 25  $\mu\text{m}$  (abajo).

Dado que estos fagocitos profesionales están especializados en capturar partículas, las NCs fueron rápidamente internalizadas, como era de esperar. Tras 1 h de incubación, ya se observaba algo de fluorescencia en el interior de las células y en tan sólo 6 h las células estaban repletas de grandes vesículas donde se encontraban las NCs fluorescentes. El tamaño de las vesículas está relacionado con el mecanismo de internalización celular, denominado endocitosis. La fagocitosis es un tipo de endocitosis solamente llevada a cabo por algunas células especializadas del sistema inmunitario, incluyendo las células dendríticas, que se caracteriza por la formación de grandes vesículas, llamadas fagosomas, de hasta 5-10  $\mu\text{m}$  [100]. La formación de vesículas de gran tamaño en las células dendríticas tras la incubación con las NCs sugiere que el mecanismo de internalización en este tipo celular podría ser la fagocitosis. No obstante, las vías de internalización no han sido objeto de estudio en esta tesis. En cuanto a la distribución de las vesículas, se puede apreciar que a tiempos cortos (1 h y 3 h) tienden a localizarse en un lado de la célula (aquel por el que se ha producido la fagocitosis) o cercanas a la membrana celular, mientras que después de 6 h las vesículas se han distribuido por todo el citoplasma. Además, la intensidad de fluorescencia aumenta progresivamente, lo que indica que la internalización es dependiente del tiempo (todas las imágenes fueron tomadas bajo las mismas condiciones).

## 2.6. Internalización de las NCs marcadas fluorescentemente en *Hydra vulgaris*

Además de estudiar la internalización de las NCs en células, también se ha investigado su interacción con organismos más complejos, entre ellos *Hydra vulgaris*, gracias a la colaboración con el Dr. Alfredo Ambrosone y el grupo de investigación de la Prof. Claudia Tortiglione, en el marco del proyecto Marie Curie del Dr. Ambrosone, quien testó las NCs, previamente sintetizadas y caracterizadas, en los animales.

El cuerpo de *H. vulgaris* consiste en dos capas de células epiteliales, es decir, el ectodermo (capa celular externa) y el endodermo (capa celular interna), separados por una matriz extracelular de mesoglea [103]; esta sencilla arquitectura corporal y la transparencia del tejido facilitan el estudio de internalización y dinámica de las nanopartículas con respecto a modelos animales más complejos.

Mediante microscopía de fluorescencia se demostró que la internalización de las NCs cargadas de Nile Red (NR-NCs) tenía lugar tras tiempos de incubación muy cortos (Figura 18). Después de una breve incubación de 5 min, los animales ya mostraban una tinción fluorescente difusa desde los tentáculos a la región del pie, y después de tiempos de incubación más prolongados (15 y 30 min), aumentaba la intensidad de fluorescencia. Esto indica que, poco después de la administración, las NCs ya han sido capaces de transportar su carga de Nile Red a los pólipos. El transporte de Nile Red efectuado por las NCs es extremadamente rápido en comparación con muchos otros nanomateriales investigados en *Hydra vulgaris* hasta el momento [104–106].

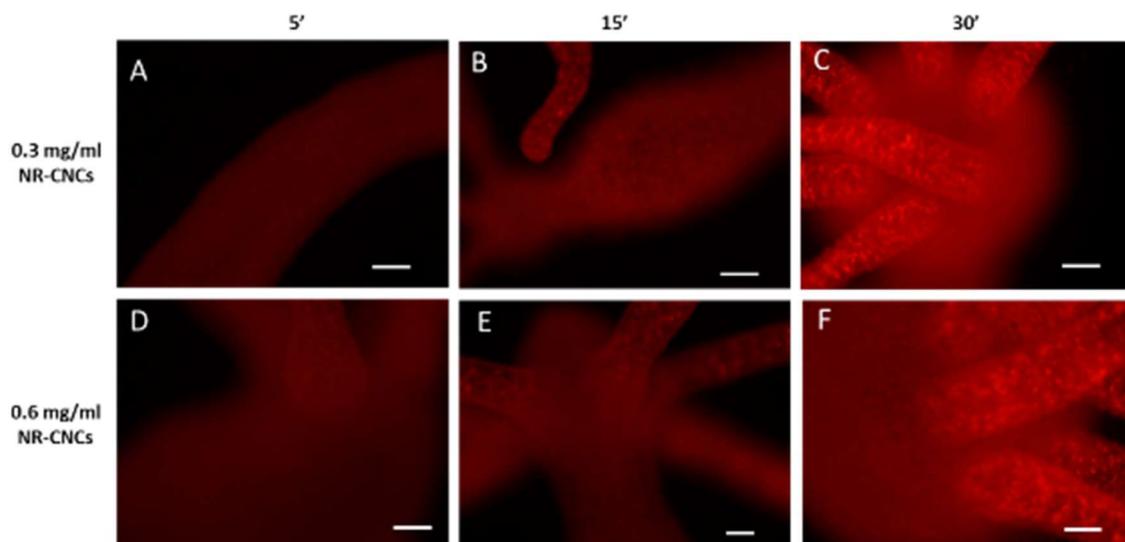


Figura 18. Internalización de NCs cargadas de Nile Red (NR-NCs, rojo) en *Hydra vulgaris* tras 5, 15 y 30 min de incubación a 0.3 y 0.6 mg/mL. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia. Escalas: 100  $\mu$ m (arriba) y 50  $\mu$ m (abajo). Reproducido con permiso de Ambrosone *et al.* [107].

Para descartar que la tinción del animal se debiera a que el fluoróforo se estuviera escapando prematuramente de las NCs al medio antes de entrar en contacto con los pólipos, se llevó a cabo un estudio de liberación del fluoróforo como parte del trabajo realizado en el marco de esta tesis. Se incubaron las NR-NCs en agua, medio fresco de *Hydra vulgaris* y medio que había sido previamente incubado con *Hydra vulgaris* (para evaluar el efecto de las posibles enzimas y sustancias químicas secretadas por *Hydra vulgaris*) durante 5 min, 30 min y 24 h a 18 °C (temperatura de mantenimiento de las *Hydras*). Las NCs fueron separadas del medio mediante filtración y el fluoróforo de su interior fue extraído en MeOH y cuantificado mediante espectrofotometría UV-Vis a 555 nm para determinar la cantidad de Nile Red que permanecía en el interior de las NCs (Figura 19).

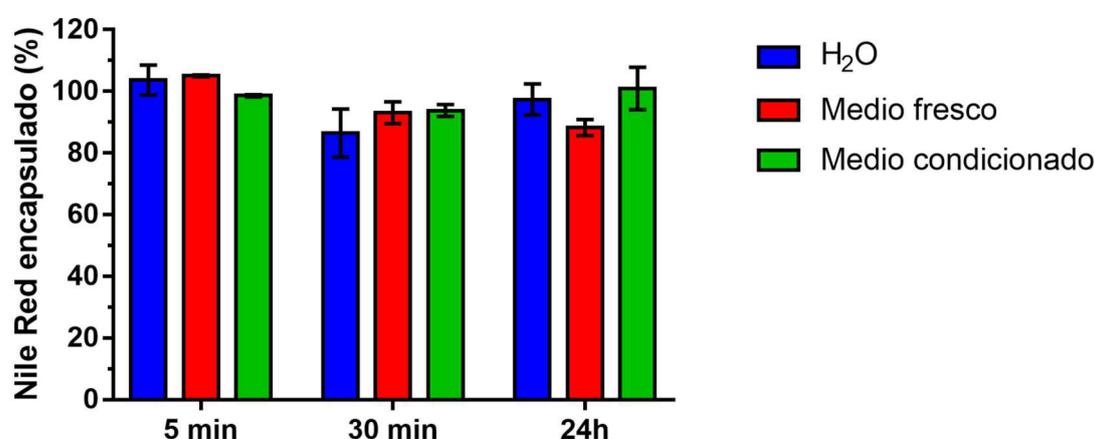


Figura 19. Ensayo de liberación de Nile Red en agua y medios de *Hydra vulgaris*. El fluoróforo retenido dentro de las NCs se expresa como porcentaje respecto a la cantidad de fluoróforo inicialmente encapsulado. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de dos réplicas experimentales. Adaptado con permiso de Ambrosone *et al.* [107].

Las NCs mantenían el 90-100 % de su carga inicial de Nile Red en todos los medios y a todos los tiempos, lo que descarta la hipótesis de una liberación de fluoróforo indeseada fuera del animal y remarca el potencial de las NCs como nanotransportadores para la administración de fármacos *in vivo*.

Para visualizar más de cerca las interacciones entre las NCs y la capa externa de la *Hydra vulgaris* y evaluar la integridad de las NCs, se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los animales tratados con NR-NCs (Figura 20). Los pólipos se incubaron 5 y 15 minutos con NR-NCs, se lavaron extensamente, se fijaron y se inspeccionaron individualmente.

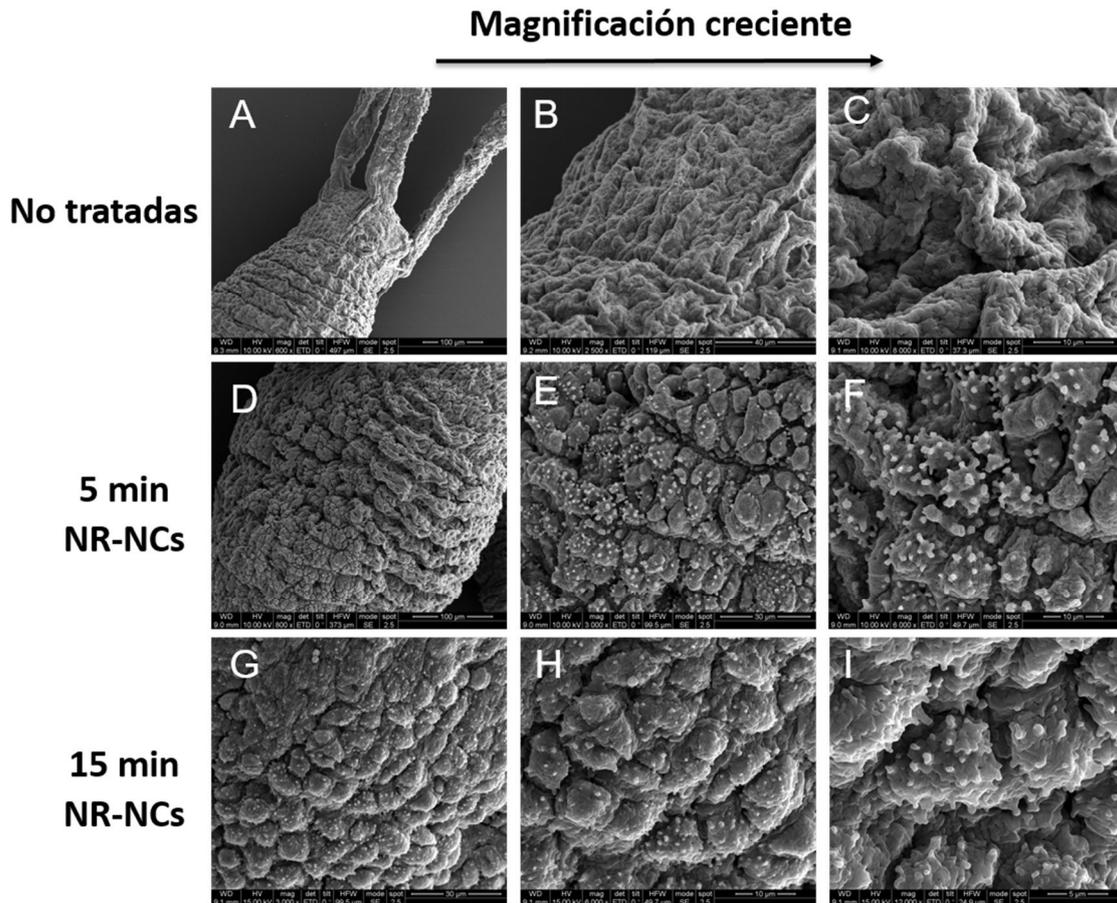


Figura 20. Imágenes de SEM de *Hydra vulgaris* no tratada (A-C) y tratada con NCs cargadas con Nile Red (NR-NCs) durante 5 min (D-F) o 15 min (G-I). Adaptado con permiso de Ambrosone *et al.* [107].

Las imágenes de SEM muestran una gran cantidad de NCs adheridas a la capa ectodérmica del animal (Figura 20D-I), lo que confirma que la interacción entre NCs e *Hydra vulgaris* ocurre en unos pocos minutos. La interacción electrostática entre las NCs cargadas positivamente y las envolturas de la capa celular externa de *Hydra vulgaris* podría ser responsable de la rápida adhesión. La literatura reúne muchos ejemplos donde se describen interacciones entre nanomateriales cargados positivamente y superficies celulares, tanto en cultivos celulares como en otros modelos animales [108–110].

Por último, con el fin de evaluar si la carga fluorescente de las NCs llega al interior de las células tras interactuar con la zona externa de *Hydra vulgaris*, se maceró el cuerpo de los pólipos para obtener células monodispersas con su morfología intacta y se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Figura 21).

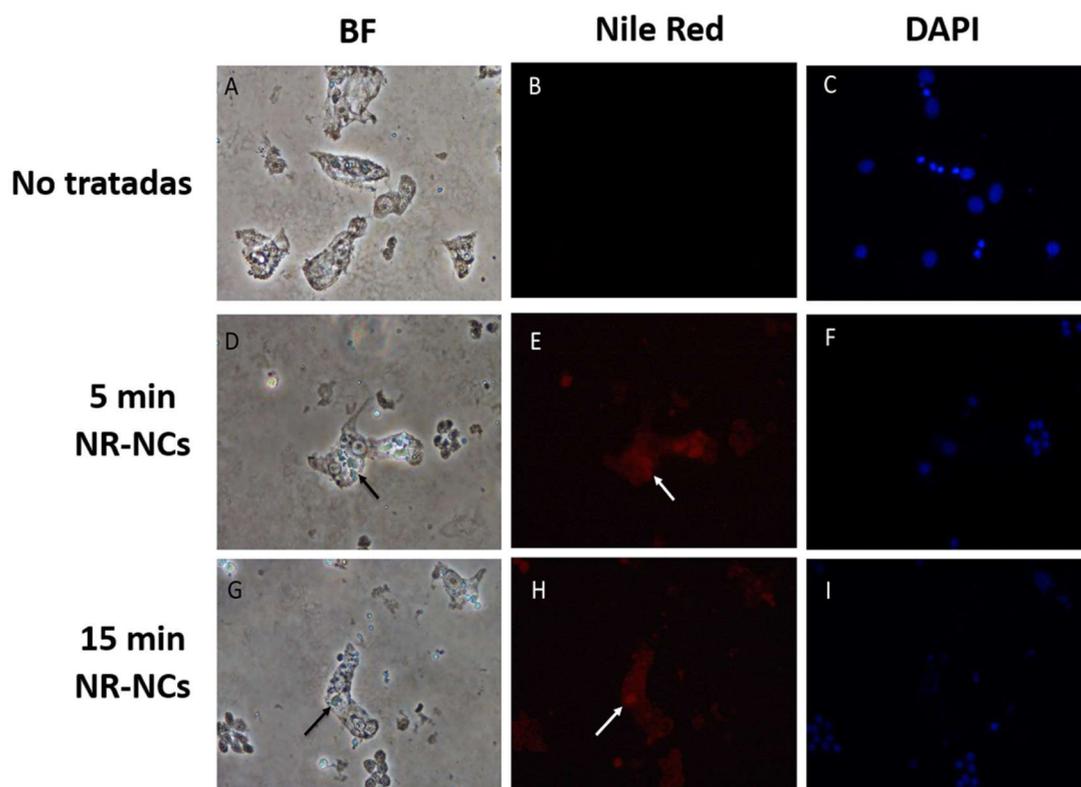


Figura 21. Internalización de NCs cargadas de Nile Red (NR-CNCs, rojo) en *Hydra vulgaris* tras 5 y 15 min de incubación a 0.3 mg/mL y posterior maceración de los pólipos en células individuales. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia. Adaptado con permiso de Ambrosone *et al.* [107].

El fluoróforo Nile Red se pudo detectar dentro de grandes vesículas citoplásmicas tras incubaciones de 5 y 15 minutos, lo que confirma que las NCs transportan su carga al interior de las células de *Hydra vulgaris* de una forma muy rápida.

## 2.7. Biodistribución de las NCs marcadas fluorescentemente en ratones

Una vez demostrada la interacción e internalización de las NCs en cultivos celulares y organismos simples (*Hydra vulgaris*), se pasó a estudiar la biodistribución en animales más complejos, en este caso ratones. Este estudio fue llevado a cabo por la investigadora predoctoral Laura Comas Calmet, perteneciente al grupo de investigación del Dr. Julián Pardo Jimeno, en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), como parte de una colaboración en el marco del proyecto NanoGram.

Para este estudio preliminar *in vivo* se sintetizaron NCs vacías y se marcaron fluorescentemente con DY-780 a 1 nmol/mg NC siguiendo el protocolo de funcionalización optimizado y previamente descrito. La ruta de administración seleccionada fue la vía oral ya que, a diferencia de muchos otros tipos de nanomateriales, las NCs de quitosano presentan propiedades muy ventajosas para el transporte oral de fármacos: el quitosano es mucoadhesivo y está descrita su capacidad

para abrir las uniones estrechas entre las células del intestino, lo que aumenta el tiempo de retención y la absorción intestinal [21,111,112].

Se administraron 500  $\mu\text{g}$  de NCs\_DY780 a 4 ratones C57BL6 y se utilizaron 2 ratones sin tratar como control. Tras 4 h, los animales fueron sacrificados y se rastreó la fluorescencia de las NCs para averiguar su localización en el tracto gastrointestinal. Después, se extrajo el aparato digestivo de cada ratón para examinarlo *ex vivo* (Figura 22).

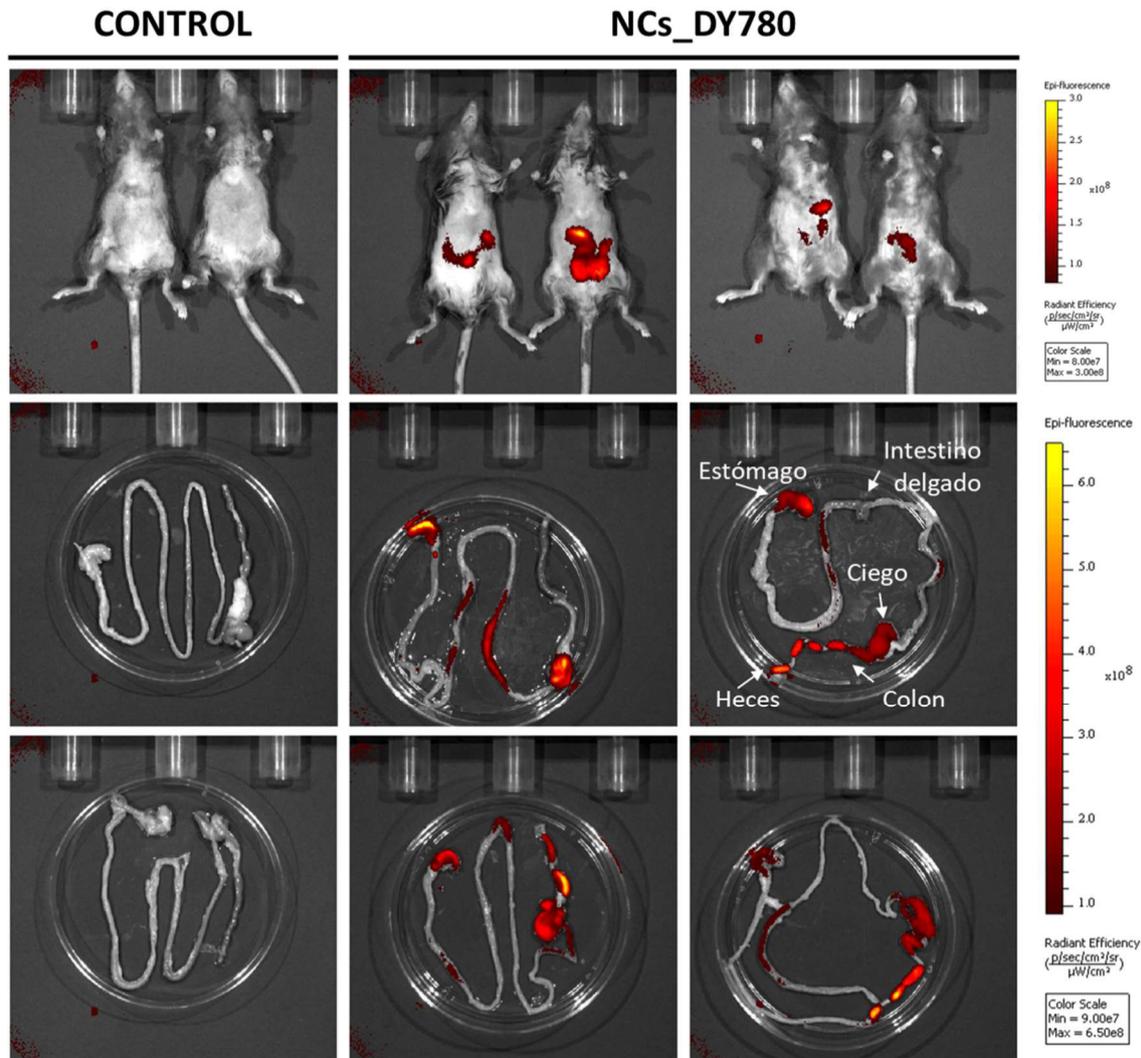


Figura 22. Biodistribución de las NCs marcadas con DY-780 en ratones a las 4 h de ser administradas oralmente.

A pesar de la variabilidad entre ratones debida a las distintas velocidades de tránsito intestinal, en los ratones tratados en general se observa acumulación de fluorescencia en el estómago, algunas zonas del intestino delgado, ciego, colon y heces. Las heces fluorescentes de las imágenes indican que gran cantidad de NCs es excretada, aunque la fluorescencia en el intestino sugiere, como se esperaba, que parte de las NCs podría quedarse adherida y retenida allí durante más tiempo.

Los ratones control no dan fluorescencia de fondo, por lo que toda la fluorescencia observada proviene del marcaje de las NCs. Además, puesto que el DY-780 está unido covalentemente a la superficie de las NCs, es menos probable que se haya liberado que si hubiera estado encapsulado en el interior. Para comprobar si la fluorescencia del fluoróforo se detectaría en el hipotético caso de que se hubiera roto el enlace covalente y el fluoróforo estuviera libre en el lumen del tracto gastrointestinal, se realizó un control administrando el fluoróforo libre. Tras administrar la misma cantidad de fluoróforo libre que la utilizada para funcionalizar las NCs, no se detectó fluorescencia, y sólo al administrar una cantidad de fluoróforo 10 veces mayor se detectó fluorescencia. Cuando el fluoróforo está libre, es probable que se encuentre más disperso en el espacio y que por eso la fluorescencia emitida no sea tan intensa como si está unido a las NCs, ya que en este último caso hay varias moléculas de fluoróforo concentradas en un mismo punto. Otra hipótesis podría ser que el fluoróforo libre no resista las condiciones gastrointestinales y pierda su funcionalidad durante el tránsito, mientras que la NC es capaz de protegerlo cuando está unido a ella. No obstante, si así fuera no debería haberse observado fluorescencia al administrar el fluoróforo libre a mayor concentración, por lo que la primera hipótesis es más probable. Estos resultados indican que la fluorescencia observada en la Figura 22 realmente proviene del fluoróforo unido a las NCs y no al hipotético fluoróforo libre. Aunque se trata de experimentos preliminares, los resultados obtenidos son prometedores y revelan el potencial de las NCs como nanotransportadores para administración oral.

### 3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización físico-química de NCs de quitosano para su aplicación como nanotransportadores de fármacos. El método de síntesis establecido ha sido optimizado con el objetivo de simplificarlo al máximo y facilitar una posible producción a escala industrial en el futuro. El proceso de gelificación iónica resultó ser imprescindible para obtener las NCs con un recubrimiento de quitosano adecuado. Sin embargo, se consiguió eliminar la sonicación durante la gelificación iónica sin perjudicar la calidad de las NCs obtenidas, lo que supone una ventaja de cara a la viabilidad del proceso para una futura producción industrial.

Además, se ha desarrollado un método de liofilización mediante el uso de crioprotectores para preservar las NCs en estado sólido y mantener así su estabilidad a largo plazo, lo que permite su almacenaje durante períodos largos de tiempo. Entre los agentes crioprotectores evaluados, el manitol ha demostrado ser el más efectivo en la estabilización y protección de las NCs durante el proceso de congelación y liofilización y se ha optimizado el ratio NCs:manitol para evitar la agregación de las NCs tras la resuspensión.

Por otro lado, se han desarrollado distintos métodos para marcar fluorescentemente las NCs y poder rastrearlas *in vitro* e *in vivo*. La gran versatilidad de las NCs ha posibilitado

tanto la encapsulación de fluoróforos en el interior de la NC como su conjugación a la superficie, así como el doble marcaje de una misma NC con un fluoróforo encapsulado y otro unido a la superficie, obteniendo NCs multifuncionales con propiedades fluorescentes óptimas tanto para aplicaciones *in vitro* como *in vivo*. Por último, se han investigado las interacciones de las NCs con sistemas biológicos de distinta complejidad (cultivos celulares y, en colaboración con otros grupos, *Hydra vulgaris* y ratones). El estudio de citotoxicidad de las NCs ha permitido determinar el rango de concentraciones no citotóxicas en células Vero, para a continuación estudiar la internalización celular. Las NCs han demostrado una gran capacidad de internalización *in vitro*, tanto en células Vero como en células dendríticas. También se ha confirmado *in vivo* que las NCs transportan su carga al interior de las células de *Hydra vulgaris* en cuestión de minutos. Estos resultados demuestran el potencial de estas nanocápsulas para su aplicación como nanotransportadores.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Tween® 20 (polioxietilen(20)sorbitanmonolaurato), etanol absoluto, ácido acético, sulfato de sodio anhídrido (99-100.5 %), cloruro de sodio (99 %), se compraron en Panreac. Span® 85 (trioleato de sorbitán), ácido oleico (90 %), quitosano (peso molecular intermedio, deacetilación 75-85 %), Orange II sal de sodio y el agua (doblemente procesada para cultivo celular) utilizada para la síntesis de las NCs se adquirieron en Sigma-Aldrich. Suberato de bis(sulfosuccinimidil) (BS<sup>3</sup>) se obtuvo de Pierce Biotechnology Millipore. Los fluoróforos Nile Red, BODIPY 493/503 y Cardiogreen fueron adquiridos en Sigma, el DiD en ThermoFisher y el DY-780 amino-modificado en DYOMICS.

Las líneas celulares Vero (células epiteliales de riñón de mono) y THP-1 (monocitos humanos de leucemia aguda) fueron adquiridos de la “American Type Culture Collection” (ATCC, USA). Los medios de cultivo celular DMEM y RPMI 1640, el tampón fosfato salino (PBS) sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y el tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS) con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> se compraron en Lonza. El MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazolil-2]-2,5-difeniltetrazolio), la penicilina, la estreptomycin, la glutamina y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se obtuvieron de Invitrogen.

##### 4.1. Síntesis de NCs de quitosano

Se siguió el método de síntesis de NCs mediante nanoemulsión de Bouchemal et al. [5], con algunas modificaciones.

Para la síntesis de NCs se preparó una solución acuosa homogénea con 13.6 mg del surfactante hidrofílico Tween® 20 en 8 mL de agua desionizada en un matraz. Se utilizó agua desionizada y estéril adquirida en Sigma para garantizar la reproducibilidad de las síntesis con respecto a las propiedades de los reactivos. Para generar la nanoemulsión, sobre la solución acuosa bajo agitación magnética a 250 rpm se añadió gota a gota una

solución orgánica homogénea con 8.6 mg del surfactante hidrofóbico Span® 85 y 40 mg de ácido oleico disueltos en 4 mL de etanol absoluto. Se dejó 15 minutos bajo agitación para que el sistema alcanzara el equilibrio y se añadieron 500 µL de quitosano 5 mg/mL en ácido acético al 1 % (v/v). Se dejó otros 15 minutos bajo agitación para que se dispersara homogéneamente y se trasvasó la nanoemulsión a un Erlenmeyer con 15 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM bajo sonicación (antes de la optimización del protocolo de síntesis) o bajo agitación (después de la optimización) para obtener el tratamiento de gelificación iónica. Para eliminar la sal y el etanol, se ultracentrifugó (Beckman Coulter Avanti J-26 XPI) a 70000 G a 10 °C durante 30 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 10 mL de H<sub>2</sub>O y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se retiró el agua de lavado y se resuspendieron las NCs en 2 mL de agua. Para determinar la concentración de cada muestra sintetizada se congelaron 200-500 µL en un congelador a -80 °C (Ultra-low Temperature Freezer MDF-U52V, SANYO), se liofilizaron (TELSTAR Cryodos) y se pesaron (Sartorius CP225D).

La síntesis se llevó a cabo en condiciones de esterilidad cuando las NCs iban a ser posteriormente testadas *in vitro* o *in vivo*. Para conseguir condiciones de esterilidad se trabajó en una campana de flujo laminar vertical de nivel I (TELSTAR PV-30/70) y todas las disoluciones fueron previamente filtradas con filtros de PVDF 0.22 µm (Millex®, Merck Millipore®). El material de vidrio fue esterilizado en la estufa a 180 °C durante 2 horas. Los tubos de centrifuga se esterilizaron mediante lavados con etanol 70 %.

#### 4.2. Caracterización físico-química de las NCs de quitosano

La composición de las nanocápsulas se analizó mediante análisis de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo JASCO FT/IR-4100 en un rango de frecuencia de 600-4000 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup> y un número de escaneo de 32.

El diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) de las NCs fue medido mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un equipo Brookhaven 90Plus. Las muestras fueron medidas a 0.15 mg/mL en H<sub>2</sub>O MilliQ a 25 °C y los datos fueron analizados según la aproximación de distribución numérica. Se realizaron al menos 8 medidas de 2 minutos de cada muestra.

El potencial zeta de las muestras fue medido a 25 °C en KCl 10 mM pH 6.5 a una concentración de 0.01 mg/mL utilizando el aparato Brookhaven 90Plus Particle Size Analyzer. Se caracterizaron varios lotes de cada tipo de nanocápsula y se realizaron al menos 5 medidas de cada muestra.

Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) fueron obtenidas usando un microscopio QUANTA-FEG 250 en modo de Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM). El análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión de Campo Claro (BF-TEM) se llevó a cabo en un microscopio FEI Tecnai T20

operando a 200 kV. Debido a la naturaleza sensible de la muestra, fue necesaria la previa fijación, deshidratación e inclusión en resina epoxi para ambas técnicas. Este proceso puede resumirse brevemente de la siguiente manera. Se sintetizó una muestra fresca y se fijó con glutaraldehído al 0.25 % en tampón fosfato 10 mM a pH 7.4 durante 2 horas. Se lavó tres veces con tampón y se incubó con tetróxido de osmio al 1 % en PBS para su posterior fijación y tinción. Finalmente, la muestra fue lavada con cuidado con agua y resuspendida en gelatina al 5 %. La muestra se centrifugó para obtener un precipitado y se incubó durante la noche a 4 °C. La muestra sólida obtenida se cortó en trozos muy pequeños antes de pasar por los siguientes pasos. La deshidratación de las muestras se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos: incubación en etanol 30 %, etanol 50 % e incubación nocturna en etanol 70 %; incubación en etanol 90 % durante 1 h y finalmente incubación durante tres veces en etanol absoluto. Después, las muestras se incubaron durante la noche en una mezcla 1:1 de etanol absoluto/resina epoxi (temperatura ambiente). A continuación, se retiró la mezcla, se cambió por resina epoxi absoluta y se dejaron las muestras para su impregnación durante 8 horas a temperatura ambiente. Después de otro cambio de medio, la incubación final en resina epoxi se llevó a cabo durante la noche a 60 °C para obtener la polimerización.

A partir de diferentes imágenes ESEM, se ha obtenido una estimación de la distribución de diámetros utilizando los softwares Digital Micrograph® y OriginLab® para medir los diámetros de más de 100 nanocápsulas y para el análisis estadístico del recuento de frecuencias, respectivamente.

### 4.3. Liofilización de las NCs de quitosano

Se prepararon suspensiones de 1.2 mL de NCs a 5 y 10 mg/mL mezcladas con trehalosa, lactosa o manitol al 5 ó 10 % (w/v). Se congelaron y liofilizaron utilizando un liofilizador Epsilon 2-4 LSC (Kühner), programado con los siguientes parámetros para las 3 etapas del proceso:

- 1) Congelación: 2 h -40 °C
- 2) Primera deshidratación (sublimación del agua congelada): 0.2 mbar, aumento de 5 °C cada 90 minutos desde -35 °C hasta +20 °C.
- 3) Segunda deshidratación (vaporización del agua de solvatación no congelada): 0.001 mbar, 1 h +20 °C.

Tras la liofilización, las muestras fueron reconstituidas añadiendo el volumen inicial de agua y se dejaron bajo agitación 20 h. Se determinó el diámetro medio, el potencial zeta y la osmolaridad de cada muestra antes de la liofilización y después de la reconstitución. El tamaño y el potencial zeta de las muestras se caracterizaron mediante las técnicas de DLS y potencial zeta utilizando un equipo Zetasizer nano (Malvern Instruments). Para el análisis por DLS se diluyeron las muestras a 0.1 mg/mL en H<sub>2</sub>O Milli-Q. Para el análisis del potencial zeta se diluyeron a 0.01-0.02 mg/mL en KCl 10 mM. Se realizaron 3 medidas

de cada muestra y se calculó la media. Para medir la osmolaridad se utilizó un equipo Turbiscan Osmometer MA 2000.

#### 4.4. Toxicidad de las NCs de quitosano

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular *in vitro* para determinar la citotoxicidad de las NCs utilizando el ensayo colorimétrico de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2] -2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células Vero se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada y con CO<sub>2</sub> al 5 % en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y glutamina (2 mM). Se sembraron 7500 células por pocillo utilizando una placa estándar de 96 pocillos (5 réplicas por muestra). Después de 24 h, el medio se reemplazó con un nuevo medio que contenía 5 concentraciones diferentes de NCs y un control negativo que no contenía cápsulas (células no tratadas). Después de otras 24 h de incubación, el medio se reemplazó con la solución de MTT (0.5 mg/mL en DMEM). Después de 2 h de incubación, se eliminó el medio y los cristales formados se disolvieron en 200 µL de DMSO. La absorbancia a 570 nm se midió en un lector de placas ThermoScientific Multiskan GO TM. La viabilidad celular relativa (%) se calculó utilizando la relación porcentual entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control, tras la sustracción del blanco de DMSO. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, cada uno con 5 repeticiones por cada muestra.

#### 4.5. Marcaje fluorescente de las NCs

##### 4.5.1. Encapsulación de fluoróforos

Para encapsular el fluoróforo en el núcleo de la cápsula, se añadió el fluoróforo disuelto en etanol a la fase orgánica justo antes de formar la nanoemulsión y se continuó la síntesis de las NCs siguiendo el protocolo estándar. La cantidad de fluoróforo añadida se optimizó para cada fluoróforo según los requerimientos de los experimentos posteriores (Nile Red 50 µg, BODIPY 200 µg y DiD 100 µg).

Las NCs se introdujeron en una cubeta de cuarzo Suprasil® de tres ventanas (QS-3 mm, 45 µL, ultra Micro Hellma®) a una concentración de 100-500 µg/mL. El espectro de fluorescencia se registró con un fluorímetro (Perkin-Elmer LS-55, 120 V) utilizando las siguientes longitudes de onda:

Fluoróforo	λ excitación	λ emisión
Nile Red	555	500-800
BODIPY	480	450-650
DiD	650	600-800

Cardiogreen	775	700-900
DY-780	780	700-900

#### 4.5.2. Doble marcaje: encapsulación y funcionalización de la superficie

Se sintetizaron NCs con 200 µg de BODIPY según el protocolo descrito en el apartado anterior y se determinó su concentración. Posteriormente, para funcionalizar su superficie, se mezclaron 10 mg de NCs a una concentración de 2 mg/mL en tampón borato 10 mM pH 8.3 con 10 nmol/mg NC del enlazador bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS<sup>3</sup>) y se mantuvieron bajo agitación durante 30 min. Después se añadió 20 nmol/mg NC de DY-780 disuelto en agua a 1 mg/mL (exceso de 2X con respecto a la BS<sup>3</sup>) y la mezcla se mantuvo bajo agitación y protegida de la luz durante 2 h a 37 °C. Finalmente, se agregaron 5 mL de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0 para bloquear el enlazador BS<sup>3</sup> que no hubiera reaccionado con el ligando. Las NCs funcionalizadas se filtraron usando un dispositivo de filtración por centrifugación con membrana de celulosa regenerada Ultracel® 100 (Amicon® Ultra-15, Millipore®, 100 KDa) para separarlas del fluoróforo no unido. Después de un lavado con agua, las NCs se concentraron hasta un volumen final de 1-2 mL. La concentración se determinó después de obtener el peso seco liofilizando una fracción de la muestra.

La fluorescencia se detectó utilizando un espectrómetro de fluorescencia fijando en 5 nm las anchuras de banda de excitación y de emisión. Para los espectros de emisión, primero se excitó a 480 nm para recoger la fluorescencia del BODIPY y después a 780 nm para recoger la fluorescencia del DY-780.

#### 4.5.3. Optimización de la funcionalización con DY-780

La cantidad de grupos amino expuestos en la superficie de las NCs se midió mediante el ensayo espectrofotométrico Orange II [95,96]. Cada molécula de Orange II se une a un grupo amino de la superficie de la NC (cuando el pH es lo suficientemente ácido para que los grupos amino estén protonados e interaccionen con el Orange II), por lo que la medida de la absorbancia del Orange II equivale a los grupos amino accesibles.

Se pusieron en contacto 0.2 mg de NCs con 1 mL de solución ácida de sal sódica de Orange II 2 mM (pH 3) y se mantuvieron bajo agitación durante 30 min a 40 °C. La suspensión de las cápsulas se pasó a través de un filtro de membrana adaptado para jeringa (filtro de PVDF con poros de 0.22 µm Millex®, Merck Millipore®) para adsorber las NCs en la membrana y mantenerlas retenidas para separarlas de la solución Orange II. Después, se pasó una solución ácida (pH 3) varias veces a través del mismo filtro hasta que se eliminó todo el colorante no unido a las NCs (verificado mediante la medición espectrofotométrica del sobrenadante). Después se lavaron con una solución alcalina (pH 12) para desorber el colorante unido a los grupos amino de las NCs. Se recogieron

las fracciones de lavado, se ajustó a pH 3 y se midió la cantidad de colorante no absorbido y desorbido a 480 nm con un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV/Vis después de realizar una curva de calibrado.

Para la funcionalización de la superficie de las NCs, se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior, pero añadiendo 1, 5, 10 ó 15 nmol/mg NC de BS<sup>3</sup> y después una cantidad doble de fluoróforo en cada muestra. Una vez funcionalizadas, se midió la intensidad de fluorescencia de cada tipo de NC a cuatro concentraciones diferentes (3.4, 1.7, 0.85 y 0.43 mg/mL) utilizando un espectrofluorímetro. Para los espectros de emisión, se excitó a 780 nm y se recogió la emisión en el rango de 700-900 nm.

## 4.6. Internalización en células

### 4.6.1. Células Vero

Las células Vero se mantuvieron en medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y glutamina (2 mM), en una incubadora humidificada (37 °C/5 % CO<sub>2</sub>).

Para el estudio preliminar de internalización de las NCs no marcadas fluorescentemente, se sembraron  $3 \times 10^4$  células sobre cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos a 37 °C. Después de 24 h, se añadieron NCs a 50 µg/mL en DMEM y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Las NCs no internalizadas se eliminaron lavando con DPBS dos veces. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (EMS) durante 20 min a 4 °C, se lavaron dos veces con DPBS y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con 4', 6-diamidino-2-fenilindolifenilindol (DAPI) para el marcaje del núcleo. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio para microscopía utilizando ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade (Invitrogen). La microscopía se realizó con un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse Ti-E) y las imágenes se analizaron con el software NIS-Elements Advanced Research.

Para el análisis de la internalización de NCs marcadas fluorescentemente, se sembraron  $3 \times 10^4$  células Vero por pocillo sobre cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos (NUNC) y se mantuvieron en la estufa a 37 °C durante 24 h. Después se añadieron NCs cargadas de Nile Red (NCs NR) a 50 µg/mL. Se mantuvieron a 37 °C en la estufa y se realizaron fotos 1 y 4 h después de añadir las NCs con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E. A las 24 h se lavaron las células con DPBS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4 % y se tiñeron los núcleos con DAPI y los filamentos de actina con faloidina conjugada con Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos y se realizaron fotos con el mismo microscopio de fluorescencia en campo claro y con los filtros de fluorescencia roja (excitación 531/46 y emisión 593/40).

#### 4.6.2. Células dendríticas diferenciadas a partir de células THP-1

Las células THP-1 se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de FBS, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y glutamina (2 mM), en una incubadora humidificada (37 °C/5 % CO<sub>2</sub>). Las células se mantuvieron a una densidad de 3-10 x 10<sup>5</sup> células/mL.

Tras sembrar 2 x 10<sup>5</sup> células/mL por pocillo en placas de 24 pocillos en las que se habían introducido cubreobjetos de vidrio esterilizados, las células THP-1 fueron diferenciadas a células dendríticas mediante adición de los factores de diferenciación IL-4 (Peprotech) a 25 ng/mL y PMA (Sigma) a 100 ng/mL al medio de cultivo durante 5 días. Una vez diferenciadas, las células fueron incubadas con 100 µg/mL de NCs cargadas de Nile Red. Después de 1, 3 y 6 h de incubación, se lavaron las NCs no internalizadas con DPBS y se fijaron las células con PFA 4 %. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV10i.

#### 4.7. Internalización en *Hydra vulgaris*

Las *Hydra vulgaris* se cultivaron en medio de *Hydra* (cloruro de calcio 1 mM, hidrógeno carbonato de sodio 0.1 mM, pH 7) a 18 °C con un régimen de luz:oscuridad de 12:12 h. Los pólipos se alimentaron en días alternos con nauplios de *Artemia salina* recién nacidos. Se seleccionaron pólipos adultos sin brotes para las pruebas *in vivo*. Todas las pruebas se llevaron a cabo con pólipos que habían estado sin comer 1 día.

Para monitorizar la internalización de las NCs, se administraron NCs cargadas de Nile Red a los animales a distintas concentraciones durante 5, 15 ó 30 min. Posteriormente, se lavaron los pólipos de *Hydra vulgaris* con medio fresco para eliminar el exceso de NCs e inmediatamente se tomaron imágenes mediante microscopía de fluorescencia. Para obtener imágenes de fluorescencia *in vivo*, se usó un microscopio invertido (Axiovert 100, Zeiss) equipado con una cámara de color digital (Olympus, DP70) y un conjunto de filtros de fluorescencia (BP 450-490/FT510/LP515). Las imágenes fueron adquiridas y analizadas con el sistema de software Cell F (Olympus).

Para investigar la internalización celular de las NCs cargadas de Nile Red, los pólipos tratados se maceraron en una suspensión de células individuales fijadas, de acuerdo con los procedimientos estándar [113]. Los macerados se tiñeron con DAPI durante 2 min y se lavaron tres veces, 10 min cada vez, con PBS. Las muestras se observaron mediante microscopía de contraste de fases y de fluorescencia.

Con el fin de detectar una posible liberación prematura del fluoróforo encapsulado, las NCs cargadas con Nile Red se diluyeron en agua o medio de cultivo *Hydra*, recién preparado o previamente incubado con animales, a una concentración de 0.75 mg/mL de NCs. Las muestras se analizaron después de 5 min, 30 min y 24 h de incubación a 18

°C, separando las NCs por filtración y extrayendo el fármaco retenido con 600 µL de metanol. La concentración de Nile Red en metanol se midió por análisis espectrofotométrico a 555 nm y la cantidad de fluoróforo retenido en el interior de las NCs se expresó como porcentaje respecto a la cantidad inicialmente encapsulada. Las muestras fueron preparadas y analizadas por duplicado.

Se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar las interacciones tempranas de las NCs de quitosano con la *Hydra*. Los pólipos fueron incubados con NCs cargadas de Nile Red durante 5 ó 15 minutos, se lavaron vigorosamente mediante pipeteo en medio *Hydra* para eliminar el exceso de NCs, se relajaron con uretano al 2 % en medio *Hydra* y se fijaron durante 1 h en glutaraldehído al 2 % en medio *Hydra*. Las muestras se lavaron (3 x 10 min) con medio *Hydra* y se fijaron durante 45 min con OsO<sub>4</sub> tamponado al 1 %. Después de una serie de lavados adicionales, los animales se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30–50–70–90–100 %). Las imágenes de los pólipos con microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) se recolectaron utilizando un microscopio Quanta FE6-250 (FEI Company) para obtener imágenes de alta resolución en modo vacío.

#### 4.8. Biodistribución en ratones

Los procedimientos experimentales con ratones se realizaron en las instalaciones del animalario del CIBA y fueron aprobados por el comité ético de investigación animal de la Universidad de Zaragoza, bajo el número PI64/17.

Se administraron 500 µg de NCs\_DY780 (100 µL de una suspensión de NCs\_DY780 a 5 mg/mL) a 4 ratones mediante vía oral utilizando una cánula. Como control se utilizaron 2 ratones a los que se les administró agua para que pasaran por el mismo proceso de manipulación. Tras 4 h, los animales fueron sacrificados con una dosis letal de anestésico DOLETHAL (pentobarbital sódico) inyectado de forma intraperitoneal. Tras ser rasurados para que su pelaje oscuro no interfiriera con la señal, los ratones fueron examinados utilizando un equipo IVIS Lumina II. A continuación, se extrajo su aparato digestivo y se tomaron imágenes de los órganos *ex vivo* con el mismo equipo.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Rodrigo Fernández Pacheco, del Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza, su apoyo técnico para la observación de las muestras mediante TEM.

Agradezco también a la Dra. Cristina Freire por permitirme realizar la primera optimización de las condiciones de liofilización de las NCs de quitosano en las instalaciones de la empresa Kuecept Ltd y a la Dra. Doroty Codoni por su supervisión.

Me gustaría agradecer al grupo de investigación de la Prof. Claudia Tortiglione del Istituto di Scienze Applicate e Sistemi Intelligenti “E.Caianello”, y especialmente al Dr.

Alfredo Ambrosone, por el estudio *in vivo* sobre la internalización de las NCs en *Hydra vulgaris*.

Agradecer también al grupo de investigación del Dr. Julián Pardo Jimeno del Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), y especialmente a Laura Comas Calmet, por el estudio *in vivo* sobre la biodistribución de las NCs en ratones.

## 6. REFERENCIAS

1. Vrignaud, S.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8593–8604.
2. Yaqoob Khan, A.; Talegaonkar, S.; Iqbal, Z.; Jalees Ahmed, F.; Krishan Khar, R. Multiple Emulsions: An Overview. *Curr. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 429–443.
3. McClements, D.J.; Jafari, S.M. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In *Nanoemulsions*; Elsevier, 2018; pp. 3–20 ISBN 9780128118399.
4. SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIACELMA, M. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, *10*, 102–110.
5. Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 241–251.
6. Gharieh, A.; Khoei, S.; Mahdavian, A.R. Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *269*, 152–186.
7. Yang, Y.; Marshall-Breton, C.; Leser, M.E.; Sher, A.A.; McClements, D.J. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocoll.* **2012**, *29*, 398–406.
8. Hong, L.; Li, X.; Bao, Y.; Duvall, C.L.; Zhang, C.; Chen, W.; Peng, C. Preparation, preliminary pharmacokinetic and brain targeting study of metformin encapsulated W/O/W composite submicron emulsions promoted by borneol. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *133*, 160–166.
9. Calvo, P.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 46–53.
10. Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 185–199.
11. Đekić, L.; Primorac, M. Microemulsions and Nanoemulsions as Carriers for Delivery of NSAIDs. In *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*; Elsevier, 2017; pp. 69–94 ISBN 9780128040805.
12. Andreu, V.; Larrea, A.; Rodriguez-Fernandez, P.; Alfaro, S.; Gracia, B.; Lucía, A.; Usón, L.; Gomez, A.-C.; Mendoza, G.; Lacoma, A.; et al. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of Mycobacterium tuberculosis.

*Nanomedicine* **2019**, *14*, 707–726.

13. Allouche, J. Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles: An Overview of the Preparation Methods. In *Nanomaterials: A Danger or a Promise?*; Springer London: London, 2013; Vol. 9781447142, pp. 27–74 ISBN 9781447142133.
14. Anton, N.; Vandamme, T.F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 978–985.
15. Sonaje, K.; Lin, K.J.; Tseng, M.T.; Wey, S.P.; Su, F.Y.; Chuang, E.Y.; Hsu, C.W.; Chen, C.T.; Sung, H.W. Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the oral absorption of endotoxins. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8712–8721.
16. Serrano-Sevilla, I.; Artiga, Á.; Mitchell, S.G.; De Matteis, L.; de la Fuente, J.M. Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives. *Molecules* **2019**, *24*, 2570.
17. Rodrigues, S.; Dionísio, M.; López, C.R.; Grenha, A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3*, 615–641.
18. He, C.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Multifunctional polymeric nanoparticles for oral delivery of TNF- $\alpha$  siRNA to macrophages. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2843–2854.
19. Peniche, H.; Peniche, C. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polym. Int.* **2011**, *60*, 883–889.
20. Coya, J.M.; De Matteis, L.; Giraud-Gatineau, A.; Biton, A.; Serrano-Sevilla, I.; Danckaert, A.; Dillies, M.-A.; Gicquel, B.; De la Fuente, J.M.; Tailleux, L. Tri-mannose grafting of chitosan nanocarriers remodels the macrophage response to bacterial infection. *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 15.
21. Mohammed, M.; Syeda, J.; Wasan, K.; Wasan, E. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2017**, *9*, 53.
22. Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M.J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *J. Control. Release* **2012**, *161*, 496–504.
23. Casettari, L.; Illum, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 189–200.
24. Ivanova, E.P.; Bazaka, K.; Crawford, R.J. Natural polymer biomaterials: advanced applications. In *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*; Elsevier, 2014; pp. 32–70 ISBN 9781782422662.
25. Buschmann, M.D.; Merzouki, A.; Lavertu, M.; Thibault, M.; Jean, M.; Darras, V. Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1234–1270.
26. Singh, B.; Choi, Y.J.; Park, I.K.; Akaike, T.; Cho, C.S. Chemical modification of chitosan with pH-sensitive molecules and specific ligands for efficient DNA transfection and siRNA silencing. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 564–576.
27. Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S.P.; Vårum, K.M.; Draget, K.I.; Nordgård, C.T. Chitosan: Gels and interfacial properties. *Polymers (Basel)*. **2015**, *7*, 552–579.
28. Chiappisi, L.; Gradzielski, M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Adv. Colloid*

*Interface Sci.* **2015**, *220*, 92–107.

29. Prego, C.; Fabre, M.; Torres, D.; Alonso, M.J. Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 549–556.
30. Ahirrao, S.P.; Gide, P.S.; Shrivastav, B.; Sharma, P. Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Res. Rev. J. Pharm. Nanotechnol.* **2014**, *2*, 1–6.
31. Mao, H.-Q.; Roy, K.; Troung-Le, V.L.; Janes, K.A.; Lin, K.Y.; Wang, Y.; August, J.T.; Leong, K.W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control. Release* **2001**, *70*, 399–421.
32. Tran, T.H.; Nguyen, T.D.; Poudel, B.K.; Nguyen, H.T.; Kim, J.O.; Yong, C.S.; Nguyen, C.N. Development and Evaluation of Artesunate-Loaded Chitosan-Coated Lipid Nanocapsule as a Potential Drug Delivery System Against Breast Cancer. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 1307–1316.
33. Veilleux, D.; Gopalakrishna Panicker, R.K.; Chevrier, A.; Biniiecki, K.; Lavertu, M.; Buschmann, M.D. Lyophilisation and concentration of chitosan/siRNA polyplexes: Influence of buffer composition, oligonucleotide sequence, and hyaluronic acid coating. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *512*, 335–345.
34. Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Fessi, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63*, 87–94.
35. Bejrapha, P.; Surassmo, S.; Choi, M.-J.; Nakagawa, K.; Min, S.-G. Studies on the role of gelatin as a cryo- and lyo-protectant in the stability of capsicum oleoresin nanocapsules in gelatin matrix. *J. Food Eng.* **2011**, *105*, 320–331.
36. Choi, M.J.; Briançon, S.; Andrieu, J.; Min, S.G.; Fessi, H. Effect of Freeze-Drying Process Conditions on the Stability of Nanoparticles. *Dry. Technol.* **2004**, *22*, 335–346.
37. Costantino, H.; Pikal, M. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*; AAPS Press, 2004; ISBN 0-9711767-6-0.
38. Umerska, A.; Paluch, K.J.; Santos-Martinez, M.J.; Corrigan, O.I.; Medina, C.; Tajber, L. Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles: Effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. *Int. J. Pharm.* **2018**, *552*, 27–38.
39. Hirsjärvi, S.; Peltonen, L.; Hirvonen, J. Effect of Sugars, Surfactant, and Tangential Flow Filtration on the Freeze-Drying of Poly(lactic acid) Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 488–494.
40. Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1688–1713.
41. Marcu, L. Fluorescence Lifetime Techniques in Medical Applications. *Ann. Biomed. Eng.* **2012**, *40*, 304–331.
42. Gazon, C.; Rieger, J.; Beaunier, P.; Méallet-Renault, R.; Clavier, G. Fluorescent core-shell nanoparticles and nanocapsules using comb-like macromolecular RAFT agents: synthesis and functionalization thereof. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 4272–4283.

43. Tsuboi, S.; Yamada, S.; Nakane, Y.; Sakata, T.; Yasuda, H.; Jin, T. Critical Review—Water-Soluble Near-Infrared Fluorophores Emitting over 1000 nm and Their Application to In Vivo Imaging in the Second Optical Window (1000–1400 nm). *ECS J. Solid State Sci. Technol.* **2018**, *7*, R3093–R3101.
44. Marshall, M. V.; Rasmussen, J.C.; Tan, I.-C.; Aldrich, M.B.; Adams, K.E.; Wang, X.; Fife, C.E.; Maus, E.A.; Smith, L.A.; Sevick-Muraca, E.M. Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update. *Open Surg Oncol J* **2012**, *2*, 12–25.
45. Zhang, X.; Bloch, S.; Akers, W.; Achilefu, S. Near-Infrared Molecular Probes for In Vivo Imaging. In *Current Protocols in Cytometry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012; Vol. 123, pp. 2145–2156 ISBN 6176321972.
46. Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P.N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2826–2885.
47. Chung, T.-H.; Wu, S.-H.; Yao, M.; Lu, C.-W.; Lin, Y.-S.; Hung, Y.; Mou, C.-Y.; Chen, Y.-C.; Huang, D.-M. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2959–2966.
48. Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
49. Sogias, I.A.; Williams, A.C.; Khutoryanskiy, V. V. Why is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1837–1842.
50. M. Ways, T.; Lau, W.; Khutoryanskiy, V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 267.
51. Onoue, S.; Yamada, S.; Chan, K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 1025.
52. Felt, O.; Buri, P.; Gurny, R. Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 979–993.
53. Raemdonck, K.; Martens, T.F.; Braeckmans, K.; Demeester, J.; De Smedt, S.C. Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1123–1147.
54. Marciello, M.; Rossi, S.; Caramella, C.; Remuñán-López, C. Freeze-dried cylinders carrying chitosan nanoparticles for vaginal peptide delivery. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *170*, 43–51.
55. Islam, N.; Ferro, V. Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. *Nanoscale* **2016**, *8*, 14341–14358.
56. Sundar, S.; Kundu, J.; Kundu, S.C. Biopolymeric nanoparticles. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2010**, *11*, 014104.
57. Huang, S.; Fu, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J. Control. Release* **2010**, *142*, 149–159.
58. Prabakaran, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery.

*Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1313–1322.

59. Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2010**, *58*, 1423–30.
60. Chen, C.-K.; Wang, Q.; Jones, C.H.; Yu, Y.; Zhang, H.; Law, W.-C.; Lai, C.K.; Zeng, Q.; Prasad, P.N.; Pfeifer, B.A.; et al. Synthesis of pH-Responsive Chitosan Nanocapsules for the Controlled Delivery of Doxorubicin. *Langmuir* **2014**, *30*, 4111–4119.
61. Mishra, B.; Patel, B.B.; Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 9–24.
62. Wang, L.; Li, X.; Zhang, G.; Dong, J.; Eastoe, J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *314*, 230–235.
63. Tavares, I.S.; Caroni, A.L.P.F.; Neto, A.A.D.; Pereira, M.R.; Fonseca, J.L.C. Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *90*, 254–258.
64. Parhiz, H.; Khoshnejad, M.; Myerson, J.W.; Hood, E.; Patel, P.N.; Brenner, J.S.; Muzykantov, V.R. Unintended effects of drug carriers: Big issues of small particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *130*, 90–112.
65. Wibroe, P.P.; Anselmo, A.C.; Nilsson, P.H.; Sarode, A.; Gupta, V.; Urbanics, R.; Szebeni, J.; Hunter, A.C.; Mitragotri, S.; Mollnes, T.E.; et al. Bypassing adverse injection reactions to nanoparticles through shape modification and attachment to erythrocytes. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 589–594.
66. Sharma, G.; Valenta, D.T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J.W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 408–412.
67. Desai, M.P.; Labhassetwar, V.; Walter, E.; Levy, R.J.; Amidon, G.L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1568–73.
68. Sotelo-Boyás, M.E.; Correa-Pacheco, Z.N.; Bautista-Baños, S.; Corona-Rangel, M.L. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT* **2017**, *77*, 15–20.
69. Mertins, O.; Dimova, R. Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry. *Langmuir* **2011**, *27*, 5506–5515.
70. Quemeneur, F.; Rammal, A.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. Large and Giant Vesicles “Decorated” with Chitosan: Effects of pH, Salt or Glucose Stress, and Surface Adhesion. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2512–2519.
71. Chauhan, N.; Dilbaghi, N.; Gopal, M.; Kumar, R.; Kim, K.-H.; Kumar, S. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *97*, 616–624.
72. Xiao, M.; Zhang, N.; Zhuang, J.; Sun, Y.; Ren, F.; Zhang, W.; Hou, Z. Degradable Poly(ether-ester-urethane)s Based on Well-Defined Aliphatic Diurethane

- Diisocyanate with Excellent Shape Recovery Properties at Body Temperature for Biomedical Application. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, 1002.
73. Yue, J.; Wu, J.; Liu, D.; Zhao, X.; Lu, W.W. BMP2 gene delivery to bone mesenchymal stem cell by chitosan-g-PEI nonviral vector. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 203.
  74. De Jaeghere, F.; Allémann, E.; Feijen, J.; Kissel, T.; Doelker, E.; Gurny, R. Freeze-Drying and Lyopreservation of Diblock and Triblock Poly(Lactic Acid)–Poly(Ethylene Oxide) (PLA–PEO) Copolymer Nanoparticles. *Pharm. Dev. Technol.* **2000**, *5*, 473–483.
  75. Stranz, M.; Kastango, E.S. A Review of pH and Osmolarity. *Int. J. Pharm. Compd.* **2002**, *6*, 216–20.
  76. Patel, K.; Forbes, B.; Cram, M. A Study into Upper and Lower pH Limits of Intravenous Products Delivered by Infusion. *King's Coll. London* **2012**, *6*, 2012.
  77. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
  78. Szczepanowicz, K.; Bazylińska, U.; Pietkiewicz, J.; Szyk-Warszyńska, L.; Wilk, K.A.; Warszyński, P. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 678–691.
  79. Dai, T.; Tanaka, M.; Huang, Y.; Hamblin, M.R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9*, 857–879.
  80. Pradines, B.; Lievin-Le Moal, V.; Vauthier, C.; Ponchel, G.; Loiseau, P.M.; Bouchemal, K. Cell line-dependent cytotoxicity of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles coated with chitosan and thiolated chitosan: Insights from cultured human epithelial HeLa, Caco2/TC7 and HT-29/MTX cells. *Int. J. Pharm.* **2015**, *491*, 17–20.
  81. Qi, L.F.; Xu, Z.R.; Li, Y.; Jiang, X.; Han, X.Y. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 5136–5141.
  82. Gupta, S.; Moulik, S.P.; Lala, S.; Basu, M.K.; Sanyal, S.K.; Datta, S. Designing and Testing of an Effective Oil-in-Water Microemulsion Drug Delivery System for In Vivo Application. *Drug Deliv.* **2005**, *12*, 267–273.
  83. Kaur, G.; Mehta, S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *Int. J. Pharm.* **2017**, *529*, 134–160.
  84. Lémery, E.; Briançon, S.; Chevalier, Y.; Bordes, C.; Oddos, T.; Gohier, A.; Bolzinger, M.-A. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *469*, 166–179.
  85. Łukasiewicz, S.; Szczepanowicz, K. In Vitro Interaction of Polyelectrolyte Nanocapsules with Model Cells. *Langmuir* **2014**, *30*, 1100–1107.
  86. Zhang, E.; Xing, R.; Liu, S.; Qin, Y.; Li, K.; Li, P. Advances in chitosan-based

- nanoparticles for oncotherapy. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *222*, 115004.
87. Rumin, J.; Bonnefond, H.; Saint-Jean, B.; Rouxel, C.; Sciandra, A.; Bernard, O.; Cadoret, J.-P.; Bougaran, G. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 42.
88. Cell Membrane Staining Available online: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/cell-tracing-tracking-and-morphology/neuronal-tracing/cell-membrane-staining.html> (accessed on Jun 25, 2019).
89. Scientific, T. BODIPY FL Dye Available online: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/bodipy-fl.html#> (accessed on Jun 25, 2019).
90. Chen, A.K.; Cheng, Z.; Behlke, M.A.; Tsourkas, A. Assessing the Sensitivity of Commercially Available Fluorophores to the Intracellular Environment. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7437–7444.
91. Ghosh, M.; Nath, S.; Hajra, A.; Sinha, S. Fluorescence self-quenching of tetraphenylporphyrin in liquid medium. *J. Lumin.* **2013**, *141*, 87–92.
92. Zhegalova, N.G.; He, S.; Zhou, H.; Kim, D.M.; Berezin, M.Y. Minimization of self-quenching fluorescence on dyes conjugated to biomolecules with multiple labeling sites via asymmetrically charged NIR fluorophores. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9*, 355–362.
93. Wang, S.; Fan, Y.; Li, D.; Sun, C.; Lei, Z.; Lu, L.; Wang, T.; Zhang, F. Anti-quenching NIR-II molecular fluorophores for in vivo high-contrast imaging and pH sensing. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1058.
94. Bae, P.K.; Jung, J.; Chung, B.H. Highly enhanced optical properties of indocyanine green/perfluorocarbon nanoemulsions for efficient lymph node mapping using near-infrared and magnetic resonance imaging. *Nano Converg.* **2014**, *1*, 6.
95. Arenal, R.; De Matteis, L.; Custardoy, L.; Mayoral, A.; Tence, M.; Grazu, V.; De La Fuente, J.M.; Marquina, C.; Ibarra, M.R. Spatially-Resolved EELS Analysis of Antibody Distribution on Biofunctionalized Magnetic Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, *7*, 4006–4013.
96. Noel, S.; Liberelle, B.; Robitaille, L.; De Crescenzo, G. Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1690–1699.
97. Hong, G.; Tabakman, S.M.; Welsher, K.; Chen, Z.; Robinson, J.T.; Wang, H.; Zhang, B.; Dai, H. Near-Infrared-Fluorescence-Enhanced Molecular Imaging of Live Cells on Gold Substrates. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 4644–4648.
98. Martins, S.; Costa-Lima, S.; Carneiro, T.; Cordeiro-da-Silva, A.; Souto, E.B.; Ferreira, D.C. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 216–227.
99. Chen, Z. (Georgia) Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 594–602.
100. Canton, I.; Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*,

2718.

101. Taylor, M.E. Structure and Function of the Macrophage Mannose Receptor. In *Mammalian Carbohydrate Recognition Systems*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001; Vol. 33, pp. 105–121 ISBN 978-3-540-46410-5.
102. McGreal, E.P.; Miller, J.L.; Gordon, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **2005**, *17*, 18–24.
103. Bode, H.R. Axial Patterning in Hydra. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, 1–10.
104. Ambrosone, A.; Marchesano, V.; Carregal-Romero, S.; Intartaglia, D.; Parak, W.J.; Tortiglione, C. Control of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Vivo via Light Responsive Capsules. *ACS Nano* **2016**, *10*, 4828–4834.
105. Ambrosone, A.; Pino, P. del; Marchesano, V.; Parak, W.J.; de la Fuente, J.M.; Tortiglione, C. Gold nanoprisms for photothermal cell ablation in vivo. *Nanomedicine* **2014**, *9*, 1913–1922.
106. Marchesano, V.; Ambrosone, A.; Bartelmess, J.; Strisciante, F.; Tino, A.; Echegoyen, L.; Tortiglione, C.; Giordani, S. Impact of Carbon Nano-Onions on Hydra vulgaris as a Model Organism for Nanoecotoxicology. *Nanomaterials* **2015**, *5*, 1331–1350.
107. Ambrosone, A.; Matteis, L. De; Serrano-Sevilla, I.; Tortiglione, C.; De La Fuente, J.M. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Inhibitor Delivered by Chitosan Nanocapsules Promotes Safe, Fast, and Efficient Activation of Wnt Signaling In Vivo. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 2893–2903.
108. Chung, T.H.; Wu, S.H.; Yao, M.; Lu, C.W.; Lin, Y.S.; Hung, Y.; Mou, C.Y.; Chen, Y.C.; Huang, D.M. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2007**.
109. Du, B.; Liu, J.; Ding, G.; Han, X.; Li, D.; Wang, E.; Wang, J. Positively charged graphene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polyethylenimine with enhanced drug loading and cellular uptake for magnetic resonance imaging and magnet-responsive cancer therapy. *Nano Res.* **2017**, *10*, 2280–2295.
110. Yue, Z.-G.; Wei, W.; Lv, P.-P.; Yue, H.; Wang, L.-Y.; Su, Z.-G.; Ma, G.-H. Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2440–2446.
111. Pauluk, D.; Padilha, A.K.; Khalil, N.M.; Mainardes, R.M. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. *Food Hydrocoll.* **2019**, *94*, 411–417.
112. Dodane, V.; Amin Khan, M.; Merwin, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.* **1999**, *182*, 21–32.
113. David, C.N. A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Wilhelm Roux Arch. für Entwicklungsmechanik der Org.* **1973**, *171*, 259–268.

## Capítulo 3

# Funcionalización de la superficie de NCs de quitosano

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un nanotransportador inteligente está estrictamente relacionado con el control de sus propiedades superficiales, ya que son las responsables de su interacción con los sistemas biológicos, por ejemplo, del reconocimiento específico de los sitios diana o de la adsorción inespecífica de proteínas séricas [1].

Gracias a que el quitosano presenta grupos amino reactivos, la superficie del nanotransportador obtenido en este trabajo de tesis y descrito en el capítulo 2 puede ser funcionalizada con moléculas de interés con el fin de modular la carga superficial, introducir grupos funcionales específicos y/o mejorar la estabilidad del nanotransportador en medios biológicos y soluciones fisiológicas [2–5]. La naturaleza química de los ligandos unidos a la superficie del nanotransportador, así como la densidad de cobertura de la superficie, juegan un papel muy importante en el destino del nanotransportador después de su administración [6].

En este capítulo, la superficie de las nanocápsulas de quitosano ha sido funcionalizada covalentemente con moléculas de PEG o de trimanósido a través de una aproximación sencilla y reproducible basada en el uso de un reactivo de acoplamiento homobifuncional, bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS<sup>3</sup>).

### 1.1. Método de funcionalización

La alta nucleofilia de los grupos amino, junto con su abundante presencia en varias biomoléculas (como en los aminoácidos y las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos) y en muchos polímeros (entre ellos algunos polisacáridos como el quitosano) hacen de las aminas uno de los grupos funcionales más "explotados" para la funcionalización de los nanotransportadores de fármacos y otros nanomateriales y superficies [7]. Entre los múltiples métodos y estrategias desarrolladas durante décadas para la unión de moléculas a través de grupos amino, el método seleccionado para la funcionalización de las NCs de esta tesis se basa en el uso del reactivo de acoplamiento homobifuncional

BS<sup>3</sup>, que une las moléculas aminadas de ligando a los grupos amino de la superficie de la nanocápsula. La Figura 1 muestra la estructura química de la BS<sup>3</sup>.

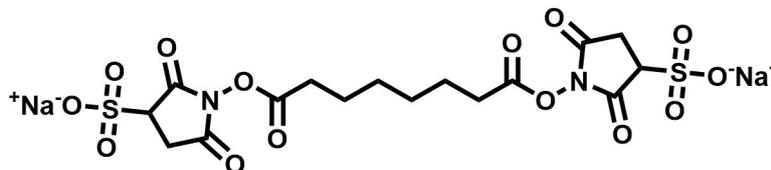


Figura 1. Estructura química de una molécula de bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS<sup>3</sup>).

La mayoría de los reactivos homobifuncionales tienen un diseño simétrico con una cadena de carbono espaciadora que conecta dos extremos reactivos idénticos [8]. En el caso de la BS<sup>3</sup>, los grupos reactivos son carboxilos activados con ésteres de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), altamente reactivos con las aminas nucleófilas. Además, el éster sulfo-NHS a menudo confiere suficiente carga y polaridad al reactivo de acoplamiento como para proporcionar solubilidad en agua y eliminar así la necesidad de usar disolventes orgánicos [9]. Cuando la BS<sup>3</sup> reacciona con el nucleófilo (en nuestro caso un grupo amino del quitosano o del ligando que se desea unir), se libera el grupo saliente sulfo-NHS para dar lugar a un enlace amida estable e irreversible. Sin embargo, en entornos acuosos los grupos sulfo-NHS pueden ser hidrolizados, impidiendo la unión del reactivo de acoplamiento a los grupos amino. Para minimizar los efectos de la hidrólisis y maximizar la unión a las aminas, es importante mantener una alta concentración de las moléculas que se desea unir a la BS<sup>3</sup>. Ajustando la proporción molar entre el reactivo de acoplamiento y las moléculas diana, se puede controlar el grado de funcionalización para obtener el producto deseado. El pH también es un factor importante para la efectividad de la reacción, siendo un pH de entre 7 y 9 el rango óptimo para favorecer la reactividad de las aminas [9].

La principal desventaja, sin embargo, del uso de reactivos homobifuncionales es la posibilidad de obtener conjugados no deseados, por ejemplo, si los dos grupos reactivos del reactivo de acoplamiento reaccionan con dos grupos funcionales dentro de la misma molécula, en lugar de unir dos moléculas distintas, o si se entrecruzan grupos de varias moléculas, lo que puede ocasionar la aparición de agregados que pueden llegar a precipitar [10]. Esto ocurre especialmente en procedimientos de una única etapa, donde todos los reactivos se añaden a la vez a la mezcla de reacción, mientras que la reacción secuencial en varias etapas permite eliminar el exceso de reactivo de acoplamiento que no haya reaccionado durante la primera etapa para minimizar los productos no deseados. El método de funcionalización utilizado en este capítulo consiste en varias etapas: en la primera etapa, los grupos amino de la superficie de las NCs reaccionan con uno de los extremos éster sulfo-NHS de la BS<sup>3</sup>; en la segunda etapa, el ligando reacciona con el otro extremo éster sulfo-NHS de la BS<sup>3</sup>; en la tercera etapa, se bloquean con tris(hidroximetil)aminometano (Tris) los grupos reactivos de la BS<sup>3</sup> que no han reaccionado previamente; en la cuarta y última etapa, se lava el exceso de reactivos.

Por un lado, en esta tesis se han funcionalizado cápsulas de quitosano con polietilenglicol (PEG). Para ello se ha empleado un PEG debidamente derivatizado con grupos amino, obtenido de manera comercial. El polietilenglicol (PEG) es un polímero ampliamente utilizado en nanomedicina para recubrir la superficie de las nanopartículas durante más de cuatro décadas [5,11–13]. Ha sido especialmente utilizado para mejorar la estabilidad de nanopartículas, reducir su toxicidad y aumentar su tiempo de circulación en sangre [14–19]. Los recubrimientos de PEG son conocidos por prevenir la agregación y la adsorción de proteínas séricas mediante repulsiones estéricas y de hidratación, lo que conduce a suspensiones coloidales más estables de las nanocápsulas en medios fisiológicos [5,11,14]. La resistencia a la unión inespecífica de proteínas plasmáticas depende de la conformación de las cadenas de PEG y se consigue normalmente usando coberturas con alta densidad [5]. Muchos estudios se han centrado en incrementar la densidad del recubrimiento de PEG, por ejemplo utilizando PEGs ramificados [20], incluyendo una capa hidrofóbica como espaciadora [15] o incubando las nanopartículas con una cantidad en exceso de PEG [21]. El aumento de la densidad de recubrimiento del PEG o el espesor de la capa afecta también a la internalización celular de las nanopartículas aportándoles un “efecto sigilo” [22].

Por otro lado, en esta tesis doctoral se ha trabajado también en la funcionalización de las NCs con moléculas de trimanósido (concretamente, 4-aminobutilo 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil) 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil)  $\alpha$ -D-manopiranosido). Se ha seleccionado este trimanósido como ligando porque se une específicamente a determinados receptores de macrófagos, que son las células diana de este estudio.

## 1.2. Funcionalización con trimanósido

Los carbohidratos poseen un gran potencial como ligandos para que los nanotransportadores lleven el fármaco específicamente a las células que expresan receptores de carbohidratos. Durante mucho tiempo, la estrategia preferida para dirigir las nanopartículas a su destino ha sido la funcionalización con ligandos peptídicos y anticuerpos. No obstante, estrategias alternativas basadas en carbohidratos han atraído cada vez más la atención entre la comunidad científica.[23]

La funcionalización con moléculas pequeñas (es decir, con un tamaño molecular inferior a 1500 Da), como es el caso de un trimanósido, posee varias ventajas sobre otros tipos de conjugados, como los peptídicos: 1) suelen ser estables en cuanto a su conformación; 2) no provocan impedimentos estéricos al interactuar con el receptor; 3) pueden ser unidos a las nanopartículas mediante procedimientos químicos sencillos, y los compuestos obtenidos pueden caracterizarse más fácilmente; 4) son más fáciles y menos costosos de producir [6,23].

Algunos carbohidratos, como la manosa y sus derivados, se encuentran frecuentemente en la superficie de bacterias, virus, y hongos [24]. Determinadas células del sistema inmunitario, que incluyen los macrófagos y las células dendríticas, expresan

receptores de membrana específicos para reconocer estos carbohidratos antigénicos [24,25], que les permiten distinguir entre antígenos inofensivos y antígenos derivados de patógenos, contra los cuales deben activar la respuesta inmunitaria [26]. Una de las familias más importantes de receptores para la captación e internalización de antígenos es la familia de los receptores de lectina tipo C (CLR). Los CLRs se caracterizan por ser moléculas de unión a carbohidratos que se unen a los ligandos de una manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  [27]. Los CLRs expresados por macrófagos y células dendríticas reconocen principalmente ligandos de tipo manosa o de tipo galactosa, y entre los más estudiados se encuentran el DC-SIGN, la dectina-2, el receptor de manosa (MR) y el DEC-205 [6,28,29]. Aunque muchos CLRs presentan afinidad por las manosas, pequeñas diferencias en la disposición de los monosacáridos del ligando y las moléculas que los rodean influyen mucho en el proceso de reconocimiento, por lo que cada receptor tiene un perfil de reconocimiento de carbohidratos único [24].

Este reconocimiento ligando-receptor ha sido aprovechado por muchos investigadores para dirigir diferentes nanopartículas a estas células de forma específica mediante la unión de residuos de manosa a la superficie de las nanopartículas, no sólo para el transporte de fármacos, sino también para modular su actividad celular [25,30–33]. Aunque en general las nanopartículas tienden a ser captadas de forma pasiva por los macrófagos, la inclusión de ligandos específicos puede regular la velocidad y el grado de internalización en los macrófagos, así como el destino de la nanopartícula en su interior [30,34]. En este capítulo se ha llevado a cabo la funcionalización de las NCs con trimanósido, a semejanza de los trimanósidos que exhibe *Mycobacterium tuberculosis* en su superficie, que le permiten infectar los macrófagos.

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es la enfermedad más mortal causada por un solo agente infeccioso, por delante del VIH/SIDA y la malaria. Según el informe más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [35], en 2017 se registraron 10 millones de casos de tuberculosis y la enfermedad causó la muerte de 1.6 millones de personas. Aún más preocupante es la aparición mundial de cepas bacterianas resistentes a los medicamentos, lo que pone en peligro la eficacia de los antibióticos. Curar las infecciones bacterianas multirresistentes es muy difícil y requiere tratamiento con medicamentos más tóxicos y costosos, a menudo con un éxito limitado [36]. Por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevas estrategias contra las cepas resistentes para acortar la duración del tratamiento y limitar los efectos secundarios de los fármacos. La funcionalización de nanopartículas con ligandos es una prometedora estrategia para dirigir el tratamiento específicamente a la zona de infección, reduciendo así los efectos adversos en el resto del cuerpo. Además, la interacción del ligando con su receptor puede dar comienzo a una variedad de procesos celulares dirigidos hacia la regulación del sistema inmunológico para curar la infección [28].

El lipoarabinomanano manosilado (ManLAM) es un glucolípido presente en la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que posee dominios terminales de dimanosa y trimanosa y juega un papel muy importante en la inmunopatogénesis de la tuberculosis ya que facilita la adhesión, penetración y persistencia de la micobacteria en los macrófagos [37–39]. ManLAM interactúa con los CLRs de macrófagos y células dendríticas, entre ellos DC-SIGN y MR, para entrar en el huésped y sobrevivir intracelularmente mediante el bloqueo de la fusión de los fagolisosomas (en los que se encuentra) con los lisosomas [38].

Imitando el mecanismo de entrada de *M. tuberculosis* a los macrófagos, las NCs funcionalizadas con trimanósido pueden ser internalizadas en los macrófagos infectados y modular su actividad metabólica para favorecer la acción del sistema inmunitario contra la infección. Aunque este trabajo se ha centrado en la optimización de la funcionalización con trimanósido para evaluar su efecto en la interacción de las NCs con los macrófagos, en un futuro las NCs podrían además ir cargadas de antibiótico para destruir las bacterias alojadas en el interior de los macrófagos.

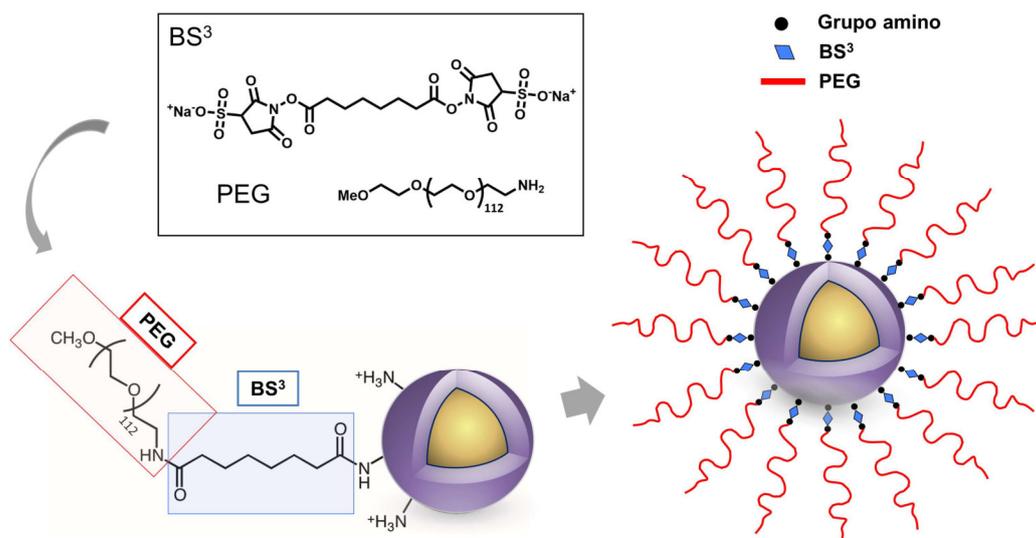
Para modificar la superficie de las NCs desarrolladas en esta tesis, se aprovecharon los grupos amino del quitosano para unirlos covalentemente a la molécula de interés por medio de un reactivo de acoplamiento. En primer lugar, se ha optimizado el proceso de funcionalización utilizando PEG como molécula modelo y las NCs funcionalizadas han sido caracterizadas en cuanto a carga superficial, tamaño, caracterización química de la superficie y estabilidad. Además, se han explorado algunas diferencias en la interacción con sistemas biológicos entre las NCs funcionalizadas y las NCs no funcionalizadas. Una vez puesto a punto el método de funcionalización, se ha trabajado en el desarrollo de NCs funcionalizadas con trimanósido y, en colaboración con el Instituto Pasteur de Paris, se ha estudiado su interacción con células diana, en este caso macrófagos.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Optimización de la funcionalización de la superficie

#### 2.1.1. Método de funcionalización

La superficie de las NCs fue funcionalizada con un PEG aminado ( $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino polietilenglicol, 5000 Da) a través de una reacción con el reactivo de acoplamiento homobifuncional bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS<sup>3</sup>) (Figura 2).



**Figura 2. Estrategia de funcionalización basada en el uso de BS<sup>3</sup> como molécula enlazadora para la unión de la molécula de interés (PEG). Nótese que la proporcionalidad entre los tamaños de la NC y de las moléculas unidas a ella no es la real, sino que ha sido modificada para facilitar la comprensión de la ilustración.**

Como se ha descrito anteriormente, este reactivo de acoplamiento se une por un extremo a los grupos amino del quitosano de las NCs y por el otro al grupo amino con el que este PEG está derivatizado. El proceso de funcionalización se dividió en tres pasos clave. El primero fue la adición del reactivo de acoplamiento a las cápsulas para dotar a la superficie de grupos éster de sulfosuccinimidilo, sensibles a la unión de moléculas aminadas, como el PEG seleccionado. Durante el segundo paso se añadió el PEG para que reaccionara con el reactivo de acoplamiento. Finalmente, el tercer paso consistió en la adición de Tris a las NCs funcionalizadas para bloquear los grupos éster de sulfosuccinimidilo libres que no hubieran reaccionado con ninguna molécula de PEG. Éste último paso es fundamental para evitar el entrecruzamiento entre las nanocápsulas debido a la posible reacción entre grupos éster de sulfosuccinimidilo libres y grupos amino en una cápsula diferente.

Algunos estudios indican que, según el grado de densidad del recubrimiento, las cadenas de PEG pueden adoptar distintos tipos de conformación alrededor de la nanopartícula y esto influye en la resistencia a la adsorción de proteínas en medios fisiológicos y en la internalización celular [5,22,40,41]. En muchos casos, los recubrimientos de alta densidad han resultado ser más efectivos [19,42,43], pero también se ha reportado que, en liposomas, el recubrimiento con PEG de tan sólo un 10 % de la superficie fue suficiente para aumentar la vida media de las partículas en la circulación sanguínea [44]. No existe todavía un consenso general sobre cuál es la combinación óptima de densidad de recubrimiento, conformación y masa molecular de PEG para un nanotransportador y una aplicación determinados, por lo que es necesario determinarlo empíricamente para cada sistema [5]. Teniendo esto en cuenta, se exploraron distintas densidades de cobertura para encontrar las condiciones óptimas de

funcionalización en favor de la estabilidad coloidal de las NCs, de cara al objetivo final de funcionalizar las NCs con trimanósido.

Sabiendo que el número de grupos amino reactivos en la superficie está en torno a 200 nmol/mg NC (ver capítulo 2), se decidió utilizar como máximo la mitad de ellos para la unión de ligandos, de forma que todavía quedaran libres suficientes grupos amino para mantener las características beneficiosas del quitosano que derivan de ellos. Siguiendo esta pauta, se creó una cobertura de baja densidad de moléculas de PEG (5 nmol/mg, ldCS-NC) y otra de mayor densidad (100 nmol/mg, hdCS-NC), y se estudiaron las propiedades finales de los materiales obtenidos.

### 2.1.2. Caracterización de las nanocápsulas funcionalizadas

La presencia de PEG en la superficie de las nanocápsulas ha sido evaluada mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), comparando los espectros de las NCs antes, durante y después de ser funcionalizadas (Figura 3).

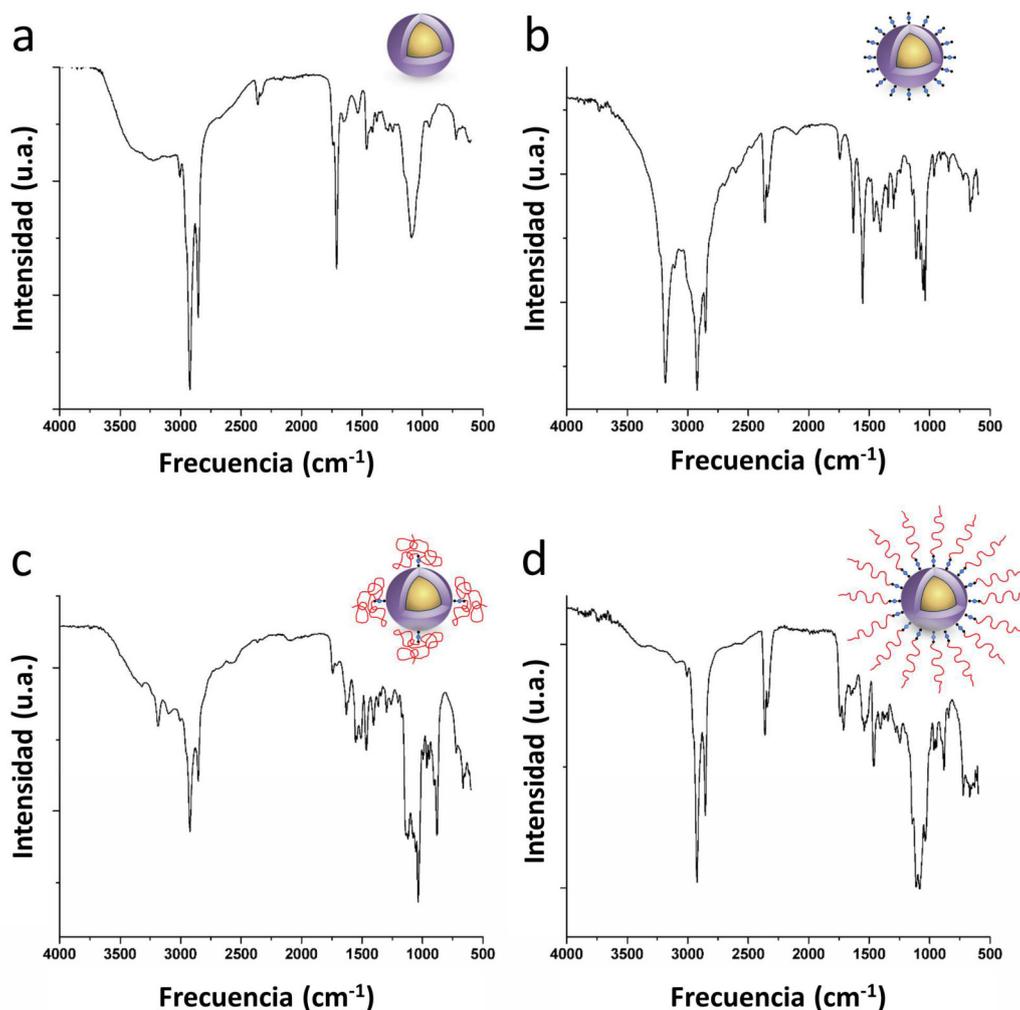


Figura 3. Análisis FTIR de las NCs de quitosano antes de ser funcionalizadas (a), después de la unión de BS<sup>3</sup> (etapa intermedia) (b) y después de la funcionalización con distintas cantidades de PEG: ldCS-NC (c) y hdCS-NC (d).

Para determinar si la funcionalización con PEG fue llevada a cabo con éxito, también se estudió el espectro FTIR del estado intermedio de las nanocápsulas después de la incubación con BS<sup>3</sup> (Figura 3b). Hay que remarcar que, para poder obtener el espectro en esta etapa intermedia, se añadió Tris a las NCs después de la unión de BS<sup>3</sup> para evitar que sus grupos reactivos reaccionaran con grupos amino de otras nanocápsulas y provocaran un entrecruzamiento entre ellas. En el caso de las muestras funcionalizadas de forma completa, también se añadió Tris al final del proceso (después de la incubación con el PEG), por lo que en teoría la BS<sup>3</sup> no está disponible para reaccionar con el Tris ya que debería haber reaccionado previamente con el PEG. Esto se confirmó comparando los espectros FTIR de las NCs antes (Figura 3a) y después de la incubación con BS<sup>3</sup> (Figura 3b) y tras finalizar la funcionalización con PEG a baja y alta densidad (Figura 3c y d, respectivamente). Los picos a 3180 y 3100 cm<sup>-1</sup>, así como los picos a 1630 y 1550 cm<sup>-1</sup>, característicos del Tris, están presentes en la etapa intermedia (y en IdCS-NC con intensidades mucho más bajas respecto a los picos adyacentes) pero desaparecen completamente en el espectro de hdCS-NC. Además, en el espectro hdCS-NC el pico correspondiente al grupo C-O-C (1105 cm<sup>-1</sup>) presenta una mayor intensidad, en comparación con otros picos en la misma región, y se pierde el pico a 1055 cm<sup>-1</sup>, que corresponde al grupo R-SO<sup>3-</sup> que se libera de la BS<sup>3</sup> durante la reacción de enlace.

El éxito de la funcionalización de la superficie de las NCs se demostró también midiendo el potencial zeta de la superficie del material antes y después de la modificación con PEG. El potencial zeta de las NCs pasó de positivo antes de la funcionalización (+27.1 mV) a negativo después de la funcionalización tanto a baja densidad (-22.4 mV) como a alta densidad donde presenta un valor absoluto mucho mayor (-34.2 mV). En otros trabajos también se han observado valores negativos en el potencial zeta de nanopartículas funcionalizadas con PEG [45,46]. Esta disminución en el potencial se relaciona con una disminución de grupos amino libres.

Para confirmar la disminución de grupos amino en la superficie tras la funcionalización con PEG, se cuantificaron mediante el ensayo espectrofotométrico basado en la interacción con el compuesto Orange II (los fundamentos del ensayo se explicaron en detalle en el capítulo 2). La cantidad de grupos amino fue determinada en 100 y 80 nmol/mg para las NCs funcionalizadas a baja y alta densidad, respectivamente, lo que corresponde al 50 % y 40 % de la cantidad de grupos amino en las NCs no funcionalizadas (200 nmol/mg).

En el caso de la funcionalización a baja densidad, esta importante disminución en el número de grupos amino no puede ser debida en su totalidad a la reacción del grupo amino con la BS<sup>3</sup> ya que la cantidad de BS<sup>3</sup> añadida fue muy baja (se ha detectado una pérdida de 100 nmol/mg de grupos amino pero se añadieron sólo 5 nmol/mg de BS<sup>3</sup>). Por lo tanto, este valor puede ser considerado como una desaparición aparente de grupos amino, probablemente debida a un efecto de enmascaramiento ocasionado por las moléculas de PEG en la superficie, que impiden la completa detección de los grupos

amino subyacentes. La interacción de la molécula Orange II con los grupos amino se vería obstaculizada por la presencia de cadenas de polímero, ya que se puede suponer que las moléculas de PEG están en una conformación similar a la denominada “tipo champiñón” [5,22]. En esta conformación, las cadenas de PEG se pliegan de forma que cubren parte de la superficie de las nanocápsulas e interactúan con ella, probablemente debido a posibles interacciones tipo puente de hidrógeno entre la cadena de PEG y los grupos amino cargados positivamente en la superficie de la nanocápsula (Figura 4).

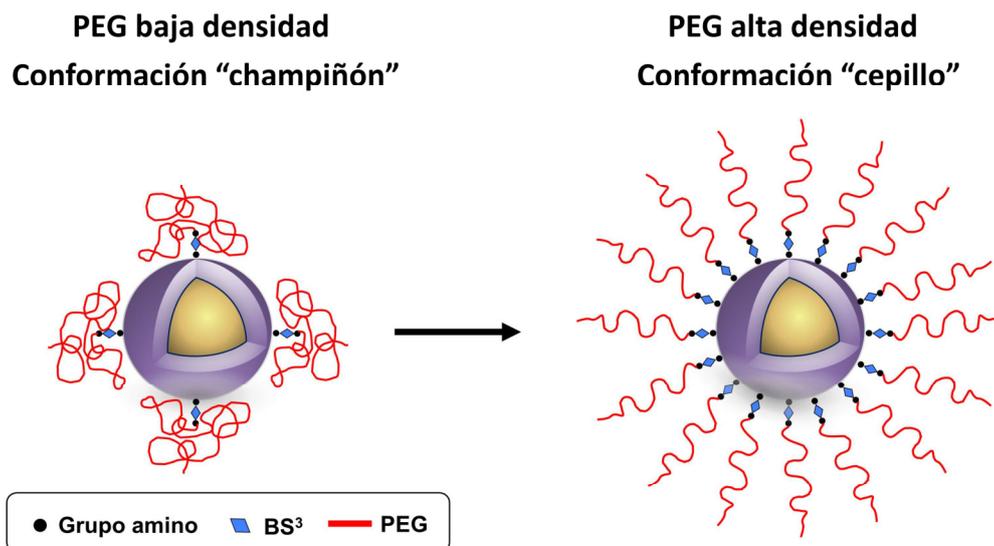


Figura 4. Esquema de las hipotéticas conformaciones que puede adoptar el PEG según la densidad de cobertura de la superficie de la nanocápsula.

La tendencia a formar tales interacciones podría ser responsable de una detección de grupos amino inferior a la esperada en la muestra con cobertura a baja densidad. Sin embargo, en el caso de la funcionalización a alta densidad, donde se añadieron 100 nmol/mg de  $BS^3$  y se ha detectado la pérdida de 120 nmol/mg de grupos amino, hay una concordancia muy buena entre el número de grupos amino perdidos y el número de moléculas de  $BS^3$  presentes para reaccionar con ellos. En este caso, podría estar alcanzándose la transición de conformación “tipo champiñón” a “tipo cepillo”, asociada con coberturas de alta densidad [5]. La mayor densidad de PEG permite que las cadenas cercanas interactúen entre ellas en vez de hacerlo con la superficie de la nanocápsula, lo que produce la extensión de las cadenas hacia el disolvente y facilita la interacción de la molécula Orange II con los grupos amino, resultando en una detección de grupos amino que concuerda con lo esperado.

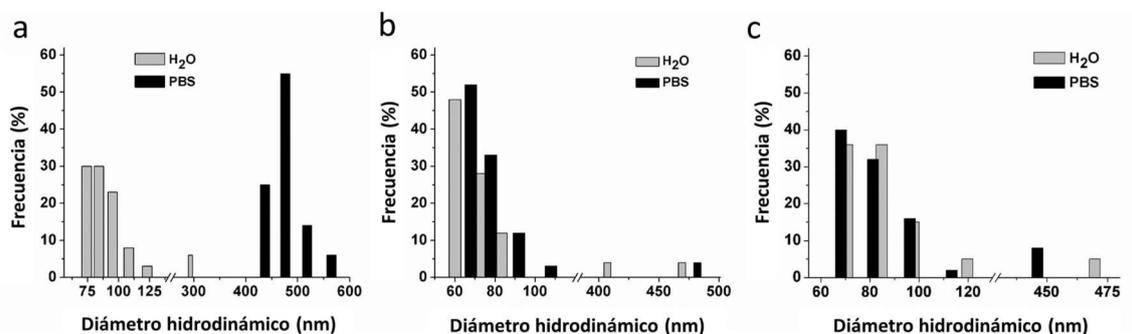
### 2.1.3. Efecto de la funcionalización con PEG en sistemas biológicos

Aunque en este trabajo no se buscaba la aplicación directa de las NCs funcionalizadas con PEG, sino que el objetivo principal era su utilización como modelo para investigar y

optimizar los efectos de la funcionalización de cara a la posterior unión de moléculas de trimanósido, sí que se llevó a cabo una primera aproximación para evaluar el comportamiento de las NCs funcionalizadas con PEG en medio fisiológico, en presencia de proteínas y en cultivos celulares, que además permitió confirmar la presencia de PEG en la superficie de las NCs.

Las nanocápsulas no funcionalizadas son sensibles a la presencia de sales en el medio y tienden a agregar durante la incubación en medios fisiológicos como el PBS. Tanto los iones fosfato como las proteínas pueden adsorberse sobre la superficie de las nanocápsulas debido a la presencia de grupos amino, produciendo el entrecruzamiento entre diferentes cápsulas. La funcionalización con cadenas de PEG es una estrategia común para mejorar la estabilidad de las nanopartículas en medios de cultivo celular y fisiológicos [5]. La presencia de PEG en la superficie de la nanocápsula apantallaría los grupos amino en la superficie, como demostró previamente la disminución del potencial zeta de las NCs tras la funcionalización, impidiendo su interacción con las sales y proteínas del medio.

Aprovechándonos de este efecto de estabilización del PEG, se evaluó el grado de agregación de las nanocápsulas funcionalizadas y no funcionalizadas en agua y PBS para determinar el éxito de la funcionalización. El efecto de la funcionalización con PEG sobre el comportamiento de las nanocápsulas en medio fisiológico se analizó midiendo sus diámetros hidrodinámicos mediante DLS (Figura 5).



**Figura 5. Tamaño hidrodinámico de NCs de quitosano en agua y PBS antes (a) y después de ser funcionalizadas con diferentes cantidades de PEG: ldCS-NC (b) y hdCS-NC (c).**

En cada gráfica se reporta la distribución de diámetros de una misma muestra en agua y en PBS. En la Figura 5a se observa un fuerte efecto de agregación en PBS de las NCs no funcionalizadas. El diámetro hidrodinámico medio pasó de 103 nm en agua a 471 nm en PBS. Por el contrario, el diámetro de las nanocápsulas funcionalizadas se mantiene en PBS (Figura 5b y c), incluso en el caso de las ldCS-NC, lo que confirma que la funcionalización se llevó a cabo con éxito y que en ambos casos fue eficaz para la estabilización de las NCs. Esta mejora en la estabilidad coloidal se debe a que los contraiones del medio fisiológico (en este caso iones fosfato) son repelidos de forma estérica por el PEG, lo que impide su interacción con la superficie de la nanocápsula.

Este mismo efecto de estabilización coloidal fue observado por Cao y colaboradores al incubar sus nanopartículas funcionalizadas con PEG en medio salino, en comparación con la importante agregación de las nanopartículas no funcionalizadas [47].

Por otro lado, la alta densidad de grupos amino en la superficie de las NCs puede considerarse responsable de la adsorción de proteínas, lo que también provoca la agregación de las nanocápsulas. El PEG ha sido ampliamente utilizado como recubrimiento de nanomateriales para evitar la adsorción de proteínas séricas mediante repulsiones estéricas y de hidratación, dando lugar a suspensiones coloidales más estables [5]. Este efecto de protección del PEG frente a la adsorción de proteínas fue aprovechado para demostrar la efectividad de la funcionalización de las NCs. Para ello, se realizaron ensayos de agregación midiendo el diámetro hidrodinámico de las NCs funcionalizadas y no funcionalizadas en presencia de concentraciones crecientes de proteína BSA en agua, seleccionada como proteína modelo por ser una de las más abundantes en sangre [48]. Además, dado que la densidad del recubrimiento está estrechamente relacionada con la capacidad para repeler las proteínas [40,41], se comparó el efecto en la agregación de NCs funcionalizadas con PEG a baja y alta densidad. La comparación de los comportamientos de las NCs sin funcionalizar, IdCS-NC y hdCS-NC se reporta en la Figura 6.

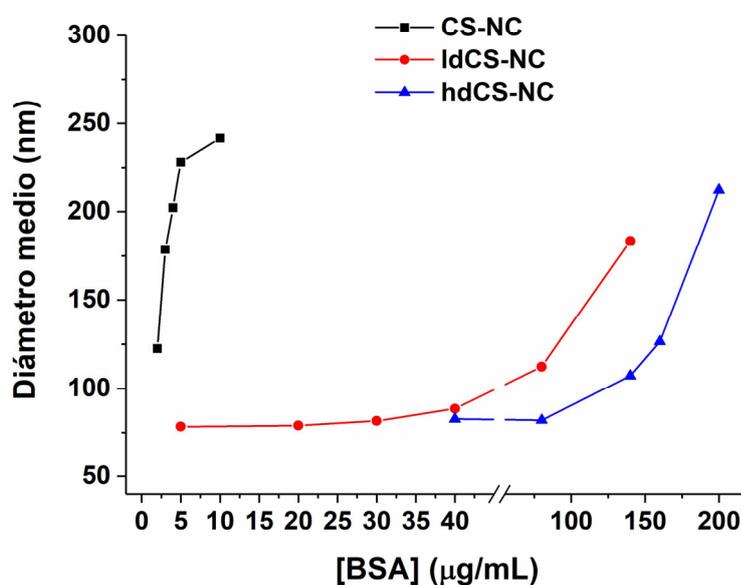


Figura 6. Tamaño hidrodinámico de NCs de quitosano (CS-NC) en presencia de diferentes concentraciones de BSA, antes y después de ser funcionalizadas a baja (IdCS-NC) o alta (hdCS-NC) densidad de PEG.

Los datos mostrados en la gráfica se refieren al diámetro medio de las NCs funcionalizadas y no funcionalizadas en presencia de concentraciones crecientes de BSA. El gran efecto estabilizador observado tras la funcionalización con PEG demostró sin lugar a dudas la presencia de PEG en la superficie de la nanocápsula, y por tanto la

disminución de los grupos amino libres en la superficie. Sólo ante una concentración muy alta de BSA (superior a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se produjo un aumento significativo en el diámetro hidrodinámico de IdCS-NC y hdCS-NC, por lo que ambas densidades de recubrimiento resultaron ser suficientes para disminuir la adsorción de proteínas, aunque en mayor medida la de alta densidad. Por el contrario, una concentración de BSA una orden de magnitud menor es suficiente para producir el mismo aumento en el diámetro de las NCs no funcionalizadas. En un trabajo similar se demostró que la funcionalización con PEG era capaz de reducir en un 80 % la cantidad de BSA adsorbida sobre nanopartículas catiónicas y fue también atribuido a la disminución de la carga superficial positiva de la nanopartícula [47].

Por otro lado, en algunos trabajos la funcionalización con PEG de nanocápsulas catiónicas recubiertas por poli-L-lisina y poli-L-glutamato ha sido asociada a una reducción de la toxicidad [49,50]. Basándonos en estas observaciones, se decidió evaluar la toxicidad de nuestras NCs antes y después de la funcionalización como herramienta para caracterizar la presencia de PEG en la superficie de las NCs y determinar su efecto sobre la interacción de las NCs con las células. La citotoxicidad se testó en células Vero mediante el ensayo espectrofotométrico MTT. Las células se incubaron 24 h con diferentes concentraciones de NCs no funcionalizadas, funcionalizadas con PEG a baja densidad (IdCS-NC) y a alta densidad (hdCS-NC). En la Figura 7 se compara el porcentaje de viabilidad celular tras el tratamiento con las distintas muestras.

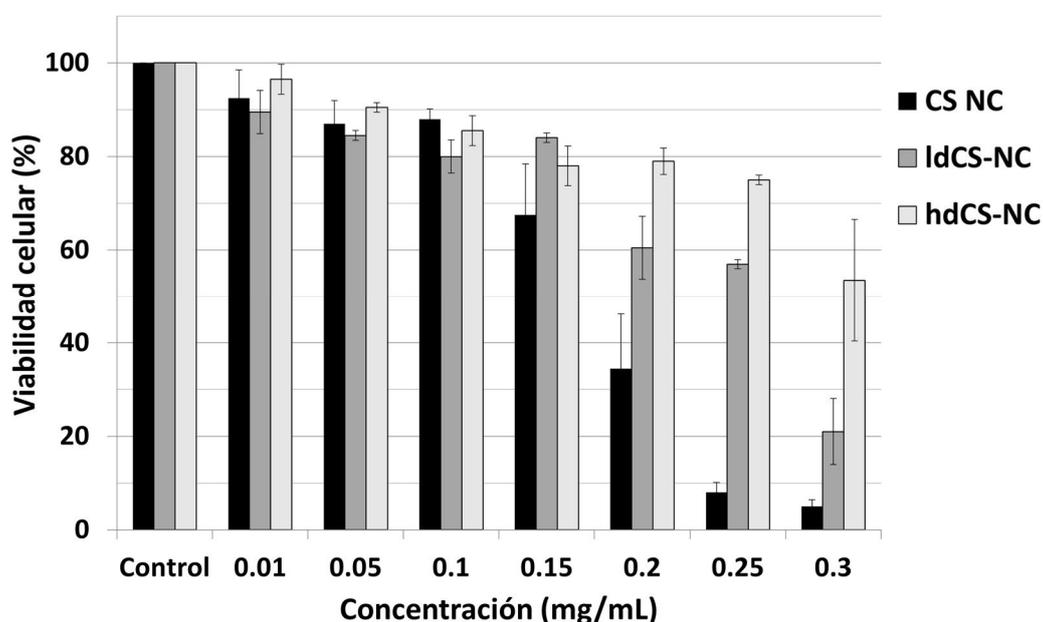
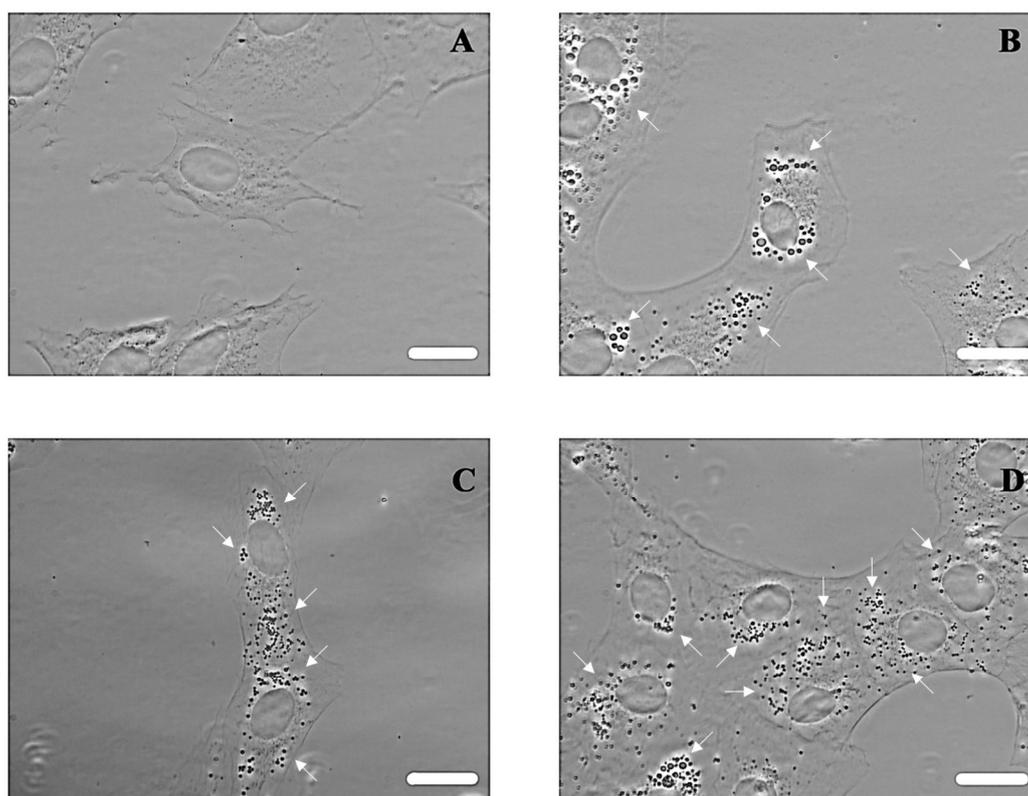


Figura 7. Viabilidad celular de células Vero incubadas durante 24 h con NCs de quitosano (CS-NC) antes y después de ser funcionalizadas a baja (IdCS-NC) o alta (hdCS-NC) densidad de PEG.

Se puede observar en la Figura 7 que la funcionalización mejoró significativamente la biocompatibilidad de las nanocápsulas, especialmente cuando se usan altas

concentraciones de NCs (más de 0.15 mg/mL). Los dos tipos de NCs funcionalizadas resultaron ser menos tóxicas para las células a altas concentraciones, especialmente las de alta densidad. Es posible que esta menor toxicidad de las NCs funcionalizadas estuviera influenciada por la contribución de las moléculas de PEG a su peso molecular, pero se descartó que el efecto sobre la viabilidad celular se debiera únicamente a este factor, ya que el PEG unido a las IdCS-NCs representa menos de un 3 % de su peso molecular y la diferencia de citotoxicidad con las NCs no funcionalizadas es muy pronunciada. Estos resultados confirman la presencia de PEG y concuerdan con lo esperado, ya que la disminución del potencial zeta observada tras la funcionalización indica que la cobertura de PEG está apantallando la carga superficial positiva del quitosano, lo que podría reducir sus interacciones con la membrana celular y su toxicidad. Sin embargo, cabe remarcar que, en el caso de las NCs funcionalizadas con PEG, la disminución de la citotoxicidad sigue asociándose a un grado muy alto de internalización celular (Figura 8). En la figura se incluyen imágenes de células Vero no tratadas (Figura 8A) e incubadas durante 24 h con NCs sin funcionalizar (Figura 8B) o NCs funcionalizadas con distintas cantidades de PEG (Figura 8C-D).



**Figura 8.** Imágenes de células Vero control (A) e incubadas durante 24 h con NCs sin funcionalizar (B) o funcionalizadas con distintas cantidades de PEG: IdCS-NC (C) y hdCS-NC (D). Las células fueron fijadas y se adquirieron las imágenes con un microscopio óptico. Escalas: 20  $\mu$ m.

Las imágenes de microscopía muestran la formación de numerosas vesículas intracelulares tras incubar las células con las NCs, tanto funcionalizadas como sin funcionalizar, a diferencia de las células no tratadas, lo que indica que la presencia de PEG reduce la toxicidad de las NCs y sigue permitiendo su internalización.

En conjunto, todos estos ensayos demostraron no sólo que el PEG se unía a la superficie de la nanocápsula, sino también que la conformación adoptada por las cadenas de polímero mediante el método desarrollado para la funcionalización a alta y baja densidad es efectiva para mejorar significativamente la estabilidad coloidal y citotoxicidad de las NCs de quitosano, manteniendo su gran capacidad de internalización celular.

## 2.2. Funcionalización con trimanósido

Las NCs de quitosano fueron funcionalizadas con ligandos de trimanósido con el objetivo final de explorar si la modificación de la superficie de las NCs con un ligando provoca una respuesta distinta en las células diana que expresan su receptor, ya sea provocando un aumento de la internalización o modulando la respuesta celular.

Se siguió el mismo método de funcionalización previamente puesto a punto con la molécula modelo PEG, donde se demostró que la adición tanto de 5 como de 100 nmol/mg NC de BS<sup>3</sup> es suficiente para poder detectar los efectos de la funcionalización, aunque el efecto se amplifica con 100 nmol/mg NC. Además, estas cantidades no sólo no ocasionaban entrecruzamientos indeseados entre las NCs, sino que favorecían su estabilidad coloidal. Sobre la base de estos resultados previos, se decidió unir el trimanósido utilizando una cantidad intermedia de BS<sup>3</sup>: 50 nmol/mg NC. Esta cantidad de BS<sup>3</sup> permitiría, por un lado, detectar mejor el efecto de la modificación de la superficie de las NCs al tratarse de una cantidad mayor que 5 nmol/mg NC, mientras que, por otro lado, permitiría disponer de suficientes grupos amino libres (el 75 %, considerando que hay un total de 200 nmol/mg NC de grupos amino disponibles en la superficie) en la superficie de las NCs para una posible multifuncionalización con diferentes moléculas de interés en el futuro.

En este caso, se utilizó la molécula homobifuncional BS<sup>3</sup> para hacer de puente entre un grupo amino primario del quitosano y un grupo amino del trimanósido. El trimanósido seleccionado para este estudio (4-aminobutilo 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil) 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil)  $\alpha$ -D-manopiranosido) había sido derivatizado con una cadena espaciadora alquilo terminada en un grupo amino para que pudiera reaccionar con la BS<sup>3</sup>. La Figura 9 muestra las estructuras químicas de la BS<sup>3</sup> y el trimanósido, así como el mecanismo de unión a las NCs.

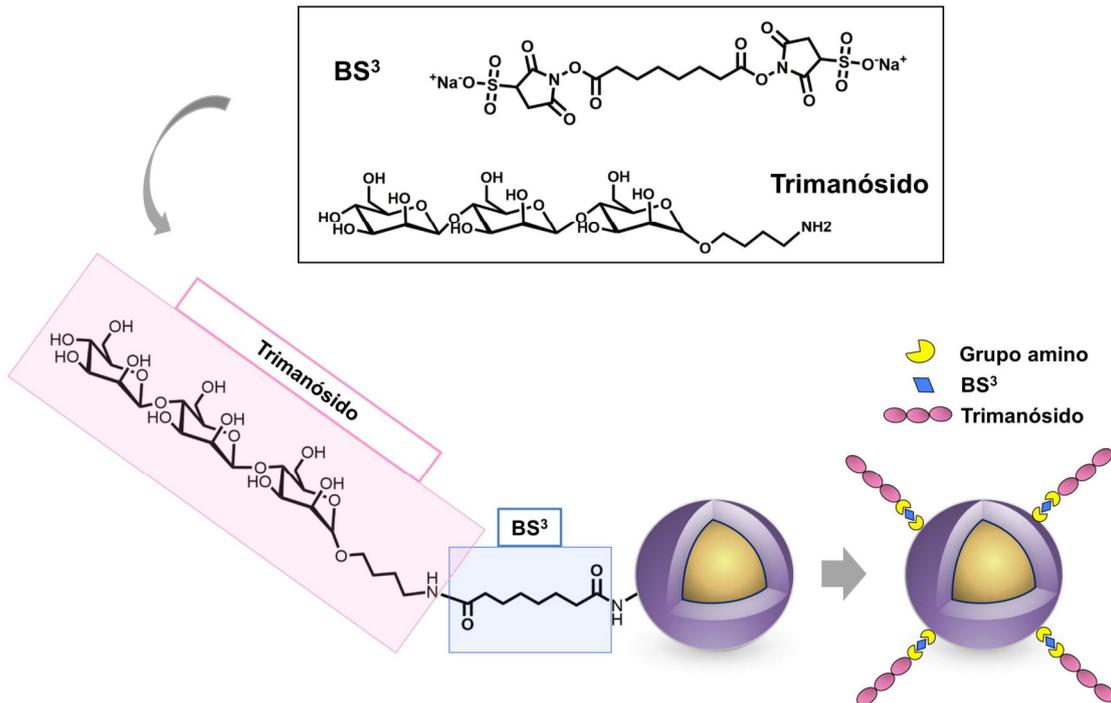


Figura 9. Estrategia de funcionalización basada en el uso de BS<sup>3</sup> como reactivo de acoplamiento para la unión de trimanósido a la superficie de la NC de quitosano.

Tras unir el trimanósido a la superficie de las NCs, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas antes y después de la funcionalización. La distribución de tamaños de las NCs antes y después de ser funcionalizadas se reporta en la Figura 10.

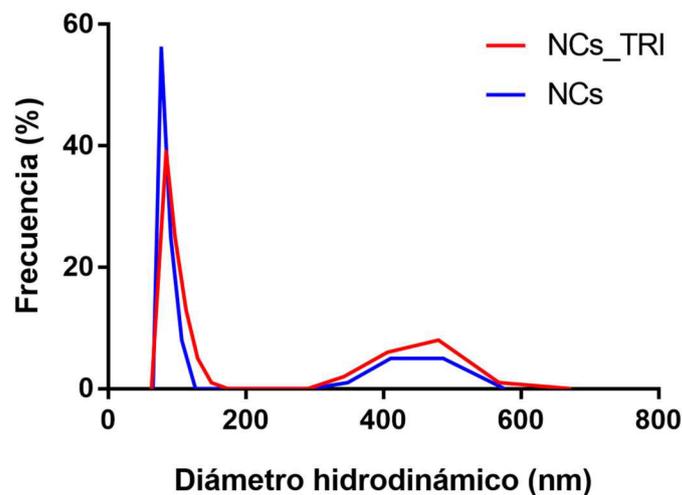
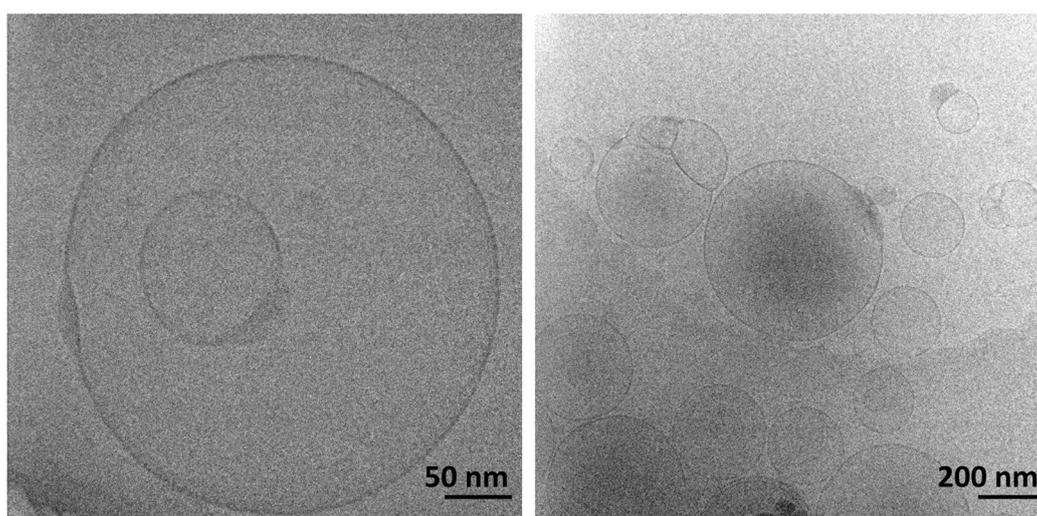


Figura 10. Distribución de tamaños de NCs funcionalizadas con trimanósido (NCs\_TRI, rojo) y NCs no funcionalizadas (NCs, azul), determinada mediante DLS.

El tamaño de las nanocápsulas fue muy similar, observándose una población principal (mayor del 85 %) con un diámetro de en torno a 100 nm y un pequeño porcentaje (menor del 15 %) con un diámetro cercano a 450 nm.

Por otro lado, la morfología de las nanopartículas es un factor clave para la internalización celular, incluso más determinante que el tamaño [44]. La velocidad a la que las células fagocíticas internalizan las nanopartículas cambia según sus propiedades geométricas [51]. Por ejemplo, Sharma et al. demostraron que las nanopartículas de poliestireno con forma elipsoidal se adherían mejor a los macrófagos que las de forma esférica, pero eran fagocitadas con menor eficiencia [52]. También existen estudios en animales que han asociado la forma esférica de las partículas con una eliminación más rápida de la circulación sanguínea y menor efecto pro-inflamatorio, comparado con partículas no esféricas (con forma de cilindro, disco o alambre) [53,54]. Por ello, se analizó la morfología de las NCs funcionalizadas mediante crio-microscopía electrónica de transmisión (Cryo-TEM, Figura 11).



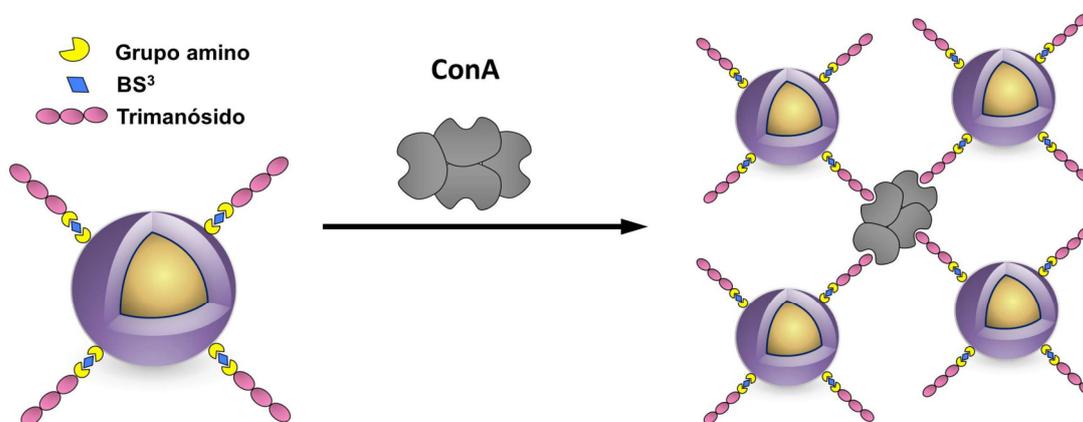
**Figura 11. Imágenes de Cryo-TEM de NCs funcionalizadas con trimanósido.**

Las NCs eran esféricas, lo que podría favorecer su internalización en los macrófagos, y su distribución de tamaños coherente con los resultados obtenidos mediante DLS. La superficie de las nanocápsulas no mostró diferencias apreciables en la morfología mediante crio-microscopía electrónica de transmisión después de la unión del trimanósido.

El resultado del proceso de funcionalización se analizó midiendo el potencial zeta de las NCs antes y después de la modificación de su superficie. Como se expuso en el capítulo 2, la superficie de las nanocápsulas de quitosano no modificadas presenta altos valores de potencial zeta positivo a pH ligeramente ácido, debido a la presencia de grupos amino protonados. Después de la funcionalización con el ligando trimanósido, el efecto de enmascaramiento sobre los grupos amino en la superficie de las NCs dio lugar

a valores negativos en el potencial zeta (-23.8 mV). Los altos valores absolutos también indicaban una buena estabilidad coloidal de las muestras en las condiciones de medición. Este cambio en el potencial de superficie de las NCs demostraba que el ligando había sido unido correctamente a la superficie.

Para favorecer la accesibilidad del ligando para la interacción con su receptor, era esencial conseguir que el ligando estuviese unido a la superficie de la NC en la orientación deseada, es decir, unido por el extremo con el grupo amino y con la cadena extendida hacia el disolvente, como se ha representado en la Figura 9. Para demostrar que los ligandos de trimanósido en la superficie de la NC estaban disponibles para interactuar con moléculas biológicas, se evaluó su capacidad de unión a una proteína capaz de reconocerlos: la concanavalina A (ConA). La ConA es una lectina que a pH fisiológico (7.4) presenta una estructura tetramérica, formada por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales posee un sitio de unión específico para residuos terminales de manosa y glucosa, incluyendo dimanósidos y trimanósidos [55]. Debido a esta característica, la ConA ha sido utilizada como puente para producir la agregación específica de nanopartículas funcionalizadas con estos carbohidratos [56,57]. La formación de interacciones multivalentes específicas entre la ConA y el trimanósido de la superficie de las NCs da lugar al entrecruzamiento entre nanocápsulas distintas y, por lo tanto, a la formación de agregados, como se ha representado esquemáticamente en la Figura 12.



**Figura 12.** Esquema de la agregación que se produce en las NCs funcionalizadas con trimanósido al interactuar con la lectina Concanavalina A (ConA) de forma específica y multivalente.

La formación de estos agregados ha sido evaluada mediante DLS al incubar las NCs funcionalizadas (NCs\_TRI) y no funcionalizadas (como control) en presencia de concentraciones crecientes de ConA (Figura 13).

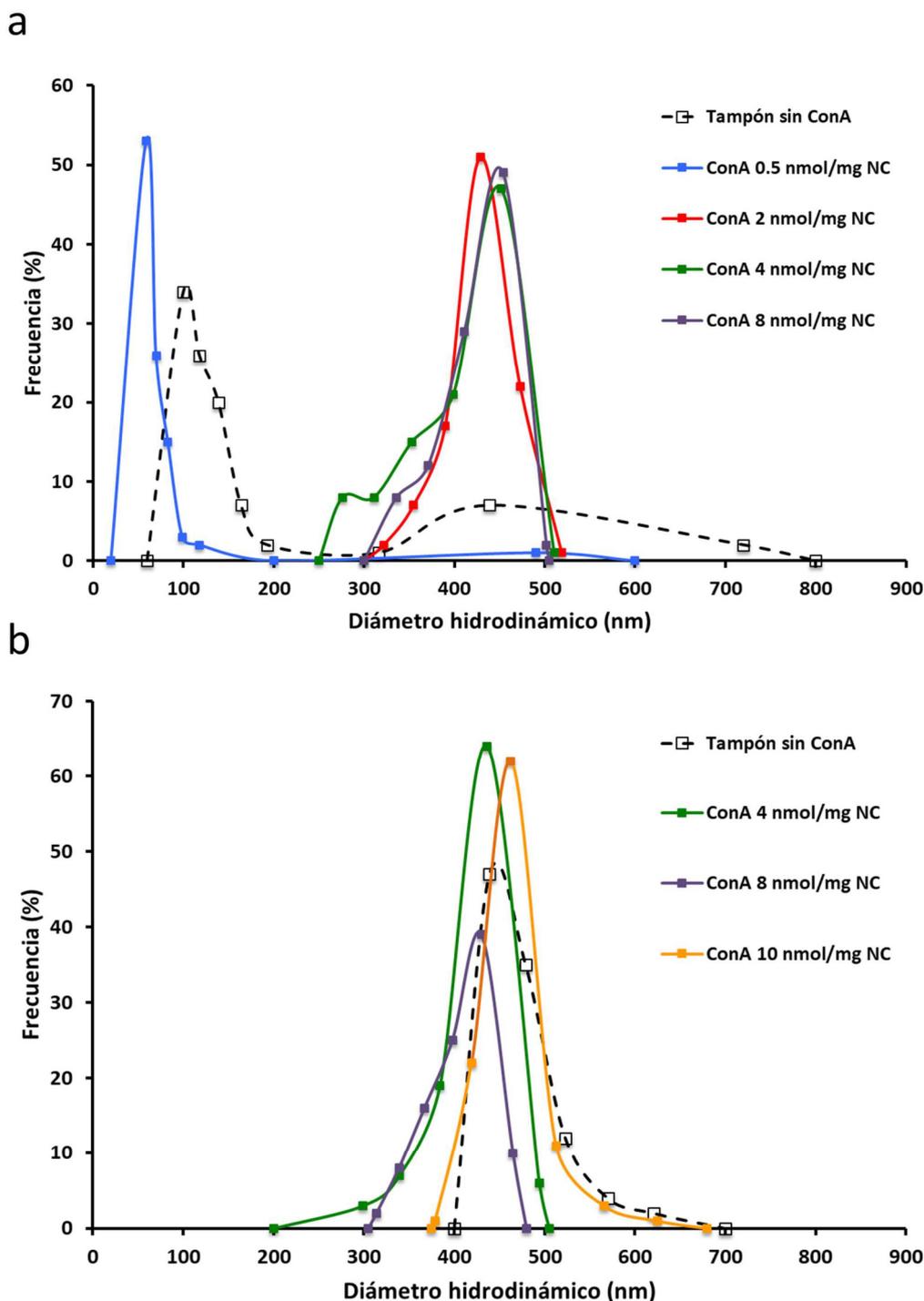


Figura 13. Ensayo de agregación de NCs funcionalizadas (a) o no (b) con trimanósido incubadas en tampón Tris-HCl pH 7.4 a varias concentraciones de Concanavalina A, evaluado mediante DLS.

En la Figura 13a se puede observar que el diámetro de las NCs TRI se cuadruplica a concentraciones superiores a 2 nmol/mg NC. El mismo experimento se llevó a cabo utilizando NCs no funcionalizadas y no se detectó un aumento en la agregación en presencia de ConA (Figura 13b). En ausencia de ConA, las NCs no funcionalizadas mostraron un comportamiento completamente diferente al ser diluidas en tampón Tris-

HCl pH 7.4, agregando debido a la presencia de sal en el tampón. Por el contrario, en ausencia de ConA las NCs\_TRI se mantenían estables en este tampón (Figura 12a), lo que concuerda con el aumento de estabilidad observado en tampón fosfato salino (PBS) tras la funcionalización con PEG y confirma una vez más la eficacia del proceso de funcionalización. En presencia de ConA, se detectó un importante efecto de agregación en las NCs\_TRI a partir de 2 nmol/mg NC de ConA, mientras que no se observó ninguna modificación del estado de agregación de las NCs no funcionalizadas incluso a concentraciones superiores de ConA. Esto demuestra que la elevada agregación de las NCs\_TRI a bajas concentraciones de ConA se produce de forma específica al interaccionar el trimanósido con los sitios de unión de la lectina, lo que refleja que el trimanósido se ha unido covalentemente y en la orientación deseada a la superficie de la NC, asegurando la disponibilidad de los ligandos en la superficie de las NCs para interaccionar con sus receptores de lectina.

Para poder investigar el comportamiento de las NCs funcionalizadas en cultivos celulares mediante técnicas de fluorescencia, se sintetizaron NCs marcadas con el fluoróforo Nile Red (NR-NCs), encapsulado en el núcleo, y posteriormente se unió el trimanósido a su superficie siguiendo el protocolo optimizado (NR-NCs\_TRI). El éxito de la funcionalización fue evidenciado mediante la disminución del potencial zeta, que pasó de  $+21.5 \pm 0.7$  mV a  $-9.5 \pm 0.5$  mV tras la unión del trimanósido. Como era de esperar, la distribución de tamaños fue similar antes y después de la funcionalización de las NR-NCs (Figura 14), y los diámetros hidrodinámicos de las poblaciones fueron análogos a los obtenidos con las NCs no marcadas fluorescentemente.

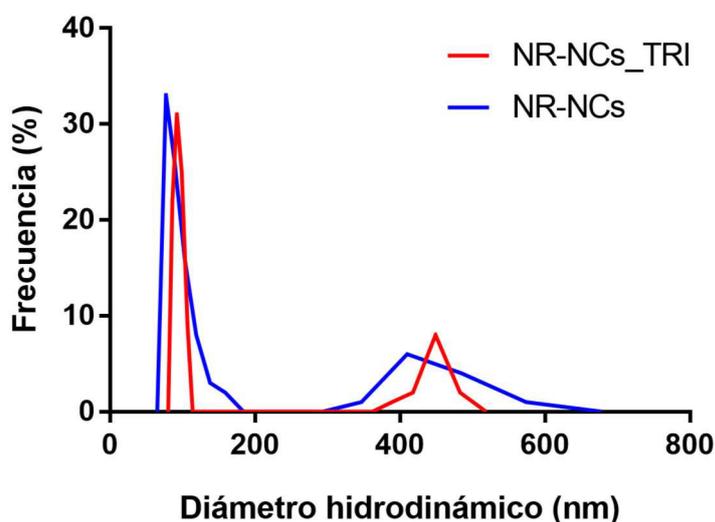


Figura 14. Distribución de tamaños de NCs cargadas de Nile Red antes (NR-NCs, azul) y después (NR-NCs\_TRI, rojo) de ser funcionalizadas con trimanósido, determinada mediante DLS.

También se comprobó que las NCs antes y después de funcionalizar emitieran fluorescencia en el mismo rango de intensidad mediante espectrometría de fluorescencia (Figura 15) y se decidió fijar una concentración de NCs de  $100 \mu\text{g/mL}$  para

los experimentos de internalización en macrófagos, ya que a esta concentración la intensidad de fluorescencia emitida por ambos tipos de NCs era prácticamente idéntica.

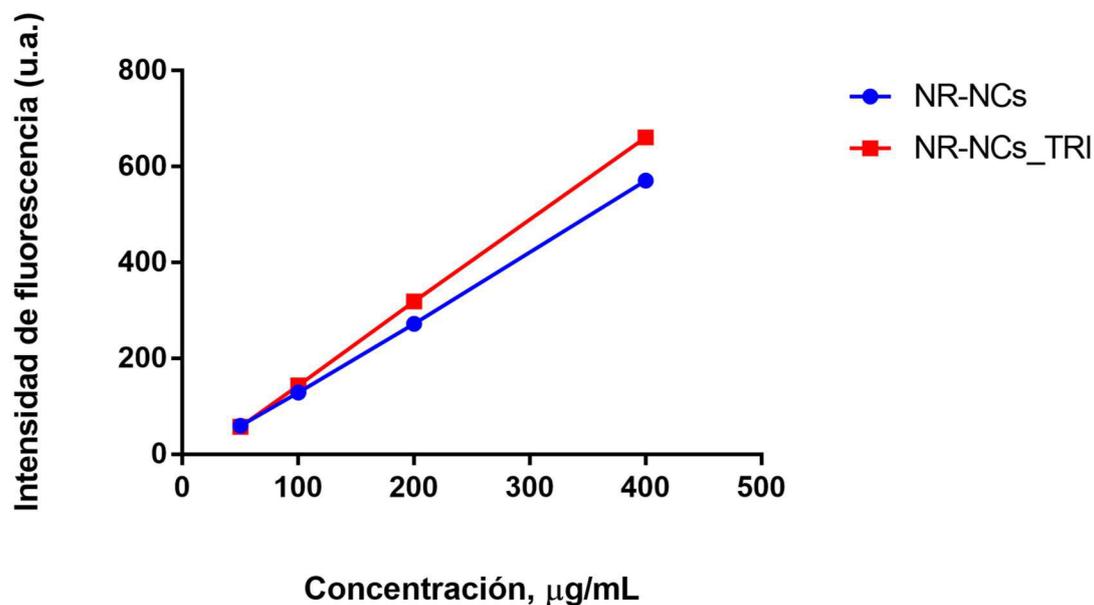


Figura 15. Intensidad de fluorescencia de las NCs cargadas de Nile Red antes (azul) y después (rojo) de ser funcionalizadas con el trimanósido, medidas a distintas concentraciones de NCs mediante espectrometría de fluorescencia.

### 2.2.1. Modulación de la respuesta de macrófagos

El estudio *in vitro* sobre el comportamiento de macrófagos humanos al ser incubados con estas NCs funcionalizadas con trimanósido fue llevado a cabo por el Dr. Juan Manuel Coya, perteneciente al grupo de investigación del Dr. Ludovic Tailleux del Instituto Pasteur de París. Según las necesidades específicas de cada experimento, se prepararon para ello distintas NCs, marcadas fluorescentemente y funcionalizadas con trimanósido.

#### 2.2.1.1. Internalización en macrófagos

Primero se evaluó si la adición de ligandos de trimanósido a la superficie de las NCs aumentaba su internalización en macrófagos, ya que este tipo de célula expresa varias lectinas a altos niveles, incluyendo receptores de manosa (ver introducción de este capítulo) [23,26]. Para cuantificar el grado de internalización, los macrófagos fueron incubados con las NR-NCs y las NR-NCs\_TRI a 100  $\mu\text{g/mL}$  (tras comprobar mediante ensayos MTT que esta concentración no afectaba a la viabilidad celular) durante 1, 4 ó 18 h y se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. La Figura 16 muestra la intensidad de fluorescencia de los macrófagos tras distintos tiempos de incubación con las NCs.

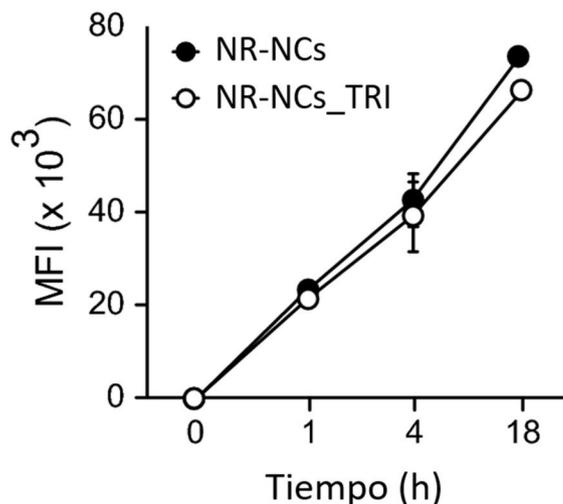


Figura 16. Internalización celular en macrófagos de NCs marcadas con Nile Red funcionalizadas con trimanósido (NR-NCs\_TRI) y no funcionalizadas (NR-NCs).

En concordancia con el estudio de internalización en células Vero y células dendríticas del capítulo 2, se observó un aumento de la internalización en macrófagos a lo largo del tiempo, pero no hubo diferencias significativas entre las NCs con ligandos o sin ellos.

Debido a que las NCs de quitosano no funcionalizadas ya muestran una elevada tasa de internalización, es posible que la presencia del trimanósido no sea tan determinante como para incrementar aún más la internalización. Algunos receptores de lectina tipo C (CLRs) expresados por los macrófagos poseen motivos de unión a distintos carbohidratos, entre ellos manosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa, glucosa o galactosa, entre otros [27]. Por lo tanto, no sólo el trimanósido sino también el quitosano, que contiene residuos de N-acetilglucosamina, podría estar siendo reconocido con gran afinidad por los receptores de los macrófagos.

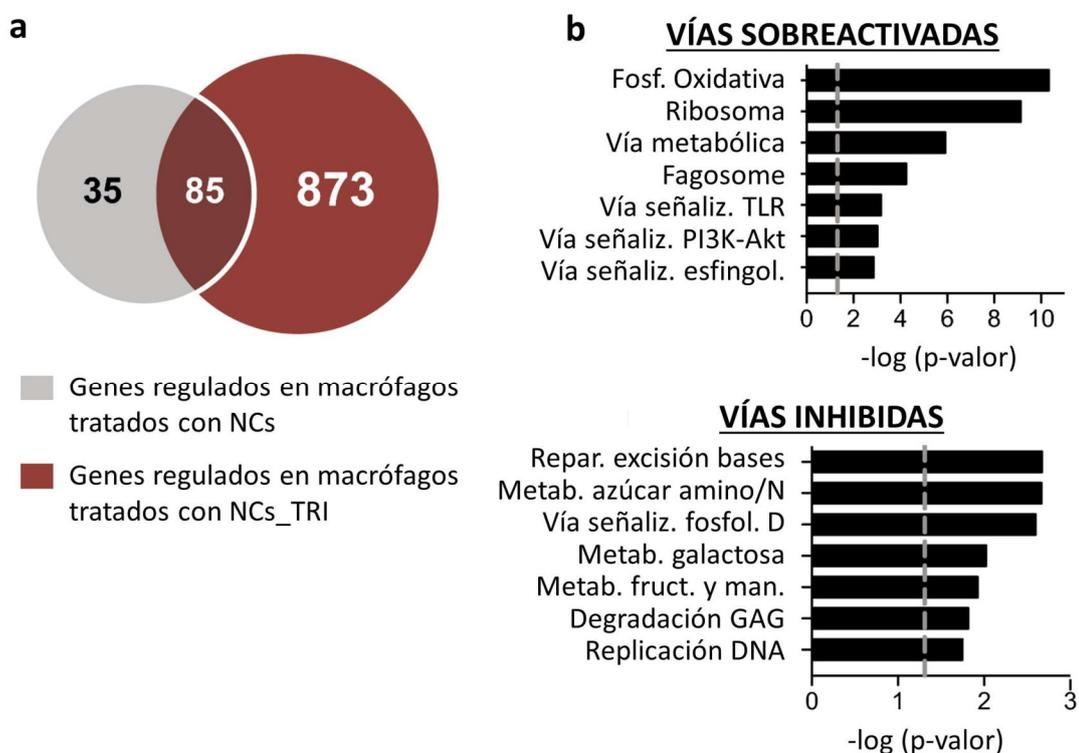
#### Actividad metabólica de macrófagos infectados

Algunos receptores de lectina tipo C (CLRs) son capaces de activar determinadas vías de señalización intracelular al unir el ligando [23,58]. Por ello, además de para el transporte específico de fármacos, los CLRs también pueden ser explotados para modular las funciones y actividades metabólicas de las células que los expresan, como la activación o la inhibición de la respuesta inmune de los macrófagos [23,27].

Para comparar la respuesta a nivel de metabolismo celular de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* ante las NCs y las NCs\_TRI, se analizó el transcriptoma de los macrófagos tratados 18 h con los dos tipos de NCs mediante mRNAseq para identificar los genes cuya expresión había sido alterada con respecto a los macrófagos sin tratar.

Sorprendentemente, a pesar de no haber observado diferencias en la internalización, el tratamiento con NCs\_TRI indujo una remodelación significativa del transcriptoma celular de los macrófagos. La Figura 17 muestra los genes diferencialmente expresados

por los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* tratados con NCs o NCs\_TRI, respecto al control no tratado (Figura 17a), así como las rutas biológicas significativamente moduladas por el tratamiento con NCs-TRI (Figura 17b).



**Figura 17.** a) Diagrama de Venn que muestra los genes expresados diferencialmente, respecto al control no tratado, por los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* tratados con NCs sin funcionalizar o funcionalizadas con trimanósido (NCs\_TRI). b) Procesos biológicos significativamente enriquecidos (análisis KEGG) por genes sobreexpresados (gráfico de arriba) o subexpresados (gráfico de abajo) por el tratamiento con NCs\_TRI en macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. La línea gris indica  $-\log$  de  $p=0.05$ .

En total, se expresaron diferencialmente 958 genes en las células incubadas con NCs\_TRI, mientras que sólo 120 en las células tratadas con NCs sin funcionalizar. Entre los 958 genes totales, 873 eran específicos de NCs\_TRI y este conjunto estaba enriquecido en genes implicados en la fosforilación oxidativa (sobreexpresados), en rutas metabólicas y en el metabolismo del azúcar (subexpresados). Estos resultados sugieren que la funcionalización con trimanósido afecta a la maquinaria mitocondrial y remodela el metabolismo celular.

La posibilidad de modular el metabolismo celular mediante la unión de ligandos en la superficie de las nanopartículas ofrece nuevas perspectivas. De hecho, muchas enfermedades, incluidas las enfermedades infecciosas, están asociadas a disfunciones metabólicas. La funcionalización de nanopartículas con moduladores metabólicos como complemento de los fármacos convencionales puede ser, por tanto, una estrategia prometedora para tratar estas enfermedades.

### 3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha modificado la superficie de las NCs de quitosano con el objetivo de modular algunas de sus propiedades, como la carga superficial, estabilidad, especificidad e internalización celular. Para ello, se ha puesto a punto un método de funcionalización basado en la reacción de los grupos amino del quitosano y del ligando con el reactivo de acoplamiento BS<sup>3</sup>.

En primer lugar, este método ha sido optimizado utilizando PEG como molécula modelo. El éxito de la funcionalización ha sido demostrado mediante FTIR, potencial zeta y cuantificación de grupos amino en la superficie de las NCs. Además, se observó, tal y como se esperaba, que la funcionalización con PEG aumentaba la estabilidad de las NCs en medio fisiológico (PBS) y en presencia de proteínas (BSA) y disminuía la citotoxicidad de las NCs.

En segundo lugar, las NCs han sido funcionalizadas con un trimanósido para dirigir el tratamiento a macrófagos. La disponibilidad del ligando en la superficie de las NCs para interactuar con sus receptores biológicos se confirmó mediante el reconocimiento específico por la lectina Concanavalina A. Aunque no se observaron diferencias en la internalización celular entre las NCs funcionalizadas y no funcionalizadas, la funcionalización de las NCs con trimanósido produjo una inesperada remodelación de la respuesta de los macrófagos ante la infección por *M. tuberculosis*. Estos prometedores resultados abren las puertas al uso de estas NCs como moduladores del metabolismo celular y es necesario un estudio en profundidad sobre la manera por la que las NCs son capaces de interactuar con los macrófagos y modificar su respuesta. Una estrategia que podría investigarse en el futuro para favorecer la disponibilidad del ligando de trimanósido en la superficie de la NC y que pueda interactuar más fácilmente con sus receptores sería la utilización de una molécula de PEG como espaciador entre la superficie de la NC y el ligando.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Materiales

El ácido bórico, el Orange II sal de sodio y la concanavalina A de *Canavalia ensiformis* –*Jack bean*– tipo VI se adquirieron en Sigma-Aldrich. El suberato de bis(sulfosuccinimidil) (BS<sup>3</sup>) se obtuvo de Pierce Biotechnology Millipore. El polietilenglicol (PEG) de 5000 Da (MeO-PEG-NH<sub>2</sub>) se compró en Iris Biotech. El trimanósido 4-aminobutilo 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil) 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil)  $\alpha$ -D-manopiranosido se adquirió en Omicron Biochemicals Inc.

El medio de cultivo celular DMEM, el tampón fosfato salino (PBS) sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y el tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS) con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> se compraron en Lonza. El MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazolil-2]-2,5-difeniltetrazolio), la penicilina, la

estreptomina, la glutamina y el 4',6-diamidino-2-fenilindolifenilindol (DAPI) se obtuvieron de Invitrogen.

#### 4.2. Líneas celulares y macrófagos

La línea celular Vero (células epiteliales de riñón de mono) fue adquirida de la “American Type Culture Collection” (ATCC) y cultivada en las condiciones que se especifican en el capítulo 2.

Las células mononucleares sanguíneas fueron aisladas por centrifugación Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences). Los monocitos CD14<sup>+</sup> fueron aislados por selección positiva usando microcápsulas CD14 (Miltenyi Biotec) y diferenciados a macrófagos en RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (20 ng/mL, R&D Systems) durante 6 días, cambiando el medio de cultivo cada dos días.

Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3. Método de funcionalización

Para la funcionalización de la superficie de las nanocápsulas, se partió de 20 mg de nanocápsulas a una concentración de 2 mg/mL en tampón borato 10 mM pH 8.3. Sobre la suspensión se añadieron diferentes cantidades del reactivo de acoplamiento BS<sup>3</sup> (5 ó 100 nmol/mg NC para la funcionalización con PEG y 50 nmol/mg NC para la funcionalización con trimanósido) y se mantuvieron bajo agitación durante 30 minutos. Después, se añadió una cantidad doble de ligando:  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino polietilenglicol (MeO-PEG-NH<sub>2</sub>) ó 4-aminobutilo 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil) 2-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil)  $\alpha$ -D-manopiranosido (trimanósido). La mezcla se mantuvo bajo agitación durante 2 h a 37 °C. Finalmente, se añadieron 20 mL de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0 para bloquear el reactivo de acoplamiento BS<sup>3</sup> que no hubiera reaccionado con el ligando. Las nanocápsulas funcionalizadas se filtraron con una unidad de ultrafiltración Amicon<sup>®</sup> utilizando discos de ultrafiltración Millipore<sup>®</sup> Biomax<sup>®</sup> de 300 kDa para separarlas del PEG no unido o con un dispositivo de filtración por centrifugación con membrana de celulosa regenerada Ultracel<sup>®</sup> 100 (Amicon<sup>®</sup> Ultra-15, Millipore<sup>®</sup>, 100 KDa) para separarlas del trimanósido no unido. Después de 2 lavados con agua, las nanocápsulas se concentraron hasta un volumen final de 2 mL. La concentración se determinó después de obtener el peso seco liofilizando una fracción de la muestra (200-500  $\mu$ L).

#### 4.4. Cuantificación de los grupos amino de la superficie

La cantidad de grupos amino expuestos en la superficie de las nanocápsulas se midió mediante el ensayo espectrofotométrico con Orange II [59,60]. Cada molécula de Orange II se une a un grupo amino de la superficie de la nanocápsula (cuando el pH es lo suficientemente ácido para que los grupos amino estén protonados e interaccionen

con el Orange II), por lo que la medida del número de moléculas de Orange II equivale a los grupos amino accesibles.

Se pusieron en contacto 0.2 mg de nanocápsulas (correspondientes, por ejemplo, a un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de suspensión acuosa a la concentración de 10 mg/mL) con 1 mL de solución ácida de sal sódica de Orange II 2 mM (pH 3) y se mantuvieron durante 30 min a 40 °C. La suspensión de las cápsulas se pasó a través de un filtro de membrana adaptado para jeringa (filtro de PVDF con poros de 0.22  $\mu\text{m}$  Millex®, Merck Millipore®) para adsorber las nanocápsulas en la membrana y mantenerlas retenidas para separarlas de la solución Orange II. A continuación, se pasó una solución ácida (pH 3) varias veces a través del mismo filtro hasta que se eliminó todo el colorante no unido a las nanocápsulas (verificado mediante la medición espectrofotométrica del sobrenadante y comparando con una curva de calibración a pH 3). Después, se lavaron con una solución alcalina (pH 12) para desorber el colorante unido a los grupos amino de las nanocápsulas. Se recogieron las fracciones de lavado y se midió la cantidad de colorante no absorbido y desorbido a una longitud de onda de 480 nm con un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV/Vis después de realizar la curva de calibrado del Orange II a pH 12.

#### 4.5. Análisis de la composición química mediante FTIR

La composición de las nanocápsulas se analizó a partir de la muestra liofilizada mediante análisis de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo JASCO FT/IR-4100 en un rango de frecuencia de 600-4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$  y un número de escaneo de 32.

#### 4.6. Determinación del diámetro hidrodinámico

El diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) de las NCs fue medido mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un equipo Brookhaven 90Plus. Las muestras fueron medidas a 0.15 mg/mL en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ a 25 °C y los datos fueron obtenidos según la aproximación de distribución numérica. Se realizaron al menos 8 medidas (*runs*) de 2 minutos de cada muestra.

#### 4.7. Determinación del potencial zeta

El potencial Z de las muestras fue medido a 25 °C en KCl 10 mM pH 6.5 a una concentración de 0.01 mg/mL utilizando el aparato Brookhaven 90Plus Particle Size Analyzer. Se caracterizaron varios lotes de cada tipo de nanocápsula y se realizaron al menos 5 medidas (*runs*) de cada muestra limitando el error residual relativo a 0.02.

#### 4.8. Estabilidad coloidal en medio fisiológico

La resistencia de las nanocápsulas a la agregación en PBS se evaluó midiendo las NCs antes y después de ser funcionalizadas con PEG a baja y alta densidad en PBS y en agua

a 0.15 mg/mL. El diámetro hidrodinámico de las nanocápsulas se midió utilizando un equipo Brookhaven 90Plus DLS.

#### 4.9. Adsorción de proteínas

La resistencia de las nanocápsulas a la adsorción de proteínas se determinó mediante la incubación de las nanocápsulas antes y después de ser funcionalizadas con PEG a baja y alta densidad (3 mL de una suspensión a 0.15 mg/mL) a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA). El diámetro hidrodinámico de las nanocápsulas se midió tras 10 minutos de incubación utilizando un equipo Brookhaven 90Plus DLS.

#### 4.10. Citotoxicidad de las NCs funcionalizadas con PEG

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular *in vitro* para determinar la citotoxicidad de las nanocápsulas utilizando el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Se sembraron 7500 células por pocillo utilizando una placa estándar de 96 pocillos (5 réplicas por muestra). Después de 24 horas de incubación, el medio se reemplazó con un nuevo medio que contenía 5 concentraciones diferentes de NCs no funcionalizadas, NCs funcionalizadas con PEG a baja densidad y NCs funcionalizadas con PEG a alta densidad. También se incluyó un control negativo que no contenía cápsulas (células no tratadas). Después de otras 24 horas de incubación, el medio se reemplazó con la solución de MTT (0,5 mg·mL<sup>-1</sup> en DMEM). Después de 2 horas de incubación, se eliminó el medio y los cristales formados se disolvieron en 200 µL de DMSO. La absorbancia a 570 nm se midió en un lector de placas ThermoScientific Multiskan GO TM. La viabilidad celular relativa (%) se calculó utilizando la relación porcentual entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control. En cada ensayo se incluyeron 5 réplicas de cada muestra y los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces.

#### 4.11. Internalización celular de las NCs funcionalizadas con PEG

Para el análisis de microscopía óptica, se sembraron  $3 \times 10^4$  células Vero sobre cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos a 37 °C. Después de 24 h, se añadieron las nanocápsulas a 50 µg/mL en DMEM y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Las nanocápsulas no internalizadas se eliminaron lavando con DPBS dos veces. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 min a 4 °C, se lavaron dos veces con DPBS y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con DAPI para el marcaje del núcleo. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio para microscopía utilizando ProLong® Gold Antifade (Invitrogen). La microscopía óptica se realizó con un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-E) y las imágenes se analizaron con el software NIS-Elements Advanced Research.

#### 4.12. Crio-microscopía electrónica de transmisión (cryoTEM).

Las NCs funcionalizadas con trimanósido fueron vitrificadas en etano líquido y analizadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) a baja temperatura. El proceso de vitrificación se realizó en un FEI Vitrobot: una gota de 3  $\mu$ L de una suspensión acuosa del material se colocó en una rejilla de carbono TEM Quantifoil, el exceso de agua se eliminó en el Vitrobot con papel de filtro y la rejilla se congeló sumergiéndola en etano líquido. A continuación, las muestras se transfirieron bajo una atmósfera de nitrógeno líquido a un porta-muestras de TEM Gatan<sup>®</sup> equipado con un depósito de nitrógeno líquido. Las imágenes TEM se obtuvieron en un Tecnai T20 (FEI), operado a 200 kV, acoplado a una cámara CCD Veleta.

#### 4.13. Ensayo de agregación con concanavalina A

Nanocápsulas de quitosano no funcionalizadas y funcionalizadas con trimanósido se incubaron en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.4 a una concentración de 0.2 mg/mL y se añadió concanavalina A a distintas concentraciones (5-80  $\mu$ g/mL). La mezcla se dejó durante 120 min para que se produjera la interacción y el grado de agregación se determinó posteriormente midiendo el diámetro hidrodinámico de las NCs en un equipo DLS Brookhaven 90Plus.

#### 4.14. Citometría de flujo

Para analizar la internalización celular de las NCs, éstas fueron marcadas fluorescentemente mediante encapsulación de Nile Red (ver capítulo 2) y posterior funcionalización con trimanósido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.

Para determinar el grado de internalización a lo largo del tiempo, los macrófagos se cultivaron a  $4 \times 10^5$  células/mL en placas de 24 pocillos durante 24 h, seguidas de 1 a 18 h de tratamiento con varias concentraciones de NCs fluorescentes (con o sin trimanósido). Después de la incubación, las células fueron lavadas extensamente con PBS para eliminar las NCs extracelulares, levantadas y fijadas en paraformaldehído al 4% para su análisis utilizando un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter).

#### 4.15. Extracción del ARN, preparación de la librería de ADNc y secuenciación

El ARN total de los macrófagos se extrajo utilizando reactivos QIAzol (Life Technologies) y se purificó sobre columnas RNeasy (Qiagen). La calidad de todas las muestras se evaluó con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) para verificar la integridad del ARN. Sólo las muestras con un buen rendimiento de ARN y sin degradación del ARN (proporción de 28S a 18S,  $> 1,7$ ; número de integridad del ARN  $> 9$ ) se utilizaron para experimentos posteriores. Las librerías de ADN complementario (ADNc) se prepararon con el Kit de Preparación de Muestras de ARN TruSeq v2 (Illumina)

y se secuenciaron en un Illumina HiSeq 2500 en el Centro Hospitalario Universitario Sainte-Justine de Genómica Clínica Pediátrica (Montreal, Canadá). STAR v2.5.0b [61] se utilizó para mapear las secuencias de ARN al genoma de referencia hg38 y cuantificar la expresión génica (opción `quantMode GeneCounts`) contando los fragmentos que solapaban con los genes Ensembl (GRCh38 v. 83). El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando un modelo lineal generalizado con el paquete R Bioconductor edgeR v3.16.5 [62] en los genes con más de un conteo por millón (CPM) en al menos dos muestras. La fórmula modelo utilizada en edgeR ( $\sim$  Donante + Infección + Infección:Donante + Infección:Tratamiento + Donante:Tratamiento) contenía: los principales efectos para el Donante y la Infección, las interacciones del Donante con la Infección y el Tratamiento para ajustar las diversas respuestas a la infección y el tratamiento entre donantes, y una interacción anidada de la Infección con el Tratamiento porque estábamos interesados en los efectos del tratamiento específicos de la infección. Esto último se utilizó para extraer genes expresados diferencialmente entre muestras tratadas con NCs y muestras no tratadas bajo las condiciones infectadas y no infectadas.

#### 4.16. Infección de los macrófagos con micobacterias

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fue cultivada a partir de una población congelada hasta la fase logarítmica intermedia en medio 7H9 (Becton-Dickinson), complementado con albúmina-dextrosa-catalasa (ADC, Difco), y la infección de los macrófagos se llevó a cabo según el protocolo descrito anteriormente [63]. Antes de la infección, las bacterias se lavaron tres veces y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Los aglomerados de bacterias se disociaron mediante 30 pases a través de una aguja y luego se dejaron sedimentar durante 5 minutos. La densidad de las bacterias en el sobrenadante se verificó midiendo la  $DO_{600}$  y los volúmenes de alícuotas fueron definidos para permitir infecciones de una bacteria por cada dos células. Las células fueron infectadas en placas de 24 pocillos donde cada pocillo contenía  $0.5 \times 10^6$  células en 1 mL de medio con GM-CSF. Después de 2 h de incubación a 37 °C, las células infectadas se lavaron tres veces en PBS para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron en medio fresco. La cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, que expresaba la proteína fluorescente verde (GFP) (GFP-*M. tuberculosis*), llevaba el plásmido pEGFP (donado por G. Stewart, Imperial College, Londres, Reino Unido), resistente a la higromicina y con el gen *gfp* bajo el control del promotor constitutivo micobacteriano *Phsp60*.

### 5. AGRADECIMIENTOS Y COLABORACIONES

Me gustaría agradecer a Rodrigo Fernández Pacheco, del Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza, su apoyo técnico para la preparación y observación de las muestras mediante Cryo-TEM.

Agradecer también al grupo de investigación del Dr. Ludovic Tailleux del Instituto Pasteur de París, y especialmente al Dr. Juan Manuel Coya Raboso, por el estudio *in vitro* sobre el efecto de las NCs funcionalizadas con trimanósido en el comportamiento de macrófagos no infectados e infectados por *M. tuberculosis*.

## 6. REFERENCIAS

1. De Matteis, L.; Alleva, M.; Serrano-Sevilla, I.; García-Embid, S.; Stepien, G.; Moros, M.; de la Fuente, J. Controlling Properties and Cytotoxicity of Chitosan Nanocapsules by Chemical Grafting. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 175.
2. Kyzas, G.; Bikiaris, D. Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 312–337.
3. Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283–318.
4. Zhang, Y.; Chan, H.F.; Leong, K.W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 104–120.
5. Rabanel, J.-M.; Hildgen, P.; Banquy, X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *J. Control. Release* **2014**, *185*, 71–87.
6. des Rieux, A.; Pourcelle, V.; Cani, P.D.; Marchand-Brynaert, J.; Préat, V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 833–844.
7. Leiro, V.; Parreira, P.; Freitas, S.C.; Martins, M.C.L.; Pêgo, A.P. Conjugation Chemistry Principles and Surface Functionalization of Nanomaterials. In *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*; Elsevier, 2018; pp. 35–66 ISBN 9780323508797.
8. Wong, S.S.; Wong, L.-J.C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 866–874.
9. Hermanson, G.T. Homobifunctional Crosslinkers. In *Bioconjugate Techniques*; Elsevier, 2013; pp. 275–298 ISBN 9780123822390.
10. Avrameas, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* **1969**, *6*, 43–52.
11. Maruyama, K.; Yuda, T.; Okamoto, A.; Ishikura, C.; Kojima, S.; Iwatsuru, M. Effect of molecular weight in amphiphilic polyethyleneglycol on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1991**, *39*, 1620–2.
12. Cieślak, A.; Wauthoz, N.; Nieto Orellana, A.; Lautram, N.; Béjaud, J.; Hureauux, J.; Lafleur, M.; Benoit, J.-P.; Salomon, C.J.; Bastiat, G. Stealth nanocarriers based liposomes using PEG post-insertion process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *115*, 31–38.
13. Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 67–81.

14. Klibanov, A.L.; Maruyama, K.; Torchilin, V.P.; Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 235–237.
15. Larson, T.A.; Joshi, P.P.; Sokolov, K. Preventing Protein Adsorption and Macrophage Uptake of Gold Nanoparticles via a Hydrophobic Shield. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9182–9190.
16. Ishida, T.; Ichihara, M.; Wang, X.; Yamamoto, K.; Kimura, J.; Majima, E.; Kiwada, H. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release* **2006**, *112*, 15–25.
17. Bastos, V.; Ferreira de Oliveira, J.M.P.; Brown, D.; Jonhston, H.; Malheiro, E.; Daniel-da-Silva, A.L.; Duarte, I.F.; Santos, C.; Oliveira, H. The influence of Citrate or PEG coating on silver nanoparticle toxicity to a human keratinocyte cell line. *Toxicol. Lett.* **2016**, *249*, 29–41.
18. Pasut, G.; Veronese, F.M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1177–1188.
19. Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Müller, R.H.; Verbavatz, J.M.; Langer, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 316–326.
20. Prencipe, G.; Tabakman, S.M.; Welsher, K.; Liu, Z.; Goodwin, A.P.; Zhang, L.; Henry, J.; Dai, H. PEG Branched Polymer for Functionalization of Nanomaterials with Ultralong Blood Circulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4783–4787.
21. Walkey, C.D.; Olsen, J.B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W.C.W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2139–2147.
22. Conriot, J.; Silva, J.M.; Fernandes, J.G.; Silva, L.C.; Gaspar, R.; Brocchini, S.; Florindo, H.F.; Barata, T.S. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 1–27.
23. Lepenies, B.; Lee, J.; Sonkaria, S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1271–1281.
24. Cambi, A.; Figdor, C.G. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 539–546.
25. Shilakari Asthana, G.; Asthana, A.; Kohli, D.V.; Vyas, S.P. Mannosylated Chitosan Nanoparticles for Delivery of Antisense Oligonucleotides for Macrophage Targeting. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–17.
26. McGreal, E.P.; Miller, J.L.; Gordon, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **2005**, *17*, 18–24.
27. Dambuza, I.M.; Brown, G.D. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, *32*, 21–27.
28. Fraser, I.P.; Ezekowitz, R.A.B. Mannose receptor and phagocytosis. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*; JAI, 1999; Vol. 5, pp. 87–101 ISBN 9781559389990.

29. Bertolotti, B.; Oroszová, B.; Sutkeviciute, I.; Kniežo, L.; Fieschi, F.; Parkan, K.; Lovyová, Z.; Kašáková, M.; Moravcová, J. Nonhydrolyzable C-disaccharides, a new class of DC-SIGN ligands. *Carbohydr. Res.* **2016**, *435*, 7–18.
30. Chaubey, P.; Mishra, B.; Mudavath, S.L.; Patel, R.R.; Chaurasia, S.; Sundar, S.; Suvarna, V.; Monteiro, M. Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against *Leishmania donovani*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 109–120.
31. Costa, A.; Sarmiento, B.; Seabra, V. Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *114*, 103–113.
32. Maretti, E.; Costantino, L.; Rustichelli, C.; Leo, E.; Croce, M.A.; Buttini, F.; Truzzi, E.; Iannuccelli, V. Surface engineering of Solid Lipid Nanoparticle assemblies by methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside for the active targeting to macrophages in anti-tuberculosis inhalation therapy. *Int. J. Pharm.* **2017**, *528*, 440–451.
33. Zhu, D.; Hu, C.; Fan, F.; Qin, Y.; Huang, C.; Zhang, Z.; Lu, L.; Wang, H.; Sun, H.; Leng, X.; et al. Co-delivery of antigen and dual agonists by programmed mannose-targeted cationic lipid-hybrid polymersomes for enhanced vaccination. *Biomaterials* **2019**, *206*, 25–40.
34. Irache, J.M.; Salman, H.H.; Gamazo, C.; Espuelas, S. Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 703–724.
35. World Health Organization *Global tuberculosis report; 2018*;
36. Lange, C.; Abubakar, I.; Alffenaar, J.-W.C.; Bothamley, G.; Caminero, J.A.; Carvalho, A.C.C.; Chang, K.-C.; Codecasa, L.; Correia, A.; Crudu, V.; et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur. Respir. J.* **2014**, *44*, 23–63.
37. Chan, C.E.; Götze, S.; Seah, G.T.; Seeberger, P.H.; Tukvadze, N.; Wenk, M.R.; Hanson, B.J.; MacAry, P.A. The diagnostic targeting of a carbohydrate virulence factor from *M. Tuberculosis*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10281.
38. Turner, J.; Torrelles, J.B. Mannose-capped lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathog. Dis.* **2018**, *76*, 26.
39. Gorocica, P.; Jiménez-Martínez, M. del C.; Garfias, Y.; Sada, I.; Lascurain, R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **2005**, *18*, 142–153.
40. Immordino, M.L.; Dosio, F.; Cattell, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1*, 297–315.
41. Hu, Y.; Jin, J.; Han, Y.; Yin, J.; Jiang, W.; Liang, H. Study of fibrinogen adsorption on poly(ethylene glycol)-modified surfaces using a quartz crystal microbalance with dissipation and a dual polarization interferometry. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 7716.
42. Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by

- polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2000**, *18*, 301–313.
43. Malmsten, M.; Emoto, K.; Van Alstine, J.M. Effect of Chain Density on Inhibition of Protein Adsorption by Poly(ethylene glycol) Based Coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *202*, 507–517.
  44. Parhiz, H.; Khoshnejad, M.; Myerson, J.W.; Hood, E.; Patel, P.N.; Brenner, J.S.; Muzykantov, V.R. Unintended effects of drug carriers: Big issues of small particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *130*, 90–112.
  45. Bloemen, M.; Brullot, W.; Luong, T.T.; Geukens, N.; Gils, A.; Verbiest, T. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1100.
  46. Nazli, C.; Ergenc, T.I.; Yar, Y.; Acar, H.Y.; Kizilel, S. RGDS-functionalized polyethylene glycol hydrogel-coated magnetic iron oxide nanoparticles enhance specific intracellular uptake by HeLa cells. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 1903–1920.
  47. Cao, Z.; Adnan, N.N.M.; Wang, G.; Rawal, A.; Shi, B.; Liu, R.; Liang, K.; Zhao, L.; Gooding, J.J.; Boyer, C.; et al. Enhanced colloidal stability and protein resistance of layered double hydroxide nanoparticles with phosphonic acid-terminated PEG coating for drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *521*, 242–251.
  48. Nurdiansyah, R.; Rifa'i, M.; Widodo A comparative analysis of serum albumin from different species to determine a natural source of albumin that might be useful for human therapy. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* **2016**, *11*, 243–249.
  49. Łukasiewicz, S.; Szczepanowicz, K. In Vitro Interaction of Polyelectrolyte Nanocapsules with Model Cells. *Langmuir* **2014**, *30*, 1100–1107.
  50. Szczepanowicz, K.; Bazylińska, U.; Pietkiewicz, J.; Szyk-Warszyńska, L.; Wilk, K.A.; Warszyński, P. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 678–691.
  51. Champion, J.A.; Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 4930–4934.
  52. Sharma, G.; Valenta, D.T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J.W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 408–412.
  53. Manshian, B.B.; Poelmans, J.; Saini, S.; Pokhrel, S.; Grez, J.J.; Himmelreich, U.; Mädler, L.; Soenen, S.J. Nanoparticle-induced inflammation can increase tumor malignancy. *Acta Biomater.* **2018**, *68*, 99–112.
  54. Wibroe, P.P.; Anselmo, A.C.; Nilsson, P.H.; Sarode, A.; Gupta, V.; Urbanics, R.; Szebeni, J.; Hunter, A.C.; Mitragotri, S.; Mollnes, T.E.; et al. Bypassing adverse injection reactions to nanoparticles through shape modification and attachment to erythrocytes. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 589–594.
  55. Cavada, B.S.; Osterne, V.J.S.; Lossio, C.F.; Pinto-Junior, V.R.; Oliveira, M.V.; Silva,

- M.T.L.; Leal, R.B.; Nascimento, K.S. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *134*, 901–911.
56. Craig, D.; Simpson, J.; Faulds, K.; Graham, D. Formation of SERS active nanoparticle assemblies via specific carbohydrate-protein interactions. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 30–32.
  57. Babu, P.; Sinha, S.; Surolia, A. Sugar-quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 146–151.
  58. Drickamer, K.; Taylor, M.E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *34*, 26–34.
  59. Noel, S.; Liberelle, B.; Robitaille, L.; De Crescenzo, G. Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1690–1699.
  60. Arenal, R.; De Matteis, L.; Custardoy, L.; Mayoral, A.; Tence, M.; Grazu, V.; De La Fuente, J.M.; Marquina, C.; Ibarra, M.R. Spatially-Resolved EELS Analysis of Antibody Distribution on Biofunctionalized Magnetic Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, *7*, 4006–4013.
  61. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21.
  62. McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Smyth, G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4288–4297.
  63. Polena, H.; Boudou, F.; Tilleul, S.; Dubois-Colas, N.; Lecoite, C.; Rakotosamimanana, N.; Pelizzola, M.; Andriamandimby, S.F.; Raharimanga, V.; Charles, P.; et al. Mycobacterium tuberculosis exploits the formation of new blood vessels for its dissemination. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33162.



# Transporte de TFDs en NCs de quitosano para terapia antimicrobiana

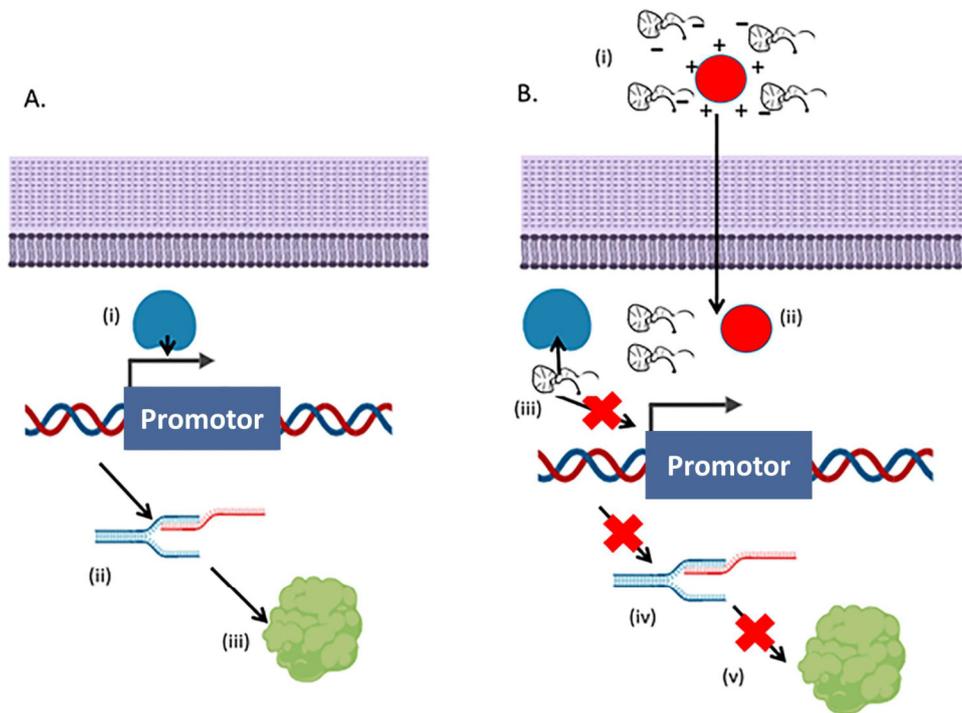
## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos convencionales es una amenaza cada vez más grave para la salud pública mundial que requiere una acción urgente. Cada año se producen aproximadamente 23000 muertes en EE.UU. y 33000 en la UE como consecuencia directa de una infección resistente a los antibióticos [1,2], y se espera que la mortalidad mundial aumente hasta alcanzar los 300 millones de muertes en 2050 [1]. Esto es especialmente preocupante para los países en desarrollo, ya que estudios recientes han predicho una mayor tendencia a la resistencia en el África subsahariana y en algunas zonas de América del Sur [3].

Para hacer frente a la creciente amenaza de la resistencia, se necesitan alternativas eficaces al uso de antibióticos [4]. Existen diversas estrategias con un gran potencial como alternativa a los antibióticos, tanto a nivel de prevención como de tratamiento de las infecciones bacterianas, aunque los avances terapéuticos logrados todavía no son satisfactorios [5]. Entre las estrategias cuyo desarrollo se encuentra en fases más avanzadas están las vacunas, probióticos, anticuerpos, lisinas, virus bacteriófagos y péptidos antimicrobianos [4,5]. También las terapias basadas en ácidos nucleicos están mostrando un gran potencial para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las infecciones bacterianas [6–8]. Recientemente ha surgido un campo de investigación centrado en el desarrollo de un tipo de ácido nucleico, denominado *Transcription Factor Decoy* (TFD, traducido al español como señuelo de factores de transcripción), que puede ser explotado como una nueva terapia antimicrobiana, ya sea matando directamente a la bacteria al inhibir sus genes esenciales o inactivando sus genes de resistencia para sensibilizarla a los antibióticos convencionales.

Los TFDs son oligonucleótidos de DNA de doble cadena y corta longitud (10-80 pares de bases) que reproducen la secuencia de unión específica de un determinado factor de transcripción [9,10]. Cuando una célula es transfectada con estas moléculas, los TFDs se unen competitivamente a los factores de transcripción diana, de forma que éstos

quedan secuestrados y no pueden unirse de forma eficiente a la región promotora del gen que regulan [11]. Esto a su vez inhibe la producción de RNA mensajero (mRNA), y por consiguiente no se producen las proteínas diana (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismo de acción del TFD transportado por nanopartículas en la inhibición de la expresión génica. A) Proceso normal de transcripción mediante el cual (i) el factor de transcripción se une a su respectiva región promotora, lo que da como resultado (ii) la transcripción de ARNm, que luego (iii) se traduce en una proteína funcional. B) (i) Después de la administración de nanopartículas cargadas de TFD, (ii) estas atraviesan la pared y membrana celular bacteriana y el TFD se libera. (iii) El TFD inhibe competitivamente la unión del factor de transcripción a la región promotora del ADN y, por lo tanto, (iv) inhiben la transcripción y (v) la traducción de proteínas. Adaptado de Hibbitts *et al.* [12].**

Aunque esta tecnología se desarrolló para su uso en células eucariotas, también se aplica a organismos procariontes [13,14]. Cuando se aplica como tratamiento antibacteriano, se busca la inhibición de proteínas diana esenciales para la supervivencia de la bacteria o que estén implicadas en su mecanismo de resistencia.

La secuencia de TFD utilizada en este trabajo se une específicamente al factor de transcripción WalR, que es una proteína altamente conservada y esencial para la viabilidad de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ya que desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo de la pared celular y en la formación de biofilm [15]. Por esta razón, la inhibición de WalR podría producir la muerte de la bacteria. De hecho, en otro trabajo se identificaron varios inhibidores específicos de WalR que consiguen matar con eficacia a *S. aureus* [16]. Además, se ha demostrado que WalR está implicado en el mecanismo de resistencia a la vancomicina [17]. Por lo tanto, aún en el caso de que no se consiguiera una muerte bacteriana directa, la inhibición de este factor de

transcripción podría producir beneficios adicionales como el aumento de la susceptibilidad a la vancomicina en las bacterias *S. aureus* resistentes tratadas con TFD.

*S. aureus* es un patógeno humano Gram-positivo que habita comúnmente en la piel, tracto respiratorio y tracto urinario, entre otros, y puede dar lugar a infecciones que varían en gravedad, desde infecciones de la piel y los tejidos blandos relativamente leves hasta sepsis potencialmente mortales, como el síndrome de shock tóxico [18]. La aparición de cepas resistentes a la meticilina y a otros agentes antimicrobianos, conocidas como *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA, por sus siglas en inglés), ha aumentado el coste y la duración del tratamiento, lo que ha generado una preocupación creciente entre los profesionales de la medicina [19]. Actualmente en Europa, las tasas de infección por MRSA han llegado a alcanzar el 24 % de los pacientes hospitalizados y a constituir el 54 % de todas las cepas de *S. aureus* detectadas [20,21]. La Organización Mundial de la Salud ha publicado recientemente que el desarrollo de nuevos antimicrobianos contra el MRSA tiene una alta prioridad [22].

La tecnología de los TFDs presenta una nueva vía potencial para mejorar el tratamiento de MRSA. En las infecciones bacterianas extracelulares, como las producidas por *S. aureus*, las bacterias patogénicas se encuentran presentes principalmente en la sangre, linfa y/o fluidos intersticiales [8]. Para tratar estos patógenos, los TFDs deben mantener una estabilidad adecuada en la circulación sanguínea antes de entrar en las células bacterianas. Sin embargo, la presencia de nucleasas y proteínas plasmáticas en la sangre da lugar a una rápida degradación y eliminación de estos ácidos nucleicos [10]. Además, la naturaleza hidrofílica, el tamaño y la carga electrostática negativa de estas moléculas dificulta su paso a través de la pared bacteriana y de la membrana plasmática, también cargadas negativamente [23,24].

La vehiculización de los TFDs a través de nanotransportadores es una estrategia prometedora para favorecer su estabilidad, protección e internalización celular, requisitos esenciales para lograr un efecto terapéutico eficiente [8,13]. Por ello, en este estudio se ha investigado la capacidad de las NCs de quitosano para atrapar y transportar los TFDs a la bacteria *S. aureus*. La naturaleza catiónica de las NCs permitió un atrapamiento eficiente del TFD. Se analizaron la estabilidad y los cambios en las características físico-químicas de las NCs cargadas de TFD en medios biológicos relevantes. Además, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de las NCs cargadas de TFD contra *S. aureus* y se evaluó un posible efecto de sinergia con antibiótico.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Síntesis de nanocápsulas de quitosano cargadas con TFD

Debido al carácter aniónico de los TFDs, la capa polimérica de las NCs desarrolladas en esta tesis resulta muy adecuada para atrapar este ácido nucleico gracias a las

interacciones electrostáticas y a los puentes de hidrógeno que se pueden establecer entre los grupos fosfato del TFD y los grupos amino del quitosano.

La incorporación del TFD en el nanotransportador de quitosano requirió una modificación apropiada del procedimiento de síntesis de NCs detallado en el capítulo 2 de esta tesis y que se resume brevemente aquí [25]. El núcleo interior de las NCs se formó mediante nanoemulsión siguiendo el procedimiento habitual (ver capítulo 2). Sobre esta nanoemulsión se añadió una mezcla de quitosano y TFD, previamente preparada, para obtener la cubierta estabilizadora de las NCs, en la que se deseaba el atrapamiento de la molécula de ácido nucleico. La suspensión se añadió a una solución de sulfato de sodio para la formación de la estructura de hidrogel mediante gelificación iónica del quitosano adsorbido sobre los núcleos de nanoemulsión. De esta manera, y a diferencia de otros trabajos donde el TFD es adsorbido sobre la superficie del nanotransportador previamente sintetizado [12,13,24,26], en nuestro caso el TFD es atrapado en el hidrogel de quitosano durante la formación de las propias NCs. Marín-Menéndez y colaboradores observaron que el TFD adsorbido sobre su nanotransportador era degradado por la enzima DNAsa I en tan sólo una hora [9]. En comparación con los 15 minutos que tardaba en degradarse el TFD en ausencia de nanotransportador, su incorporación en el nanotransportador aumentaba su protección durante más tiempo, pero una hora sigue siendo un tiempo de protección muy limitado para una posible aplicación *in vivo*. Comparado con la adsorción, el atrapamiento del TFD dentro de la matriz polimérica de quitosano puede mejorar su protección frente a la degradación en medios biológicos al evitar que quede expuesto en la superficie.

## 2.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación y carga de TFD

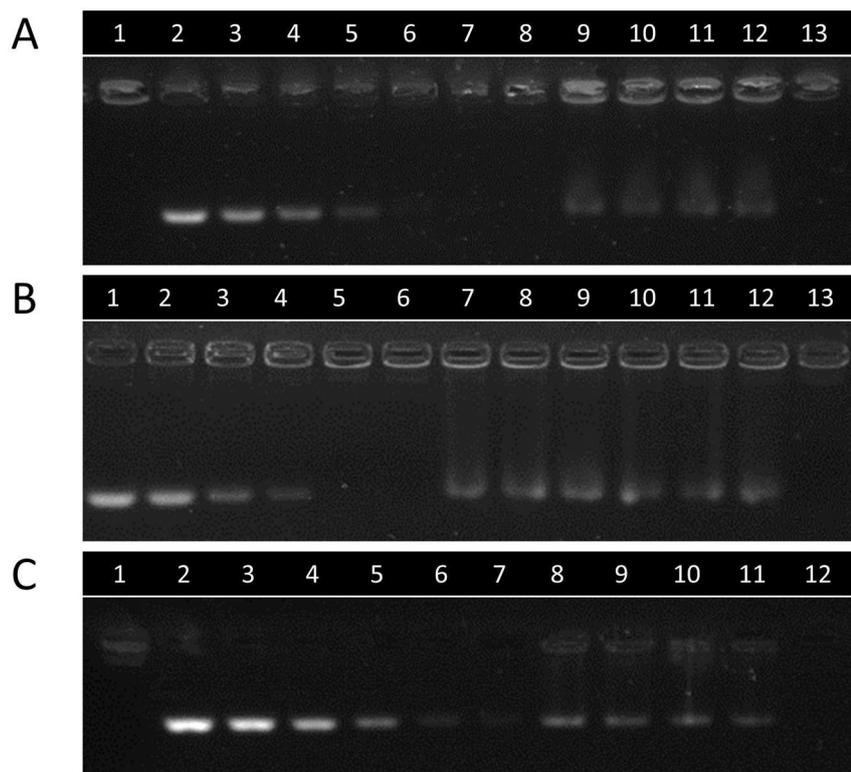
Una vez sintetizadas las NCs cargadas de TFD, se buscó un método de análisis apropiado para cuantificar el TFD atrapado en las NCs. En primer lugar, se investigaron métodos indirectos basados en la cuantificación del TFD no atrapado durante el proceso de síntesis de las NCs. Para ello, se trató de cuantificar la cantidad de TFD perdida en los sobrenadantes tras las centrifugaciones para sustraerla de la cantidad añadida inicialmente y estimar así la cantidad atrapada. La espectrofotometría UV es un método ampliamente utilizado para la cuantificación de los ácidos nucleicos debido a su característica absorbancia a 260 nm, aunque tiene desventajas como una limitada sensibilidad o que puede verse sesgado por la presencia de contaminantes [27,28]. De hecho, algunos reactivos presentes en los sobrenadantes, principalmente los surfactantes, exhibían absorbancia en el mismo rango que el TFD, lo que impidió la cuantificación del TFD mediante espectrofotometría UV.

También fue problemática la cuantificación mediante espectrometría de fluorescencia utilizando un intercalante de DNA (naranja de acridina), ya que los surfactantes interferían con la fluorescencia del propio intercalante. Para superar este problema, con el objetivo de separar los surfactantes del sobrenadante y purificar el TFD, se utilizaron

columnas de exclusión molecular de sefarosa especiales para la purificación de oligonucleótidos. Desafortunadamente, este método no permitió eliminar completamente los surfactantes.

Finalmente, se consiguió separar los surfactantes del TFD mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con el intercalante GelRed®. Sin embargo, no se detectó TFD en los sobrenadantes, ni siquiera tras concentrarlos 10 veces mediante evaporación o liofilización, lo que *a priori* conduciría a pensar que el 100 % del TFD se encontraba atrapado en las NCs. No obstante, hay que tener en cuenta que los métodos de análisis indirectos pueden dar lugar a una sobreestimación de la carga de TFD, por ejemplo, si el TFD no se detecta porque se ha degradado o desnaturalizado o por falta de sensibilidad de la técnica de detección.

Por ello, finalmente se aplicó un método directo para cuantificar el TFD que se encontraba realmente atrapado en las NCs mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con GelRed® y posterior cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las bandas analizando la intensidad de los píxeles de la imagen del gel con el software ImageJ (Figura 2). De entre todos los métodos explorados, este era el que mejor resultado proporcionaba debido a las características de este tipo de nanotransportador. Aun así, los métodos de cuantificación basados en electroforesis seguida de análisis de imagen tienen algunas limitaciones en su reproducibilidad y precisión [29], por lo que los resultados obtenidos mediante el método desarrollado deben considerarse una estimación. Las NCs con el TFD atrapado (TFD-NCs) fueron cargadas en el gel a una dilución adecuada sin tratamiento previo y se llevó a cabo la electroforesis para separar el TFD de las NCs. El pH alcalino del tampón de electroforesis (pH 8.5) en este caso favorece la desprotonación de los grupos amino del quitosano y, por lo tanto, la liberación del oligonucleótido atrapado, debido a la disminución de las fuerzas electrostáticas que lo retienen [30]. La Figura 2 muestra imágenes obtenidas en un transiluminador de los geles de agarosa, tras la electroforesis, para la cuantificación del TFD.



**Figura 2.** Cuantificación del TFD atrapado en las NCs de quitosano (TFD-NCs) mediante electroforesis en gel de agarosa. A) Adición de 50 µg TFD. 1, NCs vacías; 2-7, calibrado de TFD libre; 8, nada; 9-12, TFD-NCs diluidas 1:2; 13, filtrado de TFD-NCs. B) Adición de 100 µg TFD. 1-4, calibrado de TFD libre; 5-6, NCs vacías; 7-9, TFD-NCs diluidas 1:5; 10-12, TFD-NCs diluidas 1:10; 13, filtrado de TFD-NCs. C) Adición de 200 µg TFD. 1, NCs vacías; 2-7, calibrado de TFD libre; 8-11, TFD-NCs diluidas 1:8; 12, filtrado de TFD-NCs.

El TFD libre se cargó también en el gel para obtener la banda de referencia. Con el fin de obtener una curva de calibrado para interpolar la intensidad de fluorescencia de la banda de TFD, se incluyeron varias cantidades de TFD libre en cada gel. La obtención de esta recta de calibrado en cada gel permitió mejorar la precisión de la cuantificación, en comparación con el método utilizado en algunas publicaciones donde únicamente se carga una cantidad de TFD libre que se toma como 100 % [9,31].

En los carriles correspondiente a las NCs cargadas con TFD aparece una banda a la altura del TFD, lo que significa que el TFD atrapado ha sido liberado de las NCs.

La idoneidad de este método para este tipo de nanotransportador se basa en la evidencia de que se logró una separación adecuada entre el TFD y las NCs. La ligera fluorescencia residual detectada en los pocillos correspondía a las NCs, que quedaron retenidas allí debido a su tamaño y no migraron a través de los poros del gel. Para confirmar que todo el TFD había migrado a través del gel y no estaba parcialmente retenido por las NCs en los pocillos, se utilizaron como control negativo NCs vacías a la misma concentración que las cargadas de TFD. De esta forma, se podía comparar directamente la intensidad de fluorescencia residual en los pocillos con TFD-NCs con la

del pocillo de NCs vacías. Una mayor intensidad de los pocillos con TFD-NCs hubiera indicado que algunas moléculas de TFD no habrían conseguido liberarse de las NCs y que se habrían quedado retenidas en el pocillo. Sin embargo, las TFD-NCs y las NCs vacías mostraron una intensidad de fluorescencia similar en los pocillos, demostrando que esta fluorescencia estaba relacionada únicamente con el nanotransportador y no con el TFD. Esto permitió concluir que todo el TFD había sido liberado durante la electroforesis y no se estaba subestimando su cuantificación o, al menos, que si quedaba cierta cantidad de TFD retenida en los pocillos junto a las NCs ésta podía considerarse despreciable.

Como control para verificar que el TFD estaba retenido establemente en las NCs y sólo era liberado durante la electroforesis, también se cargó en el gel una suspensión de las TFD-NCs (en su medio acuoso inicial) filtrada con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  capaz de retener las NCs y dejar pasar sólo las posibles moléculas de TFD que estuvieran libres. La ausencia de banda correspondiente al TFD libre en este control confirmó que todas las moléculas de TFD en la muestra estaban asociadas al nanotransportador y no existían como moléculas libres en la suspensión, corroborando la estabilidad de la carga de TFD en las NCs.

Dado que estas NCs de quitosano han sido concebidas como nanotransportadores de fármacos, la eficiencia de encapsulación (EE, porcentaje de fármaco atrapado respecto a la cantidad inicialmente añadida) y la carga final de fármaco (DL, porcentaje de fármaco encapsulado respecto al peso del material final obtenido) son factores importantes que deben optimizarse en vistas a la aplicación biomédica de los nanotransportadores desarrollados [32]. De hecho, estos factores se utilizan frecuentemente para evaluar la calidad, utilidad y efectividad de los nanotransportadores [33]. Un alto valor de EE es importante para que el proceso de fabricación sea rentable, mientras que un alto valor de DL permite transportar una mayor cantidad de fármaco utilizando una menor cantidad de nanotransportador, y así alcanzar más fácilmente las concentraciones terapéuticas disminuyendo los posibles efectos tóxicos del nanotransportador.

La EE y el DL fueron optimizados aumentando la cantidad de TFD inicialmente añadida a la síntesis (Figura 2 y Figura 3). Los valores numéricos de la EE y el DL se detallan en la Tabla 1, así como los valores de potencial zeta de las TFD-NCs obtenidas.

**Tabla 1. Caracterización físico-química de las TFD-NCs obtenidos al añadir 50, 100 o 200  $\mu\text{g}$  de TFD. Los errores de la tabla corresponden a la desviación estándar de varios pocillos del gel cargados con la misma muestra, en el caso de la eficiencia de encapsulación (EE) y la carga de TFD (DL), o a la desviación estándar de varias medidas (runs), en el caso del potencial zeta.**

TFD inicial, $\mu\text{g}$	EE, %	DL, %	Potencial zeta, mV
50	42 $\pm$ 4	0.071 $\pm$ 0.007	+17.5 $\pm$ 0.3
100	44 $\pm$ 5	0.138 $\pm$ 0.016	-11.3 $\pm$ 0.9
200	24 $\pm$ 6	0.190 $\pm$ 0.049	-16.1 $\pm$ 1.4

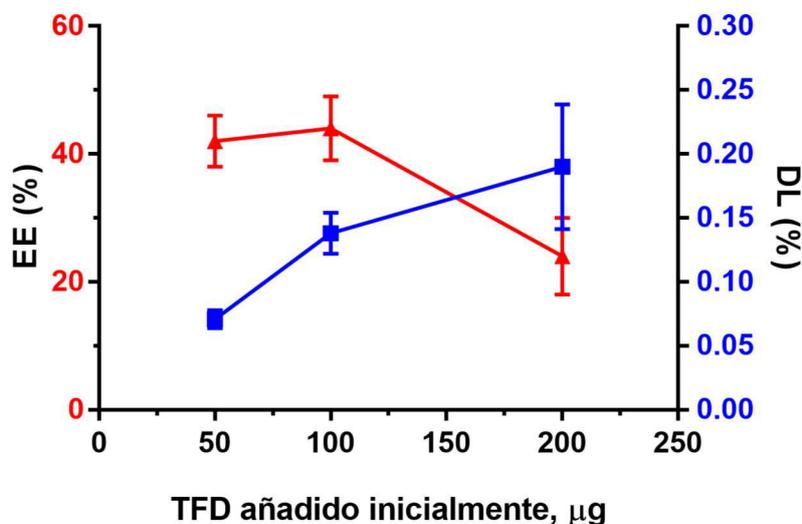


Figura 3. Eficiencia de encapsulación (EE) y carga de TFD (DL) obtenidos al añadir 50, 100 o 200 µg de TFD durante la síntesis de las NCs. Los datos representados corresponden a la media y desviación estándar de las muestras cargadas por cuadruplicado en el gel.

La Tabla 1 muestra los datos de caracterización de las NCs obtenidas tras la adición de 50, 100 o 200 µg de TFD y en la Figura 3 se representa la variación de EE y DL en función de la cantidad inicial añadida de TFD. La adición de 50 µg de TFD dio como resultado un DL del 0.071 % y una EE del 42 %. Al duplicar la cantidad de TFD a 100 µg, el DL se duplicó mientras que la EE fue similar. Sin embargo, al continuar duplicando la cantidad de TFD a 200 µg, el DL estuvo lejos de ser duplicado y la EE disminuyó.

La variación obtenida en el potencial zeta concuerda con la del DL, mostrando una pronunciada disminución al pasar de 50 a 100 µg de TFD y una menor disminución al pasar de 100 a 200 µg. Esto podría significar que al añadir 200 µg de TFD a la síntesis se estaba alcanzando la saturación del sistema y el nanotransportador no era capaz de atrapar tal cantidad de TFD tan eficientemente. En vista de estos resultados, las NCs sintetizadas mediante la adición de 100 µg TFD fueron elegidas como las mejores candidatas para los estudios adicionales de este capítulo, ya que presentaron un alto valor de DL sin comprometer la EE.

### 2.3. Estabilidad de las NCs cargadas con TFD en medios biológicos

Tras la síntesis de las nanocápsulas cargadas de TFD y antes de la evaluación de su actividad antibacteriana, sus propiedades físico-químicas se caracterizaron analizando su diámetro hidrodinámico, polidispersidad y potencial zeta al ser incubadas en diferentes medios biológicos durante un período de 72 h. El objetivo era predecir el comportamiento de las TFD-NCs en condiciones fisiológicas, ya que es bien sabido que las propiedades físico-químicas de las nanopartículas pueden dictar las interacciones y

respuestas biológicas [34]. Por ejemplo, la agregación de las nanopartículas puede alterar su toxicidad e internalización en las células bacterianas, ya que afecta al número de partículas libres en suspensión y a la superficie total disponible para interactuar con las células [35].

Para el estudio de la estabilidad de las TFD-NCs se utilizaron tres medios diferentes: agua MilliQ, tampón fosfato salino (PBS) y medio de cultivo Mueller Hinton II (MHII). Se eligió el agua como control por ser el medio de almacenamiento de las NCs de quitosano. El PBS es una solución salina tamponada isotónica comúnmente utilizada para la inyección intravenosa. El MHII es el medio que se ha utilizado para realizar los ensayos de susceptibilidad al TFD y a antibióticos con cepas de *Staphylococcus aureus*.

Los datos referentes al tamaño de las TFD-NCs en función del tiempo de incubación en diferentes medios se muestran en la Figura 4.

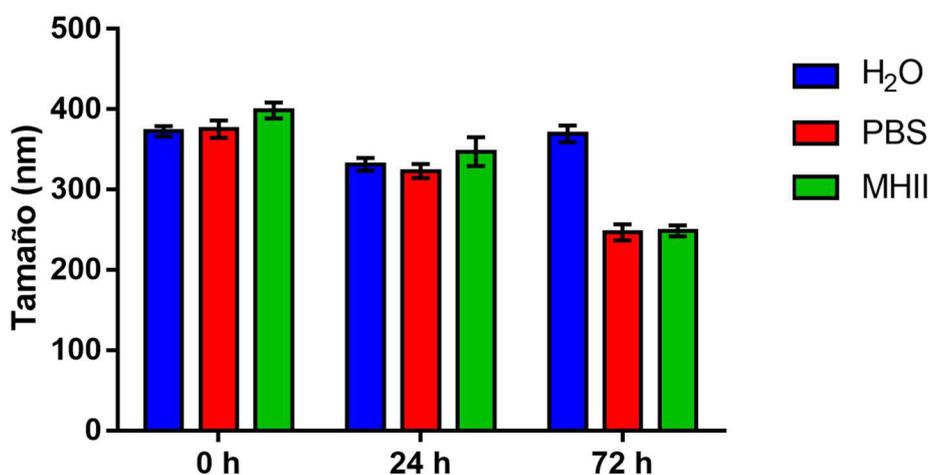


Figura 4. Tamaño de las NCs cargadas con TFD (TFD-NCs) en diferentes medios. Las TFD-NCs fueron incubadas en agua, PBS y medio de cultivo MHII durante 0, 24 o 72 h y su diámetro hidrodinámico medio fue determinado mediante DLS.

Las TFD-NCs a tiempo cero en agua presentaban un diámetro hidrodinámico medio de 372.5 nm y éste no cambió de forma relevante al poner las NCs en contacto con PBS o MHII. Después de 72 h, las TFD-NCs en agua mantenían un diámetro medio similar, demostrando la elevada estabilidad coloidal en este medio, pero las TFD-NCs incubadas en PBS y MHII mostraron una marcada disminución de su tamaño, con diámetros medios de 250 nm. Esta disminución podría ser debida a un efecto de estabilización causado por los componentes del medio, que consistiría en cierta desagregación tras la interacción con iones y proteínas y que conduciría a una disminución general del diámetro hidrodinámico medio. Rohiwal y colaboradores también observaron disminuciones en el tamaño de sus nanopartículas de BSA en medio salino y medio de cultivo y las relacionaron con una disminución de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre las nanopartículas y con procesos de adsorción y desorción de los componentes

del medio [36]. Además, en otros trabajos demostraron que la adición de proteínas al medio de cultivo disminuía la agregación debido a la repulsión electrostática que se generaba entre las nanopartículas al adsorberse las proteínas sobre su superficie [34,35]. La estabilidad de las TFD-NCs después de los tiempos de incubación evaluados resultó ser adecuada para la realización de los ensayos de actividad antibacteriana, donde el tiempo de incubación en el medio de cultivo bacteriano es de 20 h.

Al examinar los cambios en el potencial zeta, los resultados evidenciaron un comportamiento distinto en agua y en los medios biológicos (Figura 5).

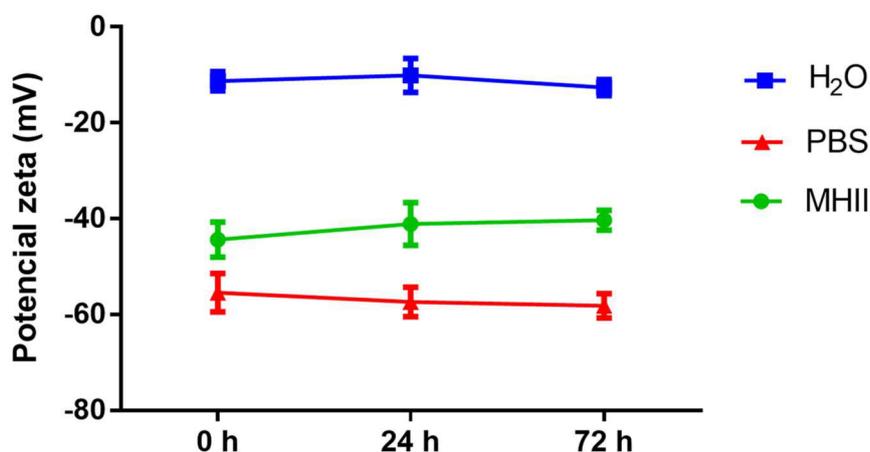


Figura 5. Análisis del potencial zeta de las NCs cargadas con TFD (TFD-NCs) tras ser incubadas en agua, PBS y medio de cultivo MHII durante 0, 24 o 72 h.

Concretamente, las nanocápsulas dispersas en agua presentaron un potencial zeta ligeramente negativo (alrededor de -10 mV) durante la incubación de 72 horas, mientras que el potencial zeta de las nanocápsulas en los medios biológicos se encontraba en torno a -40 mV en MHII y -60 mV en PBS. El mayor pH de los medios fisiológicos (pH 7.4) favorece la desprotonación de los grupos amino del quitosano ( $pK_a$  6-6.5) [37], lo que influye en la disminución del potencial zeta. Este cambio en el valor del potencial zeta va también acorde con la elevada fuerza iónica de los medios biológicos probados en comparación con el agua. Cuando las nanopartículas se añaden a un medio complejo, el potencial zeta está influido no sólo por la carga de la superficie de la partícula, sino también por el medio que la rodea [34]. Algunos iones y proteínas presentes en estos medios, como los iones fosfato del PBS, podrían estar interactuando con la superficie de las NCs, dando lugar a un potencial zeta más negativo que el observado en agua. El potencial zeta permaneció estable durante las 72 horas de incubación en los tres medios.

En conjunto, estos resultados confirmaron la interacción de los componentes de los medios biológicos con la superficie de las NCs, lo que ocasiona un impacto importante en el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas. El efecto de esta interacción

fue inmediato e invariable en el tiempo en el caso del potencial zeta, mientras que el tamaño mostró una disminución dependiente del tiempo de incubación tanto en PBS como en medio de cultivo.

#### 2.4. Actividad *in vitro* de las TFD-NCs contra *S. aureus*

Los ensayos con bacterias fueron llevados a cabo por la Dra. Ainhoa Lucía Quintana en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza, como parte de una colaboración con el grupo de José Antonio Aínsa Claver dentro del proyecto europeo NAREB. La doctoranda aprendió a realizar los ensayos de susceptibilidad a fármacos junto a la Dra. Ainhoa Lucía Quintana.

Para determinar la capacidad antimicrobiana de las TFD-NCs, se utilizó la cepa de *S. aureus* sensible a la meticilina de referencia CECT794, indicada en la guía CLSI como estándar para ensayos de susceptibilidad a fármacos.

Las bacterias fueron incubadas con las NCs cargadas de TFD y con TFD libre durante 24 h a concentraciones de TFD de 0.5-250 nM y se analizaron los cambios en su crecimiento tras la adición de resazurina. La resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) tiene color azul, pero pasa a ser rosa cuando se reduce a resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) durante la respiración aeróbica de células metabólicamente activas, por lo que es comúnmente utilizada como indicador de viabilidad celular en ensayos microbiológicos. Los resultados se analizaron cualitativamente de forma visual, monitorizando un cambio de color de azul a rosa cuando había crecimiento bacteriano. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se consideró como la concentración más baja de antimicrobiano capaz de prevenir el crecimiento (y como resultado el cambio de color).

En primer lugar, se determinó la MIC de 4 lotes de NCs vacías (>1 mg/mL) y la concentración de nanotransportador en los posteriores ensayos con las TFD-NCs se mantuvo por debajo de este límite, ya que de lo contrario el efecto antibacteriano no sería específico del TFD.

Las TFD-NCs no provocaron ninguna alteración en el crecimiento de las bacterias a ninguna de las concentraciones testadas, pero hay que remarcar que el TFD libre tampoco mostró actividad antimicrobiana por sí solo, a diferencia de otros inhibidores de WalR descritos en literatura [16]. Es posible que el TFD estuviera ejerciendo su actividad biológica pero que ésta fuera insuficiente para eliminar las bacterias por sí sola, quizás porque no consigue secuestrar de forma eficaz al factor de transcripción WalR o porque la bacteria encuentra un mecanismo biológico alternativo para suplir la inactividad de WalR. No obstante, aunque este TFD no provocara la muerte directa de las bacterias sí que podía estar debilitando su pared celular, y esta hipótesis podía ser demostrada y aprovechada combinando la acción del TFD con la de un antibiótico que

también atacara la pared celular, como la vancomicina, para evaluar si el TFD era capaz de mejorar la eficacia del antibiótico mediante un efecto sinérgico.

Aprobada por primera vez en 1958 por la FDA, la vancomicina es un antibiótico eficaz contra las infecciones bacterianas Gram-positivas a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana [38]. Aunque la vancomicina se ha utilizado durante más de 60 años, sigue siendo el tratamiento estándar para las infecciones causadas por MRSA, con los peligros obvios que conlleva esta excesiva dependencia y que ahora se están haciendo evidentes [39]. Concretamente, se han publicado informes describiendo fallos clínicos durante el tratamiento con vancomicina debido a la aparición de cepas de *S. aureus* con menor susceptibilidad a la vancomicina [40–43]. La combinación de TFD con vancomicina podría ser una estrategia prometedora para incrementar la susceptibilidad de *S. aureus* a este antibiótico.

Se probaron simultáneamente el TFD (incorporado en las NCs o libre) y la vancomicina en un ensayo de sinergia y se estudiaron los cambios en la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la vancomicina. Como control se incluyeron también NCs vacías a la misma concentración de nanotransportador que en las TFD-NCs para comprobar que el nanotransportador no provocara toxicidad en las bacterias. Los primeros ensayos de sinergia se realizaron utilizando la metodología de microdilución por tablero de ajedrez (*Checkerboard*), y después se seleccionaron dos concentraciones representativas de TFD para el resto de experimentos: 125 nM y 8 nM. Esto permitió usar un número reducido de muestras y, en consecuencia, disminuir el gasto de TFDs. Estas dos concentraciones de TFD-NCs se probaron en combinación con diluciones seriadas de vancomicina de 2.5 a 0.16 µg/mL. Desafortunadamente, el valor MIC de la vancomicina se mantuvo constante en todos los casos (0.6 µg/mL), indicando que no se estaba produciendo el efecto de sinergia esperado, ni con el TFD libre ni con el TFD cargado en el nanotransportador.

Aunque es una tecnología prometedora, la terapia basada en oligonucleótidos como los TFDs todavía se enfrenta a obstáculos importantes como la baja eficacia [26]. De hecho, la eficacia demostrada en modelos *in vitro* e *in vivo* requiere de concentraciones relativamente altas y repetidas dosis, lo que dificulta su aplicación clínica [24,44]. Como reportan Hecker y colaboradores, los dos únicos sistemas terapéuticos basados en TFD que han llegado en la última década a la fase 3 de ensayos clínicos han fracasado debido a la falta de eficacia clínica [10]. En nuestro caso, es posible que la falta de eficacia se debiera a que las concentraciones de TFD alcanzadas no fueran suficientes para demostrar su efecto antimicrobiano.

### 3. CONCLUSIONES

En este capítulo las NCs de quitosano han sido cargadas con TFD mediante su incorporación en la cubierta de quitosano. Se ha desarrollado un método para cuantificar la cantidad de TFD incorporada al nanotransportador, que incluye la

verificación de que el TFD es retenido de forma estable por las NCs. Aumentando la cantidad de TFD añadida inicialmente a la síntesis se ha optimizado la carga de TFD hasta alcanzar la saturación del nanotransportador, con el fin de maximizar su efecto terapéutico. El análisis de las propiedades físico-químicas de las TFD-NCs incubadas en medios biológicos reveló que la interacción con los componentes del medio produce un impacto importante en la superficie de las NCs, pero su estabilidad coloidal demostró ser satisfactoria para efectuar los ensayos de actividad antibacteriana.

Desafortunadamente, ni el TFD libre ni las TFD-NCs lograron inhibir el crecimiento de bacterias *S. aureus*, ni tampoco mejoraron la eficacia de la vancomicina mediante un efecto sinérgico. Teniendo en cuenta que la baja eficacia es una de las principales limitaciones de la terapia basada en oligonucleótidos, posiblemente la ausencia de actividad antimicrobiana del TFD se deba a que las concentraciones alcanzadas son insuficientes para lograr una eficacia adecuada.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

Los materiales utilizados en este capítulo para la síntesis de las NCs fueron descritos previamente en el capítulo 2. La agarosa y el tampón fosfato salino (PBS) se adquirieron en Lonza. El tampón TBE UltraPure™ 10X se compró a Invitrogen y la resazurina (resazurin sodium salt) a Sigma. El intercalante GelRed® (Gelred Nucleic Acid Gel Stain, 10000X) fue adquirido en Biotium.

El TFD WalR fue fabricado y purificado por HPLC en AxoLabs (Kulmbach). Con un peso molecular de 12902 Da, consiste en 40 nucleótidos formando la siguiente secuencia: 5'-TGTAATGACAATGTAATGTTTTTCATTACATTGTCATTACA-3'. Contiene los dos hexámeros TGTAAT separados por cinco nucleótidos, secuencia que es específica de los sitios de unión del factor de transcripción WalR al promotor *lytM* de *S. aureus* [15]. Al tratarse de una secuencia palindrómica, ésta se pliega para formar una horquilla de doble hebra con un bucle o "loop". Los nucleótidos fueron resuspendidos en agua MilliQ a una concentración de trabajo de 1 mg/mL.

### 4.2. Nanocápsulas de quitosano cargadas de TFD

Para la preparación de las nanocápsulas de quitosano, se siguió el procedimiento general descrito en detalle en el capítulo 2, el cual se basa en la formación de un núcleo de nanoemulsión recubierto por una capa de quitosano. El TFD fue atrapado en el recubrimiento de quitosano durante el proceso de formación de las NCs.

El primer paso de la síntesis de nanocápsulas es idéntico al procedimiento general (capítulo 2). Después de la formación de la nanoemulsión, a esta se añadieron 0.5 mL de una solución de quitosano 5 mg/mL, que contenía la cantidad deseada de TFD (50, 100 o 200 µg de la solución de TFD a 1 mg/mL). La mezcla se dejó 15 minutos más bajo

agitación y finalmente fue añadida sobre 15 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM para la gelificación ionotrópica del recubrimiento polimérico. Como en el caso de las nanocápsulas sin TFD, el sólido fue separado por ultracentrifugación (30 min, 69673 G, 10 °C), lavado con 10 mL de agua MilliQ, centrifugado nuevamente y resuspendido en agua. La concentración de las nanocápsulas en suspensión acuosa se determinó midiendo el peso de la muestra tras ser liofilizada.

Las nanocápsulas estériles fueron preparadas en una campana de flujo laminar vertical y todos los reactivos y materiales utilizados habían sido previamente esterilizados mediante irradiación UV, lavado con etanol al 70 %, filtración a través de filtros PVDF de 0.22 µm (Millex® Millipore®) o tratamiento térmico en seco (180 °C).

### 4.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación y carga de TFD

La eficiencia de encapsulación (EE) se entiende aquí como el porcentaje de TFD atrapado respecto a la cantidad añadida inicialmente para la preparación de los nanotransportadores. La carga de fármaco (DL) se entiende como el porcentaje de la relación entre el peso de TFD atrapado por peso del nanotransportador.

Para determinar la EE y el DL se realizaron pruebas iniciales utilizando columnas illustra™ NAP™ Columns, NAP-5 (GE Healthcare) para purificar el TFD, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Las muestras se analizaron mediante espectrometría de fluorescencia añadiendo el intercalante Acridine Orange Hydrochloride hydrate (Sigma) a una concentración final de 0.05 µg/mL.

El método seleccionado definitivamente para cuantificar la EE y el DL fue la electroforesis en gel de agarosa con tinción de GelRed® y posterior estimación de la intensidad de la fluorescencia. Las muestras se cargaron en el gel a una dilución adecuada después de mezclarlas con el tampón de carga glicerol:TBE 25 % en una proporción de volumen de 10:3 (muestra:tampón de carga). Con el fin de obtener una curva de calibrado para interpolar la intensidad de la fluorescencia de la banda de TFD, se incluyeron varias cantidades de TFD libre en cada gel. Además, como controles se cargaron NCs vacías a la misma concentración que las TFD-NCs y también la solución recogida tras filtrar las nanocápsulas cargadas de TFD con una unidad de filtración Millex-GV (membrana de PVDF, poro de 0.22 µm y diámetro de 13 mm) para separar las posibles moléculas de TFD libre de las NCs retenidas en el filtro. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 min a 90 V utilizando geles de agarosa al 1 % y tampón TBE 0.5X pH 8.5. Después se adquirió una imagen del gel utilizando un transiluminador Gene Genius Bio Imaging System (Syngene) y con el software ImageJ se midió la intensidad de la fluorescencia de la banda de TFD que migró a través del gel.

#### 4.4. Estabilidad de las NCs cargadas con TFD en medios biológicos

La caracterización del material obtenido se realizó mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) con un instrumento DLS Brookhaven 90Plus a una concentración de nanocápsulas de 0.15 mg/mL. El análisis del potencial zeta se llevó a cabo utilizando un analizador Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation). En este caso se midieron nanocápsulas a una concentración de 5 µg/mL en KCl 1mM.

La estabilidad de las nanocápsulas cargadas de TFD frente a la agregación en diferentes medios de interés biológico fue determinada mediante análisis de DLS y potencial zeta como se acaba de explicar. Las NCs cargadas con TFD se incubaron previamente a 2 mg/mL y 37 °C en tampón fosfato salino (PBS), medio de cultivo de bacterias Mueller-Hinton II (MHII) y agua pura para la comparación. Se midieron en términos de tamaño (DLS) y potencial zeta inmediatamente después de entrar en contacto con el medio y después de 24 y 72 h de incubación.

#### 4.5. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* CECT-794 (*S. aureus* sensible a la meticilina, ATCC 29213) fue comprada a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y conservada en caldo de soja de tripticasa BBL en stocks de glicerol al 15-17 % a -80 °C. Para cada experimento, las bacterias se transfirieron desde el caldo congelado a una placa de Agar Columbia con 5 % de sangre de oveja (BD), incubada durante la noche, y una colonia de esa placa fue transferida a 5 mL de caldo de soja de tripticasa BBL, luego incubada 20 h a 37 °C y utilizado como pre-inóculo para los experimentos.

Los ensayos MIC se realizaron con caldo BBL Mueller Hinton II con ajuste de cationes según lo recomendado por los estándares CLSI para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

#### 4.6. Actividad *in vitro* de las TFD-NCs y la vancomicina contra *S. aureus*

Los efectos antimicrobianos de la vancomicina y las TFD-NCs se probaron por separado y en combinación mediante un ensayo en placa de 96 pocillos como el descrito anteriormente por Palomino et al. y Ramon-García et al. [45,46]. La prueba de sinergia en tablero de ajedrez (Checkerboard) se utilizó para estudiar la interacción entre la vancomicina y las TFD-NCs contra *S. aureus*. Brevemente, antes de la adición de las bacterias, se pipetearon diluciones seriadas de vancomicina en los pocillos a lo largo del eje vertical y diluciones seriadas de TFD-NCs en los pocillos a lo largo del eje horizontal. Esto permitió testar el efecto antimicrobiano de la vancomicina y las TFD-NCs tanto separadas como combinadas. Concretamente, las TFD-NCs se probaron utilizando concentraciones de vancomicina entre 2.5 µg/mL y 0.04 µg/mL frente a concentraciones de TFD de 250-0.5 nM. Las bacterias se añadieron a una concentración final de 10<sup>5</sup> ufc/mL, y las placas se incubaron durante 20 h a 37 °C. En este punto, la inhibición

bacteriana fue evaluada usando resazurina y registrando un cambio en el color de azul (sin crecimiento) a rosa (crecimiento bacteriano). La concentración más baja de antimicrobiano capaz de prevenir el crecimiento (y como resultado el cambio de color) se registró como la MIC.

Después de los ensayos de sinergia en tableros de ajedrez, se seleccionaron dos concentraciones representativas de TFD para el resto de experimentos: 125 nM y 8 nM. Estas dos concentraciones de TFD-NCs se probaron en combinación con diluciones seriadas de vancomicina de 2.5 a 0.16 µg/mL. Cada una de estas concentraciones se testó por duplicado en 6 experimentos independientes.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al grupo de investigación del Prof. José Antonio Aínsa Claver del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza, y especialmente a la Dra. Ainhoa Lucía Quintana, por el estudio de actividad *in vitro* de las TFD-NCs en *S. aureus*.

## 6. REFERENCIAS

1. Lowe, J. Chapter 13. Mechanisms of Antibiotic Resistance. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; 1982; Vol. 17, pp. 119–127.
2. Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66.
3. Hendriksen, R.S.; Munk, P.; Njage, P.; van Bunnik, B.; McNally, L.; Lukjancenko, O.; Röder, T.; Nieuwenhuijse, D.; Pedersen, S.K.; Kjeldgaard, J.; et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1124.
4. Ghosh, C.; Sarkar, P.; Issa, R.; Haldar, J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 323–338.
5. Czaplowski, L.; Bax, R.; Clokie, M.; Dawson, M.; Fairhead, H.; Fischetti, V.A.; Foster, S.; Gilmore, B.F.; Hancock, R.E.W.; Harper, D.; et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 239–251.
6. Sridharan, K.; Gogtay, N.J. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *82*, 659–672.
7. Castanotto, D.; Stein, C.A. Antisense oligonucleotides in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2014**, *26*, 584–589.
8. Xue, X.-Y.; Mao, X.-G.; Zhou, Y.; Chen, Z.; Hu, Y.; Hou, Z.; Li, M.-K.; Meng, J.-R.; Luo, X.-X. Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2018**, *14*, 745–758.

9. Marín-Menéndez, A.; Montis, C.; Díaz-Calvo, T.; Carta, D.; Hatzixanthis, K.; Morris, C.J.; McArthur, M.; Berti, D. Antimicrobial Nanoplexes meet Model Bacterial Membranes: the key role of Cardiolipin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13.
10. Hecker, M.; Wagner, A.H. Transcription factor decoy technology: A therapeutic update. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *144*, 29–34.
11. Hibbitts, A.; O’Leary, C. Emerging nanomedicine therapies to counter the rise of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*, 1–33.
12. Hibbitts, A.; Lucía, A.; Serrano-Sevilla, I.; De Matteis, L.; McArthur, M.; de la Fuente, J.M.; Aínsa, J.A.; Navarro, F. Co-delivery of free vancomycin and transcription factor decoy-nanostructured lipid carriers can enhance inhibition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One* **2019**, *14*, e0220684.
13. Mamusa, M.; Resta, C.; Barbero, F.; Carta, D.; Codoni, D.; Hatzixanthis, K.; McArthur, M.; Berti, D. Interaction between a cationic bolaamphiphile and DNA: The route towards nanovectors for oligonucleotide antimicrobials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *143*, 139–147.
14. Mann, M.J.; Dzau, V.J. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 1071–1075.
15. Dubrac, S.; Boneca, I.G.; Poupel, O.; Msadek, T. New Insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) Essential Signal Transduction Pathway Reveal a Major Role in Controlling Cell Wall Metabolism and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8257–8269.
16. Gotoh, Y.; Doi, A.; Furuta, E.; Dubrac, S.; Ishizaki, Y.; Okada, M.; Igarashi, M.; Misawa, N.; Yoshikawa, H.; Okajima, T.; et al. Novel antibacterial compounds specifically targeting the essential WalR response regulator. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2010**, *63*, 127–134.
17. Howden, B.P.; McEvoy, C.R.E.; Allen, D.L.; Chua, K.; Gao, W.; Harrison, P.F.; Bell, J.; Coombs, G.; Bennett-Wood, V.; Porter, J.L.; et al. Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalKR. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002359.
18. Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 520–532.
19. Uematsu, H.; Yamashita, K.; Kunisawa, S.; Fushimi, K.; Imanaka, Y. The economic burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-onset pneumonia inpatients. *Am. J. Infect. Control* **2016**, *44*, 1628–1633.
20. Shenoy, E.S.; Paras, M.L.; Noubary, F.; Walensky, R.P.; Hooper, D.C. Natural history of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus*(VRE): a systematic review. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 177.
21. Dulon, M.; Haamann, F.; Peters, C.; Schablon, A.; Nienhaus, A. MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. *BMC Infect. Dis.* **2011**, *11*, 138.
22. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed Available online: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

(accessed on Aug 14, 2019).

23. Vergara, M. Study of the role of LPXTG proteins, wall teichoic acids and the global regulator Rot in the biofilm formation process of *Staphylococcus aureus*, Universidad Pública de Navarra, 2009.
24. González-Paredes, A.; Sitia, L.; Ruyra, A.; Morris, C.J.; Wheeler, G.N.; McArthur, M.; Gasco, P. Solid lipid nanoparticles for the delivery of anti-microbial oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *134*, 166–177.
25. De Matteis, L.; Alleva, M.; Serrano-Sevilla, I.; García-Embid, S.; Stepien, G.; Moros, M.; de la Fuente, J. Controlling Properties and Cytotoxicity of Chitosan Nanocapsules by Chemical Grafting. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 175.
26. Marín-Menéndez, A.; Montis, C.; Díaz-Calvo, T.; Carta, D.; Hatzixanthis, K.; Morris, C.J.; McArthur, M.; Berti, D. Antimicrobial Nanoplexes meet Model Bacterial Membranes: the key role of Cardiopilin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41242.
27. Blatter Choosing the Right Method for Nucleic Acid Quantitation Available online: <https://www.promega.es/resources/pubhub/choosing-the-right-method-for-nucleic-acid-quantitation/> (accessed on Nov 26, 2019).
28. Nucleic Acid Electrophoresis Education | Thermo Fisher Scientific - MY Available online: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/na-electrophoresis-education/na-electrophoresis-applications.html#quantitation> (accessed on Nov 26, 2019).
29. Abdallah, C.; Dumas-Gaudot, E.; Renaut, J.; Sergeant, K. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. *Int. J. Plant Genomics* **2012**, *2012*, 1–17.
30. Buschmann, M.D.; Merzouki, A.; Lavertu, M.; Thibault, M.; Jean, M.; Darras, V. Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1234–1270.
31. González-Paredes, A.; Sitia, L.; Ruyra, A.; Morris, C.J.; Wheeler, G.N.; McArthur, M.; Gasco, P. Solid lipid nanoparticles for the delivery of anti-microbial oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *134*, 166–177.
32. Kowalczyk, A.; Trzcinska, R.; Trzebicka, B.; Müller, A.H.E.; Dworak, A.; Tsvetanov, C.B. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 43–86.
33. Szczepanowicz, K.; Bazylińska, U.; Pietkiewicz, J.; Szyk-Warszyńska, L.; Wilk, K.A.; Warszyński, P. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 678–691.
34. Moore, T.L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6287–6305.
35. Cohen, J.; DeLoid, G.; Pyrgiotakis, G.; Demokritou, P. Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry.

*Nanotoxicology* **2013**, 7, 417–431.

36. Rohiwal, S.S.; Tiwari, A.P.; Verma, G.; Pawar, S.H. Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanoparticles for ex vivo colloidal stability in biological media. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, 480, 28–37.
37. Chiappisi, L.; Gradzielski, M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, 220, 92–107.
38. Watanakunakorn, C. Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, 14, 7–18.
39. Camarena, J.; Sánchez, R. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. *Dep. Microbiol. Hosp. Univ. Dr. Peset. Val.* **1999**, 1–4.
40. Melo-Cristino, J.; Resina, C.; Manuel, V.; Lito, L.; Ramirez, M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet* **2013**, 382, 205.
41. Chang, S.; Sievert, D.M.; Hageman, J.C.; Boulton, M.L.; Tenover, F.C.; Downes, F.P.; Shah, S.; Rudrik, J.T.; Pupp, G.R.; Brown, W.J.; et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1342–1347.
42. Ward, P.B.; Johnson, P.D.; Grabsch, E.A.; Mayall, B.C.; Grayson, M.L. Treatment failure due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to vancomycin. *Med. J. Aust.* **2001**, 175, 480–3.
43. Al-Amery, K.; Elhariri, M.; Elsayed, A.; El-Moghazy, G.; Elhelw, R.; El-Mahallawy, H.; El Hariri, M.; Hamza, D. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from camel meat and slaughterhouse workers in Egypt. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, 8, 129.
44. Wardwell, P.R.; Forstner, M.B.; Bader, R.A. Investigation of the cytokine response to NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotide coated polysaccharide based nanoparticles in rheumatoid arthritis in vitro models. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, 17, 310.
45. Ramón-García, S.; Ng, C.; Anderson, H.; Chao, J.D.; Zheng, X.; Pfeifer, T.; Av-Gay, Y.; Roberge, M.; Thompson, C.J. Synergistic drug combinations for tuberculosis therapy identified by a novel high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 3861–3869.
46. Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 2720–2722.



# Transporte de siRNA en NCs y evaluación *in vitro* del silenciamiento génico y la localización intracelular

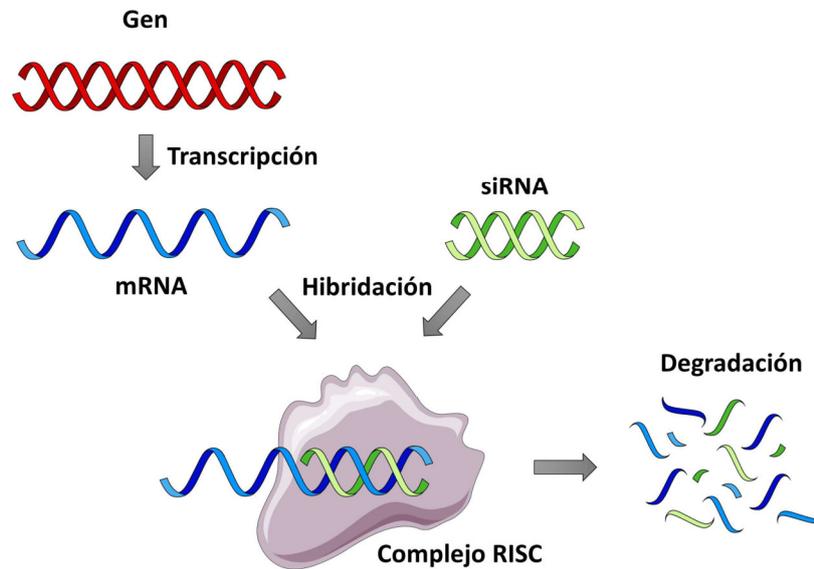
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Mecanismo y retos del RNA de interferencia para silenciamiento génico

La interferencia por RNA (RNAi) es un proceso biológico, altamente conservado desde el punto de vista evolutivo, que regula la expresión génica mediante el silenciamiento específico de genes a nivel postranscripcional, es decir, evitando la traducción a proteínas de sus transcritos de RNA mensajero (mRNA) gracias a la interferencia de RNA de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés). En 1998, Fire y Mello detectaron por primera vez una interferencia de RNA después de inyectar dsRNA exógeno en *Caenorhabditis elegans* [1]. Tres años más tarde, la tecnología RNAi se adaptó a las células de mamíferos [2]. Aunque la vía de interferencia del RNA puede ser desencadenada por diferentes dsRNA (microRNA (miRNA), RNA interferente pequeño (siRNA, conocido así por sus siglas en inglés), RNA en horquilla (shRNA) y RNA asociado a PIWI (piRNA)), la estructura más común utilizada en las formulaciones terapéuticas basadas en RNAi es el siRNA [3,4].

El siRNA es un dsRNA de aproximadamente 21-23 pares de bases de longitud, con 2 nucleótidos que sobresalen de forma característica en ambos extremos 3' y con una secuencia totalmente complementaria al mRNA diana [5]. El término siRNA en organismos superiores es ahora comúnmente reservado para el dsRNA sintetizado exógenamente [4]. Sin embargo, su origen puede ser endógeno (entonces denominado endo-siRNA) [6,7], cuando se sintetiza en el núcleo celular y posteriormente se transloca al citoplasma, o exógeno, cuando se sintetiza fuera de la célula diana y se introduce en el citoplasma [8,9]. Una vez en el citoplasma, el siRNA participa en la formación de un complejo multiproteico, el complejo silenciador inducido por el RNA (en inglés RISC, *RNA-induced silencing complex*), responsable de la degradación de la hebra pasajera (es

decir, la hebra sentido) y de la incorporación de la hebra guía (es decir, la hebra antisentido). Esta hebra es utilizada como guía para reconocer y cortar el mRNA complementario, impidiendo la síntesis de la proteína codificada para así silenciar selectivamente su expresión génica [10,11]. La Figura 1 ilustra el mecanismo del RNA de interferencia mediado por siRNA.



**Figura 1. Mecanismo del RNA de interferencia mediado por siRNA.**

Aparte de ser una tecnología útil para el estudio funcional de genes y proteínas, el siRNA sintético ha atraído mucha atención como herramienta terapéutica prometedora [12]. Puede diseñarse y adaptarse fácilmente para el silenciamiento eficaz y específico de, teóricamente, cualquier gen diana. La alta especificidad puede incluso permitir la selección de los alelos específicos de la enfermedad que difieren del alelo normal en sólo una o pocas sustituciones de nucleótidos. Muchas terapias basadas en siRNA están en desarrollo para el tratamiento de enfermedades que van desde infecciones virales hasta enfermedades genéticas y cáncer. [13]

Sin embargo, el éxito terapéutico de las formulaciones basadas en siRNA se ha visto obstaculizado por los retos que implica la administración *in vivo* de siRNA. El siRNA es rápidamente degradado por las nucleasas endógenas e induce la respuesta inmune innata. La modificación química de la estructura del siRNA ha resultado ser una posible estrategia para prevenir tanto la vulnerabilidad a las enzimas como la inmunogenicidad, así como para reducir los efectos inespecíficos [14]. No obstante, hay otros problemas que tales modificaciones no pueden resolver: la rápida eliminación por los riñones después de la administración sistémica, debido al tamaño relativamente pequeño del siRNA (comparado con el tamaño efectivo de los poros glomerulares), y la incapacidad del siRNA para cruzar la membrana celular hidrofóbica, debido a su hidrofiliidad, carga negativa y peso molecular demasiado alto. El desarrollo de sistemas de transporte

seguros y eficaces que puedan proteger el siRNA y facilitar su transporte al citoplasma de las células diana puede ser decisivo para obtener una aplicación más exitosa de las terapias basadas en el siRNA [15].

Un sistema de transporte ideal para la administración de siRNA debe reunir una serie de propiedades fundamentales. En primer lugar, debe ser capaz de unirse eficientemente al siRNA, para mantener su estabilidad en medios fisiológicos y para proporcionar protección contra la degradación enzimática. La asociación con un transportador también puede ayudar a evitar la eliminación del siRNA por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), antes llamado sistema retículo-endotelial (SRE), y a mejorar su internalización en las células. Finalmente, el complejo transportador-siRNA debería ser capaz de escapar de los endolisosomas al citosol y producir una liberación sostenida de siRNA sin causar toxicidad o activar el sistema inmunológico [16]. En la Figura 2 se resumen esquemáticamente los problemas relacionados con la administración *in vivo* de siRNA y las soluciones que puede proporcionar el uso de sistemas de transporte.

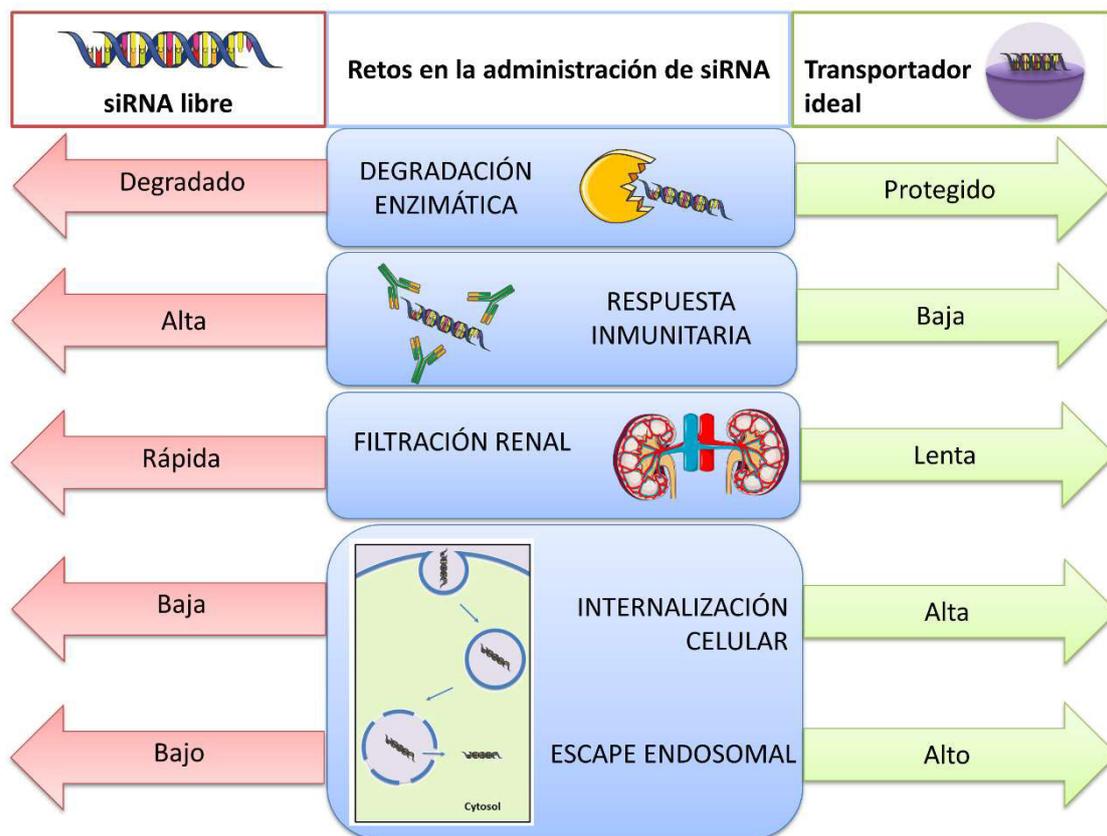


Figura 2. Problemas relacionados con la administración *in vivo* de siRNA y soluciones que puede proporcionar el uso de sistemas de transporte.

## 1.2. Nanotransportadores de siRNA basados en polisacáridos naturales: quitosano y xantano

Los recientes avances en la ciencia de los biomateriales y la nanotecnología han llevado al desarrollo de nanomateriales no virales como una alternativa atractiva para la administración de siRNA. Los sistemas de administración basados en la nanotecnología ofrecen ventajas únicas, como la protección contra la degradación prematura y la mejora de la interacción con el entorno biológico. También ofrecen la posibilidad de mejorar la absorción en un tejido seleccionado, extender el tiempo de retención del siRNA y mejorar la internalización celular [17].

Las aproximaciones nanotecnológicas para la administración de siRNA incluyen una amplia variedad de nanotransportadores con distinta composición, incluyendo los inorgánicos, lipídicos y poliméricos [18]. Entre los nanotransportadores basados en polímeros, los que se obtienen utilizando polisacáridos naturales son especialmente prometedores ya que se consideran altamente biocompatibles, no inmunogénicos y biodegradables [11,19].

La utilidad de los polisacáridos para producir nanotransportadores para la administración efectiva de siRNA depende en gran medida de sus propiedades. Al mismo tiempo, sus propiedades funcionales también pueden ser optimizadas mediante modificaciones químicas [19,20]. En cuanto a la carga electrostática, los polisacáridos naturales pueden ser neutros (por ejemplo, celulosa, pululano, almidón, dextrano), negativos (por ejemplo, xantano, ácido hialurónico, alginato, sulfato de condroitina, pectina) o positivos (por ejemplo, quitosano).

En este capítulo se han utilizado nanocápsulas basadas en dos polisacáridos naturales: quitosano y xantano. Además de las NCs recubiertas de quitosano que aparecen en los capítulos anteriores de esta tesis, en este capítulo se ha desarrollado una variante de NCs con una cubierta estabilizante de xantano en sustitución del quitosano. Estos dos polisacáridos presentan una carga electrostática diferente a pH fisiológico y esta propiedad de su estructura puede afectar en gran medida su uso para la administración de ácidos nucleicos. La Figura 3 representa las estructuras químicas del quitosano y del xantano.

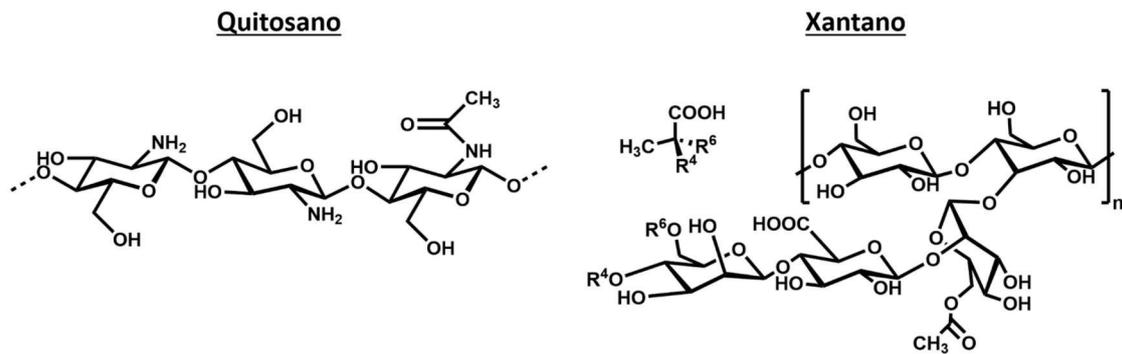


Figura 3. Estructuras químicas del quitosano y del xantano.

El hecho de ser un polisacárido natural con carga positiva ha llevado al uso extensivo del quitosano para la administración de ácidos nucleicos [21]. Una de sus principales ventajas es que su naturaleza catiónica mejora la interacción electrostática con el RNA cargado negativamente, favoreciendo la formación de policomplejos estables. En general, los nanotransportadores con carga positiva logran transfectar con mayor eficiencia los ácidos nucleicos. Esto puede explicarse por dos razones: en primer lugar, la fuerte interacción física con el ácido nucleico cargado negativamente lo protege de la degradación de la nucleasa; en segundo lugar, la carga positiva mejora la interacción del complejo con la superficie aniónica de las células [22]. Sin embargo, después de la internalización en las células, el desensamblado del complejo es necesario para permitir que el siRNA interactúe con componentes citosólicos como el RISC y llevar a cabo el silenciamiento del gen [23], y esto puede ser difícil cuando la interacción entre el polímero y el ácido nucleico es muy fuerte. Se necesita un equilibrio adecuado entre la protección y la liberación del siRNA para obtener una eficiencia de silenciamiento óptima [16].

Los polisacáridos aniónicos, como el xantano, pueden permitir una liberación más fácil y proporcionar este equilibrio al interactuar de forma más débil con el siRNA, pero al mismo tiempo las repulsiones electrostáticas pueden dificultar la carga de ácido nucleico en el nanotransportador. Aunque la mayoría de los nanotransportadores de siRNA incluyen algún componente catiónico para favorecer la carga de siRNA mediante atracción electrostática, algunos estudios demuestran que polisacáridos aniónicos como el ácido hialurónico son capaces de atrapar las moléculas de siRNA en la matriz de polisacárido al establecer puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals con ellas, sin necesidad de incorporar un catión, y lograr eficiencias de silenciamiento de hasta el 60 % en el caso de transportadores basados en ácido hialurónico [24–26].

El xantano (XN) es un polisacárido extracelular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* [27]. Está compuesto por una cadena principal de (1,4)- $\beta$ -D-glucano con cadenas laterales de trisacáridos formados por manosa-(1,4)- $\beta$ -ácido glucurónico-(1,2)- $\beta$ -manosa unidas a residuos de glucosa alternados en la cadena principal. La presencia de residuos de ácido acético y pirúvico en las cadenas laterales hace del XN un

polielectrolito aniónico. Desde hace más de 50 años, este polisacárido natural ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, y está aprobado por la FDA para su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica desde 1968 [28,29]. Por lo tanto, el XN se considera un candidato ideal para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, especialmente como estabilizador de emulsiones [30]. Aunque todavía no existen publicaciones sobre el uso de nanopartículas de XN para la administración de siRNA, Fernandez-Piñeiro y colaboradores demostraron recientemente en un estudio prometedor la capacidad de sus nanopartículas lipídicas recubiertas de xantano para transfectar con éxito plásmidos de DNA tanto *in vitro* como *in vivo* [27].

En este capítulo se han utilizado las NCs recubiertas de quitosano descritas en el capítulo 2 para encapsular el siRNA y se ha optimizado el proceso mediante distintas estrategias. Además, las NCs recubiertas de quitosano han sido comparadas con NCs basadas en el mismo núcleo de nanoemulsión pero recubiertas de xantano para evaluar el efecto que ejerce la distinta naturaleza química y carga electrostática de cada polisacárido sobre la eficiencia de encapsulación del siRNA y su funcionalidad biológica. Para estudiar esto último, se ha seleccionado el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) como diana del silenciamiento génico y se han utilizado células HeLa modificadas genéticamente para expresar la proteína GFP (HeLa-GFP) como línea celular modelo. El gen de la GFP es una diana ampliamente utilizada en investigación para la optimización de la metodología durante las primeras etapas de desarrollo de un nuevo nanomaterial con aplicación en terapia génica debido a que es un modelo sencillo que permite detectar el silenciamiento utilizando técnicas basadas en fluorescencia, como la citometría de flujo. Además, se han utilizado las técnicas de Western Blot (o inmunoblot) y RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa) para verificar los resultados a nivel de expresión proteica y de mRNA, respectivamente, así como la microscopía confocal para realizar estudios de colocalización en distintos orgánulos subcelulares que han permitido conocer la distribución intracelular del siRNA.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Encapsulación de siRNA en NCs recubiertas de quitosano

Las NCs fueron sintetizadas siguiendo el método estándar descrito en el capítulo 2, basado en una nanoemulsión seguida de un proceso de gelificación iónica, con algunas adaptaciones para cargar el siRNA en las NCs. Las NCs fueron cargadas con el siRNA durante el proceso de síntesis, obteniendo el siRNA incorporado en las NCs, con el fin de proporcionar una mayor protección al siRNA frente a la degradación en medios biológicos al evitar su exposición [23,31].

Para cargar el siRNA en las NCs durante la síntesis se siguieron dos estrategias diferentes para evaluar cual era la mejor: 1) adición del siRNA en la fase acuosa antes del proceso de formación de la nanoemulsión, pretendiendo que el siRNA quede encapsulado en la interfase entre el núcleo y la cubierta tras la adición del quitosano ó 2) adición del siRNA en la fase de quitosano después de la nanoemulsión para la formación de la cubierta de las NCs con el siRNA atrapado entre las cadenas del polímero.

En primer lugar, se demostró que era posible cargar el siRNA dentro de las NCs durante el proceso de síntesis, tanto mediante adición a la fase acuosa como al quitosano. Al tratarse de oligonucleótidos con características similares, la cuantificación del siRNA se llevó a cabo siguiendo el mismo método de análisis directo optimizado para la cuantificación de los TFDs y reportado en el capítulo 4. Las NCs con el siRNA atrapado (siRNA-NCs) fueron cargadas en el gel de agarosa a una dilución adecuada sin tratamiento previo ya que el siRNA encapsulado se libera en el gel debido al pH básico del tampón de electroforesis (pH 8.5) [31]. Para cada gel, se representó una curva de calibrado con siRNA libre basada en las intensidades de fluorescencia correspondientes a las diferentes concentraciones de siRNA cargadas en el gel. La cuantificación del siRNA encapsulado se determinó interpolando la intensidad obtenida en la curva de calibrado. Además, para verificar que el siRNA encapsulado se libera en el gel [31] y no antes, se filtró una alícuota de las mismas siRNA-NCs con el objetivo de separar las NCs retenidas en el filtro del posible siRNA libre recogido en el filtrado. Para cada muestra, la suspensión filtrada se cargó en el gel y no se detectó fluorescencia a la altura del siRNA libre, lo que significa que en agua todo el siRNA está interaccionando con las NCs o que la cantidad eventualmente libre es despreciable.

La Tabla 1 muestra la caracterización mediante potencial zeta de las muestras obtenidas con las dos estrategias, así como la carga de siRNA obtenida (DL, nmol de siRNA encapsulado respecto al peso del material final obtenido) y la eficiencia de encapsulación (EE, porcentaje de siRNA encapsulado respecto a la cantidad inicialmente añadida), determinadas mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 1. Caracterización físico-química de las NCs cargadas de siRNA, en función de su encapsulación en la fase acuosa o en el quitosano. Los errores de la tabla corresponden a la desviación estándar de varios pocillos del gel cargados con la misma muestra, en el caso de la EE y el DL, o a la desviación estándar de varias medidas (runs), en el caso del potencial zeta.**

Estrategia de adición	siRNA añadido, nmol	EE, %	DL, nmol/mg NC	Potencial zeta, mV
Fase acuosa	1	25 ±5	0.005 ±0.001	+28.8 ±1.2
Quitosano	1	41 ±2	0.010 ±0.001	+16.8 ±1.0

En la Tabla 1 se puede apreciar que tanto la EE como la carga de siRNA resultó ser aproximadamente el doble cuando el siRNA se mezcló con el quitosano en vez de ser añadido a la fase acuosa. Es probable que las interacciones electrostáticas que el siRNA es capaz de establecer con el quitosano antes de su adición a la nanoemulsión favorezcan su atrapamiento en la nanocápsula. Además, la mayor carga de siRNA también se reflejó en la disminución del potencial zeta (+16.8 mV), con respecto a la muestra con el siRNA encapsulado en la fase acuosa (+28.8 mV). Raemdonck y colaboradores también observaron una clara dependencia del potencial zeta con la carga de siRNA en sus nanogeles catiónicos, registrando menores valores de potencial zeta conforme aumentaba la carga de siRNA [32]. En cuanto al tamaño, los diámetros hidrodinámicos medios de ambas muestras estaban comprendidos entre 175 y 200 nm. La mayor EE y carga de siRNA de la muestra con el siRNA atrapado en el hidrogel de quitosano demostró ser el método de carga más eficiente, por lo que se decidió continuar con esta estrategia de encapsulación a la hora de evaluar si era posible aumentar la carga de siRNA en las NCs.

La carga o cantidad de fármaco que un nanotransportador es capaz de acarrear es un parámetro muy importante que hay que tratar de maximizar ya que cuanto mayor sea, menor es la cantidad de nanotransportador necesaria para alcanzar las concentraciones terapéuticas, por lo que se minimiza la posible toxicidad derivada del propio nanotransportador [33,34]. Además, se ha demostrado que un nanotransportador con una alta carga de fármaco es más efectivo que con una carga baja, incluso cuando se comparan a la misma concentración de fármaco, debido a que el número de nanopartículas que puede entrar en las células es limitado [33]. Con la finalidad de maximizar la carga de siRNA, se incrementó la cantidad de siRNA añadida a la solución de quitosano (de 1 a 25 y 125 nmol) y se comparó la carga de las NCs obtenidas.

Tal y como se esperaba, al incrementar la cantidad de siRNA añadida durante la síntesis, aumentó la carga de las NCs. Se obtuvieron valores de DL de 0.63 nmol/mg NC tras la adición de 25 nmol siRNA y 1.88 nmol/mg NC tras la adición de 125 nmol siRNA. Estos valores indicaban que las NCs recubiertas de quitosano tenían mucha capacidad para incorporar grandes cantidades de siRNA. La EE se mantuvo en un rango de 40-55 %. A partir de 25 nmol de siRNA, el potencial zeta pasó a ser negativo (-4.04 mV tras añadir 25 nmol siRNA y -14.66 mV tras añadir 125 nmol siRNA), probablemente debido a que el sistema estaba alcanzando la saturación y el siRNA podría estar quedando parcialmente expuesto en la superficie de las NCs.

En comparación con las concentraciones utilizadas en otros trabajos para conseguir silenciamiento génico mediante nanotransportadores (10-200 nM) [35–37], la carga de siRNA conseguida tras la adición de 25 y 125 nmol permitía alcanzar concentraciones altas de siRNA *in vitro* (hasta 300 nM), utilizando concentraciones moderadas de NCs (inferiores a 150 µg/mL), por lo que se decidió seleccionar estas muestras para evaluar su efecto de silenciamiento génico en cultivos celulares.

## 2.2. Encapsulación de siRNA en NCs recubiertas de xantano

La elevada capacidad de unión al siRNA del quitosano se debe a su naturaleza catiónica, que le otorga la ventaja de poder interaccionar electrostáticamente con el siRNA cargado negativamente. No obstante, esta ventaja puede convertirse en un impedimento si el nanotransportador no permite que el siRNA sea posteriormente liberado para ejercer su función biológica [38]. Para evaluar el efecto de la carga electrostática del polímero sobre la liberación del siRNA, se exploró también una nueva aproximación: sustituir el recubrimiento de quitosano de las NCs por un recubrimiento de xantano. Como se ha indicado en la introducción, el xantano es un polisacárido aniónico, por lo que no atrae electrostáticamente a las moléculas de siRNA, pero sí puede establecer puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals con ellas, permitiendo su retención dentro de la matriz de polisacárido. Esta capacidad de unión de los polisacáridos aniónicos a los ácidos nucleicos ha sido demostrada en otros trabajos [25] y recientemente se ha reportado un silenciamiento génico del 60 % logrado por un nanotransportador de siRNA basado únicamente en ácido hialurónico [26].

Las NCs de xantano se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento que para las NCs de quitosano, con la excepción de que los núcleos de nanoemulsión fueron recubiertos por una capa de xantano. De la misma forma que se hizo con las NCs recubiertas de quitosano, el siRNA fue añadido a la solución de xantano antes de entrar en contacto con la nanoemulsión y las NCs obtenidas finalmente fueron lavadas mediante ultracentrifugación. La adición de 25 nmol de siRNA dio lugar a una carga de siRNA en las NCs de 0.06 nmol/mg NC y una EE del 7 %. La carga de siRNA es aproximadamente 10 veces inferior a la obtenida tras la encapsulación de 25 nmol siRNA en las NCs recubiertas de quitosano, lo que concuerda con las diferencias supuestas inicialmente en la capacidad de unión del siRNA entre ambos polisacáridos.

Posteriormente, la EE y la carga de siRNA se consiguieron optimizar modificando el método de lavado de las NCs durante la síntesis. Tras la ultracentrifugación, los pellets de NCs formados no eran compactos y parte del material se perdía en el sobrenadante. Esta diferencia con las NCs recubiertas de quitosano posiblemente fuera debida a la ausencia de sal en el caso de las NCs recubiertas de xantano, ya que ésta favorece la sedimentación de las nanopartículas poliméricas [39]. Por ello, la ultracentrifugación fue sustituida por filtración utilizando dispositivos de filtración por centrifugación. Con esta modificación del protocolo de síntesis, se obtuvieron EE y cargas de siRNA muy superiores (EE del 80-90 % y DL de 0.4-0.5 nmol/mg NC). En cuanto al tamaño y potencial de superficie de las NCs recubiertas de xantano cargadas con siRNA, el diámetro hidrodinámico medio fue de 196.5 nm y el potencial zeta de -44.8 mV.

## 2.3. Evaluación del silenciamiento génico en células HeLa-GFP

Los dos tipos de NCs cargadas con siRNA, recubiertas de quitosano o de xantano, fueron testadas *in vitro* para evaluar si el tipo de recubrimiento afectaba a su capacidad

para silenciar la expresión de la proteína GFP en células HeLa-GFP. Las células HeLa-GFP fueron adquiridas comercialmente y habían sido genéticamente modificadas para expresar constitutivamente la proteína GFP. Para analizar la expresión de GFP en estas células, se utilizaron tres técnicas distintas: citometría de flujo, Western Blot y RT-qPCR.

### 2.3.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica biofísica de alta precisión que permite analizar cuantitativamente determinadas características de una población celular [40,41]. Cada célula es irradiada de forma individual con un láser y las señales recogidas dan indicación de su tamaño (FSC), complejidad (SSC) y fluorescencia. En este caso, se utilizó la citometría con un triple objetivo. En primer lugar, analizar la viabilidad celular para verificar que las concentraciones de NCs utilizadas no provocaran una elevada citotoxicidad. En segundo lugar, este análisis de la viabilidad celular permitía excluir la población de células muertas durante el tratamiento posterior de los datos, ya que las células muertas pierden la fluorescencia de la GFP [42,43] y podrían confundirse con el efecto de silenciamiento génico. En tercer lugar, cuantificar la fluorescencia emitida por la proteína GFP, que en teoría debería ser directamente proporcional a la cantidad de proteína GFP expresada por las células, para determinar el nivel de silenciamiento génico obtenido.

Sobre la base de datos previos de citotoxicidad y teniendo en cuenta que la eficiencia del silenciamiento génico es dependiente de la concentración de siRNA [44], las NCs recubiertas de quitosano fueron testadas a dos concentraciones finales de NCs, 25 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que corresponden a 50 y 300 nM de siRNA. Debido a su menor carga de siRNA, las NCs recubiertas de xantano sólo fueron testadas a la concentración más alta (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de NCs, que suponía una concentración de siRNA de 10 nM. También se evaluó la citotoxicidad de otro agente de transfección, la Lipofectamina® 2000, ya que se utilizó como control positivo para el posterior análisis del silenciamiento génico. La Lipofectamina® 2000 es un reactivo basado en liposomas catiónicos comúnmente utilizado para transfectar ácidos nucleicos en cultivos celulares ya que proporciona una elevada eficiencia de transfección [45,46]. Como control negativo, se utilizaron células no tratadas, es decir, que no habían estado en contacto con siRNA, NCs ni ningún otro agente de transfección.

Las células fueron sembradas y, 24 h después, fueron transfectadas durante 4 h con el siRNA, ya sea utilizando Lipofectamina® o NCs como agente de transfección. Después, se lavaron con DPBS para eliminar el exceso de NCs y Lipofectamina® que no hubieran sido internalizadas y se mantuvieron en la estufa con medio de cultivo fresco durante 24, 48 ó 72 h. En ese momento, las células se levantaron, se lavaron, se tiñeron con anexina-V y yoduro de propidio (PI) (para evaluar la viabilidad celular durante el propio experimento y poder excluir las células muertas durante el tratamiento posterior de los datos) y se analizaron mediante citometría de flujo. El rango de tiempo de análisis (24-

72 h) se seleccionó en base a la literatura existente sobre la cinética del silenciamiento génico [47–49], teniendo en cuenta la importancia de evaluar múltiples tiempos ya que la vida media de cada proteína diana es distinta y la duración del silenciamiento depende de la línea celular y el sistema de transfección utilizados.

La Figura 4 muestra la viabilidad de las células 24, 48 y 72 h después de la transfección. El error debido al levantamiento y preparación de las células para la citometría a distintos tiempos fue inferior al 6 %, y el error entre réplicas en el mismo experimento estuvo siempre comprendido entre 0.1 y 5 %.

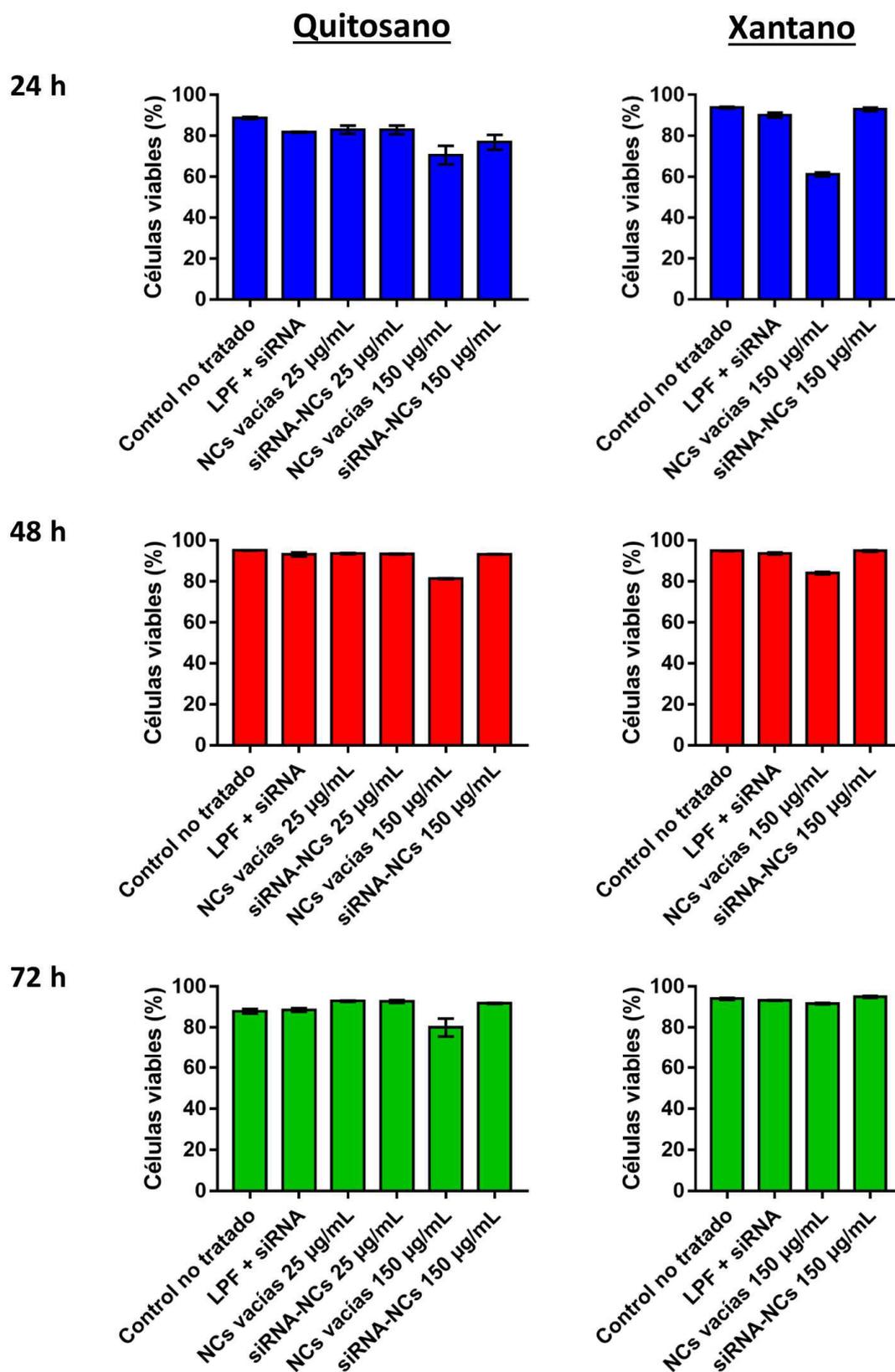


Figura 4. Viabilidad de células HeLa-GFP no tratadas o tratadas con NCs recubiertas de quitosano o de xantano, vacías o cargadas con siRNA, y Lipofectamina® con siRNA (control positivo). Las células fueron incubadas con las muestras durante 4 h y su viabilidad se analizó 24, 48 o 72 h después del inicio de la incubación. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de dos réplicas experimentales.

La viabilidad celular se mantuvo por encima del 80 % en todas las muestras y a todos los tiempos, excepto en las células tratadas con las NCs vacías a 150 µg/mL a las 24 h, donde disminuyó al 71 % en el caso de las NCs recubiertas de quitosano y al 61 % en el caso de las NCs recubiertas de xantano. Estos datos corroboran que las concentraciones de siRNA-NCs utilizadas no eran tóxicas a ninguno de los tiempos, mientras que las NCs vacías generaban cierta toxicidad a 24 h, pero tras tiempos más largos la viabilidad recuperaba valores superiores al 80 %.

Una vez descartada la población de células muertas, se analizó la intensidad de fluorescencia de la GFP en las células vivas para determinar el grado de silenciamiento conseguido. Sorprendentemente, se observó que las siRNA-NCs de quitosano a 150 µg/mL, en vez de disminuirla, aumentaban la intensidad de fluorescencia de las células en el canal de la GFP. En comparación con las células no tratadas, este aumento en la intensidad de fluorescencia era de un 110-150 % a las 48 h y fue corroborado con distintos lotes de nanocápsulas en 5 experimentos independientes. Este efecto también era producido por las NCs vacías a 150 µg/mL, e incluso en mayor medida, con aumentos en la intensidad de fluorescencia del 130-230 % a las 48 h. Además, se comprobó que las NCs recubiertas de xantano provocaban el mismo efecto, por lo que éste era independiente del tipo de polisacárido de la cubierta. También se descartó que esa fluorescencia fuera emitida por las propias NCs, ya que al incubar células no fluorescentes con las NCs no se observó fluorescencia en el canal de la GFP más allá de la tenue autofluorescencia de las propias células.

Era importante esclarecer si el aumento de la intensidad de fluorescencia provenía de una sobreexpresión de GFP o de alguna interferencia en el propio método de medida. Se plantearon dos hipótesis para explicar este aumento de fluorescencia: 1) las NCs estaban alterando el metabolismo celular haciendo que las células sobreexpresaran proteína GFP o 2) alguno de los componentes de las NCs podía estar interfiriendo con la fluorescencia de la GFP, posiblemente los surfactantes de la nanoemulsión, ya que está ampliamente descrito que los surfactantes pueden afectar a las propiedades de fluorescencia de fluoróforos y proteínas [50–52]. La primera hipótesis fue posteriormente descartada mediante Western Blot y qPCR (ver apartados 2.3.2 y 2.3.3. de este capítulo), por lo que prevaleció la idea de que el aumento de fluorescencia era debido a una interferencia de las NCs que podía estar compensando y enmascarando el posible efecto de silenciamiento.

Debido a esta interferencia, la fluorescencia de las células tratadas con siRNA-NCs no podía ser directamente comparada con la de las células no tratadas. Por ello, se utilizaron células tratadas con NCs vacías a idéntica concentración como control del efecto provocado por el propio nanotransportador en la fluorescencia, y su intensidad

de fluorescencia se tomó como 100 % para normalizar la fluorescencia de las células tratadas con siRNA-NCs.

La Figura 5 y la Figura 6 muestran el análisis de la expresión de GFP en las células tratadas con NCs de quitosano y de xantano, respectivamente. Las NCs recubiertas de quitosano fueron testadas a 25 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que corresponden a 50 y 300 nM de siRNA. Debido a su menor carga de siRNA, las NCs recubiertas de xantano sólo fueron testadas a la concentración más alta (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de NCs, que suponía una concentración de siRNA de 10 nM. La mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células viables de cada muestra ha sido normalizada en relación a su respectivo control (células tratadas con NCs vacías a idéntica concentración en el caso de las siRNA-NCs y células no tratadas en el caso de la siRNA-Lipofectamina®) y se representa como porcentaje de expresión de GFP.

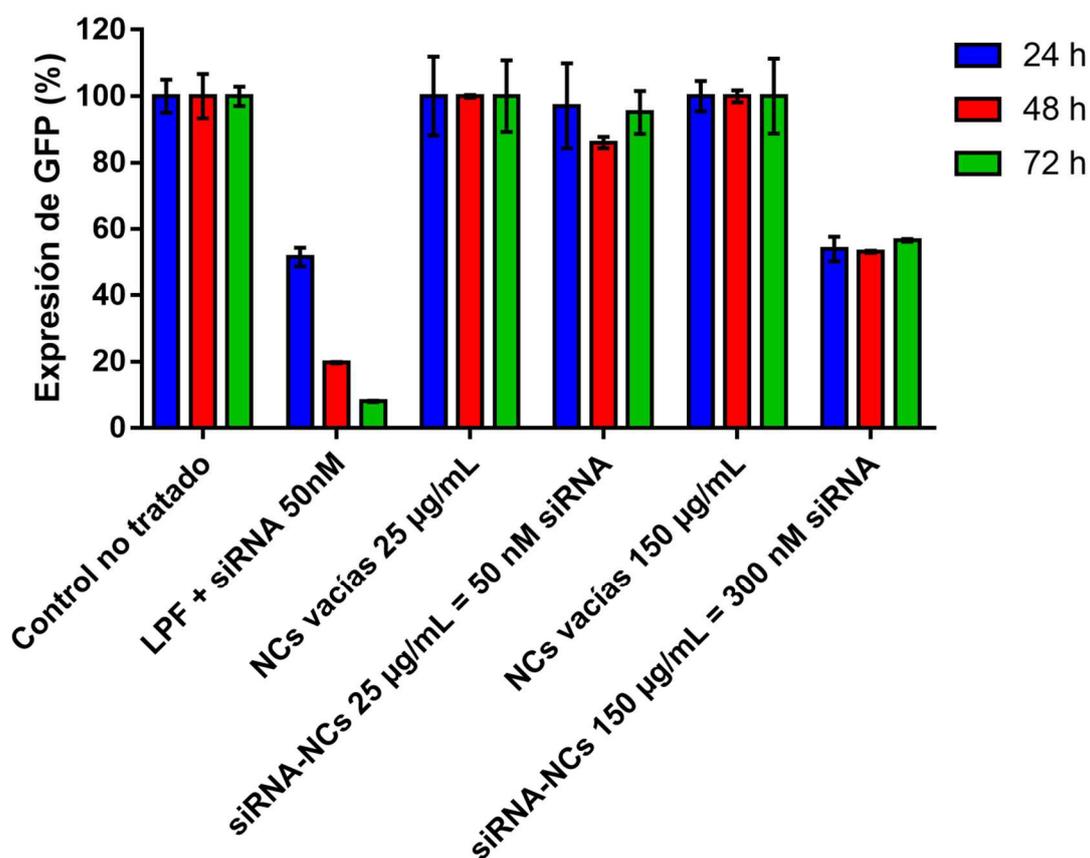


Figura 5. Expresión de GFP de células HeLa-GFP tratadas con NCs recubiertas de quitosano, analizada mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de dos réplicas experimentales.

En la Figura 5 se puede observar una notable disminución de la expresión de GFP de casi el 50 % en las células tratadas con siRNA-NCs de quitosano a alta concentración, y una disminución menos acentuada (hasta un 15 %) a baja concentración. Resultados similares fueron observados con las siRNA-NCs de xantano a alta concentración de NCs,

correspondiente a una menor concentración de siRNA, con un silenciamiento de hasta el 60 % a las 48 h (Figura 6).

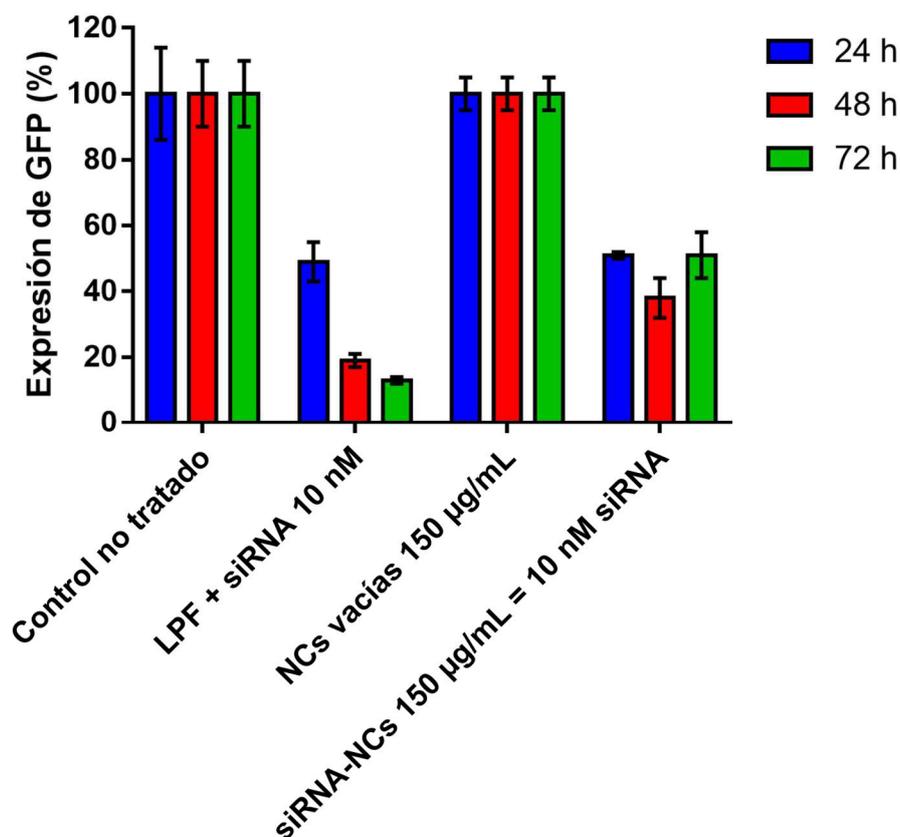


Figura 6. Expresión de GFP de células HeLa-GFP tratadas con NCs recubiertas de xantano, analizada mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a la media  $\pm$ desviación estándar de dos réplicas experimentales.

A pesar de que el uso de las NCs vacías como control proporcionaba resultados prometedores, existía la posibilidad de que el efecto de interferencia en la fluorescencia provocado por las NCs vacías no fuera exactamente igual que el provocado por las siRNA-NCs. La ausencia o presencia de siRNA en el nanotransportador hace que las propiedades físico-químicas de las NCs sean distintas y estas influyen en su interacción con las células.

Por ejemplo, la diferencia en la carga superficial (las NCs de quitosano vacías exhibían un potencial zeta positivo, mientras que éste era negativo en las NCs cargadas con siRNA) podría afectar a la internalización celular y la toxicidad. En un interesante trabajo, Yue y colaboradores utilizaron nanopartículas de quitosano con distinta carga superficial (positiva, neutra o negativa, modulada mediante grupos carboximetil) pero uniformes en cuanto al resto de propiedades físico-químicas para evaluar la influencia de la carga superficial sobre la internalización en ocho líneas celulares [53]. Demostraron que, efectivamente, la carga positiva aumentaba la velocidad y el grado de internalización en las células.

En nuestro caso, si las NCs vacías habían sido internalizadas en mayor cantidad que las siRNA-NCs y esta era la causa de su mayor interferencia en la fluorescencia, probablemente esto iría acompañado de un aumento en la toxicidad. Efectivamente, la tinción de las células con anexina V y yoduro de propidio durante el propio experimento reveló una mayor toxicidad de las NCs vacías en comparación con las siRNA-NCs, como se describió previamente en la Figura 4. Esto sugería que cada tipo de nanocápsula ejercía un efecto distinto sobre el comportamiento celular, en función de si iban cargadas o no con siRNA. Del mismo modo, la interferencia de las NCs con la fluorescencia de las células también podría ser distinta y esto podría haber afectado al análisis del silenciamiento génico, al haberse utilizado la fluorescencia de las células tratadas con NCs vacías como referencia.

Con el objetivo de encontrar un control más adecuado para el análisis del silenciamiento génico, se sustituyó el control de NCs vacías por un control de NCs cargadas con un siRNA de secuencia aleatoria que no silenciara la GFP (C- siRNA). De esta forma, la estructura molecular y las propiedades físico-químicas del control se asemejaban lo máximo posible a las de las siRNA-NCs dirigidas contra GFP, ya que ambos tipos de NCs iban cargadas de siRNA, ya sea dirigido contra GFP (GFP siRNA-NCs) o sin diana específica (C- siRNA-NCs), y exhibían un potencial zeta negativo.

La Figura 7a y la Figura 7b muestran el efecto de silenciamiento obtenido por las GFP siRNA-NCs de quitosano y de xantano, respectivamente, al normalizar la MFI de las células viables respecto al control C- siRNA-NCs. Tras haber confirmado en los experimentos anteriores que la concentración más alta de siRNA-NCs (150 µg/mL) no generaba toxicidad, se seleccionó esta concentración para favorecer el efecto de silenciamiento. Además, el análisis del silenciamiento se realizó 48 h después de la transfección. En la bibliografía frecuentemente se realiza el análisis a 48 h por ser un tiempo óptimo para detectar el silenciamiento producido por otros nanotransportadores cargados con siRNA [32,35,54,55]. Además, en los experimentos anteriores se corroboró que nuestras siRNA-NCs provocaban la máxima disminución de la señal de fluorescencia a este tiempo.

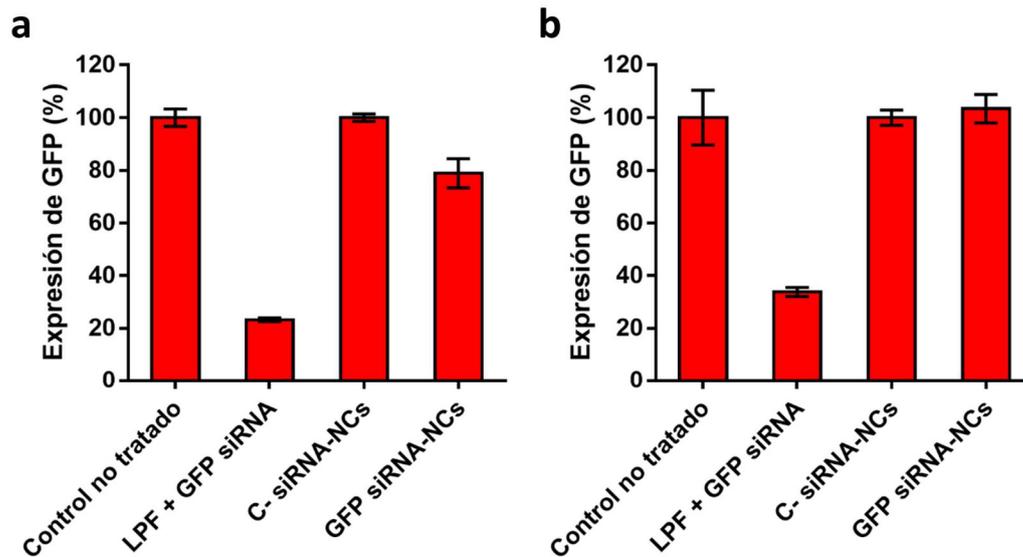


Figura 7. Expresión de GFP en células HeLa-GFP tratadas con NCs recubiertas de quitosano (a) o de xantano (b) a 150 µg/mL, analizada mediante citometría de flujo a las 48 h. El GFP siRNA fue transfectado a 50 nM (a) o 10 nM (b) en el control positivo de Lipofectamina®, a 300 nM con las NCs de quitosano (a) y a 80 nM con las NCs de xantano (b). Los datos corresponden a la media y desviación estándar de dos réplicas experimentales y son representativos de varios experimentos independientes.

En la Figura 7a se puede apreciar cómo la expresión de la GFP desciende al 79 % tras el tratamiento con GFP siRNA-NCs de quitosano. Este dato fue corroborado en varios experimentos independientes. Al contrario que con las NCs recubiertas de quitosano, en el caso de las NCs recubiertas de xantano no se detectó una diferencia significativa en el nivel de expresión de la GFP (Figura 7b), quizá debido a que la concentración alcanzable de siRNA no es suficiente para provocar un silenciamiento detectable. La eficiencia de silenciamiento alcanzada por las siRNA-NCs es mucho menor que la del control positivo de Lipofectamina® (LPF), que consigue un silenciamiento del 20-40 % a las 48 h. Gran parte de los nanotransportadores de siRNA presentados en literatura también muestran un silenciamiento inferior y más lento que la LPF, incluso a concentraciones de siRNA 10-20 veces mayores [32,49].

Para evitar los problemas que causaban las NCs al interferir con la fluorescencia de la GFP cuando se medía el silenciamiento por citometría de flujo y poder validar estos resultados, se utilizaron otras técnicas (Western Blot y qPCR) que no miden la fluorescencia intracelular de la GFP directamente, sino que conllevan la extracción celular de la proteína, o su mRNA en el caso de la qPCR, y su separación del resto de componentes intracelulares. De esta forma se evitaban los problemas de interferencia con las NCs.

### 2.3.2. Western Blot

El Western Blot, también llamado inmunoblot, es una de las técnicas de laboratorio más utilizadas para la identificación y cuantificación de proteínas en células o tejidos

[56,57]. Su selectividad y especificidad permiten la identificación de proteínas dentro de extractos proteicos muy complejos, como es el lisado celular, gracias a la utilización de anticuerpos específicos de la proteína de interés. En este caso, se utilizó esta técnica para determinar y comparar la expresión de la proteína GFP en células HeLa-GFP tras el tratamiento con siRNA cargado en nanocápsulas poliméricas.

Las mismas muestras fueron analizadas en paralelo mediante citometría de flujo (datos reportados en el apartado anterior Figura 6 y Figura 7) y mediante Western Blot para confirmar los resultados. Las células fueron transfectadas con NCs recubiertas de quitosano o de xantano cargadas de siRNA específico para GFP (GFP siRNA) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Como control positivo, las células se transfectaron con GFP siRNA utilizando Lipofectamina®. Como control negativo, las células se trataron con NCs vacías o cargadas de siRNA no específico (C- siRNA) incubadas a la misma concentración de nanotransportador (150 µg/mL). A las 48 ó 72 h después de la transfección, las células fueron lisadas para extraer las proteínas citoplasmáticas y se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separar las proteínas según su tamaño. Después, las proteínas fueron transferidas a una membrana e hibridadas con un anticuerpo primario específico de GFP y otro específico de actina (proteína elegida como control “housekeeping” por tener un nivel de expresión constante). Tras la hibridación de un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo NIR, la membrana fue revelada utilizando un detector de fluorescencia infrarroja y la intensidad de fluorescencia de las bandas cuantificada mediante análisis de imagen.

La Figura 8 muestra las membranas de los Western Blots llevados a cabo a partir de las células tratadas con las NCs de quitosano y de xantano a 150 µg/mL.

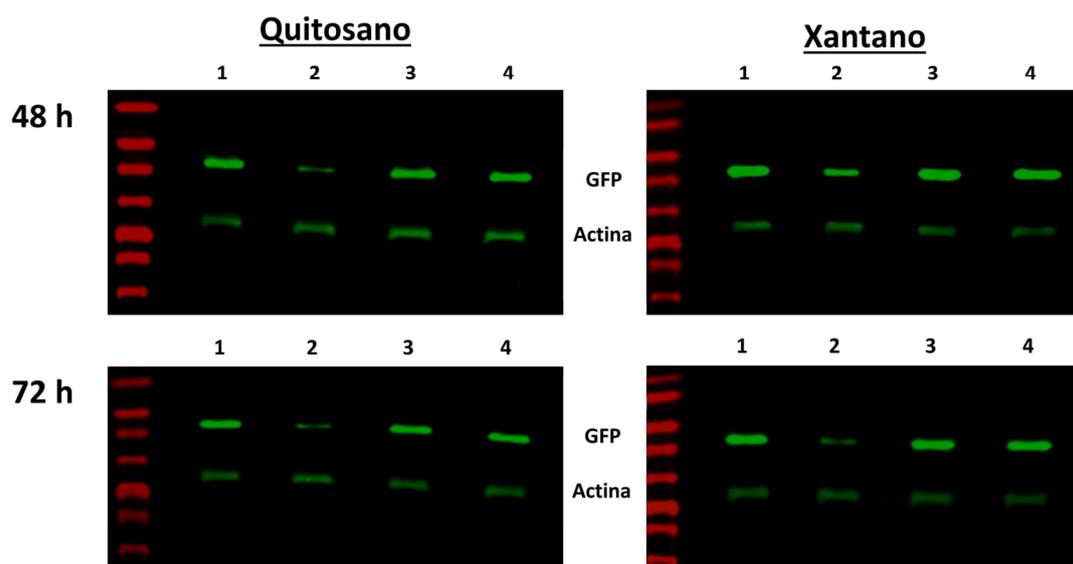


Figura 8. Expresión de GFP en células HeLa-GFP evaluada mediante Western Blot. NCs quitosano (izqda): carril 1, control no tratado; carril 2, Lipofectamina® + GFP siRNA 50 nM; carril 3, C- siRNA-NCs 150

$\mu\text{g/mL}$ ; carril 4, GFP siRNA-NCs 150  $\mu\text{g/mL}$  (= 300 nM siRNA). NCs xantano (dcha): carril 1, control no tratado; carril 2, Lipofectamina<sup>®</sup>+ GFP siRNA 10 nM; carril 3, NCs vacías 150  $\mu\text{g/mL}$ ; carril 4, GFP siRNA-NCs 150  $\mu\text{g/mL}$  (= 10 nM siRNA).

La ausencia de interferencia de las NCs en este tipo de ensayo, a diferencia de la citometría de flujo, permitió que las muestras tratadas con GFP siRNA-NCs pudieran ser directamente comparadas con el control no tratado (carril 1). Además, se confirmó que el tratamiento con las NCs y con la Lipofectamina<sup>®</sup> no alteraba la expresión de la actina, por lo que ésta pudo ser utilizada como control interno.

En las cuatro membranas se puede observar una intensa disminución en la expresión de GFP después de la transfección de siRNA con Lipofectamina<sup>®</sup> (LPF, carril 2), que corresponde a una expresión del 20-50 %, confirmando la validez del control positivo y del método. Por el contrario, no se aprecia esta disminución en las bandas de GFP tras el tratamiento con GFP siRNA-NCs (carril 4) y la cuantificación demostró que no se detectaba un efecto de silenciamiento relevante, ni con las NCs de quitosano ni con las de xantano.

Por otro lado, los controles negativos de NCs vacías o cargadas con siRNA no específico (C- siRNA) no alteraron la expresión de la GFP (carril 3), quedando evidenciado que el tratamiento con las nanocápsulas de quitosano y de xantano no provoca la sobreexpresión de la GFP. Esto supuso un hallazgo importante para confirmar que el aumento en la intensidad de fluorescencia observado mediante citometría de flujo era debido a una interferencia o un artefacto propio de la técnica en sí y no a un posible estrés celular que acelerara la síntesis de GFP. Los resultados obtenidos para las NCs recubiertas de xantano mediante Western Blot son consistentes con los obtenidos mediante citometría de flujo. Sin embargo, el pequeño efecto de silenciamiento producido por las NCs de quitosano que se registró mediante citometría de flujo no se aprecia mediante Western Blot. Hay que señalar que el Western Blot es una técnica semi-cuantitativa y que la multitud de pasos en el protocolo hasta obtener los resultados finales es una gran fuente de variabilidad, lo que dificulta la obtención de datos robustos y precisos [56–58]. Por ello, es importante utilizar técnicas complementarias adicionales para verificar los datos generados mediante Western Blot [59]. Como técnica complementaria para cuantificar la expresión de la GFP, esta vez a nivel de RNA, se usó la q-PCR.

### 2.3.3. RT-qPCR

Una de las múltiples aplicaciones de la técnica qPCR consiste en la determinación del número de copias de RNA presentes en una muestra de células o tejido (a través del cDNA) para analizar el nivel de expresión génica [60]. Para ello, se utiliza una variante de la qPCR, la qPCR de transcripción inversa (RT-qPCR), que permite utilizar el RNA como molde [61].

Las células fueron transfectadas durante 4 h con el siRNA, utilizando Lipofectamina® (LPF) o NCs a 150 µg/mL como agente de transfección, y fueron lisadas para extraer el RNA 48 h después de la transfección. Después de ser cuantificado, el RNA se retrotranscribió a DNA complementario (cDNA) y se llevó a cabo la amplificación mediante qPCR. Durante los ensayos preliminares para poner a punto la técnica, se seleccionó la dilución óptima de cDNA para obtener una amplificación eficiente y se confirmó que la expresión del gen *housekeeping* elegido como control interno (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa, HPRT) no variaba tras el tratamiento con las NCs. Para cada muestra, los datos de expresión de GFP fueron normalizados respecto a HPRT y después todas las muestras fueron referidas al control no tratado, que se tomó como 100 % de expresión. El análisis de RT-qPCR se repitió tres veces y en cada análisis las muestras fueron preparadas y analizadas por triplicado. Los datos de la media y desviación estándar de los tres análisis se representan en la Figura 9.

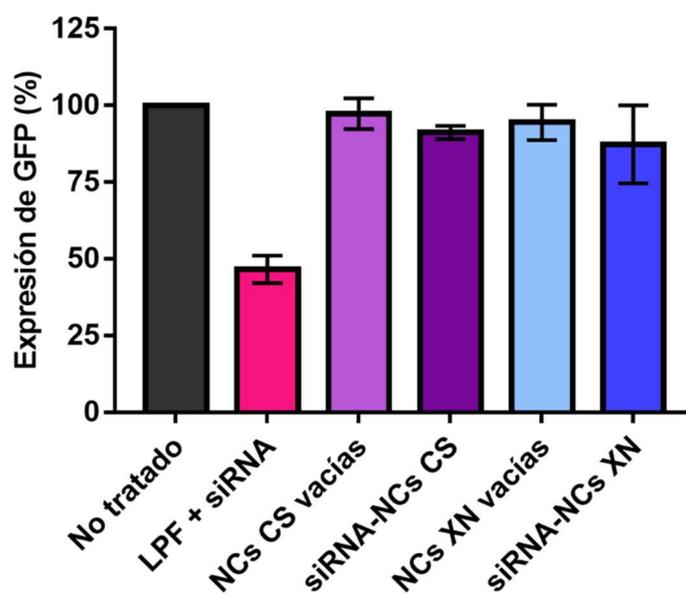


Figura 9. Expresión de GFP en células HeLa-GFP evaluada mediante RT-qPCR. El GFP siRNA fue transfectado a 10 nM en el control positivo de Lipofectamina® (LPF + siRNA) y con las NCs recubiertas de xantano (XN), y a 300 nM con las NCs recubiertas de quitosano (CS). Los datos corresponden a la media y desviación estándar de tres análisis de RT-qPCR independientes.

En consonancia con los resultados obtenidos por Western Blot, se demostró mediante RT-qPCR que el tratamiento con NCs recubiertas de quitosano (NCs CS) y xantano (NCs XN) vacías no altera la expresión de la GFP a nivel de RNA (los valores medios son de 97 y 95 %, respectivamente). Esto confirma una vez más que los aumentos en la fluorescencia de GFP que se observaban durante la citometría de flujo no se debían a una sobreexpresión de GFP, sino a la interferencia de las NCs con la fluorescencia. El tratamiento con las NCs cargadas con siRNA dirigido contra GFP (siRNA-NCs) da lugar a una leve disminución de la expresión de GFP (91 % en el caso de las NCs recubiertas de quitosano y 87 % en el de las NCs recubiertas de xantano).

Como conclusión global de la cuantificación del silenciamiento génico efectuada mediante las tres técnicas distintas reportadas, es evidente que la GFP no está siendo silenciada de forma notoria tras la transfección del siRNA con las NCs. Ragelle y colaboradores también obtuvieron bajos niveles de silenciamiento de GFP (10-30 %) con sus nanopartículas de quitosano, a pesar de la alta concentración intracelular de siRNA, por lo que atribuyeron estos resultados a que las nanopartículas no conseguían liberar el siRNA al citosol [62]. Además, observaron que al unir un ligando RGD a su superficie se duplicaba su internalización celular y aumentaba la eficiencia de silenciamiento. Esto demuestra que la eficiencia de silenciamiento depende en gran medida de la internalización y el destino final del siRNA dentro de la célula. Por lo tanto, es importante estudiar estos aspectos para adquirir una mayor comprensión del mecanismo de transporte del siRNA y poder así mejorar la eficiencia de los nanotransportadores en el futuro.

## 2.4. Internalización de siRNA-NCs en células HeLa

Algunos estudios afirman que las propiedades superficiales de las nanopartículas pueden influir en su internalización celular y en su distribución intracelular, y que es posible dirigir las nanopartículas a objetivos intracelulares específicos (lisosomas, mitocondrias, citosol, etc.) modificando sus propiedades superficiales [63–65]. La elevada capacidad de internalización de las NCs recubiertas de quitosano ya ha sido puesta de manifiesto en otros capítulos de esta tesis, pero aquí se exploró también la internalización y distribución intracelular de las NCs recubiertas de xantano, analizando la influencia de las distintas cubiertas en el destino de las NCs y su carga de siRNA una vez dentro de la célula.

Para descartar la posibilidad de que el siRNA estuviera siendo liberado de las NCs en el medio de cultivo y las NCs estuvieran entrando en las células sin su carga, tanto las NCs como el siRNA fueron marcados fluorescentemente y rastreados en cultivos celulares. El objetivo era investigar si el siRNA permanece encapsulado una vez que las NCs entran en contacto con el medio de cultivo y si durante el proceso de internalización se localiza en el mismo compartimento celular que las nanocápsulas (en este caso, las NCs y el siRNA marcados fluorescentemente deberían colocalizar) o, por el contrario, se libera de las NCs y se dirige a un compartimento celular distinto. He y colaboradores también utilizaron nanopartículas poliméricas y siRNA marcados fluorescentemente para evaluar mediante microscopía de fluorescencia la internalización celular y disociación del siRNA de su nanotransportador [48].

El atrapamiento y la degradación de las nanomedicinas en los compartimentos endolisosomales son las principales barreras para el transporte eficiente de los ácidos nucleicos al citosol y son, en gran medida, responsables de la baja eficiencia de transfección de los nanotransportadores no virales en comparación con los vectores virales [66]. Para profundizar en este estudio, las vesículas intracelulares implicadas en

la endocitosis (endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas) también se marcaron fluorescentemente para descubrir cuál era el destino de las NCs y el siRNA en el interior de las células y si conseguían escapar de los endolisosomas para poder llevar a cabo el silenciamiento génico. Para favorecer que el siRNA alcance su diana subcelular, es esencial obtener una mejor comprensión de la distribución intracelular de los nanotransportadores a través del marcaje fluorescente tanto del nanotransportador y su carga como de los orgánulos celulares en los que se encuentran para su estudio mediante microscopía de fluorescencia.

#### 2.4.1. Marcaje fluorescente de las NCs y el siRNA

Para poder rastrear el siRNA, se utilizó la misma secuencia de siRNA, específica de GFP, marcada con el fluoróforo Cy3 en uno de sus extremos (excitación a 550 nm, emisión a 575 nm). Para rastrear las NCs, se decidió encapsular el fluoróforo DiD (excitación a 650 nm, emisión a 675 nm) para minimizar el solapamiento de su fluorescencia con el resto de los fluoróforos (teniendo en cuenta que las vesículas intracelulares iban a ser marcadas con proteínas o sondas con emisión a 509 nm).

Para evaluar si las NCs admitían el marcaje simultáneo con ambas moléculas fluorescentes, se sintetizaron NCs recubiertas de quitosano y de xantano cargadas con siRNA-Cy3 y DiD. Las NCs obtenidas fueron caracterizadas a la misma concentración (100 µg/mL) mediante espectrofotometría de fluorescencia (Figura 10).

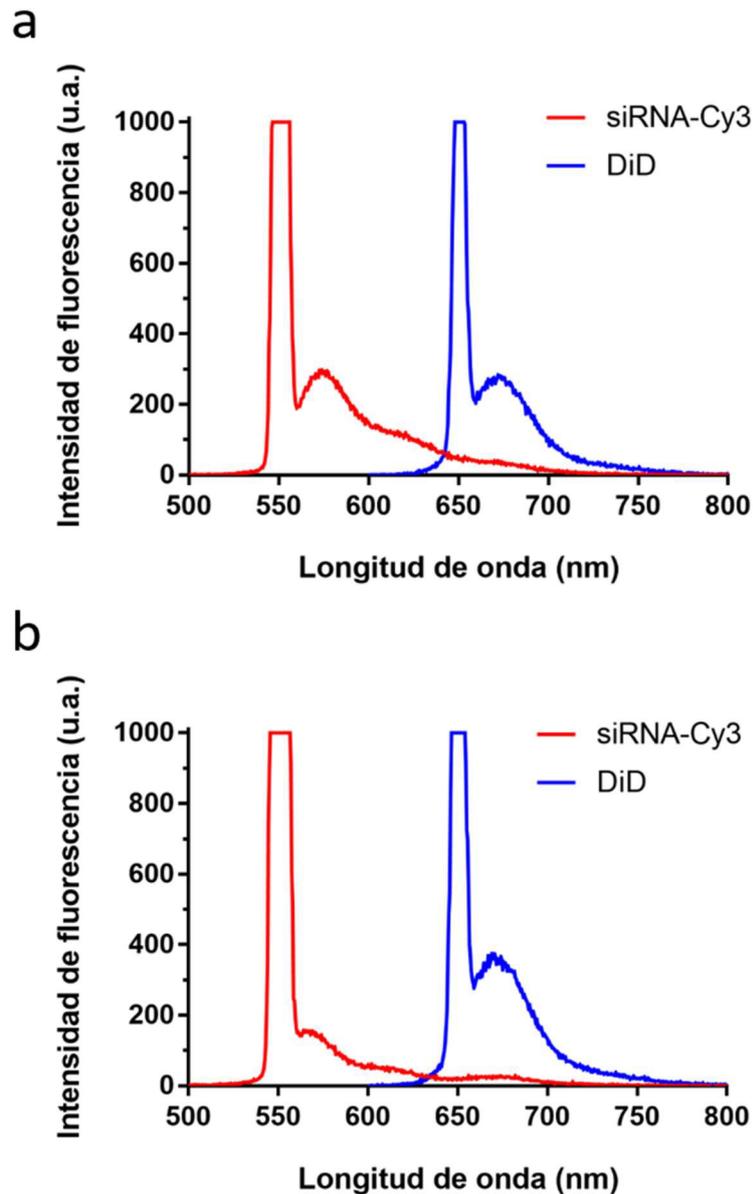


Figura 10. Espectros de fluorescencia de NCs recubiertas de quitosano (a) y de xantano (b) cargadas simultáneamente con siRNA-Cy3 (rojo) y DiD (azul).

Los espectros de fluorescencia de la Figura 10 muestran que ambas moléculas fluorescentes fueron encapsuladas con éxito. El siRNA-Cy3 encapsulado muestra un pico de emisión a 575 nm y el DiD encapsulado muestra un pico de emisión alrededor de los 675 nm. El marcaje simultáneo proporciona la ventaja de poder rastrear el siRNA y las NCs a partir de la misma muestra en vez de utilizar dos muestras distintas, una con el siRNA marcado y otra con las NCs marcadas, que podrían interactuar de forma diferente con las células. Gracias al éxito del marcaje simultáneo, se pudo estudiar la localización de las NCs y el siRNA en cultivos celulares.

### 2.4.2. Colocalización en células HeLa

El objetivo de este estudio era saber si tanto el siRNA como las NCs internalizaban en las células y si se ubicaban en el mismo compartimento celular durante el proceso. La asociación entre una molécula y un compartimento celular específico es habitualmente determinada comparando la distribución de la molécula marcada fluorescentemente con la distribución de una sonda fluorescente que marque el compartimento de interés [67].

Para ello, además de disponer de las siRNA-NCs con el doble marcaje (NCs marcadas con DiD y siRNA marcado con Cy3), fue necesario marcar los compartimentos celulares en los que podrían encontrarse las NCs y el siRNA. Se esperaba que estos compartimentos fueran los endosomas y los lisosomas (denominados en su conjunto como endolisosomas), ya que son vesículas intracelulares que juegan un papel fundamental en la endocitosis. Sin embargo, las primeras observaciones de la distribución intracelular del siRNA nos hicieron sospechar que también podría estar acumulándose en las mitocondrias, por lo que se decidió marcar también este compartimento intracelular.

Para marcar los endosomas, se utilizaron plásmidos que expresan proteínas específicas de endosomas tempranos (Rab5a) y endosomas tardíos (Rab7a) fusionadas a una proteína GFP. Hay que señalar que a pesar de la gran especificidad en el marcaje que proporcionan estos plásmidos, una de sus limitaciones es que su eficiencia de transfección no es del 100 % y por ello no todas las células quedan marcadas. Durante las pruebas preliminares se determinó la cantidad óptima de plásmido para conseguir un marcaje intenso, pero sin llegar a la saturación, en el mayor número de células posible. Los lisosomas fueron marcados utilizando LysoTracker® Green, una sonda fluorescente que marca en verde los compartimentos ácidos de la célula. Por último, se marcaron también las mitocondrias utilizando MitoTracker® Green. Debido a que los marcajes de los compartimentos celulares emitían fluorescencia en el canal verde, se utilizaron células HeLa (en lugar de las HeLa-GFP utilizadas para cuantificar el silenciamiento) y el marcaje de cada compartimento fue realizado en paralelo.

En el campo de la microscopía de fluorescencia, la colocalización es comúnmente entendida como la presencia de dos o más fluoróforos en la misma localización. La colocalización de dos fluoróforos puede ser identificada por la detección de estructuras cuyo color refleja la contribución combinada de ambos fluoróforos cuando las imágenes de cada uno de ellos se superponen [67]. Para el tratamiento de las imágenes de este apartado, a cada fluoróforo se le asignó un color, de forma que el producto de la combinación de varios colores indica que existe colocalización. Los colores usados en el análisis y su correspondencia con compartimentos celulares, nanotransportadores y ácidos nucleicos se resumen esquemáticamente en la Figura 11, junto con los colores que indican su colocalización.

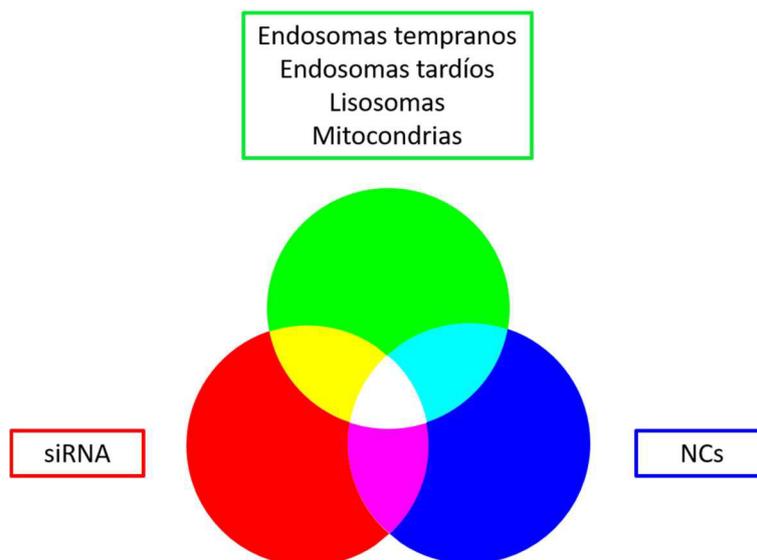
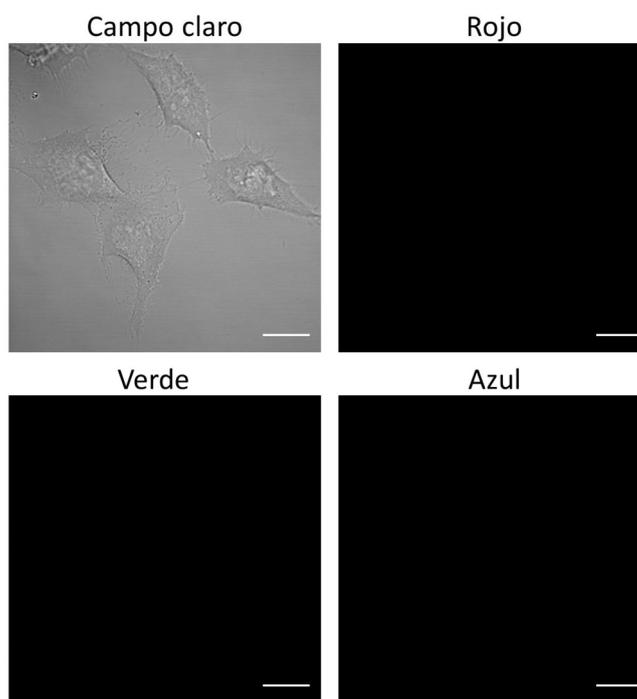


Figura 11. Esquema que representa la combinación de colores utilizados en el estudio de colocalización.

Además, el nivel de colocalización fue cuantificado utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson (PCC), que indica el grado de correlación entre la intensidad de los píxeles de dos canales [68]. El valor del PCC puede oscilar entre -1 y 1. Un valor de 1 significaría que los patrones de fluorescencia son totalmente similares (colocalización perfecta), un valor de -1 significaría que los patrones son totalmente opuestos (exclusión perfecta), mientras que un valor cercano a 0 indica que no hay ninguna correlación en los patrones entre ambos canales (localización aleatoria), lo que también implica ausencia de colocalización [67,69]. Por lo tanto, el grado de colocalización aumenta conforme el PCC se aproxima a 1.

Las células HeLa fueron incubadas con NCs cargadas de DiD y siRNA-Cy3 a una concentración de nanotransportador de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 4 horas, reproduciendo las condiciones de los experimentos de silenciamiento realizados anteriormente. Como control positivo, se utilizó Lipofectamina<sup>®</sup> para transfectar el siRNA. Después de las 4 horas de transfección, las células fueron lavadas para eliminar todos los reactivos que quedaran en suspensión y se tomaron imágenes de las células vivas mediante microscopía confocal. Para el marcaje de los endosomas tempranos y tardíos (en paralelo, es decir, cada tipo de marcaje en una muestra distinta), los plásmidos fueron transfectados al menos 16 h antes de realizar la microscopía, es decir, el día anterior a la transfección del siRNA. Para el marcaje con LysoTracker<sup>®</sup> y MitoTracker<sup>®</sup> (en paralelo también), estos reactivos fueron añadidos justo después de la transfección del siRNA. En este estudio se evitó la fijación celular puesto que este proceso puede generar artefactos, por ejemplo autofluorescencia, y alterar la localización intracelular de las nanopartículas [66,70]. Por lo tanto, no es aconsejable fijar las células cuando se realizan estudios de colocalización. Además, algunos marcadores fluorescentes, como el LysoTracker<sup>®</sup>, no son compatibles con la fijación celular [70]. Por estas razones, las células fueron observadas directamente sin fijar después de la transfección del siRNA.

Para comprobar que las muestras no generaban autofluorescencia, se tomaron imágenes de células no tratadas (Figura 12).



**Figura 12. Células HeLa no tratadas (control negativo). Imágenes adquiridas en campo claro y en los canales de fluorescencia verde, rojo y rojo lejano (a cuya fluorescencia se le asignó el color azul) mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .**

Las células no mostraron fluorescencia en ninguno de los canales de fluorescencia utilizados, confirmando la ausencia de artefactos de autofluorescencia.

Las Figuras 13-18 muestran imágenes de microscopía representativas del análisis de colocalización de las NCs de quitosano y de xantano, así como del siRNA transportado por ellas, con endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas.

NCs de quitosano, endosomas tempranos

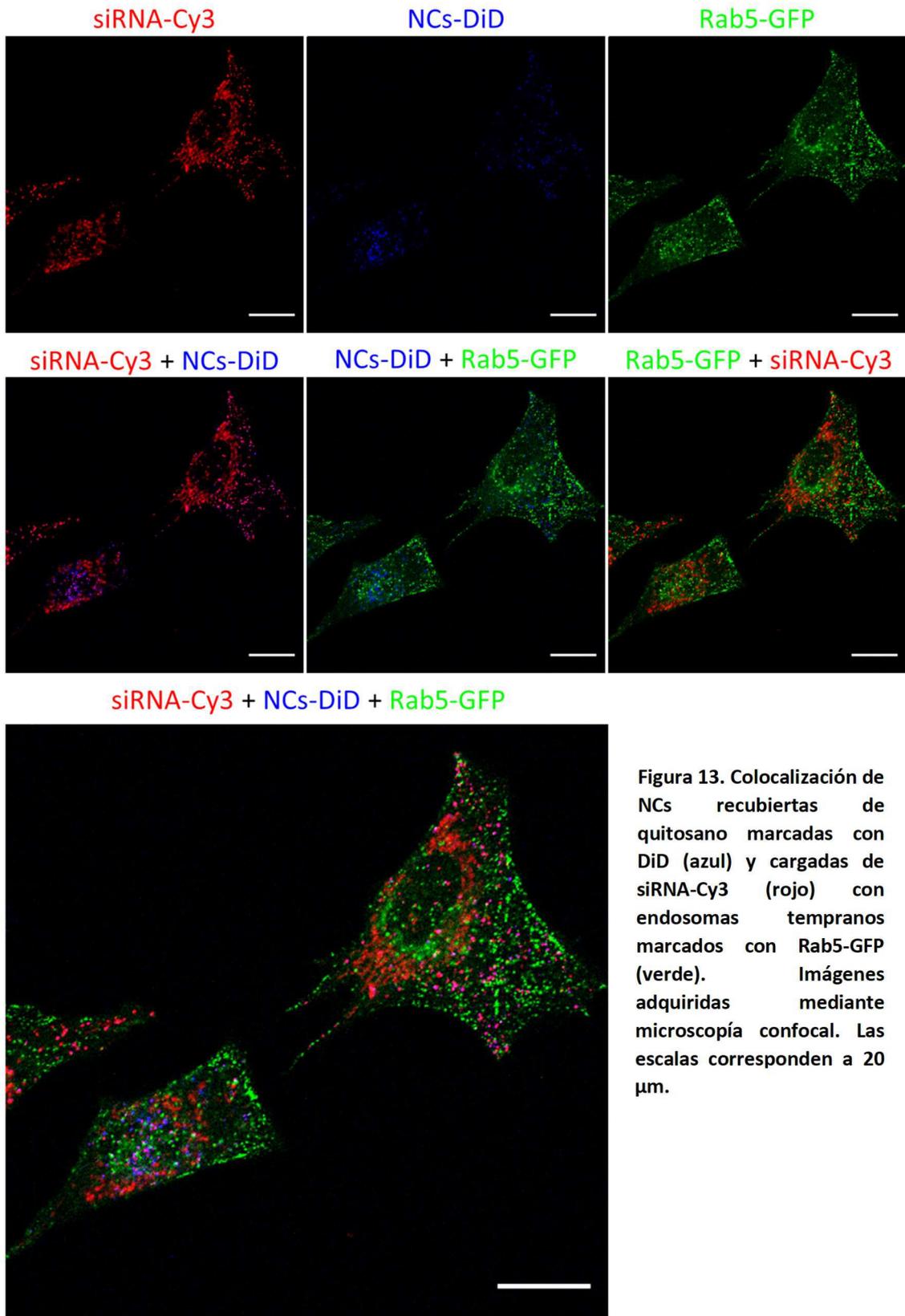


Figura 13. Colocalización de NCs recubiertas de quitosano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con endosomas tempranos marcados con Rab5-GFP (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

NCs de xantano, endosomas tempranos

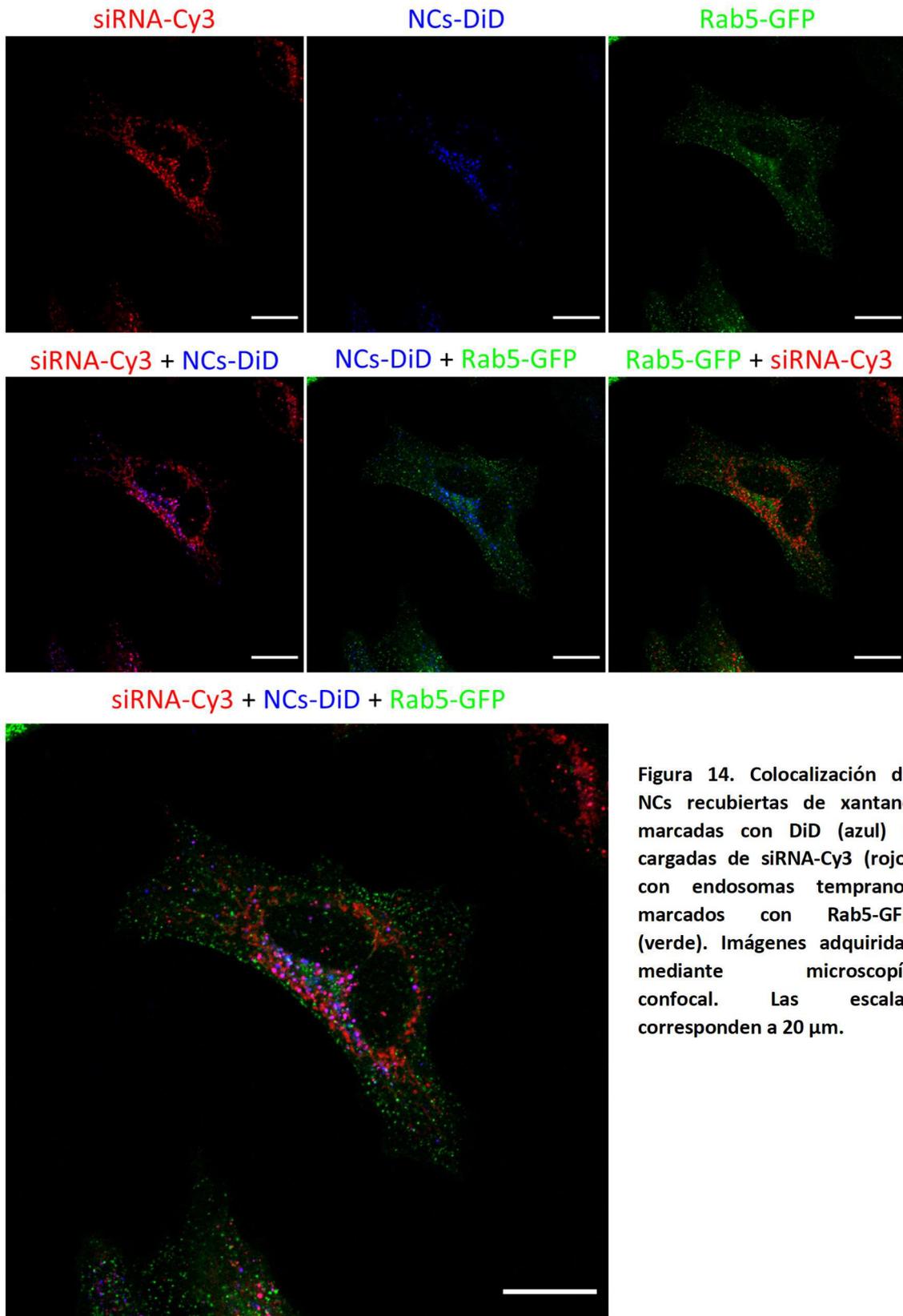


Figura 14. Colocalización de NCs recubiertas de xantano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con endosomas tempranos marcados con Rab5-GFP (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu$ m.

### NCs de quitosano, endosomas tardíos

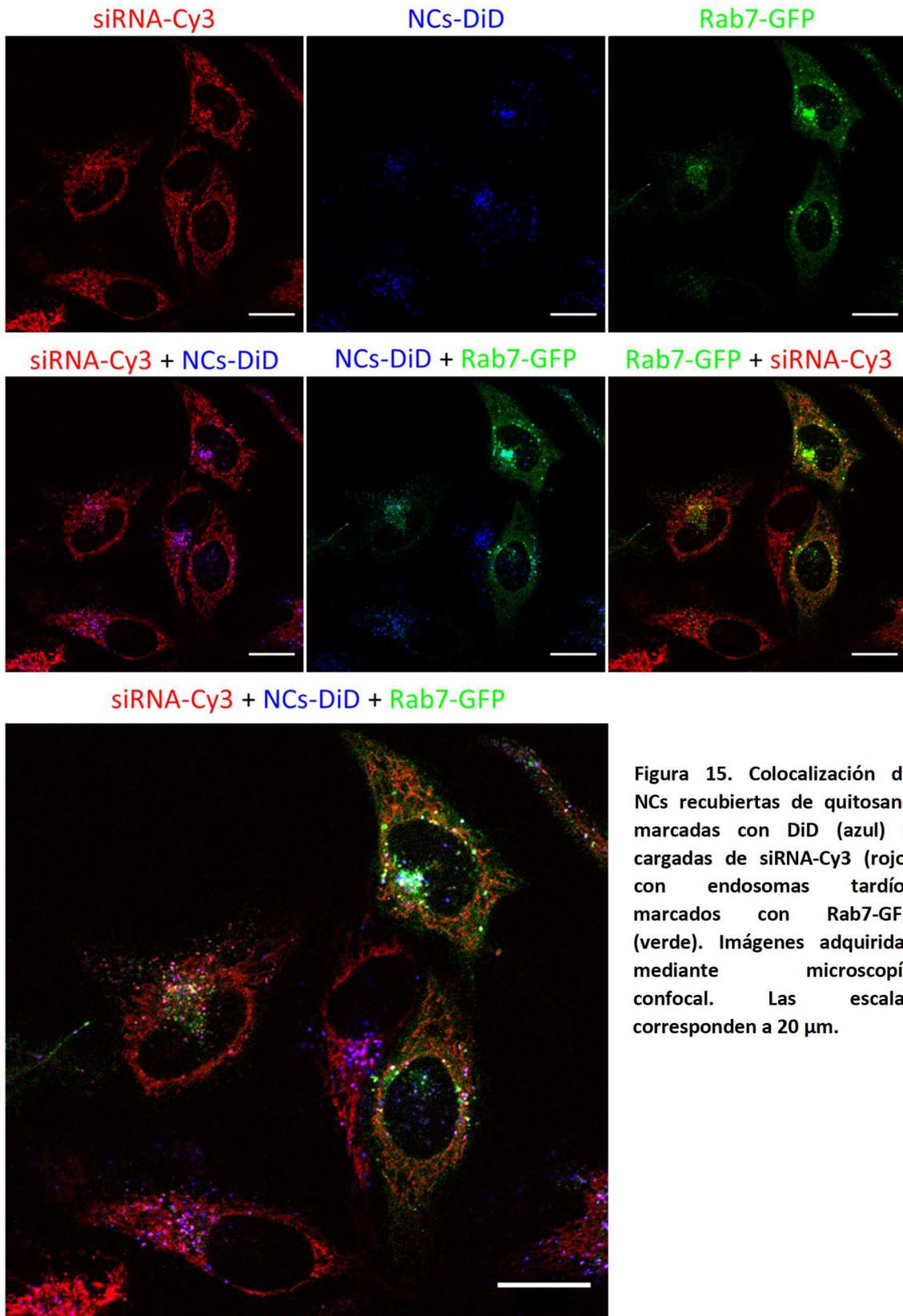


Figura 15. Colocalización de NCs recubiertas de quitosano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con endosomas tardíos marcados con Rab7-GFP (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu$ m.

NCs de xantano, endosomas tardíos

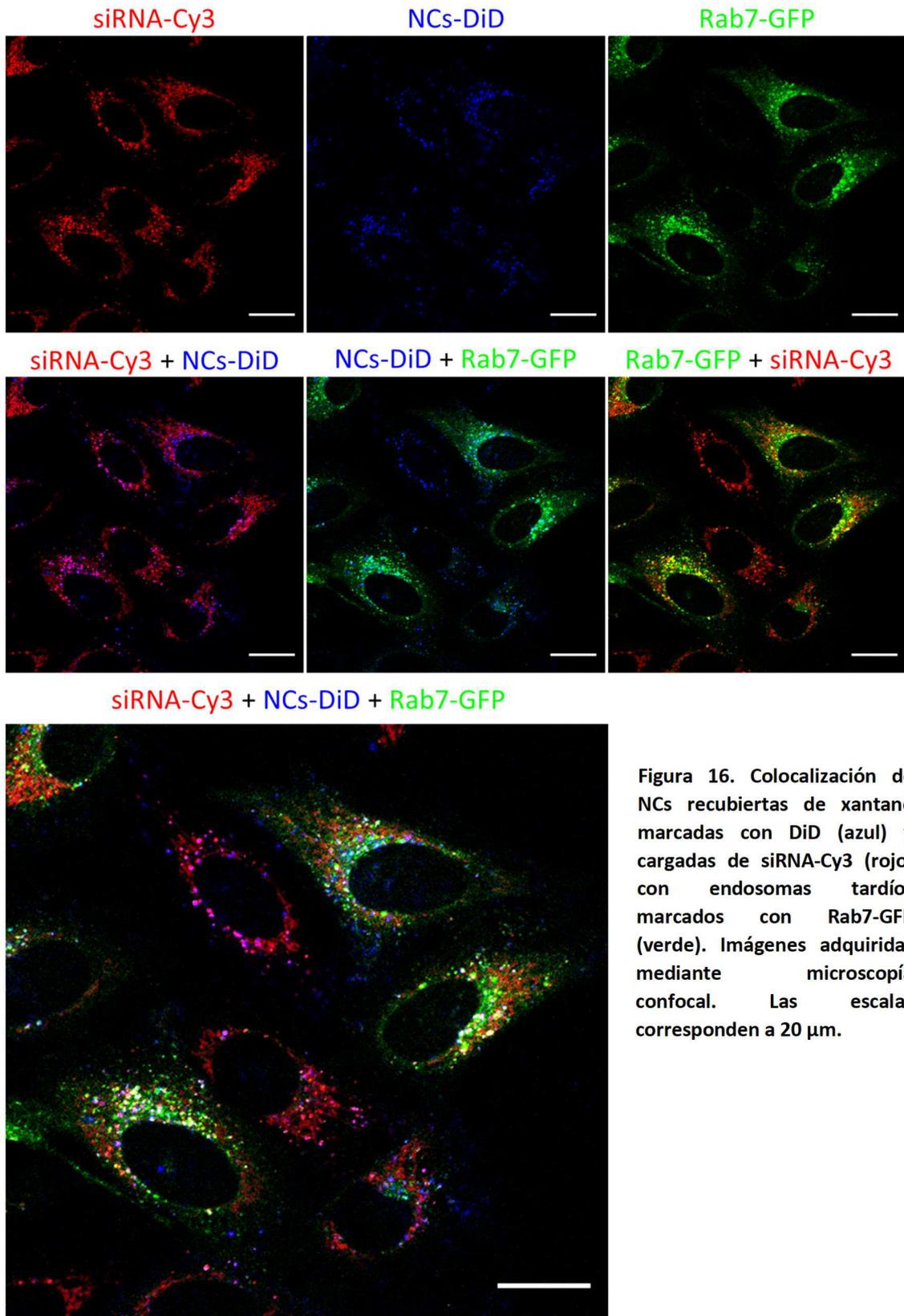


Figura 16. Colocalización de NCs recubiertas de xantano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con endosomas tardíos marcados con Rab7-GFP (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu$ m.

### NCs de quitosano, lisosomas

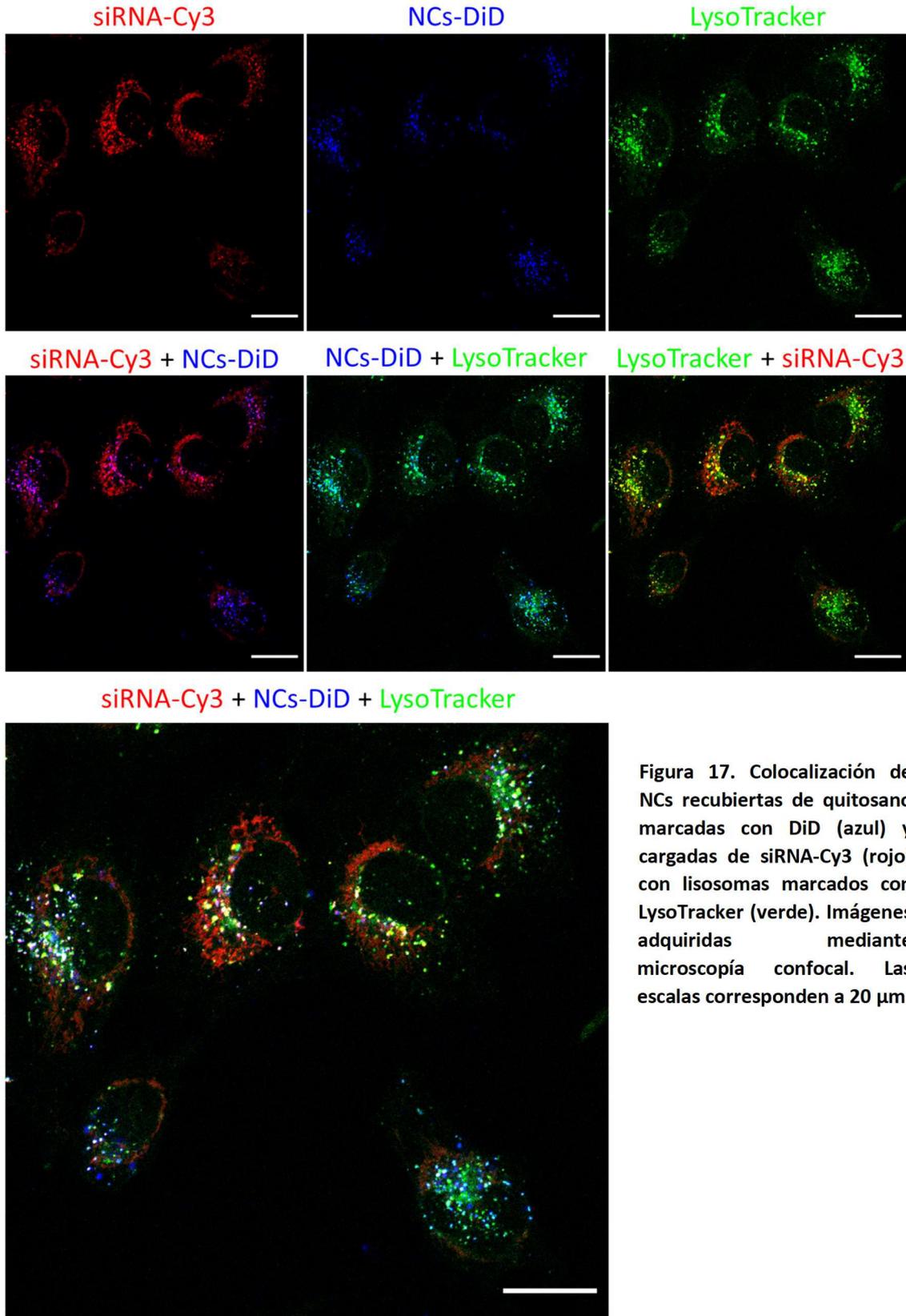


Figura 17. Colocalización de NCs recubiertas de quitosano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con lisosomas marcados con LysoTracker (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

### NCs de xantano, lisosomas

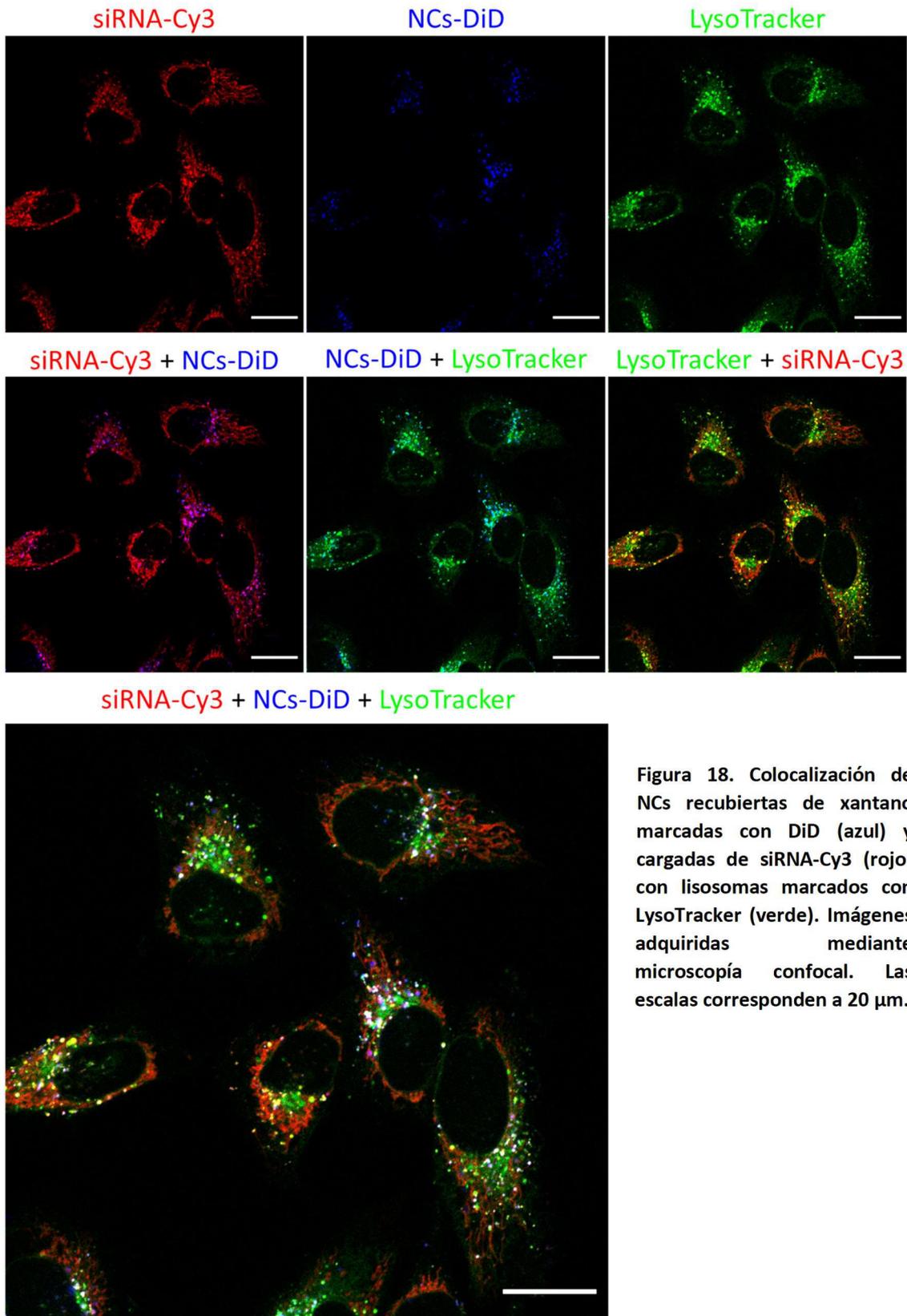
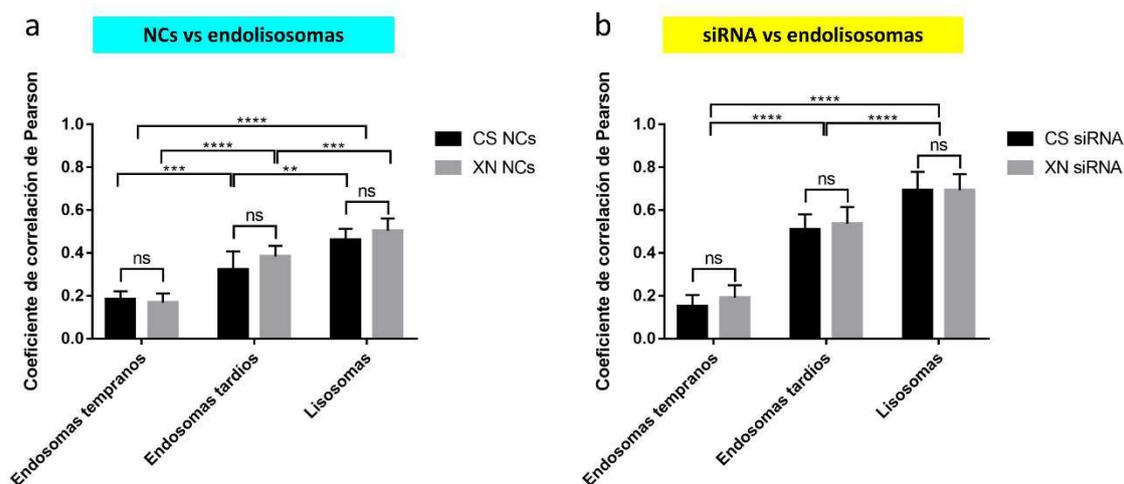


Figura 18. Colocalización de NCs recubiertas de xantano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con lisosomas marcados con LysoTracker (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

Como se puede apreciar en las imágenes de microscopía, el siRNA (rojo) estaba siendo claramente internalizado en las células, lo que permitió descartar la hipótesis de que éste pudiera ser liberado de las NCs en el medio de cultivo y que las NCs estuvieran entrando en las células sin su carga.

Además, todas las muestras tratadas con NCs muestran colocalización parcial entre NCs y siRNA (magenta), correspondiente a un PCC de  $0.52 \pm 0.06$ . Existe una mayor proporción de NCs colocalizadas con el siRNA (la mayoría de los puntos azules colocalizan con puntos rojos) en comparación con una menor proporción de siRNA colocalizado con las NCs (sólo algunos puntos rojos colocalizan con puntos azules, el resto de fluorescencia roja no), lo que sugiere que gran parte del siRNA ha sido liberado de las NCs y tan sólo queda una pequeña parte del siRNA atrapada en las NCs. Este hecho resulta muy favorable para conseguir un silenciamiento génico adecuado, ya que es un requisito clave que el siRNA se disocie de la NC una vez dentro de la célula para que pueda interactuar sin impedimentos con el complejo RISC. Wang y colaboradores observaron un patrón de fluorescencia similar, donde parte del siRNA no colocalizaba con su nanotransportador, y también lo atribuyeron a la liberación del siRNA, que constituye un paso fundamental para lograr el silenciamiento génico [71].

Por otro lado, se analizó la colocalización de las NCs recubiertas de quitosano o de xantano, así como del siRNA transportado por ellas, con los endolisosomas. En las imágenes de microscopía se puede constatar que apenas hay colocalización en los endosomas tempranos, ni por parte del siRNA ni de las NCs, independientemente de que las NCs estuvieran recubiertas de quitosano o de xantano (Figura 13 y Figura 14). Sin embargo, se puede apreciar una leve colocalización en endosomas tardíos (Figura 15 y Figura 16) y algo más en el caso de lisosomas (Figura 17 y Figura 18), tanto del siRNA como de las NCs. Estas observaciones fueron confirmadas mediante el análisis cuantitativo de la colocalización de las imágenes de microscopía. La Figura 19 muestra el PCC obtenido al cuantificar el grado de colocalización entre las NCs marcadas con DiD (a) o el siRNA-Cy3 (b) con los endolisosomas.



**Figura 19.** Colocalización de NCs recubiertas de quitosano (CS) o de xantano (XN) marcadas con DiD (a) o del siRNA-Cy3 transportado por ellas (b) con endosomas tempranos, endosomas tardíos o lisosomas. El análisis cuantitativo de la colocalización se realizó mediante determinación del Coeficiente de correlación de Pearson (PCC). Los valores representados son el promedio y desviación estándar del PCC calculado a partir del análisis de 10-20 células por muestra. Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas (ns, no significativo; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , prueba t de Student desapareada).

En cuanto a la posibilidad de que el tipo de recubrimiento de la nanocápsula afectara a su localización intracelular o a la de su carga, ninguna de las gráficas muestra una diferencia significativa en la colocalización de las NCs o el siRNA con cada uno de los compartimentos celulares según si se han utilizado NCs recubiertas de quitosano o de xantano. Esto indica que la distribución intracelular tanto del siRNA transportado como de la propia NC es similar independientemente del tipo de polímero utilizado para recubrir las NCs.

Además, se observa una tendencia muy parecida en el nivel de colocalización de las NCs (Figura 19a) y el siRNA (Figura 19b) entre los distintos orgánulos, obteniendo valores crecientes del PCC, y por tanto, de colocalización, en el siguiente orden: endosomas tempranos < endosomas tardíos < lisosomas.

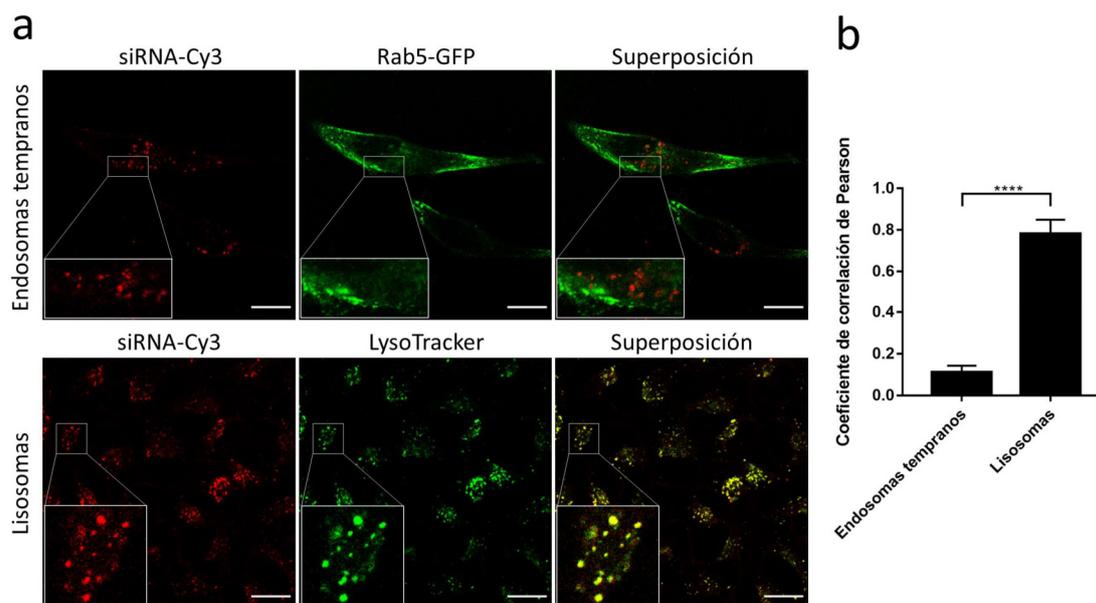
Los valores del PCC obtenidos para los endosomas tempranos (0.15-0.20) se encuentran cercanos a 0, lo que indica que el grado de colocalización es muy bajo. Es posible que debido a que las células se observaron 4 h después del inicio de la transfección, los endosomas tempranos que hubieran albergado NCs y/o siRNA hubieran madurado ya a endosomas tardíos o lisosomas. Vercauteren y colaboradores observaron una fuerte colocalización de sus nanotransportadores poliméricos con endosomas tempranos (mediante marcaje de la proteína Rab5, igual que en nuestro caso) durante los primeros 30 minutos tras el inicio de la transfección, que fue progresivamente sustituida por una colocalización mayoritaria con endosomas tardíos y lisosomas tras 2 h [66]. Sin embargo, al repetir el ensayo de colocalización observando las células 30 min después del inicio de la transfección, tampoco se obtuvo una

colocalización remarcable con endosomas tempranos. Una posibilidad es que la maduración de los endosomas tempranos que contienen las siRNA-NCs a endosomas tardíos sea tan rápida en este caso que no haya permitido la detección de colocalización en endosomas tempranos. Otra posibilidad es que la ruta de endocitosis de las siRNA-NCs sea independiente de Rab5 y, por ende, de endosomas tempranos. Los endosomas tempranos están generalmente asociados a endocitosis mediada por clatrina, por lo que su ausencia puede considerarse un indicio de que las NCs no son internalizadas por esta ruta [72]. No obstante, existen otras vías endocíticas en las que no intervienen los endosomas tempranos y las vesículas se fusionan directamente con lisosomas, como la fagocitosis, la macropinocitosis, la endocitosis mediada por caveolina o la endocitosis independiente de clatrina y caveolina [73].

La colocalización en endosomas tardíos (PCC 0.30-0.55) fue mayor que en endosomas tempranos (PCC 0.15-0.20), como puede observarse también en las imágenes de microscopía (Figura 15 y Figura 16). Parte de las NCs se encuentran en el interior de los endosomas tardíos (color cian en la imagen combinada de los canales verde y azul), así como una cierta proporción del siRNA (color amarillo en la imagen combinada de los canales verde y rojo), precisamente la que se encuentra todavía encapsulada ya que a la vez colocaliza con las NCs (color magenta en la imagen combinada de los canales azul y rojo, color blanco en la imagen combinada de los tres canales). Sin embargo, también se observa una elevada proporción de siRNA que no colocaliza ni con las vesículas ni con las NCs (color rojo en las imágenes que combinan este canal con cualquier otro). Tanto las NCs de quitosano como las de xantano presentan la misma distribución intracelular.

La colocalización de las NCs y el siRNA en los lisosomas (Figura 17 y Figura 18) sigue un patrón similar al de los endosomas tardíos, pero con mayor nivel de colocalización (PCC 0.45-0.70).

Por otro lado, también se analizó la distribución intracelular del siRNA transfectado con Lipofectamina® (LPF, Figura 20), con la intención de identificar posibles diferencias que pudieran ser las causantes de su mayor efecto de silenciamiento con respecto al siRNA transfectado con las NCs. Si el siRNA transfectado con LPF conseguía interferir con su mRNA diana, tenía que haber conseguido escapar de las vesículas endolisosomales y encontrarse en el citoplasma de la célula.



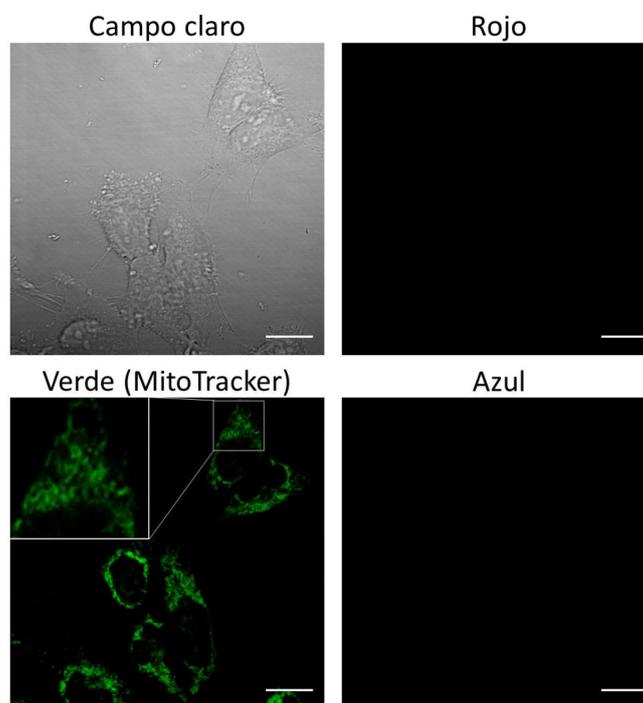
**Figura 20.** Colocalización de siRNA-Cy3 (rojo) transfectado con Lipofectamina® con endosomas tempranos marcados con Rab5-GFP (verde) o lisosomas marcados con LysoTracker (verde). a) Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. b) Análisis cuantitativo mediante determinación del Coeficiente de correlación de Pearson (PCC). Los valores representados son el promedio y desviación estándar del PCC calculado a partir del análisis de 10-20 células por muestra. Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas (\*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , prueba t de Student desapareada). Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

Sorprendentemente, el siRNA no sólo no se encontraba en el citoplasma, sino que además presentaba una distribución en las vesículas endocíticas muy similar a la observada con las NCs: la colocalización con endosomas tempranos era mínima (PCC 0.11), mientras que la colocalización con lisosomas era mucho mayor (PCC 0.78), como demuestran cualitativamente las imágenes de microscopía (Figura 20a) y cuantitativamente los valores del PCC en la Figura 20b.

No obstante, se observaron diferencias importantes en comparación con las muestras tratadas con NCs: la fluorescencia roja del siRNA transfectado con LPF aparecía principalmente con forma de puntos, no de fibras, y prácticamente todo el siRNA colocalizaba con lisosomas.

Por el contrario, en las células tratadas con NCs, la fluorescencia roja que no colocaliza con la fluorescencia azul, es decir, el siRNA libre, tiende a encontrarse distribuida por la célula en forma de estructuras fibrosas, muy distinta de la fluorescencia punteada que se observa cuando colocaliza con las vesículas y las NCs (Figuras 13-18). Esto parece indicar que el siRNA que ha sido liberado de la NC no se encuentra dentro de vesículas esféricas, como son las vesículas endocíticas, sino en compartimentos más alargados. Hay que remarcar que este hecho sólo fue observado tras el tratamiento con NCs, tanto de quitosano como de xantano, pero no tras el tratamiento con Lipofectamina®, donde la fluorescencia roja es principalmente punteada, lo que sugiere que este

comportamiento del siRNA está relacionado con su medio de transporte y no con su secuencia. Además, dado que ocurre lo mismo con las NCs recubiertas de quitosano y de xantano, es posible que sea el núcleo de nanoemulsión de las NCs el que esté jugando un papel importante en el destino intracelular del siRNA. Uno de los compartimentos celulares con forma alargada son las mitocondrias, y precisamente el tipo de distribución de la fluorescencia roja se asemeja al obtenido en otros trabajos donde han realizado un marcaje mitocondrial [74,75]. Por esta razón, se decidió marcar las mitocondrias y evaluar si el siRNA liberado se encontraba allí. En primer lugar, como control se utilizaron células no tratadas con NCs ni con siRNA para comprobar que el marcaje de las mitocondrias con MitoTracker® no produjera artefactos en la fluorescencia (Figura 21). Para reducir al máximo el cruce entre los espectros de fluorescencia de los distintos fluoróforos, estos fueron excitados en modo secuencial y sus señales de emisión fueron recogidas con filtros de emisión de banda estrecha.



**Figura 21.** Células HeLa tratadas solamente con MitoTracker para marcar las mitocondrias. Imágenes adquiridas en campo claro y en los canales de fluorescencia verde, rojo y rojo lejano (a cuya fluorescencia se le asignó el color azul) mediante microscopía confocal. Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

En las imágenes se puede constatar que la fluorescencia del MitoTracker® sólo aparece en el canal verde y no invade el resto de canales utilizados, evitando así posibles interferencias entre canales. También se puede observar el patrón de fluorescencia con forma alargada característico del marcaje mitocondrial.

A continuación, se tomaron imágenes de células tratadas con siRNA-NCs y marcadas con MitoTracker (Figuras 22-23) y se analizó cuantitativamente la colocalización (Figura 24).

NCs de quitosano, mitocondrias

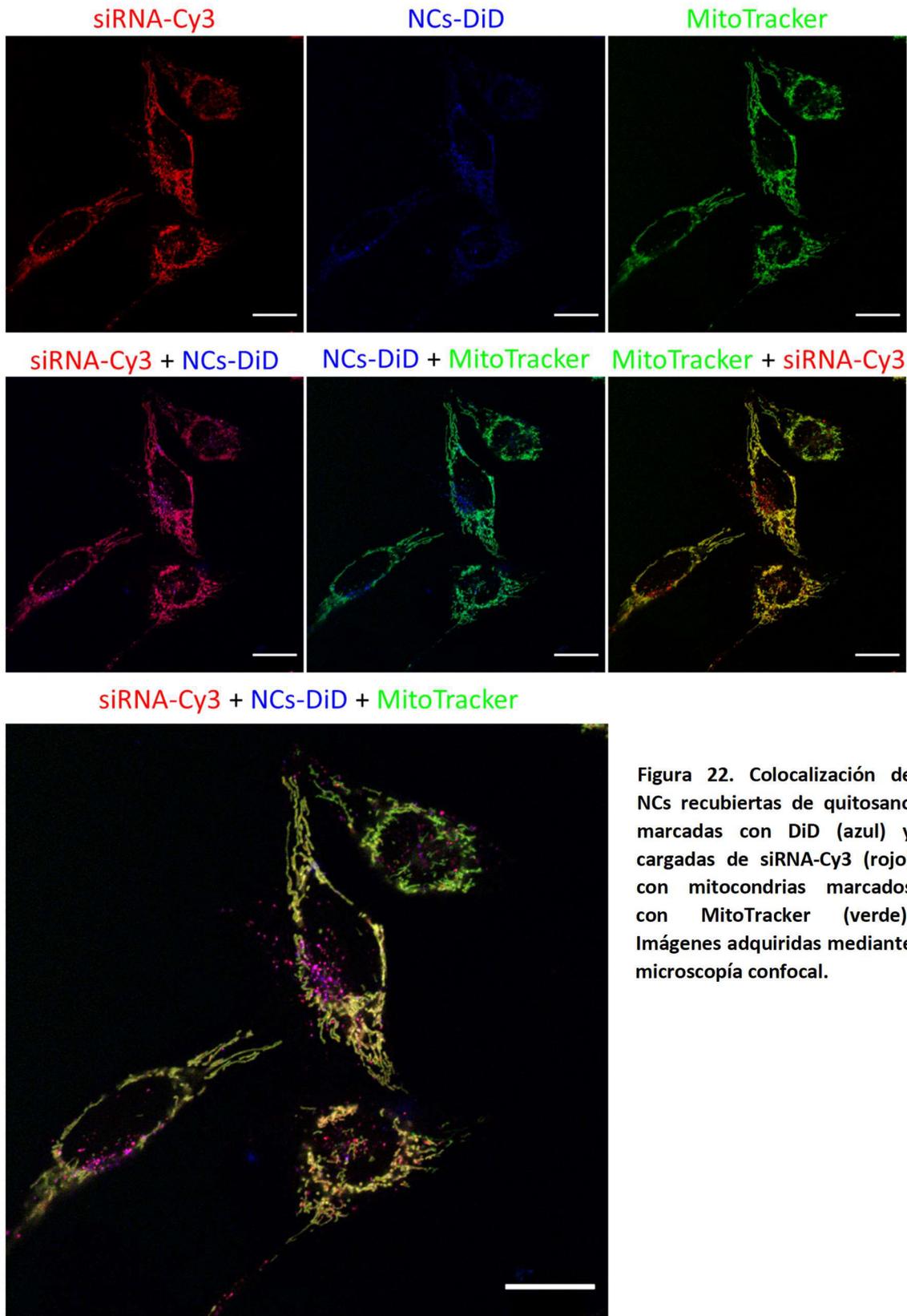


Figura 22. Colocalización de NCs recubiertas de quitosano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con mitocondrias marcados con MitoTracker (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.

NCs de xantano, mitocondrias

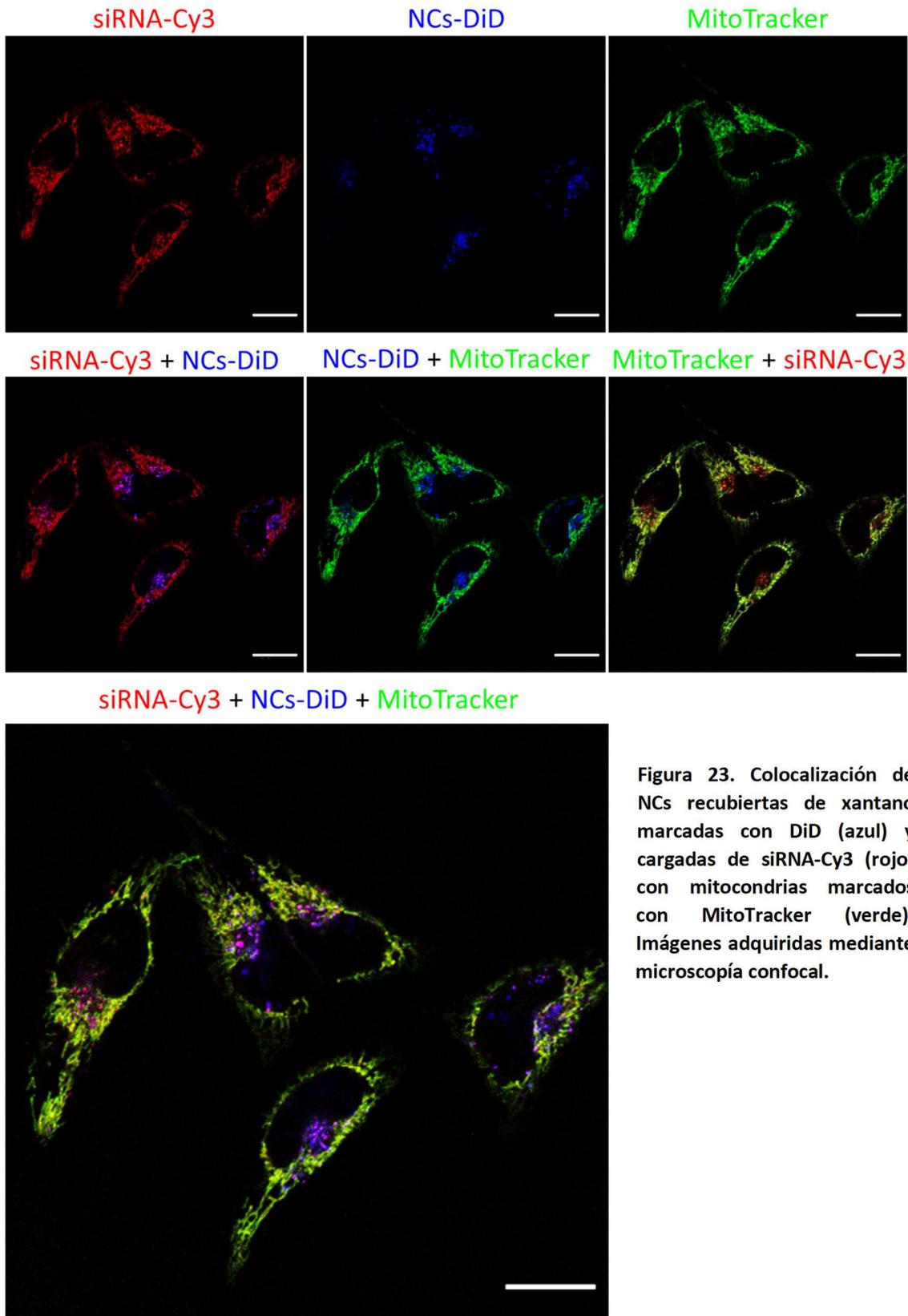


Figura 23. Colocalización de NCs recubiertas de xantano marcadas con DiD (azul) y cargadas de siRNA-Cy3 (rojo) con mitocondrias marcados con MitoTracker (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.

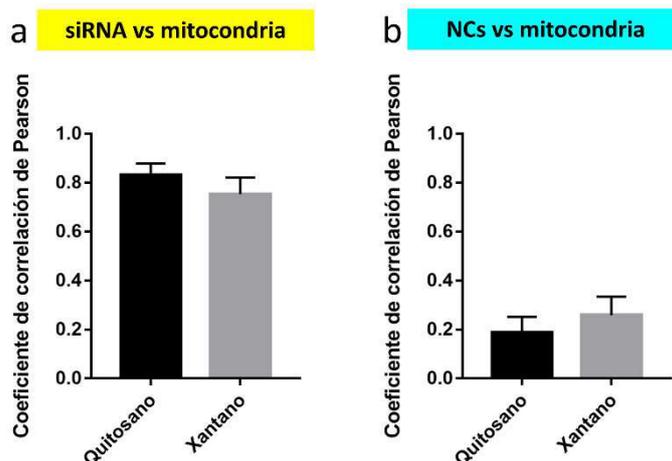
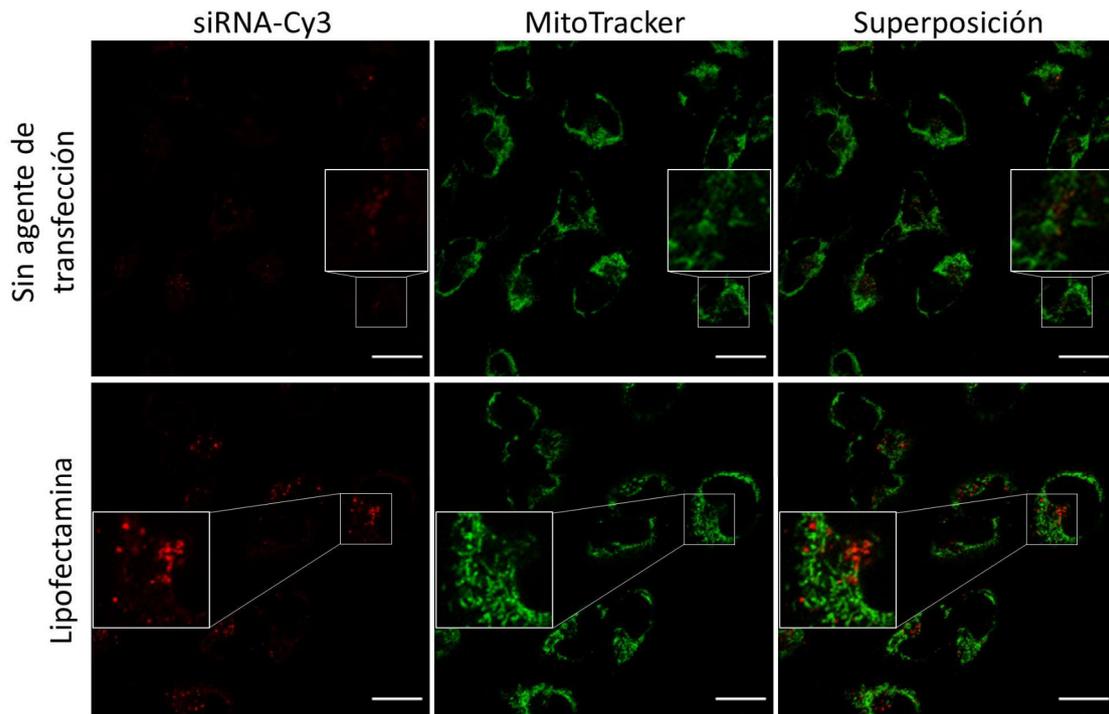


Figura 24. Análisis cuantitativo de la colocalización de NCs recubiertas de quitosano o de xantano marcadas con DiD (b) o del siRNA-Cy3 transportado por ellas (a) con mitocondrias. Los valores representados son el promedio y desviación estándar del Coeficiente de correlación de Pearson (PCC) calculado a partir del análisis de 10-20 células por muestra.

Efectivamente, el alto grado de colocalización entre el siRNA transfectado con NCs (tanto quitosano como xantano) y las mitocondrias demostró que el siRNA se encontraba principalmente en este compartimento celular, como puede observarse tanto en la gráfica de la Figura 24, que muestra los elevados valores del PCC obtenidos en estas muestras (PCC 0.83 para el quitosano y 0.76 para el xantano), como en las imágenes de confocal (Figura 22 y Figura 23). No obstante, hay que remarcar que el grado de colocalización en mitocondrias no es total, ya que el PCC es inferior a 1 y en las imágenes también se puede observar fluorescencia roja punteada que no colocaliza con las mitocondrias. En base a los resultados del estudio anterior, esta fluorescencia punteada probablemente corresponde a la proporción de siRNA que se encuentra en los endosomas tardíos y lisosomas. Curiosamente, las NCs marcadas con DiD no colocalizan con las mitocondrias (fluorescencia azul en vez de cian, PCC 0.20-0.25), sino que colocalizan parcialmente con endosomas tardíos y lisosomas (previamente demostrado en este apartado), lo que indica que gran parte del siRNA encapsulado ha sido liberado de las NCs en el interior de la célula y se dirige hacia las mitocondrias. Para demostrar que la localización mitocondrial sólo se da cuando el siRNA ha sido transfectado por las NCs, se marcaron las mitocondrias de células que habían sido transfectadas con siRNA utilizando Lipofectamina® y células que habían sido incubadas con la misma concentración de siRNA sin usar ningún agente de transfección (Figura 25).



**Figura 25. Colocalización de siRNA-Cy3 (rojo) internalizado sin agente de transfección o transfectado con Lipofectamina® con mitocondrias marcadas con MitoTracker (verde). Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.**

En la Figura 25 se puede apreciar que, en ausencia de agente de transfección, el siRNA apenas entra en las células, tal y como se esperaba ya que esta es una de las principales limitaciones de la tecnología del RNA interferente [76]. En cambio, la fluorescencia del siRNA dentro de las células es mucho mayor cuando este ha sido transfectado mediante Lipofectamina® o mediante NCs (Figuras 22-23), lo que revela la gran capacidad de estos vectores para transportar el siRNA al interior de las células. En cuanto a las células transfectadas con Lipofectamina®, nuevamente se observa la fluorescencia roja de forma punteada y no colocaliza de forma notoria con las mitocondrias (PCC 0.29, frente al PCC de 0.75-0.85 de las NCs).

Una hipótesis para explicar la localización del siRNA en las mitocondrias exclusivamente al utilizar NCs como agente de transfección podría ser que el siRNA, al liberarse de las NCs, esté arrastrando con él alguno de los componentes de las NCs y que sea este componente el que lo dirija a las mitocondrias. Actualmente se están utilizando moléculas catiónicas y anfifílicas para transportar ácidos nucleicos a las mitocondrias, aprovechando la carga negativa de la matriz mitocondrial, incluyendo el fluoróforo rodamina 123, surfactantes, lípidos y péptidos catiónicos [77]. El quitosano es una molécula catiónica, pero en este caso el efecto no puede ser específico del quitosano ya que también se produce con las NCs recubiertas de xantano. Es más probable que sea alguno de los componentes del núcleo de las NCs, comunes a ambos tipos de NCs, el que está arrastrando al siRNA a las mitocondrias. Los surfactantes utilizados son no-

iónicos, pero su anfifilicidad intrínseca podría favorecer su fusión con las membranas mitocondriales. Por último, pero no menos importante, las NCs están compuestas también por ácido oleico, que es un ácido graso muy importante para el metabolismo celular. De hecho, está ampliamente estudiado y confirmado el transporte de los ácidos grasos al interior de las mitocondrias porque es allí donde se realiza su  $\beta$ -oxidación [78,79], por lo que este podría ser el responsable de que el siRNA entre en las mitocondrias. Además, esta hipótesis estaría de acuerdo también con el bajo efecto de silenciamiento provocado por las NCs, ya que este componente de las NCs estaría “secuestrando” gran parte del siRNA en las mitocondrias, y además podría estar todavía unido a las pocas moléculas de siRNA que consiguen llegar al citoplasma y podría impedir que se incorporaran correctamente al complejo RISC, dificultando su hibridación con el mRNA y, en consecuencia, el silenciamiento del gen correspondiente.

### 3. CONCLUSIONES

Se ha conseguido encapsular satisfactoriamente moléculas de siRNA en NCs recubiertas de quitosano y en NCs recubiertas de xantano. La encapsulación ha sido optimizada hasta conseguir aumentar la carga de siRNA, lo que ha permitido alcanzar concentraciones elevadas de siRNA a concentraciones no citotóxicas de nanotransportador durante los estudios *in vitro*. Sin embargo, el nivel de silenciamiento génico de la GFP producido por las NCs cargadas de siRNA en cultivos celulares ha sido bajo, en el caso de las NCs de quitosano, o nulo, en el caso de las NCs de xantano.

Para adquirir una mayor comprensión del mecanismo de transporte del siRNA y poder así facilitar una optimización racional de estos nanotransportadores en el futuro, se ha estudiado la internalización y el tráfico intracelular de las NCs y el siRNA. El marcaje fluorescente de las NCs y el siRNA que transportan ha permitido verificar una excelente internalización celular, tanto para las NCs de quitosano como para las de xantano, demostrando la capacidad de ambos sistemas para facilitar la entrada del siRNA en las células. Sin embargo, los estudios de distribución intracelular han revelado que las NCs se encuentran principalmente atrapadas en los endolisosomas, junto a una parte del siRNA, mientras que gran parte del siRNA consigue escapar de ellos y se dirige a las mitocondrias. En consecuencia, la baja eficiencia de silenciamiento obtenida podría deberse a la ausencia de siRNA en su sitio de acción, el citosol, al encontrarse atrapado en otros compartimentos celulares.

Con el objetivo de liberar el siRNA de estos compartimentos celulares, en el siguiente capítulo se investiga el uso de la tecnología de internalización fotoquímica (PCI), basada en el uso de fotosensibilizadores y luz.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados para la síntesis de las nanocápsulas son los mismos que aparecen referenciados en el capítulo 2, salvo que se indique lo contrario.

El xantano (Xanthan from *Xanthomonas campestris*) y los fluoróforos Nile Red, Bodipy 493/503 y Caedogreen fueron adquiridos en Sigma. El fluoróforo DiD fue adquirido en Thermo Fisher Scientific. La Lipofectamina® 2000 fue adquirida en Invitrogen® y el CFBlue Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI en Immunostep®. El reactivo Coomassie Plus-The Better Bradford® Assay Reagent fue adquirido en Fisher Scientific, los geles de poliacrilamida 4–15 % Mini-PROTEAN™ TGX Stain-Free™ Protein Gels en Bio-Rad® y el patrón de peso molecular para los geles de poliacrilamida PageRuler™ Prestained NIR Protein Ladder en Thermo Fisher Scientific.

Todas las secuencias de siRNA fueron sintetizadas y purificadas mediante HPLC por Dharmacon® y adquiridas a través de Cultek: siRNA contra GFP (GFP Duplex I, hebra sentido: 5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCUU 3', hebra antisentido: 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGCUU 3'), siRNA control negativo (hebra sentido: 5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU(UU)-3', hebra antisentido: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU(UU)-3'; y siGENOME Non-Targeting siRNA #4), siRNA contra GFP marcado con Cy3 (hebra sentido: Cy3 5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCUU 3', hebra antisentido: 5'- GAACUUCAGGGUCAGCUUGCUU 3'). Los siRNA fueron suspendidos en agua libre de RNAasas (Sigma®) a una concentración de trabajo de 100 µM.

#### 4.1. Cultivo celular

La línea celular estable HeLa (adenocarcinoma de cérvix) con expresión constitutiva de GFP y resistencia a puromicina fue adquirida a Amsbio®. La línea celular HeLa fue adquirida a la ATCC. Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % de FBS, penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL) y glutamina (2 mM), en una incubadora humidificada (37 °C / 5% CO<sub>2</sub>).

#### 4.2. Encapsulación de siRNA en NCs recubiertas de quitosano y de xantano

Para la preparación de las NCs recubiertas de quitosano, se siguió el procedimiento general descrito en detalle en el capítulo 2, el cual se basa en la formación de un núcleo de nanoemulsión recubierto por una capa de quitosano. Brevemente, se añadió una solución orgánica que contenía 40 mg de ácido oleico y 8.6 mg de Span® 85 disueltos en 4 mL de etanol absoluto bajo agitación magnética sobre una solución acuosa que contenía 13.6 mg de Tween® 20 en 8 mL de agua. La mezcla se dejó en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente para la formación de la nanoemulsión. En este punto, se añadió a la nanoemulsión 0.5 mL de una solución de quitosano 5 mg/mL preparada con agua libre de RNAasas y ácido acético 1 %. La suspensión se dejó 15 minutos más bajo agitación y finalmente fue añadida sobre 15 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM para la gelificación ionotrópica del recubrimiento polimérico. El sólido fue separado por ultracentrifugación (30 minutos, 69673 G, 10 °C), lavado con 10 mL de agua libre de RNAasas, centrifugado nuevamente y resuspendido en 1-2 mL de agua libre de RNAasas.

El siRNA (1, 25 ó 125 nmol) fue añadido para su encapsulación durante el proceso de síntesis de las NCs (mezclado con la fase acuosa o con el quitosano). La concentración de las NCs en suspensión acuosa se determinó después de obtener el peso seco liofilizando una fracción (200  $\mu$ L) de la muestra. Las NCs estériles fueron preparadas en una campana de flujo laminar vertical y todos los reactivos y materiales utilizados habían sido previamente esterilizados mediante irradiación UV, lavado con etanol 70%, filtración a través de filtros PVDF de 0.22  $\mu$ m (Millex<sup>®</sup> Millipore<sup>®</sup>) o tratamiento térmico en seco (180 °C).

Para la preparación de las NCs recubiertas de xantano, se siguió el mismo procedimiento que para las NCs recubiertas de quitosano con algunas modificaciones. La formación de la nanoemulsión se realizó de forma idéntica. Una vez formada la nanoemulsión, se añadió 0.5 mL de una solución de xantano 5 mg/mL preparada con agua libre de RNAasas y mezclada con la cantidad deseada de siRNA (25 nmol). La suspensión se dejó 15 minutos más bajo agitación y se lavó con agua libre de RNAasas mediante ultracentrifugación (30 minutos, 69673 G, 10 °C), en las primeras síntesis, o utilizando un dispositivo de filtración por centrifugación con membrana de celulosa regenerada Ultracel<sup>®</sup> 100 (Amicon<sup>®</sup> Ultra-15, Millipore<sup>®</sup>, 100 KDa) como optimización del protocolo de síntesis. Después de dos lavados con agua, las nanocápsulas se concentraron hasta un volumen final de 1-2 mL.

#### 4.3. Caracterización físico-química de las nanocápsulas cargadas de siRNA

La eficiencia de encapsulación (EE) se entiende aquí como el porcentaje de siRNA encapsulado sobre la cantidad añadida inicialmente para la preparación de los nanotransportadores. La carga de fármaco (DL) se entiende como el porcentaje de siRNA encapsulado por peso del nanotransportador. La eficiencia de encapsulación (EE) y la cantidad de siRNA encapsulada se han determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con tinción de Gel Red y posterior estimación de la intensidad de la fluorescencia utilizando el transiluminador Gene Genius Syngene y el software ImageJ. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 minutos a 90 V utilizando geles de agarosa al 1 % y tampón TBE 0.5x pH 8.5. Las muestras se cargaron en el gel después de mezclarlas con el tampón de carga glicerol:TBE 25 % en una proporción de volumen de 10:3 (muestra:tampón de carga). Se cargaron varias réplicas de cada muestra de siRNA-NCs para poder calcular la desviación estándar del método y se midió la intensidad de la fluorescencia de la banda de siRNA que migró a través del gel. Con el fin de obtener una curva de calibrado para interpolar la intensidad de la fluorescencia de la banda de siRNA, se incluyeron varias cantidades de siRNA libre en cada gel, comprendidas entre 0.25 y 1  $\mu$ M. Además, como controles se cargaron nanocápsulas vacías y el eluido tras la filtración de nanocápsulas cargadas con siRNA. Para filtrar las NCs de quitosano se utilizaron filtros de PVDF de 0.22  $\mu$ m (Millex<sup>®</sup> Millipore<sup>®</sup>) y para las de xantano un dispositivo de filtración por centrifugación con membrana de celulosa regenerada Ultracel<sup>®</sup> 100 (Amicon<sup>®</sup> Ultra-0.5 mL, Millipore<sup>®</sup>, 50 KDa).

El tamaño del material obtenido se midió mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) con un instrumento DLS Brookhaven 90Plus a una concentración de NCs de 0.15 mg/mL. El análisis del potencial zeta se llevó a cabo utilizando un analizador Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation). En este caso se midieron las NCs a una concentración de 10 µg/mL en KCl 1mM.

#### 4.4. Evaluación del silenciamiento génico en células HeLa-GFP

##### 4.4.1. Cuantificación de la expresión de GFP y de la viabilidad celular mediante citometría de flujo

El silenciamiento génico producido por las siRNA-NCs se evaluó midiendo la intensidad de fluorescencia de GFP en células HeLa-GFP (que expresan constitutivamente GFP), después de haber sido incubadas con las NCs, y comparándola con la fluorescencia de GFP de las células no tratadas (considerada como el 100 % de intensidad de fluorescencia).

Se sembraron 20 000 células HeLa-GFP por pocillo en placas de 24 pocillos. Después de 24 horas, el medio fue sustituido por medio nuevo que contenía las NCs cargadas de siRNA o vacías a 25 ó 150 µg/mL (150 µg/mL de nanotransportador corresponden a 300 nM GFP siRNA y 445 nM C- siRNA en los lotes de NCs de quitosano utilizados y a 10 ó 80 nM GFP siRNA y 70 nM C- siRNA en los lotes de NCs de xantano), así como un control negativo sin NCs (células no tratadas). Como control positivo, las células fueron transfectadas con siRNA 10-50 nM utilizando Lipofectamina® 2000, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Después de 4 horas de incubación en la estufa, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS para eliminar los reactivos que no hubieran sido internalizados y se añadió medio de cultivo nuevo. Se mantuvieron las células en la estufa hasta el momento de ser analizadas.

Transcurridas 24, 48 y 72 h desde la transfección, se trasvasó el medio de cultivo de los pocillos a tubos de citometría, se levantaron las células con 100 µL de tripsina y se neutralizó con el medio recogido anteriormente. Las células fueron centrifugadas en los tubos de citometría 2 minutos a 3500 G. Se descartó el sobrenadante por decantación y se lavaron con 500 µL PBS. Se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones y se resuspendieron en 100 µL de tampón Anexina que contenía 2 µL de Anexina V CF Blue y 3 µL de yoduro de propidio (CFBlue Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI), previamente mezclados en un mix para asegurar una tinción homogénea entre las muestras. Tras 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se añadió 300 µL de tampón Anexina 1X a cada tubo y se analizaron en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter®). Se registraron 10.000 eventos por muestra y los datos se interpretaron utilizando el software Kaluza 1.5a (Beckman Coulter®). Para el análisis de expresión de GFP se obtuvo la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células vivas de cada muestra, descartando las células muertas con marcaje positivo

para Anexina y/o yoduro de propidio. Todas las muestras se prepararon y analizaron por duplicado.

#### 4.4.2. Cuantificación de la expresión de GFP mediante Western Blot

Se sembraron 40 000 células HeLa-GFP por pocillo en placas de 12 pocillos. Después de 24 horas, el medio fue sustituido por medio nuevo que contenía las NCs cargadas de siRNA o vacías a 150 µg/mL (correspondiendo a concentraciones de GFP siRNA de 300 nM para las NCs de quitosano y 10 nM para las de xantano, y de C- siRNA de 445 nM), así como un control negativo sin NCs (células no tratadas). Como control positivo, las células fueron transfectadas con siRNA 10 nM utilizando Lipofectamina® 2000, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Después de 4 horas de incubación en la estufa, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS y se añadió medio de cultivo nuevo. Se mantuvieron las células en la estufa hasta el momento de ser analizadas.

Transcurridas 48 y 72 h desde el tratamiento con el siRNA, las células fueron levantadas con tripsina y lavadas dos veces con PBS mediante centrifugaciones de 2 minutos a 100 G. El sobrenadante fue retirado con micropipeta y se dejaron los pellets de células en hielo durante al menos 2 minutos. Se extrajeron las proteínas citoplasmáticas resuspendiendo cada pellet en 20 µL de tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% (v/v), NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.6, glicerol 10 % (v/v), EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, leupeptina 10 µg/mL, fluoruro de sodio 10 mM, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas) y se mantuvieron en hielo durante 15 minutos. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4 °C y máxima potencia (24 500 G), se recogieron los sobrenadantes y se descartaron los pellets.

Antes de realizar la electroforesis, la concentración de proteínas de los lisados fue determinada mediante el método de Bradford para poder cargar una cantidad apropiada de proteína y asegurar la carga de una cantidad similar de proteína en cada carril. Se utilizó el reactivo Coomassie Plus-The Better Bradford® Assay Reagent y se cargaron 10 µg de proteína por pocillo en geles de poliacrilamida 4–15 %, incluyendo un patrón de peso molecular. Se llevó a cabo la electroforesis a 100 V, 0.02 A (por cada gel) durante 1 h.

Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad®) utilizando un equipo de transferencia TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad®). Se sumergió la membrana en tampón de bloqueo (SEA BLOCK Blocking Buffer, ThermoFisher®) durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y se hibridó con los anticuerpos primarios monoclonales (anti-GFP B-2, Santa Cruz Biotechnology®; anti-β-actin, Sigma®, como control interno) a 4 °C durante la noche. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST 1X (solución salina con TRIS 20 mM, NaCl 150 mM y Tween® 20 al 0.1 %) durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se hibridaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos en agitación a temperatura

ambiente, se lavaron 3 veces con TBST 1X y se cubrieron con TBS 1X (solución salina con TRIS 20 mM y NaCl 150 mM) hasta el momento del revelado.

Las membranas fueron reveladas en un equipo de escaneo Li-Cor Odyssey®, utilizando el software Image Studio 5.0, y posteriormente analizadas con el software ImageJ. El control interno de actina permite normalizar la cuantificación de GFP respecto a la cantidad de actina para disminuir el error de la técnica.

#### 4.4.3. Cuantificación de la expresión de GFP mediante RT-qPCR

Se sembraron 80 000 células HeLa-GFP por pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, el medio fue sustituido por medio nuevo que contenía NCs cargadas de siRNA o vacías a 150 µg/mL (correspondiendo a concentraciones de siRNA de 300 nM para las NCs de quitosano y 10 nM para las de xantano), así como un control negativo sin NCs (células no tratadas). Como control positivo, las células fueron transfectadas con siRNA 10 nM utilizando Lipofectamina® 2000, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Después de 4 horas de incubación en la estufa, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS y se añadió medio de cultivo nuevo. Se mantuvieron las células en la estufa hasta el momento de ser analizadas.

Transcurridas 48 h desde el tratamiento con el siRNA, el RNA total fue extraído usando el Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek®), siguiendo las instrucciones del fabricante y eliminando el DNA durante el proceso de extracción mediante tratamiento con DNAasa I (kit de Promega®). La concentración y pureza del RNA fue analizada mediante espectrofotometría UV (Thermo Scientific® Multiskan GO UV/Vis) a 260 y 280 nm y mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con Gel Red (Biotium®). El cDNA fue sintetizado a partir de 1.5 µg de RNA utilizando el kit SuperScript VILO cDNA Synthesis (Invitrogen®) según las instrucciones del fabricante.

La RT-qPCR se realizó en 20 µL de mezcla de reacción, que consistía en 1x iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad®), diluciones seriadas de cDNA y 0.25 µM de cada primer (primer GFP directo: 5' GAC TCG GAA GTT CAT CTG CAC CAC AGG C 3', primer GFP reverso: 5' ACT CGC GTT CTT CTG CTT GTC GGC CA 3', sintetizados por Thermo Fisher®). Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo BioRad CFX-96 Real Time PCR System siguiendo las siguientes etapas: 1) desnaturalización inicial: 20 segundos a 95 °C, 2) 39 ciclos de extensión: 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 58 °C, 3) curva de *melting* o curva de disociación (para evaluar si se han formado productos de amplificación indeseados): 15 segundos a 95 °C, 5 segundos a 65 °C y rampa de temperatura con incrementos de 0.5 °C hasta llegar a los 95 °C. La expresión del gen de la GFP se normalizó a la expresión del gen housekeeping HPRT (primer HPRT directo: 5' CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA 3', primer HPRT reverso: 5' CTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT 3'). Cada reacción de RT-qPCR fue realizada por triplicado. Además, se llevaron a cabo 3 repeticiones técnicas a partir de las mismas muestras biológicas, repitiendo el proceso desde la transcripción inversa a cDNA

durnate la segunda repetición o desde la mezcla de reactivos para la RT-qPCR durante la tercera repetición. El análisis de datos se realizó utilizando el programa Bio-Rad CFX Manager.

#### 4.5. Marcaje fluorescente de las NCs y el siRNA

El núcleo de las nanocápsulas de xantano y de quitosano fue marcado con el fluoróforo DiD y el siRNA encapsulado dentro de la cubierta polimérica de las NCs iba marcado con el fluoróforo Cy3 mediante unión covalente a uno de sus extremos 5'.

Se siguió el procedimiento estándar de síntesis de NCs, añadiendo 100 µg del fluoróforo DiD disuelto en etanol a la fase orgánica justo antes de formar la nanoemulsión y, después, 25 ó 125 nmol de siRNA-Cy3 previamente mezclados con el polímero (xantano o quitosano).

El espectro de fluorescencia se registró con un fluorímetro (Perkin-Elmer LS-55, 120 V) excitando secuencialmente el Cy3 a 550 nm y el DiD a 650 nm. Las NCs se introdujeron en una cubeta de cuarzo Suprasil® de tres ventanas (QS-3 mm, 45 µL, ultra Micro Hellma®) a una concentración de 100 µg/mL.

#### 4.6. Estudios de colocalización mediante microscopía confocal

##### 4.6.1. Transfección con siRNA

Se sembraron 20000 células por pocillo en portaobjetos de 8 pocillos (Ibidi®). Después de 24 horas, se añadieron NCs de quitosano y de xantano cargadas con DiD y siRNA-Cy3 a 150 µg/mL de nanotransportador (equivalente a una concentración de siRNA de 549 ±43 nM en el caso de las NCs de quitosano y de 93 ±8 nM en el caso de las NCs de xantano, estimada mediante electroforesis). Como control negativo, se dejó un pocillo con células sin transfectar, y como control positivo, en otro pocillo las células fueron transfectadas con siRNA 75 nM utilizando Lipofectamina® 2000 (Invitrogen®). También se incluyó un control añadiendo siRNA 75 nM sin agente de transfección. Después de 4 horas de incubación en la estufa, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS. Los reactivos para marcar los orgánulos fueron añadidos antes o después de la transfección, según el tipo de reactivo, tal y como se especifica en el siguiente apartado.

##### 4.6.2. Marcaje de los orgánulos intracelulares

Endosomas tempranos y tardíos: 5-6 h después de sembrar las células (una vez que estaban adheridas a la superficie del pocillo) se añadieron los marcadores de endosomas tempranos y tardíos (CellLight™ Early Endosomes-GFP BacMam 2.0 y CellLight™ Late Endosomes-GFP BacMam 2.0, ThermoFischer®) a una concentración de 10 partículas por célula sembrada y se mantuvieron las células en el incubador como mínimo 16 h. Los reactivos de marcaje fueron retirados y las células fueron lavadas con DPBS justo antes de realizar la transfección con siRNA.

Lisosomas y mitocondrias: los reactivos para marcar los lisosomas (LysoTracker® Green DND-26, ThermoFisher®) y las mitocondrias (MitoTracker® Green FM, ThermoFisher®) fueron añadidos después de la transfección con siRNA y del lavado de las células. Las células fueron incubadas con LysoTracker® a 100 nM o MitoTracker® a 50 nM durante 30 minutos en el incubador y después observadas en el microscopio confocal sin retirar el reactivo de marcaje.

La especificidad de los marcajes y la ausencia de cruce de señales se comprobó examinando muestras control con un único marcaje, sin presencia de siRNA-Cy3.

#### 4.6.3. Microscopía confocal

Las células vivas, previamente transfectadas con siRNA y con los orgánulos marcados, se mantuvieron en una cámara termostaticada a 37 °C durante la adquisición de imágenes. Se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 880. las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 63X/1.40 Plan Apochromat y aceite de inmersión. Los fluoróforos fueron excitados en modo secuencial para minimizar el cruce de señales (GFP a 488 nm, Cy3 a 561 nm y DiD a 633 nm). Para cada experimento, la configuración del microscopio se mantuvo constante, incluyendo la potencia y ganancia del láser y el tamaño del *pinhole*. Las imágenes fueron procesadas utilizando ImageJ.

#### 4.6.4. Análisis de la colocalización

Para cuantificar el grado de colocalización de los píxeles entre varios canales, se utilizó la herramienta Coloc2 de ImageJ. Los canales de cada imagen fueron separados y se seleccionaron regiones de interés ROIs en 10-20 células. La colocalización fue cuantificada utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson (PCC), que indica el grado de correlación entre la intensidad de los píxeles de dos canales. El valor del PCC puede oscilar entre -1 y 1. Un valor de 1 significa que los patrones de fluorescencia son totalmente similares (colocalización perfecta), un valor de -1 significa que los patrones son totalmente opuestos (exclusión perfecta), mientras que un valor cercano a 0 indica que no hay ninguna correlación en los patrones entre ambos canales (localización aleatoria), lo que implica ausencia de colocalización. Los resultados se representaron como la media y desviación estándar del PCC obtenido del conjunto de células analizadas. Para analizar la significancia estadística de los datos obtenidos, se realizó el test “t” de Student’s utilizando el software GraphPad Prism v7.00, con un intervalo de confianza del 95 %.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Laura Comas por haber diseñado los primers que utilicé en los experimentos de RT-qPCR y a Iñaki Ochoa por el acceso al equipo de RT-qPCR.

Gracias a María Royo y César vallejo por el soporte técnico durante los experimentos de microscopía confocal realizados en el CIBA, a Javier Godino por el acceso al citómetro

de flujo y a Irene Orera y Giuseppe Lattanzio por el acceso al equipo de escaneo de membranas.

## 6. REFERENCIAS

1. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
2. Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
3. Mokhtarzadeh, A.; Alibakhshi, A.; Hashemi, M.; Hejazi, M.; Hosseini, V.; de la Guardia, M.; Ramezani, M. Biodegradable nano-polymers as delivery vehicles for therapeutic small non-coding ribonucleic acids. *J. Control. Release* **2017**, *245*, 116–126.
4. Snead, N.M.; Rossi, J.J. Biogenesis and function of endogenous and exogenous siRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2010**, *1*, 117–131.
5. Jackson, A.L.; Linsley, P.S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 57–67.
6. Piatek, M.J.; Werner, A. Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1174–1179.
7. Xia, J.; Joyce, C.E.; Bowcock, A.M.; Zhang, W. Noncanonical microRNAs and endogenous siRNAs in normal and psoriatic human skin. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 737–748.
8. Whitehead, K.A.; Langer, R.; Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129–138.
9. Jeang, K.-T. RNAi in the regulation of mammalian viral infections. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 58.
10. Kanasty, R.; Dorkin, J.R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 967–977.
11. Tamura, A.; Nagasaki, Y. Smart siRNA delivery systems based on polymeric nanoassemblies and nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. **2010**, *5*, 1089–1102.
12. Agrawal, N.; Dasaradhi, P.V.N.; Mohmmed, A.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R.K.; Mukherjee, S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 657–85.
13. Aagaard, L.; Rossi, J.J. RNAi therapeutics : Principles , prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 75–86.
14. Shukla, S.; Sumaria, C.S.; Pradeepkumar, P.I. Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: A structural and functional outlook. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 328–349.
15. Hong, C.A.; Nam, Y.S. Functional Nanostructures for Effective Delivery of Small

- Interfering RNA Therapeutics. *Theranostics* **2014**, *4*, 1211–1232.
16. Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 12–27.
  17. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18.
  18. Tekade, R.K.; Tekade, M.; Kesharwani, P.; D’Emanuele, A. RNAi-combined nano-chemotherapeutics to tackle resistant tumors. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 1761–1774.
  19. Joye, I.J.; McClements, D.J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19*, 417–427.
  20. Khan, W.; Hosseinkhani, H.; Ickowicz, D.; Hong, P. Da; Yu, D.S.; Domb, A.J. Polysaccharide gene transfection agents. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 4224–4232.
  21. Zhang, N.; Wardwell, P.R.; Bader, R.A. Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2013**, *5*, 329–352.
  22. Parraga, J.E.; Zorzi, G.K.; Diebold, Y.; Seijo, B.; Sanchez, A. Nanoparticles based on naturally-occurring biopolymers as versatile delivery platforms for delicate bioactive molecules: An application for ocular gene silencing. *Int. J. Pharm.* **2014**, *477*, 12–20.
  23. Kwon, Y.J. Before and after Endosomal Escape: Roles of Stimuli-Converting siRNA/Polymer Interactions in Determining Gene Silencing Efficiency. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1077–1088.
  24. Lee, H.; Mok, H.; Lee, S.; Oh, Y.-K.; Park, T.G. Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *J. Control. Release* **2007**, *119*, 245–252.
  25. Lucas, R.; Gómez-Pinto, I.; Aviñó, A.; Reina, J.J.; Eritja, R.; González, C.; Morales, J.C. Highly Polar Carbohydrates Stack onto DNA Duplexes via CH/ $\pi$  Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1909–1916.
  26. Paidikondala, M.; Rangasami, V.K.; Nawale, G.N.; Casalini, T.; Perale, G.; Kadekar, S.; Mohanty, G.; Salminen, T.; Oommen, O.P.; Varghese, O.P. An Unexpected Role of Hyaluronic Acid in Trafficking siRNA Across the Cellular Barrier: The First Biomimetic, Anionic, Non-Viral Transfection Method. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58*, 2815–2819.
  27. Fernandez-Piñeiro, I.; Alvarez-Trabado, J.; Márquez, J.; Badiola, I.; Sanchez, A. Xanthan gum-functionalised span nanoparticles for gene targeting to endothelial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *170*, 411–420.
  28. Luo, Y.; Wang, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *64*, 353–367.
  29. Food Additive Status List\_Xanthan | FDA Available online: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list> (accessed on Sep 2, 2019).

30. Singhvi, G.; Hans, N.; Shiva, N.; Kumar Dubey, S. Xanthan gum in drug delivery applications. In *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*; Elsevier, 2019; pp. 121–144 ISBN 9780128170557.
31. Buschmann, M.D.; Merzouki, A.; Lavertu, M.; Thibault, M.; Jean, M.; Darras, V. Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1234–1270.
32. Raemdonck, K.; Naeye, B.; Høgset, A.; Demeester, J.; De Smedt, S.C. Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization. *J. Control. Release* **2010**, *145*, 281–288.
33. Yang, G.; Liu, Y.; Wang, H.; Wilson, R.; Hui, Y.; Yu, L.; Wibowo, D.; Zhang, C.; Whittaker, A.K.; Middelberg, A.P.J.; et al. Bioinspired Core–Shell Nanoparticles for Hydrophobic Drug Delivery. *Angew. Chemie* **2019**, *131*, 14495–14502.
34. Szczepanowicz, K.; Bazylińska, U.; Pietkiewicz, J.; Szyk-Warszyńska, L.; Wilk, K.A.; Warszyński, P. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 678–691.
35. Ragelle, H.; Vanvarenberg, K.; Vandermeulen, G.; Prétat, V. Chitosan Nanoparticles for siRNA Delivery In Vitro. In *siRNA Delivery Methods: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*; 2016; Vol. 1364, pp. 143–150 ISBN 978-1-4939-3111-8.
36. Forbes, D.C.; Peppas, N.A. Polymeric nanocarriers for siRNA delivery to murine macrophages. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 1096–1105.
37. Wu, C.; Li, J.; Wang, W.; Hammond, P.T. Rationally Designed Polycationic Carriers for Potent Polymeric siRNA-Mediated Gene Silencing. *ACS Nano* **2018**, *12*, 6504–6514.
38. Delgado, D.; del Pozo-Rodríguez, A.; Solinís, M.Á.; Rodríguez-Gascón, A. Understanding the mechanism of protamine in solid lipid nanoparticle-based lipofection: The importance of the entry pathway. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79*, 495–502.
39. Mächtle, W.; Börger, L. *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*; Springer Laboratory; Springer-Verlag: New York, 2006; ISBN 3-540-23432-2.
40. Picot, J.; Guerin, C.L.; Le Van Kim, C.; Boulanger, C.M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **2012**, *64*, 109–130.
41. Givan, A.L. Flow Cytometry: An Introduction. In; Humana Press, 2011; pp. 1–29 ISBN 978-1-61737-950-5.
42. Lowder, M.; Unge, A.; Maraha, N.; Jansson, J.K.; Swiggett, J.; Oliver, J.D. Effect of Starvation and the Viable-but-Nonculturable State on Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence in GFP-Tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3160–3165.
43. Steff, A.-M.; Fortin, M.; Arguin, C.; Hugo, P. Detection of a decrease in green fluorescent protein fluorescence for the monitoring of cell death: An assay

- amenable to high-throughput screening technologies. *Cytometry* **2001**, *45*, 237–243.
44. Ki, K.H.; Park, D.Y.; Lee, S.H.; Kim, N.Y.; Choi, B.M.; Noh, G.J. The optimal concentration of siRNA for gene silencing in primary cultured astrocytes and microglial cells of rats. *Korean J. Anesthesiol.* **2010**, *59*, 403–410.
  45. Mo, R.H.; Zaro, J.L.; Ou, J.-H.J.; Shen, W.-C. Effects of Lipofectamine 2000/siRNA Complexes on Autophagy in Hepatoma Cells. *Mol. Biotechnol.* **2012**, *51*, 1–8.
  46. Dalby, B. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **2004**, *33*, 95–103.
  47. Bartlett, D.W.; Davis, M.E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 322–333.
  48. He, C.; Yue, H.; Xu, L.; Liu, Y.; Song, Y.; Tang, C.; Yin, C. siRNA release kinetics from polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation therapy via oral delivery. *Acta Biomater.* **2020**, *103*, 213–222.
  49. Chernousova, S.; Epple, M. Live-cell imaging to compare the transfection and gene silencing efficiency of calcium phosphate nanoparticles and a liposomal transfection agent. *Gene Ther.* **2017**, *24*, 282–289.
  50. Kapoor, R.C.; Mishra, V.N. Influence of surfactants on the fluorescence and absorption spectra of erythrosin in aqueous solution. *J. Lumin.* **1978**, *17*, 175–183.
  51. Tofani, L.; Feis, A.; Snoke, R.E.; Berti, D.; Baglioni, P.; Smulevich, G. Spectroscopic and Interfacial Properties of Myoglobin/Surfactant Complexes. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1186–1195.
  52. Zhang, D.; Lans, H.; Vermeulen, W.; Lenferink, A.; Otto, C. Quantitative Fluorescence Correlation Spectroscopy Reveals a 1000-Fold Increase in Lifetime of Protein Functionality. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3439–3446.
  53. Yue, Z.-G.; Wei, W.; Lv, P.-P.; Yue, H.; Wang, L.-Y.; Su, Z.-G.; Ma, G.-H. Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2440–2446.
  54. Malhotra, M.; Tomaro-Duchesneau, C.; Prakash, S. Synthesis of TAT peptide-tagged PEGylated chitosan nanoparticles for siRNA delivery targeting neurodegenerative diseases. *Biomaterials* **2013**, *34*, 1270–1280.
  55. Kowalczewski, C.J.; Saul, J.M. Surface-mediated delivery of siRNA from fibrin hydrogels for knockdown of the BMP-2 binding antagonist noggin. *Acta Biomater.* **2015**, *25*, 109–120.
  56. Faden, F.; Eschen-Lippold, L.; Dissmeyer, N. Normalized Quantitative Western Blotting Based on Standardized Fluorescent Labeling. In; Lois, L.M., Matthiesen, R., Eds.; *Methods in Molecular Biology*; Springer New York: New York, NY, 2016; Vol. 1450, pp. 247–258 ISBN 978-1-4939-3757-8.
  57. Ghosh, R.; Gilda, J.E.; Gomes, A. V The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev. Proteomics* **2014**, *11*, 549–560.

58. Taylor, S.C.; Berkelman, T.; Yadav, G.; Hammond, M. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *55*, 217–226.
59. Bass, J.J.; Wilkinson, D.J.; Rankin, D.; Phillips, B.E.; Szewczyk, N.J.; Smith, K.; Atherton, P.J. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2017**, *27*, 4–25.
60. Aldrich, S. qPCR Technical Guide. *St. Louis Sigma Aldrich* **2008**.
61. Jalali, M.; Zaborowska, J.; Jalali, M. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*; Elsevier, 2017; pp. 1–18 ISBN 9780128030783.
62. Ragelle, H.; Colombo, S.; Pourcelle, V.; Vanvarenberg, K.; Vandermeulen, G.; Bouzin, C.; Marchand-Brynaert, J.; Feron, O.; Foged, C.; Pr eat, V. Intracellular siRNA delivery dynamics of integrin-targeted, PEGylated chitosan–poly(ethylene imine) hybrid nanoparticles: A mechanistic insight. *J. Control. Release* **2015**, *211*, 1–9.
63. Patil, S.; Sandberg, A.; Heckert, E.; Self, W.; Seal, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4600–4607.
64. Nam, H.Y.; Kwon, S.M.; Chung, H.; Lee, S.-Y.; Kwon, S.-H.; Jeon, H.; Kim, Y.; Park, J.H.; Kim, J.; Her, S.; et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J. Control. Release* **2009**, *135*, 259–267.
65. Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 255–264.
66. Vercauteren, D.; Deschout, H.; Remaut, K.; Engbersen, J.F.J.; Jones, A.T.; Demeester, J.; De Smedt, S.C.; Braeckmans, K. Dynamic colocalization microscopy to characterize intracellular trafficking of nanomedicines. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7874–7884.
67. Dunn, K.W.; Kamocka, M.M.; McDonald, J.H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2011**, *300*, 723–742.
68. Bolte, S.; Cordeli eres, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232.
69. Zinchuk, V.; Zinchuk, O. Quantitative Colocalization Analysis of Confocal Fluorescence Microscopy Images. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2008**, *39*, 4.19.1-4.19.16.
70. M endez-Ardoy, A.; Lostal e-Seijo, I.; Montenegro, J. Where in the Cell Is our Cargo? Methods Currently Used To Study Intracellular Cytosolic Localisation. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 488–498.
71. Wang, F.; Chen, H.; Liu, Z.; Mi, F.; Fang, X.; Liu, J.; Wang, M.; Lo, P.K.; Li, Q. Conjugated polymer dots for biocompatible siRNA delivery. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 14443–14449.
72. Khalil, I.A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 32–

- 45.
73. Pollard, T.D.; Earnshaw, W.C.; Lippincott-Schwartz, J.; Johnson, G. Endocytosis and the Endosomal Membrane System. In *Cell Biology*; Elsevier, 2017; pp. 377–392.
74. Sorvina, A.; Bader, C.A.; Darby, J.R.T.; Lock, M.C.; Soo, J.Y.; Johnson, I.R.D.; Caporale, C.; Voelcker, N.H.; Stagni, S.; Massi, M.; et al. Mitochondrial imaging in live or fixed tissues using a luminescent iridium complex. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8191.
75. Mitra, K.; Lippincott-Schwartz, J. Analysis of Mitochondrial Dynamics and Functions Using Imaging Approaches. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2010**, *46*, 1–29.
76. Artiga, Á.; Serrano-Sevilla, I.; De Matteis, L.; Mitchell, S.G.; de la Fuente, J.M. Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 876–896.
77. Jang, Y.; Lim, K. Recent Advances in Mitochondria-Targeted Gene Delivery. *Molecules* **2018**, *23*, 2316.
78. Kerner, J.; Hoppel, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1486*, 1–17.
79. Milane, L.; Trivedi, M.; Singh, A.; Talekar, M.; Amiji, M. *Mitochondrial biology, targets, and drug delivery*; Elsevier B.V., 2015; Vol. 207; ISBN 6173733137.



# Aplicación de la tecnología de internalización fotoquímica para el silenciamiento génico

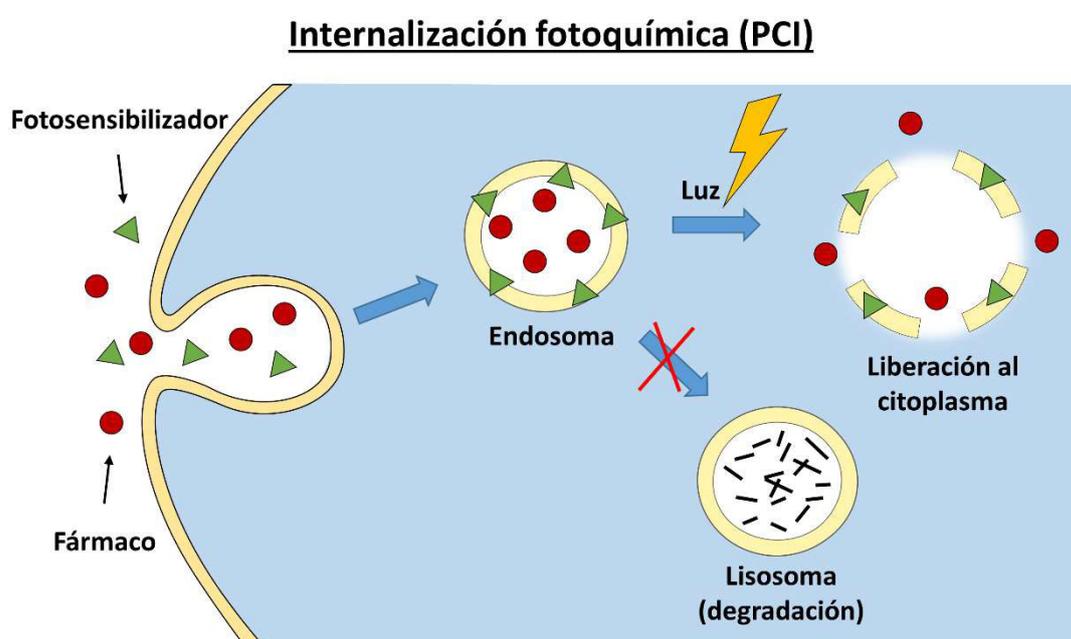
## 1. INTRODUCCIÓN

Los nanotransportadores son generalmente internalizados por las células mediante endocitosis. Durante este proceso, el material internalizado es transportado en el interior de vesículas endocíticas, incluyendo endosomas y lisosomas [1]. Sin embargo, en ocasiones la molécula activa transportada debe llegar al citosol de la célula para poder ejercer su función biológica, como en el caso del siRNA [2–5]. Si el siRNA no consigue escapar al citosol a tiempo, puede terminar siendo exocitado o degradado en el ambiente ácido de los lisosomas [1,4]. De hecho, el atrapamiento endosomal es una de las principales barreras del transporte de fármacos [6]. Para facilitar el escape endosomal, se han desarrollado numerosas estrategias, como el uso de péptidos y polímeros capaces de desestabilizar la membrana endosomal por sí mismos, actuando como una “esponja de protones” [7–11], o el método de internalización fotoquímica [12–14].

La internalización fotoquímica (PCI, por sus siglas en inglés) fue presentada por primera vez en 1999 [15] como un método basado en la luz para la liberación al citosol de moléculas terapéuticas atrapadas en vesículas endocíticas. Se basa en los mismos principios que la terapia fotodinámica (PDT, en inglés), que implican la activación por luz de un fotosensibilizador (una molécula sensible a la luz) que, después de ser excitado, transfiere su energía al oxígeno molecular, lo que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente oxígeno singlete [16,17]. Este intermediario es altamente reactivo y puede dañar las estructuras celulares más próximas. No obstante, a diferencia de la PDT, la PCI no pretende generar muerte celular por sí misma, por lo que las dosis requeridas de luz y fotosensibilizador son mucho menores [18]. Además, el corto rango de alcance (10-100 nm) y la corta vida media del oxígeno singlete limitan el efecto dañino a las estructuras que se encuentran muy próximas al sitio donde se produce, mientras que las moléculas menos cercanas no se ven afectadas [14,19]. En

consecuencia, si el fotosensibilizador se acumula en un punto muy concreto de la célula y se irradia durante un tiempo corto, se produce un daño muy localizado que no afecta al resto de componentes celulares.

Los fotosensibilizadores utilizados para PCI son compuestos anfífilicos que se localizan en las membranas de las vesículas endolisosomales después de la endocitosis [20]. La activación por luz del fotosensibilizador produce daño mediado por ROS en las membranas de estas vesículas, con la subsiguiente liberación del fármaco al citosol. Se ha demostrado que la liberación de macromoléculas inducida por la PCI tiene lugar en un intervalo de 0.01-4 segundos desde la aplicación de la luz, dependiendo de la naturaleza de la macromolécula [21]. La Figura 1 esquematiza el mecanismo en el que se basa la internalización fotoquímica.



**Figura 1. Mecanismo de internalización fotoquímica.**

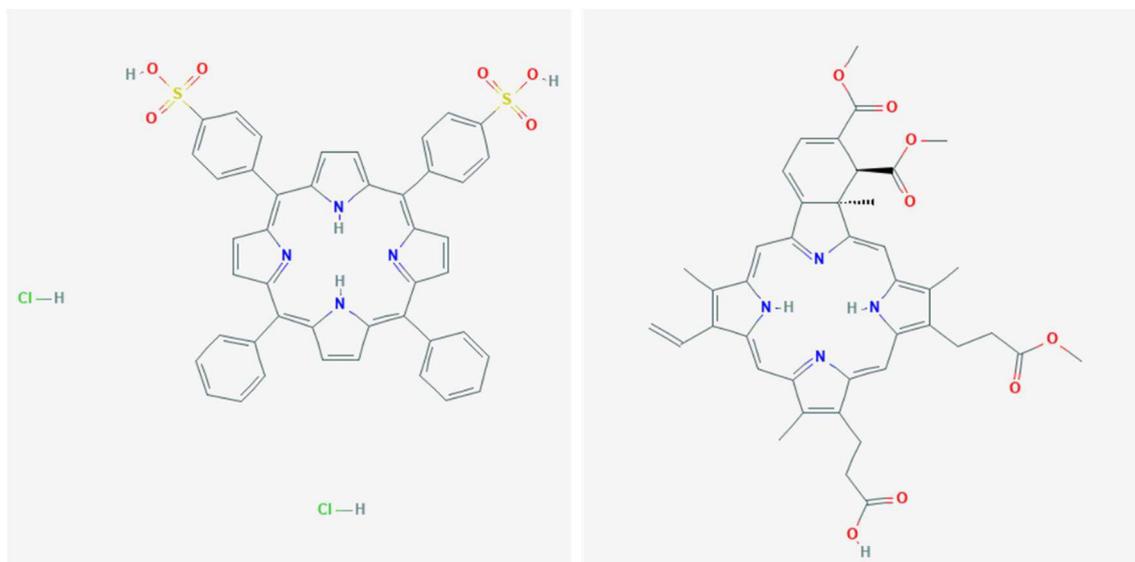
El uso de PCI y PDT está limitado por la profundidad de penetración de la luz en los tejidos. Se considera que la profundidad máxima de penetración de la luz infrarroja cercana (NIR), por ejemplo, es de 2 cm en tejidos poco pigmentados [22]. Sin embargo, esto también proporciona la ventaja de ser un tratamiento muy específico del tejido que se expone a la luz, muy poco invasivo y con leves efectos secundarios. Además, las bajas dosis de fármaco y luz necesarias, junto a la sencillez y accesibilidad del equipo necesario (un láser o lámpara con filtro) podrían reducir el coste por paciente y el tiempo de hospitalización. Aunque todavía no ha sido aprobada para uso clínico, la PCI está siendo evaluada en ensayos clínicos con resultados prometedores [23,24].

Si bien la mayoría de estudios sobre PCI se centran en la liberación de fármacos anticancerígenos, esta tecnología también ha demostrado ser exitosa en la liberación de

otras moléculas, como proteínas, plásmidos y oligonucleótidos [14,15,25]. Por ejemplo, la eficiencia de silenciamiento del siRNA ha sido mejorada tanto *in vitro* como *in vivo* [5,14]. Sin embargo, aunque una fracción significativa de las moléculas secuestradas se liberan al citosol después de la PCI, algunos de los fármacos también pueden fotooxidarse debido a su localización cerca de las membranas de las vesículas endocíticas donde se forma el oxígeno singlete [26]. Esto parece ser una limitación en la terapia génica cuando el transportador del gen es lipofílico y por eso se localiza cerca de las membranas [27]. Sin embargo, con el uso de vectores más hidrofílicos, el efecto de la PCI parece ser más consistente. Este es el caso de nanotransportadores poliméricos catiónicos, como los basados en PEI, poliarginina, dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) y nanogeles de dextrano catiónicos [26,28]. No obstante, en algunos casos concretos también se ha observado una mejora sustancial en el nivel de silenciamiento al usar algunos agentes de transfección lipídicos como la Lipofectamina® 2000 [5,14] o el jetSI® [29].

El estudio de colocalización incluido en el capítulo 5 demostró que cuando las células HeLa son tratadas con nanocápsulas cargadas de siRNA, este se encuentra principalmente atrapado en lisosomas y mitocondrias y esta podría ser la razón por la cual no se logra un efecto de silenciamiento génico notable. El objetivo de este capítulo era combinar el tratamiento de las siRNA-NCs con la PCI para liberar el siRNA al citosol, tratando de mejorar así la eficacia del silenciamiento génico.

La meso-tetrafenilporfina disulfonada (TPPS2a) es el fotosensibilizador con destino endolisosomal utilizado en estos experimentos y se ha usado frecuentemente para estudios *in vitro* de PCI durante los últimos años, demostrando una gran eficiencia [18,26]. También, otro fotosensibilizador dirigido a las mitocondrias, llamado BPD-MA por ser un derivado de la benzoporfirina, ha sido utilizado en este estudio para tratar de liberar el siRNA de las mitocondrias al citosol. Este enfoque es muy innovador ya que el uso de BPD-MA sólo ha sido descrito para la terapia fotodinámica (PDT), pero nunca para la internalización fotoquímica (PCI). Todavía no está claro el mecanismo por el cual las reacciones fotoquímicas provocan la ruptura de la membrana endolisosomal [18], por lo que se hipotetizó que el daño ocasionado por el BPD-MA en la mitocondria también podría conllevar la desestabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de su contenido al citosol, lo que constituiría una variante del tratamiento PCI estándar. La Figura 2 muestra las estructuras químicas de los fotosensibilizadores utilizados.



**Figura 2. Estructuras químicas de los fotosensibilizadores TTPS2a (izquierda) y BPD-MA (derecha).**

Como ya se explicó, el uso de fotosensibilizadores va asociado a una alta citotoxicidad debida a la producción de especies ROS [29]. Sin embargo, el objetivo de la PCI es lograr la liberación sin causar una muerte significativa de células [14,18]. Por lo tanto, se requiere una optimización muy cuidadosa de las condiciones del tratamiento, especialmente la cantidad de fotosensibilizador y la dosis de luz. La dosis de luz hace referencia a la cantidad de luz que recibe la muestra por unidad de superficie y depende de la intensidad de la lámpara y del tiempo de irradiación.

Para el trabajo incluido en este capítulo se han utilizado las NCs de quitosano y de xantano cargadas de siRNA descritas en el capítulo 5 y se ha combinado su tratamiento en células HeLa con un tratamiento de PCI dirigido a la liberación del siRNA de los endolisosomas, por un lado, y de las mitocondrias, por otro lado. En primer lugar, se optimizaron algunos parámetros clave (dosis de luz, longitud de onda de la lámpara, concentración de fotosensibilizador (PS) y concentración de NCs) para establecer unas condiciones de tratamiento que no causaran una citotoxicidad elevada. El siguiente paso fue evaluar mediante citometría de flujo si el tratamiento de PCI mejoraba la eficiencia del silenciamiento génico, comparando muestras tratadas y no tratadas. Para un mejor análisis de los resultados, se realizaron estudios de microscopía confocal para analizar si el siRNA había sido liberado de los lisosomas y las mitocondrias después del fototratamiento.

Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de la Dra. Pilar Acedo Núñez durante una estancia de tres meses en el Institute for Liver and Digestive Health del University College London.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Tratamiento de PCI dirigido a endolisosomas

#### 2.1.1. Citotoxicidad del fotosensibilizador TPPS2a

Como se explicó en el capítulo 5, el gen que se pretende silenciar en este trabajo es el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y por ello se han utilizado células HeLa (adenocarcinoma de cérvix) modificadas genéticamente para expresar la proteína GFP (HeLa-GFP) como línea celular modelo.

Con el fin de seleccionar una concentración apropiada para los siguientes experimentos, se sembraron células HeLa-GFP y, 24 horas después, se incubaron durante 18 horas con el fotosensibilizador TPPS2a en un rango de concentraciones de entre 0.025 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tras un lavado para eliminar el exceso de TPPS2a, las células se mantuvieron en el incubador durante 4 horas (en medio de cultivo sin fotosensibilizador), antes de ser irradiadas con luz azul a 435 nm. Este procedimiento asegura que una baja cantidad de fotosensibilizador (PS) se localice en la membrana plasmática en el momento de la exposición a la luz y que una cantidad mayor se localice en las vesículas endocíticas [19]. Se aplicaron diferentes tiempos de irradiación para evaluar también la influencia de la dosis de luz. Irradiaciones de 3, 5 ó 7 minutos con la lámpara utilizada corresponden a dosis de luz de 1.3, 2.1 y 2.9  $\text{J}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Se utilizaron células HeLa-GFP no irradiadas como control negativo para comprobar que el PS no afecta a la viabilidad celular cuando no se combina con la luz. En la Figura 3 se reporta la viabilidad celular evaluada mediante MTT 48 h después del tratamiento con distintas concentraciones de PS y distintos tiempos de irradiación.

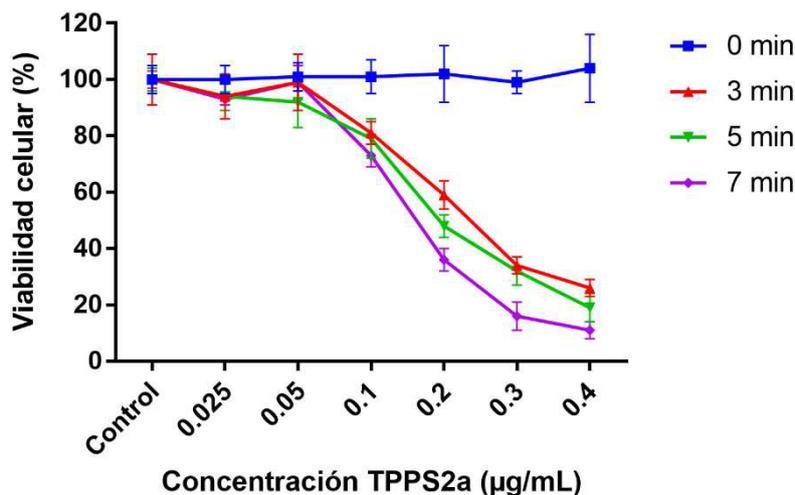


Figura 3. Viabilidad de células HeLa-GFP tras ser tratadas con TPPS2a e irradiadas durante distintos tiempos.

Como se esperaba, sólo cuando las células que han internalizado el PS son irradiadas se activa la generación de ROS y se produce citotoxicidad. Una desventaja de la tecnología PCI es que es más efectiva con dosis de luz elevadas que resultan ser más citotóxicas [25,30], lo cual es favorable cuando el objetivo es matar células tumorales pero no para otras aplicaciones en las que no se desea la muerte celular, como en este caso. En la gráfica se puede apreciar que el grado de citotoxicidad en este caso depende más de la concentración de TPPS2a que del tiempo de iluminación, lo que permite fijar la concentración no citotóxica más alta posible y variar el tiempo de iluminación hasta maximizar el efecto del tratamiento. La concentración de TPPS2a seleccionada para los siguientes experimentos fue de 0.1 µg/mL porque a esta concentración, después de la irradiación, la viabilidad celular se encontraba entre el 70 y el 80 %, lo que significaba que el fototratamiento estaba ejerciendo efecto sobre las células sin causar demasiada toxicidad.

### 2.1.2. Citotoxicidad de TPPS2a combinado con NCs

Para verificar que la concentración de TPPS2a y dosis de luz seleccionadas no resultaban demasiado tóxicas cuando se combinaba la PCI con el tratamiento de NCs, se incubaron las células con NCs de quitosano (CS) y de xantano (XN) cargadas de siRNA (siRNA-NCs) a una concentración alta de nanocápsulas (150 µg/mL) y a una concentración baja (25 µg/mL) y se comparó la viabilidad celular a las 48 h, con y sin el tratamiento de PCI de 3 min ó de 7 min (Figura 4). Las células se dejaron en contacto con las NCs durante 4 h (el mismo tiempo de incubación que en todos los experimentos de silenciamiento anteriores, ver capítulo 5), aprovechando el lapso de tiempo desde la retirada del TPPS2a del medio hasta el momento de la irradiación, tal y como recomiendan Berg (uno de los inventores de la tecnología PCI) y colaboradores [19]. Las NCs no internalizadas fueron retiradas del medio a través de lavados con PBS justo antes de la irradiación. Como control se incluyeron células no incubadas con NCs, tratadas o no con PCI.

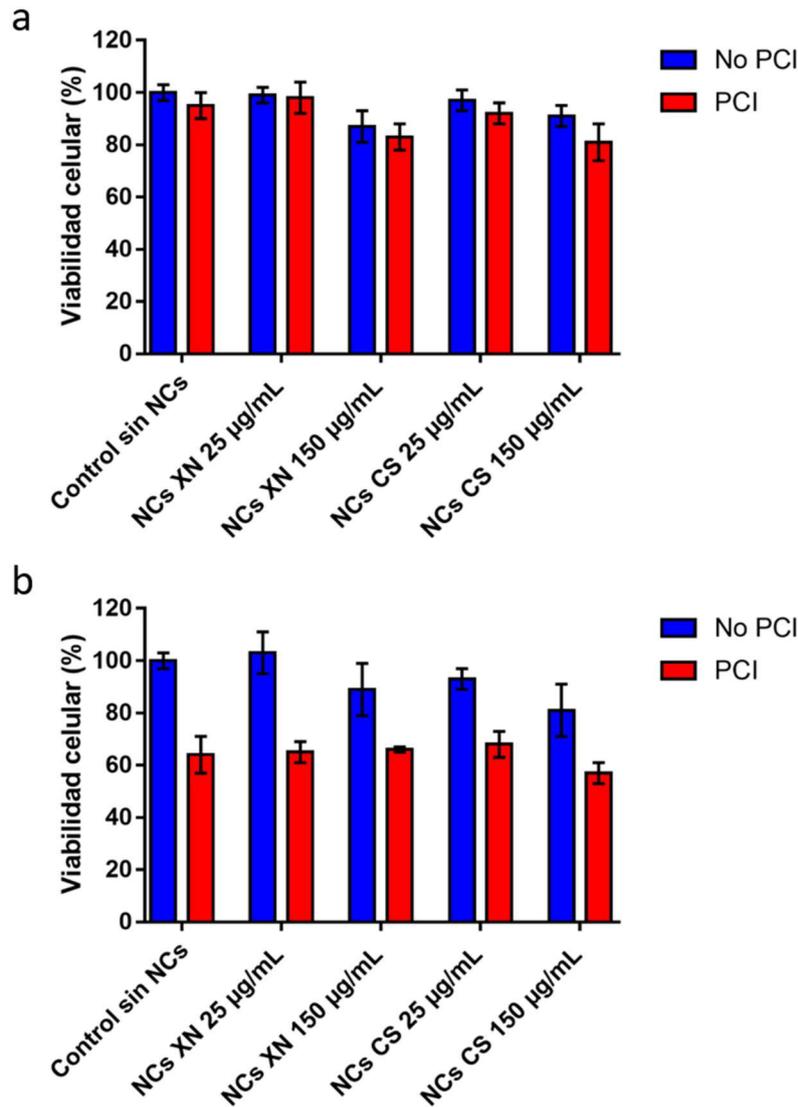


Figura 4. Viabilidad de células HeLa-GFP tras ser incubadas con NCs de quitosano (CS) o de xantano (XN) cargadas de siRNA y tratadas o no con PCI. El tratamiento de PCI consistió en la adición de TPPS2a e irradiación durante 3 min (a) o 7 min (b).

Como se puede apreciar en las gráficas, la adición de las NCs no altera de forma importante la citotoxicidad generada por el fototratamiento.

En el caso del fototratamiento de 3 minutos, en ausencia de NCs no se observa citotoxicidad debida a la PCI ya que la viabilidad celular de las muestras tratadas con PCI (90-100 %) es similar a la del control no tratado ni con PCI ni con NCs. Esta elevada viabilidad celular se mantiene también en presencia de NCs a baja concentración, con o sin tratamiento de PCI. Cuando se añaden NCs a alta concentración y se aplica la PCI, la viabilidad disminuye ligeramente hasta un 80-85 % (83 % para las NCs de xantano y 82 % para las NCs de quitosano), pero esta leve disminución no se debe a la combinación de NCs y fototratamiento, ya que sin el fototratamiento también está cerca de este valor (85-90 %). Estos datos confirman una vez más que las concentraciones de NCs

seleccionadas no generan citotoxicidad en este sistema y son apropiadas para continuar este estudio.

Por otro lado, después de 7 minutos de irradiación la viabilidad celular disminuye hasta el 60 %, pero esto ocurre tanto en el control sin NCs como en todas las muestras incubadas con NCs, lo que indica que en este caso tampoco aumenta la citotoxicidad al combinar el tratamiento de PCI con el de NCs.

La diferencia de viabilidad obtenida al aumentar el tiempo de irradiación de 3 min (90 % viabilidad) a 7 min (60 % viabilidad) refleja el aumento de especies ROS producidas por el PS y es clave porque va a permitir modular la intensidad del tratamiento según las necesidades. En consecuencia, para los siguientes experimentos se priorizaron las irradiaciones de 3 minutos para minimizar la citotoxicidad y se aumentó el tiempo hasta 7 minutos sólo cuando fue necesario. Sobre la base de estos resultados, se seleccionó la concentración más alta de NCs (150 µg/mL) para así reproducir las concentraciones de los experimentos de silenciamiento realizados anteriormente (capítulo 5) y se decidió mantener la concentración de PS seleccionada (0.1 µg/mL).

### 2.1.3. Silenciamiento de GFP tras el tratamiento con NCs y PCI

Una vez establecidas las condiciones para los experimentos, se analizó si el tratamiento de PCI con el fotosensibilizador TPPS2a, dirigido a endolisosomas, producía la liberación del siRNA de estas vesículas celulares y mejoraba el silenciamiento génico de la GFP.

Se siguió el mismo procedimiento que durante los ensayos de silenciamiento llevados a cabo en el apartado 2.3.1. del capítulo 5, con la diferencia de que en este caso el tratamiento con siRNA-NCs se combinó con la PCI. Las células tratadas mediante PCI fueron incubadas con 0.1 µg/mL de TPPS2a e irradiadas durante 3 minutos. Las células no tratadas con PCI no se incubaron con el fotosensibilizador y no se irradiaron, pero sí fueron incubadas con siRNA-NCs de quitosano y xantano a 150 µg/mL para confirmar los resultados obtenidos en el laboratorio de Zaragoza y evaluar la potencial mejoría tras la combinación de tratamientos. Como control se incluyeron células no incubadas con NCs, y se trataron o no con PCI (0.1 µg/mL de TPPS2a e irradiación de 3 minutos). El silenciamiento de GFP se analizó 48 y 72 h después del tratamiento con NCs mediante citometría de flujo (Figura 5).

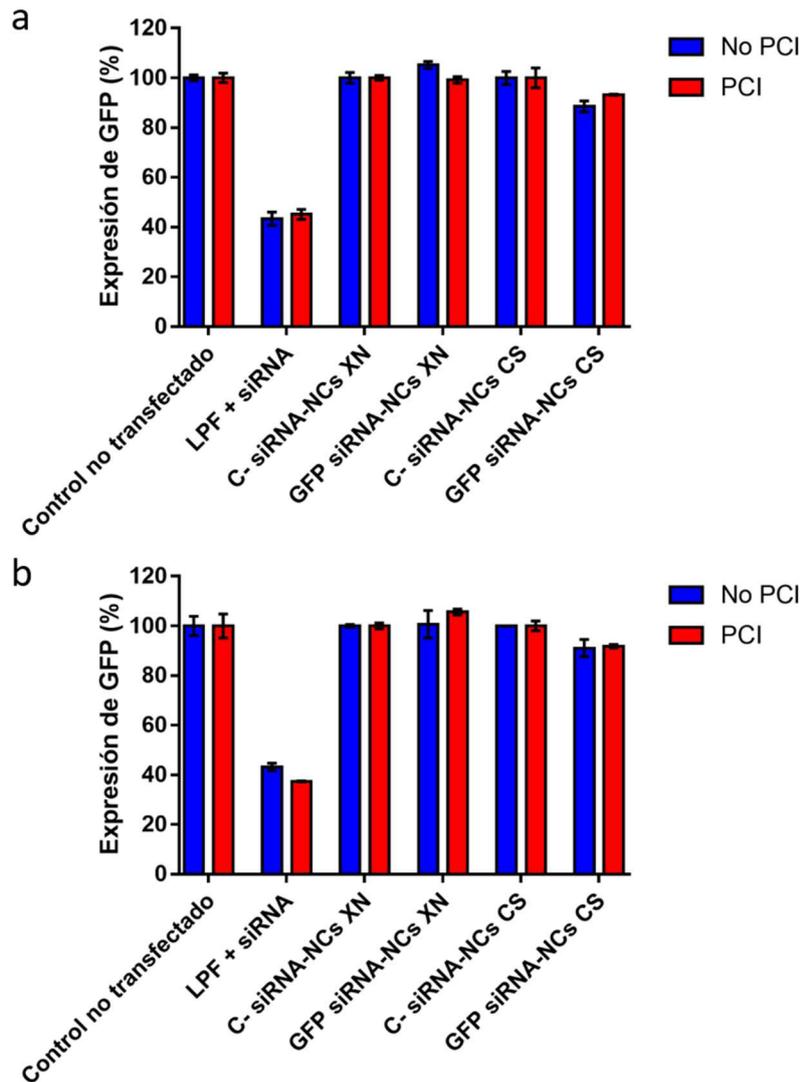


Figura 5. Silenciamiento de GFP 48h (a) o 72h (b) después de la incubación con NCs de quitosano (CS) o de xantano (XN) cargadas de siRNA dirigido contra GFP (GFP) o sin diana específica (C-) y el tratamiento de PCI con irradiación de 3 minutos.

Las gráficas representan el porcentaje de GFP expresada por las células. La intensidad de fluorescencia de las NCs cargadas de siRNA inespecífico (C- siRNA-NCs) fue tomada como 100 % para normalizar la intensidad de fluorescencia de las NCs cargadas de siRNA específico de GFP (GFP siRNA-NCs). En el caso de las NCs de xantano (XN) no se detecta nada de silenciamiento génico, ya que se mantiene el 100 % de expresión de GFP con y sin fototratamiento. En el caso de las NCs de quitosano (CS), se observa un pequeño efecto de silenciamiento (89 % a las 48 h y 91 % a las 72 h). Estos datos concuerdan con el rango de expresión de GFP detectado en los estudios previos llevados a cabo en Zaragoza (70-90 %). Sin embargo, el fototratamiento de 3 min no consigue mejorar la eficiencia de silenciamiento. Los resultados a las 48 h y 72 h fueron muy similares. Por ello, se decidió aumentar el tiempo de irradiación a 7 minutos para llevar al máximo la intensidad del tratamiento y se evaluó el silenciamiento a las 48 h (Figura 6).

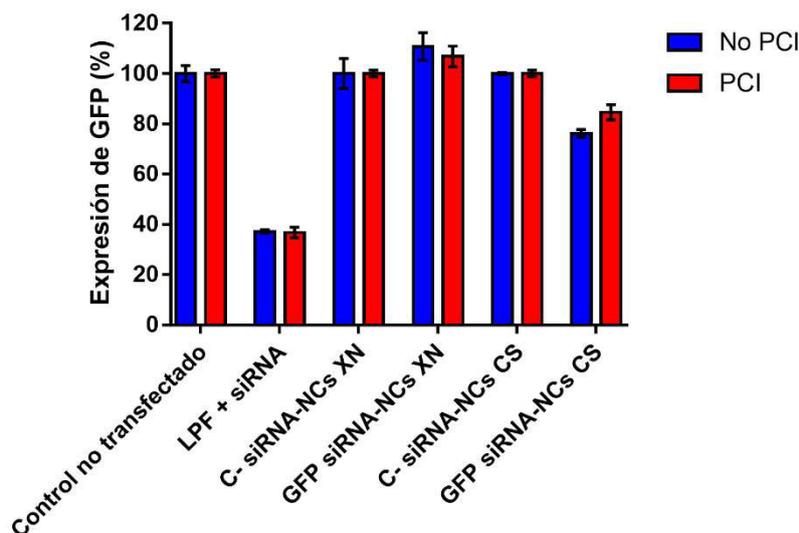


Figura 6. Silenciamiento de GFP 48h después de la incubación con NCs de quitosano (CS) o de xantano (XN) cargadas de siRNA dirigido contra GFP (GFP) o sin diana específica (C-) y el tratamiento de PCI con irradiación de 7 minutos

Debido a la variabilidad entre experimentos asociada al uso de cultivos celulares, además de las muestras tratadas con PCI se volvieron a analizar las muestras no tratadas para que todas las muestras sufrieran el mismo proceso experimental en paralelo. Aunque las NCs de xantano seguían sin provocar ningún efecto de silenciamiento, en las células tratadas con NCs de quitosano se obtuvieron valores de expresión de GFP algo más bajos (75 %) que en el experimento anterior. Sin embargo, el tratamiento de PCI no mejoró la eficiencia del silenciamiento tras aumentar la irradiación a 7 minutos. Es importante señalar que tampoco en el caso de la transfección del siRNA con Lipofectamina® (LPF, control positivo) mejoró el silenciamiento al aplicar el fototratamiento. La expresión de GFP disminuye hasta el 40 %, pero no hay una diferencia considerable entre las muestras tratadas con PCI y las no tratadas.

En conclusión, el tratamiento de PCI con TPPS2a estaba ejerciendo cierto efecto sobre las células porque la viabilidad celular después de la irradiación disminuía hasta un 60 % al irradiar 7 minutos, pero este efecto no disminuyó la expresión de GFP. Teniendo en cuenta estos resultados, la cuestión clave era averiguar si el fototratamiento era capaz de mejorar la liberación del contenido endolisosomal al citosol pero la funcionalidad del siRNA estaba dañada y por eso no disminuía la expresión de GFP, o si directamente no se producía la liberación del siRNA de las vesículas. Esta cuestión fue investigada mediante microscopía confocal para evaluar si el siRNA seguía colocalizando o no con los lisosomas después del tratamiento de PCI.

#### 2.1.4. Colocalización del siRNA con lisosomas tras el fototratamiento

Para observar si el siRNA realmente estaba siendo liberado de los lisosomas, se realizó un análisis mediante microscopía confocal. Como en el estudio anterior de

colocalización (capítulo 5), se utilizaron células HeLa (que no expresaban GFP) para dejar el canal verde disponible para el marcaje de los lisosomas con LysoTracker® Green. En este caso, el estudio se centró en la localización del siRNA y no de las NCs, ya que el objetivo principal es conseguir que la molécula activa llegue a su sitio de acción, con o sin su transportador.

Las células fueron tratadas con el fotosensibilizador, incubadas durante 4 h con las NCs recubiertas de quitosano y xantano cargadas con el siRNA-Cy3 (rojo) e irradiadas durante 7 minutos. Después, se marcaron los lisosomas y se tomaron imágenes en un microscopio confocal (Figura 7 y Figura 8). A modo de comparativa, se utilizaron células incubadas con NCs pero que no habían sido tratadas con PCI. Además, se comprobó que el PS no emitía fluorescencia detectable con los láseres y filtros utilizados y que el patrón de fluorescencia de las células incubadas con NCs no variaba cuando sólo se les aplicaba una de las partes del tratamiento de PCI (luz o PS).

### NCs quitosano

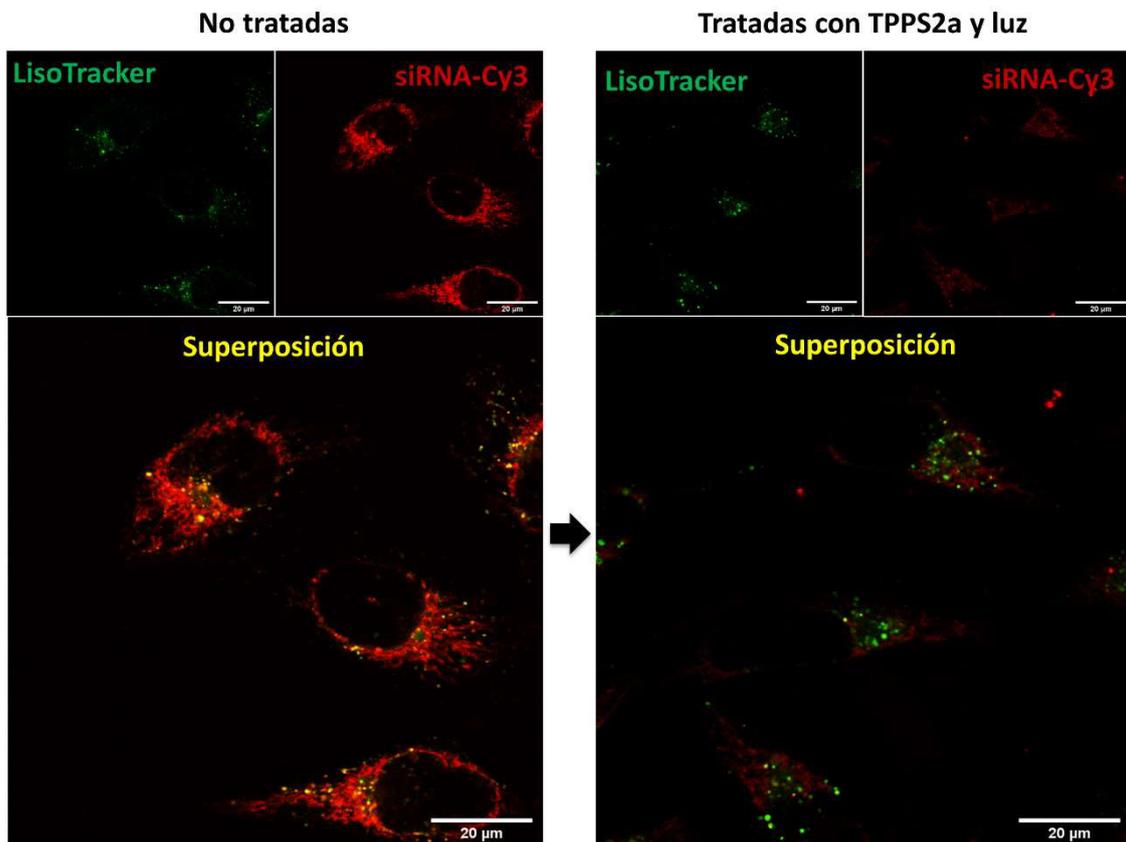
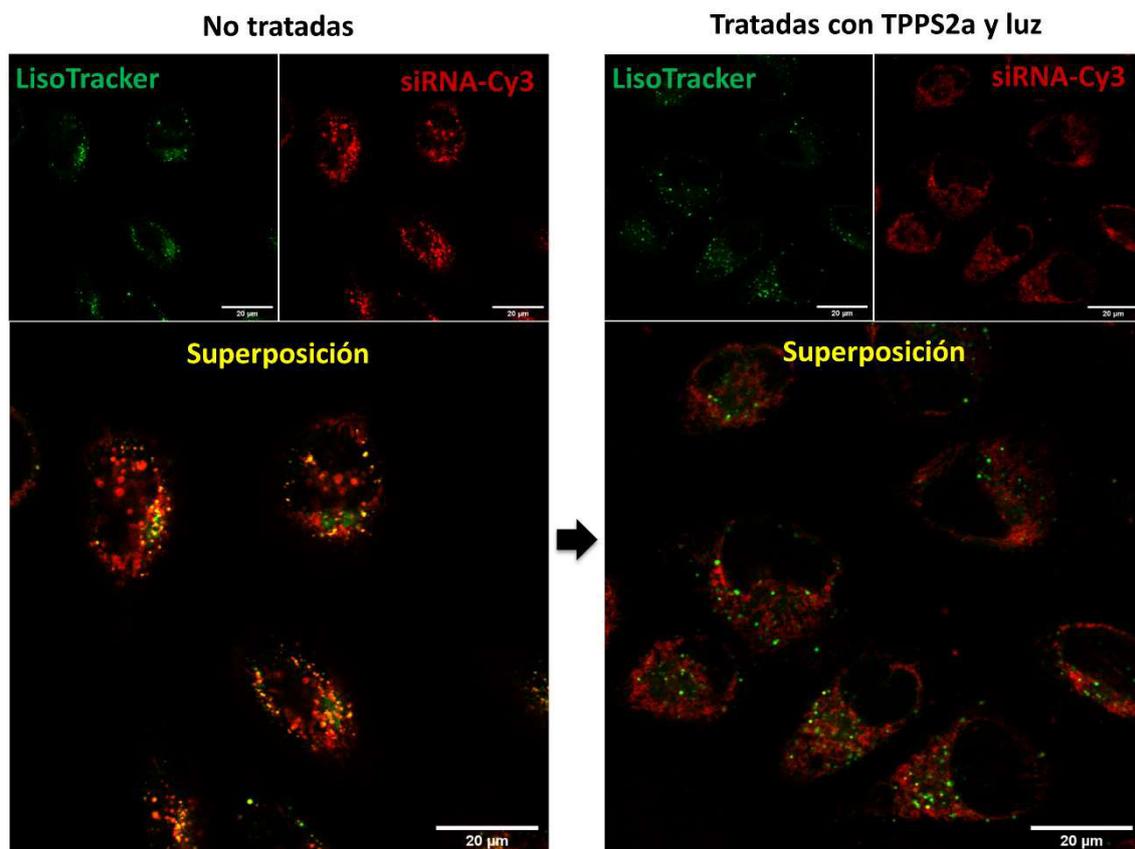


Figura 7. Colocalización del siRNA-Cy3 (rojo) transfectado en células HeLa por NCs de quitosano con los lisosomas marcados con LysoTracker® Green (verde), tras la aplicación o no del tratamiento de PCI con TPPS2a y luz. Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.

## NCs xantano



**Figura 8.** Colocalización del siRNA-Cy3 (rojo) transfectado en células HeLa por NCs de xantano con los lisosomas marcados con LysoTracker® Green (verde), tras la aplicación o no del tratamiento de PCI con TPPS2a y luz. Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.

En las células no tratadas con PCI de la Figura 7 y Figura 8 se pueden observar puntos amarillos de colocalización, que indican que parte del siRNA transfectado por las NCs de quitosano y de xantano se encuentra en los lisosomas, lo que corrobora los resultados del estudio anterior de colocalización, incluido en el apartado 2.4.2. del capítulo 5. Por el contrario, después del tratamiento de PCI todos los lisosomas aparecen marcados en verde en vez de amarillo, lo que sugiere que el siRNA que se encontraba en lisosomas ha sido liberado. Estas observaciones fueron corroboradas mediante análisis cuantitativo de la colocalización (Figura 9).

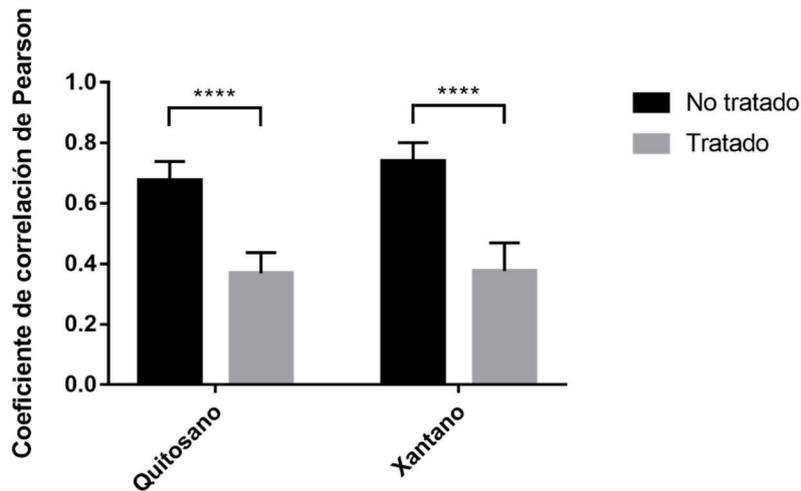


Figura 9. Análisis cuantitativo de la colocalización mediante determinación del Coeficiente de correlación de Pearson (PCC) entre los lisosomas marcados con LysoTracker® Green y el siRNA-Cy3 transfectado con NCs de quitosano o de xantano en células HeLa, después de ser sometidas o no al tratamiento de PCI. Los valores representados son el promedio y desviación estándar del PCC calculado a partir del análisis de 15-20 células por muestra. Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas (\*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , prueba t de Student desapareada).

La gráfica representa el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) entre los lisosomas y el siRNA transfectado con NCs de quitosano y de xantano. Las muestras no tratadas con PCI, poseen un PCC relativamente elevado (0.68 para el siRNA transfectado con NCs de quitosano y 0.74 para el transfectado con NCs de xantano), reproduciendo con gran similitud los valores obtenidos en el estudio de colocalización realizado en la Universidad de Zaragoza. Tras el tratamiento con PCI, el PCC disminuye significativamente (0.37 para el siRNA transfectado con NCs de quitosano y 0.38 para el transfectado con NCs de xantano), lo que demuestra la efectividad de este tratamiento para liberar el siRNA de los lisosomas.

Estos resultados permiten concluir que el fototratamiento está aumentando la liberación de siRNA de los lisosomas, tal y como se esperaba, por lo que debe haber otra razón que explique por qué no mejora la eficiencia del silenciamiento génico. Es posible que las especies ROS generadas por el fotosensibilizador reaccionen con el siRNA afectando su funcionalidad. De hecho, esta es una de las limitaciones actuales de la tecnología PCI en terapia génica y ocurre principalmente cuando el nanotransportador es lipofílico y se sitúa cerca de la membrana endosomal donde se forman las especies ROS, provocando la fotooxidación del fármaco transportado [26]. Teniendo en cuenta que las NCs poseen componentes anfífilicos, esta podría ser la causa de la ineficacia del tratamiento de PCI en este caso. Otra posibilidad es que la nanocápsula o alguno de sus componentes permanezca asociado al siRNA, incluso tras ser liberado de los lisosomas, y esté dificultando su incorporación al complejo multiproteico RISC, un paso clave para que se produzca el silenciamiento génico.

Este trabajo ha sido una primera aproximación al uso de la tecnología PCI para liberar el siRNA de los lisosomas. No obstante, en trabajos futuros sería interesante profundizar en aspectos relacionados con la localización del propio nanotransportador, para saber si se sitúa cerca de la membrana lisosomal, si también consigue escapar de los lisosomas al aplicar la PCI y si continúa asociado al siRNA o se separan para que este pueda ejercer su función.

## 2.2. Tratamiento de PCI dirigido a mitocondrias

Como el tratamiento de PCI dirigido a endolisosomas no funcionó como se esperaba, y sabiendo que parte del siRNA se podía encontrar retenido en las mitocondrias, se decidió intentar liberarlo utilizando un fotosensibilizador dirigido a mitocondrias. El fotosensibilizador seleccionado fue el BPD-MA (del inglés *Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A*), también llamado verteporfina y comercializado en la Unión Europea bajo el nombre de Visudyne© desde el año 2000 para su uso en terapia fotodinámica [31,32]. El uso de fotosensibilizadores dirigidos a mitocondria para liberar su contenido al citosol mediante PCI representa una estrategia innovadora todavía no documentada.

### 2.2.1. Citotoxicidad del fotosensibilizador BPD-MA y combinación con NCs

A diferencia del fotosensibilizador TPPS2a, el BPD-MA se activa con luz roja (600-700 nm). Dado que disponíamos de dos lámparas que emitían luz roja a diferentes longitudes de onda (630 nm y 670 nm), la primera optimización del tratamiento consistió en seleccionar la longitud de onda más efectiva y una concentración de PS que causara baja citotoxicidad. Se sembraron células HeLa-GFP y al día siguiente se incubaron durante 90 min con el fotosensibilizador BPD-MA en un rango de concentraciones entre 0.025 y 0.4  $\mu\text{M}$ . Tras un lavado para eliminar el exceso de BPD-MA, las células fueron irradiadas a 630 ó 670 nm manteniendo constante la dosis de luz ( $2.5 \text{ J/cm}^2$ ). Esta dosis de luz fue seleccionada en base a estudios previos realizados por la Dra. Pilar Acedo y correspondía a tiempos de irradiación de 5 min 52 s con la lámpara a 630 nm y 1 min 15 s con la lámpara a 670 nm (debido a las distintas intensidades de las lámparas). La viabilidad celular fue evaluada mediante MTT 48 h después de la irradiación (Figura 10).

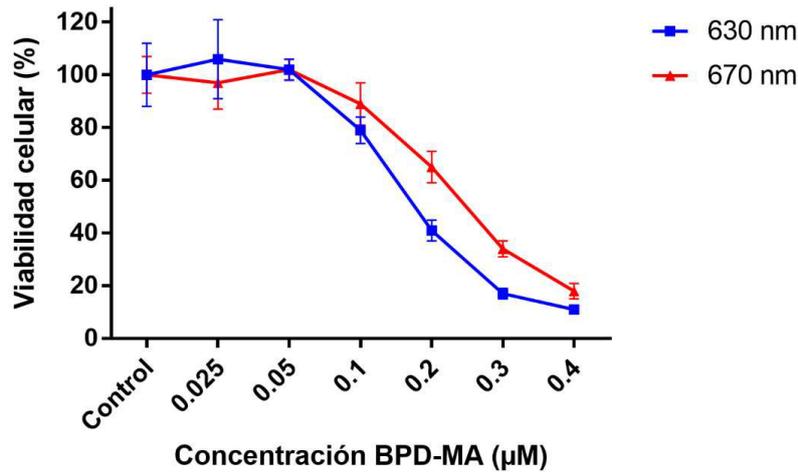


Figura 10. Viabilidad de células HeLa-GFP tras ser tratadas con BPD-MA e irradiadas a distintas longitudes de onda.

La irradiación a 630 nm demostró ser ligeramente más efectiva que a 670 nm. Se seleccionó una concentración de 0.1 μM de BPD-MA y la lámpara a 630 nm para realizar los siguientes experimentos. Estas condiciones garantizan que el fototratamiento sea efectivo, pero sin llegar a ser demasiado tóxico para las células (viabilidad del 80%).

De la misma forma que se hizo con el TPPS2a, para verificar que la concentración de BPD-MA y la dosis de luz seleccionada no resultaban demasiado tóxicas cuando se aplicaba la PCI en presencia de siRNA-NCs, se probaron una concentración alta de 150 μg/mL y una concentración más baja de 25 μg/mL y se comparó la viabilidad celular mediante MTT a las 48 h, con y sin el tratamiento de PCI (Figura 11). En este caso, primero se efectuó el tratamiento con las NCs durante 4 h y, después de retirar las NCs no internalizadas, se incubó el BPD-MA durante 90 min, para irradiar las células después de su retirada, ya que con el BPD-MA es importante que la irradiación se lleve a cabo justo al finalizar la incubación para asegurar la eficiencia óptima del fototratamiento.

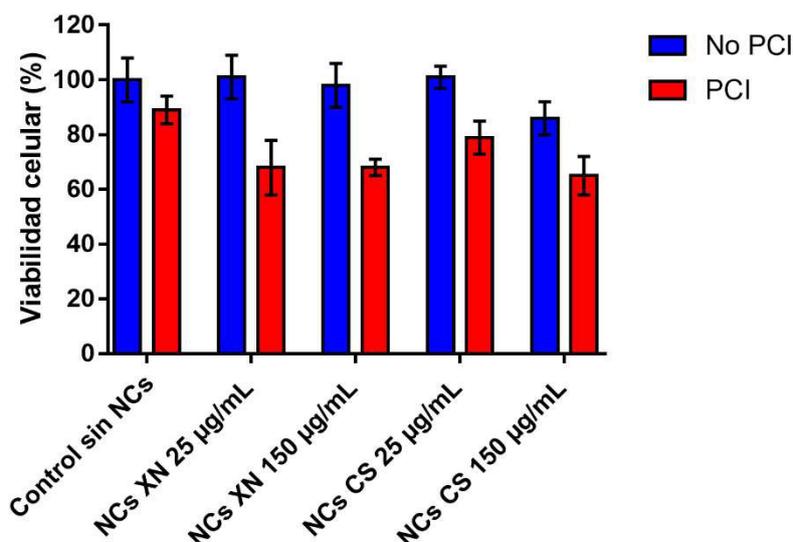


Figura 11. Viabilidad de células HeLa-GFP tras ser incubadas con NCs de quitosano (CS) o de xantano (XN) cargadas de siRNA y tratadas o no con PCI utilizando el fotosensibilizador BPD-MA.

A diferencia del tratamiento con TPPS2a, la citotoxicidad aumenta cuando el tratamiento con BPD-MA se combina con las NCs, pero la viabilidad se mantiene por encima del 60 %, por lo que se utilizaron las mismas condiciones para los siguientes experimentos (150 µg/mL de NCs, 0.1 µM BPD-MA e irradiación de 5 min 52 seg a 630 nm).

### 2.2.2. Silenciamiento de GFP tras el tratamiento con NCs y PCI

En este caso, el objetivo de estos experimentos era analizar si el tratamiento de PCI con el fotosensibilizador BPD-MA dirigido a mitocondrias mejoraba el silenciamiento génico de las NCs, de forma que disminuyera la expresión de GFP. Las células fueron tratadas con siRNA-NCs y PCI siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior (150 µg/mL de NCs, 0.1 µM BPD-MA e irradiación de 5 min 52 seg a 630 nm). Las células no tratadas con PCI, utilizadas como referencia de partida, no se incubaron con el fotosensibilizador y no se irradiaron, pero sí fueron tratadas con NCs para evaluar la potencial mejoría tras la combinación de los dos tratamientos (excepto el control no transfectado). El silenciamiento de GFP se analizó 48 h después de los tratamientos (Figura 12).

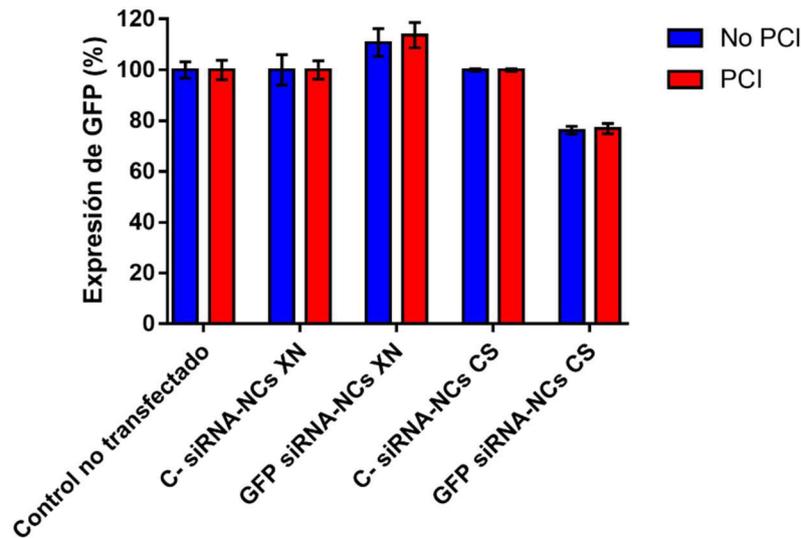


Figura 12. Silenciamiento de GFP 48h después de la incubación con NCs de quitosano (CS) o de xantano (XN) cargadas de siRNA y el tratamiento de PCI con BPD-MA.

Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con el tratamiento de PCI dirigido a endolisomas. En el caso de las NCs de quitosano, la expresión de GFP baja a un 76 %, lo que demuestra la reproducibilidad de los experimentos anteriores, llevados a cabo tanto en Londres como en Zaragoza, pero el tratamiento con PCI no disminuye más la expresión de GFP. En el caso de las NCs de xantano no se observa ningún efecto de silenciamiento génico, con o sin tratamiento.

De la misma forma que se hizo con el tratamiento dirigido a endolisomas, para completar el estudio de PCI dirigido a mitocondrias era importante saber si el fototratamiento estaba siendo capaz de liberar el siRNA de las mitocondrias o continuaba atrapado allí y por eso no mejoraba el silenciamiento génico. Para averiguar si el siRNA seguía colocalizando o no con las mitocondrias después del tratamiento de PCI, se utilizó la microscopía confocal.

### 2.2.3. Colocalización del siRNA con mitocondrias tras el fototratamiento

Como en el caso del estudio de liberación de los endolisomas, para comprobar si el siRNA conseguía escapar de las mitocondrias se realizó un análisis mediante microscopía confocal de las células sometidas al tratamiento. Como en los estudios anteriores de colocalización, se utilizaron células HeLa (sin GFP) para dejar el canal verde disponible para el marcaje de las mitocondrias con MitoTracker® Green.

Las células fueron incubadas con las NCs de quitosano y xantano cargadas con el siRNA-Cy3 durante 4 h, tratadas con el fotosensibilizador BPD-MA, e irradiadas. Después del tratamiento, se marcaron las mitocondrias y se tomaron imágenes en un microscopio confocal (Figura 13 y Figura 14). Como referencia, se utilizaron células incubadas con NCs pero que no habían sido tratadas con PCI. La colocalización entre

siRNA y mitocondrias fue cuantificada utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson (PCC) (Figura 15).

### NCs quitosano

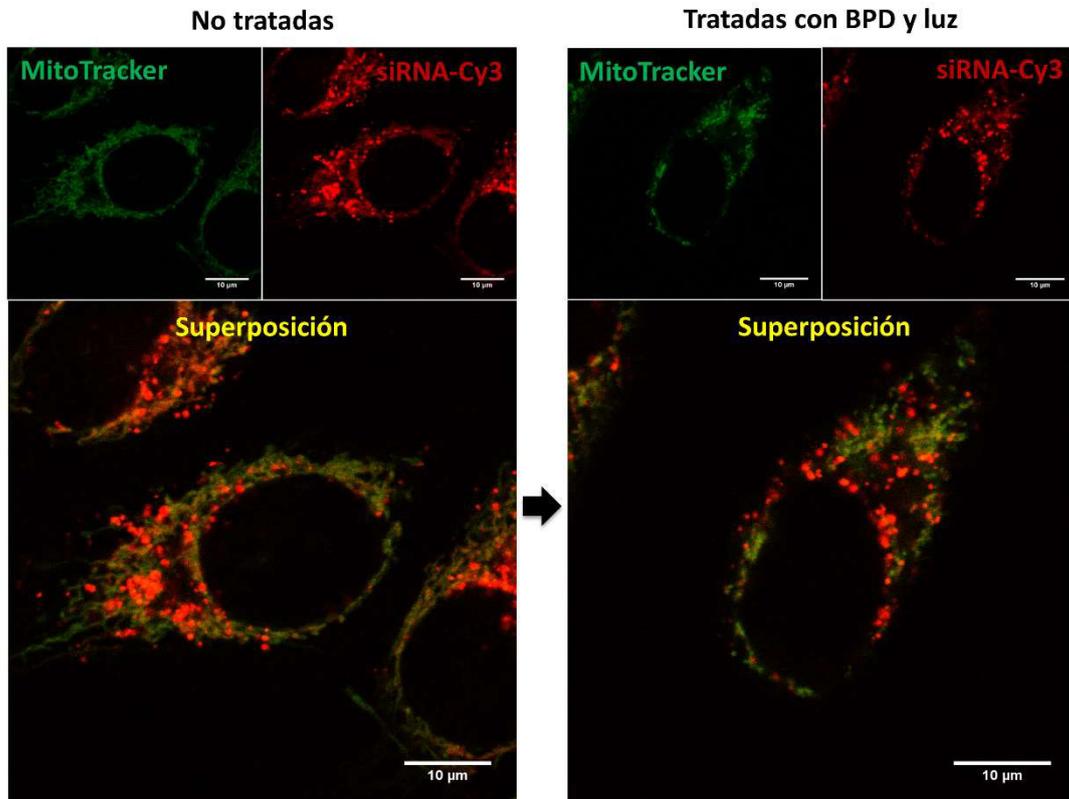


Figura 13. Colocalización del siRNA-Cy3 (rojo), transfectedo en células HeLa por NCs de quitosano, con las mitocondrias marcados con MitoTracker® Green (verde), tras la aplicación o no del tratamiento de PCI con BPD-MA y luz. Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.

## NCs xantano

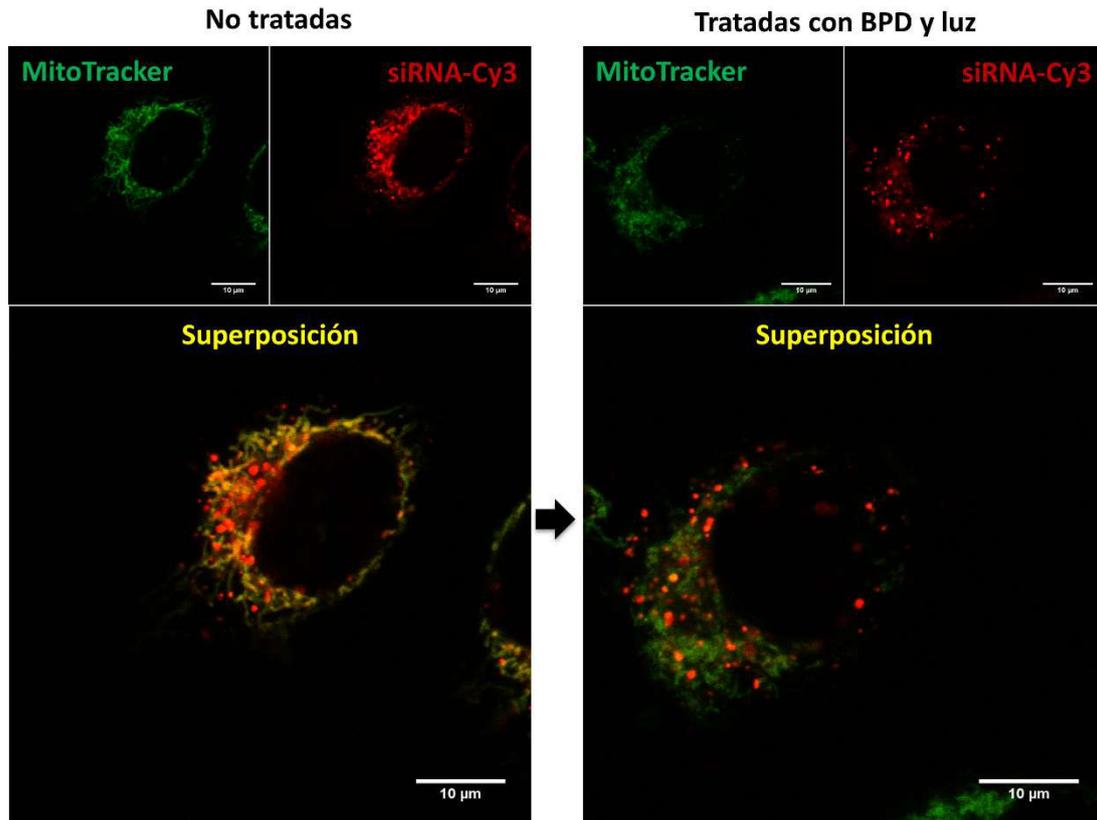


Figura 14. Colocalización del siRNA-Cy3 (rojo), transfectado en células HeLa por NCs de xantano, con las mitocondrias marcados con MitoTracker® Green (verde), tras la aplicación o no del tratamiento de PCI con BPD-MA y luz. Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal

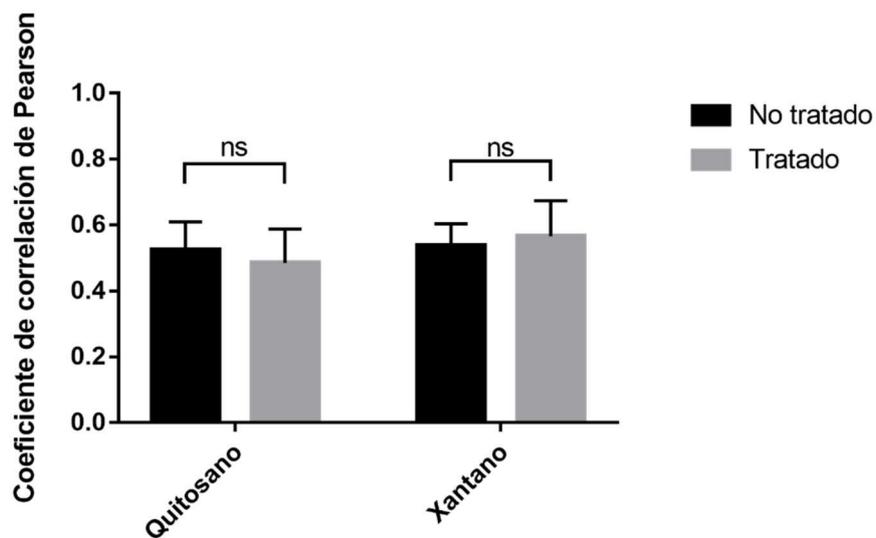


Figura 15. Análisis cuantitativo de la colocalización mediante determinación del Coeficiente de correlación de Pearson (PCC) entre las mitocondrias marcadas con MitoTracker® Green (verde) y el siRNA-Cy3 (rojo) transfectado con NCs de quitosano o de xantano en células HeLa, después de ser sometidas o no al tratamiento de PCI. Los valores representados son el promedio y desviación estándar

**del PCC calculado a partir del análisis de 15-20 células por muestra. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba t de Student despareada (ns).**

Como se ha comentado anteriormente, la fluorescencia roja del siRNA transportado por las NCs presenta dos tipos de patrones de fluorescencia: en forma de puntos y en forma de fibras. Durante los experimentos de colocalización anteriores (ver capítulo 5 apartado 2.4.2.) se demostró que la fluorescencia punteada corresponde principalmente a los lisosomas y la fibrilada a las mitocondrias.

Sin el tratamiento de PCI, una moderada parte del siRNA (rojo) transfectado por las NCs de quitosano y de xantano colocaliza con las mitocondrias (verde), como puede observarse en la Figura 13 y la Figura 14. Sin embargo, después del tratamiento de PCI se sigue observando colocalización, lo que significa que todavía hay siRNA dentro de las mitocondrias. A diferencia del fototratamiento de endolisomas, no se observa una liberación clara del siRNA de las mitocondrias al citosol.

Los valores del PCC (0.52 y 0.54 para las NCs de quitosano y de xantano, respectivamente) representados en la Figura 15 verifican la colocalización parcial en las mitocondrias, debida a que la fluorescencia del siRNA está distribuida entre lisosomas y mitocondrias. La ausencia de diferencias significativas entre el PCC de las muestras tratadas y no tratadas indica que, en este caso, el tratamiento de PCI no está produciendo ningún cambio en la distribución intracelular del siRNA, lo que explica por qué no se observaban diferencias en la eficiencia de silenciamiento después del tratamiento.

### 3. CONCLUSIONES

Los estudios de colocalización presentados en el capítulo 5 revelaron que el siRNA se encuentra parcialmente atrapado en los lisosomas y las mitocondrias, lejos de su sitio de acción (el citosol). Para favorecer la liberación del siRNA de estos compartimentos intracelulares al citosol se ha utilizado y optimizado la novedosa tecnología de internalización fotoquímica (PCI), basada en el uso de fotosensibilizadores. El fotosensibilizador TPPS2a ha sido utilizado para liberar el siRNA de los endolisomas y se ha investigado una posible nueva aplicación del fotosensibilizador BPD-MA para la liberación del siRNA de las mitocondrias. Se han optimizado las condiciones del tratamiento combinado de siRNA-NCs y PCI para maximizar su efecto sin llegar a generar una elevada citotoxicidad.

La eficiencia de silenciamiento obtenida con las NCs de quitosano y de xantano en el laboratorio de Londres es consistente con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio de Zaragoza (capítulo 5), pero el tratamiento de PCI no la mejoró. En el caso del tratamiento dirigido a mitocondrias, el análisis de colocalización del siRNA con las mitocondrias reveló que el siRNA continuaba estando atrapado en estos orgánulos tras la PCI, lo que podría explicar la ausencia de efecto de este tratamiento. Sin embargo, en

el caso del tratamiento dirigido a endolisosomas, se detectó una notable liberación del siRNA de los lisosomas. El hecho de que la liberación del siRNA no se viera traducida en una mayor eficiencia de silenciamiento podría deberse a la fotooxidación del siRNA por las especies ROS generadas durante la reacción fotoquímica, que podría conducir a la pérdida de su funcionalidad, como ha sido descrito con otras biomoléculas y fármacos en la literatura. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que la funcionalidad del siRNA que llega al citosol esté impedida porque no consigue liberarse totalmente de la nanocápsula, lo que podría ser objeto de un interesante estudio futuro.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las secuencias de siRNA, la Lipofectamina®, el fluoróforo DiD, los marcadores de lisosomas y mitocondrias y las líneas celulares utilizadas en este capítulo han sido previamente referenciadas en el capítulo 5.

El fotosensibilizador TPPS2a (meso-tetraphenylporphine disulphonic acid dihydrochloride, TPPS2 adjacent isomer) fue adquirido a Frontier Scientific Inc y el fotosensibilizador BPD-MA (comercializado como Visudyne) a Novartis pharma. El Sytox Blue fue comprado a ThermoFisher®.

##### 4.1.1. Tratamiento con NCs-siRNA, fotosensibilizadores y luz

Tratamiento dirigido a endolisosomas. Se sembraron células HeLa-GFP en placas de 96 pocillos a 5 000 células por pocillo (para análisis por MTT, 6 réplicas por muestra) o en placas de 24 pocillos a 20 000 células por pocillo (para análisis por citometría, 2 réplicas por muestra). Después de 24 horas, se añadió el fotosensibilizador TPPS2a en un rango de concentraciones de entre 0.025 y 0.4 µg/mL (en los experimentos de optimización) o a 0.1 µg/mL (en los experimentos finales) y se incubó durante 18 h. Tras retirar el TPPS2a, se añadieron NCs-siRNA de quitosano y xantano a 25 ó 150 µg/mL (la concentración de siRNA correspondiente a 150 µg/mL de nanotransportador era: 47 nM (NCs CS GFP), 59 nM (NCs CS NT), 71 nM (NCs XN GFP) y 50 nM (NCs XN NT). Se añadió un control positivo de siRNA 10 nM transfectado con Lipofectamina® siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 4 h de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e iluminadas a 435 nm con una lámpara LumiSource de 7 mW/cm<sup>2</sup> (PCI Biotech) durante 0, 3, 5 ó 7 minutos, correspondiendo a una dosis de luz de 0, 1.3, 2.1 y 2.9 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Se mantuvieron las células en el incubador hasta el momento de ser analizadas.

Tratamiento dirigido a mitocondrias. Se sembraron células HeLa-GFP en placas de 96 pocillos a 5 000 células por pocillo (para análisis por MTT, 6 réplicas por muestra) o en placas de 24 pocillos a 20 000 células por pocillo (para análisis por citometría, 2 réplicas por muestra). Después de 24 horas, se añadieron NCs-siRNA de quitosano y xantano a 25 ó 150 µg/mL (la concentración de siRNA correspondiente a 150 µg/mL de nanotransportador era: 47 nM (NCs CS GFP), 59 nM (NCs CS NT), 71 nM (NCs XN GFP) y

50 nM (NCs XN NT)). Para el análisis por citometría, se añadió un control positivo de siRNA 10 nM transfectado con Lipofectamina® siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 4 h de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas durante 90 min con el fotosensibilizador BPD-MA en un rango de concentraciones de entre 0.025 y 0.4  $\mu\text{M}$  (en los experimentos de optimización) o a 0.1  $\mu\text{M}$  (en los experimentos finales). Después, se retiró el BPD-MA, se lavaron las células una vez con PBS y se irradiaron a 630 ó 670 nm con una lámpara LED Par 64 short (Showtec) o una lámpara LED Red 670 Device (Red Light Man), respectivamente, a una dosis de luz de 2.5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , correspondiendo a 5 min 52 seg y 1 min 15 seg, respectivamente. La irradiancia se estableció utilizando un medidor PM100A (Thorlabs).

#### 4.1.2. Ensayos MTT

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular para determinar la citotoxicidad del tratamiento con las NCs, el fototratamiento, y la combinación de ambos, utilizando el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). 48 h después de que las células fueran tratadas con NCs y/o luz (ver apartado anterior), el medio se reemplazó con la solución de MTT (0.5 mg/mL en DMEM). Después de 1 h de incubación, se eliminó el medio y los cristales formados se disolvieron en 150  $\mu\text{L}$  de DMSO. La absorbancia a 570 nm se midió en un lector de placas Infinite 200PRO (Tecan®). La viabilidad celular relativa (%) se calculó utilizando la relación porcentual entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control.

#### 4.1.3. Citometría de flujo

Para cuantificar el nivel de expresión de la GFP 48 h tras el tratamiento combinado de NCs y luz, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.1.1. con las variaciones indicadas a continuación. Tras ser levantadas y lavadas con PBS, las células fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de PBS y marcadas con Sytox Blue. Las células se analizaron en un citómetro de flujo BD™ LSR II (BD Biosciences). Se registraron 10.000 eventos por muestra y los datos se interpretaron utilizando el programa FlowJo 7.6. Para el análisis de expresión de GFP se obtuvo la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células vivas de cada muestra, descartando las células muertas con marcaje positivo para Sytox. Todas las muestras se prepararon y analizaron por duplicado.

#### 4.1.4. Microscopía confocal

Análisis de colocación con lisosomas. Se sembraron células HeLa (sin GFP) en portaobjetos de 8 pocillos (Ibidi®) a 10 000 células/pocillo. Después de 24 horas, se añadió el fotosensibilizador TPPS2a a 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó durante 18 h. Tras retirar el TPPS2a, se añadieron NCs de quitosano y xantano marcadas fluorescentemente con DiD y cargadas con siRNA-Cy3 a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (correspondiendo a  $67 \pm 10$  nM siRNA-Cy3 en las NCs de quitosano y a  $79 \pm 1$  nM en las de xantano, estimado mediante electroforesis). Tras 4 h de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e iluminadas a 435 nm

durante 7 minutos. Las células fueron incubadas con LysoTracker® a 100 nM durante 30 minutos en el incubador y después observadas en el microscopio confocal.

Análisis de colocación con mitocondrias. Se sembraron células HeLa (sin GFP) en portaobjetos de 8 pocillos (Ibidi®) a 20 000 células/pocillo. Después de 24 horas, se añadieron NCs-siRNA de quitosano y xantano marcadas fluorescentemente con DiD y cargadas con siRNA-Cy3 a 150 µg/mL (correspondiendo a 67 nM siRNA-Cy3 en las NCs de quitosano y a 79 nM en las de xantano). Tras 4 h de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas durante 90 min con el fotosensibilizador BPD-MA a 0.1 µM. Después, se retiró el BPD-MA, se lavaron las células una vez con PBS y se irradiaron a 630 nm con una dosis de luz de 2.5 J/cm<sup>2</sup> (5 min 52 seg). A modo de control, se incluyeron muestras no tratadas, tratadas con NCs o con el fotosensibilizador pero sin irradiar, tratadas con NCs y luz pero en ausencia de fotosensibilizador, y tratadas con el fotosensibilizador y luz pero en ausencia de NCs.

A modo de control, se incluyeron muestras no tratadas, tratadas con NCs o con el fotosensibilizador pero sin irradiar, tratadas con NCs y luz pero en ausencia de fotosensibilizador, y tratadas con el fotosensibilizador y luz pero en ausencia de NCs. Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio confocal Olympus IX 81, un objetivo 60X con aceite de inmersión y láseres a 488, 559 y 635 nm para excitar el LysoTracker® o MytoTracker®, el Cy3 y el DiD, respectivamente. Las imágenes fueron procesadas utilizando ImageJ y el análisis cuantitativo de la colocación se realizó como en el apartado 4.6.4.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer especialmente a la Doctora Pilar Acedo (University College London) por el acceso y soporte con los equipos de citometría y microscopía del Royal Free Hospital y el UCL Cancer Institute.

## 6. REFERENCIAS

1. Canton, I.; Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718.
2. Liang, W.; W. Lam, J.K. Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. In *Molecular Regulation of Endocytosis*; InTech, 2012; pp. 429–456.
3. He, C.; Yue, H.; Xu, L.; Liu, Y.; Song, Y.; Tang, C.; Yin, C. siRNA release kinetics from polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation therapy via oral delivery. *Acta Biomater.* **2020**, *103*, 213–222.
4. Serrano-Sevilla, I.; Artiga, Á.; Mitchell, S.G.; De Matteis, L.; de la Fuente, J.M. Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives. *Molecules* **2019**, *24*, 2570.
5. Oliveira, S.; Hogset, A.; Storm, G. Delivery of siRNA to the Target Cell Cytoplasm:

- Photochemical Internalization Facilitates Endosomal Escape and Improves Silencing Efficiency, In Vitro and In Vivo. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 3686–3697.
6. Moros, M.; Mitchell, S.; Grazu, V.; Fuente, J.M. de The Fate of Nanocarriers As Nanomedicines In Vivo: Important Considerations and Biological Barriers to Overcome. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2759–2778.
  7. Patil, S.; Bhatt, P.; Lalani, R.; Amrutiya, J.; Vhora, I.; Kolte, A.; Misra, A. Low molecular weight chitosan–protamine conjugate for siRNA delivery with enhanced stability and transfection efficiency. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 110951–110963.
  8. Howard, K.A.; Rahbek, U.L.; Liu, X.; Damgaard, C.K.; Glud, S.Z.; Andersen, M.; Hovgaard, M.B.; Schmitz, A.; Nyengaard, J.R.; Besenbacher, F.; et al. RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System. *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 476–484.
  9. Sun, P.; Huang, W.; Kang, L.; Jin, M.; Fan, B.; Jin Hongyan; Wang, Q.-M.; Gao, Z. Chitosan Nanoparticle With Enhanced Cell- Penetrating and Endosomal Escape Capacities for Suppressing Breast Tumor Metastasis. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 3221–3234.
  10. Moreira, C.; Oliveira, H.; Pires, L.R.; Simões, S.; Barbosa, M.A.; Pêgo, A.P. Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2995–3006.
  11. Kim, J.S.; Oh, M.H.; Park, J.Y.; Park, T.G.; Nam, Y.S. Protein-resistant, reductively dissociable polyplexes for in vivo systemic delivery and tumor-targeting of siRNA. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2370–2379.
  12. Yotsumoto, F.; Sanui, A.; Fukami, T.; Shiota, K.; Horiuchi, S.; Tsujioka, H.; Yoshizato, T.; Kuroki, M.; Miyamoto, S. Endosomal Escape Pathways-Efficacy of ligand-based targeting for the EGF system in cancer. *Anticancer Res.* **2009**, *151*, 220–228.
  13. Ma, D. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale* **2014**, *6*, 6415.
  14. Oliveira, S.; Fretz, M.M.; Høgset, A.; Storm, G.; Schiffelers, R.M. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2007**, *1768*, 1211–1217.
  15. Berg, K.; Selbo, P.K.; Prasmickaite, L.; Tjelle, T.E.; Sandvig, K.; Moan, J.; Gaudernack, G.; Fodstad, Ø.; Kjølrsrud, S.; Anholt, H.; et al. Photochemical Internalization: A Novel Technology for Delivery of Macromolecules into Cytosol. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1180–1183.
  16. Selbo, P. Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2000**, *1475*, 307–313.
  17. Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145–157.
  18. Wang, J.; Woodhams, J.; MacRobert, A.; Bown, S.; Berg, K. Photodynamic Drug

- Delivery. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, Third Edition - Two Volume Set*; CRC Press, 2012; pp. 1529–1540.
19. Berg, K.; Weyergang, A.; Prasmickaite, L.; Bonsted, A.; Høgset, A.; Strand, M.-T.R.; Wagner, E.; Selbo, P.K. Photochemical Internalization (PCI): A Technology for Drug Delivery. In *Chapter 10. Photodynamic Therapy, Methods and Protocols*; Gomer, C.J., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 635, pp. 133–145 ISBN 978-1-60761-696-2.
  20. Prasmickaite, L.; Høgset, A.; Berg, K. Evaluation of Different Photosensitizers for Use in Photochemical Gene Transfection. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 388.
  21. de Bruin, K.G.; Fella, C.; Ogris, M.; Wagner, E.; Ruthardt, N.; Bräuchle, C. Dynamics of photoinduced endosomal release of polyplexes. *J. Control. Release* **2008**, *130*, 175–182.
  22. Jori, G. Far-red-absorbing photosensitizers: their use in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1992**, *62*, 371–378.
  23. Sultan, A.A.; Jerjes, W.; Berg, K.; Høgset, A.; Mosse, C.A.; Hamoudi, R.; Hamdoon, Z.; Simeon, C.; Carnell, D.; Forster, M.; et al. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a)-induced photochemical internalisation of bleomycin in patients with solid malignancies: a phase 1, dose-escalation, first-in-man trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1217–1229.
  24. Haug, M.; Brede, G.; Håkerud, M.; Nedberg, A.G.; Gederaas, O.A.; Flo, T.H.; Edwards, V.T.; Selbo, P.K.; Høgset, A.; Halaas, Ø. Photochemical Internalization of Peptide Antigens Provides a Novel Strategy to Realize Therapeutic Cancer Vaccination. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 650.
  25. Høgset, A.; Prasmickaite, L.; Tjelle, T.E.; Berg, K. Photochemical Transfection: A New Technology for Light-Induced, Site-Directed Gene Delivery. *Hum. Gene Ther.* **2000**, *11*, 869–880.
  26. Selbo, P.K.; Weyergang, A.; Høgset, A.; Norum, O.-J.; Berstad, M.B.; Vikdal, M.; Berg, K. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *J. Control. Release* **2010**, *148*, 2–12.
  27. Hellum, M.; Høgset, A.; Engesæter, B.; Prasmickaite, L.; Stokke, T.; Wheeler, C.; Berg, K. Photochemically enhanced gene delivery with cationic lipid formulations. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 407–411.
  28. Raemdonck, K.; Naeye, B.; Høgset, A.; Demeester, J.; De Smedt, S.C. Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization. *J. Control. Release* **2010**, *145*, 281–288.
  29. Bøe, S.; Longva, A.S.; Hovig, E. Photochemically Induced Gene Silencing Using Small Interfering RNA Molecules in Combination with Lipid Carriers. *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 166–173.
  30. Høgset, A.; Øvstebø Engesæter, B.; Prasmickaite, L.; Berg, K.; Fodstad, Ø.; Mælandsmo, G.M. Light-induced adenovirus gene transfer, an efficient and specific gene delivery technology for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.*

**2002**, 9, 365–371.

31. VISUDYNE 15 mg powder for solution for infusion - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc) Available online: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/1322/smpc#PRODUCTINFO> (accessed on Dec 19, 2019).
32. Visudyne | C41H42N4O8 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Visudyne> (accessed on Dec 19, 2019).

# Encapsulación de nanopartículas de oro en NCs de quitosano para administración oral

## 1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores de esta tesis se ha investigado la encapsulación directa de ácidos nucleicos y otras moléculas. Además, las nanocápsulas también ofrecen la posibilidad de albergar en su interior nanopartículas de menor tamaño, que pueden ir conjugadas a un fármaco y actuar a su vez como nanotransportadores cuando sean liberados en el lugar de interés. Este enfoque supone enfrentarse a un nivel superior en cuanto a la complejidad del sistema de transporte con el fin de superar, a través de la encapsulación, algunas de las limitaciones de otros tipos de nanotransportadores. Concretamente, los nanotransportadores encapsulados en este trabajo han sido nanopartículas de oro (AuNPs), con el objetivo a largo plazo de unir las a siRNA para que sean liberadas de la cápsula junto con la biomolécula y silencien el gen diana.

En este capítulo se ha optimizado la encapsulación de AuNPs recubiertas de PEG (sin siRNA) como primera etapa del futuro desarrollo de un nanotransportador híbrido cargado con siRNA. La futura unión del siRNA podría realizarse directamente sobre la superficie de la AuNP mediante un enlace entre un átomo S de una molécula tiolada de siRNA y un átomo de Au de la superficie de la AuNP o bien al recubrimiento de PEG mediante un enlace covalente entre un grupo funcional del extremo libre del PEG y otro presente en uno de los extremos de la molécula de siRNA, por ejemplo PEG-COOH y NH<sub>2</sub>-siRNA. Para unir el siRNA mediante el primer método, sería necesario que quedara espacio libre en la superficie de la AuNP, por lo que un recubrimiento parcial de PEG sería la condición idónea, mientras que para unirlo mediante el segundo método sería más ventajoso un recubrimiento total de la superficie con PEG para así disponer de más grupos funcionales. Por estas razones, en este trabajo se han estudiado recubrimientos de PEG a distintas saturaciones de superficie y se ha evaluado cuál de ellas es más favorable para el proceso de encapsulación, lo que servirá como referencia para un futuro estudio con AuNPs funcionalizadas con siRNA.

Las AuNPs han mostrado un gran potencial en una variedad de aplicaciones biomédicas, entre ellas la terapia fototérmica [1], la imagen optoacústica [2], la espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) [3] y la administración de fármacos [4]. No obstante, todavía no se ha aprobado ningún tratamiento clínico con AuNPs e incluso el número de ensayos clínicos con AuNPs es limitado [4]. Esta falta de traslación de la investigación a la clínica se debe principalmente a la escasez de conocimientos sobre la biocompatibilidad de las AuNPs a largo plazo, junto con las numerosas dificultades asociadas con su administración [5].

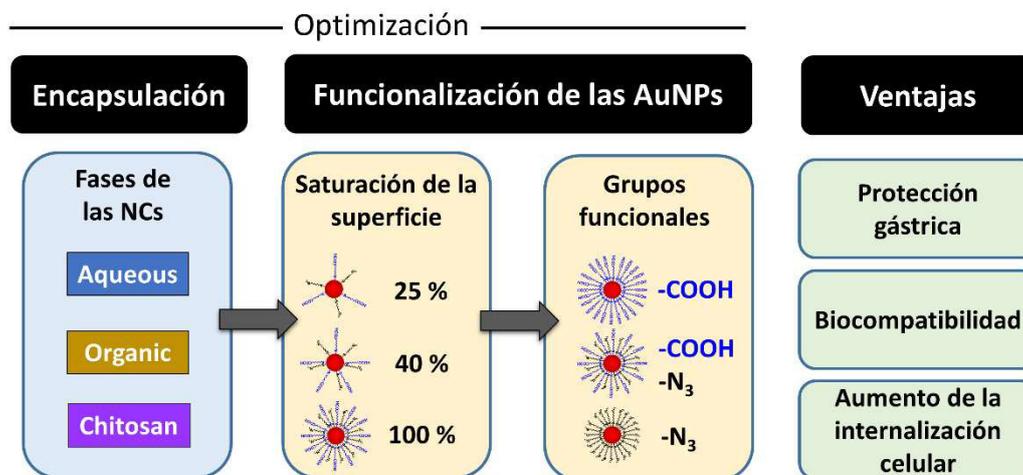
A pesar de que la mayor parte de la investigación actual sobre AuNPs para aplicaciones biomédicas está enfocada hacia la administración intravenosa, se han realizado algunos estudios dirigidos hacia una administración oral. La administración oral suele ser preferible a otras vías de administración, porque al ser un tratamiento no invasivo suele tener una alta aceptación por parte del paciente, un buen grado de cumplimiento a largo plazo y posibilita la cómoda administración de dosis múltiples [6,7]. No obstante, también existen desafíos para lograr la administración oral de los fármacos y sus nanotransportadores, como la variación del pH (muy ácido en el estómago y menos en el intestino [8]), la presencia de enzimas y la barrera intestinal para la absorción del fármaco [9].

La mayoría de los estudios sobre AuNPs para administración oral exploran la biocompatibilidad, la absorción y la biodistribución de las AuNPs tras la administración oral [3,7,10–12]. Es importante destacar que mediante esta vía de administración las AuNPs no mostraron toxicidad aguda *in vivo* [13–15], pero se describieron efectos secundarios menores asociados con la activación del sistema inmunológico [16,17] y el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina [14]. Desafortunadamente, también se ha observado que las AuNPs administradas por vía oral aparecen en gran medida en el contenido fecal sin haber sido absorbidas por el intestino [18]. Además, la excreción fecal también es indicativa de la agregación de las AuNPs y de la pérdida de funcionalidad causada por el entorno gástrico durante la digestión. En consecuencia, es crucial desarrollar estrategias novedosas para proteger y aumentar la absorción de las AuNPs y así facilitar su aplicación como nanotransportadores mediante administración oral.

La encapsulación de AuNPs en nanocápsulas de quitosano podría aumentar su absorción intestinal y a la vez mejorar su biocompatibilidad. Como se describió en el capítulo 2, el quitosano es un polisacárido biocompatible [19–24] y está actualmente aprobado por la FDA para uso dietético [9,25]. El amplio éxito del quitosano en el campo de la administración oral se debe principalmente a sus propiedades mucoadhesivas, derivadas de los grupos amino presentes en su estructura, que aumentan el tiempo de retención en el intestino y facilitan su absorción [26]. Además, también se ha reportado que el quitosano es capaz de abrir las uniones estrechas del epitelio intestinal, facilitando el transporte paracelular de los fármacos [9].

A menudo se utilizan recubrimientos poliméricos para mejorar la estabilidad, biocompatibilidad y biodisponibilidad de las nanopartículas inorgánicas [27–31]. Algunos sistemas híbridos de AuNPs recubiertas con quitosano han sido previamente empleados para aumentar la absorción intestinal de las AuNPs [7,12]. Sin embargo, hasta donde sabemos sólo dos artículos han reportado la posibilidad de encapsular AuNPs en nanotransportadores basados en quitosano [32,33]. Aunque en la literatura sobre nanopartículas inorgánicas a menudo se utiliza el término “encapsulación” como sinónimo de “recubrimiento”, es importante distinguir ambos conceptos. En este capítulo la encapsulación implica el atrapamiento de una o varias nanopartículas dentro de una misma cápsula, a diferencia del recubrimiento entendido como modificación de la superficie de cada una de las nanopartículas de forma individual. La encapsulación de AuNPs ofrece varias ventajas, como una mayor protección frente a la agregación, una mejor adhesión celular, una liberación sostenida y la posibilidad de co-encapsular varios fármacos o componentes activos [24,34,35].

Ante la necesidad de desarrollar nuevos transportadores para proteger y aumentar la absorción de las AuNPs durante la administración oral, en este trabajo se han diseñado y comparado distintas estrategias sintéticas para la obtención de NCs cargadas de AuNPs (Figura 1).



**Figura 1.** Optimización de la estrategia de encapsulación de nanopartículas de oro y ventajas clave del nanomaterial híbrido final para la administración oral.

En este capítulo se investigan varias aproximaciones para encapsular AuNPs de 14 nm de diámetro dentro de NCs de quitosano. Se ha analizado el efecto de la interacción entre los componentes de estas NCs y las AuNPs para optimizar la metodología de encapsulación, concretamente la fase de encapsulación a la que se pueden añadir las AuNPs durante la síntesis de las NCs. La eficiencia de encapsulación de las AuNPs se ha evaluado en función del recubrimiento de la superficie de las AuNPs, incluyendo diferentes saturaciones de recubrimiento y grupos funcionales. Después, las NCs híbridas de oro-quitosano optimizadas mediante este enfoque han sido investigadas

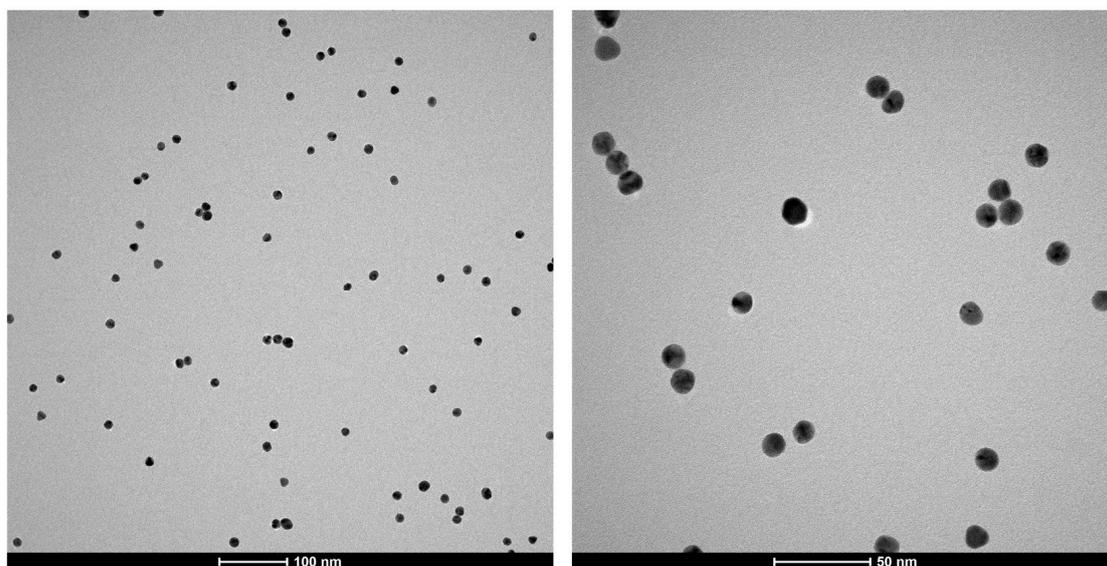
para determinar por una parte su estabilidad y capacidad para proteger a las AuNPs frente a la agregación bajo condiciones gastrointestinales simuladas, y por otra su biocompatibilidad y su internalización en células colorrectales.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo forma parte de una colaboración con el investigador predoctoral Álvaro Artiga Folch y el Dr. Scott Mitchell, en el marco del proyecto Nanogram. Álvaro llevó a cabo la síntesis y funcionalización de las AuNPs utilizadas en este capítulo.

### 2.1. Optimización de la encapsulación de AuNPs

Las nanopartículas esféricas de oro de 14 nm de diámetro seleccionadas para este estudio se eligieron porque pueden ser fácilmente funcionalizadas con diferentes moléculas y a diferentes densidades de cobertura. Esto las convierte en excelentes modelos de las diferentes cargas superficiales y grupos funcionales que las AuNPs podrían exhibir cuando se funcionalicen con PEG y siRNA en el futuro. En este apartado se han utilizado AuNPs recubiertas únicamente con PEG. La caracterización de las AuNPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Imagen de TEM de las nanopartículas de oro esféricas de  $14 \pm 2$  nm utilizadas para la encapsulación.

Las AuNPs han sido encapsuladas en nanotransportadores de quitosano para protegerlas y aumentar su biodisponibilidad para una futura aplicación oral. El proceso sintético para la obtención de las NCs, previamente desarrollado para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos [35] y de ácidos nucleicos, ha sido adaptado y optimizado para la encapsulación de nanopartículas hidrofílicas de oro, lo que demuestra la gran versatilidad de estas NCs para encapsular tanto moléculas simples como pequeñas nanopartículas, ya sea con propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas.

Como se ha explicado en detalle en el capítulo 2, la síntesis de las NCs consta de dos pasos (Figura 3): en el primer paso, se forma una nanoemulsión mediante la adición de una fase orgánica a una fase acuosa. En el segundo paso, se añade una solución de quitosano (denominada en adelante "fase de quitosano" por comparación con las fases acuosa y orgánica) para recubrir los núcleos de nanoemulsión y se realiza la gelificación iónica con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Las AuNPs se añadieron a la fase acuosa, orgánica o de quitosano para evaluar cuál era el medio más adecuado para su encapsulación.

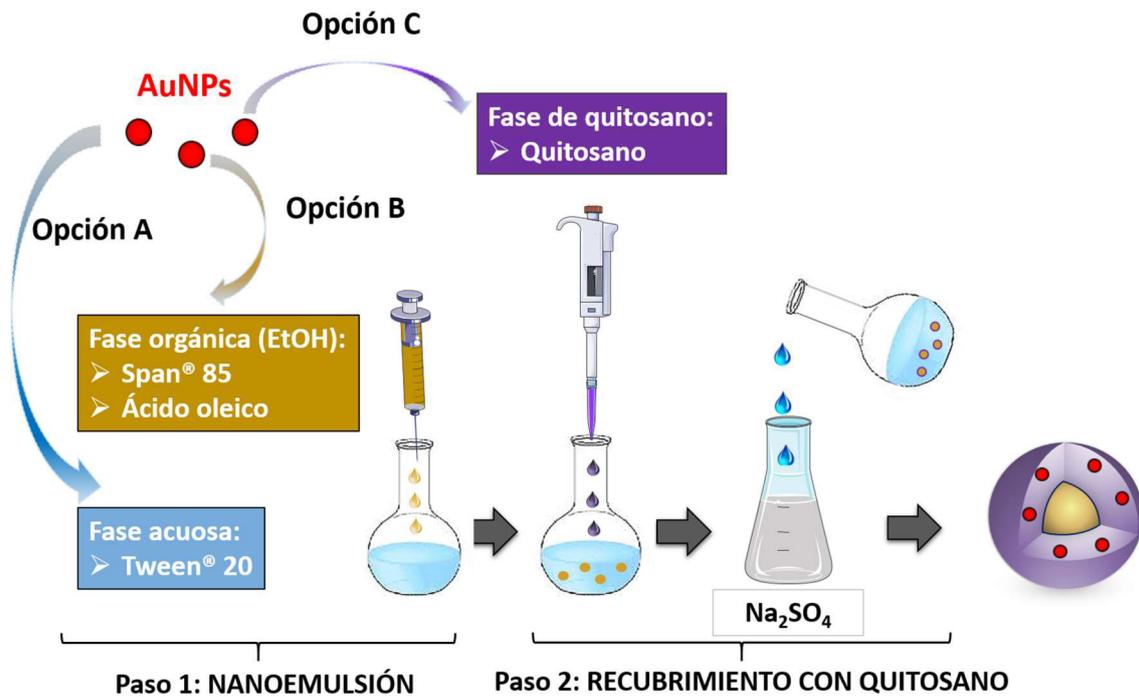


Figura 3. Esquema del método de síntesis empleado para la encapsulación de nanopartículas de oro (AuNPs), destacando las tres fases a las que se pueden añadir las AuNPs.

Las AuNPs poseen una característica banda de resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR), que puede ser aprovechada para extraer información sobre su estabilidad coloidal en función de su entorno. Cuando las AuNPs son estables, su pico LSPR aparece a 524 nm, mientras que la agregación provoca desplazamientos del LSPR hacia longitudes de onda mayores.

Para estudiar cómo interaccionan las AuNPs con los componentes de las tres posibles fases de encapsulación, las AuNPs fueron puestas en contacto con cada fase y se registraron sus espectros de absorbancia UV-Vis (Figura 4a).

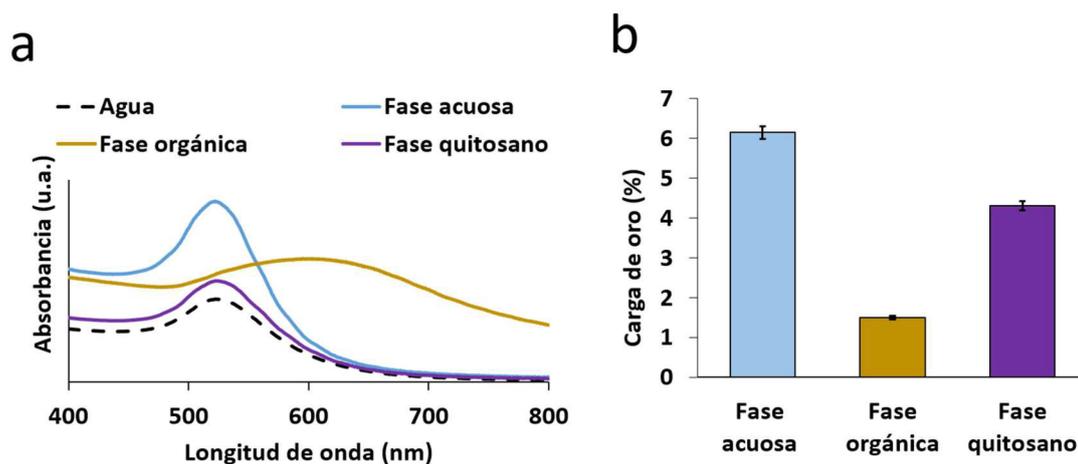


Figura 4. a) Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs al interactuar con los componentes de las tres posibles fases de encapsulación y en agua (como referencia). b) Carga de oro de las nanocápsulas en función de la fase a la que se añadieron las AuNPs, medida por ICP-AES.

La Figura 4a muestra el pico LSPR a 524 nm de las AuNPs en agua y cómo se mantiene a esta longitud de onda cuando las AuNPs están inmersas en la fase acuosa o de quitosano, lo que significa que son estables, pero se desplaza a 600 nm al ser añadidas a la fase orgánica, reflejando el estado agregado de las AuNPs en este ambiente hidrofóbico (lo cual se esperaba dada su naturaleza hidrofílica).

Estas diferencias en la estabilidad nos llevaron a investigar más a fondo si la fase de adición también podría afectar a la cantidad de AuNPs encapsuladas. La carga de oro de las NCs (Figura 4b), determinada mediante ICP-AES y expresada como el porcentaje de AuNPs encapsuladas sobre el peso final del material obtenido después de la encapsulación, fue 3-4 veces mayor cuando las AuNPs se añadieron a la fase acuosa (6.15 %) o a la fase de quitosano (4.31 %), en comparación con la fase orgánica (1.50 %). Además, las adiciones en la fase acuosa o de quitosano dieron lugar a mayores eficiencias de encapsulación (consideradas como el porcentaje de AuNPs encapsuladas respecto a la cantidad añadida inicialmente para la preparación de las NCs), el 57 % y el 50 %, respectivamente, en comparación con la fase orgánica (29 %). La falta de datos publicados que evalúen la carga de oro de las AuNPs encapsuladas en otras nanocápsulas poliméricas dificulta la contextualización de estos valores, sin embargo, las eficiencias de encapsulación reportadas por otras nanoestructuras de oro-quitosano están en torno al 60 % [36]. Teniendo en cuenta estos resultados y que mediante microscopía electrónica se observó que las NCs no se formaban correctamente tras añadir las AuNPs a la fase orgánica, se descartó la adición de AuNPs a la fase orgánica y para las siguientes encapsulaciones las AuNPs se añadieron a la fase acuosa o a la fase de quitosano.

A continuación, la cantidad de AuNPs añadida fue optimizada para maximizar la carga de oro. En concordancia con algunos capítulos anteriores de esta tesis, donde el

aumento de la cantidad inicial de TFD o siRNA dio lugar a un aumento en la carga de las NCs (ver capítulos 4 y 5), en este caso se observó la misma tendencia, alcanzando una mayor carga de oro conforme se incrementa la cantidad de AuNPs añadida en cualquiera de las dos fases (0.45-0.50 % al añadir 0.25 mg de AuNPs, 1.6-2.1 % al añadir 1 mg de AuNPs y 3.2-3.3 % al añadir 2 mg de AuNPs). Se seleccionó una cantidad de 2 mg de AuNPs para todos los experimentos sucesivos debido a la mayor carga de oro lograda en comparación con la adición de 0.25 y 1 mg.

El potencial zeta, tamaño y morfología de las NCs candidatas seleccionadas, obtenidas tras la adición de 2 mg de AuNPs en la fase acuosa o de quitosano, se caracterizaron mediante técnicas de potencial zeta, DLS (Figura 5) y microscopía electrónica (Figura 6).

Los grupos amino del quitosano expuestos en la superficie de las nanocápsulas les confirieron un potencial zeta positivo con valores comparables entre ambas muestras ( $+21.4 \pm 0.6$  mV cuando se añadieron a la fase acuosa y  $+17.0 \pm 0.6$  mV cuando se añadieron a la fase de quitosano). Generalmente se considera que un potencial zeta cercano a  $+20$  mV o  $-20$  mV es suficiente para obtener una estabilidad coloidal óptima, especialmente cuando existe un recubrimiento polimérico que, además de conferir estabilidad electrostática, proporciona estabilidad estérica [37]. La carga positiva en la superficie también promueve las interacciones electrostáticas de los nanotransportadores con la mucosa del intestino cargada negativamente, mejorando su absorción intestinal [37].

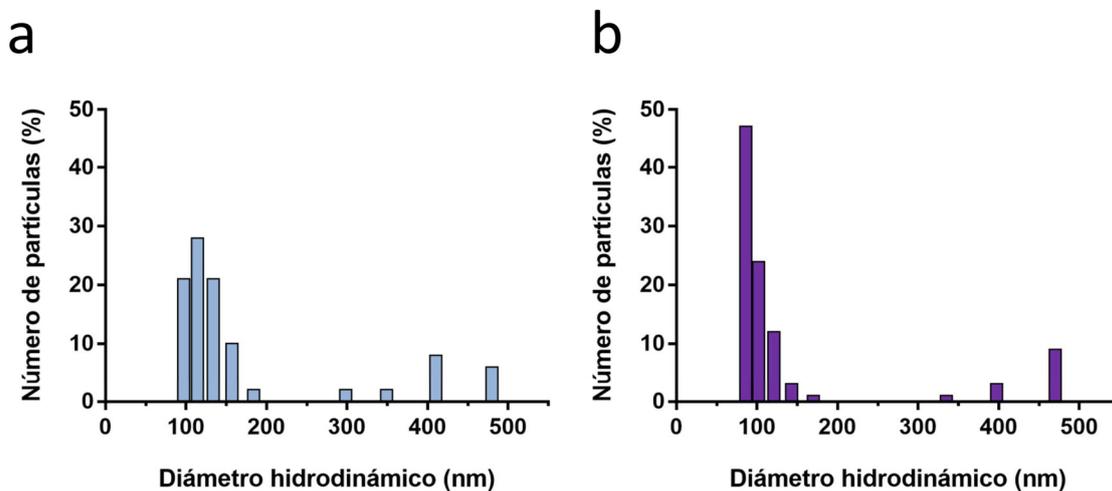
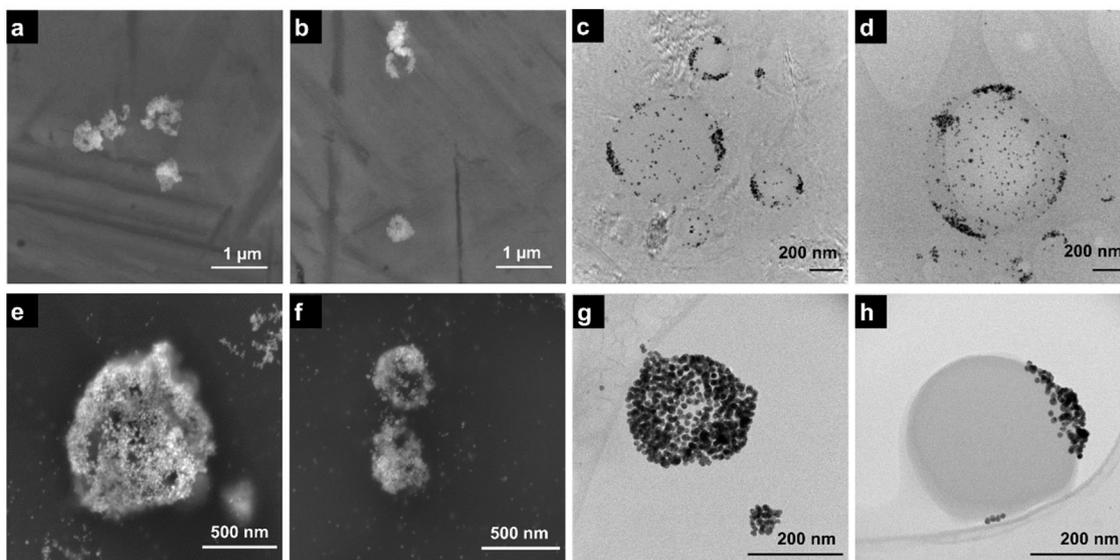


Figura 5. Distribución del tamaño hidrodinámico de las nanocápsulas cargadas con AuNPs añadidos a la fase acuosa (a) o a la fase de quitosano (b).

En la Figura 5 se muestra la distribución de tamaños de las NCs cargadas con AuNPs en la fase acuosa y en la de quitosano. La distribución de tamaños también fue similar para ambas muestras: una población principal (87 % para las NCs de la fase acuosa y 82 % para las de la fase de quitosano) con diámetros hidrodinámicos de alrededor de 100 nm y una población minoritaria (13 ó 18 %) de alrededor de 450 nm fueron registradas

mediante DLS. Esta distribución de tamaños concuerda bien con los análisis de microscopía electrónica (algunas imágenes representativas de cada tamaño de población se muestran en la Figura 6).



**Figura 6.** Imágenes de microscopía electrónica de nanocápsulas cargadas con AuNPs en la fase acuosa (fila superior) o en la fase de quitosano (fila inferior). a-b) Imágenes obtenidas por STEM; c-d,g-h) Imágenes obtenidas por Cryo-TEM; e-f) imágenes obtenidas por SEM.

En la Figura 6 se pueden observar imágenes de microscopía electrónica de transmisión en modo barrido (STEM, Figura 6a-b), microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-TEM, Figura 6c-d,g-h) y de microscopía electrónica de barrido (SEM, Figura 6e-f). Las imágenes confirmaron la presencia de AuNPs en las NCs y mostraron la morfología esférica de las NCs, donde las AuNPs se encontraban atrapadas en el recubrimiento de quitosano, independientemente de su adición a la fase acuosa o de quitosano. Luque-Michel y colaboradores también observaron sus AuNPs hidrofílicas de 10 nm localizadas cerca de la superficie de su nanotransportador polimérico basado en nanoemulsión, embebidas en la cubierta de PLGA [38].

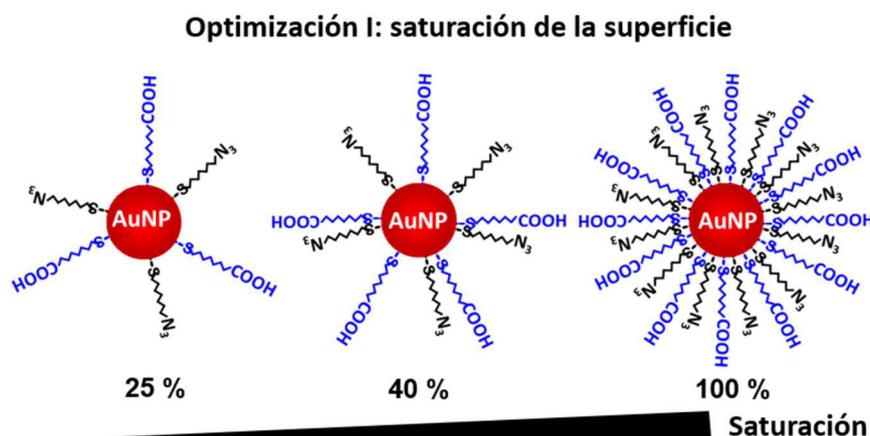
## 2.2. Influencia del recubrimiento de las AuNPs en su encapsulación

Las AuNPs diseñadas para aplicaciones biomédicas habitualmente se funcionalizan para mejorar su biocompatibilidad y su estabilidad en medios biológicos, para incorporar grupos funcionales químicos, para incluir ligandos que permitan su vectorización o para unir fármacos a su superficie [39]. El recubrimiento superficial de las nanopartículas inorgánicas puede influir en la eficiencia de encapsulación en función de las interacciones que es capaz de establecer con el material de encapsulación [40].

Aplicando los parámetros de síntesis optimizados en el apartado anterior (2 mg de AuNPs añadidas a la fase acuosa o de quitosano), se evaluó si las NCs permiten la encapsulación de AuNPs con diferentes recubrimientos para analizar cuál de ellos es

más idóneo para la encapsulación. Con este objetivo, se encapsularon AuNPs funcionalizadas a diferentes niveles de saturación de la superficie con dos tipos diferentes de poli(etilenglicol) (PEG): un PEG con un grupo carboxílico en un extremo (PEG-COOH) y/o un PEG con un grupo azida en un extremo (PEG-N<sub>3</sub>).

En primer lugar, se estudió la encapsulación de AuNPs con diferente saturación superficial de PEG. Para ello, las AuNPs fueron funcionalizadas a una cobertura superficial del 25 %, 40 % o 100 % y manteniendo un ratio de grupos funcionales fijo de 50/50 (PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub>), de acuerdo con un estudio de saturación previamente publicado por el grupo [41], tal y como muestra el esquema de la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema de la superficie de las AuNPs dependiendo de la saturación del recubrimiento de PEG (25, 40 y 100 %).

Después de encapsular en paralelo AuNPs recubiertas de PEG a estas tres saturaciones, la carga de oro de las NCs fue medida por ICP-AES. La carga de oro aumentó ligeramente al incrementar la saturación superficial del 25 % (3-3.5 % de carga) al 40 % (3.5-4 % de carga) y no se observaron diferencias relevantes entre la adición a la fase acuosa o a la de quitosano. Por el contrario, se observa una diferencia notable con una saturación del 100 %, donde la carga de oro es mucho mayor para la adición en la fase acuosa ( $6.15 \pm 0.16$  %) que para la adición en la fase de quitosano ( $4.31 \pm 0.11$  %). Además, es importante señalar que una saturación del 100 % garantiza una mayor estabilidad de las AuNPs y proporciona más grupos funcionales para unir otras moléculas de interés en el futuro, por ejemplo, moléculas de siRNA aminadas que podrían unirse a grupos carboxilo de la superficie. Del mismo modo, una mayor cantidad de grupos funcionales de PEG incrementa las interacciones de las AuNPs con las NCs y permitiría una mejor detección y comprensión, durante nuestro siguiente estudio, del efecto que ejercen los grupos funcionales del recubrimiento sobre la encapsulación. Por estas razones, se seleccionaron las AuNPs recubiertas de PEG a una saturación del 100 % añadidas a la fase acuosa como el método de encapsulación más adecuado para el siguiente estudio.

Una vez seleccionada la mejor saturación superficial para nuestros propósitos, el siguiente paso fue evaluar si el grupo funcional de la superficie de las AuNPs juega un papel importante durante el proceso de encapsulación. Para ello, se utilizaron AuNPs funcionalizadas con PEG-COOH y/o PEG-N<sub>3</sub> a tres ratios diferentes: sólo PEG-COOH; PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub> (50/50) y sólo PEG-N<sub>3</sub> (Figura 8).

**Optimización II: grupo funcional**

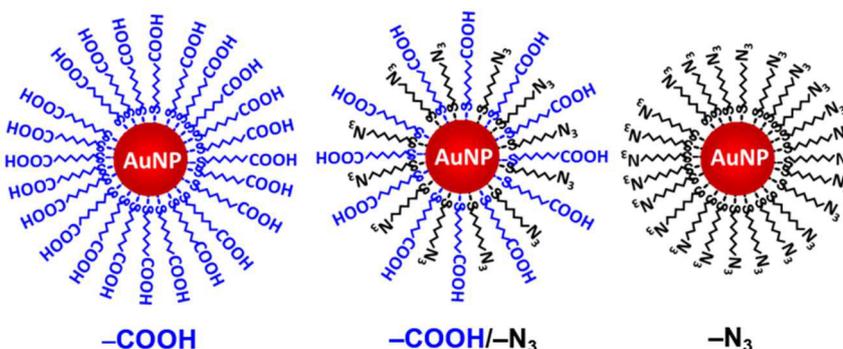


Figura 8. Esquema de la superficie de las AuNPs dependiendo de los grupos funcionales del recubrimiento de PEG (-COOH y/o -N<sub>3</sub>).

Los espectros de absorción de las AuNPs en suspensión acuosa o tras 15 minutos de incubación en la fase acuosa se reportan en la Figura 9.

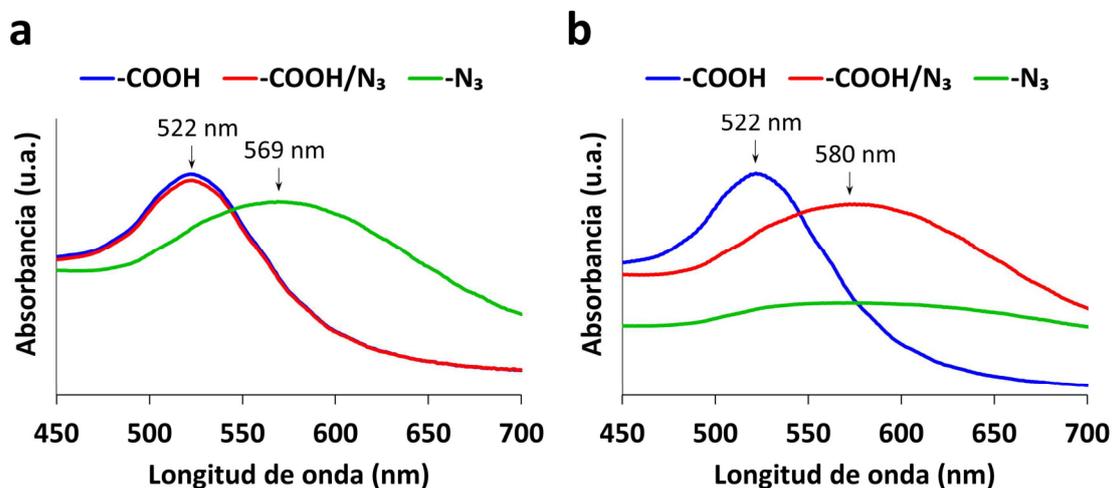


Figura 9. Espectros de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro recubiertas con PEG con diferentes grupos funcionales, en suspensión acuosa (a) o 15 minutos después de ser añadidas a la fase acuosa (b).

Cuando al menos la mitad de los grupos funcionales de PEG eran -COOH, el pico LSPR de las AuNPs en agua (Figura 9a) se mantuvo en 522 nm. Sin embargo, el pico LSPR de las AuNPs recubiertas sólo con PEG-N<sub>3</sub> se desplazó a 569 nm, lo que indica la presencia de agregación y la menor estabilidad coloidal de esta muestra en agua.

Cuando las AuNPs recubiertas de PEG fueron puestas en contacto con la fase acuosa de la síntesis de las NCs, que contiene Tween® 20, el efecto de agregación causado en el caso de las partículas recubiertas con sólo PEG-N<sub>3</sub> fue aún más evidente (Figura 9b). Las AuNPs funcionalizadas sólo con PEG-COOH mantienen su estabilidad en este medio (pico LSPR a 522 nm). Por el contrario, la inclusión de PEG-N<sub>3</sub> en el recubrimiento provoca un desplazamiento del LSPR de las AuNPs, indicativo de un estado más agregado en presencia de Tween® 20. En el caso de las AuNPs con PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub>, el máximo de la banda LSPR apareció aproximadamente a 580 nm, mostrando un pico ancho, pero aún definido. Sin embargo, éste desapareció casi por completo en el caso de las AuNPs con recubrimiento de sólo PEG-N<sub>3</sub>, indicando la mayor agregación de las AuNPs.

Sin embargo, en esta primera etapa del trabajo todavía no descartamos las muestras de PEG-N<sub>3</sub>, ya que la agregación en fase acuosa podría ser un factor favorable para su encapsulación. Si las AuNPs están más cerca en el espacio es más probable que queden atrapadas en la misma nanocápsula, lo que aumentaría su carga de oro. Para investigar esta hipótesis, se analizó mediante ICP-AES la carga de oro de las NCs obtenidas encapsulando partículas recubiertas con PEG con distintos grupos funcionales. La carga de oro obtenida con las AuNPs con PEG-COOH ( $5.98 \pm 0.10$  %) y PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub> ( $6.15 \pm 0.16$  %) fue muy superior a la de las AuNPs con PEG-N<sub>3</sub> ( $0.65 \pm 0.02$  %). Las eficiencias de encapsulación también fueron superiores para las dos primeras muestras ( $51.5 \pm 0.8$  % y  $57.5 \pm 1.5$  %, respectivamente) que para la tercera ( $11.3 \pm 0.3$  %). Estos resultados nos permitieron descartar la hipótesis anterior y confirmar que los grupos carboxílicos son esenciales para obtener altas cargas de oro, posiblemente porque son capaces de establecer interacciones electrostáticas con los grupos amino del quitosano cargados positivamente. Sin embargo, la presencia de cadenas de PEG-N<sub>3</sub> en combinación con PEG-COOH no alteró la carga durante la encapsulación y la presencia de estos grupos funcionales podría ser interesante para aplicaciones biológicas ya que el grupo azida se ha asociado con una mayor internalización celular [39]. Además, la presencia de dos grupos funcionales diferentes en la superficie de las AuNPs podrá facilitar la funcionalización con un espectro más amplio de fármacos u otras moléculas en el futuro, a través de la reacción con carbodiimida en el caso de los grupos carboxílicos [42] o a través de la química click utilizando los grupos azida [43].

Dado que el material híbrido desarrollado ha sido diseñado para el transporte de fármacos mediante administración oral, debe ser capaz de proteger su carga durante el tránsito por el tracto gastrointestinal y favorecer la absorción en el intestino. Para evaluar estas capacidades, se seleccionaron dos tipos de AuNPs: funcionalizadas con PEG-COOH o con PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub> (en lo sucesivo denominadas Au-COOH y Au-COOH/N<sub>3</sub>, respectivamente) y sus respectivas NCs cargadas con ellas (en lo sucesivo denominadas Au-COOH@NC y Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC, respectivamente).

### 2.3. Protección ante fluidos gastrointestinales simulados

Uno de los principales desafíos para la administración oral de nanopartículas y fármacos es resistir el fuerte pH ácido en el estómago sin dañarse o degradarse [44]. Se ha reportado que el estado de agregación de las nanopartículas de oro es muy importante de cara a su absorción intestinal ya que los aglomerados dificultan su aproximación a los tejidos donde se produce la absorción [45].

La falta de estabilidad de las AuNPs a bajo pH y en presencia de sales nos llevó a encapsularlas en NCs de quitosano con el fin de protegerlas de la agregación en los fluidos gástricos para una posible administración oral. Como se ha indicado en la introducción, el quitosano es un polímero natural con excelentes cualidades para la administración oral y se ha utilizado como recubrimiento de muchos nanotransportadores destinados a aplicaciones orales [26]. Por ejemplo, el quitosano fue un elemento crucial para proteger las AuNPs funcionalizadas con toxoide tetánico frente a la degradación gástrica y para mantener su actividad después de la administración oral [46].

Para demostrar el efecto protector de las nanocápsulas de quitosano a pH ácido, los dos tipos de AuNPs seleccionados, encapsulados (Au-COOH@NC y Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC) o no encapsulados (Au-COOH y Au-COOH/N<sub>3</sub>), fueron incubados durante 24 h a 37 °C en fluido gástrico simulado (SGF) libre de enzimas y en agua como control de estabilidad y sus picos LSPR fueron analizados mediante espectrofotometría UV-Vis (Figura 10).

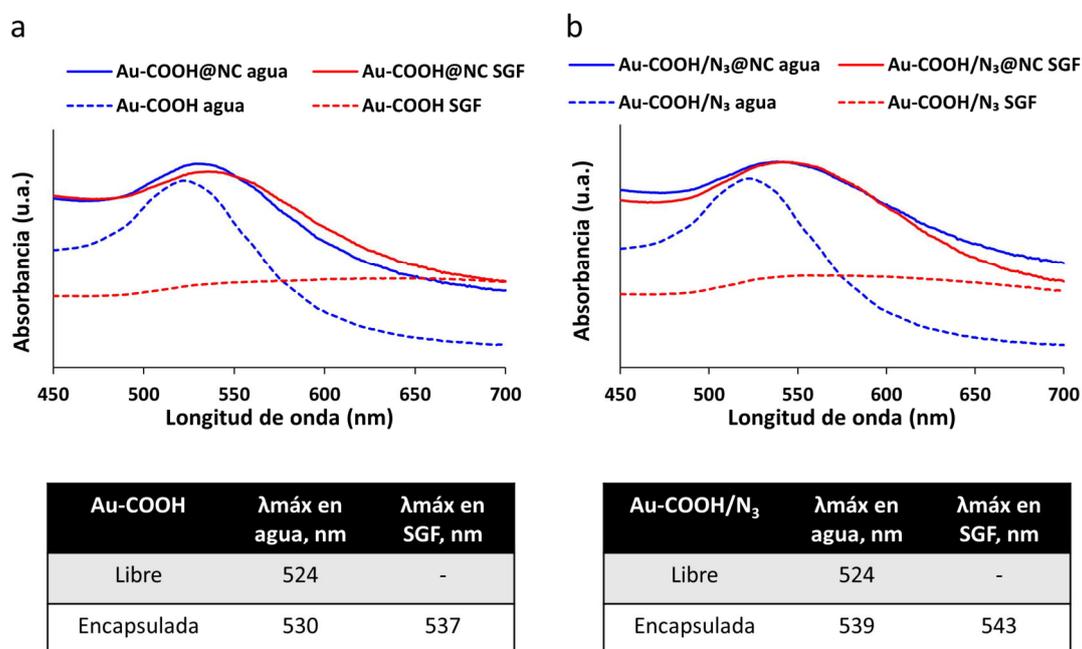


Figura 10. Espectros UV-Vis de AuNPs encapsuladas (líneas continuas) o no encapsuladas (líneas discontinuas) incubadas en agua (azul) y fluido gástrico simulado (SGF, rojo) durante 24 horas a 37 °C. a) AuNPs recubiertas con PEG-COOH (Au-COOH). b) AuNPs recubiertas con PEG-COOH y PEG-N<sub>3</sub> al 50/50 (Au-COOH/N<sub>3</sub>). Las tablas detallan la longitud de onda del máximo de absorción de cada espectro.

Ambas AuNPs no encapsuladas eran perfectamente estables después de la incubación en agua (pico LSPR a 524 nm), mientras que la incubación en SGF les hacía perder casi por completo su banda LSPR, dando lugar a un espectro UV-Vis prácticamente plano, indicativo de una alta agregación e inestabilidad en este medio. Esta inestabilidad fue corroborada mediante DLS, mostrando un pronunciado aumento en el diámetro hidrodinámico de las AuNPs no encapsuladas, que pasó a ser de alrededor de 30 nm en agua a más de 400 nm (Au-COOH/N<sub>3</sub>) y 600 nm (Au-COOH) en SGF.

Por el contrario, las NCs cargadas con ambos tipos de AuNPs no mostraron casi ningún cambio en su banda LSPR después de la incubación en agua y SGF, validando así la mejora en la estabilidad de la partícula de oro gracias a la encapsulación. Au-COOH@NC y Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC presentaron bandas LSPR ligeramente desplazadas en agua (absorbancia máxima a 530 y 539 nm, respectivamente), en comparación con las AuNPs libres, probablemente debido a que las AuNPs están más cerca unas de otras cuando se encuentran dentro de las NCs que cuando se encuentran libres en suspensión. La diferencia de 9 nm entre los picos LSPR de Au-COOH@NC y Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC también se reflejaba en un cambio del tono de color de la suspensión.

La variación de la longitud de onda en el máximo de la banda LSPR puede apreciarse mejor en la Figura 11, donde se representan los desplazamientos del pico LSPR tras 0, 2, 4 y 24 h de incubación en agua, SGF y fluido intestinal simulado (SIF).

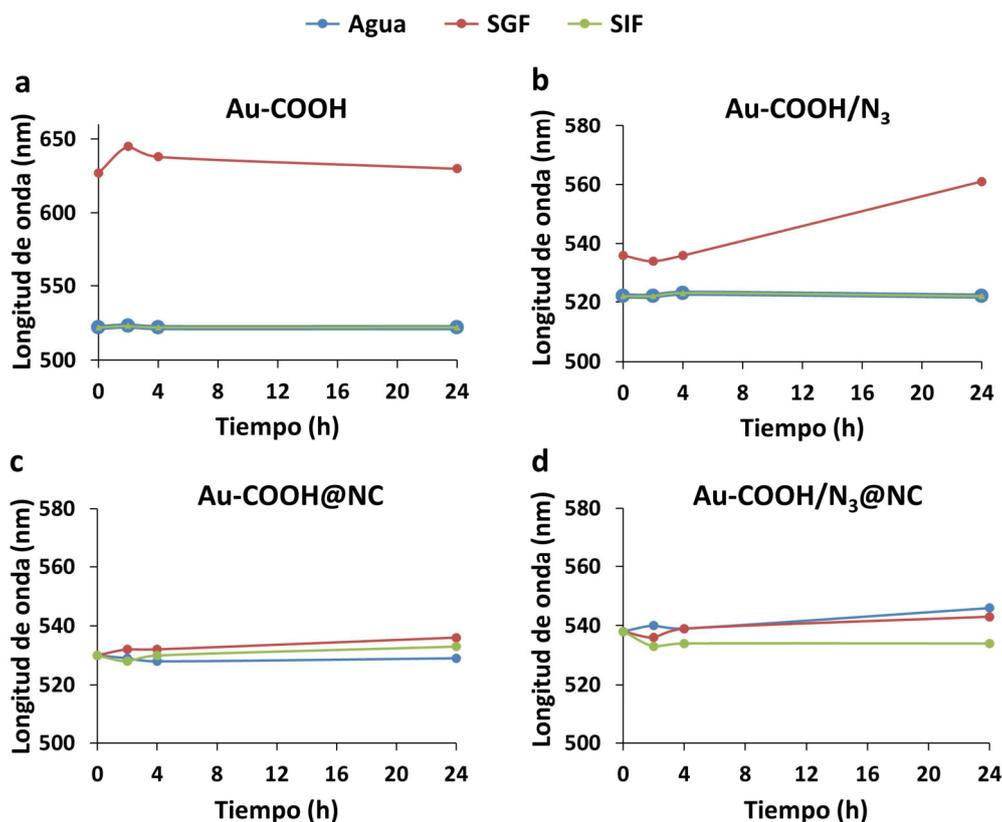


Figura 11. Desplazamiento del pico LSPR en el tiempo durante la incubación en agua, fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF) de (a) AuNPs no encapsuladas funcionalizadas con PEG-COOH, (b) AuNPs no encapsuladas funcionalizadas con PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub>, (c) AuNPs encapsuladas funcionalizadas con PEG-COOH y (d) AuNPs encapsuladas funcionalizadas con PEG-COOH/PEG-N<sub>3</sub>.

Las AuNPs libres (Figura 11a,b) agregan inmediatamente cuando entran en contacto con el SGF y la agregación se mantiene constante durante las siguientes 24 h, o incluso aumenta en el caso de Au-COOH/N<sub>3</sub>. Por otra parte, ambos tipos de AuNPs son estables en el SIF. En el caso de las AuNPs encapsuladas (Figura 11c,d) no se observa ningún desplazamiento relevante del pico LSPR en ninguno de los tiempos o medios probados, lo que confirma que las nanocápsulas son capaces de proteger a las AuNPs durante al menos 24 h.

Aunque la ausencia de desplazamiento de la banda LSPR sugería que las AuNPs encapsuladas no estaban siendo liberadas en agua, SGF o SIF, se utilizó la electroforesis en gel de agarosa como confirmación (Figura 12).

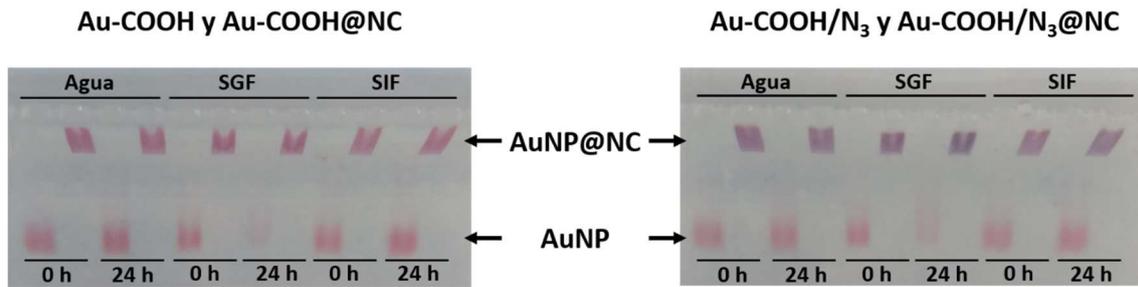


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa para evaluar la liberación de las AuNPs encapsuladas al ser incubadas en agua, SGF y SIF, a las 0 h ó 24 h. AuNPs funcionalizadas con PEG-COOH (izquierda) y AuNPs funcionalizadas con PEG-COOH/N<sub>3</sub> (derecha). Los pocillos consecutivos corresponden a AuNPs libres y encapsuladas para comparar su capacidad de migración.

Las AuNPs libres pudieron migrar a través del gel debido a su pequeño tamaño y carga negativa, pero una vez encapsuladas, permanecieron retenidas en los pocillos debido al mayor tamaño de las NCs. Esto demostró que las fuertes interacciones entre las AuNPs y la nanocápsula, incluso en condiciones gastrointestinales simuladas, evitaban la liberación de las AuNPs durante al menos 24 h.

Cuando un nanotransportador llega al intestino, existen dos opciones: que el fármaco sea liberado del nanotransportador para su absorción intestinal o que el conjunto nanotransportador-fármaco sea internalizado por el epitelio intestinal. De lo contrario, el fármaco será inevitablemente expulsado del cuerpo a través de las heces [44]. En contraste con los numerosos nanotransportadores basados en hidrogeles que liberan su carga en el intestino debido al pH básico de éste [47,48], dejándolos susceptibles a la microflora intestinal y a la degradación enzimática [49], la gran estabilidad de este nanotransportador podría asegurar y potenciar que su carga llegue al interior de las células intestinales.

En conclusión, diferentes técnicas han demostrado que las NCs protegen a las AuNPs de la agregación y evitan su liberación en condiciones gastrointestinales simuladas, lo que demuestra el potencial de este nanotransportador híbrido para la administración oral.

#### 2.4. Biocompatibilidad e internalización en células epiteliales colorrectales

La biocompatibilidad de las AuNPs, libres o encapsuladas, se evaluó *in vitro* con células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (células Caco-2/TC7). Las células Caco-2 se incubaron con concentraciones crecientes de AuNPs o NCs cargadas con AuNPs, de 0.05 a 0.25 mg/mL, durante 24 h y la viabilidad de las células se evaluó mediante citometría de flujo (Figura 13). Se utilizó anexina V-CF Blue y yoduro de propidio para marcar las células muertas y discriminarlas de las células vivas.

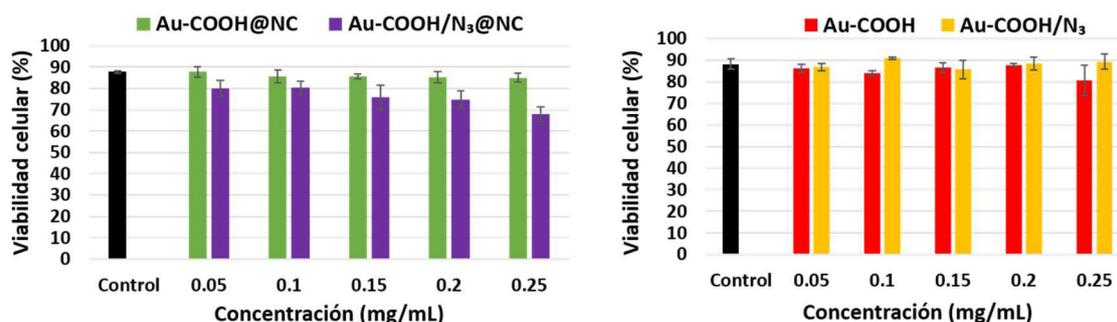


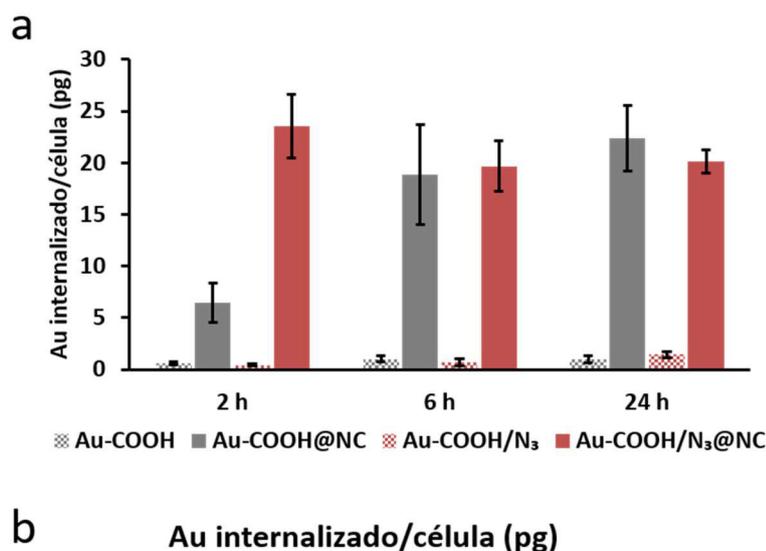
Figura 13. Viabilidad celular de células Caco-2 después de 24 h de incubación con AuNPs encapsuladas (gráfico izquierdo) o no encapsuladas (gráfico derecho) funcionalizadas con PEG-COOH o PEG-COOH/N<sub>3</sub>, determinada mediante citometría de flujo.

Como se puede observar en la Figura 13, las AuNPs no mostraron citotoxicidad a ninguna de las concentraciones probadas, ni Au-COOH ni Au-COOH/N<sub>3</sub>, ya que la viabilidad se mantuvo cerca de la del control (90 %, que es el porcentaje de viabilidad estándar medido con esta técnica en los cultivos celulares no tratados). La incubación con Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC indujo una citotoxicidad muy baja hasta 0.2 mg/mL (75-80 %, en comparación con el 88 % de las células control no tratadas) y sólo a la concentración más alta (0.25 mg/mL) la viabilidad disminuyó al 68 %. Las Au-COOH@NC no provocaron citotoxicidad, ni siquiera a altas concentraciones.

Para utilizar una concentración inocua de Au-NCs, que garantice un comportamiento normal de las células, se eligió una concentración de 0.1 mg/mL para ambos tipos de NCs para los experimentos de internalización en células Caco-2.

Los grupos amino del quitosano expuestos en la superficie de las NCs les proporcionan propiedades mucoadhesivas, que pueden favorecer la fijación de las nanocápsulas a la mucosa que recubre las paredes intestinales durante la administración oral, aumentando el tiempo de retención en el tracto gastrointestinal y facilitando su absorción por las células intestinales.

Las nanopartículas de oro se han asociado a una escasa biodisponibilidad *in vivo* después de la administración oral, resultando absorbida menos del 1% de la dosis administrada [45]. Sorprendentemente, Alalaiwe et al. han demostrado en ratas una mejora de 25 veces en la biodisponibilidad de las AuNPs tras ser recubiertas por quitosano [50]. Por esta razón, decidimos evaluar si la encapsulación de las AuNPs en las NCs basadas en quitosano aumentaba su absorción por parte de las células intestinales, así como estudiar la cinética de internalización. Con este objetivo, las células Caco-2 se incubaron con AuNPs encapsuladas y no encapsuladas a idénticas concentraciones de oro durante 2 h, 6 h y 24 h, y se lavaron, contaron y digirieron para medir su contenido de oro mediante ICP-MS. En la Figura 14 se reporta la cantidad de oro internalizado por célula a lo largo del tiempo.



**Figura 14.** Internalización de oro de AuNPs encapsuladas y no encapsuladas en células Caco-2 a tiempos de incubación crecientes (2, 6 ó 24 horas). Los datos se representan como cantidad de oro internalizado por célula y corresponden a la media y desviación estándar de tres réplicas.

Coincidiendo con la hipótesis planteada, la encapsulación de AuNPs dentro de las NCs mejoró drásticamente su internalización, en comparación con las AuNPs no encapsuladas. Las AuNPs libres presentaron una internalización baja incluso tras 24 h de incubación, con 1.0 pg Au/célula en el caso de Au-COOH y 1.4 pg Au/célula en el caso de Au-COOH/N<sub>3</sub>. Sin embargo, estas leves diferencias en la internalización de las AuNPs dependiendo del recubrimiento de PEG fueron insignificantes comparadas con la mejora en la absorción obtenida después de la encapsulación. A las 24 h, se alcanzaron valores de 22.4 y 20.1 pg de Au/célula en el caso de la encapsulación de Au-COOH y Au-COOH/N<sub>3</sub>, respectivamente. Estos datos corresponden a un aumento de 20 veces en la internalización con respecto a las AuNPs sin encapsular. En cuanto a la cinética de internalización, se observa una marcada diferencia entre Au-COOH@NC y Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC: esta última internalizó sorprendentemente rápido, habiendo alcanzado en tan sólo 2 h el nivel de saturación de oro de las células (alrededor de 20 pg Au/célula), que se mantuvo después de 6 h y 24 h de incubación. Au-COOH@NC internalizó a una velocidad menor, con 6.5 pg Au/célula después de 2 h (casi 4 veces menos que Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC), pero también logró la saturación celular a partir de las 6 h. Estos resultados sugieren que el grupo azida de las Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC podría estar desempeñando un papel importante en la cinética de internalización del nanotransportador.

Para confirmar la internalización y observar la distribución intracelular de las AuNPs encapsuladas y no encapsuladas después de 2 y 24 horas de incubación, se fijaron las células con glutaraldehído, se embebieron en resina y se cortaron en secciones ultrafinas de 0.08  $\mu\text{m}$  para el análisis por TEM (Figura 15 y Figura 16).

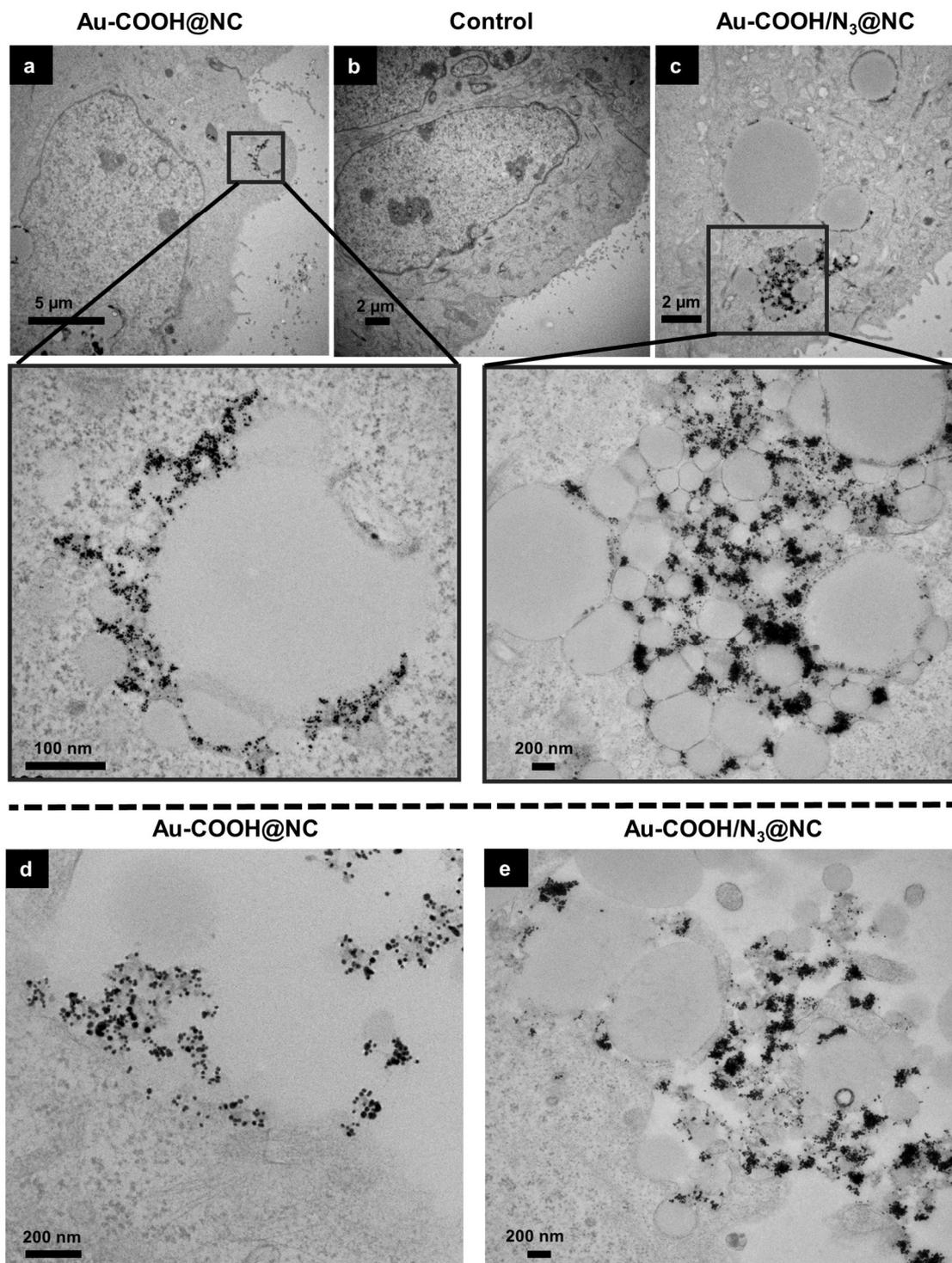
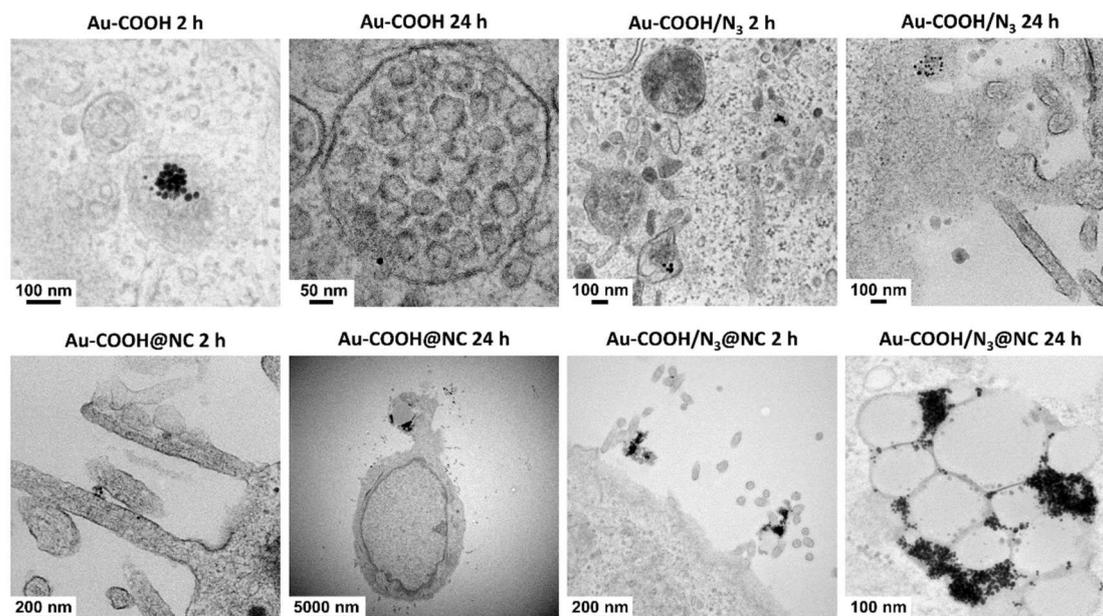


Figura 15. Imágenes TEM de células Caco-2 incubadas durante 24 horas con (a) Au-COOH@NC o (c) Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC y (b) células control sin NCs. d-e) Imágenes TEM que muestran la interacción de Au-COOH@NC y Au-COOH/N<sub>3</sub>@NC con la membrana celular.



**Figura 16.** Imágenes TEM de células Caco-2 incubadas durante 2 ó 24 horas con Au-COOH y Au-COOH/N<sub>3</sub> encapsuladas o no encapsuladas.

Las Au-NCs fueron fácilmente identificadas dentro de las células Caco-2 gracias a la presencia de las AuNPs, debido a su forma pseudo-esférica y a su elevado contraste por la alta densidad electrónica del oro atómico. En la Figura 15 y la Figura 16 se puede apreciar cómo las NCs cargadas de AuNPs interactúan con las microvellosidades de las células Caco-2 y la membrana celular forma invaginaciones y protuberancias alrededor de las nanocápsulas para internalizarlas dentro de vesículas intracelulares, lo que podría asociarse a eventos de endocitosis mediada por receptores y macropinocitosis [51]. Una vez dentro de la célula, algunas NCs aparecen rodeadas por una membrana, lo que podría sugerir su localización dentro de vesículas relacionadas con la vía endo-lisosomal, como los endosomas, cuerpos multivariantes y lisosomas [52]. De hecho, en el capítulo 5 se detectó mediante microscopía confocal una colocalización parcial de las NCs cargadas con siRNA con endosomas tardíos y lisosomas, mientras que otras se encontraban fuera de estas vesículas. En la Figura 15 se observan también algunas NCs sin ninguna membrana que las rodee, por lo que podrían haber escapado de estas vesículas y encontrarse en el citoplasma. Esto no sería sorprendente, ya que existen polímeros catiónicos, como el quitosano, que poseen la habilidad de escapar de los endolisosomas gracias a su capacidad para tamponar el pH ácido, mediante un proceso de ruptura endosómica conocido como efecto "esponja de protones" [53]. Sin embargo, algunas imágenes también muestran vesículas intracelulares de doble membrana que contienen NCs y que podrían corresponder a autofagosomas implicados en el mecanismo celular de la autofagia, que ha sido descrito recientemente como un nuevo mecanismo de protección de las células para reducir la citotoxicidad de las nanopartículas [54]. Con respecto a las AuNPs no encapsuladas, en la Figura 16 se muestra cómo la presencia de AuNPs dentro de las células es muy inferior en

comparación con las AuNPs encapsuladas y eran mucho más difíciles de localizar, lo que es coherente con los datos obtenidos por ICP.

### 3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha desarrollado un nanotransportador híbrido de AuNPs y NCs de quitosano con el objetivo de superar las limitaciones de la administración oral de las AuNPs. Para proteger las AuNPs del entorno gástrico y mejorar su absorción en el intestino, se han encapsulado nanoesferas de oro de 14 nm funcionalizadas con PEG en las NCs de quitosano. El estudio de las interacciones entre las AuNPs y los componentes de las NCs ha permitido optimizar la metodología de encapsulación y seleccionar la fase más apropiada para la adición de las AuNPs. Las cargas de oro más elevadas se consiguieron mediante la adición de 2 mg de AuNPs a la fase acuosa de la nanoemulsión. También se ha evaluado la influencia del recubrimiento de la superficie de las AuNPs en la eficiencia de encapsulación, incluyendo diferentes grados de saturación y grupos funcionales. Los grupos carboxílicos en el recubrimiento de las AuNPs resultaron esenciales para obtener altas cargas de oro, probablemente a través de su interacción con los grupos amino del quitosano, pudiendo ser combinados con grupos azida en un ratio 50/50 sin disminuir la carga de las NCs. Las NCs han conseguido proteger a las AuNPs de la agregación y prevenir su liberación en condiciones gastrointestinales simuladas. Además, han manifestado una biocompatibilidad excelente con células Caco-2 y han aumentado drásticamente la internalización de las AuNPs en estas células colorrectales. Estos prometedores resultados demuestran el gran potencial de este nanotransportador híbrido para la administración oral de fármacos en un estudio futuro.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados en este capítulo para la síntesis de las NCs fueron descritos previamente en el capítulo 2.

El  $\alpha$ -tio- $\omega$ -(ácido propiónico) octa(etilenglicol) (HS-PEG-COOH) (458 g/mol) y el  $\alpha$ -amine- $\omega$ -azido hepta(etilenglicol) (HS-PEG-N<sub>3</sub>) (350 g/mol) fueron adquiridos en Iris Biotech GmbH. El hidrato de tetracloroaurato de hidrógeno (III) (HAuCl<sub>4</sub>) se compró a Strem Chemicals.

El medio de cultivo celular DMEM, el tampón fosfato salino (PBS) sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y el tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS) con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> se compraron en Lonza. La penicilina, la estreptomina y la glutamina se obtuvieron de Invitrogen. El kit de detección de apoptosis Annexin V-FITC con PI fue adquirido de Immunostep.

#### 4.1. Síntesis de nanopartículas de oro

Las nanopartículas esféricas de oro (AuNPs) con un diámetro de 14 nm y un pico máximo de absorbancia LSPR a 523 nm fueron preparadas de acuerdo con la literatura [42], con pequeñas modificaciones. Brevemente, se calentaron 195 mL de ácido

tetracloroáurico acuoso (HAuCl<sub>4</sub>) 1.2 mM hasta que hirviera y se agregaron 5 mL de citrato de sodio (aq) de 162 nM y se mantuvieron en el punto de ebullición, protegidos de la luz, durante 30 minutos. Las AuNPs se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz.

#### 4.2. Funcionalización de nanopartículas de oro con PEG

La síntesis de N-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxoicosano)-4-mercaptobutanamida (HS-PEG-N<sub>3</sub>) se realizó como se describió anteriormente [55]. Brevemente, 0.6 mmol de  $\alpha$ -amino- $\omega$ -azido hepta(etilenglicol) fueron disueltos en 12.5 mL de dimetilsulfóxido bajo atmósfera inerte a 50 °C con agitación continua y 0.63 mmol de  $\gamma$ -tiobutirrolactona y 5.7 mmol de trietilamina fueron añadidos. Después de 5 h, la mezcla se enfría y se liofiliza obteniendo un aceite amarillo. El producto se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo Jasco FT-IR 4100. Para la funcionalización de las AuNPs con SH-PEG-COOH y/o SH-PEG-N<sub>3</sub> se mezclaron las AuNPs a 10 nM con 0.028 % de dodecilsulfato de sodio, NaOH 25 mM y diferentes cantidades de HS-PEG-COOH y/o HS-PEG-N<sub>3</sub> (50  $\mu$ M para la saturación al 100 % de la superficie de la nanopartícula, 20  $\mu$ M para la saturación al 40 % y 12.5  $\mu$ M para la saturación al 25 %)[41] y se incubaron durante 16 h bajo agitación, a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las nanopartículas se lavaron 3 veces con agua ultrapura mediante centrifugación a 16000 rcf durante 30 minutos a 4 °C, se resuspendieron en agua ultrapura y se almacenaron a 4 °C. El peso medio (g/mol) de cada AuNP se calculó a partir del valor de densidad de oro (19,3 g/cm<sup>3</sup>) y del diámetro obtenido a partir de imágenes TEM. Se calculó el coeficiente de extinción (11.3 mL/mg·cm) correlacionando el contenido de oro medido por ICP-AES con su absorbancia UV-vis a 450 nm. La concentración de AuNPs se calculó a partir de la absorbancia UV-Vis a 450 nm utilizando el coeficiente de extinción descrito anteriormente. El número de moléculas de PEG unidas a las nanopartículas se calculó midiendo el PEG no unido en los sobrenadantes mediante el ensayo de Ellman, tal como se describió anteriormente [41].

#### 4.3. Síntesis de nanocápsulas para la encapsulación de nanopartículas de oro

Las nanocápsulas de quitosano basadas en nanoemulsión (NCs) se sintetizaron siguiendo el procedimiento descrito previamente en el capítulo 2 de esta tesis, el cual se basa en la formación de un núcleo de nanoemulsión recubierto por una capa de quitosano. Brevemente, para la generación de la nanoemulsión, se añadió gota a gota una fase orgánica compuesta de 8.6 mg de Span<sup>®</sup> 85 y 40 mg de ácido oleico disueltos en 4 mL de etanol absoluto sobre una fase acuosa que contenía 13.6 mg de Tween<sup>®</sup> 20 disuelto en 8 mL de agua. La nanoemulsión se dejó bajo agitación magnética durante 15 minutos. Posteriormente, la nanoemulsión se recubrió con una cubierta de quitosano mediante la adición de 0.5 mL de una solución de quitosano a 5 mg/mL en ácido acético al 1 % (v/v). La solución se agitó durante 15 minutos y luego se añadió sobre 15 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM bajo agitación suave para que tuviera lugar la gelificación ionotrópica de

las cadenas de quitosano. Las nanocápsulas obtenidas se ultracentrifugaron a 69673 G durante 30 minutos a 10 °C, se lavaron con 10 mL de agua, se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendieron en agua. Se liofilizó una alícuota de la suspensión final de nanocápsulas para medir el peso seco y calcular la concentración. Para encapsular las AuNPs, éstas se mezclaron durante 1 minuto con la fase acuosa, orgánica o de quitosano y se continuó con el procedimiento general de síntesis de nanocápsulas. Se optimizó la cantidad de AuNPs añadidas (0.25, 1 ó 2 mg en suspensión acuosa).

Las nanocápsulas utilizadas para los ensayos *in vitro* se sintetizaron utilizando el mismo protocolo, pero en condiciones estériles en una campana de flujo laminar (Telstar PV-30/70). Todas las soluciones, así como las AuNPs, se esterilizaron mediante filtración con filtros de acetato de celulosa de 0.2 µm (CHMLAB®) o de PVDF con poros de 0.22 µm (Millex®, Merck Millipore®). Antes de su uso, todo el material de vidrio fue esterilizado en el horno a 180 °C durante 2 h. Los tubos de ultracentrífuga se esterilizaron con etanol al 96 % (ac.).

#### 4.4. Determinación de la carga de oro y la eficiencia de encapsulación

Se usó espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) para cuantificar la carga de oro y la eficiencia de encapsulación tras la síntesis de las NCs. Para la digestión tanto del material orgánico como del inorgánico, se mezclaron 100-350 µL de las muestras con 100 µL de una solución 3:1 de ácido sulfúrico (96 %)/peróxido de hidrógeno (33 %) y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadieron 300 µL de una solución 1:3 de ácido nítrico (65 %)/ácido clorhídrico (37 %) y las muestras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y durante 15 minutos a 60 °C. Finalmente, se añadió agua Milli-Q para alcanzar un volumen final exacto de 20 mL. Las muestras fueron analizadas mediante ICP-AES utilizando un equipo Optima 8300 (Perkin Elmer®) por el Servicio Central de Análisis de Bizkaia de SGIker de la Universidad del País Vasco (EHU). La carga de oro se refiere al porcentaje de AuNPs encapsuladas respecto al peso del material final obtenido después de la encapsulación. La eficiencia de encapsulación se refiere al porcentaje de AuNP encapsulados respecto a la cantidad añadida inicialmente para la preparación de las NCs.

#### 4.5. Interacción de las AuNPs con los componentes de las NCs

Las AuNPs funcionalizadas con PEG-COOH/N<sub>3</sub> al 25 % de saturación de la superficie se añadieron a la fase acuosa, fase orgánica o fase de quitosano y se registraron sus espectros de absorbancia UV-vis empleando un espectrofotómetro Cary 50 Probe® (Varian) cada minuto durante 15 min para monitorear su agregación durante el proceso de encapsulación. Las AuNPs se añadieron a la concentración exacta para reproducir la encapsulación de 2 mg de AuNPs, excepto en el caso de la fase de quitosano, donde se

las AuNPs se añadieron a 0.15 mg/mL porque no se podían medir concentraciones más altas en el espectrofotómetro UV-Vis. La estabilidad coloidal de las AuNPs funcionalizadas con diferentes moléculas de PEG (PEG-COOH, PEG-COOH/N<sub>3</sub> o PEG-N<sub>3</sub>) después de la adición a la fase acuosa se analizó midiendo sus espectros de absorbancia UV-Vis cada minuto durante 15 minutos.

#### 4.6. Determinación del tamaño y potencial zeta de las AuNPs y las NCs cargadas de AuNPs

El diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) de las AuNPs y las NCs cargadas de AuNPs se determinaron mediante análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un instrumento DLS Brookhaven 90Plus. Todas las muestras fueron medidas en agua Milli-Q a 25 °C. Las AuNPs se midieron a una concentración de 0.1 mg/mL y los datos se representaron en intensidad. Las NCs cargadas de AuNPs se midieron a 0.15 mg/mL durante 8-10 medidas y los datos se representaron en número. El análisis de potencial zeta se realizó utilizando un equipo Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation). Las AuNPs se midieron a 5 µg/mL y las NCs se midieron a 10 µg/mL en KCl 1 mM.

#### 4.7. Caracterización por microscopía electrónica de AuNPs y NCs cargadas de AuNPs

Para la caracterización de AuNPs, el análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en un microscopio FEI Tecnai T20 a 200 kV. Las NCs cargadas con AuNPs se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) en modo de microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) y microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM). Las imágenes de SEM se adquirieron utilizando un SEM Inspect F50 de emisión de campo con un sistema EDX INCAPentaFETx3 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) en un rango de energía de entre 5 y 15 kV. Las imágenes de ESEM se obtuvieron usando un microscopio QUANTA-FEG 250 en modo STEM. Para las imágenes de cryo-TEM, las muestras se vitrificaron y se observaron en el servicio del Laboratorio de Microscopía Avanzada (LMA) del Instituto de Nanociencia de Aragón. El proceso de vitrificación se realizó en un Vitrobot FEI: se colocó una gota de 4 µL de una suspensión acuosa del material en una rejilla de carbono TEM Quantifoil, el exceso de agua se secó en el Vitrobot con papel de filtro y la rejilla se sumergió por congelación en etano líquido. Después, las muestras se transfirieron en atmósfera de nitrógeno líquido a un crioportador Gatan TEM equipado con un depósito de nitrógeno líquido. De esa forma, las muestras se manipularon y se observaron a -173 °C. Las imágenes Cryo-TEM se obtuvieron en un Tecnai T20 (Thermofisher Scientific, anteriormente FEI) a un voltaje de trabajo de 200 KV, y se acoplaron con una cámara Veleta CCD.

#### 4.8. Análisis del desplazamiento del pico SPR durante la incubación en agua o fluidos gastrointestinales simulados

Las AuNPs encapsuladas y no encapsuladas se incubaron en agua, fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF) bajo agitación orbital (250 rpm) y sus espectros de absorbancia UV-vis se registraron de 450 nm a 700 nm (rango donde aparece el pico SPR de las AuNPs) a las 0, 2, 4 y 24 h utilizando un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO UV/Vis. Los fluidos gástricos e intestinales simulados de humano se prepararon siguiendo el protocolo de Marques y colaboradores [56] sin enzimas ni proteínas. Brevemente, el fluido gástrico simulado (SGF) contenía 2 mg/mL de NaCl disuelto en agua y el pH se ajustó con HCl a 1.6. El fluido intestinal simulado (SIF) fue una solución acuosa que contenía KCl (0.20 mg/mL), NaCl (8 mg/mL) y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24 mg/mL) con un pH ajustado de 7.

#### 4.9. Estudios de liberación en fluidos gastrointestinales simulados

Para analizar si las AuNPs se liberaban de las NCs bajo condiciones gastrointestinales, se incubaron las AuNPs y las NCs cargadas con AuNPs en agua, SGF o SIF y se cargaron en un gel de agarosa al 1 % justo después de la adición a los medios o después de 24 h de incubación para comparar su capacidad de migrar a través del gel. Las AuNPs se incubaron a 0.09 mg/mL y las NCs cargadas con AuNPs a 2 mg/mL (equivalente a 0.09 mg/mL de oro) a 37 °C, luego se mezclaron en una proporción de 4: 1 con el tampón de carga TBE/glicerol 25 % y se cargaron 20 µL en cada pocillo. La electroforesis se realizó a 90 V durante 15 minutos en tampón 0.5X pH 8.5 TBE usando una fuente de alimentación Bio-Rad PowerPac HC. Las bandas de AuNPs se detectan fácilmente a simple vista gracias a su color visible.

#### 4.10. Cultivo de células Caco-2/TC7

Se cultivaron células Caco-2/TC7 (células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano) en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamax 2 mM y penicilina y estreptomina 100 U/mL (cDMEM). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 4.11. Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron las células Caco-2 a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 h, se añadieron AuNPs o NCs cargadas con AuNPs a los pocillos a concentraciones finales comprendidas entre 0.05 y 0.25 mg/mL. Las diluciones de nanopartículas se prepararon a 10X en agua para añadir el mismo volumen de agua en cada pocillo. Después de 24 h de incubación con las nanopartículas, las células se lavaron dos veces con DPBS para eliminar el exceso de nanopartículas y se levantaron con 100 µL de tripsina por pocillo. Después de neutralizar la tripsina con 500 µL de cDMEM, las células se centrifugaron a 3500 G durante 2 minutos, se lavaron con PBS y se

centrifugaron nuevamente. Las muestras se resuspendieron en 50  $\mu$ L de tampón de unión de anexina 1X que contenía 2.5  $\mu$ L de anexina V-FITC y 2.5  $\mu$ L de yoduro de propidio (el tampón se mezcló previamente con los reactivos para asegurar una tinción homogénea entre las muestras). Después de 20 minutos a temperatura ambiente (protegidas de la luz), las muestras se diluyeron añadiendo 350  $\mu$ L de tampón de unión anexina 1X por tubo y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter). Se registraron 10000 eventos por muestra y los datos se interpretaron utilizando el software Kaluza 1.5a (Beckman Coulter). Todas las muestras fueron preparadas y analizadas por triplicado.

#### 4.12. Cuantificación de las AuNPs internalizadas en células Caco-2/TC7

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 24 pocillos a 30000 células/pocillo 24 h antes de la adición de las nanopartículas. Después, se añadieron las NCs cargadas de AuNPs a 0.1 mg/mL y las AuNPs a la misma concentración que en sus respectivas muestras encapsuladas (4.3  $\mu$ g/mL en el caso de Au-COOH y 4.9  $\mu$ g/mL en el caso de Au-COOH/N<sub>3</sub>, de acuerdo con la carga de oro de estos lotes medidos por ICP). Las células se incubaron con las nanopartículas durante 2, 6 y 24 h, se lavaron dos veces con DPBS y se levantaron con tripsina. Después de la neutralización de la tripsina con cDMEM, las células se contaron en una cámara de Neubauer. Las células se digirieron con soluciones ácidas siguiendo el mismo método que para la determinación de la carga de oro y la eficiencia de encapsulación. La cantidad de oro internalizada por las células fue analizada por ICP-MS. Todas las muestras fueron preparadas y analizadas por triplicado.

#### 4.13. Estudio de la internalización celular mediante TEM

Las células se sembraron a 12600 células/pocillo en portaobjetos con pocillos Permanox® Nunc® Lab-Tek® (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron durante 24 h en la incubadora. Después, se añadieron las NCs cargadas de AuNPs a 0.1 mg/mL y las AuNPs a la misma concentración de oro que en sus respectivas muestras encapsuladas. Las células se incubaron con las nanopartículas durante 2 h y 24 h, se lavaron dos veces con DPBS y se fijaron de la siguiente manera: se eliminó el DPBS y se añadió glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato (PB) 0.1 M a temperatura ambiente (RT). Después de 10 minutos de incubación a 37 °C, se eliminó el glutaraldehído y se añadió nuevo glutaraldehído al 3 %. Después de 2 h a temperatura ambiente, se retiró el glutaraldehído nuevamente y las muestras se lavaron con PB 0.1 M, 5 veces durante 5 minutos cada vez. Finalmente, los pocillos se llenaron con PB 0.1 M y se mantuvieron a 4 °C. El resto de la preparación fue realizada por el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). Las muestras fueron fijadas en OsO<sub>4</sub> al 2 % durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % en oscuridad durante 2 horas a 4 °C. Después, se enjuagaron con agua destilada, se deshidrataron con etanol y se infiltraron durante la noche en resina Durcupan (Sigma-Aldrich). Después de la polimerización, los cultivos embebidos se separaron de los

pocillos y se pegaron a los bloques Durcupan. Finalmente, se cortaron secciones ultrafinas (0.08  $\mu\text{m}$ ) con un Ultracut UC-6 (Leica microsystems) y se tiñeron con citrato de plomo (solución de Reynolds). Las muestras se examinaron bajo un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai T20 usando una cámara Veleta CCD.

## 5. AGRADECIMIENTOS

La Figura 2 se diseñó utilizando elementos del banco de imágenes de PowerPoint Servier Medical Art.

Me gustaría agradecer al Dr. R. Fernández Pacheco, del Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza y al Dr. M. Soriano, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia), por el soporte técnico con la microscopía electrónica y la preparación de muestras, así como a J. C. Raposo, del Servicio Central de Análisis de Bizkaia de SGIker de la Universidad del País Vasco (EHU), por el soporte técnico de ICP-AES. Agradecer también a Javier Godino Gómez, del Servicio de Separación Celular y Citometría del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, por permitirme el acceso al citómetro y sus consejos para manejarlo.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio Álvaro Artiga Folch por realizar la síntesis y pegilación de las nanopartículas de oro que se han usado en este capítulo, así como su ayuda en los experimentos *in vitro*, y al Dr. Scott G. Mitchell por la adquisición de imágenes de SEM y de TEM y el constante apoyo de ambos para sacar adelante este trabajo.

## 6. REFERENCIAS

1. Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S.G.; de la Fuente, J.M. Gold nanoprism – nanorod face off : comparing the heating efficiency , cellular internalization and thermoablation capacity. *Nanomedicine (Lond.)* **2016**, *11*, 2903–2916.
2. Bao, C.; Beziere, N.; Del Pino, P.; Pelaz, B.; Estrada, G.; Tian, F.; Ntziachristos, V.; De La Fuente, J.M.; Cui, D. Gold nanoprisms as optoacoustic signal nanoamplifiers for in vivo bioimaging of gastrointestinal cancers. *Small* **2013**, *9*, 68–74.
3. Campbell, J.L.; SoRelle, E.D.; Ilovich, O.; Liba, O.; James, M.L.; Qiu, Z.; Perez, V.; Chan, C.T.; de la Zerda, A.; Zavaleta, C. Multimodal assessment of SERS nanoparticle biodistribution post ingestion reveals new potential for clinical translation of Raman imaging. *Biomaterials* **2017**, *135*, 42–52.
4. Artiga, Á.; Serrano-Sevilla, I.; De Matteis, L.; Mitchell, S.G.; de la Fuente, J.M. Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 876–896.
5. Moros, M.; Mitchell, S.G.; Grazu, V.; de la Fuente, J.M. The Fate of Nanocarriers As Nanomedicines In Vivo: Important Considerations and Biological Barriers to Overcome. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2759–2778.

6. Mitragotri, S.; Burke, P.A.; Langer, R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 655–672.
7. Kang, S.H.; Revuri, V.; Lee, S.-J.; Cho, S.; Park, I.-K.; Cho, K.J.; Bae, W.K.; Lee, Y. Oral siRNA Delivery to Treat Colorectal Liver Metastases. *ACS Nano* **2017**, *11*, 10417–10429.
8. Fallingborg, J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan. Med. Bull.* **1999**, *46*, 183–196.
9. Mohammed, M.; Syeda, J.; Wasan, K.; Wasan, E. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2017**, *9*, 53.
10. Zhu, S.; Jiang, X.; Boudreau, M.D.; Feng, G.; Miao, Y.; Dong, S.; Wu, H.; Zeng, M.; Yin, J.J. Orally administered gold nanoparticles protect against colitis by attenuating Toll-like receptor 4- and reactive oxygen/nitrogen species-mediated inflammatory responses but could induce gut dysbiosis in mice. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 86.
11. Li, J.; Cha, R.; Zhao, X.; Guo, H.; Luo, H.; Wang, M.; Zhou, F.; Jiang, X. Gold Nanoparticles Cure Bacterial Infection with Benefit to Intestinal Microflora. *ACS Nano* **2019**, *13*, 5002–5014.
12. Barhate, G.; Gautam, M.; Gairola, S.; Jadhav, S.; Pokharkar, V. Quillaja saponaria extract as mucosal adjuvant with chitosan functionalized gold nanoparticles for mucosal vaccine delivery: Stability and immunoefficiency studies. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 636–642.
13. Hillyer, J.F.; Albrecht, R.M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1927–1936.
14. Cancino-Bernardi, J.; Marangoni, V.S.; Besson, J.C.F.; Cancino, M.E.C.; Natali, M.R.M.; Zucolotto, V. Gold-based nanospheres and nanorods particles used as theranostic agents: An in vitro and in vivo toxicology studies. *Chemosphere* **2018**, *213*, 41–52.
15. Patlolla, A.K.; Kumari, S.A.; Tchounwou, P.B. A comparison of poly-ethylene-glycol-coated and uncoated gold nanoparticle-mediated hepatotoxicity and oxidative stress in sprague dawley rats. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 639–647.
16. Zlobina, O. V.; Pakhomy, S.S.; Bucharskaya, A.B.; Bugaeva, I.O.; Maslyakova, G.N.; Khlebtsov, N.G.; Khlebtsov, B.N.; Bogatyrev, V.A. The reversibility of morphological changes in the mesenteric lymph nodes after peroral administration of gold nanoparticles. In Proceedings of the Saratov Fall Meeting 2013: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XV; and Laser Physics and Photonics XV; Genina, E.A., Derbov, V.L., Meglinski, I., Tuchin, V. V., Eds.; 2014; Vol. 9031, p. 90310P.
17. Bucharskaya, A.B.; Maslyakova, G.N.; Pakhomy, S.S.; Zlobina, O. V.; Bugaeva, I.O.; Navolokin, N.A.; Khlebtsov, B.N.; Bogatyrev, V.A.; Khlebtsov, N.G.; Tuchin, V. V. The morphological changes in the internal organs of laboratory animals after prolonged oral administration of gold nanoparticles. *J. Innov. Opt. Health Sci.*

**2016**, 09, 1642004.

18. Smith, C.A.; Simpson, C.A.; Kim, G.; Carter, C.J.; Feldheim, D.L. Gastrointestinal bioavailability of 2.0 nm diameter gold nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3991–3996.
19. Ivanova, E.P.; Bazaka, K.; Crawford, R.J. Natural polymer biomaterials: advanced applications. In *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*; Elsevier, 2014; pp. 32–70 ISBN 9781782422662.
20. Serrano-Sevilla, I.; Artiga, Á.; Mitchell, S.G.; De Matteis, L.; de la Fuente, J.M. Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives. *Molecules* **2019**, *24*, 2570.
21. Rodrigues, S.; Dionísio, M.; López, C.R.; Grenha, A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3*, 615–641.
22. He, C.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Multifunctional polymeric nanoparticles for oral delivery of TNF- $\alpha$  siRNA to macrophages. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2843–2854.
23. Peniche, H.; Peniche, C. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polym. Int.* **2011**, *60*, 883–889.
24. Coya, J.M.; De Matteis, L.; Giraud-Gatineau, A.; Biton, A.; Serrano-Sevilla, I.; Danckaert, A.; Dillies, M.-A.; Gicquel, B.; De la Fuente, J.M.; Tailleur, L. Tri-mannose grafting of chitosan nanocarriers remodels the macrophage response to bacterial infection. *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 15.
25. Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M.J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *J. Control. Release* **2012**, *161*, 496–504.
26. Pauluk, D.; Padilha, A.K.; Khalil, N.M.; Mainardes, R.M. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. *Food Hydrocoll.* **2019**, *94*, 411–417.
27. García-Embid, S.; Di Renzo, F.; De Matteis, L.; Spreti, N.; M. de la Fuente, J. Magnetic separation and high reusability of chloroperoxidase entrapped in multi polysaccharide micro-supports. *Appl. Catal. A Gen.* **2018**, *560*, 94–102.
28. Liechty, W. B., Kryscio, D.R., Slaughter, B. V. and Peppas, N.A. Polymers for drug delivery systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2010**, *1*, 149–173.
29. Regiel-Futyra, A.; Kus-Liškiewicz, M.; Sebastian, V.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Stochel, G.; Kyzioł, A. Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 1087–1099.
30. Nemati, H.; Ghahramani, M.H.; Faridi-Majidi, R.; Izadi, B.; Bahrami, G.; Madani, S.H.; Tavoosidana, G. Using siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation in psoriasis. *J. Control. Release* **2017**, *268*, 259–268.
31. Mendoza, G.; Regiel-Futyra, A.; Andreu, V.; Sebastián, V.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Arruebo, M. Bactericidal Effect of Gold–Chitosan Nanocomposites in Coculture Models of Pathogenic Bacteria and Human Macrophages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 17693–17701.

32. Artiga, Á.; García-Embid, S.; De Matteis, L.; Mitchell, S.G.; de la Fuente, J.M. Effective in Vitro Photokilling by Cell-Adhesive Gold Nanorods. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 234.
33. Nivethaa, E.A.K.; Dhanavel, S.; Narayanan, V.; Vasu, C.A.; Stephen, A. An in vitro cytotoxicity study of 5-fluorouracil encapsulated chitosan/gold nanocomposites towards MCF-7 cells. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 1024–1032.
34. De Matteis, L.; Alleva, M.; Serrano-Sevilla, I.; García-Embid, S.; Stepien, G.; Moros, M.; de la Fuente, J. Controlling Properties and Cytotoxicity of Chitosan Nanocapsules by Chemical Grafting. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 175.
35. De Matteis, L.; Jary, D.; Lucía, A.; García-Embid, S.; Serrano-Sevilla, I.; Pérez, D.; Ainsa, J.A.; Navarro, F.P.; M. de la Fuente, J. New active formulations against M. tuberculosis: Bedaquiline encapsulation in lipid nanoparticles and chitosan nanocapsules. *Chem. Eng. J.* **2018**, *340*, 181–191.
36. Artiga, Á.; García-Embid, S.; De Matteis, L.; Mitchell, S.G.; de la Fuente, J.M. Effective in Vitro Photokilling by Cell-Adhesive Gold Nanorods. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 1–10.
37. Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems-A Review (Part 2). *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 265–273.
38. Luque-Michel, E.; Larrea, A.; Lahuerta, C.; Sebastian, V.; Imbuluzqueta, E.; Arruebo, M.; Blanco-Prieto, M.J.; Santamaría, J. A simple approach to obtain hybrid Au-loaded polymeric nanoparticles with a tunable metal load. *Nanoscale* **2016**, *8*, 6495–6506.
39. Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C.C.; Ibarra, M.R.; Baptista, P. V; et al. Design of Multifunctional Gold Nanoparticles for In Vitro and In Vivo Gene Silencing. *ACS Nano* **2012**, *6*, 8316–8324.
40. Zhang, W.; Xu, C.; Yin, G.Q.; Zhang, X.E.; Wang, Q.; Li, F. Encapsulation of inorganic nanomaterials inside virus-based nanoparticles for bioimaging. *Nanotheranostics* **2017**, *1*, 358–368.
41. Sanz, V.; Conde, J.; Hernández, Y.; Baptista, P. V.; Ibarra, M.R.; de la Fuente, J.M. Effect of PEG biofunctional spacers and TAT peptide on dsRNA loading on gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 917.
42. Sguassero, A.; Artiga, Á.; Morasso, C.; Jimenez, R.R.; Rapún, R.M.; Mancuso, R.; Agostini, S.; Hernis, A.; Abols, A.; Linē, A.; et al. A simple and universal enzyme-free approach for the detection of multiple microRNAs using a single nanostructured enhancer of surface plasmon resonance imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 1873–1885.
43. Fratila, R.M.; Navascuez, M.; Idiago-López, J.; Eceiza, M.; Miranda, J.I.; Aizpurua, J.M.; De La Fuente, J.M. Covalent immobilisation of magnetic nanoparticles on surfaces: Via strain-promoted azide-alkyne click chemistry. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 10835–10840.
44. Reinholz, J.; Landfester, K.; Mailänder, V. The challenges of oral drug delivery via

- nanocarriers. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1694–1705.
45. Hinkley, G.K.; Carpinone, P.; Munson, J.W.; Powers, K.W.; Roberts, S.M. Oral absorption of PEG-coated versus uncoated gold nanospheres: does agglomeration matter? *Part. Fibre Toxicol.* **2015**, *12*, 9.
  46. Barhate, G.; Gautam, M.; Gairola, S.; Jadhav, S.; Pokharkar, V. Quillaja saponaria extract as mucosal adjuvant with chitosan functionalized gold nanoparticles for mucosal vaccine delivery: Stability and immunoefficiency studies. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 636–642.
  47. Liu, L.; Zhang, Y.; Yu, S.; Yang, Z.; He, C.; Chen, X. Dual Stimuli-Responsive Nanoparticle-Incorporated Hydrogels as an Oral Insulin Carrier for Intestine-Targeted Delivery and Enhanced Paracellular Permeation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 2889–2902.
  48. Chaturvedi, K.; Ganguly, K.; Nadagouda, M.N.; Aminabhavi, T.M. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery. *J. Control. Release* **2013**, *165*, 129–138.
  49. Jain, A.; Gupta, Y.; Jain, S.K. Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2007**, *10*, 86–128.
  50. Alalaiwe, A.; Carpinone, P.; Alshahrani, S.; Alsulays, B.; Ansari, M.; Anwer, M.; Alshehri, S.; Alshetaili, A. Influence of chitosan coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats. *Saudi Pharm. J.* **2019**, *27*, 171–175.
  51. Canton, I.; Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718.
  52. Ye, D.; Dawson, K.A.; Lynch, I. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. *Analyst* **2015**, *140*, 83–97.
  53. Patil, S.; Bhatt, P.; Lalani, R.; Amrutiya, J.; Vhora, I.; Kolte, A.; Misra, A. Low molecular weight chitosan–protamine conjugate for siRNA delivery with enhanced stability and transfection efficiency. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 110951–110963.
  54. Nakashima, A.; Higashisaka, K.; Kusabiraki, T.; Aoki, A.; Ushijima, A.; Ono, Y.; Tsuda, S.; Shima, T.; Yoshino, O.; Nagano, K.; et al. Autophagy is a new protective mechanism against the cytotoxicity of platinum nanoparticles in human trophoblasts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13.
  55. Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C.C.; Ibarra, M.R.; Baptista, P. V; et al. Design of Multifunctional Gold Nanoparticles for In Vitro and In Vivo Gene Silencing. *ACS Nano* **2012**, *6*, 8316–8324.
  56. Marques, M.R.C.; Loebenberg, R.; Almukainzi, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* **2011**, *18*, 15–28.

## General conclusions

Nanoparticles have a size range similar to that of some biological entities such as proteins, DNA or viruses. This facilitates the interaction of nanoparticles with the biomolecules and cells in the human body and has opened new possibilities for the use of nanotechnology in the field of Medicine. In the area of Nanomedicine applied to the treatment of diseases, this thesis has focused on the development of polysaccharide-based nanocapsules (NCs) that serve as a vehicle for the delivery of drugs in the human body.

The selected method for the synthesis of NCs consists of a nanoemulsion process followed by a chitosan coating that allowed to obtain NCs with a spherical morphology and a main population of 100 nm in diameter. The ionic gelation process proved to be essential for the correct formation of the chitosan coating, while the sonication process did not, and was therefore eliminated to favour the scalability of the synthesis in view of possible industrial production in the future. Through this optimisation of the synthesis, it was achieved a simple, easily scalable, inexpensive and completely soft method that allows the encapsulation of molecules or small nanoparticles during the formation of NCs without being damaged. The nanocarrier obtained has shown great versatility and loading capacity as it is able of carrying molecules of interest with very different physical-chemical properties and even simultaneously incorporating active molecules and fluorescent markers, thus obtaining a multifunctional platform with great potential for biomedical applications.

The functionalisation of the nanocapsules surface by binding the molecule of interest to the chitosan amino groups was an effective strategy to precisely control the surface properties of the NC. In accordance with the literature, the binding of biomolecules to the surface of NCs allowed to demonstrate that the surface properties of the nanocapsule strongly influence its interactions with biological systems. The binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of NCs provided them greater stability in biological media and lower cytotoxicity. The functionalization of NCs with trimannoside produced an unexpected remodelling of the metabolic response of macrophages to *M. tuberculosis* infection. These promising results pave the way for the use of these NCs as cell metabolism modulators in the future, although further studies are needed to obtain information on the mechanisms and consequences of the modulation of cell metabolism.

In this thesis, it has been demonstrated that these nanocapsules can be efficiently and stably loaded with a wide range of molecules or nanoparticles: oligonucleotides as transcription factor decoy (TFD) or small interfering RNA (siRNA), fluorophores with different properties and gold nanoparticles (AuNPs). In addition, to quantify the loading it has been necessary to develop specific methods for each type of molecule or nanoparticle incorporated into the nanocarrier. For example, interferences of the nanocarrier during the quantification of loaded oligonucleotides were solved by finding a method that guaranteed a correct separation between the nanocarrier and the loaded molecule. Loading quantification has shown that certain parameters, such as the amount of molecule added for encapsulation, the addition phase or the surface coating in the case of gold nanoparticles, play a key role in increasing the loading of the nanocapsule. The loading has been maximized in order to reach effective concentrations of the carried molecule using a lower amount of nanocarrier, which allows to decrease the possible toxicity derived from it.

Regarding the toxicity of nanocapsules, the determination of the range of non-cytotoxic concentrations in different cell lines has allowed their *in vitro* application under biocompatible conditions. In the future it would be interesting to carry out an optimisation of the nanocapsules in order to extend their range of non-cytotoxic concentrations and to be able to use higher doses, thus increasing the maximum achievable concentration of the cargo at the target site. This approach could favour the delivery of molecules that require high concentrations due to their low efficacy, such as the TFD used in this thesis, which did not show *in vitro* antibacterial activity, neither in its free form nor incorporated into the nanocarrier. To determine whether the low efficacy could be due to the failure of TFD to reach the inside of the bacteria or to other factors, it would be necessary to perform a bacterial internalisation study.

However, the great capacity of the NCs to deliver their cargo inside eukaryotic cells quickly and efficiently was corroborated with other types of cargo (siRNA, fluorophores or gold nanoparticles) in different cell lines and *Hydra vulgaris*. For example, the nanocapsules delivered Nile Red fluorophore into the cells extremely quickly compared to many other nanomaterials investigated so far. The speed and efficiency of delivery are key advantages in a nanocarrier to reduce treatment times and thus reduce the associated toxicity.

In the case of the AuNPs nanocarrier developed, besides dramatically increasing the internalization of AuNPs in colorectal cells while exhibiting an excellent biocompatibility, the NCs were able to protect AuNPs from aggregation and prevent their release in simulated gastrointestinal conditions. These promising results demonstrate the great potential of this hybrid nanocarrier to overcome the limitations of AuNPs in oral drug delivery in a future study.

In the case of siRNA, the excellent cellular internalization of siRNA when carried by chitosan- or xanthan-coated NCs demonstrated the ability of both systems to facilitate the entry of this oligonucleotide into cells. However, the level of gene silencing produced by siRNA-loaded NCs was low or nil, depending on the quantification technique used and the type of NC. The intracellular distribution of chitosan and xanthan NCs and the siRNA carried by them was very similar, so it was concluded that the presence of one or another polymer in the NC shell does not influence the intracellular fate of the nanocarrier or the transported molecule. The observation of siRNA trapped in endolysosomes and mitochondria led us to postulate that the low silencing efficiency obtained could be due to the absence of siRNA in its site of action, the cytosol. In order to release the siRNA from endolysosomes and mitochondria, we investigated the use of photochemical internalization (PCI) technology. In the case of mitochondria-targeting treatment, no clear release of siRNA from these organelles was observed after PCI. On the contrary, in the case of endolysosomes-targeting treatment, a remarkable release of siRNA from lysosomes was detected although it was not translated into a higher silencing efficiency. This could be due to the photooxidation of siRNA during the photochemical reaction, which could lead to the loss of its functionality, as has been described with other biomolecules and drugs in the literature. However, it is also possible that the siRNA released to the cytosol is still associated with the nanocapsule and this prevents it from exerting its biological activity, which could be the subject of an interesting future study.



## Conclusiones generales

Las nanopartículas poseen un rango de tamaño similar al de algunas entidades biológicas como las proteínas, el DNA o los virus. Esto facilita la interacción de las nanopartículas con las biomoléculas y células del cuerpo humano y ha abierto nuevas posibilidades para el uso de la nanotecnología en el campo de la medicina. En el ámbito de la nanomedicina aplicada al tratamiento de enfermedades, esta tesis se ha centrado en el desarrollo de nanocápsulas (NCs) basadas en polisacarídicas que sirvan como vehículo para transportar principios activos en el cuerpo humano.

El método seleccionado para la síntesis de las NCs consiste en un proceso de nanoemulsión seguido de un recubrimiento de quitosano que permitió la obtención de NCs de morfología esférica con una población mayoritaria de 100 nm de diámetro. El proceso de gelificación iónica resultó ser imprescindible para la correcta formación del recubrimiento de quitosano, mientras que el proceso de sonicación no, y por ello fue eliminado en favor de la escalabilidad de la síntesis en vistas a una posible producción industrial en el futuro. Mediante esta optimización de la síntesis se consiguió un método simple, fácilmente escalable, barato y completamente suave que permite la encapsulación de moléculas o pequeñas nanopartículas durante la formación de las NCs sin que resulten dañadas. El nanotransportador obtenido ha mostrado una gran versatilidad y capacidad de carga al ser capaz de albergar moléculas de interés con propiedades físico-químicas muy distintas e incluso incorporar simultáneamente moléculas activas y marcadores fluorescentes, obteniendo así una plataforma multifuncional con gran potencial para aplicaciones biomédicas.

La funcionalización de la superficie de las nanocápsulas mediante la unión de la molécula de interés a los grupos amino del quitosano fue una estrategia eficaz para controlar de forma precisa las propiedades de la superficie de la NC. De acuerdo con la literatura, la unión de biomoléculas a la superficie de las NCs permitió demostrar que las propiedades de superficie del nanotransportador influyen de forma notoria en sus interacciones con los sistemas biológicos. La unión de poli(etilenglicol) (PEG) a la superficie de las NCs les proporcionó una mayor estabilidad en medios biológicos y una menor citotoxicidad. La funcionalización de las NCs con trimanósido produjo una inesperada remodelación de la respuesta metabólica de los macrófagos ante la infección por *M. tuberculosis*. Estos prometedores resultados abren las puertas al uso de estas NCs como moduladores del metabolismo celular en el futuro, aunque se necesitan más

estudios para obtener información sobre los mecanismos y las consecuencias de la modulación del metabolismo celular.

En esta tesis, se ha demostrado que estas nanocápsulas pueden ser cargadas de forma eficiente y estable con una gran diversidad de moléculas o nanopartículas: oligonucleótidos como señuelo de factores de transcripción (TFD) o RNA interferente pequeño (siRNA), fluoróforos con distintas propiedades y nanopartículas de oro (AuNPs). Además, para cuantificar la carga ha sido necesario desarrollar métodos específicos de cada tipo de molécula o nanopartícula incorporada al nanotransportador. Por ejemplo, las interferencias del nanotransportador durante la cuantificación de los oligonucleótidos cargados se solucionaron al encontrar un método que garantizara una correcta separación entre nanotransportador y molécula cargada. La cuantificación ha permitido evidenciar que algunos parámetros, como la cantidad de molécula añadida para su encapsulación, la fase de adición o el recubrimiento superficial en el caso de las nanopartículas de oro, juegan un papel fundamental para lograr incrementar la carga de la nanocápsula. La carga ha sido maximizada con la finalidad de alcanzar concentraciones efectivas de la molécula transportada utilizando una menor cantidad de nanotransportador, lo que permite disminuir la posible toxicidad derivada de este.

En relación a la toxicidad de las nanocápsulas, la determinación del rango de concentraciones no citotóxicas en distintas líneas celulares ha permitido su aplicación *in vitro* bajo condiciones biocompatibles. En el futuro sería interesante realizar una optimización de las nanocápsulas para ampliar su rango de concentraciones no citotóxicas y poder utilizar mayores dosis, aumentando así la máxima concentración alcanzable de la molécula transportada en el sitio diana. Esta aproximación podría favorecer el transporte de moléculas que requieren de elevadas concentraciones debido a su baja eficacia, como el TFD utilizado en esta tesis, que no mostró actividad antibacteriana *in vitro*, ni en su forma libre ni incorporada al nanotransportador. Para determinar si la baja eficacia podría ser debida a que el TFD no consigue llegar al interior de la bacteria o a otros factores, sería necesario realizar un estudio de internalización bacteriana.

No obstante, la gran capacidad de las NCs para transportar su carga al interior de células eucariotas de forma rápida y eficaz fue corroborada con otros tipos de carga (siRNA, fluoróforos o nanopartículas de oro) en distintas líneas celulares e *Hydra vulgaris*. Por ejemplo, las nanocápsulas transportaron el fluoróforo Nile Red al interior de las células de manera extremadamente rápida en comparación con muchos otros nanomateriales investigados hasta el momento. La rapidez y eficacia en el transporte constituyen ventajas clave en un nanotransportador para disminuir los tiempos del tratamiento y reducir así la toxicidad asociada.

En el caso del nanotransportador de nanopartículas de oro desarrollado, además de aumentar drásticamente la internalización de las AuNPs en células colorrectales

exhibiendo una biocompatibilidad excelente, las NCs fueron capaces de proteger a las AuNPs de la agregación y prevenir su liberación en condiciones gastrointestinales simuladas. Estos prometedores resultados demuestran el gran potencial de este nanotransportador híbrido para superar las limitaciones de las AuNPs en la administración oral de fármacos en un estudio futuro.

En el caso del siRNA, la excelente internalización celular del siRNA transportado por las NCs recubiertas de quitosano o xantano demostró la capacidad de ambos sistemas para facilitar la entrada de este oligonucleótido en las células. Sin embargo, el nivel de silenciamiento génico producido por las NCs cargadas de siRNA fue bajo o nulo, según la técnica de cuantificación utilizada y el tipo de NC. La distribución intracelular de las NCs de quitosano y de xantano y del siRNA transportado por ellas fue muy similar, por lo que se concluyó que la presencia de uno u otro polímero en la cubierta de la NC no influye en el destino intracelular del nanotransportador ni de la molécula transportada. La observación del siRNA atrapado en endolisosomas y mitocondrias nos llevó a postular que la baja eficiencia de silenciamiento obtenida podría deberse a la ausencia de siRNA en su sitio de acción, el citosol. Con el objetivo de liberar el siRNA de los endolisosomas y las mitocondrias, se investigó el uso de la tecnología de internalización fotoquímica (PCI). En el caso del tratamiento dirigido a mitocondrias, no se observó una liberación clara del siRNA de estos orgánulos tras la PCI. Por el contrario, en el caso del tratamiento dirigido a endolisosomas, se detectó una notable liberación del siRNA de los lisosomas pero no se vio traducida en una mayor eficiencia de silenciamiento. Esto podría deberse a la fotooxidación del siRNA durante la reacción fotoquímica, que podría conducir a la pérdida de su funcionalidad, como ha sido descrito con otras biomoléculas y fármacos en la literatura. No obstante, también es posible que el siRNA liberado al citosol esté todavía asociado a la nanocápsula y esto le impida ejercer su actividad biológica, lo que podría ser objeto de un interesante estudio futuro.



## Lista de publicaciones

- 1) Serrano-Sevilla, I., Artiga, Á., Hernández, Y., De Matteis, L., Mitchell, S. G. & de la Fuente, J. M. Rational design of chitosan nanocapsules as gold nanoparticle carriers for gastrointestinal protection and enhanced cellular internalization. En preparación
- 2) Ambrosone, A., De Matteis, L., Serrano-Sevilla, I., Tortiglione, C. & de la Fuente, J. M. Glycogen synthase kinase 3 beta inhibitor delivered by chitosan nanocapsules promotes safe, fast and efficient activation of WNT signalling in vivo. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6, 5, 2893-2903
- 3) Artiga, Á., Ramos-Sánchez, F., Serrano-Sevilla, I., De Matteis, L., Mitchell, S. G., Sánchez-Somolinos, C. & de la Fuente, J. M. Inkjet-based technology for microencapsulation of gold nanoparticles within biocompatible hydrogels. *Particle and Particle Systems Characterization*, 37(4), 2000026
- 4) Hibbitts, A., Lucía, A., Serrano-Sevilla, I., De Matteis, L., McArthur, M., de la Fuente, J. M., Aínsa, J.A. & Navarro, F. (2019). Co-delivery of free vancomycin and transcription factor decoy-nanostructured lipid carriers can enhance inhibition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PloS one*, 14(9)
- 5) Serrano-Sevilla, I., Artiga, Á., Mitchell, S. G., De Matteis, L. & de la Fuente, J. M. (2019). Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives. *Molecules*, 24(14), 2570
- 6) Artiga, Á., Serrano-Sevilla, I., De Matteis, L., Mitchell, S. G. & de la Fuente, J. M. (2019). Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(6), 876-896
- 7) Coya, J. M., De Matteis, L., Giraud-Gatineau, A., Biton, A., Serrano-Sevilla, I., Danckaert, A., Dillies, M.A., Gicquel, B., de la Fuente, J. M. & Tailleux, L. (2019). Tri-mannose grafting of chitosan nanocarriers remodels the macrophage response to bacterial infection. *Journal of nanobiotechnology*, 17(1), 15
- 8) De Matteis, L., Jary, D., Lucía, A., García-Embid, S., Serrano-Sevilla, I., Pérez, D., Aínsa, J.A., Navarro, F. & de la Fuente, J. M. (2018). New active formulations against *M. tuberculosis*: Bedaquiline encapsulation in lipid nanoparticles and chitosan nanocapsules. *Chemical Engineering Journal*, 340, 181-191
- 9) De Matteis, L., Alleva, M., Serrano-Sevilla, I., García-Embid, S., Stepien, G., Moros, M. & de la Fuente, J. M. (2016). Controlling Properties and Cytotoxicity of Chitosan Nanocapsules by Chemical Grafting. *Marine drugs*, 14(10), 175



## Abreviaturas

**°C:** grados centígrados

**AuNPs:** nanopartículas de oro

**BPD-MA:** *Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A*

**BS<sup>3</sup>:** bis(sulfosuccinimidil)suberato

**BSA:** albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

**cDNA:** DNA complementario (*complementary DNA*)

**Cryo-TEM:** microscopía electrónica de transmisión criogénica (*Cryogenic Transmission Electron Microscopy*)

**CS:** quitosano (*Chitosan*)

**DL:** carga de fármaco (*Drug Loading*)

**DLS:** dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*)

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**dsRNA:** RNA de doble cadena (*double strand RNA*)

**EE:** eficiencia de encapsulación

**EPR:** efecto de permeabilización y retención (*Enhanced Permeability and Retention*)

**ESF:** Fundación Europea de la Ciencia (*European Science Foundation*)

**FDA:** Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*U. S. Food and Drug Administration*)

**FTIR:** espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

**GFP:** proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

**IRM:** imagen por resonancia magnética (*MRI: Magnetic Resonance Imaging*)

**LPF:** Lipofectamina

**LSPR:** resonancia del plasmón de superficie localizado (*Localized Surface Plasmon Resonance*)

**MFI:** mediana de la intensidad de fluorescencia (*Median Fluorescence Intensity*)

**MHII:** medio de cultivo Mueller Hinton II

**MIC:** concentración mínima inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration*)

**mRNA:** RNA mensajero (*messenger RNA*)

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*Methicillin resistant*)

*Staphylococcus aureus*)

**MTT:** bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**NCS:** nanocápsulas

**NIR:** región espectral del infrarrojo cercano (*Near Infrared*)

**NPs:** nanopartículas

**o/w:** emulsión simple de aceite en agua (*oil/water*)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud (WHO: *World Health Organization*)

**PBS:** tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

**PCC:** coeficiente de correlación de Pearson (*Pearson's Correlation Coefficient*)

**PCI:** tecnología de internalización fotoquímica (*Photochemical Internalization*)

**PDI:** índice de polidispersidad (*Polidispersity Index*)

**PDT:** terapia fotodinámica (*Photodynamic Therapy*)

**PEG:** poli(etilenglicol)

**PLGA:** ácido poli(láctico-co-glicólico)

**PS:** fotosensibilizador (*Photosensitizer*)

**RISC:** complejo silenciador inducido por el RNA (*RNA-induced silencing complex*)

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNAi:** interferencia por RNA (*RNA interference*)

**ROS:** especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen species*)

**ROS:** especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

**rpm:** revoluciones por minuto

**RT-qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa  
(*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*)

**S. aureus:** *Staphylococcus aureus*

**SDS-PAGE:** electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

**SEM:** microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*)

**SFM o SRE:** sistema fagocítico mononuclear o sistema retículo-endotelial

**SGF:** fluido gástrico simulado (*Simulated Gastric Fluid*)

**SIF:** fluido intestinal simulado (*Simulated Intestinal Fluid*)

**siRNA:** RNA pequeño interferente (*small interfering RNA*)

**SPR:** resonancia de plasmón superficial (*Surface Plasmon Resonance*)

**Sulfo-NHS:** N-hidroxisulfosuccinimida

**TEM:** microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*)

**TFD:** señuelo de factor de transcripción (*Transcription Factor Decoy*)

**TPPS2a:** meso-tetrafenilporfina disulfonada

**ufc:** unidades formadoras de colonias

**UV-Vis:** ultravioleta-visible

**XN:** xantano (*Xanthan*)