



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

“NANOVECTORES HÍBRIDOS PARA INSERTAR MATERIAL GENÉTICO
EN CÉLULAS HUMANAS”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A:
ING. ROBERTO CABALLERO GONZÁLEZ

TUTOR:
Dra. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA (CFATA)
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. GENOVEVA HERNÁNDEZ PADRÓN
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA (CFATA)
Dr. ALFREDO MACIEL CERDA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS ESTÁ DEDICADA

A mi esposa **María del Refugio Pérez Campos**, a mi hija **Regina Xiomara Caballero Pérez** y a mi mamá **Ma. de la Luz González Arsola** por todo el apoyo y cariño incondicional que me han brindado siempre para lograr mis objetivos y metas, por ser tan comprensivas y permitirme estar lejos de ellas, por su permanencia a mi lado en las buenas y en las malas, GRACIAS.

A todos los integrantes de mi familia, en especial a mi hermano **Juan Caballero González y Matilde Caballero González** por el apoyo que siempre me brindaron en el transcurso de esta nueva etapa de mi vida, por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles que se suscitaron, por escucharme y haber sabido apoyarme a cada momento.

A todos los integrantes de la familia de mi esposa, por su apoyo incondicional que siempre mostraron, en especial a mi suegro **Benjamín Pérez Hernández**, por esos comentarios y/o discusiones buenas o malas que siempre entablamos y las cuales me hacían ver las cosas desde otro punto de vista, aunque no siempre llegábamos a un acuerdo.

A todos mis maestros que con mucho esmero dedicaban parte de su tiempo para preparar sus clases que impartirían al día siguiente, por todos esos consejos y conocimientos que me brindaron y por toda su paciencia que siempre mostraron para compartir su conocimiento. MIL GRACIAS.

A mis compañeras y compañeros de la generación: **Miriam, Daniela, Luis Fernando, Luis Perdomo, Néstor, Jesús, Carlos e Iván**, por aguantar mis malos comentarios que hice alguna vez en esa sala de estudiantes, en donde pasábamos la mayor parte del tiempo compartiendo comentarios y puntos de vista sobre los proyectos que cada uno desarrollamos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **CONACYT**, por ser una institución que brinda apoyo a la formación académica de personas que no contamos con posibilidades de solventar nuestros propios gastos académicos, y sin embargo, tenemos el deseo de seguir superándonos con el objetivo de ser mejores personas y en un futuro contribuir en mejoras que beneficien a nuestro país. Pero principalmente le agradezco el apoyo económico brindado durante estos 2 años y por seguir apoyando el desarrollo de proyectos.

Sobre todo agradezco a las personas que han contribuido con sus conocimientos teóricos, prácticos y administrativos a mi formación académica, al desarrollo y conclusión de mi proyecto de investigación, ya que con ello pude vencer las dificultades presentadas durante este proceso y con su apoyo terminar los trabajos en tiempo y forma. Principalmente agradezco a mi tutora la **Dra. Luz María López Marín** por toda esa paciencia que siempre mostró, por su apoyo incondicional, por confiar en mí para desarrollar el proyecto y por saber guiarme a cada momento.

Como tutor principal la Dra. Luz María López Marín y a mis asesores Dra. Genoveva Hernández Padrón y Dr. Alfredo Maciel Cerda.

Agradezco a las personas que me asesoraron para el desarrollo de esta investigación. Especialmente a la **M en C. Lourdes Palma Tirado** (Instituto de Neurobiología, UNAM) por su excelente ayuda en los análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión, a las **Dras. Susana Vargas Muñoz y Miriam Estévez González** por su apoyo para el análisis de muestras por Dispersión de Luz, y a la **Dra. Genoveva Hernández Padrón** por su apoyo en el análisis de muestras por espectroscopias Raman e infra-roja.

Al personal de la Biblioteca que contribuyó para conseguir todas las bibliografías que no se encontraban dentro del campus.

A la **Fís. Rosa Elena Escalera López** y a su asistente **Sra. Paloma Calderón Barrera**, por su apoyo para la realización de todos los trámites académicos-administrativos durante estos estudios.

Al **Lic. Arnulfo Guzmán Álvarez** por su valioso apoyo en la preparación para la presentación del examen TOEFL.

Por último agradezco a todas aquellas personas que siempre nos recibieron con una sonrisa y un saludo caluroso, aquellos que con su trabajo cotidiano nos hacían tener una permanencia agradable manteniendo siempre limpias nuestras áreas.

En general a todos los integrantes del CFATA ya que directa o indirectamente tuvieron algo que ver en el ámbito motivacional y académico para llegar hasta este punto, la redacción del trabajo de tesis.

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Nanobio-óptica del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Luz María López Marín.

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de una beca para estudios de posgrado y de la Dirección General de Asuntos del personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IT200512.

ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. CAPÍTULO I	
Marco teórico	
1.1 La Nanomedicina.....	15
1.2 Historia de las nanopartículas.....	17
1.2.1. Definición.....	19
1.2.2. Clasificación.....	20
1.3 Materiales para acarrear ácidos nucleicos.....	22
1.3.1. Nanopartículas de cerámica.....	24
1.3.2. Liposomas.....	24
1.3.3. El concepto de tamaños ADN-nanovectores-células.....	26
1.4 Terapia génica.....	29
1.4.1 Características de los ácidos nucleicos.....	32
1.5 Microscopía electrónica de transmisión.....	33
1.6 Espectroscopia Raman.....	35
1.7 Microscopía de epifluorescencia.....	37
1.8 Dispersión de luz.....	40
1.9 Cromatografía.....	42
1.9.1 Tipos de cromatografía.....	43

1.9.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	43
Objetivos.....	45
Justificación.....	46
Antecedentes.....	48
Diagrama experimental.....	49
2. Material y métodos	
2.1 Reactivos.....	50
2.2 Preparación de liposomas unilaminares grandes.....	50
2.3 Encapsulación de dextrano fluoresceinado en liposomas.....	52
2.4 Preparación de nanopartículas de sílice.....	53
2.5 Preparación del nanovector híbrido.....	54
2.6 Análisis de dispersión de luz dinámica (DLD).....	54
2.7 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	55
2.8 Espectroscopia Raman.....	55
2.9 Análisis de internalización de fluorocromo en células humanas.....	55
3. Resultados y discusión	
3.1 Autoensamblaje de lípidos anfipáticos para preparación de liposomas.....	57
3.2 Obtención de liposomas unilaminares grandes.....	58
3.3 Determinación del tamaño de los liposomas.....	59
3.4 Determinación de la morfología y talla de liposomas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).....	62
3.5 Estabilidad de liposomas unilaminares grandes.....	62
3.6 Obtención y análisis de nanopartículas de sílice porosa.....	65
3.7 Preparación de nanopartículas híbridas.....	67
3.8 Análisis de nanopartículas híbridas.....	68
3.9 Encapsulación de una molécula modelo y liberación en células eucariotas.....	72
CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFIA.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Longitudes de ondas de algunos marcadores fluorescentes.

Tabla 2 Reactivos utilizados en el proceso sol-gel.

Tabla 3 Composición molar de lípidos anfipáticos utilizados para la preparación de liposomas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La terapia génica consiste en la introducción-liberación de ácidos nucleicos dentro de la célula, a fin de reprogramar sus funciones. En esta figura se esquematiza la entrega de DNA encapsulado dentro de un nanovector.

Figura 2. Escala comparativa del tamaño del DNA, virus y células, así como de algunos elementos de la nanotecnología.

Figura 3. Las nanoesferas son sistemas matriciales que adsorben fármacos.

Figura 4. Se muestra una nanocápsula, cuyas partes son constituidas por una capa externa y una cavidad interior donde se puede encontrar el fármaco.

Figura 5. Las nanoesferas y nanocápsulas de segunda generación están recubiertas de un polímero hidrofílico, lo que impide la opsonización.

Figura 6. Las nanopartículas de tercera generación tienen en su superficie ligandos que son reconocidos por células blancas.

Figura 7. Representación esquemática de las etapas que tienen lugar durante el tráfico intracelular de fármacos incluidos en nanosistemas.

Figura 8. Diagrama que muestra las dimensiones de nanovectores, ADN y células.

Figura 9. Los estudios de terapia génica en fase clínica se enfocan en el tratamiento de diversas enfermedades. En esta gráfica se muestra el porcentaje de estudios clínicos enfocados a distintos padecimientos.

Figura 10. Se esquematizan las estrategias asociadas con el uso de distintos vectores para transferir material genético.

Figura 11. Estructura molecular del ADN.

Figura 12. Microscopio electrónico de transmisión marca JOEL, JEM-1010 Electron Microscope, ORIUS CCD camera controller.

Figura 13. Dispersiones posibles que puede presentar una molécula al incidir un rayo sobre ella.

Figura 14. La línea anti-Stokes es mucho menos intensa que la línea Stokes porque a temperaturas normales la población en el estado basal es mayor que en

uno de mayor energía (distribución de Boltzmann), entonces las transiciones anti-Stokes tienen menor probabilidad de ocurrir.

Figura 15. La fluorescencia (como también la fosforescencia) es la capacidad de un material de emitir la energía absorbida en forma de luz.

Figura 16. Esquema del microscopio de epifluorescencia.

Figura 17. Esquema del equipo de dispersión de luz dinámica (DLD).

Figura 18. Esquema del mecanismo de separación en la cromatografía de exclusión molecular.

Figura 19. Estructura de los lípidos anfipáticos utilizados para la preparación de liposomas unilaminares. Sobre cada estructura se indica el nombre científico o común correspondiente.

Figura 20. Eliminación de dextrano de 10 kDa no encapsulado en los liposomas.

Figura 21. Análisis de la talla de liposomas unilaminares grandes constituidos por DOPC, extruidos a través de membranas con poros de 100 nm.

Figura 22. Análisis de la talla de liposomas unilaminares grandes constituidos por una mezcla de DOPC/colesterol (7:3, mol/mol), extruidos a través de membranas con poros de 100 nm.

Figura 23. Análisis de liposomas unilaminares grandes mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) Liposomas compuestos por di-oleil-fosfatidilcolina (DOPC); (b) liposomas compuestos por una mezcla de DOPC/colesterol (7:3, mol/mol).

Figura 24. Análisis de liposomas unilaminares grandes compuestos de di-oleil-fosfatidilcolina, colesterol y DOTAP (2 : 2 : 1.5, mol/mol), mediante microscopía electrónica de transmisión.

Figura 25. Análisis de la talla de liposomas unilaminares grandes constituidos por una mezcla de DOPC/colesterol (7:3, mol/mol), extruidos a través de membranas con poros de 100 nm y conservados a temperatura ambiente durante 7 días.

Figura 26. Estructura del tetra-ortosilicato (TEOS) (arriba), reactivo precursor para la obtención de las nanopartículas de sílice (abajo).

Figura 27. Análisis de las nanopartículas de sílice obtenidas mediante

polimerización de tetra-etil-ortosilicato por el proceso de sol-gel. (a) Talla de las partículas, obtenida mediante dispersión de luz dinámica. (b) Imagen de una nanopartícula de sílice mediante microscopía electrónica de transmisión.

Figura 28. Análisis por microscopía electrónica de transmisión de liposomas compuestos de DPPE/DOPC/colesterol/DOTAP (1 : 1 : 1.5 : 2, mol/mol), extruidos a través de poros de 100 nm.

Figura 29. Análisis mediante DLD de la talla de liposomas catiónicos estabilizados con nanopartículas de sílice.

Figura 30. Espectros Raman comparativos de nanopartículas de sílice (a), liposomas catiónicos (b) y nanopartículas híbridas (c) obtenidos en este estudio. Las líneas punteadas muestran la correspondencia de bandas con el sistema híbrido.

Figura 31. Internalización en células derivadas de riñón humano de una macromolécula fluorescente de 10 kDa (FITC-Dextrano) encapsulada en liposomas catiónicos. (a) Microscopía en campo claro, 10X; (b) Microscopía de epifluorescencia ante excitación con luz azul, 10X.



RESUMEN

La búsqueda de materiales para liberar ácidos nucleicos en células humanas constituye una necesidad apremiante. Actualmente, una de las áreas con mayor potencial en medicina es la terapia génica, definida como el proceso por el cual la expresión de genes en una célula es reprogramada para fines terapéuticos. La terapia génica tiene el potencial de solucionar problemas relacionados con enfermedades emergentes, tales como cáncer, Alzheimer, Parkinson y padecimientos cardiovasculares diversos, pero su uso actual está limitado a tratar padecimientos terminales, ya que el acarreo de material genético se hace a través de virus, los cuales presentan efectos colaterales que pueden ser letales. Una amplia gama de materiales han sido evaluados para la liberación de ácidos nucleicos al interior de células eucariontes. Sin embargo, se requiere profundizar en su estudio, considerando factores críticos para la interacción vector-célula (talla, características superficiales, estabilidad), y es también necesario el montaje de técnicas amigables para el control de calidad de estos productos de interés farmacéutico.

En este trabajo se describe el diseño de nanopartículas híbridas para encapsulamiento y entrega de macromoléculas, con posibles aplicaciones para terapia génica. El sistema se basa en nanopartículas de sílice porosa, capaces de adsorber moléculas en sus poros internos mediante simple incubación, así como en el recubrimiento de dichas partículas con lípidos anfipáticos mediante autoensamblaje molecular. Las características de morfología y talla de las partículas fueron analizadas mediante dispersión de luz y microscopía electrónica de transmisión. Finalmente, se propone el uso de la espectroscopia Raman como una alternativa para el análisis de nanovectores híbridos.



INTRODUCCIÓN.

El estudio y desarrollo de nanopartículas ofrece la oportunidad del tratamiento de enfermedades para las que actualmente existen importantes limitaciones terapéuticas. Por ejemplo, los tratamientos requeridos para el tratamiento de enfermedades complejas, tales como cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y problemas cardiovasculares, presentan serios efectos colaterales, o son ineficaces. Muchos mecanismos clave en la patogénesis de estos padecimientos han sido dilucidados, y podrían ser reprogramados a través de la manipulación genética. Una de las técnicas más prometedoras para el tratamiento de estas enfermedades es la terapia génica, es decir la introducción de construcciones de ácidos nucleicos al interior de una célula con fines terapéuticos. La figura 1 representa una de las formas de introducir ácidos nucleicos en una célula.

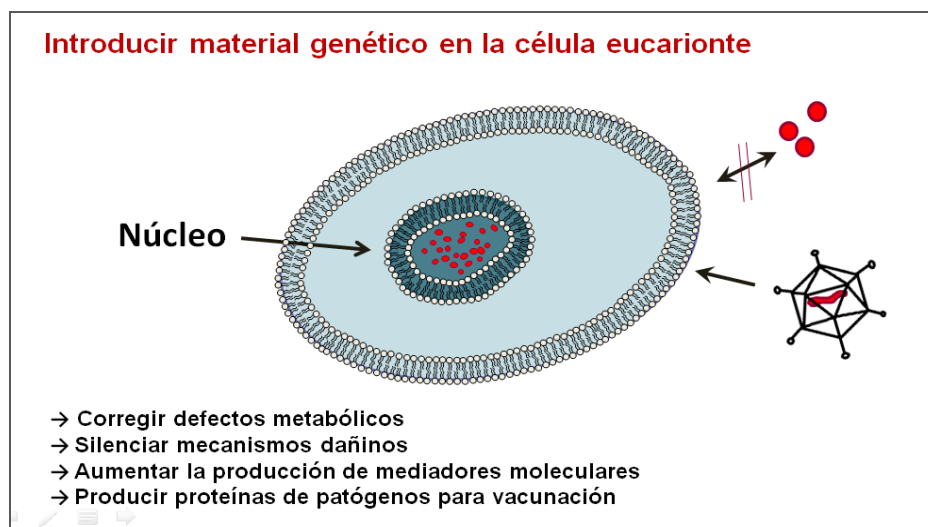
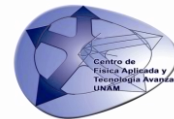


Figura 1. La terapia génica consiste en la introducción-liberación de ácidos nucleicos dentro del núcleo, a fin de reprogramar sus funciones. En esta figura se esquematiza



cómo la entrega de DNA desnudo es inviable, por la impermeabilidad de la membrana, por lo que su introducción debe ser mediada por nanovectores, incluidos los virus.

La manera más eficaz de introducir un gen terapéutico dentro de una célula humana es empleando un virus, el cual utiliza la célula como una maquinaria para replicar su información genética y sintetizar los productos correspondientes. Hasta ahora, todos los tratamientos de terapia génica que han sido utilizados se basan en insertar el gen terapéutico en el genoma de un virus, el cual en principio ha sido modificado para evitar, procesos dañinos. En consecuencia, una célula infectada con el virus producirá las proteínas codificadas en la información genética del mismo, liberando la molécula terapéutica; sin embargo, el uso de virus como acarreadores de material genético es difícil de controlar por completo. Todos los tipos de virus que han sido explorados para acarrear material genético en células humanas han producido efectos colaterales, que van desde su rápida destrucción (ocasionando la pérdida del material terapéutico), hasta la muerte de un individuo, asociada con leucemia o choque anafiláctico (M. Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Debido a los efectos colaterales mencionados, la terapia génica, por medio de virus, ha sido autorizada únicamente para el tratamiento de enfermedades terminales, como por ejemplo inmunodeficiencia severa por falta de adenosin deaminasa (M. Cavazzana-Calvo et al., 2000). No obstante, el potencial terapéutico de la modificación de genes en el humano es enorme.

Es por esto que se ha intentado subsanar las desventajas de utilizar sistemas virales, mediante el uso de diferentes substitutos naturales y mediante el desarrollo de nuevas investigaciones sobre diversos materiales compuestos.

En el presente trabajo se reporta la obtención de nanopartículas híbridas para introducir material genético en células humanas, así como su caracterización.



En el capítulo I se introduce al lector en el tema de los biomateriales, que son materiales que se utilizan para la construcción de nanopartículas utilizadas como vectores para la entrega de material genético.

Se resalta también la importancia de los materiales cerámicos y sus aplicaciones. Además, se hace una revisión enfocada a los constituyentes orgánicos de la membrana celular, y se discute el uso de liposomas, o membranas modelo, para encapsular material genético, así como de membranas modelo estabilizada con nanopartículas. Finalmente, se hace una revisión básica sobre las técnicas para caracterizar este tipo de materiales, a saber, la microscopía electrónica de transmisión (MET), la dispersión de luz dinámica (DLD), la espectroscopia Raman dispersiva y la epifluorescencia.

El capítulo II corresponde al desarrollo experimental realizado para obtener liposomas y liposomas estabilizados con nanopartículas de sílice. En particular, se detalla la obtención de liposomas por autoensamblaje molecular, el procedimiento para obtener nanopartículas de sílice de tamaño y forma específica, y la preparación de nanopartículas recubiertas por liposomas.

En el capítulo III se presentan los resultados obtenidos, que incluyen principalmente datos de caracterización de los materiales obtenidos.

Por último, se presenta un apartado con las conclusiones a las que se llegó con el desarrollo del presente trabajo.



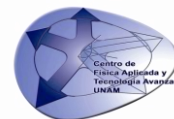
CAPITULO I

Marco teórico, objetivos, justificación y antecedentes

1.1 La Nanomedicina.

En la actualidad, el avance de varios campos ligados a la medicina está llevando a una revolución en la manera de tratar enfermedades. Las ciencias biomédicas han puesto al descubierto mecanismos clave para el control de importantes enfermedades. A nivel de laboratorio se han dilucidado vías que permiten vislumbrar el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo aquellas de gran complejidad. Por ejemplo, mientras que las causas y la patología de un proceso neoplásico (canceroso) no se comprenden del todo, algunos eventos clave para el crecimiento de un tumor sí podrían ser inhibidos a través de bloqueadores de proliferación del tejido. Un ejemplo de ello puede ser el bloqueo de señales para la formación de nuevos vasos sanguíneos, o angiogénesis. De igual manera, otras enfermedades complejas, incluyendo padecimientos crónico-degenerativos e inclusive infecciones, podrían ser tratadas mediante la reprogramación de células en un paciente.

Sin embargo, la aplicación de muchos tratamientos reviste varios problemas de índole tecnológica. Entre los principales problemas para la aplicación de tratamientos terapéuticos destacan la toxicidad de fármacos aplicados en altas dosis, o a nivel sistémico, es decir por vía intravenosa, y la dificultad de llevarlos a órganos, tejidos y células específicas.



La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y a la manipulación de materiales, a nivel de átomos y moléculas (nanomateriales), lo que corresponde a dimensiones en el intervalo de 0.1 a 100 nanómetros, aunque

algunos autores incluyen escalas de varios cientos de nanómetros menores a la micra. En esta escala, la materia muestra características y aplicaciones nuevas a las conocidas tradicionalmente. La nanotecnología tiene sus orígenes en los años 1950s, cuando el físico Richard Feynman postuló que era posible la manipulación de la materia en tamaño nanométrico. Actualmente, esta tecnología se ha convertido en una opción real para la solución de problemas en múltiples áreas, tales como la electrónica, la óptica, la tecnología informática, así como en la medicina. En la última década, la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina ha sido llamada nanomedicina, y puede definirse como la rama de la nanotecnología que emplea herramientas moleculares, así como conocimientos sobre el cuerpo humano, a fin de preservar y mejorar la salud (Freitas, 2005).

Una de las ramas de la nanomedicina es aquella dedicada a la utilización de nanopartículas para fines farmacéuticos. En particular, los nanomateriales tienen una escala compatible con las células, es decir con macromoléculas biológicas y con estructuras celulares tales como varios organelos. En la figura 2, se muestra la escala en nanómetros y micrómetros de estructuras celulares, así como de técnicas de uso común en nanotecnología.

Los orígenes de la nanomedicina se remontan a los años 1970s y el primero en proponer su uso fue Speiser (J.M. Irache, An. Sist. Sanit. Navar. 2008, Vol. 31). Este autor utilizó nanopartículas elaboradas con un polímero sintético, las cuales tenían la desventaja de no ser biodegradables, por lo que se pueden acumular en el cuerpo y ser altamente tóxicas. En la actualidad, se cuenta con nanopartículas tanto de polímeros sintéticos biodegradables como de materiales de origen natural (sílice y fosfolípidos).



1.2 Historia de las nanopartículas.

Las primeras nanopartículas transportadoras de fármaco estaban constituidas de gelatina y albúmina. Sin embargo, el uso de proteínas puede estimular el sistema inmune y presentarse problemas de antigenicidad y toxicidad. Para disminuir estos efectos se desarrollaron las nanopartículas de polímeros sintéticos.

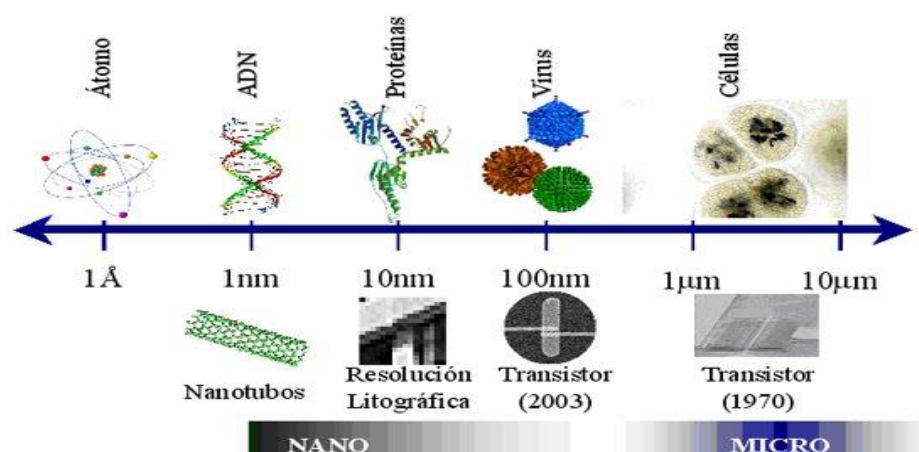


Figura 2. Escala comparativa del tamaño del ADN, virus y células, así como de algunos elementos de la nanotecnología. (Francisco G. Bolivar 2007).

Los primeros polímeros¹ utilizados, propuestos por Speiser y Birrenbach en 1976 fueron los de poli(acrilamida) y estos se elaboran a partir de monómeros de acrilamida y de metacrilato de metilo por el método de polimerización en emulsión (Vauthier et al, 2003).



¹ Polímero deriva de la palabra griega poli, muchos; y de meros, partes; esto es muchas partes. Un polímero es una molécula compuesta de unidades repetitivas denominadas monómeros.

Esos polímeros no son biodegradables, por lo que posteriormente se propusieron polímeros biodegradables. Entre ellos se encuentran los producidos a partir de monómeros de cianoacrilatos de alquilo, cuyo uso había estado limitado a pegamentos en cirugías. El método utilizado para la preparación de los policianoacrilatos de alquilo es la polimerización en emulsión en medio ácido (Couvreur et al, 2002).

Gurny y colaboradores propusieron otro método de preparación de nanopartículas a partir de ácido láctico, formando el polímero de poliácido láctico el cual es utilizado para realizar suturas en las cirugías. En este método, las nanopartículas son formadas directamente a partir del polímero preformado (Couvreur et al, 2002).

A partir de 1986 se empezaron a desarrollar métodos para la fabricación de nanocápsulas. El método de preparación es el de polimerización interfacial en emulsión a partir de monómeros de cianoacrilatos de alquilo.

En los últimos años se han desarrollado métodos como: emulsión-difusión, doble emulsión, salting out (salado), fluido supercrítico², evaporación del solvente, etc, (Fattal et al, 2002). Asimismo, se están desarrollando métodos para la elaboración de nanopartículas recubiertas con agentes tensoactivos, reduciendo así su hidrofobicidad y permitiendo que permanezcan más tiempo en el torrente sanguíneo, al evitar su captura por la parte de los macrófagos. La siguiente meta es el desarrollo de nanopartículas que tengan una especificidad hacia un tipo particular de células blancas. Esto se puede lograr poniendo en la superficie de la nanopartícula anticuerpos monoclonales y proteínas.



² Los fluidos supercríticos se producen por el calentamiento de un gas por encima de su presión crítica. Se comportan como híbridos en donde hay difusión como en un gas, y disuelven como líquidos.

1.2.1 Definición.

Las nanopartículas son sistemas coloidales los cuales están hechos de polímeros biodegradables o no biodegradables. Su tamaño varía entre 1 a 1000 nm, con un diámetro promedio de 200nm (Couvreur et al, 2002). Existen dos tipos de nanopartículas: nanoesferas y nanocápsulas.

Nanoesferas: son sistemas matriciales³ en los cuales el fármaco se encuentra disperso en el polímero del cual está hecha la nanopartícula. El fármaco también se puede encontrar adsorbido en la superficie de la nanoesfera (figura 3).

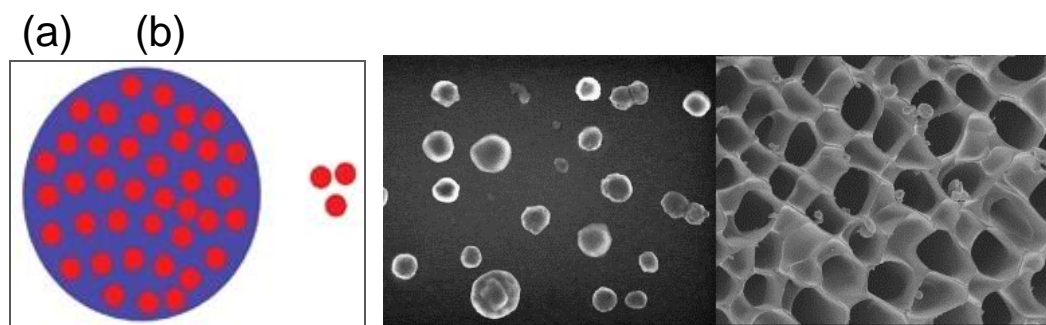


Figura 3. Las nanoesferas son sistemas matriciales que adsorben fármacos. (a) Esquema de una nanoesfera con fármacos adsorbidos; (b) Micrografías electrónicas típicas de nanoesferas..

Nanocápsulas: Son sistemas con un reservorio, compuesto por una membrana polimérica que rodea un núcleo oleoso o acuoso. En este núcleo se encuentra



generalmente el fármaco; aunque también se puede encontrar el fármaco adsorbido en la superficie de la nanocápsula (figura 4).

³ Los sistemas matriciales son aquellos en los que el principio activo está uniformemente distribuido en el seno de un polímero (Costa et al, 2004).

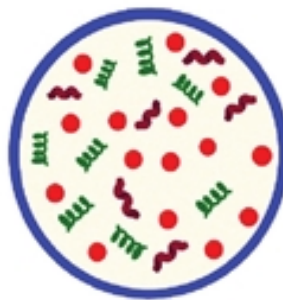


Figura 4. Se muestra una nanocápsula, cuyas partes son constituidas por una capa externa y una cavidad interior donde se pueden encontrar fármacos de diversos tipos (Fattal et al, 2002).

1.2.2 Clasificación.

Las nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, pueden clasificarse en tres tipos:

Primera generación: Son las primeras nanopartículas que fueron elaboradas. Se caracterizan por no tener un recubrimiento. Este tipo de partículas interactúan fuertemente con las proteínas plasmáticas, debido a su gran área superficial. Esto favorece la creación de interacciones hidrófobas⁴ fuertes entre la superficie de la nanopartícula y las opsoninas, ocasionando que sean reconocidas por los macrófagos y, especialmente, por las células de Kupffer y por las células del sistema retículo endotelial. Las nanopartículas penetran en los macrófagos por



endocitosis y a su vez son degradadas por las enzimas lisosomales, liberando el principio activo en el interior de la célula.

⁴ En los medios acuosos, el enlace de Van der Waals es reforzado por la variación entrópica del sistema resultante de la desolvatación que tiene lugar al acercarse dos moléculas orgánicas por su parte lipofílica, con el consiguiente aumento de la entropía del sistema; aunque las proporciones hidrocarbonadas se ordenan, un número considerable mayor de moléculas de agua se desordena, haciendo positivo el valor de ΔS y negativo el de ΔG , este refuerzo del enlace de Van der Waals, constituye el denominado enlace hidrófobo, de gran importancia en los medios biológicos (Valle-Delgado et al, 2005).

Sus principales aplicaciones son el tratamiento de tumores hepáticos, enfermedades hepáticas o del sistema reticuloendotelial.

Segunda generación: Estas surgen de la necesidad de que las nanopartículas tengan una permanencia más prolongada dentro de la circulación sanguínea, por lo tanto tienen un recubrimiento polimérico tal como el polietilenglicol, polisorbato 80, polióxido de etileno, poloxamer 188, etc. El mecanismo de operación del recubrimiento es que el polímero hidrofílico repele (repulsión esférica⁵) a las opsoninas⁶, que en esta forma ya no se adhieren a la nanopartícula (figura 5). Con la capa hidrofílica, las nanopartículas de segunda generación no son reconocidas por los macrófagos.

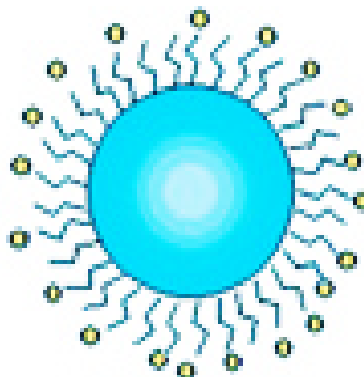




Figura 5. Las nanoesferas y nanocápsulas de segunda generación están recubiertas de un polímero hidrofílico, lo que impide la opsonización⁷ (Roitt,2003).

⁵ La tensión esférica es la interacción de repulsión que se desarrolla cuando los átomos son forzados a acercarse más de lo que permiten sus radios atómicos. Es el resultado de tratar de obligarlos a ocupar el mismo espacio.

⁶ Las opsoninas son sustancias, por ejemplo un anticuerpo (IgG) o un C3_b, que favorece la fagocitosis al facilitar la adhesión del antígeno al fagocito (Serda et al, 2011).

⁷ La opsonización es el proceso por el que anticuerpos, u otras moléculas, se unen a una sustancia, permitiendo una mejor fagocitosis de ésta.

En consecuencia tienen un tiempo de permanencia mayor en la circulación sanguínea. De esta forma, las partículas de segunda generación han resultado eficaces para el tratamiento de tumores cancerígenos, hacia los cuales hay un paso facilitado de moléculas de la circulación sanguínea, debido a la vasodilatación asociada con tumores.

Tercera generación: Son las nanopartículas que utilizan los desarrollos de las dos generaciones anteriores, pero además tienen una alta especificidad hacia las células blanco. Para lograr esto son necesarias tres características a) nanopartícula construida por un material biodegradable, b) capa de polímero hidrofílico que recubra a las nanopartículas para evitar su opsonización y c) que los extremos de las cadenas del polímero sean reconocidos por los receptores específicos en las membranas de la célula (figura 6).

1.3 Materiales para acarrear ácidos nucleicos

Algunas ventajas con el diseño de nanosistemas terapéuticos se centran en la obtención de:



- I. Fármacos más selectivos y eficaces, mediante estrategias de orientación selectiva. Estos sistemas pueden ser de forma activa o pasiva.
- II. Fármacos más fáciles de administrar.
- III. Nuevos fármacos o terapias que no serían viables de no disponer de un nanosistema que los solubilice o los proteja.

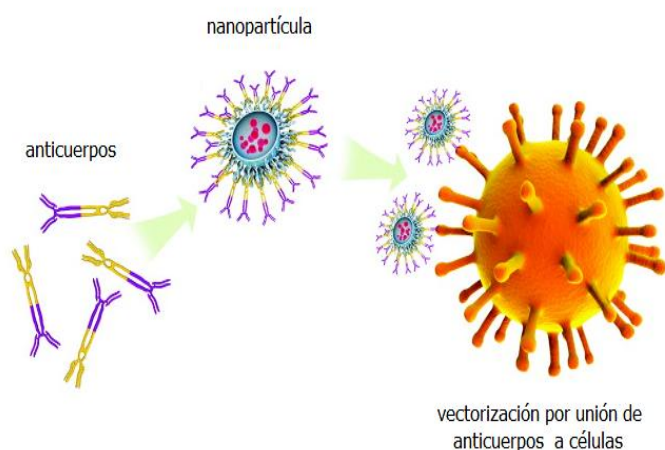
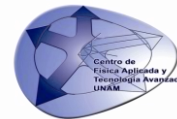


Figura 6. Las nanopartículas de tercera generación tienen en su superficie ligandos que son reconocidos por células blancas. Los anticuerpos son los ligandos más utilizados para dirigir nanopartículas hacia una población celular en particular (Couvreux, 2001).

En particular, el material genético que, como vimos anteriormente, puede ser utilizado para fines terapéuticos, requiere protección de nucleasas presentes en tejidos biológicos, así como de células del sistema reticuloendotelial. Para ello, el uso de nanopartículas constituye una opción llamativa.

Se considera que aún debe estudiarse más la toxicidad, la epidemiología, la persistencia y bioacumulación de los nanomateriales que se fabrican, sin



embargo, la nanotecnología ha ayudado a dar solución a los problemas que tenían los fármacos como son:

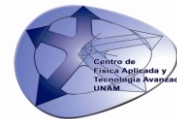
- a) Agentes terapéuticos con limitada capacidad para llegar al tejido o al objetivo deseado.
- b) Inestabilidad en el ambiente biológico.
- c) Pérdida prematura en el metabolismo.

Actualmente ya se dispone en el mercado de medicamentos basados en nanopartículas, los cuales han sido aprobados por instancias como la “Food and Drug Administration” (FDA) en los EUA.

Enseguida se enumeran los principales tipos de nanopartículas con alto potencial para ser utilizadas en el acarreo de material genético al interior de las células.

1.3.1 Nanopartículas de cerámica (sílice).

Las nanopartículas de sílice porosa presentan numerosas características favorables para su utilización en esta aplicación. Se trata de materiales con una alta superficie específica y volumen de poros, con una mayor capacidad de almacenamiento que otros materiales. Además, es posible modificar sus propiedades superficiales fácilmente, de manera que pueden ser adaptadas para el transporte de moléculas de diversa naturaleza, tanto hidrófila como hidrófoba. La gran ventaja de los materiales porosos en general, y la sílice mesoporosa en particular, es que puede proporcionar una liberación controlada del fármaco previamente adsorbido en su estructura de poros ordenados e iguales.



1.3.2 Liposomas.

Los fosfolípidos forman espontáneamente membranas formadas por bicapas que pueden convertirse en vesículas. Estas vesículas se denominan *liposomas*. Los liposomas se forman espontáneamente cuando ciertas mezclas de fosfolípidos se dispersan en una fase acuosa.

Los liposomas son vesículas artificiales de fosfolípidos con un tamaño comprendido entre 50 y 500 nm que pueden ser cargados con un elevado número de fármacos hidrosolubles y, en algunos casos, también con fármacos liposolubles al colocarse éstos entre las cadenas fosfolipídicas. Durante más de 20 años los liposomas se han considerado como nanovehículos prometedores, por ser inertes, biocompatibles y prácticamente carentes de reacciones tóxicas y antigénicas, todo ello aunado a la protección que brindan a los principios activos ante el medio externo. El uso de los liposomas dirigidos, es decir, aquellos que se acumulan selectivamente en determinados órganos o tejidos, aumenta la eficacia del fármaco incluido en el liposoma y disminuye la captación de fármaco por parte del sistema reticuloendotelial.

Las formulaciones actuales que contienen liposomas inhiben su rápida eliminación biológica a través del control de su tamaño, de su carga e hidratación superficial. Los fármacos que han mejorado su seguridad y eficacia con los liposomas incluyen los agentes contra el cáncer, los antivirales, los antifúngicos⁸, los antibióticos, las vacunas y los agentes terapéuticos genéticos (Lian y Ho, 2001). La figura 7 esquematiza las etapas de internalización de fármacos al interior de una célula mediante nanosistemas.



⁸ Se entiende por antifúngico toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

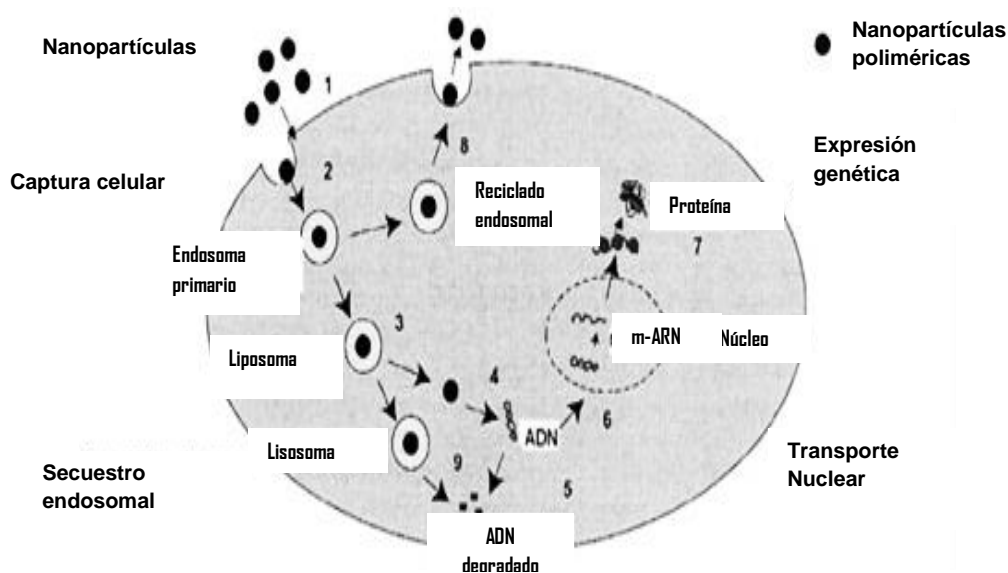


Figura 7. Representación esquemática de las etapas que tienen lugar durante el tráfico intracelular de fármacos incluidos en nanosistemas (Prokop, A. & Davidson, J.M. (2008)).

1.3.3 El concepto de tamaños ADN-nanovectores-células

El tamaño de una molécula de ADN de doble hélice se expresa en miles de pares de bases o kilobases (Kb). La longitud de 1kb es de 0.34 micras. Una



molécula de ADN de un milímetro de longitud estará formada de 3 mil kb o sea tres millones de bases. Sin embargo, el ADN se encuentra enrollado, de tal manera que los cromosomas, que pueden contener millones de pares de bases, tienen una longitud de unos pocos micrómetros.

En concordancia, una molécula de ADN terapéutica tendría unos cuantos miles de pares de bases, con una talla del orden de pocos nanómetros. La figura 8 muestra las dimensiones del ADN cromosómico, de los nanovectores y de una célula.

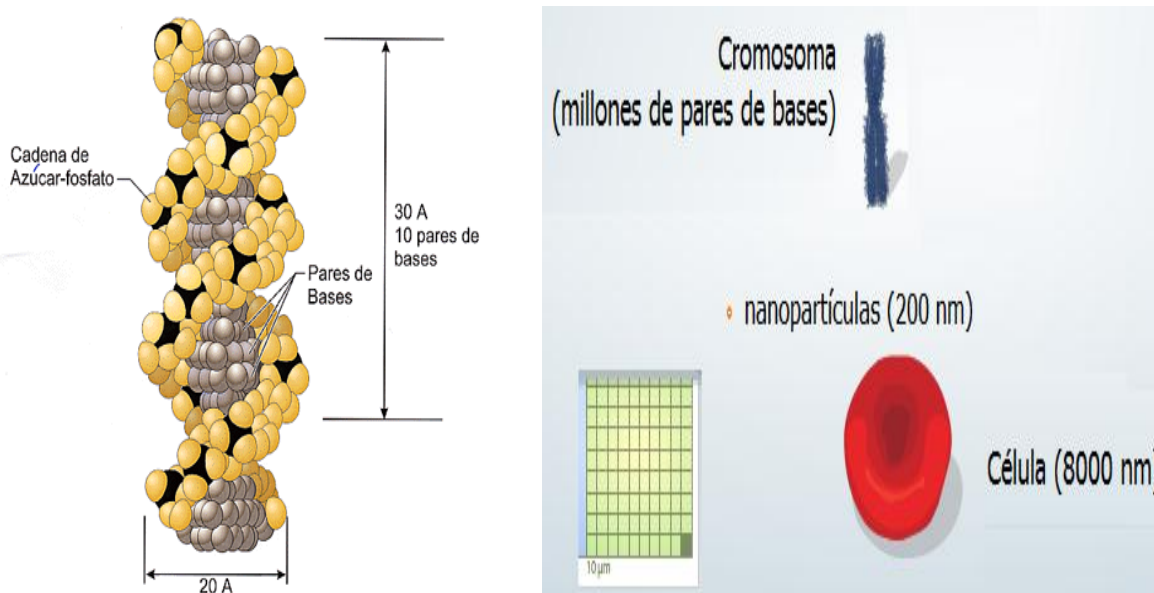


Figura 8. Diagrama que muestra las dimensiones de las nanopartículas, el ADN y una célula, del imagen adaptada del sitio web

[http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/scale/.](http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/scale/)

a) *Tamaño de las células*

En general, el tamaño de las células eucariotas oscila entre los 10 y 100 μm.



Células pequeñas ----- menos de 12 μm

Células medianas ----- entre 12 y 30 μm

Células grandes ----- más de 30 μm

Todas las células eucariotas, independientemente de la función que realicen tienen en común lo siguiente:

- La presencia de una membrana plasmática⁹ que delimita el contenido celular, del medio que la rodea.
- Una endomatriz fluida (citosol)⁹ compuesta por una solución de proteínas, electrolitos y carbohidratos.
- La presencia en la matriz citoplasmática⁹ de estructuras proteicas filamentosas (microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios), que constituyen el citoesqueleto.

b) La importancia de las características estructurales de un nanovector para uso farmacéutico (biocompatibilidad, carga, tamaño).

Los nanosistemas (liposomas y nanopartículas) encuadran dentro del campo que constituye lo que actualmente se conoce con el nombre de nanotecnología farmacéutica. Con ellos es posible conseguir las siguientes características:

- i. Proteger al material genético de su degradación.
- ii. Obtener partículas de tamaño nanométrico.
- iii. Obtener compatibilidad biológica.
- iv. Lograr la inserción en células y la incorporación del principio activo.



- v. Combinar con métodos físicos ya propuestos.
- vi. Posibilitar la liberación del material genético en función de determinadas características fisiológicas o patológicas como pH y temperatura.

⁹ La membrana plasmática participa en todos los procesos de intercambio celular entre el interior y el entorno de la célula. La endomatrix fluida es la sede de muchos de los procesos metabólicos que se dan en las células. La función de la matriz citoplasmática es albergar los orgánulos celulares y contribuir al movimiento de estos.

1.4 Terapia génica

La terapia génica se puede definir como el proceso por el cual se inserta material genético en una célula, con el fin de corregir la expresión de genes involucrados en un padecimiento. Las utilidades van desde curar enfermedades causadas por un solo gen defectuoso, también llamadas enfermedades mendelianas, hasta modificar el equilibrio del sistema inmune (responsable de controlar infecciones, pero también de alergias y autoinmunidad), o controlar crecimiento tumoral. En esencia, su objetivo es el de introducir una copia correcta de un gen defectuoso o ausente en un organismo para que tenga implicaciones fenotípicas, o bien de silenciar genes cuya expresión resulte excesiva y dañina, a través de material nucleico regulador (Kim & Kim, 2009). En los últimos años, otro de los blancos de la terapia génica es la inducción de señales que permitan diferenciar de manera selecta a una célula madre.

La manera más eficaz de introducir un gen terapéutico en una célula humana es empleando un virus, el cual utiliza la maquinaria de una célula humana para reproducir su información genética. Hasta ahora, todos los tratamientos de terapia



génica que se han llevado a cabo, se basan en insertar el gen terapéutico en el genoma de un virus (el cual ha sido modificado para evitar, en principio, procesos dañinos). En consecuencia, una célula infectada con el virus producirá las proteínas codificadas en la información genética del mismo, liberando la molécula terapéutica. No obstante, el uso de virus como acarreadores de material genético es difícil de controlar por completo. Todos los tipos de virus que han sido explorados para acarrear material genético en células humanas han producido efectos colaterales que van desde su rápida destrucción (ocasionando la pérdida del material terapéutico), hasta la muerte del paciente, asociada con leucemia o por reacción inmunológica.

Debido a los efectos colaterales mencionados, la terapia génica por medio de virus ha sido autorizada únicamente para el tratamiento de enfermedades terminales (Flotte, 2007). No obstante, el potencial terapéutico de la modificación de genes en el humano es enorme. De acuerdo con múltiples estudios, la terapia génica es capaz de solucionar problemas relacionados con las enfermedades más emergentes, tales como cáncer, Alzheimer, Parkinson y padecimientos cardiovasculares diversos. En la figura 9 se muestran las principales enfermedades para las cuales se exploran tratamientos mediante terapia génica.

A fin de evitar el riesgo asociado con el uso de virus para introducir material genético en una célula, actualmente se encuentran en estudio otras estrategias basadas en la ciencia de los materiales. Por un lado, se estudian métodos físicos que induzcan un aumento en la permeabilidad de la membrana celular. En este aspecto sobresalen el uso de dos fenómenos: la aplicación de un campo eléctrico en el tejido a tratar (electroporación) (Mir, 2009), y la exposición a ondas de choque o a ultrasonido (cavitación acústica) (Liang et al, 2010; Loske et al. 2011).

Por otro lado, mediante el diseño de materiales, se ha buscado mimetizar la capacidad de los virus de introducirse dentro de una célula; es decir de actuar



como acarreadores de ácidos nucleicos. En la figura 10 se esquematizan las estrategias asociadas con el uso de distintos vectores para transferir material genético. Como puede observarse, actualmente los virus son los principales vectores investigados.

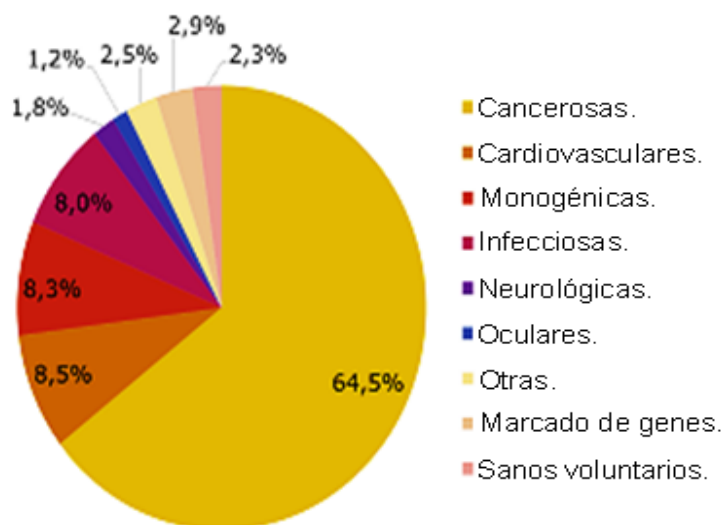


Figura 9. Los estudios de terapia génica en fase clínica se enfocan en el tratamiento de diversas enfermedades. En esta gráfica se muestra el porcentaje de estudios clínicos enfocados a distintos padecimientos. Figura adaptada del sitio <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.

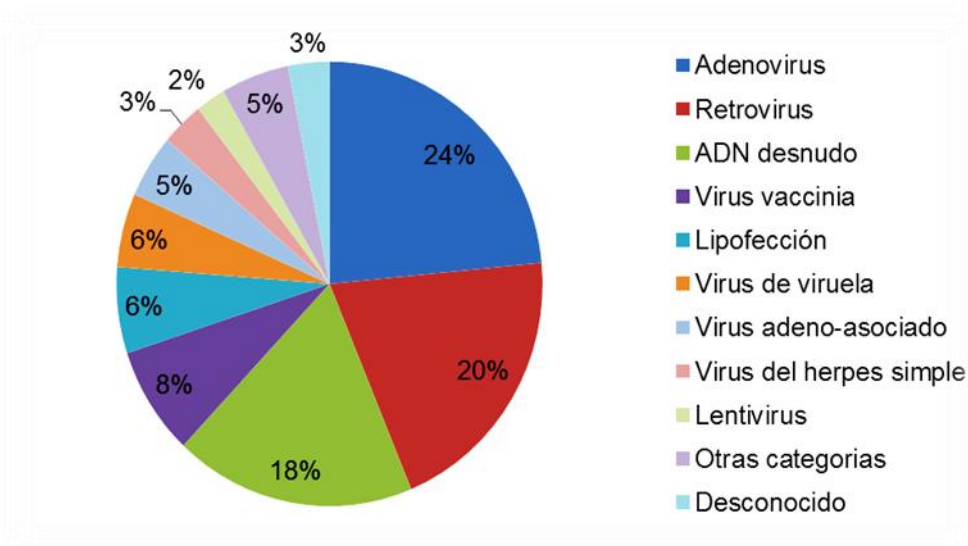


Figura 10. Se esquematizan las estrategias asociadas con el uso de distintos vectores para transferir material genético. Figura adaptada del sitio <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.

1.4.1 Características de los ácidos nucleicos

Químicamente, el ADN está constituido por cadenas de nucleótidos, siendo estos las unidades esenciales del ADN. Un nucleótido consta de un ácido fosfórico, una pentosa (azúcar de 5 átomos de C) y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas son de tipo purinas (Adenina y Guanina) y pirimidinas (Citosina y Timina). Cuando los nucleótidos de ambas cadenas se alinean, se agrupan las bases nitrogenadas formando complementos o pares de bases nitrogenadas complementarias, es decir, la adenina se une con la timina, la citosina con la guanina, por medio de enlaces de hidrógeno, entre el par A - T hay 2 puentes de hidrógeno y entre el par C - G hay 3 puentes: por poseer un puente hidrógeno más, el par C - G le da la forma helicoidal del ADN y su estabilidad. La figura 11 muestra la estructura molecular del ADN.

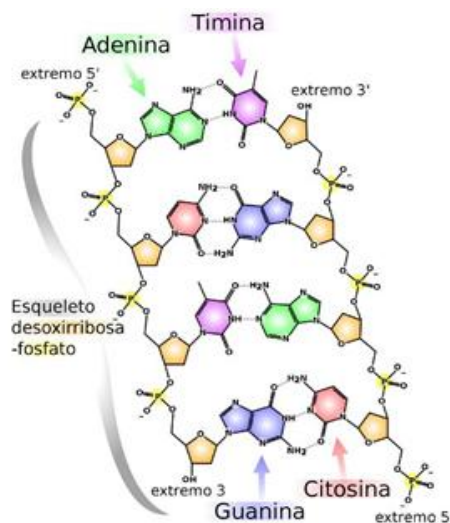
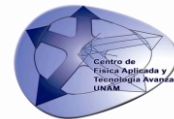


Figura 11. Estructura molecular del ADN. Figura adaptada del sitio (<http://www.google.com.mx/search?q=estructura+del+ADN&hl=es&biw=1280&bih=685&prmd=ivns&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=DoE5Tsr0JIWCsgKO59X4Dw&ved=0CEoQsAQ>)

A pesar de que el ADN se encuentra en el núcleo celular, existen moléculas de ADN de tipo procarionta en las mitocondrias y cloroplastos, sin embargo, en las células procariontas hay también pequeñas moléculas circulares de ADN extracromosómico llamados plásmidos, los cuales se pueden producir y manejar con facilidad. Los plásmidos, también llamados vectores, son moléculas de ADN circular o lineal, que se replican y transcriben de manera independiente del ADN cromosómico; están presentes normalmente en bacterias. Gracias a procedimientos comunes de ingeniería genética es posible reproducir un gen bien definido utilizando un plásmido bacteriano. Las moléculas de ADN plasmídico, adoptan una conformación tipo doble hélice al igual que el ADN de los cromosomas, aunque, por definición, se encuentran fuera de los mismos.

1.5 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)



La microscopía electrónica es una poderosa herramienta que permite la caracterización de materiales utilizando para ello un haz de electrones de alta energía que interactúa con la muestra que a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. Puede mostrar desde la forma de un cristal hasta el ordenamiento de los átomos en una muestra. Nos permite observar y fotografiar zonas de la muestra, desde 10 hasta 1 000 000 aumentos, con una resolución espacial de 5 nm. El poder resolutivo de un microscopio es la capacidad de poder distinguir dos puntos muy próximos entre sí, o el máximo número de líneas que aparecen a la observación separadas entre sí en la unidad de superficie. La resolución del ojo humano es 0.1 mm. Los microscopios aumentan una imagen hasta la resolución visual humana. El diámetro de la imagen aumentada puede ser determinado mediante:

$$d = \frac{K \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad \text{Ec. Abbe}$$

donde:

K es la constante del medio de la lente

n es el índice de refracción del espacio lente-objeto

α es el semiángulo de incidencia

Al aumentar una imagen no se aumenta el poder resolutivo, la imagen se ve más borrosa. El aumento máximo útil es aquel en el que los objetos se separan por la distancia límite de resolución del ojo humano (0.1 mm).

$$Au = \frac{0.1 \text{ mm}}{d}$$

En la figura 12, se muestra el esquema del microscopio electrónico de transmisión utilizado para la obtención de imágenes en este trabajo.

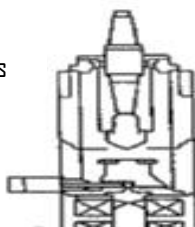




Figura 12. Microscopio electrónico de transmisión marca JOEL, JEM-1010 Electron Microscope, ORIUS CCD camera controller (<http://enclasesdefisica.blogspot.mx/>).

1.6 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución (con número de onda de 80 a 3500 cm^{-1}) que se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar.

La mayor parte de la luz dispersada muestra la misma frecuencia que la luz incidente, pero una fracción muy pequeña muestra un cambio en frecuencia, debido a la interacción de la luz con la materia.

R. Caballero González, robert_itg@yahoo.com.mx, PCEIM, Junio 2013

Dispersión Rayleigh: Es una dispersión elástica, donde el fotón emitido tiene la misma longitud de onda que el fotón



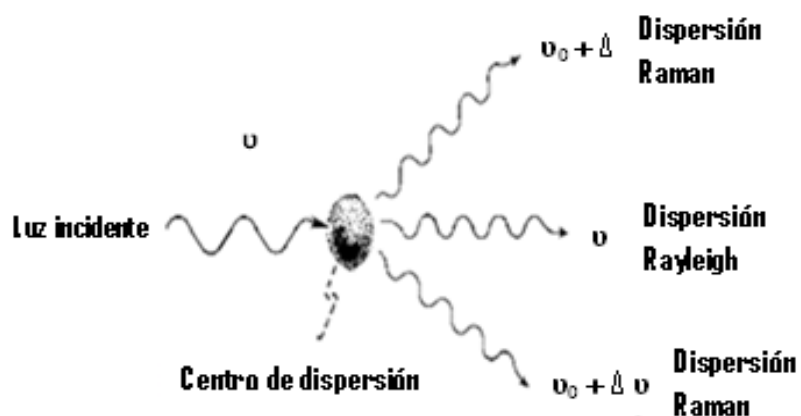
Tipos de
Dispersión

Dispersión Raman: Es una dispersión inelástica. Aquí hay un cambio en la frecuencia entre el fotón incidente y el emitido. En este cambio o desplazamiento puede ocurrir de dos formas:

Dispersión Stokes, que es cuando el fotón le cede energía a la molécula, por tanto la radiación dispersada es menor que la radiación incidente.

Dispersión anti-Stokes, que es caso contrario donde el fotón toma energía de la molécula.

La figura 13 muestra un rayo que incide en una molécula y las tres dispersiones posibles.



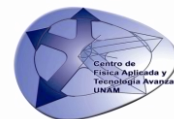


Figura 13. Dispersiones posibles que puede presentar una molécula al incidir un rayo sobre ella.

Un sistema de espectroscopia Raman consiste típicamente de las siguientes partes:

- ✓ Fuente de radiación (láser).
- ✓ Dispositivo colector, detector.
- ✓ Espectrógrafo.

La información que podemos obtener de un espectro Raman es referente a la estructura de la molécula estudiada (modos vibracionales), en otras palabras, la diferencia de frecuencia (energía) es característica para cada modo vibracional y esto nos habla de los enlaces de la molécula. La figura 14 muestra las líneas Stokes, que es lo que mide la espectroscopia Raman.

Esta espectroscopia tiene muchas ventajas, entre ellas, se puede utilizar para analizar soluciones acuosas debido a la débil respuesta del agua. Casi nunca requiere la preparación de muestras, además de que estas pueden encontrarse en diferentes formas (cristales, polvos, filamentos de polímeros, muestras líquidas, soluciones). También ha resultado un método muy útil en el análisis de sistemas biológicos. La técnica es no destructiva y el análisis se realiza en tiempos cortos.

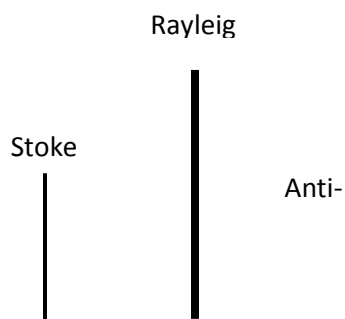




Figura 14. La línea anti-Stokes es mucho menos intensa que la línea Stokes porque a temperaturas normales la población en el estado basal es mayor que en uno de mayor energía (distribución de Boltzmann), entonces las transiciones anti-Stokes tiene menor probabilidad de ocurrir. En la espectroscopia de Raman normalmente sólo se mide la línea Stokes.

1.7 Microscopía de epifluorescencia

Es la propiedad que tienen ciertos elementos químicos denominados fluoróforos o fluorocromos de emitir luz visible cuando sobre ellos incide una radiación intensa; en otras palabras, adsorben una luz de una longitud de onda determinada (por ejemplo luz ultravioleta o luz monocromática azul) y luego emiten otra luz de una mayor longitud de onda (de un determinado color, verde, rojo, amarillo).

La condición esencial para que se produzca fluorescencia es que la longitud de onda de la energía radiante excitatoria sea menor que la longitud de onda emitida. La figura 15 muestra el esquema de la fluorescencia.

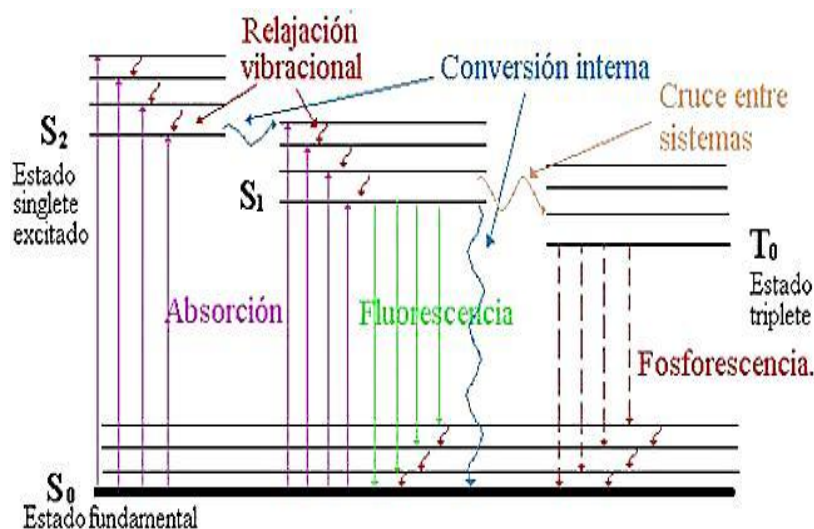


Figura 15. La fluorescencia (como también la fosforescencia) es la capacidad de un material de emitir la energía absorbida en forma de luz.

Principio de funcionamiento.

Se necesita una intensa fuente de luz para excitar la fluorescencia en el todo el espectro, los rayos emitidos se hacen pasar por filtros de excitación, los cuales solo permiten el paso de luz de una determinada longitud de onda, la del rango y color necesario para excitar al fluorocromo y bloquean las longitudes de onda no deseadas parte del espectro para excitar el espécimen. Una vez filtrada, la luz incide sobre la muestra por reflexión de un espejo dicroico (epi-iluminación). La muestra se excita con la luz que le llega y emite un espectro superior al de la

excitación, nuevamente el espejo dicroico transmite la emisión del espécimen el cual pasa por el filtro de barrera el cual hace una selección exacta del espectro de emisión que nos interesa.



La figura 16 muestra los elementos de un microscopio de epifluorescencia (http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf).

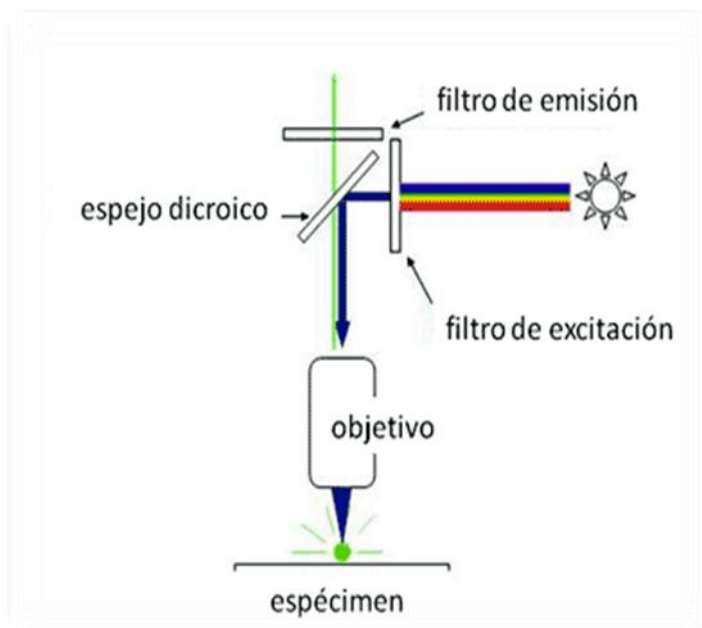


Figura 16. Esquema básico de la iluminación en el microscopio de fluorescencia epifluorescencia.

Para obtener una intensidad de la señal óptima se debe emplear una apertura numérica elevada y el menor aumento posible. La tabla 1 muestra las longitudes de onda de excitación y emisión de algunos marcadores fluorescentes (costa J. 2004 (109)).

Tabla 1 Longitudes de ondas de algunos marcadores fluorescentes.

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Fluoresceína	500	520



CFP	433/455	475/501
Naranja de Acridina	490	530/640
Calceína	495	520
Rodamina	500	540
Verde de Calcio	506	526
Azul de Evans	550	625

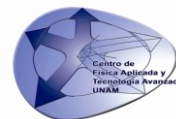
1.8 Dispersión de Luz

La dispersión de luz dinámica (DLD, del inglés *dynamic light scattering*) conocida también como espectroscopia de correlación de fotones (ECF) y dispersión de luz casi elástica (DLCE), es una técnica muy eficaz para sondear la dinámica de soluciones y para medir tamaños de partícula.

Esta técnica consiste en obtener la función de correlación en el tiempo de la luz dispersada. Es una herramienta muy útil en el estudio del movimiento traslacional de partículas esféricas en suspensión. Esta técnica permite la obtención de información sobre el tamaño de partículas con diámetros que van desde algunos nanómetros hasta casi 5 micrómetros.

El tamaño de la partícula es obtenido mediante el coeficiente de difusión traslacional y la información de la forma de la partícula. Para partículas no esféricas, el diámetro obtenido es el de una esfera hipotética que tendría el mismo coeficiente de difusión traslacional. Los equipos de dispersión de luz, como se muestra en la figura 17, constan de una fuente láser, una celda para la muestra, un fotodetector y el equipo para el análisis con un autocorrelador.

La celda utilizada para este tipo de ensayos tiene forma cilíndrica, está rodeada por un líquido y se mantiene a una temperatura constante. El índice de



refracción de este líquido es comparado con el del medio de suspensión. Para un mejor análisis, la muestra debe estar bien dispersada en el medio, lo cual se consigue mediante una agitación suave o con agitación ultrasónica. Sin embargo, el exceso de agitación puede generar aglutinamientos de algunos materiales o fractura de partículas.

El equipo consta de:

- 1.- Una fuente de luz láser de Helio-Neón emitiendo en 632.8 nm.
- 2.- Un goniómetro controlado por una computadora para fijar en ángulo de dispersión.
- 3.- Un sistema óptico de enfoque para concentrar la luz incidente en la muestra.
- 4.- Un porta muestras control de temperatura y solvente.
- 5.- Un sistema óptico para colectar la luz dispersada.
- 6.- Un sistema de detección de alta sensibilidad para contar fotones.
- 7.- Un sistema electrónico para preamplificar-amplificar la señal.
- 8.- Un correlador digital para correlacionar la señal proveniente de cada fotón.

El equipo se encuentra conectado a un sistema de cómputo para analizar las funciones de correlación obtenidas.

Lente

Celda de muestra

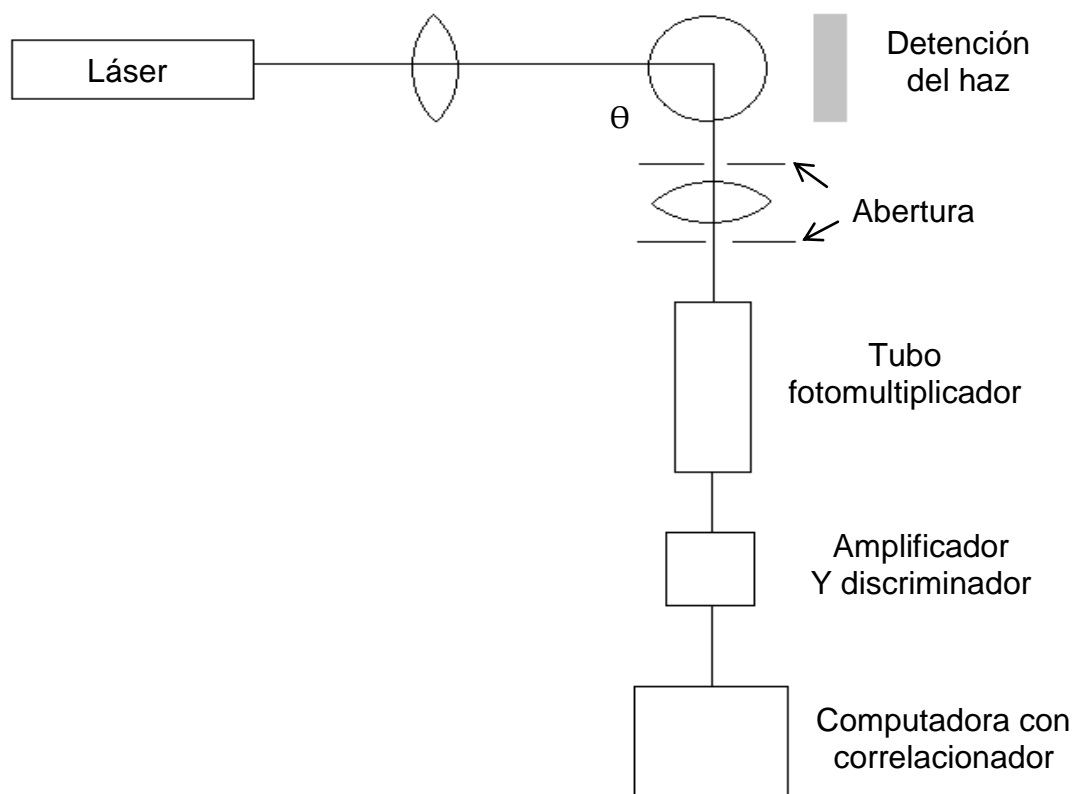


Figura 17. Esquema del equipo de dispersión de luz dinámica (DLD).

1.9 Cromatografía

Es un método de separación de sustancias basado en el retardo de las mismas durante su paso por una matriz adsorbente, lo que implica la presencia de una fase móvil y una estacionaria. Es posible que el reparto se deba a disolución, adsorción, absorción, intercambio de iones o a propiedades de exclusión por tamaño de una de las fases.

Esta técnica permite realizar la separación de muestras en pequeña escala e identificar sustancias orgánicas e inorgánicas tales como: aminoácidos, péptidos,



proteínas, carbohidratos, esteroides, hormonas esteroideas, ácidos grasos, liposomas.

1.9.1 Tipos de cromatografía

Existen diferentes técnicas cromatográficas que se pueden clasificar en seis tipos, de acuerdo al principio fisicoquímico por el cual actúan.

1. De reparto:
 - Sobre papel (ascendente, descendente, bidimensional)
 - En capa fina
 - Por adsorción selectiva
2. De intercambio iónico
3. De afinidad
4. De gas-líquido
5. HPLC
6. De exclusión molecular

En el presente trabajo se utilizó la cromatografía de exclusión molecular, para realizar la separación de las macromoléculas de acuerdo con su tamaño.

1.9.2 Cromatografía de exclusión molecular

Esta técnica también es llamada filtración en gel y permite separar moléculas de acuerdo a su tamaño. Las de menor tamaño se retienen al pasar por el gel, ya que éste forma porosidades por las que pueden penetrar, las de mayor tamaño no entran y son excluidas, por lo que su velocidad de paso no se ve retardada (figura 18).

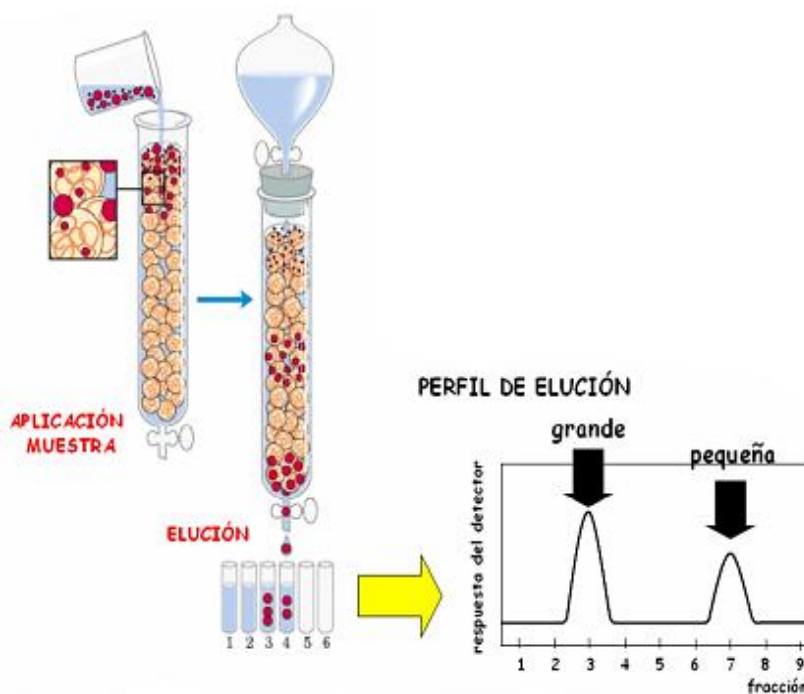
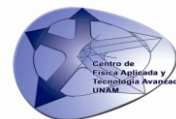


Figura 18. Esquema del mecanismo de separación en la cromatografía de exclusión molecular.

Algunos tipos de Sephadex son:

Sephadex	Límite de exclusión (peso molecular)	Límite de separación (peso molecular)
G – 25	5 000	100 – 5 000
G – 50	10 000	500 – 10 000
G – 75	50 000	1 000 – 50 000
G – 100	100 000	5 000 – 150 000
G - 200	200 000	5 000 – 200 000

En particular, en este trabajo se empleó la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25, para separar liposomas y el material no encapsulado durante su preparación (calceína).



OBJETIVOS

Los objetivos planteados para la realización del presente trabajo son:

Objetivo general.

Diseñar y preparar nanopartículas para encapsular macromoléculas hidrofílicas y liberarlas en células humanas.

Objetivos particulares.

1. Sintetizar nanopartículas de sílice por el método de Sol-Gel.
2. Preparar liposomas unilaminares.
3. Preparar nanopartículas de sílice recubiertas con lípidos anfipáticos (nanovectores híbridos).
4. Encapsular una macromolécula fluorescente en los nanovectores híbridos.
5. Caracterización físico-química de los nanovectores híbridos.



JUSTIFICACIÓN

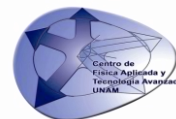
La introducción de genes terapéuticos en células humanas tiene un gran potencial para el tratamiento de muchas enfermedades como: cáncer, problemas circulatorios, desórdenes inmunológicos, etc. Entre los métodos para introducir sustancias dentro de una célula también se encuentran tecnologías físicas, actualmente en estudio dentro del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada. En particular, la cavitación acústica (ondas de choque), la cual produciría permeabilización de las células para, de esta manera, introducir genes.

Sin embargo, se ha reportado muy baja eficacia cuando la molécula que se introduce mediante ondas de choque es un plásmido (Armenta 2005), lo cual puede estar relacionado con una repulsión entre la carga negativa del material genético y la superficie celular, así como por la ruptura del plásmido por efectos de la cavitación acústica.

Por lo anterior, resulta de gran interés diseñar una nanopartícula que, por un lado, pueda ser internalizada fácilmente dentro de la célula y, por otro lado, disminuya la posible degradación del material encapsulado al utilizar las ondas de choque.

En este proyecto se propone aprovechar las características de ciertos materiales en sistemas diseñados para la liberación de fármacos y, en particular, de material genético. Específicamente:

Las nanopartículas de sílice, que son biocompatibles y fáciles de producir. Existen metodologías bien definidas para controlar su tamaño y su porosidad; son uniformes y la encapsulación de biomoléculas es fácilmente realizada por simple adsorción, sin su degradación. A fin de modelar la entrega de una macromolécula



hidrofílica, como el DNA, en células humanas se propone el uso de dextrano de 10 kDa acoplado a isotiocianato de fluoresceína.

- Los liposomas (nanopartículas formadas por bicapas de fosfolípidos) tienen una toxicidad muy baja, son fáciles de producir y no inducen una respuesta inmune fuerte.
- Si un liposoma se encuentra recubriendo una nanopartícula, el resultado es un vector más estable con menor fuga del material encapsulado, con respecto a los liposomas comunes y con buena biocompatibilidad.
- La introducción de una carga superficial positiva en un nanovector favorece su introducción en la célula.



ANTECEDENTES

Entre los vectores para acarreo de fármacos y material genético se encuentran diversos tipos de nanopartículas, que incluyen: nanopartículas poliméricas, nanopartículas cerámicas, micelas poliméricas, dendrímeros, nanotubos de carbono, y liposomas.

En los últimos años se han reportado algunos trabajos en los que se han desarrollado métodos de obtención de vectores acarreadores de fármacos, formados por nanopartículas de cerámica y liposomas específicamente con el fin de lograr la obtención de un vector más estable y con mejores propiedades de entrega de material. Este material, compuesto de material orgánico e inorgánico, está recubierto de una capa que mimetiza la membrana celular. De acuerdo con algunos autores la endocitosis de este tipo de vector es viable, debido a dicha estructura, por lo cual la eficiencia en la entrega del material genético es eficiente y la duración del mismo dentro de la célula es prolongada (Crispin & Dass, 2006; Gao et al, 2007).

A pesar de los múltiples trabajos que apoyan el uso de liposomas estabilizados para acarreo de fármacos, varios estudios han indicado también que, dependiendo del contenido en lípidos catiónicos sintéticos, los cuales promueven la internalización en células, el uso de estos vectores para aplicaciones sistémicas estaría asociado con una alta toxicidad (Xiang 2007).

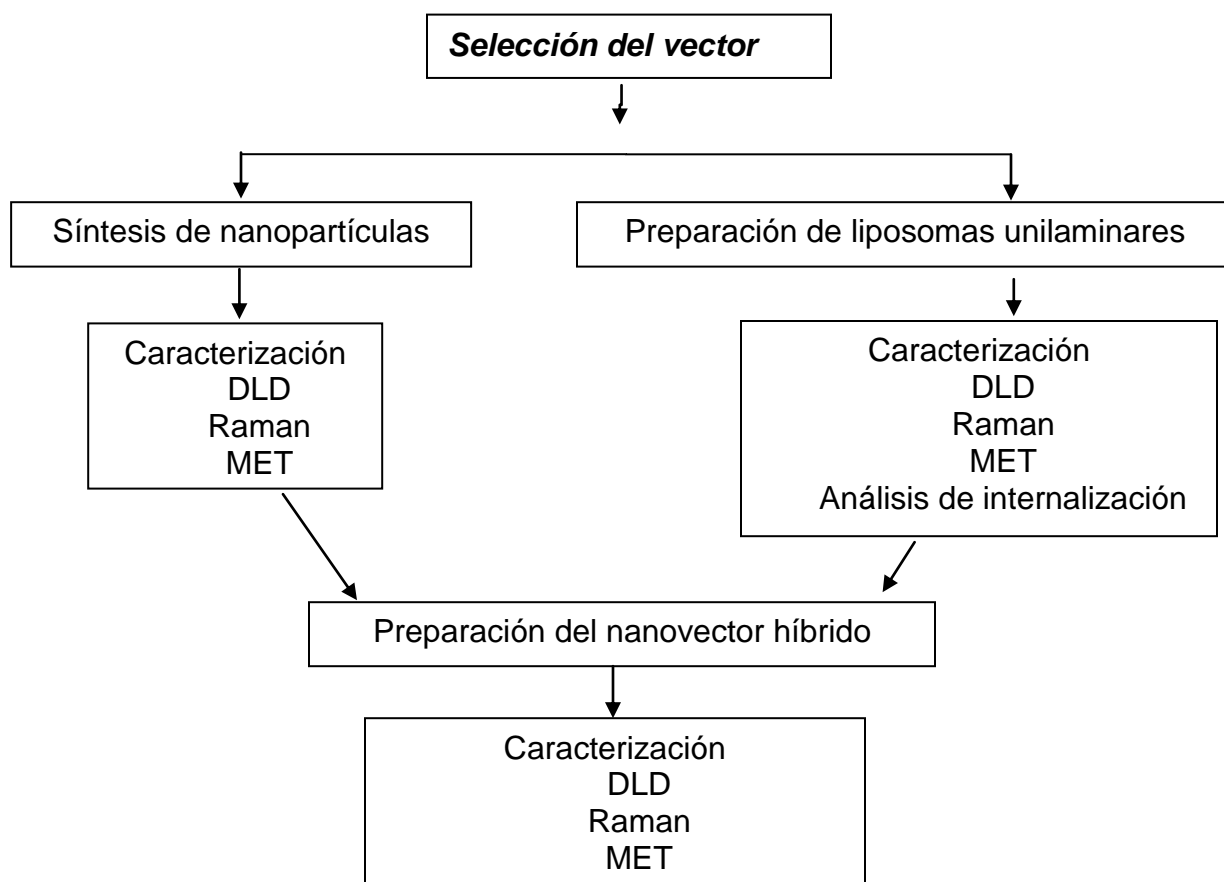
Este proyecto tiene por objetivo el desarrollo de vectores híbridos basados en nanopartículas cerámicas con recubrimiento de liposomas, para su posterior estudio como vectores para entrega de material en células humanas, auxiliado por un método físico para permeabilización de membranas. Para ello, se desarrolló la



metodología para sintetizar las partículas híbridas, y se montaron las técnicas de caracterización adecuadas para análisis de su tamaño, composición y estabilidad.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL

Para este trabajo se incluyen: síntesis de nanopartículas de sílice por el método de sol-gel, autoensamblaje molecular de lípidos anfipáticos, cromatografía de exclusión molecular, microscopía electrónica de transmisión, espectroscopia Raman, microscopía de epifluorescencia y análisis de dispersión de luz. Enseguida se representa un diagrama de flujo con las etapas de este trabajo.





Se trata de la preparación de un nanovector híbrido, hecho con un material inorgánico (sílice porosa) y otro orgánico (fosfolípidos), que busca mejorar la eficiencia de encapsulamiento y la entrega de material nucleico en la célula.

Capítulo II

Material y métodos

2.1 Reactivos

Los fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-3-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (dipalmitoil fosfatidiletanolamina o DPPE), 1,3-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina (dioleil fosfatidilcolina o DOPC) y el colesterol, así como el dextrano fluoresceinado de 10 kDa y la fase cromatográfica Sephadex G-25 fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). El lípido catiónico 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) fue suministrado por Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, EUA). Se utilizaron solventes orgánicos grado R.A. (Baker, EUA), los cuales fueron destilados inmediatamente antes de su uso. En la Figura 19 se esquematizan las estructuras de los lípidos anfipáticos utilizados.

2.2 Preparación de liposomas unilaminares grandes

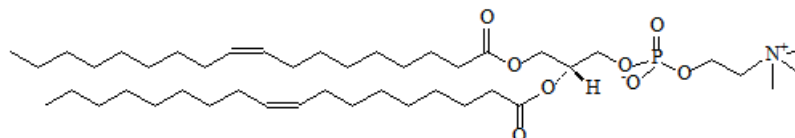
Los lípidos fueron colocados dentro de un vial de vidrio de 20 ml, en una cantidad suficiente para preparar una suspensión de 5 mg/ml de lípidos totales, para obtener 4 ml de volumen final, es decir con una cantidad total de lípidos de 20 mg. Cada lípido fue pesado o tomado a partir de una solución madre, de acuerdo con las cantidades de cada formulación. Las soluciones de lípidos fueron hechas en una mezcla de cloroformo/metanol (9:1, vol/vol). Los lípidos fueron mezclados en el vial de 20 ml, secados en atmósfera de nitrógeno y conservados



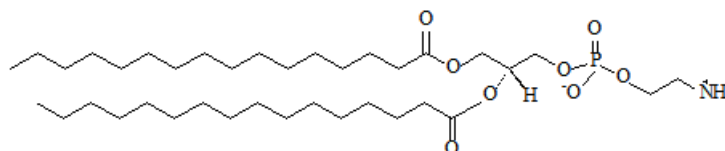
a -20°C . Para la preparación de liposomas, los viales fueron llevados a temperatura ambiente y rehidratados con solución tampón de fosfatos, pH 7.4,

0.01 M (PBS 1X, del inglés *phosphate buffered saline*, la cual se encuentra a una concentración de sales iso-osmótica con respecto a las células humanas).

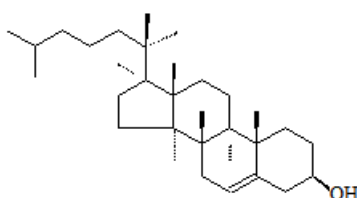
Dioleil fosfatidilcolina
1,3-dioleil-sn-glicero-3-fosfolina
PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))



Dipalmitoil fosfatidiletanolamina
1,2-dipalmitoil-3-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PE(16:0/16:0)



Colesterol



DOTAP

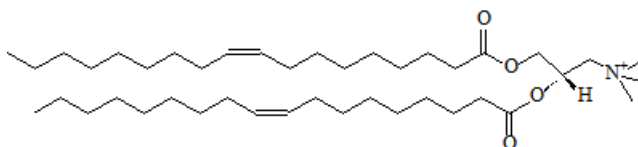


Figura 19. Estructura de los lípidos anfipáticos utilizados para la preparación de liposomas unilaminares. Sobre cada estructura se indica el nombre científico o común correspondiente.



La muestra fue llevada a 55° en baño María por 3 minutos y agitada en vórtex durante 1 minuto. Al término del proceso, se obtuvo una suspensión de lípidos opaca, la cual fue filtrada utilizando membranas de 450, 220 y 100 nm (tres veces por cada una). Los liposomas obtenidos fueron conservados en atmósfera inerte a 4°C.

2.3 Encapsulación de dextrano fluoresceinado en liposomas

Se utilizó dextrano acoplado a isotiocianato de fluoresceína de 10,000 Da como modelo para encapsular y liberar moléculas que no atraviesan membranas celulares (incluyendo ácidos nucleicos). La encapsulación de dextrano se realizó incorporando dextrano 200 μ M en la solución tampón de PBS para la rehidratación de los lípidos. El dextrano no encapsulado se eliminó mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando Sephadex G25 como fase estacionaria, y PBS 1 X como eluyente. Los liposomas con el fluorocromo encapsulado fueron recuperados al coleccionar los eluatos de color naranja. El dextrano no encapsulado fue eluido con mayor retardo, debido a su menor talla molecular (figura 20).



Figura 20. Eliminación de dextrano de 10 kDa no encapsulado en los liposomas.

2.4 Preparación de nanopartículas de sílice

La tabla 2 muestra los reactivos correspondientes, así como las cantidades utilizadas en el presente trabajo para la preparación de nanopartículas de sílice.

Tabla 2 Reactivos utilizados en el proceso sol-gel.

Reactivos	Cantidad
Etanol	125 ml
Hidróxido de amonio (NH_4OH)	8 ml
Agua desionizada	8 ml
Tetra etil- <i>ortho</i> -silicato (TEOS)	3 ml

- Se tomaron 4 matraces y se colocaron cada uno en plato caliente, a los cuales se agregó 2 ml de NH_4OH , 2ml de agua desionizada y 25 ml de etanol. Las mezclas fueron cubiertas y sometidas a agitación constante.
- En un vaso de precipitado se preparó una mezcla con 25ml de etanol y 3 ml de TEOS, agitando hasta obtener una mezcla homogénea.



- c) Por último, se vertió la segunda mezcla en la primera, dejando entre cada una de ellas un tiempo aproximado de 5 minutos entre cada adición.

Una vez comenzada la polimerización, las partículas de sílice comienzan a ser visibles, generándose una solución turbia (blanquizca) u opaca. La solución obtenida se deja secar durante 1 día y medio para obtener la sílice en polvo. Para promover la adsorción de lípidos anfipáticos sobre la superficie de las nanopartículas, la muestra fue tratada de acuerdo con el método reportado por (Liu y colaboradores, 2009). Brevemente, las nanopartículas fueron sonicadas en

baño durante 30 minutos, a fin de eliminar residuos de síntesis, y sometidas a los siguientes tratamientos:

- a) Dos lavados con 20 ml de una solución de HCl 1% en etanol (vol/vol),
- b) Dos lavados con agua desionizada,
- c) Incubación por 10 min con 4% de hidróxido de amonio y 4% de peróxido de hidrógeno a 80°,
- d) Un lavado con agua desionizada,
- e) Incubación con HCl 0.4 M y 4% de peróxido de hidrógeno a 80° por 10 minutos,
- f) Un lavado con agua desionizada.

2.5 Preparación del nanovector híbrido

Se preparó una mezcla de suspensiones de sílice y de liposomas unilaminares y se incubó a 4°C en agitación ocasional durante 20 minutos. Las proporciones utilizadas fueron un volumen de sílice (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + un volumen de suspensión de liposomas (2.5 mg lípidos/ml). Al final de la incubación, los lípidos no adsorbidos sobre las nanopartículas fueron eliminados por centrifugaciones a 14,000 rpm



(3X), descartando el sobrenadante después de cada lavado. La muestra resultante fue conservada a 4°C en atmósfera inerte.

2.6 Análisis de dispersión de luz dinámica (DLD)

Las suspensiones de liposomas o de nanopartículas fueron diluidas en agua desionizada, previamente filtrada a través de membranas de policarbonato de 0.22 μm de poro, a una dilución de 100 μl de suspensión en 10 ml de agua. Las muestras fueron colocadas en viales de vidrio, y analizadas en un dispersor de luz Brookhaven, modelo B1-200SM (Brookhaven Instruments Co., Holtsville, New

York, EUA), equipado con una fuente láser de 633 nm. Los resultados de diámetro hidrodinámico fueron obtenidos mediante el método de Contin y de mínimos cuadrados no negativos (NNLS), utilizando el programa del equipo.

2.7 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Una muestra de liposomas diluida (1:1000 o 1:3000) fue depositada en rejillas de cobre filmadas con Formvar/carbono, malla 200. Se utilizó acetato de uranilo al 2% como agente de tinción. Para ello, las rejillas fueron incubadas en la solución de acetato de uranilo a 80°C durante 10 min dentro de placas de Mazzini, y lavadas con agua desionizada. Finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio JEM-1010 (Jeol Co., Peabody, MA, USA).

2.8 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman fue realizada en un espectrómetro Raman dispersivo Senterra (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania), acoplado a un microscopio



Olympus BX. Se utilizó una fuente láser de 632.8 nm. Las muestras fueron depositadas en un porta-muestras sin ningún tratamiento previo.

2.9 Análisis de internalización de fluorocromo en células humanas

Se utilizó una línea de células inmortalizadas (auto-replicables) derivadas de riñón de embrión humano (HEK 293). Las células fueron manipuladas en condiciones estériles, y cultivadas a 37°C, 5% CO₂, en medio de cultivo celular

Eagle modificado según Dulbecco (DMEM, Life Technologies Co., Grand Island, New York, EUA), suplementado con suero fetal bovino al 10% (vol/vol) y 100 U/ml

de penicilina-estreptomina (Gibco, Carlsbad, California, EUA). Las células (180,000) fueron propagadas en cajas de cultivo estériles de 35 mm de diámetro (Nunc-Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca), por un periodo de 24 hs. Al final del periodo, se obtuvo una monocapa de células adherentes con un 80% de confluencia o saturación. La preparación de liposomas con fluorocromo fue agregada al cultivo (500 µl en 4 ml de medio DMEM) e incubada por 20 minutos. Al cabo de este lapso, el medio fue aspirado. Se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X), y se agregaron 5 ml de metanol a -10°C para fijar la muestra. Las células fijadas sobre la caja de cultivo fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus, BX2 (Olympus America Inc., Mellville, New York, EUA).



CAPITULO III

Resultados y Discusión

3.1 Autoensamblaje de lípidos anfipáticos para preparación de liposomas

Las mezclas de lípidos anfipáticos fueron evaluadas para la preparación de liposomas unilaminares grandes. El método utilizado para su preparación fue el de rehidratación, en el cual los lípidos son mezclados en solventes orgánicos, los cuales son eliminados por evaporación en atmósfera inerte, e inmersos en solución acuosa a 50°C, en donde el autoensamblaje en bicapas de lípidos es auxiliado mediante varios pasajes a través de una aguja calibre 22.

Las mezclas evaluadas incluyeron los lípidos zwitteriónicos fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, los cuales fueron seleccionados con 2 residuos de ácido palmítico y 2 residuos de ácido oleico, respectivamente. De esta manera, con el uso de fosfolípidos de un subtipo específico, es decir dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) y di-oleilfosfatidilcolina (DOPC), el porcentaje molar de cadenas insaturadas y saturadas pudo ser controlado con precisión.

Por otro lado, se utilizó también un 30-36% de colesterol para aumentar la estabilidad de membranas modelo (Mercadal et al, 1995). Finalmente, algunas de las preparaciones incluyeron un porcentaje del 27% del lípido catiónico sintético 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP). En la figura 20 de la sección anterior se muestran las estructuras de los componentes utilizados.



La preparación de distintas formulaciones mostró que la inclusión de un lípido insaturado es estrictamente necesaria para obtener los liposomas. Mezclas de DPPE y colesterol no producen fácilmente liposomas, como puede notarse a simple vista, por la agregación de lípidos que difícilmente son dispersados en solución acuosa (resultados no mostrados).

3.2 Obtención de liposomas unilaminares grandes

El autoensamblaje de lípidos normalmente genera liposomas multilaminares de talla heterogénea. El uso de liposomas para fines terapéuticos requiere generalmente de preparaciones homogéneas, y de una talla específica ya que, además de su composición, la interacción de las vesículas con las células depende fuertemente de su talla (Adler & Leong, 2010). También la estabilización de liposomas con nanopartículas requiere de vesículas de talla homogénea, a fin de facilitar el ensamblaje de los lípidos sobre la superficie de las partículas (Liu et al, 2009).

El método utilizado en este trabajo para la preparación de vesículas unilaminares grandes fue el de extrusión. Para ello, los liposomas multilaminares formados por el método de rehidratación fueron pasados varias veces a través de membranas con poros de tallas definidas. Se utilizaron membranas con poros de 450, 220 y 100 nm de diámetro de manera secuencial, a excepción de la preparación utilizada para la fabricación del vector híbrido, la cual consistió en liposomas filtrados a través de 450 y 220 nm únicamente (ver más adelante).

Después de la extrusión de liposomas, las preparaciones cambiaron su aspecto a simple vista, tornándose de una suspensión opaca de color blanquecino, al de una solución translúcida. En la Tabla 3 se muestran 4 distintas



formulaciones empleadas para este trabajo. La concentración de lípidos utilizada fue de 5 mg de lípidos totales / ml de medio acuoso (PBS).

Tabla 3. Composición molar de lípidos anfipáticos utilizados para la preparación de liposomas.

Formulación	Composición (mol %)			
	DPPE	DOPC	Colesterol	DOTAP
DOPC	-	100.00	-	-
DOPC/Chol	-	70.00	30.00	-
DOPC/Chol/DOTAP	-	36.36	36.36	27.27
DPPE/DOPC/Chol/DOTAP	18.18	18.18	27.27	36.36

Los análisis para caracterización de las vesículas unilaminares consistieron en la determinación de su talla, mediante dispersión de luz dinámica (DLD) y morfología, por microscopía electrónica de transmisión (MET). Se empleó asimismo la espectroscopia Raman, como un método novedoso para el control de calidad, mediante el monitoreo de grupos funcionales de los componentes de liposomas, así como de nanopartículas y fármacos asociados (Gordon & McGoverin, 2011).

3.3 Determinación del tamaño de los liposomas

El tamaño de las vesículas generadas mediante extrusión se obtuvo por análisis de dispersión de luz dinámica (DLD). Debido a su facilidad de manejo durante el proceso de autoensamblaje, una preparación de un lípido zwitteriónico con cadenas insaturadas, DOPC, fue utilizada para examinar la factibilidad de



obtener liposomas de tamaño definido mediante la técnica de extrusión. En la figura 21 se muestra el histograma obtenido por DLD que indica la abundancia relativa de liposomas de distintos diámetros hidrodinámicos. Como puede observarse, los liposomas mostraron un tamaño muy homogéneo, que va de

185 a 189 nm. Este análisis mostró un diámetro superior del esperado, de 100 nm, lo cual podría estar influenciado por la alta fluidez de las vesículas, y su deformación durante la extrusión.

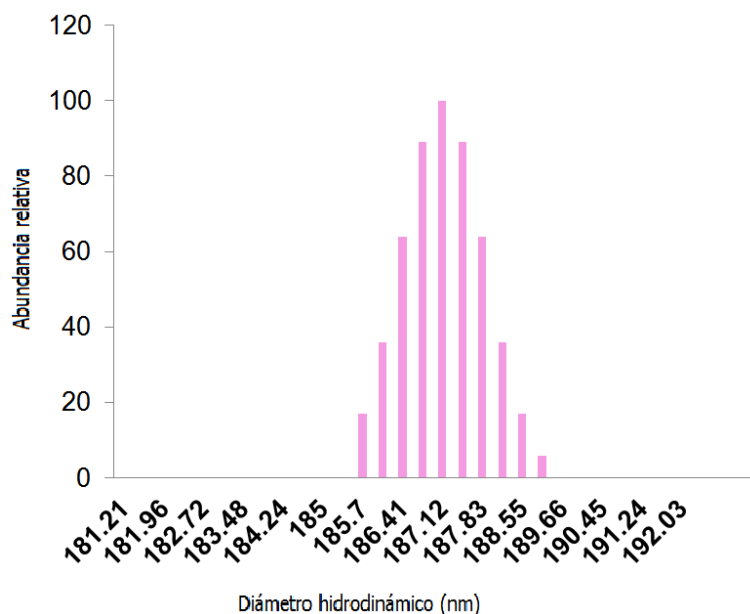


Figura 21. Análisis de la talla de liposomas unilaminares grandes constituidos por DOPC, extruidos a través de membranas con poros de 100 nm.

Para liposomas cuya composición incluye colesterol, la formulación consistió en una mezcla de DOPC/ colesterol (70:30, mol/mol). El análisis del tamaño de esta preparación mostró también una homogeneidad alta, aunque bimodal. Como puede observarse en la figura 22, los liposomas tienen un diámetro hidrodinámico promedio de 146 nm, con un 98% de la población dentro de un



intervalo de tallas de 131 a 169 nm, de acuerdo con las estadísticas generadas con el análisis de DLD.

En concordancia con la mayor rigidez de estas vesículas preparadas con un 30% de colesterol, una menor flexibilidad pareciera limitar la deformación de vesículas al paso a través de los poros reduciendo el tamaño de la población obtenida (de 187 nm, para liposomas con lípidos insaturados, a 146 nm, en esta población que contiene un 30% de colesterol).

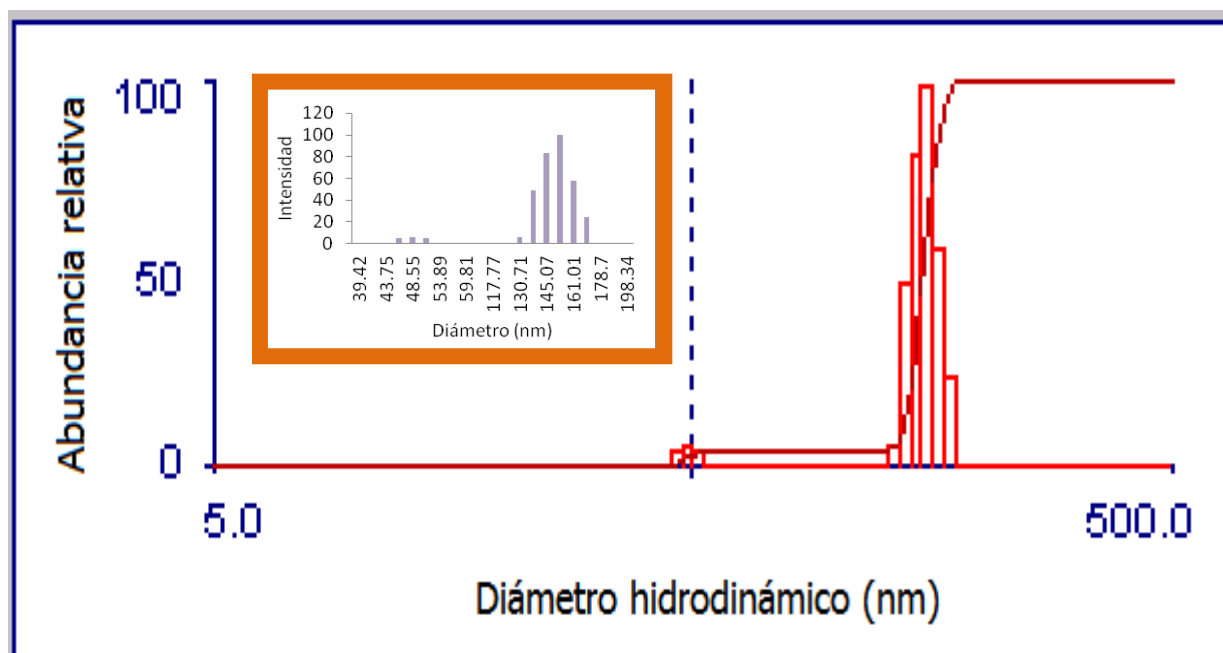


Figura 22. Análisis de la talla de liposomas unilaminares grandes constituidos por una mezcla de DOPC/colesterol (7:3, mol/mol), extruidos a través de membranas con poros de 100 nm.

De acuerdo con estos resultados, la presencia de concentraciones de un 30% de colesterol en las vesículas modelo facilita la obtención de liposomas de un tamaño más cercano al esperado. En las preparaciones obtenidas posteriormente



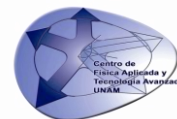
con el lípido catiónico DOTAP, fue incluido un porcentaje de 27 a 36% de colesterol (ver Tabla 3).

3.4 Determinación de la morfología y del tamaño de liposomas mediante microscopía electrónica de transmisión

Para analizar la morfología y heterogeneidad de las vesículas modelo se utilizó una tinción directa con acetato de uranilo para observación al microscopio electrónico de transmisión. Con este análisis pudimos corroborar que las vesículas son de una sola bicapa lipídica, ya que muestran una estructura sin capas (figura 23). Asimismo, los análisis muestran poblaciones de alta uniformidad de talla, con algunas vesículas de talla mucho menor. En concordancia con el análisis de DLD, este análisis mostró una población de liposomas de mayor talla en las preparaciones que contenían únicamente lípidos insaturados. Por otro lado, el análisis de liposomas compuestos de DOPC/colesterol/DOTAP, sugiere que una talla más cercana a los 100 nm puede ser obtenida, probablemente porque la carga catiónica de las vesículas dificulta su agregación (figura 24).

3.5 Estabilidad de liposomas unilaminares grandes

A fin de determinar si los liposomas unilaminares pueden ser conservados para su posterior ensamblaje sobre nanopartículas de sílice, las preparaciones de liposomas fueron mantenidas a temperatura ambiente y a 4°C durante un periodo de 7 días. Al analizar las muestras por DLD al final de este periodo, observamos que las dos formulaciones, liposomas con lípidos insaturados y liposomas con lípidos insaturados y colesterol, experimentan un fenómeno de autoagregación a temperaturas $\geq 20^{\circ}\text{C}$, dando lugar a liposomas de una talla superior a las 10



micras de diámetro (figura 25). Este fenómeno es visible en periodos del orden de minutos, como pudimos observar en muestras que permanecían a temperatura ambiente durante algunas preparaciones para microscopía electrónica de transmisión (datos no mostrados). En contraste, todas las muestras de liposomas permanecieron estables cuando fueron mantenidas en refrigeración (4-5°C). Estos datos sugieren que, si bien la preparación de liposomas unilaminares grandes conlleva una serie de procesos meticulosos, la estabilidad a 4°C de las vesículas obtenidas permite la programación de la fabricación del material híbrido en distintas jornadas.

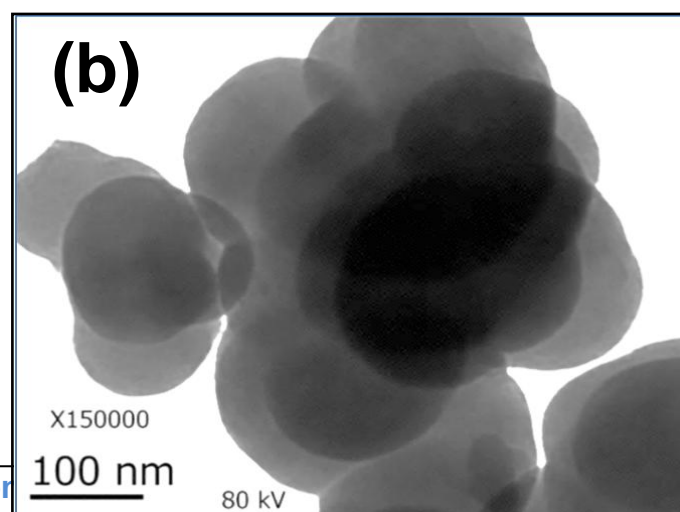
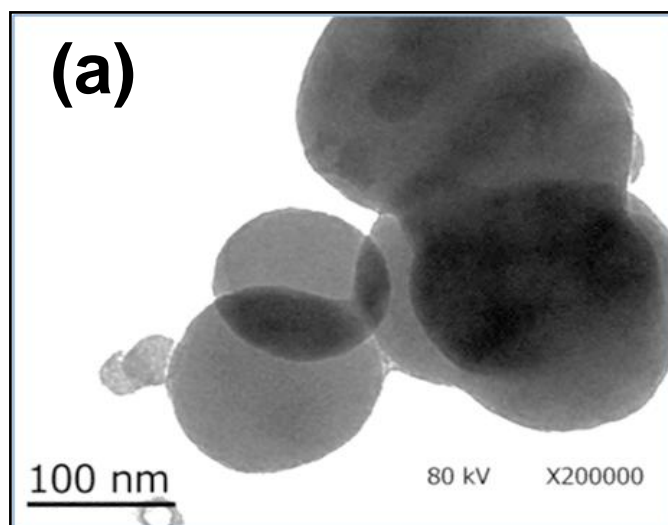




Figura 23. Análisis de liposomas unilaminares grandes mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) Liposomas compuestos por di-oleil-fosfatidilcolina (DOPC); (b) liposomas compuestos por una mezcla de DOPC/colesterol (7:3, mol/mol).

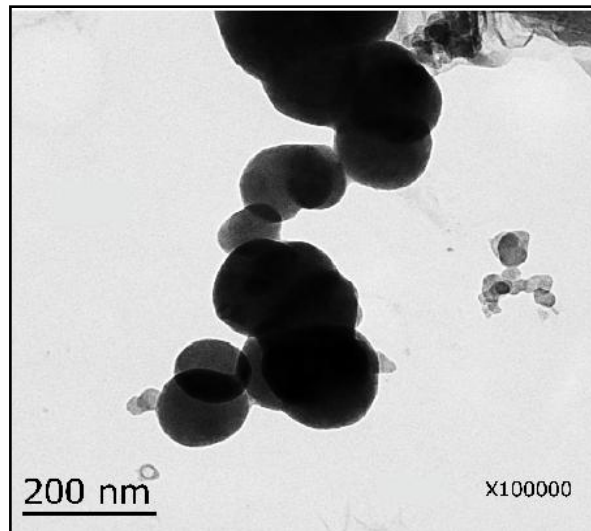


Figura 24. Análisis de liposomas unilaminares grandes compuestos de di-oleil-fosfatidilcolina, colesterol y DOTAP (2 : 2 : 1.5, mol/mol), mediante microscopía electrónica de transmisión.



Figura 25. Análisis de la talla de liposomas unilaminares grandes constituidos por una mezcla de DOPC/colesterol (7:3, mol/mol), extruidos a través de membranas con poros de 100 nm y conservados a temperatura ambiente durante 7 días.

3.6 Obtención y análisis de nanopartículas de sílice porosa

Las nanopartículas de sílice fueron obtenidas por polimerización de tetraetil-ortosilicato (TEOS) por el método de sol-gel, utilizando NH_4OH y H_2O como catalizadores y etanol como solvente. Las estructuras del precursor y del polímero obtenido se muestran en la figura 26.

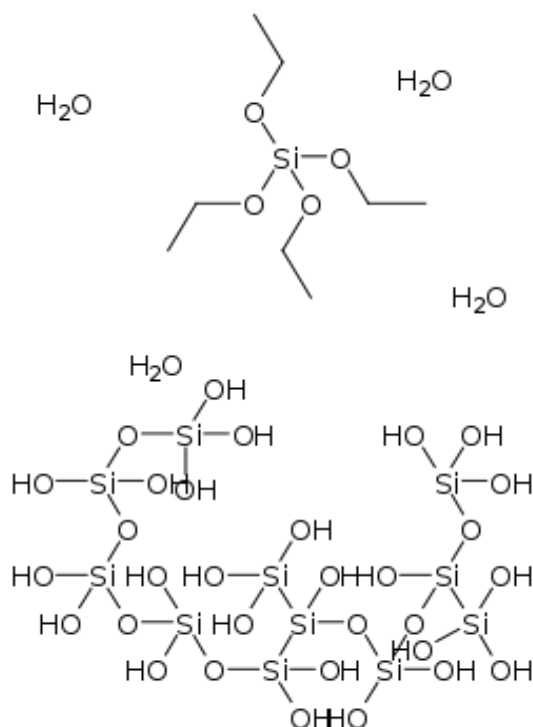


Figura 26. Estructura del tetra-ortosilicato (TEOS) (arriba), reactivo precursor para la obtención de las nanopartículas de sílice (abajo).

Las nanopartículas obtenidas fueron lavadas para cambiar la carga de superficie, lo cual constituye un paso necesario para el autoensamblaje de lípidos anfipáticos sobre las partículas (Liu et al, 2009). La muestra de nanopartículas fue caracterizada mediante DLD y MET para análisis de tamaño de partícula y morfología. En la figura 27 se muestra un análisis por DLD de las nanopartículas cerámicas. Las nanopartículas mostraron un diámetro de 287 a 305 nm de diámetro. El análisis por MET mostró que las nanopartículas son porosas, aunque no se observó la morfología esférica esperada de acuerdo con lo reportado para el método de síntesis utilizado (Echeverri, 2007). Con los datos obtenidos no es claro si las nanopartículas corresponden a aglomerados de nanopartículas de menor



tamaño, o a partículas con uniones covalentes. Sin embargo, las partículas obtenidas corresponden a una población de alta homogeneidad, con tamaño de 296 ± 9 nm de diámetro.

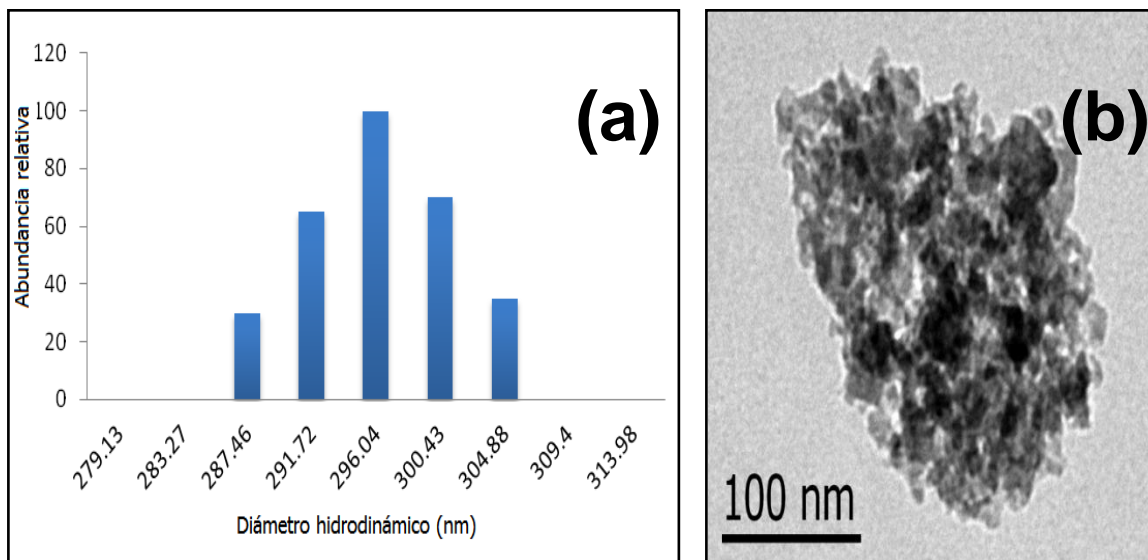


Figura 27. Análisis de las nanopartículas de sílice obtenidas mediante polimerización de tetra-etil-ortosilicato por el proceso de sol-gel. (a) Talla de las partículas, obtenida mediante dispersión de luz dinámica. (b) Imagen de una nanopartícula de sílice mediante microscopía electrónica de transmisión.

3.7 Preparación de nanopartículas híbridas

Los nanovectores híbridos fueron preparados mediante autoensamblaje de vesículas unilaminares de talla similar a las partículas de sílice. Para ello, se prepararon liposomas que contenían el lípido catiónico sintético DOTAP en un 36%, un 27% de colesterol y porcentajes equimolares de fosfolípidos saturados e insaturados (ver tabla 7). En la figura 28 se muestra un análisis por TEM de los



liposomas utilizados para recubrir las nanopartículas de sílice. De acuerdo con este análisis, la población obtenida corresponde a liposomas de morfología esférica, de tamaño ≤ 100 nm de diámetro.

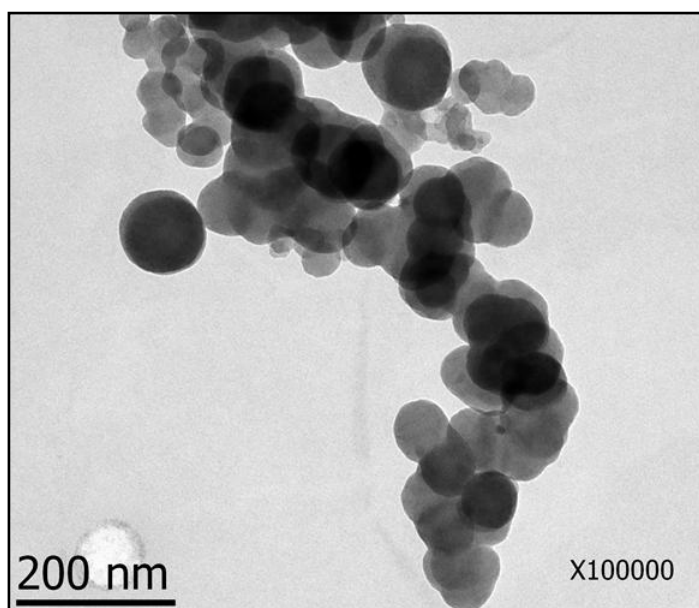


Figura 28. Análisis por microscopía electrónica de transmisión de liposomas compuestos de DPPE/DOPC/colesterol/DOTAP (1 : 1 : 1.5 : 2, mol/mol), extruidos a través de poros de 100 nm.

Las nanopartículas de sílice para la preparación del sistema híbrido fueron previamente tratadas para la internalización de calceína, una macromolécula

fluorescente que ha sido frecuentemente utilizada para modelar el encapsulamiento y liberación de biomoléculas a partir de nanovectores, el dextrano fluoresceinado (Nielsen et al, 1999). Dicha internalización fue realizada mediante un simple proceso de adsorción, incubando las nanopartículas en una solución que contenía la molécula modelo, y eliminando su exceso mediante centrifugaciones. Posteriormente, el autoensamblaje de membranas lipídicas



sobre la superficie de la sílice fue realizado mediante incubación de las partículas con los liposomas catiónicos.

3.8 Análisis de nanopartículas híbridas

Para caracterizar los nanovectores híbridos, compuestos de nanopartículas de sílice recubiertas con lípidos anfipáticos con carga neta positiva, se utilizó un análisis de DLD, para caracterización del tamaño. En la figura 29 se muestra el análisis correspondiente.

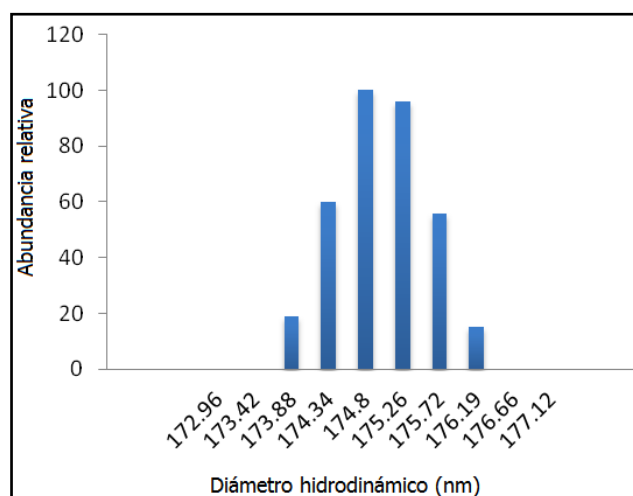


Figura 29. Análisis mediante DLD de la talla de liposomas catiónicos estabilizados con nanopartículas de sílice.

Actualmente, una de las técnicas más prometedoras para control de calidad de productos farmacéuticos es la espectroscopia Raman, ya que permite el análisis de materiales de composiciones variadas de manera simultánea (McGovern, 2011). En este trabajo, exploramos el uso de esta técnica espectroscópica para analizar simultáneamente la presencia de los materiales orgánico (fosfolípidos), e inorgánico (sílice) en el sistema obtenido. En la figura 30



se muestran los espectros Raman de cada uno de los 2 componentes en el nanovector (a, b), así como del espectro obtenido al analizar el material híbrido (c). En el espectro correspondiente a las nanopartículas de sílice se puede ver una gran protuberancia que va de los 3100 a los 3500 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión O-H, típicamente encontrada entre los 3000 a los 3650 cm^{-1} . Una banda que se encuentra en los 1088 cm^{-1} fue asignada a los enlaces Si-O, mientras que enlaces Si-O-Si generarían bandas de vibración en el intervalo de los 550 cm^{-1} , poco visibles en el espectro obtenido. En el espectro correspondiente a los liposomas catiónicos, se observan señales Raman de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. A los 1100 y 1128 cm^{-1} , las señales fueron asignadas a los modos vibracionales de los enlaces C-C del esqueleto de la cadena, una banda en los 1297 cm^{-1} corresponde a la torsión de los H-C-H, al grupo $-\text{CH}_3$ se asignó la señal a 1460 cm^{-1} , y a 1650 cm^{-1} se observa la banda correspondiente al doble enlace C=C del radical graso y del colesterol. Las bandas observadas a 2848 cm^{-1} , 2884 cm^{-1} , 2936 cm^{-1} , y 2962 cm^{-1} corresponden a los estrechamientos de los enlaces C-H. La banda ancha que va de los 3200 a los 3500 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estrechamiento de los OH del agua.

En la figura 30 se indica cómo las bandas características de los fosfolípidos y de la sílice pueden ser observadas al analizar las partículas híbridas. El espectro Raman de los liposomas estabilizados muestra las señales correspondientes a los lípidos utilizados en su preparación, siendo las bandas correspondientes a los grupos CH_2 , CH_3 , C-H y C=C las más características. Asimismo, es posible observar que algunas bandas se desplazan ligeramente, observándose máximos u hombros de emisión correspondientes al espectro de la sílice.

Recientemente, el autoensamblaje de lípidos sobre nanopartículas ha sido explorado por varios autores, algunos para mimetizar membranas biológicas



(Chemboruro et al, 2010) y otros para fines farmacéuticos (Carmona-Ribeiro, 2010). Hasta ahora, los métodos descritos para poner en evidencia el ensamblaje de lípidos sobre nanopartículas han sido: la microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinciones especiales, tales como el polivinil butiral (Katagiri & Caruso, 2004) o el ácido fosfotúngstico (de Miguel et al, 2000), la criomicroscopía electrónica (de Miguel et al, 2000; Mornet et al, 2005), la microscopía electrónica con criofractura (Moya et al 2003), la microscopía electrónica de transmisión (SEM) (Katagiri & Caruso, 2004), la formación de complejos con surfactantes de carga opuesta a los lípidos utilizados, la solubilización de fármacos hidrofóbicos por la capa de lípidos, así como diversas técnicas basadas en el marcaje a través de lípidos acoplados a fluorocromos, como la microscopía de fluorescencia (De Miguel et al, 2000; Kodama et al, 2009), la citometría de flujo (Moya et al, 2003) y la microscopía confocal (Ge et al, 2003; Liu et al, 2009).

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte del uso de la espectroscopia Raman como herramienta para el análisis de sílice recubierta con una membrana modelo, lo cual fue posibles gracias a la disponibilidad de un equipo Raman dispersivo acoplado a un microscopio. Tomando en cuenta la facilidad de este análisis directo sobre el material, consideramos que la microscopía Raman puede ser propuesta como un método eficaz y de bajo costo para el control de calidad en la producción de liposomas estabilizados.

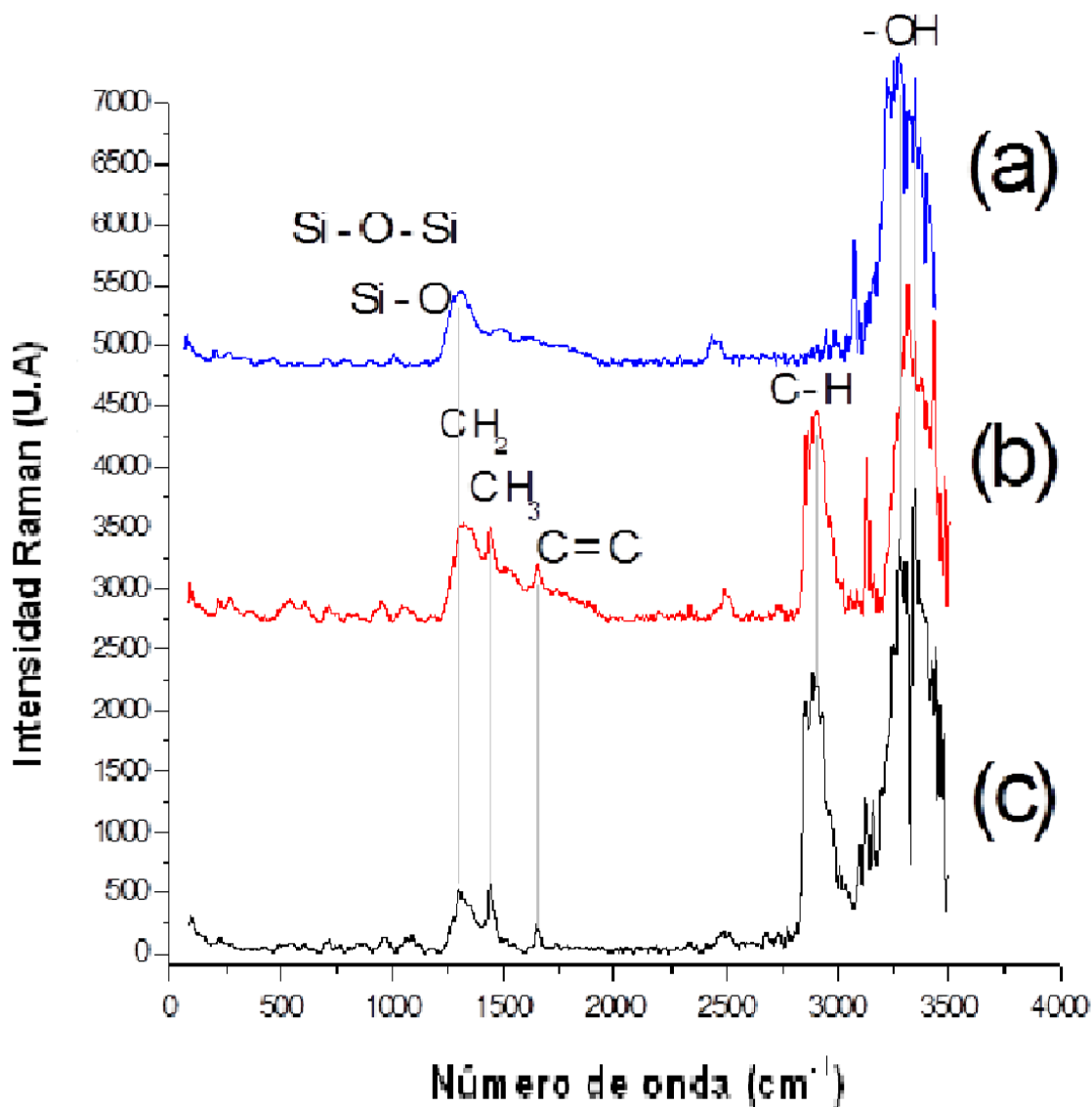


Figura 30. Espectros Raman comparativos de nanopartículas de sílice (a), liposomas catiónicos (b) y nanopartículas híbridas (c) obtenidas en este estudio. Las líneas punteadas muestran la correspondencia de bandas con el sistema híbrido.



3.9 Encapsulación de una molécula modelo y liberación en células eucariotas

Como último paso de este trabajo, los nanovectores híbridos obtenidos fueron evaluados en cuanto a su utilidad para liberar al interior de las células una macromolécula de 10 kDa, el dextrano acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Dextrano de 10 kDa o FD10). Este compuesto no es capaz de ser internalizado espontáneamente en células eucariotas, debido a su gran talla. El nanovector, en cambio, debido al recubrimiento de lípidos anfipáticos, fue diseñado para ser endocitado. Más aún, su formulación con DOTAP, lípido catiónico, promovería una fácil endocitosis, debido a la atracción de cargas positivas, con las cargas negativas de varios fosfolípidos de las membranas celulares (la composición en fosfolípidos aniónicos puede ser consultada en Lehninger et al, 2008).

Para evaluar la factibilidad de utilizar las membranas modelo de composición catiónica, para internalizar la molécula fluorescente utilizamos un cultivo de monocapas de células inmortalizadas derivadas de riñón de embrión humano (HEK 293), obtenidas de la colección de cultivos típicos americana (ATCC, por sus siglas en inglés). Las células fueron crecidas en medio de cultivo celular y, un cultivo en monocapa (sobre placas de cultivo celular de 3.5 cm de diámetro) fue incubado en condiciones estériles a 37°C, 5%CO₂, 97% humedad, durante 20 minutos en presencia de una preparación de liposomas catiónicos compuestos por DPPE/DOPC/colesterol/DOTAP (1:1:1.5:2 mol/mol). Al término de la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con solución isotónica, y fijadas con metanol a -20°C. En la figura 31 se observa un análisis mediante microscopía de campo claro y de epifluorescencia de células tratadas.

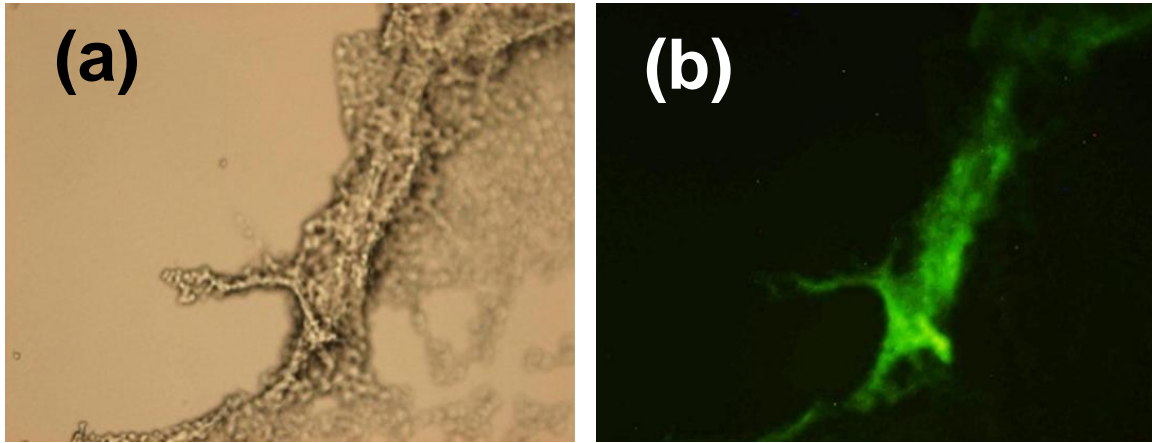
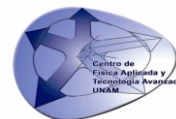


Figura 31. Internalización en células derivadas de riñón humano de una macromolécula fluorescente de 10 kDa (FITC-Dextrano) encapsulada en liposomas catiónicos. (a) Microscopía en campo claro, 10X; (b) Microscopía de epifluorescencia ante excitación con luz azul, 10X.

Este análisis demostró que la composición de lípidos seleccionada para promover la internalización del vector al interior de células eucariotas funciona adecuadamente. Queda pendiente el análisis de internalización de macromoléculas a través del nanovector híbrido.



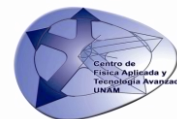
CONCLUSIONES

1. En este trabajo se diseñaron y fabricaron nanopartículas de sílice recubiertas con fosfolípidos anfipáticos, que permiten facilidad de encapsulamiento, constituyen un sistema altamente biocompatible y tienen el potencial de proteger material genético de daño por endonucleasas, o por fenómenos físicos inherentes a algunos métodos físicos de transfección genética.
2. La caracterización de las nanopartículas obtenidas mostró que el método de preparación establecido fue capaz de brindar nanopartículas de tamaño controlado y morfología homogénea.
3. De acuerdo con nuestros resultados, la introducción de la espectroscopia Raman para la caracterización de nanopartículas híbridas resulta prometedora.
4. La mezcla de los lípidos utilizados en el diseño de nuestras nanopartículas es capaz de promover la entrega de macromoléculas al interior de células, como quedó demostrado con la entrega de dextrano fluoresceinado de 10,000 Da al interior de células HEK 293.



BIBLIOGRAFÍA

1. Adler, A. F., Leong, K. W. (2010) Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: impact on nonviral gene delivery. *Nano Today*, 5: 553-569.
2. Allen, T.M. (1997) Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs* 54: 8–14.
3. Armenta Ruiz, E., Varela Echavarría, A., Martínez de la Escalera, G., Loske Mehling, A. M. (2006) Transfección de células por medio de ondas de choque. *Rev. Mex. Fís.* 52: 352-358.
4. Aston. A., Saffie-Siebert, R., Canham, L., Ogden, J. (2005) Nanotechnology Applications for Drug Delivery. *Pharm. Tech. Eur.* 17: 21–28.
5. Braithwaite, A., Smith, F.J. *Chromatographic Methods*. 5th edition, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1999, 580 pp.
6. Budker, V., Budker, T., Zhang, G., Subbotin, V., Loomis, A., Wolff, J. A. (2000) Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J. Gene Med.* 2: 76–88.
7. Carmona-Ribeiro, A. M. (2010) Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. *Int. J. Nanomed.*, 5: 249-259.
8. Chemburu, S., Fenton, K., Lopez, G. P., Zeineldin, R. (2010) Biomimetic silica microspheres in biosensing. *Molecules*, 15: 1932-1957.
9. Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C. (2002) Nanocapsule technology: A review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 19: 99-134.
10. De Miguel, I., Imbertie, L., Rieumajou, V., Major, M., Kravtsoff, R., Betbeder, D. (2000) Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV™) used as drug carriers. *Pharmaceutical Research* 17: 817-824.



11. Clark, P. R., Hersh, E. M. (1999) Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 158-76.
12. Costa, E., Arancibia, A., Aiache, J.-M. (2004) Sistemas matriciales. *Acta Farm. Bonaerense* 23: 259-265.
13. Crispin R. Dass. (2006) Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: In vivo proof of applicability. *J. Control. Release* 11: 155–163.
14. Echeverri, E., Giraldo, L.F., López, B.L. (2007) Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílica con morfología esférica. *Scientia et Technica* 36: 169-173.
15. Edwards, D.J. Cromatografía, principios y técnicas. El manual moderno, México, D.F., 1975.
16. Escoffre, J. M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., Rols, M. P. (2009) *Mol. Biotechnol.* 41: 286-95.
17. Farhood, H., Serbina, N., Huang, L. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer, *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 289–295.
18. Flotte, T. R. (2007) Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art. *J. Cell. Physiol.* 213: 301-305.
19. Freitas Jr., R. A. (2005) What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotech. Biol. Med.* 1: 2-9.
20. Gaber, B. P., Yager, P., Peticolas, W. L. (1978) Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. *Biophys. J.* 21: 161-176.
21. Gao, X., Kim, K., Liu, D, (2007). Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J.* 9, art. no. 9.



22. Ge, L., Möhwald, H., Li, J. (2003) Phospholipase A₂ hydrolysis of mixed phospholipid vesicles formed on polyelectrolyte hollow capsules. *Chem. Eur. J.*, 9: 2589-2594.
23. Gordon, K. C., McGoverin, C. M. (2011) Raman mapping of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 417: 151-162.
24. Huang, L., Hung, M.-C., Wagner, E. Non-Viral Vectors for gene therapy, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, 2005.
25. Katagiri, K., Caruso, F. (2004) Functionalization of colloids with robust inorganic-based lipid coatings. *Macromolecules* 37: 9947-9953.
26. Kim, W. J., Kim, S. W. (2009) Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm. Res.* 26: 657-666.
27. Kochanski, A. M., Mejnartowicz, J. P., Latos-Bielenska, A., Etienne, J., Filipczynski, L. (2001) DNA damage induced by lithotripter generated shock waves: short report. *Int. Urol. Nephrol.* 32: 419-422.
28. Kocisová, E., Procházka, M., (2011). Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposome. *J. Raman Spectroscopy* 42: 1606-1610.
29. Kodama, T., Tomita, Y., Koshiyama, K., Blomley, M. J. (2006) Transfection effect of microbubbles on cells in superposed ultrasound waves and behavior of cavitation bubble. *Ultrasound Med. Biol.* 32: 905-914.
30. Kodama, T., Tomita, Y., Watanabe, Y., Koshiyama, K., Yano, T., Fujikawa, S. (2009) Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation. *J. Biomech. Sci. Eng.* 4: 124-130.
31. Kolata, G. (2009) *The New York Times*, November 6: A19.
32. Lauer, U., Bürgelt, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P. H., Gregor, M., Delius, M. (1997) *Gene Ther.* 4: 710-5.
33. Lehninger, A., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fifth Edition, Freeman W. H., USA, 1263 pp.



34. Liu, F., Huang, L. (2002) Development of non-viral vectors for systemic gene delivery, *J. Control. Release* 78: 259–266.
35. Liu, J., Stace-Naughton, A., Jiang, X., Brinker, C. J. (2009) Porous nanoparticle supported lipid bilayers (Protocells) as delivery vehicles. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 1354-1355.
36. Liang, H.-D., Tang, J., Halliwell, M. (2010) Sonoporation, drug delivery, and gene therapy. *Proc. IME, Part H: J. Eng. Med.* 224: 343-361.
37. Loske AM, Campos-Guillen J, Fernández F, Castaño-Tostado E. (2011) Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. *Ultrasound Medicine Biol* 37: 502–510.
38. Mercadal, M., Domingo, J. C., Bermudez, M., Mora, M., de Madariaga, M. A. (1995) N-palmitoylphosphatidylethanolamine stabilizes liposomes in the presence of human serum: effect of lipidic composition and system characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1235: 281-288.
39. Michel, M. S., Erben, P., Trojan, L., Schaaf, A., Kiknavelidze, K., Knoll, T., Alken, P. (2004) *Anticancer Res.* 24: 2303-2308.
40. Miller, D. L., Pisaru, S. V., Greenleaf, J. E. (2002) Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat. Cell Mol. Genet.* 27: 115-134.
41. Mir, L. M. (2009) Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenotherapy): past, current, and future. *Mol. Biotech.* 43: 167-176.
42. Morales, N., De Oca, J.M., Ñiquen, J., Alarcón H. (2008). Obtención de Óxido de silicio por el método sol-gel. *Rev. Fac. Ciencias de la UNI* 12: 33-39.
- Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E., Brisson, A. (2005) The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Letters*, 5: 281-285.



43. Moya, S. E., Georgieva, R., Bäuml, H., Richter, W., Donath, E. (2003) Composite lipid polyelectrolyte capsules template on red blood cells: fabrication and structural characterization. *Med. Biol. Eng. Comput.* 41: 504-508.
44. National Nanotechnology Initiative. www.nano.gov/. Consultado el 25/01/13.
45. Nielsen, H. M., Verhoef, J. C., Ponc, M., Rassing, M. R. (1999) TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextrans in the presence of sodium glycocholate. *Journal of Controlled Release* 60: 223-233.
46. Padron, H.G (2003) Development of hybrid materials consisting of SiO₂ microparticles embedded in phenolic-formaldehydic resin polymer matrices. *Adv. Mat. Sci. Eng.* A355: 338-347.
47. Park, S.-J., Choi, S.G., Davaa, E., Park, J, (2011) Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposome. *Int. J. Pharm.* 415: 267-272.
48. Phan, G., Herbet, A., Cholet, S., Benech, H., Devere, J., Fattal, E. (2005). Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation. *J. Control. Release* 110: 177-188.
49. Sanjeeb, K. Sahoo, Labhasetwar, V. (2003) Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* 8: 1112-1120.
50. Serda, R. E., Godin, B., Blanco, E., Chiappini, C., Ferrari, M. (2011) Multi-stage delivery nano-particle systems for therapeutic applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1810: 317-329.
51. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2008) Principios de análisis instrumental. 6a. Edición. Science Learning, 2008.



52. Shenoy, D., Little, S., Langer, R., Amiji, M. 2005. Poly (ethylene oxide)-modified poly (β amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluation. *Mol. Pharm.*, 2: 357-366.
53. Valle-Delgado, J. J., Molina-Bolívar, J. A., Galisteo-González, F., Gálvez-Ruiz, M. J., Feiler, A., Rutland, M. W. (2005) Hydration forces between silica surfaces: Experimental data and predictions from different theories. *J. Chem. Phys.* 123, art. no. 034708.
54. Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., Couvreur, P. (2003) Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 519-548.
55. Weinstein, J. N., Ralston, E., Leserman, L. D., Klausner, R. D., Dragsten, P., Henkart, P., Blumenthal, R. (1984) In Liposome Technology. Gregoriadis, G. (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Vol. 1, p. 2.
56. Zhou, C., Yu, B., Yang, X., (2010) Lipid-coated nano-calcium-phosphate (LNCP) for gene delivery (2005) How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles), *Int. J. Pharm.* 39: 201-208.
57. Zidovska A, Heather M., Evans, B. (2009) The Role of Cholesterol and Structurally Related Molecules in Enhancing Transfection of Cationic Liposome-DNA Complexes. *J. Phys. Chem.* 113: 5208–5216.