

Vanessa Herrero García

Multifuncionalización de
nanopartículas magnéticas por
reconocimiento molecular de
ácidos nucleicos y
péptidonucleicos para la liberación
controlada mediante hipertermia

Departamento
Química Orgánica

Director/es
Martínez de la Fuente, Jesús
Fratila, Raluca Maria

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

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

MULTIFUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS POR RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PÉPTIDONUCLEICOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA MEDIANTE HIPERTERMIA

Autor

Vanessa Herrero García

Director/es

Martínez de la Fuente, Jesús
Fratila, Raluca Maria

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Orgánica

2018

MULTIFUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS POR RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PÉPTIDONUCLEICOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA MEDIANTE HIPERTERMIA

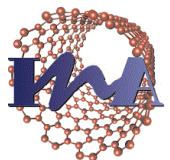
Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Zaragoza

Vanessa Herrero García

Directores:

Jesús Martínez de la Fuente

Raluca M. Fratila



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

Departamento de Química Orgánica

Zaragoza 2018

Dr. Jesús Martínez de la Fuente, Investigador científico titular del CSIC del grupo Nanotecnología y Apoptosis de la Universidad de Zaragoza y Dña. Raluca M. Fratila, Investigadora Ramón y Cajal del mismo grupo.

INFORMAN:

Que Vanessa Herrero García, licenciada en Químicas y con título de Master Universitario en Investigación Química, ha realizado en el grupo de Nanotecnología y Apoptosis de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección el trabajo descrito en la presente memoria, que lleva por título “ Multifuncionalización de nanopartículas magnéticas por reconocimiento molecular de ácidos nucleicos y péptidonucleicos para la liberación controlada mediante hipertermia”, y que presenta para optar al grado de Doctor.

Zaragoza, 2018

Dr. Jesús Martínez de la Fuente

Dra. Raluca M. Fratila

Índice

Capítulo 1. Introducción

1.1. Nanomateriales y sus aplicaciones en Biomedicina.....	1
1.2 Nanopartícula magnéticas de óxido de hierro.....	3
1.2.1 Introducción.....	3
1.2.2. Propiedades físico-químicas de las MNPs.....	5
1.2.3 Propiedades magnéticas de las MNPs.....	6
1.2.3.1 Tipos de materiales magnéticos.....	6
1.2.3.2 Clasificación de las propiedades magnéticas.....	8
1.3.1.1 Generación de calor en hipertermia magnética.....	9
1.3 MNPs de óxido de hierro biofuncionalizadas en biomedicina.....	11
1.3.1 Funcionalización de MNPs con diferentes biomoléculas.....	12
1.3.1.1 Ácidos nucleicos (ADN).....	12
1.3.1.2 Ácido péptidonucleico (APN).....	14
1.3.1.3 Carbohidratos.....	15
1.3.2 Aplicaciones de MNPs multifuncionalizadas en la terapia del cáncer... ..	16
1.3.2.1 Introducción.....	16
1.3.2.2 Aplicaciones de MNPs en liberación de fármacos quimioterapéuticos.....	17

1.3.2.3 Aplicaciones de MNPs en hipertermia magnética.....	20
1.4 Retos en el uso de MNPs para aplicaciones biomédicas.....	24
1.5 Objetivos del trabajo.....	25
1.6 Referencias.....	26

Capítulo 2. Síntesis de NPs magnéticas en medio acuoso

2.1 Introducción.....	41
2.1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe_xO_y).....	41
2.1.1.1 Métodos de co-precipitación.....	44
2.1.1.2 Método hidrotérmico.....	44
2.1.1.3 Método de descomposición térmica.....	45
2.1.2 Estabilización de MNPs de óxido de hierro en medio acuoso.....	47
2.1.2.1 Mecanismos de estabilización de MNPs.....	48
2.1.2.2 Naturaleza de los materiales utilizados para la estabilización de MNPs.....	50
2.2 Resultados y Discusión.....	54
2.2.1 Síntesis de MNPs de óxido de hierro en medio orgánico.....	54
2.2.1.1 Caracterización de MNPs de óxido de hierro en fase orgánica...56	56
2.2.2 Estabilización de MNPs de óxido de hierro en medio acuoso.....	58
2.2.2.1 Caracterización de MNPs de óxido de hierro estabilizadas en agua.....	60
2.3 Conclusiones.....	63
2.4 Materiales y Métodos.....	63

2.4.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe_xO_y).....	63
2.4.1.1 Síntesis de semillas de 6 nm.....	63
2.4.1.2 Crecimiento de semillas de 6 a 12 nm.....	64
2.4.2 Transferencia a fase acuosa de las MNPs de óxido de hierro.....	64
2.4.3 Métodos de caracterización.....	65
2.5 Agradecimientos.....	66
2.6 Referencias.....	66

Capítulo 3. Funcionalización de las MNPs-1 con ácidos nucleicos y péptidonucleicos

3.1 Introducción.....	75
3.1.1. Funcionalización de MNPs-1 con biomoléculas.....	75
3.1.1.1 Funcionalización con ácido nucleicos (ADN) y péptidonucleico... <td>80</td>	80
3.1.1.2 Funcionalización con glucosa (Glc).....	81
3.2 Resultados y discusión.....	82
3.2.1 Funcionalización del sistema MNPs-1 con ácidos nucleicos(ADN').....	82
3.2.1.1 Búsqueda de las condiciones óptimas de reacción.....	82
3.2.2.1 Cuantificación de la funcionalización mediante métodos indirectos.....	85
3.2.2.2 Funcionalización de la plataforma MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN') y péptidonucleicos (APN').....	88
3.2.2.1 Optimización de la proporción de ADN' y APN'	88
3.2.3 Estudios de estabilidad en medio de cultivo celular de la plataforma MNPs-5.....	90

3.2.4 Estabilización de MNPs-5 mediante la funcionalización con glucosa.....	91
3.2.4.1 Optimización de las cantidades de glucosa.....	91
3.2.4.2 Funcionalización de MNPs-6 con hebras de ADN' y APN' en diferentes porcentajes.....	96
3.2.5 Búsqueda de las condiciones óptimas de hibridación de la plataforma MNPs-8.....	98
3.3 Conclusiones.....	104
3.4 Materiales y métodos	105
3.4.1 Funcionalización de MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN').....	105
3.4.1.1 Procedimiento general de funcionalización.....	105
3.4.1.2 Hibridación del sistema MNPs-2 con una hebra de ADN''-fluoróforo (FAM).....	107
3.4.2 Funcionalización del sistema MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN') y péptidonucleicos (APN').....	107
3.4.2.1 Búsqueda de las proporciones óptimas de ADN'/APN'.....	107
3.4.3 Optimización de la funcionalización con glucosa de la plataforma MNPs-4	108
3.4.4 Optimización de la hibridación de MNPs-7.....	109
3.4.4.1 Hebra de ADN'' actuando de bloqueante.....	109
3.4.4.2 Longitud de la cadena de la hebra de ADN''.....	109
3.4.5 Cuantificación de la funcionalización/hibridación.....	109
3.4.6 Métodos de caracterización.....	111
3.4.6.1 Cuantificación de la fluorescencia.....	111

3.4.6.2 Determinación de la concentración de hierro.....	111
3.4.6.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	111
3.4.6.4 DLS.....	111
3.4.6.5 Potencial Z.....	111
3.4.6.6 Estudio de estabilidad en medio de cultivo celular.....	111
3.5 Agradecimientos.....	112
3.6 Referencias.....	112

Capítulo 4. Estudios de desnaturalización de ADN” mediante calentamiento global e hipertermia magnética

4.1 Introducción.....	115
4.1.1 Métodos de liberación controlada.....	117
4.2 Resultados y discusión.....	118
4.2.1 Estudios de la temperatura de desnaturalización (Tm) en hebras conjugadas de ADN’ y APN’.....	118
4.2.1.1 Conjugados ADN’/ADN” y APN’/ADN” en disolución.....	118
4.2.1.2 Hebras conjugadas en la plataforma funcional MNPs-8.....	121
4.2.2 Estudios de liberación de hebras de ADN” conjugadas a la plataforma funcional.....	122
4.2.2.1 Liberación mediante calentamiento global.....	123
4.2.2.2 Optimización del procedimiento general.....	123
4.2.2.2.1 Influencia en la conjugación del fluoróforo unido al ADN”	126

4.2.2.2.2 Influencia del porcentaje de funcionalización con ADN'/APN'.....	128
4.2.2.2.3 Influencia de la longitud de la hebra complementaria en la liberación.....	130
4.2.2.3 Liberación mediante aplicación de hipertermia magnética.....	133
4.2.2.3.1 Procedimiento general.....	134
4.2.2.3.2 Estudio de liberación con y sin ADN' de captura.....	134
4.2.2.3.3 Influencia de la temperatura inicial de la muestra.....	136
4.3 Conclusiones.....	138
4.4 Materiales y métodos.....	140
4.4.1 Estudio de Tm en conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN''.....	140
4.4.1.1. Procedimiento general de conjugación en disolución.....	140
4.4.1.2 Estudio de la Tm en la plataforma funcional MNPs-8.....	141
4.4.1.3 Cuantificación de la Tm de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN''.....	141
4.4.2 Métodos de liberación de las hebras de ADN'' de MNPs-8.....	141
4.4.2.1 Liberación mediante calentamiento global.....	142
4.4.2.2 Liberación mediante aplicación de hipertermia magnética.....	142
4.4.3 Cuantificación de la liberación de ADN''.....	143
4.4.4 Métodos de caracterización.....	143
4.4.4.1 Cuantificación de la temperatura de desnaturalización.....	143
4.4.4.2 Métodos de liberación d hebras de ADN'' complementario....	143
4.4.4.3 Cuantificación de la fluorescencia.....	144

4.4.4.4 Determinación de la concentración de hierro.....	144
4.5 Agradecimientos.....	144
4.6 Referencias.....	144
Capítulo 5. Estudios de liberación de Doxorrubicina y ensayos preliminares <i>in vitro</i>	
5.1 Introducción.....	147
5.1.1 Doxorrubicina.....	147
5.1.1.1 Mecanismos de acción de la doxorrubicina.....	147
5.1.1.1.1 Doxorrubicina en combinación con la nanotecnología.....	149
5.2 Resultados y discusión.....	150
5.2.1 Intercalación de Doxorrubicina en la MNPs-8 y MNPs-10.....	150
5.2.1.1 Procedimiento general de reacción.....	150
5.2.1.2 Cuantificación de la intercalación de doxorrubicina en las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox.....	151
5.2.2 Liberación de doxorrubicina mediante estímulos externos.....	154
5.2.2.1 Liberación mediante calentamiento global.....	154
5.2.2.2 Liberación mediante la aplicación de hipertermia magnética.....	157
5.2.3 Estudios preliminares de viabilidad celular y liberación <i>in vitro</i>	160
5.2.3.1 Estudios de citotoxicidad.....	160
5.2.3.2 Estudios preliminares de hipertermia magnética en células HCT116 con MNPs-8@Dox.....	164
5.3 Conclusiones.....	166
5.4 Materiales y métodos.....	167

5.4.1 Intercalación de doxorrubicina en MNPs-8 y MNPs-10.....	167
5.4.1.1 Procedimiento general.....	167
5.4.1.2 Cuantificación de la intercalación de doxorrubicina.....	168
5.4.2 Métodos de liberación de doxorrubicina.....	168
5.4.2.1 Liberación por calentamiento global.....	168
5.4.2.2 Liberación mediante aplicación de hipertermia magnética.....	169
5.4.2.3 Cuantificación de la liberación de doxorrubicina.....	169
5.4.3 Estudios preliminares de viabilidad celular y liberación <i>in vitro</i>	169
5.4.3.1 Ensayos de citotoxicidad en diferentes líneas celulares HCT116 y MCF-7.....	169
5.4.3.2 Aplicación d hipertermia magnética en HCT116.....	170
5.4.4 Métodos de caracterización.....	171
5.4.4.1 Métodos de liberación de doxorrubicina.....	171
5.4.4.2 Cuantificación de la fluorescencia.....	171
5.4.4.3 Determinación de la concentración de hierro.....	171
5.4.4.4 Cálculo de la concentración de doxorrubicina en la plataforma para ensayos de MTT.....	171
5.4.4.5 Cálculo del porcentaje de viabilidad celular.....	172
5.5 Agradecimientos.....	172
5.6 Referencias.....	172
Conclusiones.....	175
Abreviaturas.....	177

Capítulo 1

Introducción

1.1 NANOMATERIALES Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, manipulación y tratamiento de átomos, moléculas o compuestos individuales para producir nanomateriales y nanodispositivos con aplicaciones especiales en diversos campos como la medicina, electrónica, energía y medioambiente. El término “nano” se deriva de la palabra griega “nanos” que significa “enano”. Esta etimología, y designación en la escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), hace referencia a estructuras extremadamente pequeñas, con un tamaño en alguna de sus dimensiones (altura, longitud y profundidad) del orden de 0.1 a 100 nm en más del 50% de las partículas, según recomendaciones de la Comisión Europea, tanto en materiales naturales como sintéticos, dispersos o formando agregados.^{1,2} Existe una gran variedad de nanomateriales, orgánicos (polímeros, micelas, nanogeles, dendrímeros, liposomas) o inorgánicos (oro, óxidos de hierro, sílica, quantum dots) que presentan diferentes propiedades fisicoquímicas relacionadas con su tamaño (Figura 1). Estos nanomateriales han adquirido a lo largo de las últimas décadas un gran interés debido a la gran variedad de aplicaciones en el campo de la salud y la medicina. Una de sus principales aplicaciones es la entrega de fármacos,³ favorecida por el hecho de que los nanomateriales ayudan a mejorar su tiempo de circulación y biodistribución, solubilidad, y cruce de barreras biológicas.⁴

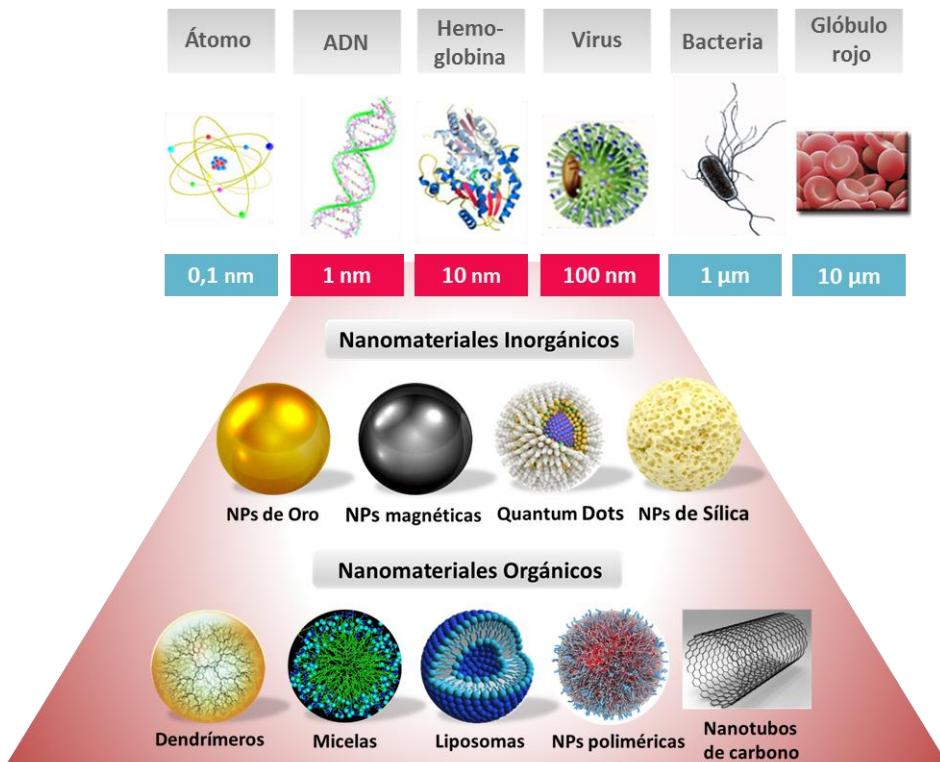


Figura 1. Esquema comparativo de la escala de tamaño de las biomoléculas y los diferentes nanomateriales utilizados en aplicaciones biomédicas.

La nanotecnología aplicada a la medicina se conoce como nanomedicina. El término no está libre de controversia, por lo que la Fundación Europea de la Ciencia (*the European Science Foundation ESF*) en una conferencia de consenso definió a la nanomedicina como “la utilización de nanomateriales como herramientas para el diagnóstico, la prevención y tratamiento de las enfermedades, así como para tener una mayor compresión de la completa pato-fisiología subyacente de la enfermedad. El objetivo final es mejorar la calidad de vida del paciente”.⁵ Esta definición engloba diferentes áreas de la nanotecnología para el desarrollo de aplicaciones en el campo de la medicina, como las indicadas en la figura 2.

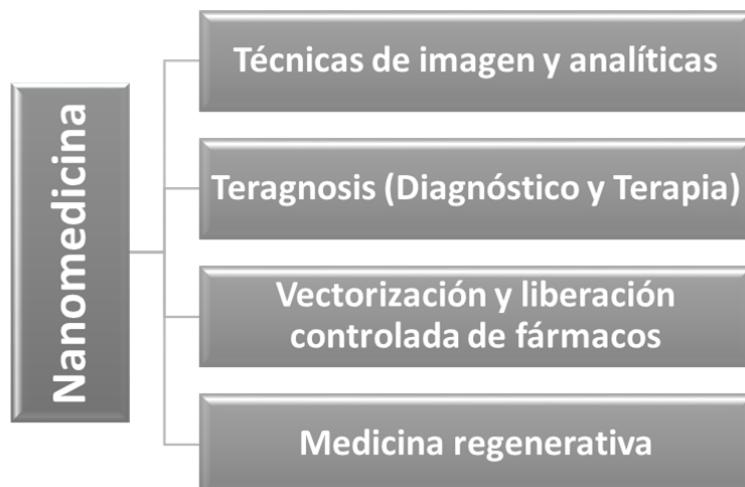


Figura 2. Esquema de las diferentes áreas de la nanomedicina

El nanodiagnóstico está basado en la utilización de técnicas analíticas (nanodispositivos), y de imagen (sistemas de contraste) para una detección más sensible, rápida y precisa a nivel celular o molecular de una enfermedad en sus estadios más tempranos. Los dispositivos para nanodiagnóstico pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo*. Los nanomateriales pueden combinar diagnóstico y terapia (teragnosis) para el desarrollo de herramientas de diagnóstico precoz y tratamiento selectivo de enfermedades. La liberación controlada de fármacos está basada en la utilización de nanoestructuras funcionalizadas con elementos de vectorización que permitan la acumulación y liberación controlada de sustancias activas exclusivamente en células diana. En cuanto al uso de nanomateriales en la medicina regenerativa, se tiene como objetivo estimular o regenerar células, tejidos u órganos con la finalidad de restaurar o establecer su función normal.

1.2. NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE HIERRO

1.2.1. Introducción

Un tipo de nanomaterial ampliamente investigado para aplicaciones biomédicas son las nanopartículas magnéticas (MNPs).⁶ Generalmente, las MNPs se pueden dividir en óxidos metálicos, metales puros y nanocomuestos magnéticos. Los más utilizados en el campo de la biomedicina son el hierro, cobalto, titanio, aleaciones metálicas de Ni y óxido de hierro, ferritas ($\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$, CoFe_2O_4 , MnFe_2O_4). Los óxidos de hierro, generalmente magnetita (Fe_3O_4) y maghemita (Fe_2O_3), son los más estudiados para aplicaciones *in vivo* e *in vitro*,^{7,8} debido a su biocompatibilidad y a sus propiedades magnéticas. En las últimas décadas, el número de estudios de investigación sobre nanopartículas magnéticas de óxido de hierro ha aumentado, debido al desarrollo de

nuevos métodos de síntesis y análisis de MNPs. Estos avances han dado lugar a la optimización de las propiedades físico-químicas de las MNPs, las cuales se van a detallar en el apartado 2.2.⁹

Como consecuencia, el abanico de aplicaciones de las MNPs se ha ampliado notablemente en las últimas décadas.^{6,10,11} En el área clínica, las MNPs de óxido de hierro se han utilizado como sistema de administración (fármacos,¹² genes,^{13,14} y radionúclidos¹⁵), para hipertermia magnética¹⁶ y como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI).¹⁷ En aplicaciones *in vitro* caben destacar el diagnóstico médico, suministro de genes¹⁴ y la separación magnética inmune de células, proteínas, ADN/ARN, bacterias, virus y otras biomoléculas (Figura 3).

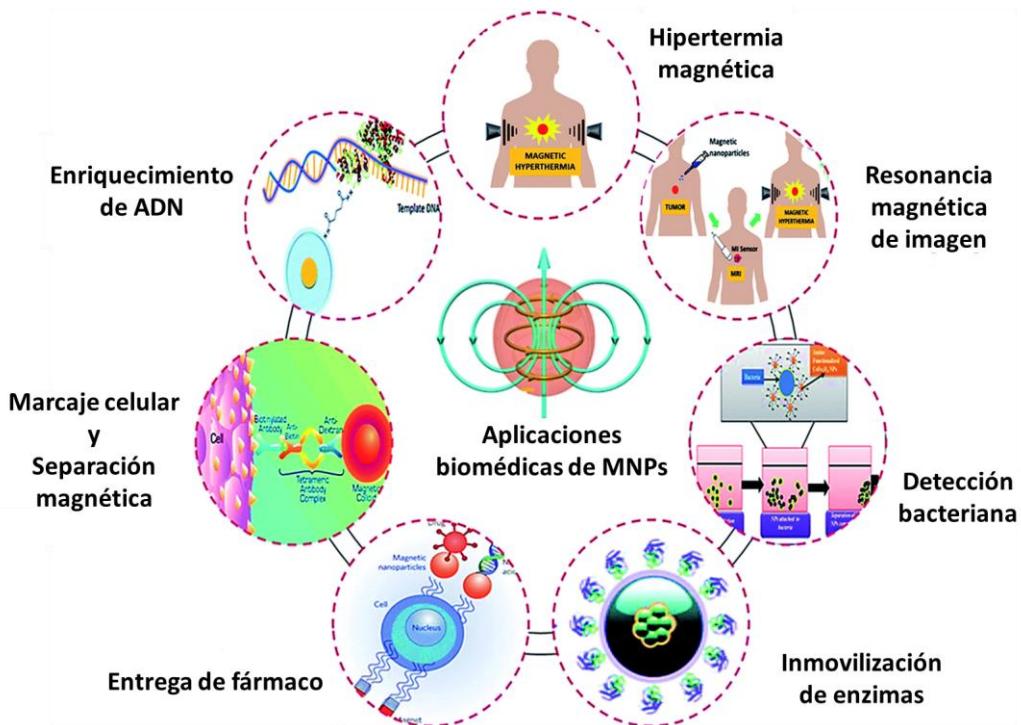


Figura 3. Representación de diferentes aplicaciones biomédicas de MNPs. Adaptado de Bohara et al.¹⁸

Esta tesis doctoral se centra en el uso de las nanopartículas magnéticas para aplicaciones en hipertermia magnética. La palabra “hipertermia” se define como el aumento de temperatura por encima de los valores fisiológicos; trasladado a la terapia del cáncer, este término se define como la generación de calor en el sitio del tumor,¹⁹ provocando cambios fisiológicos en las células tumorales y como resultado la muerte celular.²⁰ Esta terapia complementa a los tratamientos actuales como la quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia génica e inmunoterapia. La hipertermia se puede aplicar de manera local, regional o de cuerpo entero. La administración de hipertermia local está sujeta a una zona localizada pequeña, como puede ser un tumor. Si el área

dañada es un tejido u órgano la hipertermia es regional. La hipertermia de todo el cuerpo se utiliza para tratar metástasis. Como el reto de esta aplicación es calentar las células tumorales sin dañar tejidos sanos, la hipertermia local es la que más está siendo investigada.²¹ Las MNPs han despertado gran interés en el tratamiento del cáncer²² mediante “hipertermia magnética” debido a su capacidad para usar la energía de un campo magnético alterno externo para generar calor a través de varios mecanismos (combinación de mecanismos de relajación de Neel, Brown y perdidas en el ciclo de histéresis, ver detalles en el apartado 1.2.3.3). A través de la aplicación de hipertermia, las células tumorales pueden alcanzar temperaturas en el rango de 41-47 °C.²³

1.2.2. Propiedades físico-químicas de las MNPs

El uso de MNPs en aplicaciones biomédicas (*in vitro* e *in vivo*) depende de sus propiedades, las cuales se ven afectadas por la composición, el método de síntesis elegido, la forma, el tamaño, la distribución de tamaños de las MNPs y las interacciones entre MNPs.

Tamaño y Morfología

El tamaño y la morfología son dos parámetros principales a tener en cuenta a la hora de diseñar las MNPs. El tamaño tiene una gran influencia en la estabilidad coloidal, área superficial, comportamiento *in vitro* e *in vivo*. En el rango de tamaños de 1-100 nm, la estabilidad coloidal de las nanopartículas en disolución se rige principalmente por dos efectos: i) la repulsión /atracción electrostática entre nanopartículas, influenciada por su carga y la fuerza iónica del disolvente, y ii) los efectos estéricos que dependen de los ligandos superficiales.²⁴ Otro parámetro que se ve fuertemente influenciado por el tamaño de las MNPs es el momento magnético de las partículas y su posterior respuesta a los campos magnéticos (véase 1.2.3). Una disminución del tamaño de partícula da como resultado un aumento del área superficial, lo que puede tener implicaciones importantes en el carácter no cristalino de las nanopartículas, por consiguiente, en su momento magnético.²⁵ La pureza y el grado de cristalinidad de las MNPs definen sus propiedades magnéticas.²⁶

Efecto superficial

Las interacciones electrostáticas, relacionadas con la carga superficial, juegan un papel fundamental en la estabilidad coloidal de las MNPs. Hay que tener en cuenta el medio iónico en el que se encuentran las MNPs, incluso a bajas concentraciones, puesto que puede influir en las propiedades físicas, químicas y biológicas.²⁴ Estas condiciones, junto con las fuerzas de atracción magnética, llevan a la agregación de partículas (interacciones dipolo-dipolo, van der Waals). Para evitar la agregación de las

MNPs tanto *in vitro* como *in vivo*, se requiere que las partículas estén funcionalizadas con ligandos que protejan contra la agregación irreversible²⁷. Además, para aplicaciones *in vivo*, es fundamental que al eliminar el campo magnético aplicado a las MNPs, estas presenten un magnetización remanente despreciable o nula, para evitar la agregación y la formación de trombos.^{28–30}

1.2.3 Propiedades magnéticas de las MNPs

1.2.3.1. Tipos de materiales magnéticos

Los materiales se pueden clasificar en las siguientes categorías dependiendo de cómo se encuentren dispuestos sus momentos magnéticos: paramagnéticos, antiferromagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos y superparamagnéticos. En los materiales paramagnéticos los momentos magnéticos se alinean aleatoriamente en ausencia de un campo magnético externo, por lo que la magnetización neta global es cero. Por el contrario, si al material se le aplica un campo magnético, los momentos se encuentran alineados de manera total o parcial en la dirección del campo, presentando una magnetización neta débil.^{31,32} En los materiales ferromagnéticos, todos los momentos magnéticos están acoplados entre sí, se encuentran alineados con el campo externo y mantienen esta orientación incluso después de la retirada del campo. En cuanto a los materiales ferrimagnéticos, los momentos magnéticos se encuentran alineados de manera antiparalela, y la magnetización no es nula puesto que los momentos magnéticos en una dirección son más fuertes que en la dirección opuesta.³³ Los materiales antiferromagnéticos se consideran un caso particular de materiales ferrimagnéticos y tienen una magnetización neta nula en presencia y ausencia de campo externo. Un tipo de magnetismo característico de partículas muy pequeñas es que se define como superparamagnetismo. Los materiales superparamagnéticos presentan sus momentos magnéticos alineados en una disposición favorita, alcanzando de esta manera la magnetización más rápidamente que otros estados magnéticos, y careciendo de memoria magnética. En la figura 4 se muestra la orientación del momento magnético en cada material.

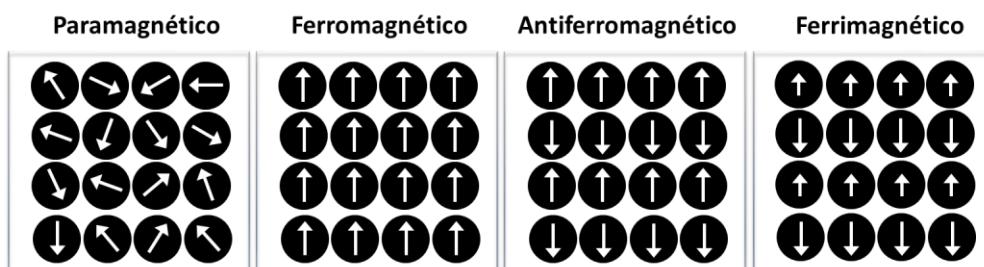


Figura 4. Diferentes tipos de materiales dependiendo de sus propiedades magnéticas y en ausencia de un campo magnético

Las MNPs presentan comportamientos ferromagnético o superparamagnético dependiendo del tamaño de partícula. El ferromagnetismo se debe a la presencia de multidominios magnéticos en las MNPs; cada dominio tiene un vector momento magnético independiente, con diferentes magnitudes y direcciones, atenuando la magnetización total.³⁴ Los multidominios están separados entre sí por paredes actuando de barrera y bloqueando cada momento, con una orientación y alineación independiente entre cada monodominio. Si nos fijamos en la figura 5, al aplicar un campo magnético, estos dominios se desplazan orientándose en la dirección y sentido del campo.³⁵ Sin embargo, cuando el tamaño de MNPs disminuye, el número de dominios decrece hasta un valor que se denomina diámetro crítico (D_{CRIT}), en el que el elevado valor de la energía asociada con la pared de los dominios es termodinámicamente desfavorable, convirtiéndose en monodominio. Por debajo de D_{CRIT} , el material tiene todos sus momentos magnéticos orientados en la misma dirección, ocasionando un dipolo permanente, en presencia y ausencia de campo, comportamiento similar a los materiales ferromagnéticos.^{36,37} Cuando las MNPs siguen disminuyendo de tamaño se llega a un segundo valor crítico, llamado diámetro superparamagnético (D_{SP}), que indica la transición de ferro- a superparamagnetismo.³⁸ Los dipolos se orientan al azar en ausencia de campo, debido a que la energía térmica es superior a la energía de anisotropía magnética de partícula responsable de una dirección determinada.³⁹ Este hecho provoca que el momento magnético en ausencia de campo sea nulo, al igual que en los materiales paramagnéticos. Por otra parte, la intensidad del campo magnético (coercitividad, H_c) que hay que aplicar a los materiales ferromagnéticos para reducir su magnetización a cero, después de llegar a la magnetización por saturación (M_s), nos indica la resistencia del material a ser desmagnetizado. En partículas de tamaño nanométrico, esta propiedad es de enorme interés y depende principalmente del tamaño. Se puede decir que cuando se reduce el tamaño, inicialmente aumenta la coercitividad, y posteriormente tiende a cero tal como muestra la figura 5.

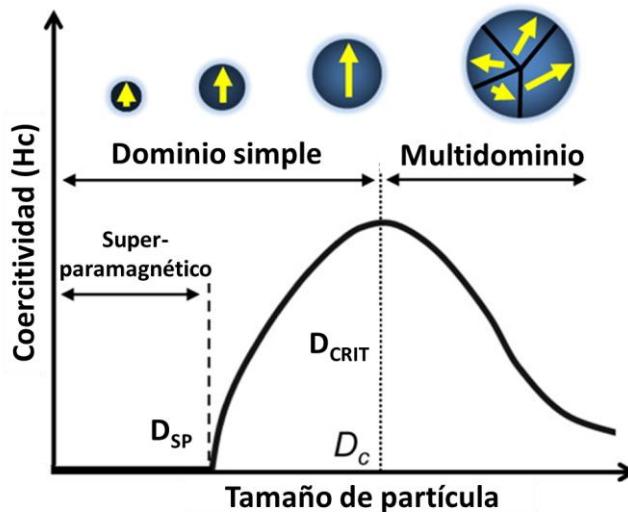


Figura 5. Esquema de la relación entre el tamaño de partícula y la coercitividad, donde D_{CRIT} es el diámetro crítico y D_{SP} es el diámetro superparamagnético. Adaptado de Wu et al.⁴⁰

1.2.3.2. Clasificación de las propiedades magnéticas

Las propiedades magnéticas de las MNPs se pueden clasificar en intrínsecas y extrínsecas. Las propiedades intrínsecas son consecuencia de las interacciones en la escala atómica y se determinan principalmente por la composición química y estructura cristalina. Estas propiedades incluyen:

- i) La *magnetización de saturación* (M_s),³² que es la cantidad máxima de magnetización debida a la alineación de los momentos magnéticos con la dirección del campo aplicado.
- ii) La *temperatura de Curie* (T_C)⁴¹, ésta se conoce como la temperatura a la cual ciertos materiales magnéticos presentan un gran cambio en sus propiedades magnéticas, llevando a la perdida de magnetización intrínseca y reemplazándola por el magnetismo inducido.
- iii) La anisotropía magnetocrystalina, donde los cristales magnéticos presentan diferentes direcciones, que no son equivalentes con la dirección de magnetización. Esta anisotropía ejerce un fuerte efecto sobre las formas de los ciclos de histéresis.

Las propiedades extrínsecas son comunes a toda clase de materiales que presentan las mismas propiedades fisicoquímicas. Estas propiedades incluyen la coercitividad (H_c) y la magnetización remanente (M_r). La primera se define como el campo magnético que hay que aplicar a un material ferromagnético para eliminar la magnetización residual. En cuanto a la segunda propiedad, es el valor de

magnetización residual que se encuentra al eliminar el campo magnético aplicado en un determinado material.

La caracterización magnética da información sobre el tipo de material magnético del que se componen las MNPs (ferro, ferri, o superparamagnéticas), su fuerza magnética y la morfología del material.⁴² Toda esta información se puede obtener de la curva de magnetización (medida de la magnetización en función del campo aplicado). Esta curva, también llamada ciclo de histéresis, es característica de cada tipo de material y permite evaluar las propiedades intrínsecas y extrínsecas de las MNPs (M_s , M_r y H_c). En la figura 6 se muestran las diferencias entre los ciclos de histéresis correspondientes a materiales ferromagnéticos y superparamagnéticos. Los valores nulos de M_r y la H_s en materiales superparamagnéticos favorecen la utilización de este tipo de MNPs para aplicaciones biomédicas, evitando su interacción magnética y la formación de agregados superiores a 100 nm que pueden ser fácilmente absorbidos por los macrófagos en el torrente sanguíneo o causar trombos.

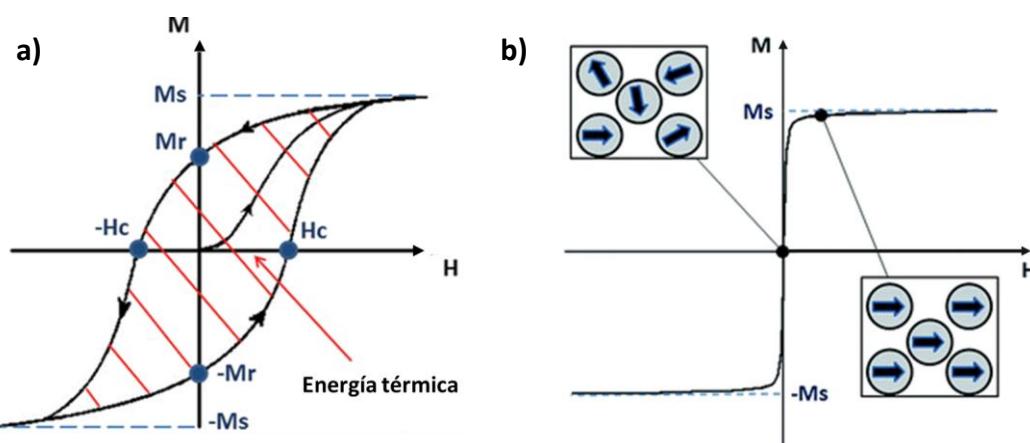


Figura 6. Ciclos de histéresis de a) un material ferromagnético (el área bajo la curva representa la energía disipada durante el ciclo de magnetización), donde M_s es la magnetización de saturación, M_r es la magnetización remanente y H_c es la coercitividad y b) un material superparamagnético (en los recuadros se muestran las orientaciones magnéticas monodominio con una intensidad de campo creciente). Adaptado de Hervault et al.⁴³

1.2.3.3. Generación de calor en hipertermia magnética

Las MNPs pueden generar calor bajo la aplicación de un campo magnético externo a través de tres mecanismos principales:⁴⁴

1. Efectos de inducción por aplicación de un campo electromagnético
2. Fricción entre la MNPs y el medio
3. Relajación de Néel y Brown, y pérdidas en el ciclo de histéresis (para MNPs > 100 nm el mecanismo principal de generar calor son las pérdidas de histéresis debido a

su Multidominio, mientras que la relajación de Néel y Brown ocurre en MNPs más pequeñas, monodominio)

Las MNPs superparamagnéticas monodominio presentan momentos magnéticos orientados al azar en un ferrofluido; como consecuencia, en ausencia de un campo magnético, las MNPs no presentan magnetización neta. Tras la aplicación de un campo magnético alterno, la energía recibida impulsa los momentos magnéticos a superar la barrera de energía generada por la anisotropía para alinearse con el campo. Al eliminar el campo magnético aplicado, los momentos magnéticos se relajan reorientándose al azar mediante dos mecanismos, el de Néel⁴⁵ y el de Brown⁴⁶ como se muestra en la figura 7. Estos dos tipos de mecanismos de relajación son la principal fuente de calor en hipertermia magnética.

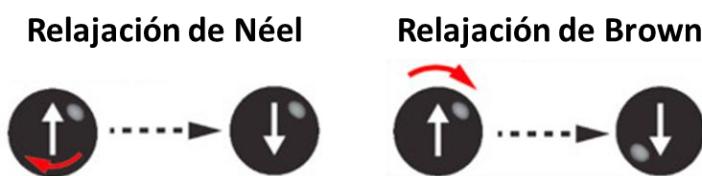


Figura 7. Mecanismos de relajación del momento magnético. Adaptado de Abenojar et al.⁴⁷

El mecanismo de Néel describe la relajación del momento magnético dentro de la partícula, está siempre presente y es el único que interviene en el caso de MNPs en polvo o en líquido congelado, debido a que la partícula no puede girar físicamente. El tiempo de relajación (τ_N) de este mecanismo depende del volumen magnético de la partícula (V_{MAG}), la constante de anisotropía (K_{eff}) (energía necesaria por unidad de volumen para invertir el momento magnético), la frecuencia de Larmor cuyo valor es inverso a τ_0 y es del orden de 10^{-9} s, la temperatura (T) y la constante de Boltzmann (k_B) como se muestra en la ecuación 1.

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_{eff}V_{MAG}}{k_B T}} \quad (1)$$

El mecanismo de relajación de Brown tiene lugar cuando las MNPs se encuentran en disolución, orientándose el momento magnético con la partícula dentro del solvente. El tiempo que tarda en invertirse el momento magnético (τ_B) depende del volumen hidrodinámico de la partícula (V_h), la viscosidad del medio (η), la temperatura absoluta (T) y la constante de Boltzmann (k_B) (ecuación 2).

$$\tau_B = \frac{3V_h\eta}{k_B T} \quad (2)$$

Esta generación de calor producida por los mecanismos mencionados se mide a través de un parámetro físico que mide la eficacia del calentamiento de las MNPs el

cual se puede encontrar en literatura con diferentes nombres: absorción de potencia específica (SPA), tasa de absorción específica (SAR) o pérdida de potencia específica (SPL), en este trabajo se empleara la terminología de SAR que puede definirse como la energía disipada por unidad de masa (W/g):⁴⁸

$$SAR = \frac{m_s c_p}{m_{NP}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (3)$$

donde m_s es la masa del solvente, c_p la capacidad calorífica del solvente y m_{NP} es la masa de las MNPs.

1.3 MNPs DE OXÍDO DE HIERRO BIOFUNCIONALIZADAS EN BIOMEDICINA

La utilización de MNPs de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas requiere la funcionalización de su superficie para aumentar su biocompatibilidad y minimizar los efectos citotóxicos.¹⁸ Esta funcionalización debe de cumplir unos determinados requisitos enumerados a continuación:

- evitar la agregación de las MNPs y conducir a una mejor estabilidad coloidal
- aumentar la afinidad con medios fisiológicos, proteger y estabilizar la superficie de las MNPs
- proporcionar grupos funcionales libres para posterior conjugación de biomoléculas (por ejemplo, carbohidratos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos)

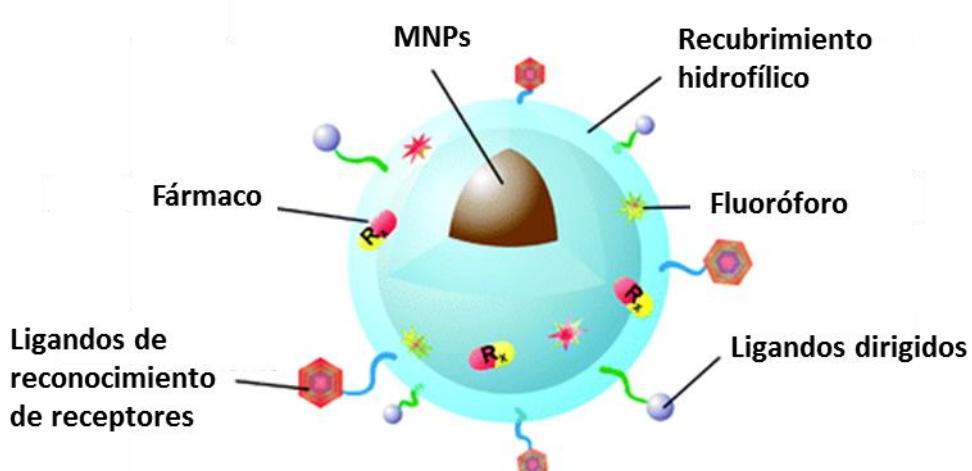


Figura 8. Representación de nanopartículas magnéticas multifuncionalizadas con diferentes biomoléculas. Adaptado de Schladr et al.⁴⁹

La estrategia elegida para la conjugación depende de una combinación de factores como el tamaño, la forma, la estructura, y la química superficial de las MNPs, junto con la naturaleza de los ligandos que recubren la MNPs y sus grupos funcionales disponibles. La elección de una combinación determinada de factores está estrechamente ligada a la aplicación biomédica a la que vaya destinada la nanopartícula. En esta tesis se han elegido MNPs de óxido de hierro esféricas de 12 nm, recubiertas con un polímero anfifílico [poli (anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO)], y funcionalizadas con glucosa y conjugados de ácidos nucleicos (ADN) y péptidonucleicos (APN). Esta plataforma funcional se utilizó como vehículo para el fármaco Doxorrubicina (Dox), el cual se intercaló entre las dobles hélices de ADN y APN y fue liberado *in vitro* mediante la aplicación de hipertermia magnética.

1.3.1 Funcionalización de MNPs con diferentes biomoléculas

1.3.1.1. Ácidos nucleicos (ADN)

En las últimas décadas, la utilización del ADN no sólo se ha centrado en su capacidad de almacenamiento de información genética, sino que ha surgido el diseño de nanoestructuras funcionalizadas con ADN debido a su mayor estabilidad física y química, además de la capacidad para tolerar una variedad de modificaciones en su composición en comparación con otras biomoléculas, como pueden ser las proteínas.^{50,51} Los avances en el diseño, preparación y caracterización de nanopartículas funcionalizadas con ADN han llevado al desarrollo de nuevas aplicaciones en detección, terapia y diagnóstico, así como en liberación controlada de fármacos.⁵²⁻⁵⁴

Las primeras investigaciones sobre la funcionalización de nanopartículas de oro (AuNPs) con ADN llevadas a cabo por Mirkin⁵⁵ y Alivisatos⁵⁶ demostraron la eficacia de la funcionalización utilizando diferentes estrategias de modificación de superficie, como puede ser la modificación con grupos tiol. Estas Au funcionalizadas con ADN fueron utilizadas en la detección colorimétrica de biomoléculas, tras hibridarse con su hebra de ADN complementario de. La relativa facilidad de la síntesis de nanopartículas de Au debida a sus condiciones de reacción suaves , así como la funcionalización con ADN entre grupos tioles presentes en la superficie del Au y la hebra de ADN, la inercia biológica y las propiedades ópticas de los coloides de Au, hacen de este nanomaterial funcionalizado con ADN un candidato ideal para aplicaciones de detección.⁵⁷

En cuanto a la liberación controlada usando nanopartículas funcionalizadas con ADN, Farokhzad, Langer y colaboradores⁵⁸ desarrollaron un conjugado de QD (quantum dots) -aptámero inteligente capaz de producir imágenes de fluorescencia y actuar como vehículo de administrador de fármacos (Dox). El conjugado formado por

QD-Aptámero-Dox se inyectó en las células tumorales, liberándose la Dox por estímulos internos como es el cambio de pH.⁵⁹

Wagner y colaboradores investigaron la internalización *in vitro* en células tumorales de MNPs recubiertas con carboximetildextrano (CDM) y funcionalizadas con diferentes oligonucleótidos utilizados como marcadores tumorales específicos, como por ejemplo el oligonucleótido 19-mer (5-CCGCTGAAGGGCTTGAA-3), fragmento estructural complementario del m-ARN producido a partir del ADN cromosómico del denominado gen de fusión bcr / abl.⁶⁰

Recientemente, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ADN, han despertado gran interés debido a sus propiedades magnéticas, las cuales pueden ser utilizadas para aplicaciones en detección,^{61,62} diagnóstico molecular y terapia.⁶³ A diferencia de las nanopartículas de oro, las MNPs no se funcionalizan tan fácilmente con ADN y requieren manipulación sintética más extensa, ya que inicialmente se deben estabilizar la superficie de estas MNPs mediante un recubrimiento que las haga más soluble en medio acuoso. Este recubrimiento aporta generalmente grupos carboxilo que se unen covalentemente mediante un grupo amino al ADN, reacción que se encuentra desfavorecida por el aporte de cargas de las MNPs y el ADN, provocando impedimento estérico en la funcionalización. Una vez funcionalizadas estas nanopartículas con ADN, pueden hibridarse con su hebra de ADN complementaria mediante la formación de puentes de hidrógeno, proporcionándole una determinada estabilidad térmica.⁶⁴ La estabilidad de la doble hélice de ADN viene marcada por la temperatura a la cual se desnaturala el 50% de las de las hebras hibridadas, denominada temperatura de *melting* (Tm) estudiada con más detalle en el capítulo 4. La estabilidad de la doble hélice también se puede ver modificada por las interacciones dipolares entre el fármaco (por ejemplo, Dox) y las hebras, así como la especial contribución en la intercalación de la unidad de azúcar presente en la molécula de doxorubicina.⁶⁵ El calentamiento local inducido por las MNPs bajo la aplicación de un campo magnético alterno puede provocar la desnaturalización de las dobles hélices de ADN presentes en la superficie de la MNPs y liberar el fármaco o cualquier otra molécula intercalada entre los pares de bases o unidas al ADN complementario.⁶⁶ Investigadores como Derfus⁶⁷ y Ruiz-Hernandez⁶⁸ emplearon diferentes estrategias en el diseño de plataformas funcionalizadas con ADN para liberación mediante estímulos externos. En el primer ejemplo las MNPs de óxido de hierro recubiertas con dextrano se funcionalizaron mediante la formación de enlaces covalentes con hebras de ADN de 30 pb (pares de bases), posteriormente fueron hibridadas con ADN complementario marcado con fluoróforo y encapsuladas en un tapón matrigel. En cuanto al segundo ejemplo, se utilizó una combinación de NPs de sílice mesoporosa y MNPs de magnetita. Las MNPs se encontraba en los poros de las NPs de sílice, funcionalizadas

con ADN mediante un enlace tiol fluoresceína simulando un fármaco. Al producirse la hibridación de las dos hebras de ADN, estas bloquearon los poros de la NPs de sílice. Ambos diseños, en mayor o menor grado, presentaron liberación de los fluoróforos, el primero mediante la aplicación de un campo electromagnético (EFM) a 400KHz durante 40 minutos que tiene un pico de liberación elevado y el segundo al aplicar un campo magnético alterno con amplitud de 24 kA/m y frecuencia de 100 kHz en un baño termostatizado a 37°C, liberándose progresivamente conforme aumenta el tiempo y la temperatura. Recientemente, se ha demostrado que las MNPs funcionalizadas con ADN pueden actuar como “termómetros moleculares” para determinar las temperaturas locales en la superficie de las MNPs mediante la desnaturización del ADN complementario marcado con un fluoróforo. Correlacionando la cantidad de ADN liberado mediante hipertermia magnética (midiendo la temperatura inicial de la muestra) con la una cantidad similar de ADN, pero mediante calentamiento global, la cual se ha liberado a una temperatura determina. La diferencia de estas temperaturas a una concentración similar nos indicara de forma estimada la temperatura que alcanza la MNPs en la superficie.⁶⁹

1.3.1.2. Ácidos péptidonucleicos (APN)

Los ácidos péptidonucleicos (APN) fueron introducidos por Nielsen y colaboradores en 1991 como análogos de los ácidos nucleicos en los que la cadena principal de fosfatos y pentosas del ADN ha sido reemplazada por una cadena peptídica sintética formada por unidades de N-(2-aminoethyl) glicina. (Figura 9) Los APNs son moléculas neutras, aquirales y resistentes a la degradación enzimática por nucleasas y proteasas.⁷⁰

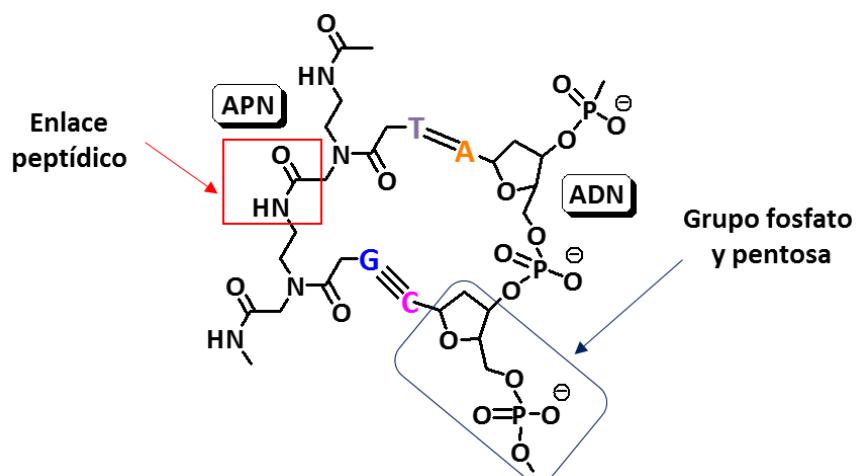


Figura 9. Diferencias estructurales entre el ácido nucleico (ADN) y péptidonucleico (APN)

Esta variación estructural con respecto al ADN natural no impide la unión específica de los APN al ADN y al ARN complementario mediante enlaces de

hidrógeno.⁷¹ La cadena principal del APN no contiene grupos fosfato, por lo que no presenta carga negativa; la ausencia de repulsión electrostática da lugar a una unión más fuerte entre las cadenas de APN/ADN que la de ADN/ADN y, como consecuencia, a una mayor estabilidad térmica traducida en una temperatura de *melting* (Tm).^{72,73} Esta característica, junto con su estabilidad enzimática, hace que los APNs sean candidatos interesantes para numerosas aplicaciones terapéuticas y biomédicas,⁷⁴ por ejemplo como herramientas moleculares en biología y biotecnología,^{75–77} en el desarrollo de agentes terapéuticos antígenos y antisentido dirigidos a determinados genes,^{78,79} y en el desarrollo de biosensores.^{80,81}

Uno de los inconvenientes de la utilización de APN en aplicaciones biomédicas es su baja solubilidad en medios fisiológicos y una capacidad muy limitada para pasar las membranas celulares. La principal estrategia para abordar estos inconvenientes es la modificación química de la cadena principal del APN, introduciendo quiralidad, restringiendo la libertad conformacional, modulando el emparejamiento con las nucleobases o introduciendo grupos funcionales catiónicos que mejoren la solubilidad.⁸²

1.3.1.3 Carbohidratos

Los carbohidratos están localizados en la membrana externa de la mayoría de las células y juegan un papel importante en los procesos de adhesión y reconocimiento celular a través de interacciones atractivas y repulsivas.⁸³ Estos carbohidratos son denominados glicocálix formado glicoconjungados como (glicoproteínas, glicolípidos y/o proteoglicanos) actuando como receptores en diversos procesos patológicos, como por ejemplo infecciones por virus o bacterias.^{84,85}

En cuanto a la biofuncionalización de nanopartículas, los carbohidratos pueden actuar también como agentes estabilizantes de la superficie de MNPs, al igual que el polietilenglicol. Estos carbohidratos actúan inhibiendo las interacciones inespecíficas con las proteínas, evitando la agregación de las MNPs y prolongando el tiempo de vida media en sangre de las MNPs antes de ser reconocidas y eliminadas por el sistema retículo endotelial (RES).^{86,87} En nuestro grupo,⁸⁸ llevó a cabo el estudio de la funcionalización de MNPs con diferentes carbohidratos (glucosa y galactosa) mediante dos estrategias de funcionalización, incorporando antes o después el carbohidrato de ser marcada fluorescentemente la MNPs. Se estudió la relación adecuada de densidad de carbohidratos a funcionalizar en las MNPs para evitar interacciones inespecíficas por la adsorción de proteínas, pero que esta cantidad no impidiera el reconocimiento molecular de diferentes biomoléculas debido a impedimentos estéricos.^{89–94}

En este trabajo se aprovechó la extensa experiencia del grupo de investigación en la funcionalización con carbohidratos, utilizando la glucosa como agente estabilizante pasivando la superficie de las MNPs.

1.3.2 Aplicaciones de MNPs multifuncionalizadas en la terapia del cáncer

1.3.2.1 Introducción

En la actualidad, la eficacia del tratamiento contra el cáncer se evalúa normalmente mediante pruebas *ex vivo* como biopsias (antes, durante y después del tratamiento) o comparando imágenes estructurales del tejido anatómico antes y después de la terapia.⁹⁵ El tiempo entre el comienzo de la terapia y la evaluación inicial del tratamiento puede ser de varias semanas. Este retraso en el comienzo del tratamiento hace que la administración del agente quimioterapéutico no esté ajustada a un tratamiento óptimo. Las MNPs tienen el potencial de seguir el tratamiento a tiempo real de entrega de fármacos, así como la respuesta de los tejidos a este tratamiento.⁹⁶⁻⁹⁸

Gracias a las propiedades de las MNPs, estas pueden ser utilizadas con diversos fines terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer. Este trabajo se va a centrar en el desarrollo de una plataforma funcional capaz de albergar el principio activo entre las dobles hebras de ADN y APN y mediante la aplicación de hipertermia magnética, será liberado de manera contralada el principio activo (doxorrubicina). Esta plataforma en combinación con la quimioterapia puede potenciar los efectos sinérgicos en el tratamiento contra el cáncer en un futuro.

I. Quimioterapéuticos

El objetivo de la quimioterapia es impedir el crecimiento de las células tumorales a través de la acción de productos químicos que inhiben la función celular, mediante la interrupción de la replicación y reparación del ADN, la interferencia con la expresión de proteínas u otros mecanismos para detener o inhibir la división celular.⁹⁹ Los principales inconvenientes en el uso de la quimioterapia son la falta de selectividad en las células tumorales diana, las limitaciones farmacológicas (concentraciones elevadas, tiempos de vida en el torrente sanguíneo, etc.) y la toxicidad que ejercen sobre los tejidos sanos.^{100,101} Una estrategia para minimizar los efectos secundarios de los quimioterapéuticos es unir o encapsular los fármacos a las en MNPs de óxido de hierro. De esta forma los fármacos quedan protegidos de la degradación, y pueden ser dirigidos a las células diana con la posibilidad de aumentar la dosis local y minimizar la toxicidad fuera de la zona a tratar ya que la dosis sistémica es menor. Esta estrategia

se ha utilizado para distintos quimioterapéuticos como la temozolomida (TMZ),^{102,103} la doxorrubicina,¹⁰⁴ el paclitaxel,¹⁰⁵ y el 5-fluorouracilo.^{106,107}

II. Tratamientos de Hipertermia

HT general

La hipertermia se ha introducido como una terapia adyuvante para el cáncer y es un tratamiento prometedor para esta enfermedad. La hipertermia usando temperaturas muy elevadas ($T > 45^{\circ}\text{C}$) se considera como ablación térmica ya que altera muchas proteínas estructurales y funcionales dentro de la célula ocasionando necrosis.^{108,109} La hipertermia más común conduce a temperaturas del rango de 41-43 °C del tejido tumoral.¹¹⁰

HT magnética

La hipertermia magnética aprovecha la propiedad de las MNPs de generar calor a través de varios mecanismos (apartado 1.2.2.3) cuando se les aplica un campo magnético externo.¹¹¹ Un ejemplo de la capacidad de generar calor las MNPs y destruir las células tumorales es el llevado a cabo por Kolosnjaj-Tabi y colaboradores,¹¹² los cuales utilizaron de MNPs recubiertas con polietilenglicol (PEG) inyectadas por vía intratumoral en carcinoma de xenoinjerto de ratones epidermoides. Se les aplicó hipertermia observando un bloqueo en el crecimiento tumoral. Se utilizó (PEG) ya que proporcionaba estabilidad en medios biológicos; además podía actuar de ligando para conjugar con diferentes biomoléculas (dependiendo de la aplicación). La zona tumoral presentaba una temperatura de 8°C más si lo comparábamos con una zona alejada del tejido tumoral. Además, la destrucción de la matriz extracelular por hipertermia ayudo a la penetración del fármaco (Dox), y como consecuencia se produjo una disminución del crecimiento tumoral significativo si se compara con MNPs de óxido de hierro control. Este estudio demuestra la capacidad de estas MNPs de óxido de hierro de actuar como vehículo de liberación de fármacos de una manera controlada, con el ajuste de parámetros como la intensidad y duración de aplicación del campo magnético.

1.3.2.2 Aplicaciones de MNPs en liberación de fármacos quimioterapéuticos

La administración convencional de un quimioterapéutico (en esta tesis Doxorrubicina) se ve limitada por la poca especificidad del mismo para llegar al sitio de acción y la poca difusión a través de barreras biológicas, dando lugar a una actividad farmacológica poco óptima y un mayor número de efectos adversos.¹¹³ Estas

limitaciones se podrían ver superadas encapsulado o uniendo el fármaco a nanodispositivos que actuaran como portadores.

El efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, *enhanced permeation and retention*)¹¹⁴⁻¹¹⁷, se postula como la absorción y acumulación de las MNPs de forma preferente en tumores debido a las elevadas aberturas en los vasos sanguíneos y el escaso drenaje linfático (Figura 9). A través del efecto EPR, las MNPs transportadoras de fármacos pueden acumularse de manera eficaz en el tumor limitando el crecimiento de las células tumorales. Sin embargo, esta vectorización pasiva depende de la captación de MNPs por las células cancerosas, y está limitada por la falta de control en sitios específicos del tumor y la liberación temprana del fármaco en la circulación sanguínea. Las estrategias de vectorización activa se centran en la unión ligando específico – célula entre los receptores de superficie de células malignas y biomoléculas complementarias, como son los anticuerpos, péptidos y carbohidratos, determinando su eficacia en la selección de tumores.¹¹⁸ Estas limitaciones se han conseguido superar mediante el desarrollo de MNPs sensibles a distintos estímulos para lograr una acumulación mediante el uso de un imán como guía y liberación a demanda de fármacos con un control preciso y adaptado. Además, mediante el desarrollo de MNPs sensibles a distintos estímulos se puede lograr la liberación controlada de fármaco en el sitio del tumor.¹¹⁹

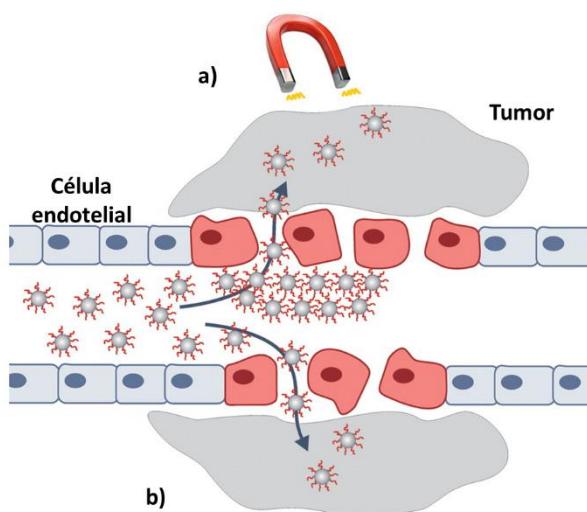


Figura 9. Representación del destino *in vivo* de MNPs si se le aplica un campo magnético externo o no hacia las células diana. a) acumulación activa de MNPs en células tumorales mediante el uso de un imán como guía. b) acumulación de MNPs en células tumorales a través del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Adaptado de Reddy et al.¹²⁰

- **Liberación controlada de fármacos basada en MNPs sensibles a estímulos**

Los nanomateriales sensibles a los estímulos se pueden clasificar en dos tipos, aquellos que responden a estímulos internos (intratumorales) y a estímulos externos (figura 10). Los nanomateriales sensibles a estímulos internos utilizan las características microambientales del tejido tumoral (pH ácido, hipoxia y sobreexpresión de una enzima específicas a una patología) para la focalización o la liberación controlada de una carga útil. El pH del tumor es ligeramente más ácido (6.0 – 6.9) con respecto al de la sangre y tejidos sanos (7.4), debido a que las células cancerosas producen metabolitos ácidos como consecuencia de la angiogénesis e hipoxia bajo condiciones insuficientes de oxígeno y nutrientes.^{121,122} Otra característica específica del tumor es el microambiente reductor, debido a la sobreproducción de biomoléculas reductoras bajo las condiciones hipóxicas presentes en las células cancerosas.^{123–125} Otra propiedad general del tejido tumoral es la sobreexpresión de algunas proteínas sensibles a enzimas, como por ejemplo las metaloproteinasas de la matriz.¹²⁶

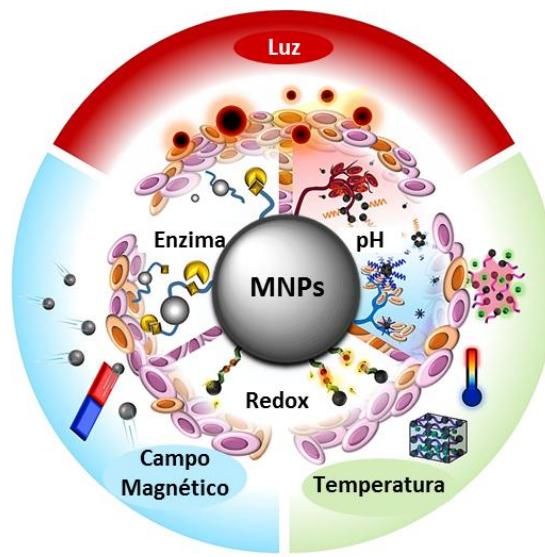


Figura 10. Representación de MNPs sensibles a diferentes estímulos, internos (pH, enzimas y redox) y externos (campo magnético, luz y temperatura). Adaptado de Kang et al.¹²⁷

El microambiente tumoral es a menudo complejo, difícil de cuantificar y varía en cada paciente,¹²⁸ por lo que las fluctuaciones endógenas que son producidas no favorece la utilización de estímulo internos. Por lo tanto, la utilización de estímulos externos como luz, temperatura o la aplicación de un campo magnético, proporciona un mayor control en la liberación del fármaco en el sitio deseado, minimizando los efectos secundarios ocasionados por restos de agentes terapéuticos, potenciando el

efecto citotóxico de manera específica en el tejido diana. Un ejemplo de aplicación de un estímulo externo es la hipertermia magnética, la cual es empleada en la plataforma de MNPs multifuncionalizadas creadas en este trabajo de tesis.

Liberación de fármacos mediante hipertermia magnética

El diseño de un sistema de liberación de fármacos mediante la activación magnetotérmica remota ha sido motivo de estudio por diversos investigadores debido a la liberación de energía térmica de MNPs de óxido de hierro al aplicar un campo magnético alterno.^{129,130} La incorporación de fármacos a la plataforma de MNPs depende en gran medida de la adsorción física o electrostática en la superficie de las MNPs recubiertas o no, quedando el fármaco adsorbido expuesto a la liberación incontrolada.¹³¹ Una estrategia ampliamente investigada en el diseño de una plataforma para la liberación de agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, Dox) de forma controlada mediante la aplicación de hipertermia magnética, es la introducción de un espaciador termolábil, como pueden ser la doble hélice de ADN,^{67,68,132} y grupos azo. Un ejemplo de espaciador termolábil con grupos azo, concretamente (azobis [N-(2-carboxietil) -2-metilpropionamidina]) consistió en la unión de azo a nanopartículas de óxido de hierro. La fluoresceína amina (FA) se unió a la molécula azo en la superficie de MNPs funcionalizada con espaciadores de poli (etilenglicol) (PEG) de diferentes pesos moleculares. El calentamiento local que se produjo al aplicar un campo magnético externo fue de hasta 45 ° C, a distancias por debajo de 0,5 nm desde la superficie de la nanopartícula, que se descomponía exponencialmente a medida que aumenta la distancia.¹³³

1.3.2.3 Aplicaciones de MNPs en hipertermia magnética

En el caso de la hipertermia magnética se tienen que tener en cuenta tanto aspectos intrínsecos de la propia técnica (frecuencia y amplitud del campo magnético), como el diseño específico de MNPs multifuncionalizadas con diferentes biomoléculas (por ejemplo, su tamaño, morfología y recubrimiento). Además, el diseño de MNPs para aplicaciones en hipertermia magnética tiene que seguir una serie de criterios que incluyan los factores más relevantes en el proceso de transferencia de calor en medios biológicos a 3 escalas diferentes de longitud (nano-, micro- y macroescala).¹³⁴

Elementos de nanoescala: nanopartículas y proteínas

Las MNPs para aplicaciones biomédicas *in vivo* necesitan tener un núcleo inorgánico con buenas propiedades magnéticas, así como una magnetización remanente nula (MNPs superparamagnéticas) para evitar su aglomeración, y una alta susceptibilidad magnética que permita una respuesta magnética intensa y rápida,

minimizando así el tiempo de exposición al campo magnético externo. El control del tamaño, forma y cristalinidad asegura propiedades magnéticas óptimas.^{135,136} Otro factor importante es el recubrimiento de las MNPs para evitar su oxidación, asegurar su estabilidad coloidal y dotarlas de grupos funcionales. Además, el recubrimiento elegido tiene que ser biocompatible y evitar la absorción de proteínas plasmáticas y la formación de la corona de proteínas, la cual puede provocar una cancelación de las funciones de las MNPs y puede afectar de manera drástica la biodistribución y biodegradación de las MNPs.^{137,138}

Elementos de microescala: células

La interacción de las MNPs con células es un proceso complejo. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las MNPs y el tiempo de contacto entre MNPs y células, se pueden desencadenar efectos citotóxicos o el proceso de internalización celular de las MNPs.¹³⁹ Las MNPs terminarían internalizadas en compartimentos celulares con estructura heterogénea y parámetros fisicoquímicos variables (composición, viscosidad y pH entre otros). Esto provocaría una distribución heterogénea de las MNPs en diferentes regiones de la célula; además, la generación de calor por las MNPs se vería limitada por la dificultad de movimiento de estas en medios con alta viscosidad (ver el mecanismo de relajación de Brown), reduciendo por tanto el efecto de la hipertermia magnética. En cuanto a la sensibilidad térmica de las células, objetivo principal de las aplicaciones de hipertermias magnética, varía durante el ciclo celular. Dependiendo de la estimulación térmica, se pueden observar daños en la estructura celular o en el contenido cromosómico. Debido a su metabolismo acelerado, las células tumorales son muy vulnerables a los efectos de la hipertermia, la cual puede provocar alteraciones del núcleo, cambios en la organización del citoesqueleto, plegamiento incorrecto de proteínas y aparición de acidosis o apoptosis ocasionada por la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico.^{140,141}

Elementos de macroescala: tejidos

El último desafío en el diseño de MNPs para obtener buenos resultados en la aplicación de hipertermia magnética en medios biológicos es la diversidad física y química de las regiones tumorales, a través del efecto EPR (ver apartado 1.3.3.2). La replicación anormal de las células cancerosas da lugar a una alta tasas de crecimiento vascular irregular con gradientes de oxígeno pronunciados. En consecuencia, el recubrimiento de las MNPs tiene que soportar el estrés oxidativo y el ambiente ácido sin que las biomoléculas conjugadas en la MNP se vean alteradas. El recubrimiento es por tanto un parámetro crítico en el rendimiento de la hipertermia magnética.¹⁴²

Para obtener un diseño adecuado de MNPs para aplicaciones en hipertermia magnética se tienen que modular los factores que afectan a las 3 escalas anteriormente indicadas. Unas buenas propiedades magnéticas se pueden obtener controlando el tamaño, la forma y el recubrimiento de las MNPs.

Debido a los efectos que se producen en las MNPs a diferentes escalas ste el tratamiento de hipertermia magnética basado en MNPs de óxido de hierro (también conocida como hipertermia fluida magnética, HFM) tiene una serie de ventajas con respecto a la hipertermia convencional:

- 1) Las nanopartículas magnéticas pueden ser calentadas usando campos magnéticos alternos de frecuencias no tóxicas para el tejido sano (generalmente en el rango de las radiofrecuencias).¹⁴³
- 2) Las nanopartículas magnéticas pueden ser derivatizadas con ligandos tumorales para una vectorización más selectiva de las mismas en los tejidos malignos.
- 3) El uso de nanopartículas magnéticas como transportadores de fármacos puede ser utilizado para inducir una liberación controlada de fármacos, proporcionando de esta manera nuevos y más eficaces sistemas terapéuticos multimodales.^{144,145}
- 4) Las MNPs debidamente funcionalizadas pueden atravesar barreras biológicas, por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB), por lo que se pueden utilizar en el tratamiento de tumores cerebrales.¹⁴⁶

Los ensayos llevados a cabo en la evaluación preclínica del tratamiento de hipertermia de fluidos magnéticos (MFH), tales como las MNPs de óxido de hierro, consta de en diferentes combinaciones de tratamientos terapéuticos contra el cáncer.

1. Hipertermia magnética y quimioterapia

La hipertermia magnética también se ha utilizado en combinación con quimioterapia para obtener una respuesta antitumoral más eficaz. Por ejemplo, el uso combinado de MNPs de óxido de hierro cargadas con *cis*-platino y la aplicación de hipertermia ha dado lugar a un efecto sinérgico en células tumorales de sarcoma de rata BP6.¹⁴⁷ Al igual que las MNPs de óxido de hierro recubiertas con polímeros termosensibles como el poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) , estas MNPs aumentaron su temperatura cuando se le aplicó un campo magnético alterno provocando la liberación del fármaco encapsulado.¹⁴⁸

2. Hipertermia magnética y radioterapia

La combinación de hipertermia magnética con radioterapia provoca la muerte celular tras su aplicación. Un ensayo llevado a cabo fue la incubación de una línea celular de cáncer de próstata humana con MNPs recubiertas con dextrano, de unos 20 nm, y se expusieron a un campo magnético externo. Los resultados observados indicaron unos niveles de muerte celular significativos en comparación con la aplicación de radioterapia en ausencia de MFH.¹⁴⁹

Además de las aplicaciones mencionadas, la hipertermia magnética (MFH) al igual que la hipertermia tradicional (HT), se ha usado para aumentar la acumulación de compuesto anticanceroso en la zona dañada, alterando la permeabilidad local del tejido. El calentamiento del tumor ayuda en el aumento del flujo sanguíneo, así como su permeabilidad microvascular y oxigenación,¹⁵⁰⁻¹⁵³ más accesible a fármacos, sistemas de liberación de fármacos o macromoléculas. Esto ayuda a lograr una regresión del tumor pretratado con hipertermia magnética antes de la administración de MNP cargadas con fármacos con un tiempo de circulación mayor

3. Hipertermia magnética (MFH) dirigida

El tratamiento de hipertermia magnética todavía puede mejorar más con la inducción selectiva de calor en el tejido tumoral, conseguir una distribución homogénea de temperaturas en la zona a tratar y evitar que sea una técnica invasiva. En el caso ideal, la técnica debería combinar la administración de una cantidad mínima de fluido magnético con la generación de un calentamiento suficiente dentro de los parámetros de campo apropiados (frecuencias entre 0.05 y 1,2 MHz y campos < 15 kA/m). Los requisitos mencionados anteriormente se pueden lograr funcionalizando las MNPs con ligandos específicos dirigidos a células tumorales, como por ejemplo MAb, FA o receptores HER2 que se unen específicamente a la células tumorales tras la inyección, internalizándose y de este modo aumentan las concentraciones intracelulares de MNPs.^{154,155}

Hasta la fecha, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos usando hipertermia magnética en combinación con radioterapia. El primer estudio se realizó con MNPs de óxido de hierro recubiertas con aminosilano de la empresa Magforce (MagForce[®] MFL AS, MagForce[®] Nanotechnologies GmbH) para tratar a pacientes que padecían cáncer de próstata localmente recurrente, usando hipertermia magnética. Las temperaturas que se alcanzaron en los tejidos de próstata fueron del rango de 41 °C a 55 °C, bien

toleradas por los pacientes en general.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Los resultados fueron prometedores, aunque había que tener en cuenta la línea celular puesto que todas no presentan la misma sensibilidad al tratamiento. También se ha experimentado con pacientes con glioblastoma multiforme, aplicándoles hipertermia magnética bien tolerada por todos los pacientes. La temperatura intratumoral que se alcanzó fue de 44.6 °C, observando una disminución o ausencia de efectos secundarios, así como un control del crecimiento tumoral.^{159,160} Este tratamiento en combinación con la radioterapia logró disminuir el tumor y aumentar la supervivencia de los pacientes con tumor cerebral.

1.4. RETOS EN EL USO DE MNPs PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

En el campo de la nanomedicina, es necesario evaluar los posibles riesgos asociados a la exposición del organismo a diferentes nanomateriales. Comprender la interacción de las MNPs con las células, así como su impacto toxicológico es crucial para la aplicación *in vivo* de MNPs.¹⁶¹ Se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* que las MNPs, pueden dañar el funcionamiento de las células a través de numerosos mecanismos, como la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) importante contribuyente a la toxicidad de nanopartículas de óxido de hierro sin recubrimiento,¹⁶² la generación de radicales libres, daño del ADN y deterioro de la función mitocondrial, entre otros.^{163,164}

Es importante destacar que la toxicidad de las MNPs puede depender de numerosos factores, como son la dosis, composición química, tamaño, química superficial, solubilidad, vía de administración, biodistribución, biodegradabilidad y farmacocinética.¹²

Una primera aproximación para estimar la citotoxicidad de las MNPs consiste en la realización de estudios de citotoxicidad *in vitro*.^{165,166} La toxicidad en ensayos *in vitro*, va a depender principalmente de la superficie y tipo de recubrimiento (orgánico e inorgánico) de las MNPs, el tiempo de exposición y las interacciones que se produzcan entre las MNPs y las células, así como el tipo de línea celular empleada. El tipo de recubrimiento superficial de las MNPs en contacto con medios fisiológicos puede ser inestables, formando agregados y por tanto creando una toxicidad en la célula y tejidos. Por tanto, se requiere una evaluación caso a caso de la citotoxicidad de las MNPs en medio de cultivo celular para obtener una buena viabilidad celular.

Hasta la fecha, se ha descrito el uso de distintos tipos de polímeros sintéticos y naturales para el recubrimiento de MNPs: dextrano, polietilenglicol (PEG), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli-L-lisina (PLL).¹⁶⁷ Un ejemplo es el PEG el cual no presentaba efecto tóxico sobre células fibroblásticas, proporcionando un aumento significativo en el tiempo de circulación sanguínea al minimizar o eliminar la adsorción

de proteínas,¹⁶⁸ incluso usando diferentes tipos de PEG,¹⁶⁹ derivados de PEG, o diferentes polímeros.^{170,171} Otro tipo de recubrimiento como alternativa a PEG, son los carbohidratos (glucosa, lactosa y galactosa), los cuales actúan pasivando la superficie de las MNPs, además de permitir la internalización en células cancerosas, sin presentar toxicidad.¹⁷²

Otro factor a tener en cuenta a la hora de evaluar la toxicidad es el tamaño de las MNPs. Generalmente, son más tóxicas las partículas de menor tamaño debido a su mayor área superficial que las hace más reactivas, estas interactúan con las membranas celulares provocando un efecto citotóxico, además de ser retenidas durante más tiempo en el cuerpo. Un estudio con MNPs de 30 nm presentaba mayores efectos tóxicos que una de 500 nm, causando un daño mayor al ADN las de 30 nm a una misma concentración.¹⁷³ La gran relación superficie/volumen de las nanopartículas nanométricas provoca la adsorción de proteínas plasmáticas, que son fácilmente reconocidas por los macrófagos del sistema reticuloendotelial haciéndolas vulnerables a una rápida eliminación sin alcanzar el objetivo final.¹⁷⁴

1.5. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es el desarrollo de una plataforma funcional compuesta por nanopartículas de óxido de hierro (MNPs) funcionalizadas con ácidos nucleicos y péptidonucleicos, hibridadas con su hebra de ADN'' complementaria, e intercalado el principio activo (doxorubicina). Este diseño será aplicado en la liberación controlada de fármacos basada en el uso de la hipertermia magnética, con aplicaciones futuras en diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Basándonos en el objetivo principal, en el capítulo 2 se describe la síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (FexOy) con morfología esférica y tamaño de 12 nm por descomposición térmica de un precursor organometálico, su estabilización en medio acuoso, y su caracterización mediante diferentes técnicas.

En el capítulo 3 se centra en el desarrollo de una plataforma basada en MNPs funcionalizadas con hebras de ácidos nucleicos (ADN') y péptidonucleicos (APN'). La conjugación de ADN'/APN' con su hebra complementaria (ADN'') marcada con un fluoróforo facilita, de manera indirecta, la estimación de la cantidad de ADN'/APN' unida covalentemente a las nanopartículas. Asimismo, se ha comprobado que la presencia de un derivado de glucosa como agente pasivante de la superficie de las MNPs es fundamental para asegurar la estabilidad de la plataforma en medio de cultivo celular.

En el capítulo 4 se detallan los estudios llevados a cabo para estudiar la temperatura de desnaturalización de las hebras conjugadas de APN'-ADN'' y ADN'-ADN''. Se ha estudiado la influencia que ejercen en la temperatura de desnaturalización diferentes parámetros, como el tampón utilizado, su concentración, así como las diferentes longitudes de las cadenas de ADN'' marcadas con fluoróforos. Se ha optimizado y cuantificado el proceso de liberación de controlada de ADN'' complementario utilizando dos técnicas diferentes, el calentamiento global y la hipertermia magnética.

Finalmente, en el capítulo 5 se describe la intercalación del fármaco doxorrubicina (Dox) en los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' en la plataforma desarrollada en el capítulo 3. Se ha estudiado la liberación de la cantidad de Dox intercalada mediante la aplicación de calentamiento global e hipertermia magnética. Por último, se han llevado a cabo ensayos preliminares de citotoxicidad y liberación de Dox mediante hipertermia magnética *in vitro*.

1.6. REFERENCIAS

- (1) European Commission. Recomendación de La Comisión de 18 de Octubre de 2011 Relativa a La Definición de Nanomaterial. *D. Of. la Unión Eur.* **2011**, 696/EU, 275/38-275/40.
- (2) Nikalje, A. P. Nanotechnology and Its Applications in Medicine. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **2015**, 5, 81–89.
- (3) Spencer, D. S.; Puranik, A. S.; Peppas, N. A. Intelligent Nanoparticles for Advanced Drug Delivery in Cancer Treatment. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2015**, 7, 84–92.
- (4) Singh, R.; Lillard, J. W. Nanoparticle-Based Targeted Drug Delivery. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, 86, 215–223.
- (5) European Science Foundation's Forward Look Nanomedicine: An EMRC Consensus Opinion. **2005**, <http://www.esf.org>.
- (6) Schütt, W.; Grüttner, C.; Häfeli, U.; Zborowski, M.; Teller, J.; Putzar, H.; Schümichen, C. Applications of Magnetic Targeting in Diagnosis and Therapy—Possibilities and Limitations: A Mini-Review. *Hybridoma* **1997**, 16, 109–117.
- (7) Torchilin, V. P. Drug Targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 2, 81–91.
- (8) Rudge, S.; Peterson, C.; Vessely, C.; Koda, J.; Stevens, S.; Catterall, L. Adsorption and Desorption of Chemotherapeutic Drugs from a Magnetically Targeted Carrier (MTC). *J. Control. Release* **2001**, 74, 335–340.
- (9) Ling, D.; Hyeon, T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Small* **2013**, 9, 1450–1466.

- (10) Hornes, E.; Ugelstad, J.; Uhlen, M. Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 43–54.
- (11) Teller, J.; Xu, B.; Holgersson, J. A Novel and Rapid Method for Quantification of Magnetic Nanoparticle – Cell Interactions Using a Desktop Susceptometer. *Nanotechnology* **2004**, *15*, 457–466.
- (12) Arruebo, M.; Fernández-pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
- (13) Davis, S. S. Biomedical Applications of Nanotechnology - Implications for Drug Targeting and Gene Therapy. *Trends Biotechnol.* **1997**, *7799*, 217–224.
- (14) Scherer, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Krüger, A.; Gänsbacher, B.; Plank, C. Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery by Magnetic Force in Vitro and in Vivo. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 102–109.
- (15) Schu, W.; Gru, C.; Teller, J.; Westphal, F.; Ha, U.; Paulke, B.; Goetz, P.; Finck, W. Biocompatible Magnetic Polymer Carriers for In Vivo Radionuclide Delivery. *Artif. Organs* **1999**, *23*, 98–103.
- (16) Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fa, H.; Felix, R. Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer Treatment with AC Magnetic Field Induced Excitation of Biocompatible Superparamagnetic Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 413–419.
- (17) Babes, L.; Jacques, J.; Jeune, L.; Jallet, P. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents : A Parametric Study. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 474–482.
- (18) Bohara, R. A.; Thorat, N. D.; Pawar, S. H. Role of Functionalization: Strategies to Explore Potential Nano-Bio Applications of Magnetic Nanoparticles. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 43989–44012.
- (19) Soundarya, N.; Zhang, Y. Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications. *Recent Patents Biomed. Eng.* **2008**, *1*, 34–42.
- (20) G van Loo, X Saelens, M van Gurp, M MacFarlane, S. J. M. et al. The Role of Mitochondrial Factors in Apoptosis: A Russian Roulette with More than One Bullet. *Cell* **2006**, *440*, 1088.
- (21) M. H. Falk, R. D. I. Hyperthermia in Oncology. *Int. J. Hyperth.* **2001**, *17*, 1–18.
- (22) Dobson, Q. A. P. and N. T. K. T. and S. K. J. and J. Progress in Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2009**, *42*, 224001.
- (23) Thomas, L. A.; Dekker, L.; Kallumadil, M.; Southern, P.; Wilson, M.; Nair, S. P.; Pankhurst, Q. A.; Parkin, I. P. Carboxylic Acid-Stabilised Iron Oxide Nanoparticles for Use in Magnetic Hyperthermia. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6529.

- (24) Pfeiffer, C.; Rehbock, C.; Huhn, D.; Carrillo-Carrion, C.; de Aberasturi, D. J.; Merk, V.; Barcikowski, S.; Parak, W. J. Interaction of Colloidal Nanoparticles with Their Local Environment: The (Ionic) Nanoenvironment around Nanoparticles Is Different from Bulk and Determines the Physico-Chemical Properties of the Nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20130931–20130931.
- (25) Marco, M. Di; Port, M.; Couvreur, P.; Dubernet, C.; Ballirano, P.; Sadun, C. Structural Characterization of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO) Particles in Aqueous Suspension by Energy Dispersive X-Ray Diffraction (EDXD). *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10054–10059.
- (26) Miser, D. E.; Shin, E. J.; Hajaligol, M. R.; Rasouli, F. HRTEM Characterization of Phase Changes and the Occurrence of Maghemite during Catalysis by an Iron Oxide. *Appl. Catal. A Gen.* **2004**, *258*, 7–16.
- (27) Thode, K.; Müller, R. H.; Kresse, M. Two-Time Window and Multiangle Photon Correlation Spectroscopy Size and Zeta Potential Analysis — Highly Sensitive Rapid Assay for Dispersion Stability. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1317–1324.
- (28) López-López, M. T.; de Vicente, J.; Bossis, G.; González-Caballero, F.; Durán, J. D. G. Preparation of Stable Magnetorheological Fluids Based on Extremely Bimodal Iron-magnetite Suspensions. *J. Mater. Res.* **2005**, *20*, 874–881.
- (29) López-López, M. T.; Durán, J. D. G.; Delgado, A. V.; González-Caballero, F. Stability and Magnetic Characterization of Oleate-Covered Magnetite Ferrofluids in Different Nonpolar Carriers. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *291*, 144–151.
- (30) Viota, J. L.; Durán, J. D. G.; González-Caballero, F.; Delgado, A. V. Magnetic Properties of Extremely Bimodal Magnetite Suspensions. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *314*, 80–86.
- (31) Teja, A. S.; Koh, P. Synthesis , Properties , and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2009**, *55*, 22–45.
- (32) Neuberger, T.; Scho, B.; Hofmann, M.; Rechenberg, B. Von. Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications : Possibilities and Limitations of a New Drug Delivery System. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 483–496.
- (33) Soler, M. A. G.; Paterno, L. G. *Magnetic Nanomaterials*; 2016.
- (34) Sorensen, C. M. Magnetism. In *Nanoscale Materials in Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001; pp. 169–221.
- (35) Decurtins, S. Magnetic Materials. Fundamentals and Device Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42*, 5791–5791.
- (36) McKeehan, L. W. The Molecular Field and Atomic Order in Ferromagnetic Crystals and in Hydrogenised Iron. *Nature* **1930**, *126*, 274–275.

- (37) Kittel, C. Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles. *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 965–971.
- (38) Hergt, R.; Dutz, S.; Röder, M. Effects of Size Distribution on Hysteresis Losses of Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia. *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 1–12.
- (39) Batlle, X. Finite-Size Effects in Fine Particles: Magnetic and Transport Properties. *J. Phys. D Appl. Phys* **2002**, *35*, R15–R42.
- (40) Wu, L.; Mendoza-Garcia, A.; Li, Q.; Sun, S. Organic Phase Syntheses of Magnetic Nanoparticles and Their Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10473–10512.
- (41) Baaziz, H.; Tozri, A.; Dhahri, E.; Hlil, E. K. Size-Induced Griffiths Phase-like in Ferromagnetic Metallic La_{0.67}Sr_{0.33}MnO₃ Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2016**, *403*, 181–187.
- (42) Cullity, B. D.; Graham, C. D. Introduction to Magnetic Materials. In *Addison-Wesley, Menlo Park, Calif, USA*; 1972.
- (43) Hervault, A.; Thanh, N. T. K. Magnetic Nanoparticle-Based Therapeutic Agents for Thermo-Chemotherapy Treatment of Cancer. *Nanoscale* **2014**, *6*, 11553–11573.
- (44) Giustini, A. J.; Petryk, A. A.; Cassim, S. A.; Tate, J. A.; Baker, I.; Hoopes, P. J. Magnetic Nanoparticle Hyperthermia in Cancer Treatment. *Nano Life* **2013**, *1*, 1–23.
- (45) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (46) Shen, J. P.; Doi, M. Effective Viscosity of Magnetic Fluids. *J. Phys. Soc. Japan* **1990**, *59*, 111–117.
- (47) Abenojar, E. .; Wickramasinghe, S.; Bas-Concepcion, J.; Cristina, A.; Samia, S. Structural Effects on the Magnetic Hyperthermia Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2016**, *26*, 440–448.
- (48) Shah, R. R.; Davis, T. P.; Glover, A. L.; Nikles, D. E.; Brazel, C. S. Impact of Magnetic Field Parameters and Iron Oxide Nanoparticle Properties on Heat Generation for Use in Magnetic Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *387*, 96–106.
- (49) Schladt, T. D.; Schneider, K.; Schild, H.; Tremel, W. Synthesis and Bio-Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Medical Diagnosis and Treatment. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 6315–6343.

- (50) Wang, H.; Yang, R.; Yang, L.; Tan, W. Nucleic Acid Conjugated Nanomaterials for Enhanced Molecular Recognition. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2451–2460.
- (51) White, K. A.; Rosi, N. L. Gold Nanoparticle-Based Assays for the Detection of Biologically Relevant Molecules. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 543–553.
- (52) Jiang, D.; England, C. G.; Cai, W. DNA Nanomaterials for Preclinical Imaging and Drug Delivery. *J. Control. Release* **2016**, *239*, 27–38.
- (53) Wu, D.; Wang, L.; Li, W.; Xu, X.; Jiang, W. DNA Nanostructure-Based Drug Delivery Nanosystems in Cancer Therapy. *Int. J. Pharm.* **2017**, *533*, 169–178.
- (54) Samanta, A.; Medintz, I. L. Nanoparticles and DNA - a Powerful and Growing Functional Combination in Bionanotechnology. *Nanoscale* **2016**, *8*, 9037–9095.
- (55) Mirkin, C. A.; Letsinger, R.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- (56) Alivisatos, A.; Johnson, K.; Peng, X.; Wilson, T. E. Organization of ‘Nanocrystal Molecules’ Using DNA. *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- (57) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1948–1998.
- (58) Bagalkot, V.; Zhang, L.; Levy-Nissenbaum, E.; Jon, S.; Kantoff, P. W.; Langery, R.; Farokhzad, O. C. Quantum Dot-Aptamer Conjugates for Synchronous Cancer Imaging, Therapy, and Sensing of Drug Delivery Based on Bi-Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3065–3070.
- (59) Lee, J. H.; Yigit, M. V.; Mazumdar, D.; Lu, Y. Molecular Diagnostic and Drug Delivery Agents Based on Aptamer-Nanomaterial Conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 592–605.
- (60) Wagner, K.; Kautz, A.; Röder, M.; Schwalbe, M.; Pachmann, K.; Clement, J. H.; Schnabelrauch, M. Synthesis of Oligonucleotide-Functionalized Magnetic Nanoparticles and Study on Their in Vitro Cell Uptake. *Appl. Organomet. Chem.* **2004**, *18*, 514–519.
- (61) Perez, J. M.; Josephson, L.; O'Loughlin, T.; Högemann, D.; Weissleder, R. Magnetic Relaxation Switches Capable of Sensing Molecular Interactions. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 816.
- (62) Zhan, S.; Wu, Y.; Wang, L.; Zhan, X.; Zhou, P. A Mini-Review on Functional Nucleic Acids-Based Heavy Metal Ion Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 353–368.
- (63) Stadler, A.; Chi, C. DNA-Incorporating Nanomaterials in Biotechnological Applications. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 319–334.

- (64) Ratialainen, T.; Holmén, A.; Tuite, E.; Haaima, G.; Christensen, L.; Nielsen, P. E.; Nordén, B. Hybridization of Peptide Nucleic Acid. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12331–12342.
- (65) Box, V. G. S. The Intercalation of DNA Double Helices with Doxorubicin and Nagalomycin. *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, *26*, 14–19.
- (66) Fortin, J. P.; Gazeau, F.; Wilhelm, C. Intracellular Heating of Living Cells through Néel Relaxation of Magnetic Nanoparticles. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 223–228.
- (67) Derfus, A. M.; Von Maltzahn, G.; Harris, T. J.; Duza, T.; Vecchio, K. S.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N. Remotely Triggered Release from Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3932–3936.
- (68) Ruiz-Hernández, E.; Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Smart Drug Delivery through DNA/magnetic Nanoparticle Gates. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1259–1266.
- (69) Dias, J. T.; Moros, M.; Del Pino, P.; Rivera, S.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 11526–11529.
- (70) Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, *114*, 1895–1897.
- (71) Demidov, V. V.; Potaman, V. N.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Sønnichsen, S. H.; Nielsen, P. E. *Stability of Peptide Nucleic Acids in Human Serum and Cellular Extracts*; 1994; Vol. 48.
- (72) Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. Recognition of Guanine and Adenine in DNA by Cytosine and Thymine Containing Peptide Nucleic Acids (PNA). *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677–9678.
- (73) Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratialainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Norden, B.; Graslund, A. Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544–5552.
- (74) Nielsen, P. E. Applications of Peptide Nucleic Acids. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, *10*, 71–75.
- (75) Demidov, V.; Frank-kamenetskii, M. D.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. Sequence Selective Double Strand DNA Cleavage by Peptide Nucleic Acid (PNA) Targeting Using Nuclease S1. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2103–2107.
- (76) Demers, D. B.; Curry, E. T.; Egholm, M.; Sozer, A. C. Enhanced PCR Amplification of VNTR Locus d1s80 Using Peptide Nucleic Acid (PNA). *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3050–3055.

- (77) Perry-O'Keefe, H.; Yao, X. W.; Coull, J. M.; Fuchs, M.; Egholm, M. Peptide Nucleic Acid Pre-Gel Hybridization: An Alternative to Southern Hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14670–14675.
- (78) Hanvey, J. C.; Peffer, N. C.; Bisi, J. E.; Thomson, S. A.; Cadilla, R.; Josey, J. A.; Ricca, D. J.; Hassman, C. F.; Bonham, M. A.; Au, K. G.; *et al.* Antisense and Antigene Properties of Peptide Nucleic Acids. *Science (80-.)* **1992**, *258*, 1481–1485.
- (79) Boffai, L. C.; Morris, P. L.; Carpaneto, E. M.; Louissaint, M.; Allfrey, V. G. Invasion of the CAG Triplet Repeats by a Complementary Peptide Nucleic Acid Inhibits Transcription of the Androgen Receptor and TATA-Binding Protein Genes and Correlates with Refolding of an Active Nucleosome Containing a Unique AR Gene Sequence. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13228–13233.
- (80) Orum, Henrik; Nielson, E.P.; Egholm, M, Stanley, C.; Chemistry, O. Single Base Pair Mutation Analysis by PNA Directes PCR Clamping. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5332–5336.
- (81) Thiede, C.; Bayerdörffer, E.; Blasczyk, R.; Wittig, B.; Neubauer, A. Simple and Sensitive Detection of Mutations in the Ras Proto-Oncogenes Using PNA-Mediated PCR Clamping. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 983–984.
- (82) Ray, A.; Norde, B. Peptide Nucleic Acid (PNA): Its Medical and Biotechnical Applications and Promise for the Future. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041–1060.
- (83) Soler, M.; Desplat-Jego, S.; Vacher, B.; Ponsonnet, L.; Fraterno, M.; Bongrand, P.; Martin, J.-M.; Foa, C. Adhesion-Related Glycocalyx Study: Quantitative Approach with Imaging-Spectrum in the Energy Filtering Transmission Electron Microscope (EFTEM). *FEBS Lett.* **1998**, *429*, 89–94.
- (84) Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- (85) Varki, A. Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories Are Correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- (86) Kogelberg, H.; Solís, D.; Jiménez-Barbero, J. New Structural Insights into Carbohydrate-Protein Interactions from NMR Spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 646–653.
- (87) Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A. Carbohydrate-Binding Proteins in Cancer, and Their Ligands as Therapeutic Agents. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 187–192.
- (88) Moros, M. *Síntesis de Gliconanopartículas Magnéticas Àra Aplicaciones Biomédicas*; 2013.

- (89) de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2257–2261.
- (90) De La Fuente, J. M.; Penadés, S. Understanding Carbohydrate-Carbohydrate Interactions by Means of Glyconanotechnology. *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 149–163.
- (91) De La Fuente, J. M.; Penadés, S. Glyco-Quantum Dots: A New Luminescent System with Multivalent Carbohydrate Display. *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, *16*, 387–391.
- (92) De La Fuente, J. M.; Alcántara, D.; Penadés, S. Cell Response to Magnetic Glyconanoparticles: Does the Carbohydrate Matter? *IEEE Trans. Nanobioscience* **2007**, *6*, 275–281.
- (93) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1746–1755.
- (94) de la Fuente, J. M.; Penadés, S. Glyconanoparticles: Types, Synthesis and Applications in Glycoscience, Biomedicine and Material Science. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2006**, *1760*, 636–651.
- (95) Ardeshirpour, Y.; Chernomordik, V.; Hassan, M.; Zielinski, R.; Capala, J.; Gandjbakhche, A. In Vivo Fluorescence Lifetime Imaging for Monitoring the Efficacy of the Cancer Treatment. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3531–3539.
- (96) Tavaré, R.; Sagoo, P.; Varama, G.; Tanriver, Y.; Warely, A.; Diebold, S. S.; Southworth, R.; Schaeffter, T.; Lechner, R. I.; Razavi, R.; *et al.* Monitoring of in Vivo Function of Superparamagnetic Iron Oxide Labelled Murine Dendritic Cells during Anti-Tumour Vaccination. *PLoS One* **2011**, *6*, e19662.
- (97) Schlachter, E. K.; Widmer, H. R.; Bregy, A.; Lönnfors-Weitzel, T.; Vajtai, I.; Corazza, N.; Bernau, V. J. P.; Weitzel, T.; Mordasini, P.; Slotboom, J.; *et al.* Metabolic Pathway and Distribution of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: In Vivo Study. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 1793–1800.
- (98) Barrefelt, Å.; Saghafian, M.; Kuiper, R.; Ye, F.; Egri, G.; Klickermann, M.; Brismar, T. B.; Aspelin, P.; Muhammed, M.; Dähne, L.; *et al.* Biodistribution, Kinetics, and Biological Fate of SPION Microbubbles in the Rat. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 3241–3254.
- (99) Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, R. Doxorubicin Pathways: pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genomics* **2012**, *21*, 440–446.
- (100) Kawasaki, E. S.; Player, A. Nanotechnology, Nanomedicine, and the Development of New, Effective Therapies for Cancer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2005**, *1*, 101–109.

- (101) Hao, H.; Ma, Q.; He, F.; Yao, P. Doxorubicin and Fe₃O₄ Loaded Albumin Nanoparticles with Folic Acid Modified Dextran Surface for Tumor Diagnosis and Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 7978–7987.
- (102) Di Martino, A.; Sedlarik, V. Amphiphilic Chitosan-Grafted-Functionalized Polylactic Acid Based Nanoparticles as a Delivery System for Doxorubicin and Temozolomide Co-Therapy. *Int. J. Pharm.* **2014**, *474*, 134–145.
- (103) Dilnawaz, F.; Sahoo, S. K. Enhanced Accumulation of Curcumin and Temozolomide Loaded Magnetic Nanoparticles Executes Profound Cytotoxic Effect in Glioblastoma Spheroid Model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 452–462.
- (104) Chen, J.; Shi, M.; Liu, P.; Ko, A.; Zhong, W.; Liao, W. J.; Xing, M. M. Q. Reducible Polyamidoamine-Magnetic Iron Oxide Self-Assembled Nanoparticles for Doxorubicin Delivery. *Biomaterials* **2014**, *35*, 1240–1248.
- (105) Schleich, N.; Po, C.; Jacobs, D.; Ucakar, B.; Gallez, B.; Danhier, F.; Préat, V. Comparison of Active, Passive and Magnetic Targeting to Tumors of Multifunctional paclitaxel/SPIO-Loaded Nanoparticles for Tumor Imaging and Therapy. *J. Control. Release* **2014**, *194*, 82–91.
- (106) Hajikarimi, Z.; Khoei, S.; Khoei, S.; Mahdavi, S. R. Evaluation of the Cytotoxic Effects of PLGA Coated Iron Oxide Nanoparticles as a Carrier of 5- Fluorouracil and Mega-Voltage X-Ray Radiation in DU145 Prostate Cancer Cell Line. *IEEE Trans Nanobioscience* **2014**, *13*, 403–408.
- (107) Khoei, S.; Azarian, M.; Khoei, S.; Mahdavian, A. R. Evaluation of the Cytotoxic Effect of PLGA Coated Iron Oxide Nanoparticles as 5- Fluorouracil Carrier on DU 145 Human Prostate Carcinoma Cell Line. *Int. Conf. Enabling Sci. Nanotechnol.* **2012**, *1*–2.
- (108) Christophi, C.; Winkworth, A.; Muralihdaran, V.; Evans, P. The Treatment of Malignancy by Hyperthermia. *Surgical Oncology*, 1998, *7*, 83–90.
- (109) Steeves, R. A. Hyperthermia in Cancer Therapy: Where Are We Today and Where Are We Going? *Bull. N.Y. Acad. Med.* **1992**, *68*, 341–351.
- (110) Beik, J.; Abed, Z.; Ghoreishi, F. S.; Hosseini-Nami, S.; Mehrzadi, S.; Shakeri-Zadeh, A.; Kamrava, S. K. Nanotechnology in Hyperthermia Cancer Therapy: From Fundamental Principles to Advanced Applications. *J. Control. Release* **2016**, *235*, 205–221.
- (111) Moroz, P.; Jones, S. K.; Gray, B. N. Magnetically Mediated Hyperthermia: Current Status and Future Directions. *Int. J. Hyperth.* **2002**, *18*, 267–284.
- (112) Kolosnjaj-Tabi, J.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Marangon, I.; Guardia, P.; Silva, A. K. A.; Luciani, N.; Clément, O.; Flaud, P.; Singh, J. V.; *et al.* Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle ‘destructurators’ of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **2014**, *8*, 4268–4283.

- (113) Kingsley, J. D.; Dou, H.; Morehead, J.; Rabinow, B.; Gendelman, H. E.; Destache, C. J. Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2006**, *1*, 340–350.
- (114) Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR Effect for Macromolecular Drug Delivery to Solid Tumors: Improvement of Tumor Uptake, Lowering of Systemic Toxicity, and Distinct Tumor Imaging in Vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71–79.
- (115) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapies in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumouritropic Accumulation of Proteins and the Antitumour Agent SMANCS. *Cancer Res.* **1986**, *6*, 6387–6392.
- (116) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751.
- (117) Wang, A. Z.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 185–198.
- (118) Bae, Y. H.; Park, K. Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility. *J. Control. Release* **2011**, *153*, 198–205.
- (119) Polakova, K.; Polakova, K.; Pizova, K.; Binder, S.; Havrdova, M.; Kolarova, M.; Kriegova, E.; Zapletalova, J.; Malina, L.; Horakova, J.; et al. In Vitro Cytotoxicity Analysis of Doxorubicin-Loaded/superparamagnetic Iron Oxide Colloidal Nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 Cell Lines. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 949–961.
- (120) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818–5878.
- (121) Vaupel, P.; Rallinoâ, F.; Okunieff, P. Blood Flow , Oxygen and Nutrient Supply , and Metabolic Microenvironment Human Tumors : A Review. *Cancer Res* **1989**, *49*, 6449–6465.
- (122) Webb, B. A.; Chimenti, M.; Jacobson, M. P.; Barber, D. L. Dysregulated pH: A Perfect Storm for Cancer Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 671.
- (123) Environment, R.; The, O. F.; As, C.; Through, V. Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/glutathione Couple. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
- (124) Estrela, J. M.; Ortega, A.; Obrador, E. Glutathione in Cancer Biology and Therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2006**, *43*, 143–181.
- (125) Balendiran, G. K.; Dabur, R.; Fraser, D. The Role of Glutathione in Cancer. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 343–352.

- (126) Nelson, A. R.; Fingleton, B.; Rothenberg, M. L. Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. *J Clin Oncol* **2000**, *18*, 1135–1149.
- (127) Kang, T.; Li, F.; Baik, S.; Shao, W.; Ling, D.; Hyeon, T. Surface Design of Magnetic Nanoparticles for Stimuli-Responsive Cancer Imaging and Therapy. *Biomaterials* **2017**, *136*, 98–114.
- (128) Swartz, M. A.; Iida, N.; Roberts, E. W.; Sangaletti, S.; Wong, M. H.; Yull, F. E.; Coussens, L. M.; DeClerck, Y. A. Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2473–2480.
- (129) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003.
- (130) Hoffman, A. S. Stimuli-Responsive Polymers: Biomedical Applications and Challenges for Clinical Translation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 10–16.
- (131) Wang, Z. H.; Tian, Y. F.; Zhang, H.; Qin, Y. M.; Li, D.; Gan, L.; Wu, F. H. Using Hyaluronic Acid-Functionalized pH Stimuli-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Delivery to CD44-Overexpressing Cancer Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 6485–6497.
- (132) Dias, J. T.; Moros, M.; Del Pino, P.; Rivera, S.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 11526–11529.
- (133) Riedinger, A.; Guardia, P.; Curcio, A.; Garcia, M. A.; Cingolani, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2399–2406.
- (134) Piñeiro, Y.; Vargas, Z.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. Iron Oxide Based Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Strategies in Biological Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 4495–4509.
- (135) Campbell, R. B. Battling Tumors with Magnetic Nanotherapeutics and Hyperthermia: Turning up the Heat. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 649–652.
- (136) Gupta, A. K.; Naregalkar, R. R.; Vaidya, V. D.; Gupta, M. Recent Advances on Surface Engineering of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 23–39.
- (137) Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. ‘Stealth’ Corona-Core Nanoparticles Surface Modified by Polyethylene Glycol (PEG): Influences of the Corona (PEG Chain Length and Surface Density) and of the Core Composition on Phagocytic Uptake and Plasma Protein Adsorption. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2000**, *18*, 301–313.

- (138) Stepien, G.; Moros, M.; Perez-Hernandez, M.; Monge, M.; Gutiérrez, L.; Fratila, R. M. M.; Las Heras, M.; Menao Guillen, S.; Puente Lanzarote, J. J.; Solans, C.; *et al.* Effect of Surface Chemistry and Associated Protein Corona on the Long-Term Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles in Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, acsami.7b18648.
- (139) Dror, Y.; Sorkin, R.; Brand, G.; Boubriak, O.; Urban, J.; Klein, J. The Effect of the Serum Corona on Interactions between a Single Nano-Object and a Living Cell. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1–11.
- (140) Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The Cellular and Molecular Basis of Hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 43, 33–56.
- (141) Huff, T. B.; Tong, L.; Zhao, Y.; Hansen, M. N.; Cheng, J. X.; Wei, A. Hyperthermic Effects of Gold Nanorods on Tumor Cells. *Nanomedicine* **2007**, 2, 125–132.
- (142) Minelli, C.; Lowe, S. B.; Stevens, M. M. Engineering Nanocomposite Materials for Cancer Therapy. *Small*, 2010, 6, 2336–2357.
- (143) Fang, L.; Hu, Z.; Bonnet, P.; Mckittrick, J. W.; Lorentz, J.; Baylor, D. W.; Domen, D. R. Improved Heat Exchanger, 2004.
- (144) Faraji, M.; Yamini, Y.; Rezaee, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, 7, 1–37.
- (145) Whitesides, G. M. The ‘Right’ Size in Nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1161–1165.
- (146) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 631–651.
- (147) Babincova, M.; Altanerova, V.; Altaner, C.; Bergemann, C.; Babinec, P. In Vitro Analysis of Cisplatin Functionalized Magnetic Nanoparticles in Combined Cancer Chemotherapy and Electromagnetic Hyperthermia. *IEEE Trans. Nanobioscience* **2008**, 7, 15–19.
- (148) Ang, K. L.; Venkatraman, S.; Ramanujan, R. V. Magnetic PNIPA Hydrogels for Hyperthermia Applications in Cancer Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, 27, 347–351.
- (149) Lehmann, J.; Natarajan, A.; DeNardo, G. L.; Ivkov, R.; Foreman, A. R.; Catapano, C.; Mirick, G.; Quang, T.; Gruettner, C.; DeNardo, S. J. Short Communication: Nanoparticle Thermotherapy and External Beam Radiation Therapy for Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2008**, 23, 265–271.

Capítulo 1

- (150) Kong, G.; Braun, R. D.; Dewhirst, M. W. Hyperthermia Enables Tumor-Specific Nanoparticle Delivery : Effect of Particle Size Hyperthermia Enables Tumor-Specific Nanoparticle Delivery : Effect of Particle Size 1. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4440–4445.
- (151) Needham, D.; Anyarambhatla, G.; Kong, G. A New Temperature-Sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia : Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1197–1201.
- (152) Tashjian, J. A.; Dewhirst, M. W.; Needham, D.; Viglianti, B. L. Rationale for and Measurement of Liposomal Drug Delivery with Hyperthermia Using Non-Invasive Imaging Techniques. *Int. J. Hyperth.* **2008**, *24*, 79–90.
- (153) Horsman, M. R.; Overgaard, J. Hot Topic: Can Mild Hyperthermia Improve Tumour Oxygenation? *Int. J. Hyperth.* **1997**, *13*, 141–147.
- (154) Rastogi, R.; Gulati, N.; Kotnala, R. K.; Sharma, U.; Jayasundar, R.; Koul, V. Evaluation of Folate Conjugated PEGylated Thermosensitive Magnetic Nanocomposites for Tumor Imaging and Therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *82*, 160–167.
- (155) Ito, A.; Kuga, Y.; Honda, H.; Kikkawa, H.; Horiuchi, A.; Watanabe, Y.; Kobayashi, T. Magnetite Nanoparticle-Loaded Anti-HER2 Immunoliposomes for Combination of Antibody Therapy with Hyperthermia. *Cancer Lett.* **2004**, *212*, 167–175.
- (156) Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Eckelt, L.; Feussner, A.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Deger, S.; Wust, P.; Loening, S. A.; Jordan, A. Clinical Hyperthermia of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Presentation of a New Interstitial Technique. *Int. J. Hyperth.* **2005**, *21*, 637–647.
- (157) Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Taymoorian, K.; Thiesen, B.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jung, K.; Jordan, A.; Wust, P.; Loening, S. A. Morbidity and Quality of Life during Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles in Locally Recurrent Prostate Cancer: Results of a Prospective Phase I Trial. *Int. J. Hyperth.* **2007**, *23*, 315–323.
- (158) Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P. Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution. *Eur. Urol.* **2007**, *52*, 1653–1662.
- (159) Maier-Hauff, K.; Rothe, R.; Scholz, R.; Gneveckow, U.; Wust, P.; Thiesen, B.; Feussner, A.; Deimling, A.; Waldoefner, N.; Felix, R.; *et al.* Intracranial Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme. *J. Neurooncol.* **2007**, *81*, 53–60.

- (160) Müller, S. Magnetic Fluid Hyperthermia Therapy for Malignant Brain Tumors—an Ethical Discussion. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2009**, *5*, 387–393.
- (161) Garnett, M. C.; Kallinteri, P. Nanomedicines and Nanotoxicology: Some Physiological Principles. *Occup. Med. (Chic. Ill.)*. **2006**, *56*, 307–311.
- (162) Nel, A. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science (80-)*. **2006**, *311*, 622–627.
- (163) Singh, N.; Jenkins, G. J. S.; Asadi, R.; Doak, S. H. Potential Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* **2010**, *1*, 5358.
- (164) Mahmoudi, M.; Hofmann, H.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Assessing the in Vitro and in Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 2323–2338.
- (165) Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of Nanopartides. *Small* **2008**, *4*, 26–49.
- (166) Fischer, H. C.; Chan, W. C. Nanotoxicity: The Growing Need for in Vivo Study. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 565–571.
- (167) Riggio, C.; Calatayud, M. P.; Hoskins, C.; Pinkernelle, J.; Sanz, B.; Torres, T. E.; Ibarra, M. R.; Wang, L.; Keilhoff, G.; Goya, G. F.; et al. Poly-L-Lysine-Coated Magnetic Nanoparticles as Intracellular Actuators for Neural Guidance. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 3155–3166.
- (168) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 3995–4021.
- (169) Cheng, F. Y.; Su, C. H.; Yang, Y. S.; Yeh, C. S.; Tsai, C. Y.; Wu, C. L.; Wu, M. T.; Shieh, D. Bin. Characterization of Aqueous Dispersions of Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 729–738.
- (170) Petri-Fink, A.; Chastellain, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Ferrari, A.; Hofmann, H. Development of Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Interaction with Human Cancer Cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2685–2694.
- (171) Juillerat-Jeanneret, L.; Cengelli, F.; Maysinger, D.; Tschuddi-Monnet, F.; Hofmann, H. Interaction of Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with the Brain. *Eur. Cells Mater.* **2005**, *10*, 108–116.
- (172) Moros, M.; Hernaez, B.; Garet, E.; Dias, J. T.; Saez, B.; Grazu, V.; Gonzalez-Fernandez, A.; Alonso, C.; de La Fuente, J. M. Monosaccharides versus PEG-Functionalized NPs : In Fluence in the Cellular Uptake. *ACS Nano* **2012**, 1565–1577.
- (173) Karlsson, H. L.; Gustafsson, J.; Cronholm, P.; Möller, L. Size-Dependent Toxicity of Metal Oxide Particles-A Comparison between Nano- and Micrometer Size. *Toxicol. Lett.* **2009**, *188*, 112–118.

Capítulo 1

- (174) Angelakeris, M. Magnetic Nanoparticles: A Multifunctional Vehicle for Modern Theranostics. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 1642–1651.

Capítulo 2

Síntesis de NPs magnéticas estables en medio acuoso

2.1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas, se han desarrollado muchos trabajos relacionados con la síntesis de nanopartículas magnéticas debido a la diversidad de aplicaciones, como se ha mencionado en el capítulo 1. En la actualidad, una de las aplicaciones más importantes objeto de estudio es el uso de NPs magnéticas (MNPs) como sistema portador para la liberación controlada de fármacos.

La elección del método de síntesis y la técnica empleada van a estar condicionadas por las características de las MNPs que se quieran obtener, como por ejemplo su tamaño, morfología y distribución de tamaños. Estas características son responsables de las propiedades magnéticas que tengan dichas NPs.

2.1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe_xO_y)

La estabilidad en medio acuoso es otro de los principales factores a tener en cuenta a la hora de diseñar MNPs para aplicaciones biomédicas, ya que se debe evitar su desestabilización y la formación de agregados en contacto con los fluidos biológicos. Estos fluidos están compuestos por sales y proteínas plasmáticas, las sales desestabilizan a las MNPs por el aporte de carga extra y las proteínas plasmáticas se adsorben inespecíficamente a la superficie de las MNPs formando agregados que pueden llevar a la obstrucción de pequeños capilares, así como a la rápida eliminación de las MNPs por los macrófagos.¹

En la bibliografía existen diversas formas de clasificar las técnicas de síntesis de nanopartículas, dependiendo de los materiales de partida, la fase de reacción, así como el tipo de procedimiento de transformación del material de partida.

- i) Una primera clasificación hace referencia al tamaño del producto de partida, y se divide en dos grandes grupos: los denominados “top-down” (de arriba abajo) donde se parte de materiales macroscópicos y mediante métodos físicos se va reduciendo el tamaño hasta alcanzar el deseado; y los “bottom-up” (de abajo arriba), partiendo de subunidades pequeñas mediante métodos químicos se produce un crecimiento hasta la obtención del producto final con un tamaño superior.²
- ii) La segunda clasificación tiene en cuenta el tipo de fase en que se produce la síntesis: 1) método de molienda³ (molienda húmeda y seca, molienda reactiva, entre otras); 2) métodos en fase gas⁴ (depositión química en fase vapor, deposición por ablación laser, técnicas de pulverización); 3) síntesis en fase líquida⁵ (síntesis hidrotérmica, proceso sol-gel, hidrólisis, microemulsión, etc.).
- iii) Finalmente, y la forma más habitual, es la clasificación que se realiza mediante la naturaleza del procedimiento. Hay tres grupos principales: métodos biológicos, físicos y químicos. En la Figura 1 se muestra un resumen de la diversidad de técnicas en cada uno de ellos.

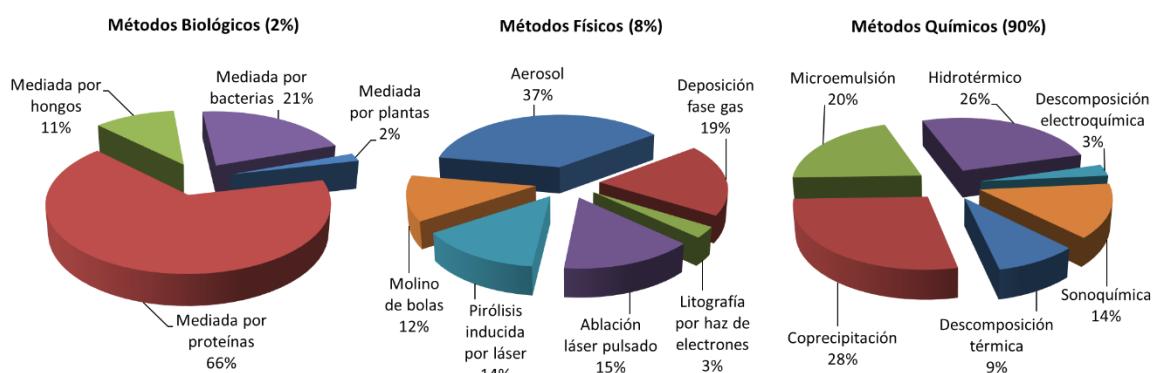


Figura 1. Comparación de las diferentes técnicas de síntesis de MNPs mediante tres métodos diferentes. Adaptado de Ali et al.⁶

- Métodos biológicos: se ha descrito la biosíntesis de nanopartículas promovida por bacterias, hongos, levaduras, virus donde la reacción principal que ocurre es una reducción de sales metálicas/oxidación de sistemas microbiológicos.⁷ Estas reacciones tienen como ventaja su química verde y la obtención de nanopartículas estables; como desventaja hay que señalar que son procesos con una velocidad de reacción baja y que la forma de controlar el tamaño, forma y monodispersidad de las MNPs es muy complicada.

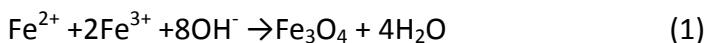
- Métodos físicos: la pirólisis por pulverización y por láser son las principales técnicas de aerosol^{8,9} para la formación de MNPs. En la primera de ellas, las MNPs se obtienen por evaporación de sales de hierro, secado y reacción de pirólisis de las gotas líquidas a altas temperaturas a presión atmosférica.¹⁰ La relación y distribución de tamaños de las MNPs obtenidas mediante este método se ve influenciada por el tamaño de las gotas líquidas, la evaporación del disolvente y el material de partida. La obtención de MNPs por pirólisis láser se lleva a cabo mediante el calentamiento de una mezcla gaseosa de un precursor de hierro y una mezcla fluida de gases, formándose MNPs de tamaño controlado, morfología definida y distribución estrecha de tamaños, sin formar agregados.¹¹ Estos métodos producen MNPs de alta calidad, pero el rendimiento porcentual que se obtiene es bajo. El inconveniente del uso de estas metodologías está asociado al gasto que conlleva el equipamiento utilizado.¹²
- Métodos químicos: son métodos simples y eficientes en los que se puede alcanzar un alto control de tamaño, composición y forma.¹³ Suponen el 90 % de las técnicas de síntesis, siendo las más empleadas la síntesis por co-precipitación de sales de hierro, formación de microemulsiones, síntesis hidrotérmica y descomposición térmica. Las principales ventajas y desventajas de cada una de estas técnicas están recogidas en la tabla 1. El método de co-precipitación es el más sencillo, la descomposición térmica es el mejor método para controlar el tamaño y morfología de MNPs con un tamaño inferior a 20 nm, mientras que para MNPs de mayor tamaño el método hidrotérmico es el más adecuado. Los otros métodos también son utilizados, pero tienen una mayor dificultad en el control de tamaño, forma, composición y distribución de tamaño.

MÉTODO DE SÍNTESIS	MORFOLOGÍA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Coprecipitación	Esferas	Simple y eficaz	Control de forma no es bueno
Hidrotérmico	Esferas irregulares y numerosas formas	Formas y tamaños son fácilmente controlables	Elevada presión y temperatura de reacción
Microemulsión	Esferas	Reacción limpia ,estable, distribución de tamaños relativamente estrechos	Rendimiento bajo
Descomposición térmica	Esferas, cubos, octahedros regulares	Distribución de tamaños estrecha y alta cristalinidad	Reacción compleja y en atmósfera inerte
Sonoquímico	Bipiramides, esferas y rods	Distribución de tamaños estrecha	Mecanismo complejo
Descomposición electroquímica	Esferas, rods, hexagonales	Tamaño de partícula controlado	Irreproducibles

Tabla 1. Resumen de las ventajas y desventajas de diferentes técnicas de síntesis de MNPs. Adaptado de Ali et al⁶

2.1.1.1. Método de co-precipitación

Este método es el más convencional, sencillo y utilizado para obtener MNPs de óxido de hierro (magnetita o maghemita) en disolución acuosa. El método consiste en hacer reaccionar una mezcla estequiométrica de sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} en medio acuoso mediante la adición de una base como se muestra en la ecuación 1.



La reacción se realiza a temperatura ambiente y en atmósfera inerte para evitar la oxidación de magnetita a maghemita. De acuerdo con la termodinámica la precipitación completa de Fe_3O_4 se forma a un pH entre 8 y 14. El proceso de nucleación ocurre con más facilidad a un pH inferior a 11, a diferencia del proceso de crecimiento para el cual un pH superior a 11 es más favorable.¹⁴

Las ventajas de obtener MNPs a través de este método son la simplicidad de la síntesis y la producción a gran escala.¹⁵ Como desventajas, hay que señalar que el tamaño, forma y composición de las MNPs dependen de varios parámetros como son: el tipo de sales de hierro, la proporción estequiométrica de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ utilizada, los valores de pH y fuerzas iónicas de la solución.¹⁶ Estos parámetros limitan el crecimiento de las MNPs de una manera controlada, afectando las propiedades físicas y disminuyendo su cristalinidad y los valores de magnetización de saturación.

2.1.1.2. Método hidrotérmico

La síntesis de MNPs de óxido de hierro mediante este método se realiza en medio acuoso en reactores o autoclaves a una presión de vapor elevada (puede variar entre 0.3 – 4 MPa) y temperaturas altas (entre 130 – 250 °C). Existen dos rutas principales para la formación de MNPs: i) hidrólisis y oxidación y ii) neutralización de hidróxidos metálicos mixtos.¹⁷ Estas técnicas permiten controlar la geometría de las MNPs sin antes haber optimizado diferentes parámetros como son: temperatura, estequiométría de los reactivos, naturaleza del disolvente, tiempos de reacción, concentración de reactivos, precursores.¹⁸ El proceso de nucleación puede ser más rápido que el de crecimiento a temperaturas altas, obteniendo MNPs de tamaño más pequeño, a diferencia que si se prolonga el tiempo de reacción se favorece el proceso de crecimiento obteniendo MNPs de mayor tamaño. Las principales ventajas de este método son la alta cristalinidad de las MNPs formadas, así como la estrecha distribución de tamaños y el control de forma y tamaño. El mayor inconveniente de esta técnica es el tiempo extenso de reacción, ocasionado unos rendimientos bajos.^{19,20}

2.1.1.3. Método de descomposición térmica

En la década de los 90 se empezó a desarrollar este método para la síntesis de nanopartículas semiconductoras de muy alta cristalinidad,²¹ utilizando precursores orgánicos mezclados con surfactantes y con disolventes de altos puntos de ebullición.

Las dos estrategias principales que se emplean en la síntesis por descomposición térmica son: i) la inyección del precursor en caliente en la mezcla de los reactivos y ii) el calentamiento de la mezcla de todos los componentes de la reacción al mismo tiempo de manera controlada.

En 1999, Alivisatos fue uno de los primeros en sintetizar partículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de 7 nm de diámetro inyectando cuprato de Fe en trioctilamina.²² Posteriormente en 2001, el grupo de Hyeon sintetizó MNPs de maghemita en dos pasos²³ a partir del precursor pentacarbonilo de hierro $\text{Fe}(\text{CO})_5$. En el primer paso se inyectaba en caliente (100 °C) el precursor a una disolución de ácido oleico en octil éter y en el segundo paso se producía una oxidación de las partículas de hierro formadas con óxido de trimetilamina $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ de 13 nm de diámetro, dependiendo de la relación (Fe: surfactante). Esta técnica de inyección en caliente provoca una gran saturación en el medio de reacción dando lugar a un proceso de nucleación instantáneo,²⁴ y una separación de los procesos de nucleación y crecimiento debido a la bajada de temperatura al inyectar el precursor, lo cual permite la obtención de nanopartículas de tamaño uniforme. El inconveniente de esta técnica es que requiere un montaje especial debido a la inyección en caliente de precursores volátiles altamente tóxicos.

Debido a las dificultades de este tipo de síntesis, en 2002 el grupo de Sun²⁵ desarrolló la síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 en una sola etapa que consistía en mezclar todos los reactivos a temperatura ambiente y realizar un calentamiento controlado, utilizando acetilacetonato de hierro (III) $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como precursor, ácido oleico y oleilamina como surfactantes y fenil éter como disolvente. El tamaño de las MNPs obtenidas mediante este procedimiento fue de 4 nm; estas MNPs de tamaño pequeño se pueden utilizar como semillas para posteriores recrecimientos con el fin de obtener MNPs con diámetros hasta 20 nm.

Cambiando el precursor, se pueden obtener MNPs de mayor tamaño, tal y como mostraron los trabajos de Covil utilizando un precursor inorgánico, oxihidroxido de hierro (FeO(OH))²⁶ para sintetizar MNPs de tamaño superior a 20 nm y de Hyeon utilizando oleato de hierro (III) $(\text{Fe}(\text{oleato})_3)$ hasta tamaños de 50 nm.²⁷

En los últimos años se han desarrollado numerosos estudios de síntesis de Fe_3O_4 por descomposición térmica, para observar la influencia de los precursores utilizados, surfactantes, disolventes, concentraciones de los reactivos, temperatura y tiempos de reacción en cuanto a la obtención de un determinado tamaño, morfología, cristalinidad, distribución de tamaños y propiedades magnéticas. Shavel y Liz-Marzán mostraron una visión general del efecto de diferentes precursores, surfactantes y el disolvente empleado, en la forma y tamaño de las MNPs sintetizadas.²⁸ El estudio demuestra que el uso de surfactantes específicos da lugar a la formación de MNPs de morfología cúbica u octaédrica. En 2011 Demortière y colaboradores demostraron que era posible controlar el diámetro de las MNPs variando el tipo de disolvente empleado en la síntesis: dihexiléter (2.5 nm), hexadeceno (3.5 nm), dioctil éter (5 y 11 nm, variando la relación entre el surfactante y precursor), dibenciléter (9 nm) o eicosano (14 nm).²⁹ Un paso más en el desarrollo de nuevos métodos de síntesis lo realizaron Amara *et al.*, obteniendo MNPs de morfología esférica y cubica utilizando una mezcla de ferroceno y polivinilpirrolidona (PVP), en ausencia de disolvente, mediante un procedimiento sencillo en un solo paso de calentamiento de la mezcla de reacción en un horno a elevada temperatura y atmósfera inerte.³⁰

Según el mecanismo propuesto por LaMer³¹ en la década de los 50, en la síntesis por descomposición térmica existen dos etapas clave: la nucleación y el crecimiento de las NPs (Figura 2). LaMer indicó que la separación de los procesos de nucleación y crecimiento eran factores importantes para obtener MNPs monodispersas y de tamaño uniforme. El proceso de nucleación genera muchos núcleos al mismo tiempo, que seguidamente comienzan a crecer simultáneamente sin una nucleación adicional.

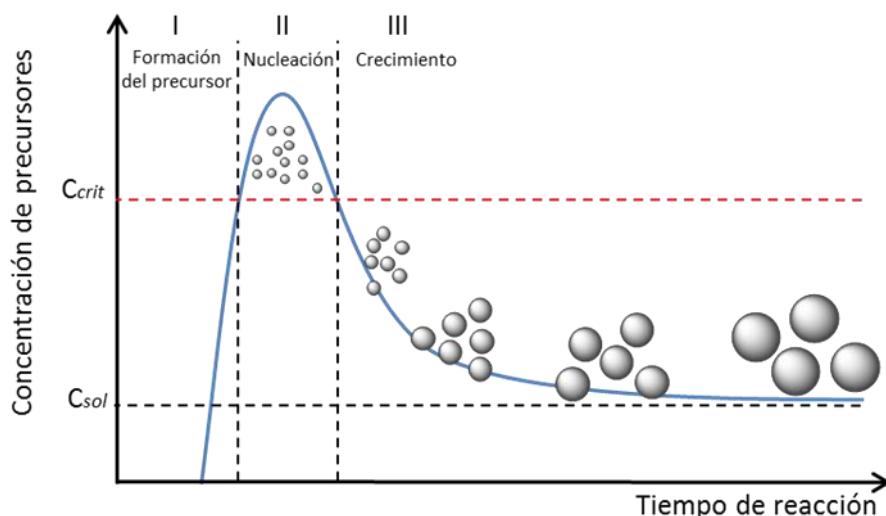


Figura 2. Modelo de LaMer diferenciando tres etapas, (I) formación del precursor, (II) nucleación y (III) crecimiento, C_{sol} es la concentración de solubilidad y C_{crit} es la concentración crítica de sobresaturación.

El proceso de nucleación/crecimiento, comienza con la formación de precursores (I), cuya concentración va aumentando con el tiempo hasta alcanzar una concentración de sobresaturación elevada (C_{crit}) para poder superar la barrera de energía necesaria para que tenga lugar la nucleación (II). Esta segunda etapa hace que la concentración de precursores disminuya hasta que se detenga la formación de núcleos a partir de los precursores y estos difundan hacia la superficie del núcleo para comenzar el proceso de crecimiento (III). El crecimiento se puede dividir en dos etapas:³² i) la difusión tanto de los precursores formados para el crecimiento de las MNPs como del solvente a la superficie del núcleo y la adsorción en la superficie de los núcleos y ii) crecimiento de la MNPs ocasionado por la incorporación de los precursores. El proceso deseable que controle la velocidad de crecimiento es la difusión ya que la distribución de tamaños al formarse las MNPs se va estrechando conforme aumenta el radio de éstas.

En este capítulo se muestra la síntesis de MNPs de morfología esférica y estrecha distribución de tamaños, por descomposición térmica del precursor $Fe(acac)_3$ en éter bencílico. Las MNPs obtenidas son estables debido a la capa de surfactante que recubre su núcleo inorgánico, por lo que no forman agregados ocasionados por impedimentos estéricos. Sin embargo, hay que señalar que la desventaja que presentan estas MNPs es su estabilidad en disolventes apolares debido a su carácter hidrófobo. Por tanto, hay que realizar una transferencia a medio acuoso de las MNPs de cara a futuras aplicaciones biomédicas.

2.1.2 Estabilización de MNPs de óxido de hierro en medio acuoso

Hay numerosos métodos descritos en la bibliografía para estabilizar en medio acuoso las MNPs de óxido de hierro obtenidas en disolventes orgánicos, ya que la obtención de ferrofluidos coloidales magnéticos estables en medios biológicos es importante para aplicaciones biomédicas.

La estabilidad de una suspensión coloidal magnética depende del equilibrio entre las fuerzas de atracción y repulsión. Son cuatro los tipos de fuerzas que pueden contribuir entre las partículas del sistema (Van der Waals, dipolo-dipolo, repulsiones electrostáticas y estéricas). La estabilidad de las MNPs depende del control de las repulsiones electrostáticas o estéricas o ambas,³³ que se puede lograr mediante la utilización de recubrimientos adecuados que no afecten a la biocompatibilidad, estabilidad y propiedades magnéticas de las NPs.³⁴

Existen dos formas de realizar el recubrimiento de las MNPs. La primera de ellas consiste en utilizar un precursor *in situ* durante la síntesis,^{35,36} procedimiento más complejo pero con una mejora de la estabilización y las propiedades magnéticas. Una limitación de este método es el tamaño reducido de las MNPs, debido a que el

recubrimiento se produce seguido al proceso de nucleación, lo que impide el crecimiento de las MNPs. La otra forma de realizar el recubrimiento es posterior a la síntesis de MNPs y se conoce como modificación post-síntesis,³⁷ su principal ventaja es la variedad de agentes de recubrimiento que se pueden emplear.

2.1.2.1 Mecanismos de estabilización de MNPs

Se han descrito tres tipos de mecanismos para la estabilización de MNPs en medio acuoso³⁸ dependiendo del tipo de unión del ligando a las MNPs: la adición de ligandos, el intercambio de ligandos y el crecimiento de una capa protectora que aísla la superficie hidrofóbica de las MNPs.

✓ Adición de ligandos:

Este tipo de mecanismo no supone la modificación, ni la eliminación del ligando existente de la superficie de las MNPs, sino la adición de un ligando a la superficie externa de la MNPs. Existen cuatro formas de realizar la adición de ligandos:

- i. Adición de ligandos de manera indirecta creando una capa de material inorgánico sobre la superficie de la MNPs, adsorbiendo el ligando sobre ésta por interacciones iónicas o no específicas.
- ii. Formación de un enlace covalente entre ligandos.
- iii. Adición de ligandos a MNPs sin agentes bloqueantes.
- iv. Interacción de la parte hidrofóbica de la MNPs con la región lipofílica de un ligando anfifílico, formado fuertes fuerzas de atracción y orientando la región hidrofílica hacia el exterior de la superficie de las MNPs (Figura 3).

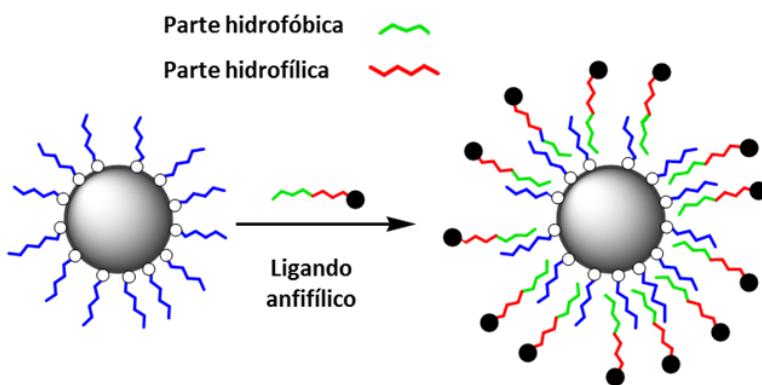


Figura 3. Esquema representativo de la modificación de la superficie de MNPs mediante la adición de un ligando anfifílico con grupos funcionales en la capa externa

En esta estrategia de adición de surfactante, su principal ventaja es la estabilización de MNPs en medio acuosos, así como la introducción de grupos

funcionales en la capa externa.³⁹ Como desventaja cabe destacar la falta de estabilidad a largo plazo y la formación de aglomerados en presencia de concentraciones elevadas de sal en el medio.⁴⁰

✓ *Intercambio de ligandos:*

Este tipo de estrategia consiste en modificar la superficie de la MNPs mediante el intercambio de un ligando hidrofóbico por un hidrofílico (Figura 4). El ligando se caracteriza por tener dos grupos funcionales: uno que se ancle fuertemente a la superficie de la MNPs y cuya afinidad por la misma debe ser superior a la de la molécula que reemplaza, mientras que el otro grupo funcional debe ser polar, estabilizando las MNPs en medio acuoso.

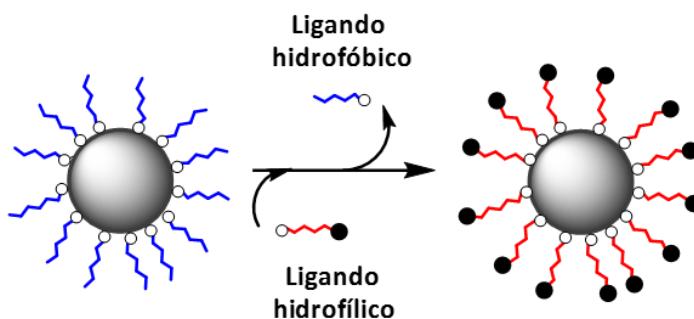


Figura 4. Esquema representativo de la estabilización de NPs en medio acuoso mediante el intercambio de ligandos hidrofóbicos por ligandos hidrofílicos con dos grupos funcionales.

La principal ventaja de esta estrategia es la poca variación de tamaño final de la MNPs en comparación con otros métodos de estabilización señalados, pero hay que tener en cuenta varios factores, como la posibilidad de que el ligando se desorba de la superficie de las MNPs, la temperatura a la que se encuentre expuesto, exceso de ligando en el medio, así como la oxidación, ocasionada por el medio acuoso. Todos estos factores pueden afectar a la estabilidad de las MNPs (formación de agregados), así como a sus propiedades físicas y toxicidad.^{12,13}

✓ *Encapsulación de MNPs:*

En este método se crea una capa protectora alrededor de la MNP (Figura 5), impidiendo la exposición directa del núcleo de la MNPs a los factores que pueden afectar su estabilidad en medio acuoso. Es uno de los métodos más utilizados para transferir a agua NPs hidrófobas y se puede dividir en dos grupos: i) crecimiento de una capa protectora sobre la superficie de un determinado material; ii) intercambio con moléculas anfifílicas con largas cadenas hidrocarbonadas dando lugar a estructuras tipo micelas o vesículas.

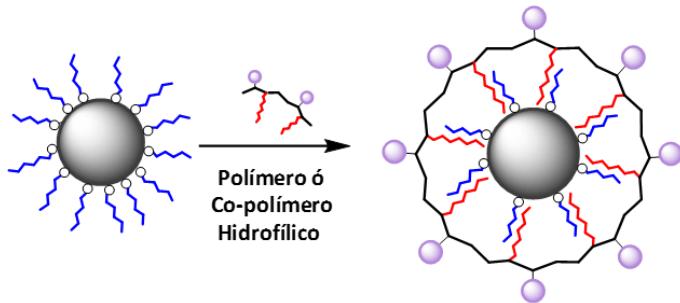


Figura 5. Esquema general de un tipo de crecimiento de capa protectora de la MNPs

Las MNPs recubiertas o encapsuladas siguiendo esta estrategia tienen como principal ventaja la estabilidad en medio acuoso y la posibilidad de ser funcionalizadas por la aportación de los grupos funcionales que se encuentran en la capa externa del polímero. Como desventajas hay que destacar que la formación de la capa puede modificar las propiedades físicas de las MNPs debido a su grosor y puede producir un aumento del tamaño hidrodinámico de las MNPs.^{41,42}

2.1.2.2 Naturaleza de los materiales utilizados para la estabilización de MNPs

Existen numerosos estudios sobre el tipo de material idóneo para estabilizar en medio acuoso MNPs para aplicaciones biomédicas consiguiendo a la vez no alterar las propiedades físicas de las MNPs. Según la naturaleza del material que se utiliza para el recubrimiento, se pueden clasificar de manera general en materiales orgánicos e inorgánicos (Figura 6).

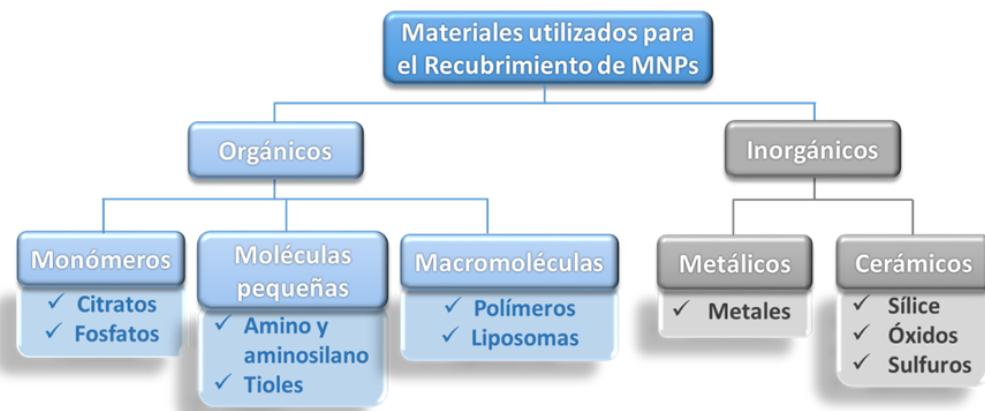


Figura 6. Esquema general de los principales tipos de recubrimientos que presentan la MNPs para adquirir estabilidad en medio acuoso.

- **Recubrimiento orgánico**

Los compuestos orgánicos se utilizan por ser biocompatibles, biodegradables y proporcionar grupos funcionales como aminas, aldehídos, carboxilos e hidroxilos capaces de reaccionar con biomoléculas como ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido péptidonucleico (APN), proteínas, anticuerpos.¹³ El mecanismo de reacción que se produce para la formación del recubrimiento es mediante intercambio o adsorción de ligandos. Considerando a las MNPs como el núcleo, existen tres tipos de estructuras que se pueden obtener utilizando compuestos orgánicos para recubrir al núcleo como se muestra en la Figura 7.

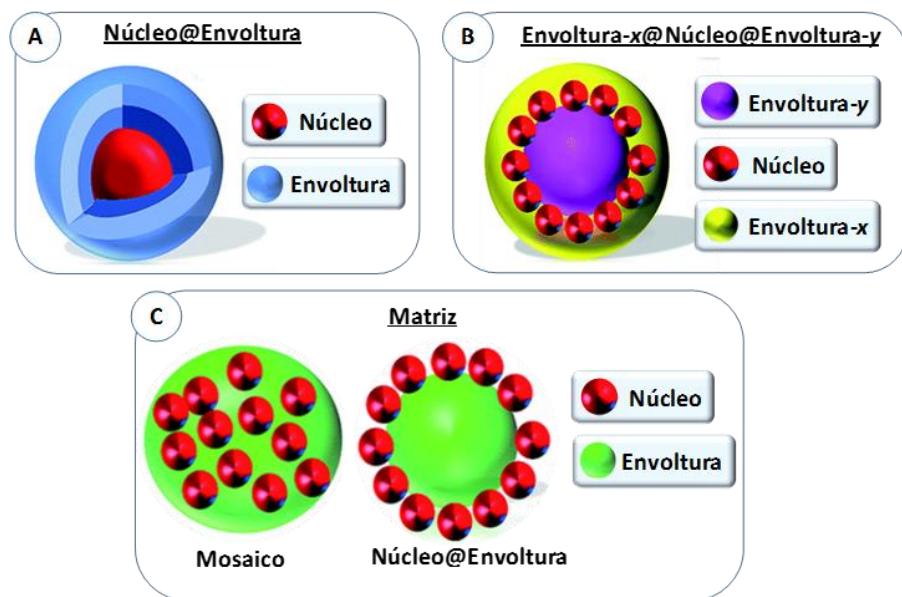


Figura 7. Esquema de las posibles estructuras que se forman en la protección del núcleo. A) Núcleo@Envoltura (Core@Shell, terminología inglesa); B) Envoltura-x@Núcleo@Envoltura-y(Shell-x@Core@Shell-y); C) Matriz. Adaptado de Bohara⁴³

En los recubrimientos con **moléculas monoméricas**, los **citratos** y los **fosfatos** son los más utilizados. El **citrato** tiene tres grupos carboxilatos que se pueden unir mediante adsorción del ácido cítrico a la superficie de las MNPs. Los grupos que permanecen libres, debido a su carácter hidrófilico,⁴⁴ proporcionan estabilidad en medio acuoso y ofrecen grupos funcionales para posteriores funcionalizaciones con diferentes biomoléculas. Como posible desventaja, en diversos estudios realizados sobre los efectos que producía el ácido cítrico durante la síntesis, observaron que el aumento de la concentración de este monómero ocasionaba una disminución en la cristalinidad y cambios en la geometría de la superficie.⁴⁵⁻⁴⁷ De igual manera que los citratos, los **fosfatos** se unen mediante los átomos de oxígeno del ácido alcanofofónico sobre la superficie de la MNPs formando complejos bidentados.⁴⁸⁻⁵⁰ Estos recubrimientos son útiles para encapsular MNPs para aplicaciones biomédicas.⁵¹

La estabilidad de las MNPs depende fuertemente del rango de pH así como de la concentración de ácidos y de fosfatos adsorbidos.⁵²

Una de las principales ventajas de utilizar **moléculas pequeñas** es que el tamaño del radio hidrodinámico final es más pequeño con respecto a otros recubrimientos.⁵³ Entre las diversas moléculas pequeñas, las **aminas** y **aminosilanos** se emplean en la síntesis de MNPs de óxido de hierro en un solo paso mediante descomposición térmica, con resultados satisfactorios, generando NPs estables en medio acuoso y adecuadas para aplicaciones biomédicas.⁵⁴ Otros compuestos habitualmente utilizados son los **compuestos tiolados**, como por ejemplo el ácido 2,3-mesodimercaptosuccínico (DMSA), utilizado ampliamente por su capacidad estabilizante. Esta molécula posee dos grupos carboxilo y dos grupos tiol y es introducida sobre la superficie de la MNPs mediante intercambio de ligandos.⁵⁵ El uso del DMSA es interesante cuando las MNPs tienen como aplicación la administración de fármacos de manera selectiva. Por ejemplo, Valois et al. demostraron que las MNPs recubiertas con DMSA presentan una distribución específica hacia el pulmón desde 5 minutos hasta 24 h después de su administración intravenosa, favoreciendo así concentraciones elevadas de fármaco sin aumentar los efectos secundarios en otros órganos.⁵⁶

Las **macromoléculas** utilizadas como material de recubrimiento de la superficie de MNPs se pueden dividir en dos grandes grupos: **polímeros** y **liposomas**. Los **polímeros** han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades fisicoquímicas. Su ventaja en el recubrimiento de MNPs consiste en el aumento de las fuerzas repulsivas, compensando las fuerzas atractivas y magnéticas y formando una barrera para evitar la aglomeración de las MNPs. Los polímeros pueden tener carácter natural o sintético y pueden ser funcionales (poseen grupos funcionales activos) o pasivadores, dando lugar a MNPs con unas propiedades determinadas dependiendo de su aplicación posterior. Dos ejemplos significativos de **polímeros naturales** utilizados para el recubrimiento de MNPs son el dextrano y el quitosano. El dextrano es un polímero biocompatible y estable en soluciones acuosas, formado por unidades de α-D-glucopiranósil con diferentes longitudes y grados de ramificación, que permiten la quelatación o la formación de enlaces de hidrógeno con la superficie de las MNPs de manera eficiente.⁵⁷ El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por unidades β(1-4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamida distribuidas aleatoriamente, es biocompatible, biodegradable, hidrofílico y no es tóxico.⁵⁸ En cuanto a los **polímeros sintéticos**, existe una amplia variedad con diferentes características y propiedades, los más comunes siendo el polietilenglicol (PEG) por su alto carácter hidrofílico,^{59,60} el alcohol polivinílico (PVA) por su mejora en la monodispersidad de las MNPs,⁶¹ y el alginato por sus repulsiones electrostáticas debido al elevado número de grupos carboxilo.^{62,63} Se han estudiado muchos otros polímeros anfifílicos como el poli(anhídrido maleico-alt-1-

octadeceno(PMAO),⁶⁴ poli(anhídrido maleico-alt-tetradeceno (PMAT),⁶⁵ copolímero bloque de poli (estireno – ácido acrílico)⁶⁶ y bloque de PEG-polilactida.⁶⁷ El recubrimiento de las MNPs con estos polímeros anfifílicos permite un intercalado de las cadenas hidrocarbonadas de éste con las del surfactante que se encuentra en la superficie de las MNPs, formando un número elevado de interacciones (uniones multipuntuales) que confiere una alta estabilidad al recubrimiento. Otras ventajas de estos polímeros es la obtención de MNPs recubiertas aisladas y dispersas, sin la formación de agregados apreciables. El método es sencillo, con rendimientos muy elevados y presenta una versatilidad en cuanto al tamaño y tipo de material que forman las MNPs, pero requiere una adecuada purificación para eliminar el exceso de polímero.⁶⁸ Los grupos carboxilo y amino de estos polímeros pueden ser empleados para posteriores funcionalizaciones con diferentes biomoléculas. Todas estas ventajas hacen de estos tipos de polímeros unos excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas.

Los **liposomas**, al igual que algunos polímeros, pueden encapsular MNPs de distintos tamaños, en forma de bicapa lipídica, reuniendo un determinado número de MNPs en su interior, formando agregados que con tamaños comprendidos entre 100 nm y 5 μm .^{69,70}

- **Recubrimiento inorgánico**

Las MNPs recubiertas con materiales inorgánicos son de gran interés por su variedad de aplicaciones biomédicas. Estos materiales incluyen sílice, metales, no metales, óxidos y sulfuros y generalmente forman estructuras Núcleo@Envoltura. La **sílice (SiO_2)** es un material inerte químicamente, mejora la estabilidad de las MNPs, evita interacciones entre partículas y la generación de agregados, favorece la protección de las MNPs del medio y tiene una buena biocompatibilidad.⁷¹ Uno de los métodos más usados para crear MNPs recubiertas con sílice se conoce como el proceso Stöber y consiste en la hidrólisis y condensación de un precursor sol-gel como es el ortosilicato de tetraetilo (TEOS).^{72,73} La presencia de grupos silanol en el recubrimiento de las MNPs con sílice es una ventaja, ya que pueden reaccionar con agentes de acoplamiento uniéndose covalentemente a ligandos.^{74,75} Para poder unir biomoléculas a la superficie de sílice se tiene que realizar un método de silanización introduciendo grupos como aminas y sulfidrilos.

En cuanto al recubrimiento con metales, el **oro (Au)** es el más utilizado por su estabilidad e inercia química. Este recubrimiento no provoca alteraciones en las propiedades magnéticas de la MNPs independientemente del grado de adición de Au.⁷⁶ La **plata (Ag)** tiene propiedades antibacterianas presentando una capacidad

esterilizadora muy fuerte.⁷⁷ La combinación de la plata y el oro puede producir efectos sinérgicos y mejorar las propiedades biomédicas de las MNPs, como pueden ser las propiedades ópticas.⁷⁸

Si nos centramos en la mejora de las propiedades magnéticas en recubrimientos inorgánicos los **óxidos metálicos o sulfuros** son unos buenos candidatos por combinación de dos fases magnéticas diferentes formando MNPs funcionalizadas con variedad de aplicaciones.^{79,80}

En este trabajo se ha llevado a cabo la estabilización de las MNPs en medio acuoso mediante la adición de un polímero anfifílico, el poli(anhídrido maléico-*alt*-1-octadeceno) o PMAO, basándonos en un proceso previamente optimizado en nuestro grupo de investigación.⁸¹ El polímero forma una estructura Núcleo@Envoltura protegiendo la superficie de las MNPs, estabilizándolas en medio acuoso y favoreciendo la posterior funcionalización gracias a los grupos funcionales presentes en la capa externa.

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1 Síntesis de MNPs de óxido de hierro en medio orgánico

Como se ha indicado en el capítulo 1, las propiedades magnéticas de las MNPs vienen dictadas por su tamaño, composición química, distribución de tamaños y morfología. Estas propiedades se pueden controlar ajustando distintos parámetros en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro: el disolvente de la reacción, el precursor de hierro, la relación precursor/surfactante, la concentración de reactivos y la temperatura de reacción.

En este trabajo se han utilizado MNPs de 12 nm debido a sus propiedades magnéticas^{82,83} y su capacidad de generar calor, al aplicar un campo magnético externo, debido a la contribución de los mecanismos de relajación de Neel y Brownian, obteniendo como resultado una disipación total del calor.⁸⁴ Las MNPs esféricas de 12 nm de tamaño fueron sintetizadas a partir de semillas de 6 nm (procedimiento designado como crecimiento o nucleación heterogénea), modificando las relaciones de precursor y surfactante, rampas de temperatura para los procesos de nucleación y crecimiento, así como la adición de semillas de NPs de 6nm, como se muestra en la tabla 2.

a) SEMILLAS 6 nm				
Fe(acac)₃ Concentración (mM)	Relación molar Fe: ácido oleico: oleilamina: diol	Disolvente	Programa de temperatura	
50	1 : 2.8 : 2.1 : 4.5	Éter bencílico	Calentamiento t.a - 200 °C	180 °C / h
			Permanecer a 200 °C	2 h
			Calentamiento 200 - 305 °C	10 °C / min
			Permanecer a 305 °C	2 h
b) RECRECIMIENTO 12 nm				
Fe(acac)₃ Concentración (mM)	Semillas de 6 nm	Relación molar Fe: ácido oleico: oleilamina: diol	Disolvente	Programa de temperatura
50	40 mg de Fe	1 : 0.7 : 0.5 : 4.5	Éter bencílico	Calentamiento t.a - 100 °C
				Permanecer a 100 °C
				Calentamiento 100 - 200 °C
				3 °C / min
				Permanecer a 200 °C
				Calentamiento 200 - 305 °C
				7 °C / min
				Permanecer a 305 °C
				1 h

Tabla 2. Resumen de las condiciones de reacción de MNPs. a) semillas de 6 nm, y b) NPs de 12 nm de diámetro.

La síntesis de MNPs de óxido de hierro se llevó a cabo mediante descomposición térmica,⁸⁵ utilizado como precursor Fe(acac)₃, como surfactantes ácido oleico y oleilamina, como reductor el 1,2 – hexadecanodiol y como disolvente éter bencílico. Todos los reactivos se adicionaron a la vez en un matraz de 4 bocas provisto de agitación mecánica y bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se calentó la mezcla de reacción a 200 °C, etapa en la cual se favorece la formación de un complejo intermedio precursor⁸⁶ (Ecuación 2) capaz de generar núcleos; la mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 2 horas para estabilizar la reacción debido a su cinética lenta, y hasta que la generación de los precursores intermedios finalice. Transcurrido dicho tiempo, se elevó la temperatura progresivamente hasta 305 °C, temperatura superior al punto de ebullición del éter bencílico (285 °C) durante otras 2 horas, provocando la descomposición de las especies precursoras en núcleos rodeados de moléculas de surfactantes. El proceso de nucleación es instantáneo observando pequeñas explosiones ocasionadas por la descomposición de los complejos de hierro con ácido oleico.



Las moléculas de surfactantes que rodean los núcleos forman una capa dinámica de cuya composición dependerá el tamaño y forma de las nanopartículas. El aumento del tamaño de las MNPs finales se verá favorecido cuanto mayor sea la proporción de ácido oleico debido a su mejor capacidad de coordinación a los átomos de Fe. La parte hidrofílica se une a la superficie de las nanopartículas y la parte hidrofóbica se orienta hacia el exterior evitando interacciones y agregaciones entre las nanopartículas. El crecimiento se verá limitado por la presencia de ligandos como la oleilamina con menor capacidad de coordinación. El uso de un disolvente con un alto punto de ebullición favorece la obtención de nanopartículas con propiedades cristalinas mejoradas debido a la ordenación de los átomos, puesto que presentan una cinética de reacción lenta y a bajas temperaturas no se consigue esta propiedad.

2.2.1.1 Caracterización de MNPs de óxido de hierro en fase orgánica

➤ El tamaño, forma y homogeneidad de las MNPs de óxido de hierro se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 8 muestra la morfología esférica de las NPs de 6.3 ± 0.5 y 11.3 ± 0.7 nm de diámetro, así como su homogénea distribución de tamaños.

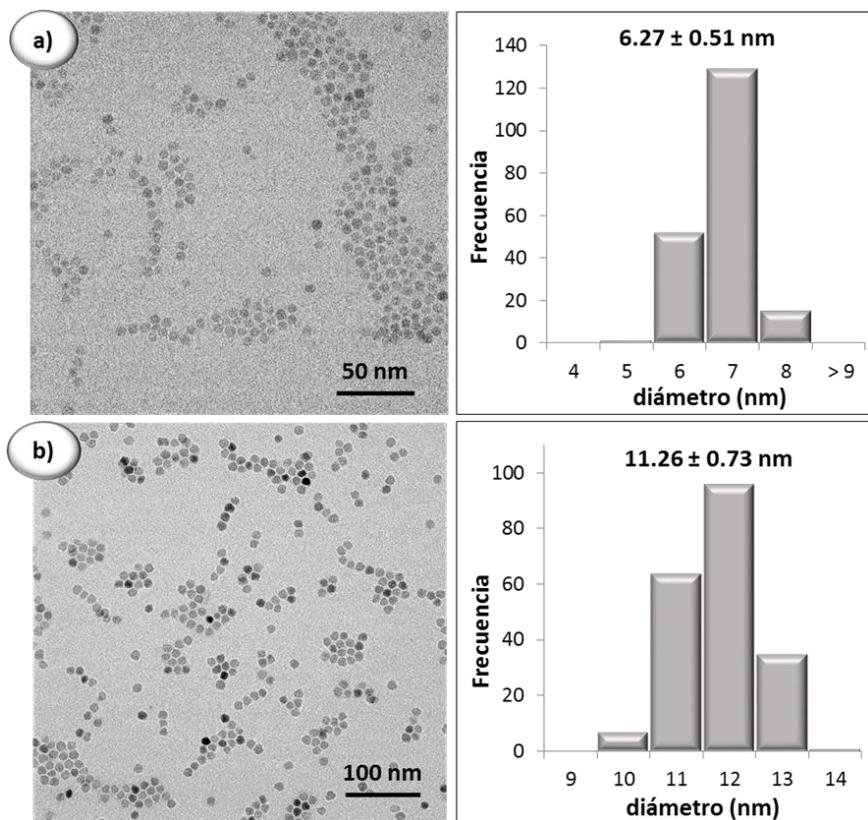


Figura 8: a) Izquierda: micrografía de TEM de la síntesis de semillas de MNPs (escala = 50 nm). Derecha: histograma de tamaño (desviación estándar inferior al 10%); b) Izquierda: micrografía de TEM del recrecimiento de MNPs (escala 100 nm). Derecha: histograma de tamaño (desviación estándar inferior al 10%).

➤ El análisis termogravimétrico (TGA) proporciona información sobre la pérdida de masa de las MNPs con respecto a la temperatura. Analizando el termograma que se muestra en la Figura 9, se observa en torno a los 200 °C el comienzo de pérdida de masa orgánica, la elevada temperatura indicando la fuerte unión de las cadenas de ácido oleico a la superficie de las MNPs.

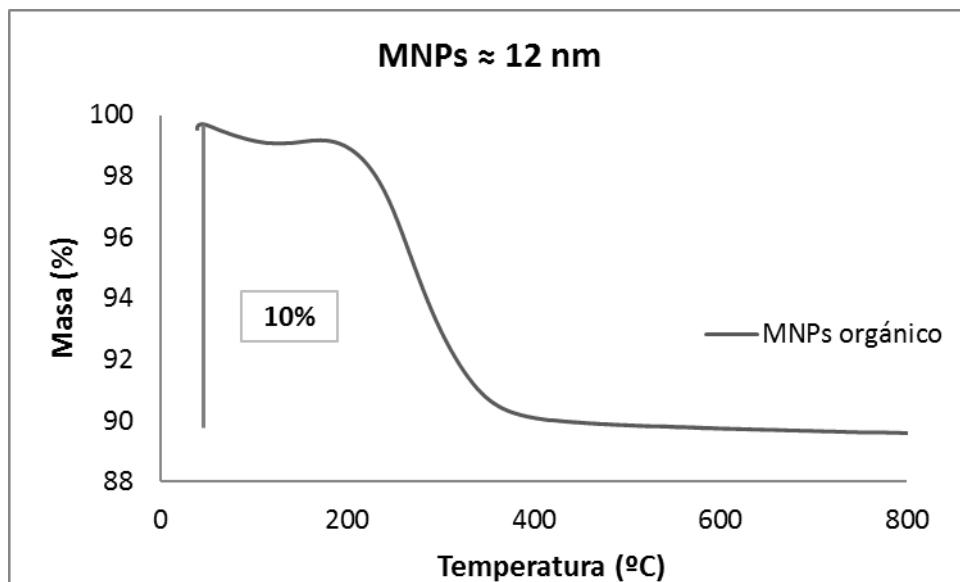


Figura 9: Termograma de las MNPs de 12 nm

El porcentaje de pérdida de materia orgánica que corresponde a un 10% proporciona información sobre la cantidad de ácido oleico que recubre la superficie de las MNPs, así como la proporción de equivalentes unidos a la superficie con respecto al adicionado inicialmente.

➤ La caracterización magnética de las MNPs de óxido de hierro se llevó a cabo utilizando un magnetómetro (SQUID, *Superconducting Quantum Interference Devices*), dispositivo superconductor de interferencia cuántica, para registrar las curvas de magnetización aplicando un campo a una temperatura fijada. Los resultados obtenidos indicaron que las MNPs sintetizadas tenían un comportamiento superparamagnético a 300 K con coercitividad despreciable, lo que las hace idóneas para aplicaciones biomédicas en las que es deseable la ausencia de magnetización remanente de campo magnético. Los valores de la magnetización de saturación se encuentran en torno a 80 Am²/kg_{Fe3O4}, valor típico observado para las MNPs de magnetita/maghemita.⁸⁷ Este valor de la magnetización de saturación confirma la estructura cristalina homogénea en toda la partícula, y descarta la formación de fases antiferromagnéticas como la wustita en el núcleo de la partícula que pueden hacer disminuir los valores de magnetización de saturación.⁸⁸

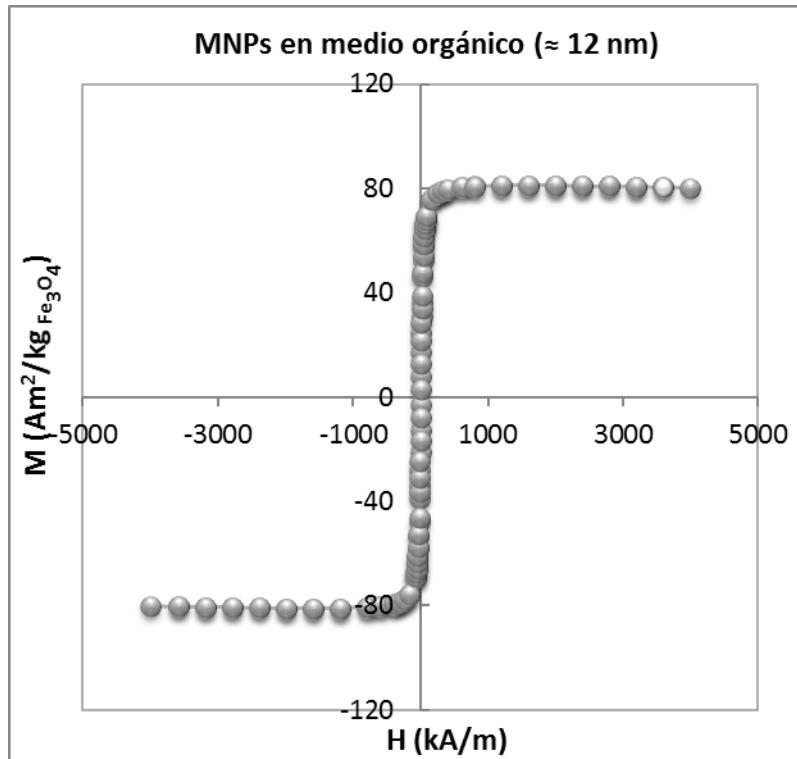


Figura 10: Magnetización en función del campo aplicado a 300 K para MNPs de 12 nm en medio orgánico.

2.2.2 Estabilización de MNPs de óxido de hierro en medio acuoso

El procedimiento utilizado en este trabajo para transferir a fase acuosa las MNPs sintetizadas en disolvente orgánico fue la adición de un polímero anfifílico [poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) –PMAO], usando una modificación de un procedimiento descrito anteriormente.⁸¹ La cadena hidrocarbonada, parte hidrofóbica de este polímero, se intercala con las cadenas de ácido oleico unidas a la superficie de las MNPs, orientando así las unidades de anhídrido maléico hacia el exterior. Tras su hidrólisis en medio básico, los grupos anhídrido generan una cubierta de grupos carboxilo (Figura 11), favoreciendo la estabilidad de las MNPs en medio acuoso y generando grupos funcionales para la unión de diferentes biomoléculas.

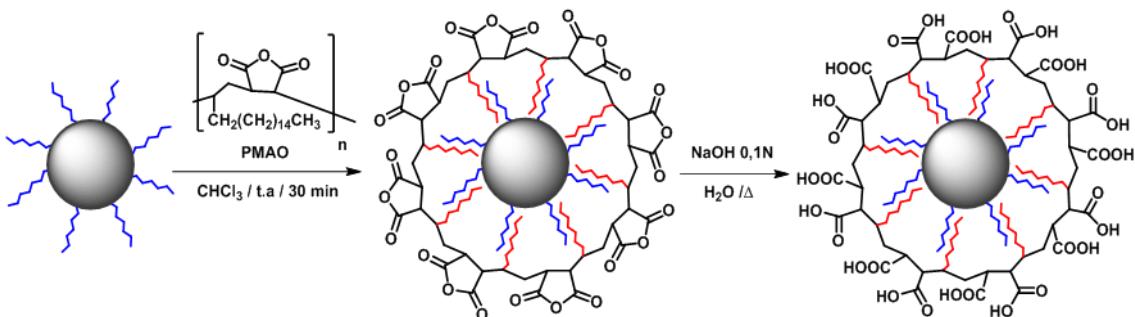


Figura 11: Esquema del procedimiento de estabilización de NPs en medio acuoso con PMAO

Un factor importante a tener en cuenta en la estabilización de las MNPs en agua es la cantidad de polímero que se adiciona a las MNPs (directamente proporcional al área superficial de éstas). Un exceso de polímero podría ocasionar un proceso de purificación de las MNPs más largo y como resultado una disminución del rendimiento del proceso de estabilización en medio acuoso. Si por el contrario se tiene un defecto de polímero, las MNPs podrían no estar totalmente recubiertas o competir entre ellas provocando su desestabilización y agregación.

Para MNPs de 12 nm, la estabilización se llevó a cabo añadiendo una relación de 400 monómeros/nm² en una disolución en cloroformo, bajo continua sonicación a temperatura ambiente, y adicionando gota a gota las MNPs, favoreciendo así la monodispersidad de la mezcla en disolución. Posteriormente se evaporó el disolvente hasta casi sequedad y se hidrolizaron los grupos anhídridos del polímero con hidróxido sódico a 70 °C. Las MNPs transferidas a medio acuoso fueron filtradas con un filtro de 0.2 µm de poro para eliminar los posibles agregados formados en la reacción.

Una vez recubiertas las MNPs, se procedió a eliminar el exceso de polímero. En bibliografía se describen diversos métodos para purificar las MNPs,⁶⁵ en este trabajo, las MNPs se purificaron realizando lavados con agua mediante ultracentrifugación a 69000 x g durante dos horas, consiguiendo así separar por peso y densidad las NPs recubiertas de polímero de las micelas⁸⁹ formadas en la hidrólisis del polímero libre presentes en el sobrenadante.

El procedimiento de lavado de las MNPs se realizó tres veces y se comprobó la eficacia del método de purificación mediante electroforesis de gel de Agarosa, ya que polímero que se encuentra libre emite fluorescencia bajo excitación a una longitud de onda de 302 nm (Figura 12). En el gel de Agarosa se observa que las MNPs no presentaban exceso de polímero libre. También se puede apreciar la ausencia de agregados, los cuales quedarían retenidos en el comienzo del pocillo del gel de electroforesis, debido a que su tamaño y densidad superficial no permitirían el desplazamiento. En cuanto al exceso de polímero, en el sobrenadante del segundo lavado apenas se aprecia la emisión de fluorescencia, mientras que en el tercer lavado se puede confirmar la ausencia de polímero libre.

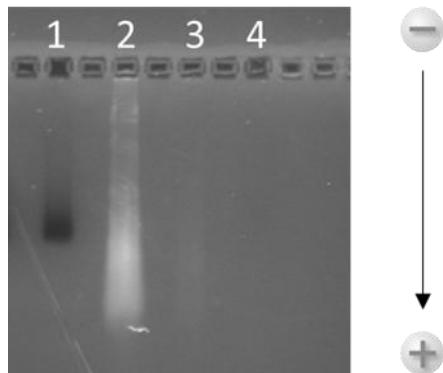


Figura 12: Imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de MNPs estabilizadas en agua bajo luz UV. Carril 1: MNPs purificadas sin polímero libre; Carril 2: primer sobrenadante del procedimiento de lavado, PMAO libre; Carril 3: segundo sobrenadante del procedimiento de lavado; Carril 4: tercer sobrenadante del procedimiento de lavado.

2.2.2.1 Caracterización de MNPs de óxido de hierro estabilizadas en agua

➤ La micrografía de TEM de las MNPs estabilizadas en medio acuoso (Figura 13) demuestra que las MNPs mantienen la distribución estrecha de tamaños de alrededor de 12 nm, semejante a las MNPs de partida en medio orgánico. Sin embargo, si la microscopía electrónica permite observar el tamaño del núcleo de óxido de hierro, no es la técnica más adecuada para caracterizar el espesor de la capa de recubrimiento de las MNPs, debido al alto voltaje de trabajo. Como se detalla a continuación, se realizaron medidas del radio hidrodinámico utilizando la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), así como un análisis termogravimétrico que permitió calcular la cantidad de recubrimiento polimérico de las MNPs.

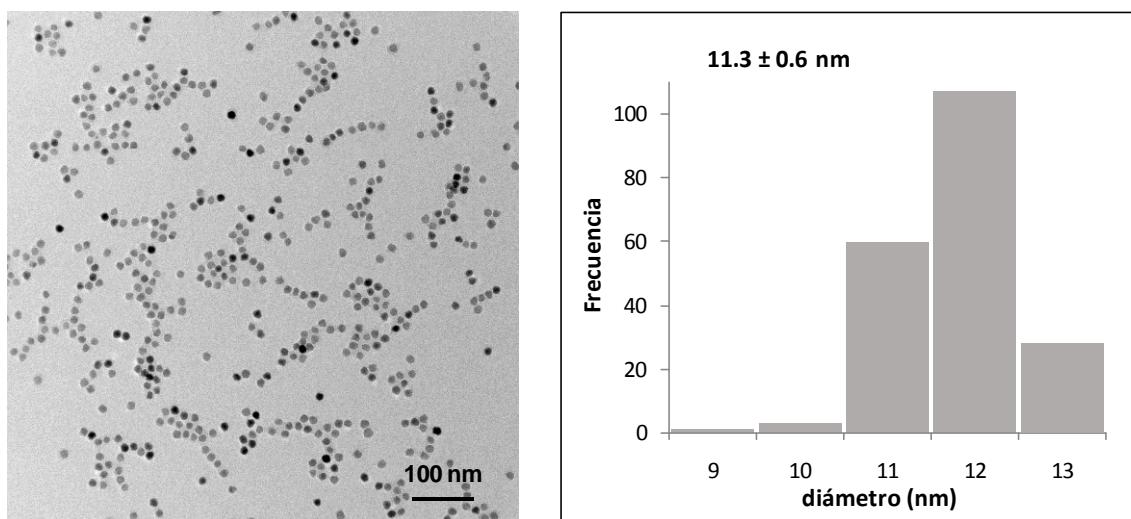


Figura 13: Izquierda: micrografía de TEM de la síntesis de MNPs en medio acuoso (escala 100 nm). Derecha: histograma de tamaño (desviación estándar inferior al 10%)

➤ El tamaño de las MNPs en disolución se determinó mediante la medida del diámetro hidrodinámico (DLS) a una concentración de 0.1 mg de Fe/ml y pH ≈ 7, y se comparó con el diámetro del núcleo de hierro obtenido mediante imágenes de TEM como se muestra en la Tabla 3.

	Microscopio Electrónico de transmisión (TEM) (nm)	Diámetro Hidrodinámico (DLS) (nm)
MNPs@PMAO	11.3 ± 0.6	29.8 ± 1.0

Tabla 3: Estimación del espesor de capa de recubrimiento de NPs en medio acuoso.

➤ Para saber la cantidad de materia orgánica en porcentaje en masa, se realizó un análisis termogravimétrico, en el cual se comparó la pérdida de masa orgánica de las MNPs en medio orgánico que tenían ácido oleico en la superficie, con las MNPs@PMAO estables en medio acuoso (Figura 14). La diferencia de 23% corresponde a la cantidad de polímero unido a la superficie. Con estos datos se pudo estimar la cantidad de polímero y por tanto el número de grupos carboxilo por NP (aproximadamente 4300), dato importante de cara a posteriores funcionalizaciones.

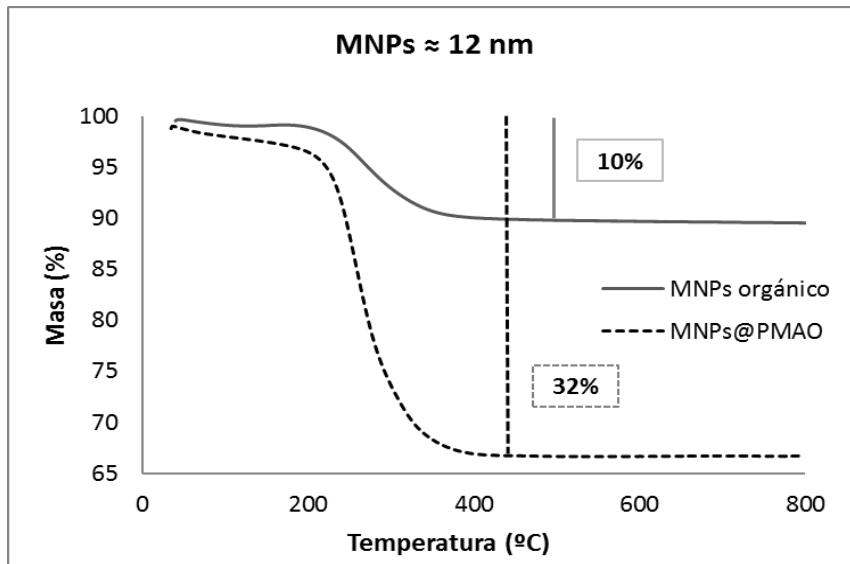


Figura 14: Representación del porcentaje de pérdida de masa con respecto de la temperatura, de MNPs recubiertas con ácido oleico en medio orgánico y MNPs@PMAO recubiertas con polímero PMAO.

➤ La caracterización magnética de las MNPs estabilizadas en medio acuoso (MNPs@PMAO) demostró que el recubrimiento polimérico no altera las propiedades magnéticas de las MNPs. Los valores de magnetización de saturación que se observan en la Figura 15 son similares, siendo para las MNPs en medio orgánico de $80 \text{ Am}^2/\text{kg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ y $84 \text{ Am}^2/\text{kg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ para las MNPs@PMAO.

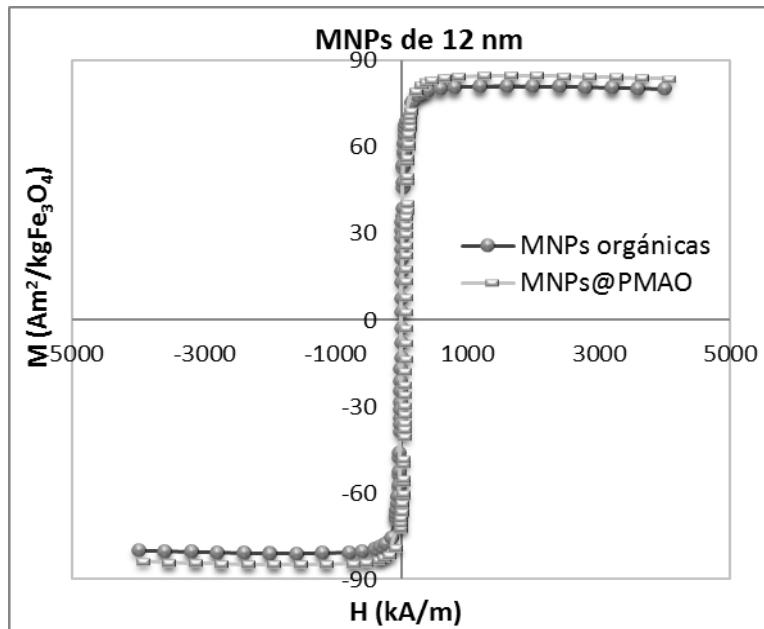


Figura 15: Comparación de la magnetización en función del campo aplicado a 300 K para MNPs de 12 nm en medio orgánico y estabilizadas en medio acuoso.

➤ La capacidad de las MNPs de transformar la energía magnética en calor bajo la aplicación de un campo magnético externo se midió mediante el índice de absorción específica (SAR). El valor obtenido depende de las propiedades de las MNPs, como son el tamaño, forma, distribución, cristalinidad y concentración de éstas, así como de la frecuencia y la amplitud del campo aplicado.^{90,91}

Las MNPs@PMAO de 12 nm presentaron un valor de SAR de $290 \text{ W/g}_{\text{Fe}}$ a una frecuencia $f = 829 \text{ kHz}$ y un campo de $H = 20.05 \text{ kA/m}$ para una concentración de 1 mg Fe/ml . Sin embargo, este valor de SAR no se puede comparar directamente con otros valores descritos en bibliografía,⁹² puesto que para igual tamaño y morfología de las NPs se pueden obtener valores diferentes, debido al campo aplicado y su frecuencia. El poder de pérdida intrínseca (ILP, Intrinsic Loss Power) es un parámetro diseñado para permitir comparaciones entre diferentes aparatos de medida térmicamente aislados, independientemente del campo y frecuencia que sea aplicado a las MNPs.⁹³ El valor de ILP de las MNPs mencionadas corresponde a $0.87 \text{ nHm}^2/\text{kg}$, valor superior a MNPs de similares características.^{92,94,95}

2.3. CONCLUSIONES

En este capítulo, se han sintetizado NPs magnéticas esféricas hidrófobas de 12 nm de diámetro mediante descomposición térmica de un precursor organometálico en un disolvente de alto punto de ebullición, favoreciendo la obtención de MNPs monodispersas, con una estrecha distribución de tamaños y elevada cristalinidad. Las MNPs fueron posteriormente recubiertas con un polímero anfifílico [poli(anhídrido maleico-*alt*-1-octadeceno) –PMAO] que además de estabilizar las MNPs en medio acuoso proporciona grupos funcionales para posteriores conjugaciones.

La caracterización de las MNPs mediante microscopía electrónica (TEM) demostró que las NPs sintetizadas en medio orgánico conservan su morfología y tamaño tras el paso de transferencia a medio acuoso. Mediante análisis termogravimétrico (TGA) se pudo estimar la cantidad de polímero unido con respecto a las cadenas de ácido oleico que tienen las MNPs. En cuanto a la caracterización magnética, las MNPs presentan un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente. Las medidas de SAR muestran la alta capacidad de absorber energía y transformarla en calor comparado con valores que se muestran en literatura.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los disolventes y reactivos empleados en la realización de este trabajo han sido suministrados por diferentes casas comerciales (Sigma-Aldrich, Acros Organics).

2.4.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe_xO_y)

2.4.1.1 Semillas de 6nm

En un matraz de 4 bocas se mezclaron 0.71 g (2.01 mmol) de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (99%), 2.58 g (9.98 mmol) de 1,2-hexadecanodiol (90%), 2 ml (5.65 mmol) de ácido oleico (90%) y 2 ml (4.42 mmol) de oleilamina (70%) en 40 ml de éter bencílico, en continua agitación mecánica a 40 rpm utilizando una varilla de vidrio de áncora, a temperatura ambiente, y en atmósfera inerte de nitrógeno que se mantuvo constante durante toda la reacción. La mezcla obtenida se colocó en una manta calefactora y se calentó hasta 200 °C durante 2 h, seguidamente se aumentó la temperatura hasta alcanzar 305 °C con una velocidad constante (3 °C/ min), y se mantuvo a esta temperatura durante 2 h. Finalizada la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se procedió a eliminar el exceso de reactivos mediante la desestabilización y consiguiente precipitación de las MNPs con etanol, separando el precipitado del sobrenadante con un imán. Las MNPs se volvieron a resuspender en hexano y el procedimiento se realizó

varias veces. El precipitado resultado tras el último paso de lavado se resuspendió en una mezcla de hexano, ácido oleico y oleilamina en proporción 90:5:5 respectivamente y las MNPs se almacenaron a 5 °C.

2.4.1.2 Crecimiento de semillas de 6 a 12 nm

Para la obtención de MNPs de mayor tamaño se utilizaron las MNPs de 6 nm, descritas en el apartado anterior, como semillas. Para ello se partió de 40 mg de Fe de las semillas de MNPs (cantidad cuantificada mediante determinación de la concentración de hierro de la muestra), lavadas de igual forma que en el apartado anterior para eliminar el exceso de ácido oleico y oleilamina. Las semillas disueltas en 5 - 10 ml de hexano se añadieron a un matraz contenido 1.42 g (4.02 mmol) de Fe (acac)₃ (99%), 5.16 g (19.97 mmol) de 1,2-hexadecanodiol (90%), 1 ml (5.65 mmol) de ácido oleico (90%), 1 ml (4.42 mmol) de oleilamina (70%) y 40 ml de éter bencílico. La mezcla se calentó a 100 °C durante 30 minutos para eliminar el exceso de hexano presente, posteriormente se aumentó la temperatura hasta 200 °C; alcanzada dicha temperatura, se mantuvo durante 1 h y posteriormente se calentó hasta 305 °C y se mantuvo durante 1 h más a reflujo, en atmósfera inerte y bajo continua agitación.

La purificación de las MNPs de 12 nm y su almacenaje se llevó a cabo como anteriormente se ha descrito para las semillas de 6 nm. La cuantificación de la concentración de óxido de hierro obtenido se realizó mediante la técnica de determinación de hierro mencionada en el apartado 4.3 de este capítulo.

2.4.2 Transferencia a fase acuosa de las MNPs de óxido de hierro

La estabilización de las NPs magnéticas en medio acuoso se llevó a cabo utilizando el polímero anfífílico [poli(anhídrido maleico-*a/t*-1-octadeceno) (PMAO, PM: 30000 – 50000)]. Partiendo de 20 mg de Fe de MNPs de 12 nm descritas en el apartado anterior, se realizaron tres lavados, precipitando las MNPs en etanol para eliminar el exceso de surfactantes en disolución. Las MNPs se resuspendieron en 2 ml de cloroformo y se adicionaron gota a gota a una disolución de 224 mg de PMAO (400 monómeros/nm²) en 200 ml de cloroformo. La mezcla se mantuvo durante 15 minutos en un baño de ultra sonidos. Posteriormente se evaporó el cloroformo a vacío hasta un volumen aproximado de 20 ml y se añadieron 20 ml de NaOH 0.05 M calentando a 70 °C bajo agitación suave a vacío. Terminada la hidrólisis, se filtraron las NPs con un filtro de acetato de celulosa de 0.22 µm (Millipore). La purificación de las MNPs del exceso de polímero se llevó a cabo mediante tres lavados por ultracentrifugación a 69000 x g durante 2 horas. La completa purificación se comprobó mediante electroforesis de gel de agarosa.

2.4.3 Métodos de caracterización

➤ El tamaño y morfología de las nanopartículas magnéticas se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio Tecnai T20 (FEI) con cañón termoiónico y voltaje de 200 keV. Las nanopartículas en fase orgánica se lavaron tres veces con hexano y etanol como se ha descrito anteriormente para eliminar el exceso de surfactantes no unidos, y se diluyeron en cloroformo. Posteriormente, se depositó una gota de esta disolución en una rejilla de TEM de cobre con recubrimiento de carbono (*ElectronMicroscopySciences*) y se dejó secar a temperatura ambiente. Para las nanopartículas en fase acuosa se tomó una pequeña fracción de muestra y se diluyó en agua hasta una concentración de 0.1 mg de Fe/ml. Las medidas del diámetro se llevaron a cabo utilizando el software DigitalMicrograph. Se contabilizaron de cada micrografía de TEM unas 200 NPs y se representaron en un histograma de tamaños.

➤ El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo Universal V4.5 TA Instruments. En las MNPs en fase orgánica, se eliminó el disolvente hasta sequedad, a diferencia de las NPs en fase acuosa las cuales fueron lyophilizadas. El análisis se llevó a cabo en atmósfera de aire calentando hasta 800 °C a 10 °C por minuto.

➤ La concentración de hierro (mg/ml) de las muestras se determinó interpolando en una recta de calibrado unos estándares de hierro, medidos mediante procedimiento colorimétrico.⁹⁶ Para ello, se tomaron 50 µl de los diferentes estándares y muestras a analizar, se adicionaron 100 µl de agua regia (3HCl:1HNO₃) y la mezcla se incubó a 60 °C durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo se adicionaron 350 µl de agua MiliQ y del volumen total de la mezcla se tomaron 50 µl y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se adicionaron 60 µl de una disolución de Tiron (ácido 1,2-dihidroxibencen-3,5-disulfónico) 42 mM en hidróxido de potasio (KOH) 3.3 N y 100 µl fosfato de sodio (pH=9.7; 0.2 M). La disolución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro Multiskan™ Go UV/Vis (*Thermo Scientific*) a 480 nm, realizando una recta de calibrado con los datos de las disoluciones estándar utilizadas (0, 100, 200, 400, 600 y 800 µg Fe/ml). Todas las muestras se analizaron por triplicado. Mediante extrapolación de absorbancia de las muestras a analizar se obtuvo la concentración de hierro.

➤ La caracterización magnética de las nanopartículas se llevó a cabo en un magnetómetro SQUID MPMS-XL (Quantum Design). Para ello se introdujeron 50 µl de la suspensión de nanopartículas en una cápsula de policarbonato, que es

posteriormente introducida en el equipo de medida. El estudio de la magnetización en función del campo se realizó a 300 K en un rango de campo magnético entre -5 y 5 T.

➤ La unión del polímero a la superficie de las MNPs, así como la eliminación del exceso de esté en las etapas de lavado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se preparó una disolución al 1% (m/v) de agarosa en tampón tris-borato-EDTA 0.5X, se cargaron las muestras mezcladas con una disolución de glicerol al 20% en TBE 0.5X para facilitar la entrada de las NPs en los pocillos del gel. Se aplicó un voltaje de 90 V y 3 A de intensidad durante 45 minutos. El exceso de polímero se observó mediante transiluminación en forma de banda blanca a diferencia de las MNPs que son oscuras. El equipo empleado fue GeneGenius bio-imaging system (*Syngene*).

➤ Las medidas del tamaño hidrodinámico de las MNPs se realizaron en un equipo Brookhaven Zeta PALS, disolviendo las NPs en soluciones de KCl con una concentración de 0.1 mg de Fe/ml y pH alrededor de 7. Los valores obtenidos de dispersión dinámica de la luz (DLS) se trataron en función de distribución de intensidad y número de MNPs, a temperatura ambiente y realizando 5 medidas.

➤ Las medidas del índice de absorción específica (SAR) se realizaron en un equipo para hipertermia magnética serie DM100 (*nanoScaleBiomagnetics*) a una concentración de 1 mg de Fe/ml aplicando un campo magnético alterno con una frecuencia de 829 kHz y una amplitud de campo de 20.10 kA/m durante 3 minutos.

2.5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Sara Rivera su ayuda con el procedimiento de síntesis de NPs, a Lucía Gutiérrez por realizar las medidas de caracterización magnética y a Raluca Fratila por la adquisición de las imágenes de TEM mostradas en este capítulo, así como al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza por el acceso a sus equipos.

2.6. REFERENCIAS

- (1) Zhang Y, Kohler N, Z. M. Surface Modification of Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553–1561.
- (2) Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 4630–4660.
- (3) Ahn, B.; Mitra, R.; Hodge, A. M.; Lavernia, E. J.; Nutt, S. R. Strain Rate Sensitivity Studies of Cryomilled Al Alloy Performed by Nanoindentation. *Mater. Sci. Forum* **2008**, *584–586*, 221–226.

- (4) Gutsch, A.; Mühlenweg, H.; Krämer, M. Tailor-Made Nanoparticles via Gas-Phase Synthesis. *Small* **2005**, *1*, 30–46.
- (5) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2–5.
- (6) Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; Ul Haq, I.; Phull, A. R.; Ali, J. S.; Hussain, A. Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, *9*, 49–67.
- (7) Pantidos, N. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1–10.
- (8) Huang, H. Y.; Shieh, Y. T.; Shih, C. M.; Twu, Y. K. Magnetic Chitosan/iron (II, III) Oxide Nanoparticles Prepared by Spray-Drying. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 906–910.
- (9) Martínez, G.; Malumbres, a.; Mallada, R.; Hueso, J. L.; Irusta, S.; Bomatí-Miguel, O.; Santamaría, J. Use of a Polyol Liquid Collection Medium to Obtain Ultrasmall Magnetic Nanoparticles by Laser Pyrolysis. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 425605–425613.
- (10) Abid, A. D.; Kanematsu, M.; Young, T. M.; Kennedy, I. M. Arsenic Removal from Water Using Flame-Synthesized Iron Oxide Nanoparticles with Variable Oxidation States. *Aerosol Sci. Technol.* **2013**, *47*, 169–176.
- (11) Costo, R.; Bello, V.; Robic, C.; Port, M.; Marco, J. F.; Puerto Morales, M.; Veintemillas-Verdaguer, S. Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: Improving the Colloidal and Magnetic Properties. *Langmuir* **2012**, *28*, 178–185.
- (12) Hasany, S. F.; Ahmed, I.; Rajan, J.; Rehman, A. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 148–158.
- (13) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 397–415.
- (14) Jolivet, J.-P.; Chanéac, C.; Tronc, E. Iron Oxide Chemistry. From Molecular Clusters to Extended Solid Networks. *Chem. Commun.* **2004**, 481–487.
- (15) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17*, 1247–1248.
- (16) Wu, J.-H.; Ko, S. P.; Liu, H.-L.; Kim, S.; Ju, J.-S.; Kim, Y. K. Sub 5 Nm Magnetite Nanoparticles: Synthesis, Microstructure, and Magnetic Properties. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 3124–3129.
- (17) Khollam, Y. B.; Dhage, S. R.; Potdar, H. S.; Deshpande, S. B.; Bakare, P. P.; Kulkarni, S. D.; Date, S. K. Microwave Hydrothermal Preparation of Submicron-Sized Spherical Magnetite (Fe_3O_4) Powders. *Mater. Lett.* **2002**, *56*, 571–577.

- (18) Chen, F.; Gao, Q.; Hong, G.; Ni, J. Synthesis and Characterization of Magnetite Dodecahedron Nanostructure by Hydrothermal Method. *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 1775–1780.
- (19) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.
- (20) Rajamathi, M.; Seshadri, R. Oxide and Chalcogenide Nanoparticles from Hydrothermal/solvothermal Reactions. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *6*, 337–345.
- (21) Nanocrystallites, T. S.; Murray, C. B.; Noms, D. J.; Bawendi, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706–8715.
- (22) Rockenberger, J.; Scher, E. C.; Alivisatos, a P. A New Non-Hydrolytic Single-Precursor Approach to Surfactant-Capped Nanocrystals of Transition Metal Oxides - Supporting Information. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11595–11596.
- (23) Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. Bin. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798–12801.
- (24) Murray, C. B.; Sun, S.; Gaschler, W.; Doyle, H.; Betley, T. A.; Kagan, C. R. Colloidal Synthesis of Nanocrystals and Nanocrystal Superlattices. *IBM J. Res. Dev.* **2001**, *45*, 47–56.
- (25) Sun, S.; Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204–8205.
- (26) Yu, W. W.; Falkner, J. C.; Yavuz, C. T.; Colvin, V. L. Synthesis of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystals by Thermal Decomposition of Iron Carboxylate Salts. *Chem. Commun.* **2004**, *10*, 2306–2307.
- (27) Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-Large-Scale Syntheses of Monodisperse Nanocrystals. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891–895.
- (28) Shavel, A.; Liz-Marzán, L. M. Shape Control of Iron Oxide Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3762–3763.
- (29) Demortière, A.; Panissod, P.; Pichon, B. P.; Pourroy, G.; Guillon, D.; Donnio, B.; Bégin-Colin, S. Size-Dependent Properties of Magnetic Iron Oxidenanocrystals. *Nanoscale* **2011**, *3*, 225–232.
- (30) Amara, D.; Margel, S. Solventless Thermal Decomposition of Ferrocene as a New Approach for the Synthesis of Porous Superparamagnetic and Ferromagnetic Composite Microspheres of Narrow Size Distribution. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 15764–15772.

- (31) LaMer, V.; Dinegar, R. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847–4854.
- (32) Cushing, B. L.; Kolesnichenko, V. L.; Connor, C. J. O. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893–3946.
- (33) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (34) Barrera, C.; Herrera, A.; Zayas, Y.; Rinaldi, C. Surface Modification of Magnetite Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1397–1399.
- (35) Tsai, Z. T.; Wang, J. F.; Kuo, H. Y.; Shen, C. R.; Wang, J. J.; Yen, T. C. In Situ Preparation of High Relaxivity Iron Oxide Nanoparticles by Coating with Chitosan: A Potential MRI Contrast Agent Useful for Cell Tracking. *J. Magn. Magn. Mater.* **2010**, *322*, 208–213.
- (36) Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E. A.; Schulz, F.; Pöseit, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G.; *et al.* In Situ Functionalization and PEO Coating of Iron Oxide Nanocrystals Using Seeded Emulsion Polymerization. *Langmuir* **2013**, *29*, 4915–4921.
- (37) Li, L.; Jiang, W.; Luo, K.; Song, H.; Lan, F.; Wu, Y.; Gu, Z. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI Contrast Agents for Non-Invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* **2013**, *3*, 595–615.
- (38) Thanh, N. T. K.; Green, L. A. W. Functionalisation of Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nano Today*, **2010**, *5*, 213–230.
- (39) Shen, L.; Laibinis, P. E.; Hatton, T. A. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. *Langmuir* **1999**, *15*, 447–453.
- (40) Jun, Y. W.; Lee, J. H.; Cheon, J. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 5122–5135.
- (41) Lattuada, M.; Hatton, T. A. Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles. *Langmuir* **2007**, *23*, 2158–2168.
- (42) Yu, W. W.; Chang, E.; Falkner, J. C.; Zhang, J.; Al-Somali, a M.; Sayes, C. M.; Johns, J.; Drezek, R.; Colvin, V. L. Forming Biocompatible & Nonaggregated Nanocrystal FeNP in Water Using Amphiphilic Polymer. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2871–2879.

- (43) Bohara, R. A.; Thorat, N. D.; Pawar, S. H. Role of Functionalization: Strategies to Explore Potential Nano-Bio Applications of Magnetic Nanoparticles. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 43989–44012.
- (44) Sahoo, Y.; Goodarzi, A.; Swihart, M. T.; Y, T.; Kaur, N.; Furlani, E. P.; Prasad, P. N.; Ohulchanskyy, T. Y. Aqueous Ferrofluid of Magnetite Nanoparticles : Fluorescence Labeling and Magnetophoretic Control. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3879–3885.
- (45) Fauconnier, N.; Bée, A.; Roger, J.; Pons, J. N. Synthesis of Aqueous Magnetic Liquids by Surface Complexation of Maghemite Nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **1999**, *83*, 233–242.
- (46) Kandori, K.; Kawashima, Y.; Ishikawa, T. Effects of Citrate Ions on the Formation of Monodispersed Cubic Hematite Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *152*, 284–288.
- (47) Liu, C.; Huang, P. M. Atomic Force Microscopy and Surface Characteristics of Iron Oxides Formed in Citrate Solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1999**, *63*, 65–72.
- (48) Tejedor-Tejedor, M.; Anderson, M. The Protonation of Phosphate on the Surface of Goethite as Studied by CIR-FTIR and Electrophoretic Mobility. *Langmuir* **1990**, *6*, 602–611.
- (49) Persson, P.; Nilsson, N.; Sjöberg, S. Structure and Bonding of Orthophosphate Ions at the Iron Oxide-Aqueous Interface. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *177*, 263–275.
- (50) Li, Y.; Ji, L.; Wang, G.; Song, L. Q.; He, B.; Li, L.; Nie, Y.; Wu, Y.; Gu, Z. W. Study on the α -Cyclodextrin/poly(ethylene Glycol) Self-Assembly Supramolecular Nanoparticles for Drug Delivery. *Sci. China Chem.* **2010**, *53*, 495–501.
- (51) Sahoo, Y.; Pizem, H.; Fried, T.; Golodnitsky, D.; Burstein, L.; Sukenik, C. N.; Markovich, G. Alkyl Phosphonate / Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles : A Comparison with Fatty Acids. *Langmuir* **2001**, *17*, 7907–7911.
- (52) Mohapatra, S.; Pramanik, N.; Ghosh, S. K.; Pramanik, P. Synthesis and Characterization of Ultrafine Poly(vinylalcohol Phosphate) Coated Magnetite Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 823–829.
- (53) Günay, M.; Baykal, A.; Sözeri, H. Structural and Magnetic Properties of Triethylene Glycol Stabilized Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Supercond. Nov. Magn.* **2012**, *25*, 2415–2420.
- (54) Barick, K. C.; Aslam, M.; Prasad, P. V.; Dravid, V. P.; Bahadur, D. Nanoscale Assembly of Amine-Functionalized Colloidal Iron Oxide. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1529–1532.

- (55) Xie, J.; Chen, K.; Lee, H.-Y.; Xu, C.; Hsu, A. R.; Peng, S.; Chen, X.; Sun, S. Ultrasmall c(RGDyK)-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Specific Targeting to Integrin alphavbeta3-Rich Tumor Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7542–7543.
- (56) Valois, C. R. A.; Braz, J. M.; Nunes, E. S.; Vinolo, M. A. R.; Lima, E. C. D.; Curi, R.; Kuebler, W. M.; Azevedo, R. B. The Effect of DMSA-Functionalized Magnetic Nanoparticles on Transendothelial Migration of Monocytes in the Murine Lung via a β2 Integrin-Dependent Pathway. *Biomaterials* **2010**, *31*, 366–374.
- (57) Lee, K.; Kim, S.-G.; Kim, W.-S.; Kim, S. Properties of Iron Oxide Particles Prepared in the Presence of Dextran. *Korean J. Chem. Eng.* **2002**, *19*, 480–485.
- (58) Shete, P. B.; Patil, R. M.; Thorat, N. D.; Prasad, A.; Ningthoujam, R. S.; Ghosh, S. J.; Pawar, S. H. Magnetic Chitosan Nanocomposite for Hyperthermia Therapy Application: Preparation, Characterization and in Vitro Experiments. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *288*, 149–157.
- (59) Xie, J.; Xu, C.; Kohler, N.; Hou, Y.; Sun, S. Controlled PEGylation of Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3163–3166.
- (60) Sandiford, L.; Phinikaridou, A.; Protti, A.; Meszaros, L. K.; Cui, X.; Yan, Y.; Frodsham, G.; Williamson, P. A.; Gaddum, N.; Botnar, R. M.; *et al.* Bisphosphonate-Anchored Pegylation and Radiolabeling of Superparamagnetic Iron Oxide: Long-Circulating Nanoparticles for in Vivo Multimodal (T1 MRI-SPECT) Imaging. *ACS Nano* **2013**, *7*, 500–512.
- (61) Sairam, M.; Naidu, B. V. K.; Nataraj, S. K.; Sreedhar, B.; Aminabhavi, T. M. Poly(vinyl Alcohol)-Iron Oxide Nanocomposite Membranes for Pervaporation Dehydration of Isopropanol, 1,4-Dioxane and Tetrahydrofuran. *J. Memb. Sci.* **2006**, *283*, 65–73.
- (62) Llanes, F.; Ryan, D. H.; Marchessault, R. H. Magnetic Nanostructured Composites Using Alginates of Different M/G Ratios as Polymeric Matrix. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27*, 35–40.
- (63) Finotelli, P. V.; Morales, M. A.; Rocha-Leão, M. H.; Baggio-Saitovitch, E. M.; Rossi, A. M. Magnetic Studies of iron(III) Nanoparticles in Alginate Polymer for Drug Delivery Applications. In *Materials Science and Engineering C*; 2004; Vol. 24, pp. 625–629.
- (64) Di Corato, R.; Quarta, A.; Piacenza, P.; Ragusa, A.; Figuerola, A.; Buonsanti, R.; Cingolani, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. Water Solubilization of Hydrophobic Nanocrystals by Means of Poly(maleic Anhydride-Alt-1-Octadecene). *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1991.
- (65) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, J. W. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals.

- Nano Lett.* **2004**, *4*, 703–707.
- (66) Kim, B.-S.; Wang, J.-P.; Taton, T. A.; Qiu, J.-M. Magnetomicelles : Composite Magnetic Nanostructures from Magnetic Nanoparticles and Cross-Linked Amphiphilic Block Copolymer Micelles. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1987–1991.
- (67) Nasongkla, N.; Bey, E.; Ren, J.; Ai, H.; Khemtong, C.; Guthi, J. S.; Chin, S. F.; Sherry, A. D.; Boothman, D. A.; Gao, J. Multifunctional Polymeric Micelles as Cancer-Targeted, MRI-Ultrasensitive Drug Delivery Systems. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2427–2430.
- (68) Shtykova, E. V.; Huang, X.; Gao, X.; Dyke, J. C.; Schmucker, A. L.; Dragnea, B.; Remmes, N.; Baxter, D. V.; Stein, B.; Konarev, P. V.; *et al.* Hydrophilic Monodisperse Magnetic Nanoparticles Protected by an Amphiphilic Alternating Copolymer. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 16809–16817.
- (69) Kim, D. H.; Vitol, E. A.; Liu, J.; Balasubramanian, S.; Gosztola, D. J.; Cohen, E. E.; Novosad, V.; Rozhkova, E. A. Stimuli-Responsive Magnetic Nanomicelles as Multifunctional Heat and Cargo Delivery Vehicles. *Langmuir* **2013**, *29*, 7425–7432.
- (70) Kim, M.-J.; Jang, D.-H.; Lee, Y.-I.; Jung, H. S.; Lee, H.-J.; Choa, Y.-H. Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Drug Release Behavior of Liposome-Enveloped paclitaxel/Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 889–893.
- (71) Ashtari, P.; He, X.; Wang, K.; Gong, P. An Efficient Method for Recovery of Target ssDNA Based on Amino-Modified Silica-Coated Magnetic Nanoparticles. *Talanta* **2005**, *67*, 548–554.
- (72) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- (73) Im, S. H.; Herricks, T.; Lee, Y. T.; Xia, Y. Synthesis and Characterization of Monodisperse Silica Colloids Loaded with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *401*, 19–23.
- (74) Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554.
- (75) Liu, Q.; Xu, Z.; Finch, J. A.; Egerton, R. A Novel Two-Step Silica-Coating Process for Engineering Magnetic Nanocomposites. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 3936–3940.
- (76) Lyon, J. L.; Fleming, D. A.; Stone, M. B.; Schiffer, P.; Williams, M. E. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 719–723.
- (77) Gong, P.; Li, H.; He, X.; Wang, K.; Hu, J.; Tan, W.; Zhang, S.; Yang, X. Preparation and Antibacterial Activity of Fe₃O₄@Ag Nanoparticles. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 285604.

- (78) Xu, Z.; Hou, Y.; Sun, S. Magnetic Core/shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8698–8699.
- (79) Jun, Y.; Choi, J.; Cheon, J. Heterostructured Magnetic Nanoparticles: Their Versatility and High Performance Capabilities. *Chem. Commun.* **2007**, 1203–1214.
- (80) Cheon, J.; Park, J.-I.; Choi, J. -s.; Jun, Y. -w.; Kim, S.; Kim, M. G.; Kim, Y.-M.; Kim, Y. J. Magnetic Superlattices and Their Nanoscale Phase Transition Effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 3023–3027.
- (81) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1746–1755.
- (82) Leslie-Pelecky, D. L.; Rieke, R. D. Magnetic Properties of Nanostructured Materials. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 1770–1783.
- (83) Jun, Y.-W.; Huh, Y.-M.; Choi, J.-S.; Lee, J.-H.; Song, H.-T.; Kim, S.; Yoon, S.; Kim, K.-S.; Shin, J.-S.; Suh, J.-S.; *et al.* Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilisation for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5732–5733.
- (84) Suto, M.; Hirota, Y.; Mamiya, H.; Fujita, A.; Kasuya, R.; Tohji, K.; Jeyadevan, B. Heat Dissipation Mechanism of Magnetite Nanoparticles in Magnetic Fluid Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1493–1496.
- (85) Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *Nature* **2004**, *430*, 126–132.
- (86) Soon, G. K.; Piao, Y.; Park, J.; Angappane, S.; Jo, Y.; Hwang, N. M.; Park, J. G.; Hyeon, T. Kinetics of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystal Formation By ‘heating-Up’ process. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12571–12584.
- (87) Roca, A. G.; Morales, M. P.; O’Grady, K.; Serna, C. J. Structural and Magnetic Properties of Uniform Magnetite Nanoparticles Prepared by High Temperature Decomposition of Organic Precursors. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 2783–2788.
- (88) Chalasani, R.; Vasudevan, S. Form, Content, and Magnetism in Iron Oxide Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18088–18093.
- (89) Lin, C. A. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M.; Chang, W. H.; Parak, W. J. Design of an Amphiphilic Polymer for Nanoparticle Coating and Functionalization. *Small* **2008**, *4*, 334–341.
- (90) Kobayashi, T. Cancer Hyperthermia Using Magnetic Nanoparticles. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 1342–1347.
- (91) Deatsch, A. E.; Evans, B. A. Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle

- Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2014, 354, 163–172.
- (92) Shah, R. R.; Davis, T. P.; Glover, A. L.; Nikles, D. E.; Brazel, C. S. Impact of Magnetic Field Parameters and Iron Oxide Nanoparticle Properties on Heat Generation for Use in Magnetic Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, 387, 96–106.
- (93) Kallumadil, M.; Tada, M.; Nakagawa, T.; Abe, M.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A. Suitability of Commercial Colloids for Magnetic Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, 321, 1509–1513.
- (94) Tong, S.; Quinto, C. A.; Zhang, L.; Mohindra, P.; Bao, G. Size-Dependent Heating of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **2017**, 11, 6808–6816.
- (95) Fortin, J. P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J. C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2628–2635.
- (96) Dias, J. T.; Moros, M.; Del Pino, P.; Rivera, S.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, 52, 11526–11529.

Capítulo 3

Funcionalización de las MNPs-1 con ácidos nucleicos y péptidonucleicos

3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en el capítulo 2, se han diseñado MNPs de óxido de hierro estables en medios fisiológicos MNPs@PMAO (MNPs-1), con grupos funcionales carboxilo capaces de conjugarse con diferentes biomoléculas que contengan grupos amino (péptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y anticuerpos), para aplicaciones biomédicas *in vitro* e *in vivo*, en particular para la liberación controlada de fármacos mediante hipertermia magnética.

3.1.1 Funcionalización de MNPs-1 con biomoléculas

Los criterios principales para la unión de biomoléculas a los grupos funcionales de la superficie de las MNPs-1, van a depender de la aplicación a la que vaya destinado este tipo de plataforma. Aunque no existen protocolos “universales” de funcionalización, hay varios aspectos clave a tener en cuenta: la densidad de conjugación de la biomolécula, la distancia entre la nanopartícula y la biomolécula, el tipo de enlace (llábil o permanente) y el mantenimiento de la actividad de la biomolécula. Por otro lado, la funcionalización de MNPs-1 no debe alterar sus propiedades fisicoquímicas ni su estabilidad. Por tanto, la biofuncionalización de MNPs-1 es un proceso complejo.

Las principales estrategias empleadas para funcionalizar las MNPs con diferentes biomoléculas se pueden clasificar según las interacciones físicas o covalentes entre las MNPs y la biomolécula. La elección de la interacción está dictada por las propiedades químicas que presentan las MNPs y las biomoléculas, los grupos funcionales presentes

en la superficie de las MNPs, las biomoléculas a enlazar y las aplicaciones finales en las que se va a utilizar el bioconjugado formado.

- **Interacciones físicas:** Este tipo de interacciones incluye las electrostáticas, hidrofóbicas/hidrofílicas y de afinidad, las cuales poseen varias ventajas: son rápidas y altamente eficaces, sin necesitar la modificación de la MNP o biomolécula para que se produzca la unión (Figura1).

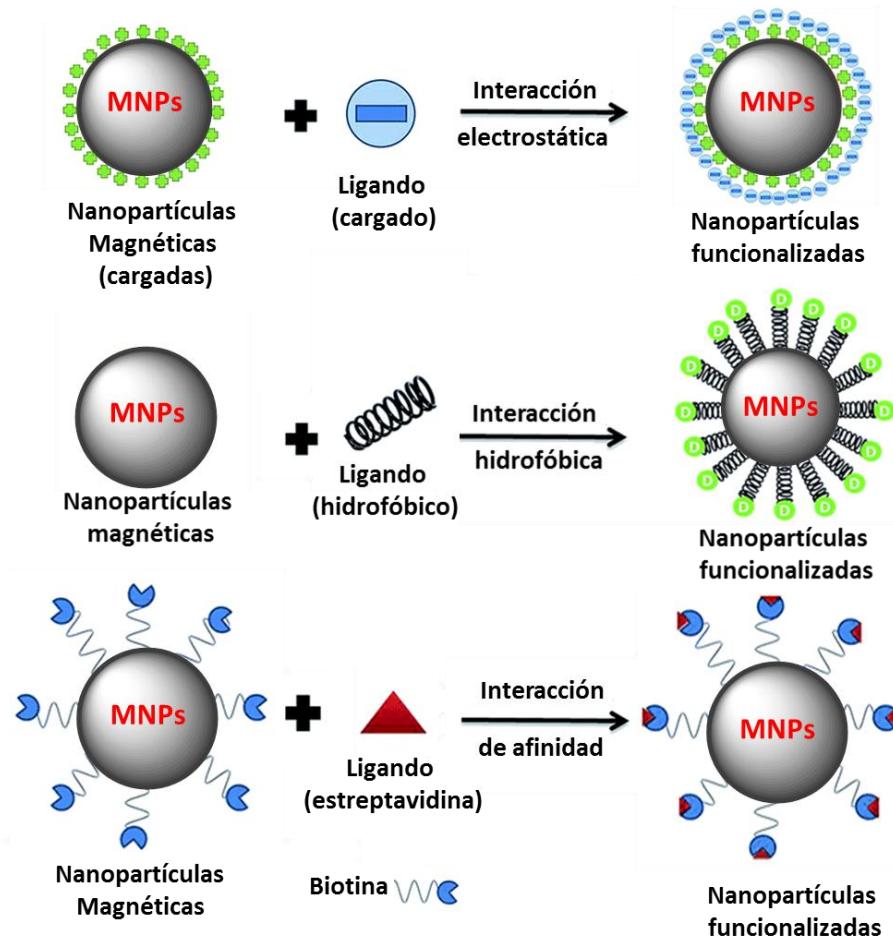


Figura 1. Esquema representativo de los diferentes tipos de interacciones físicas

Las interacciones electrostáticas se deben a la atracción que existe entre cargas opuestas y la unión mediante este tipo de interacciones es un enfoque ampliamente utilizado para la biofuncionalización de nanopartículas. Diversas investigaciones han demostrado su utilidad en MNPs recubiertas con polímeros catiónicos que se complejan con moléculas de ADN plasmídico cargado negativamente.^{1,2} Las interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas son muy útiles en la adsorción de biomoléculas hidrofóbicas sobre la superficie de las MNPs. Estas biomoléculas pueden albergar principios activos que pueden ser liberados mediante la degradación intracelular del recubrimiento de las MNPs.³ Las interacciones de

afinidad son más eficaces para la biofuncionalización de ligandos dirigidos a la superficie de las MNPs, debido a que el enlace es el más estable y fuerte de todos los enlaces no covalentes. A diferencia de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, la unión por afinidad no es sensible a estímulos como cambio de pH, salinidad o hidrofilia del medio.⁴ Un ejemplo de este tipo de interacción, es el formado por la modificación de la superficie de la MNPs con moléculas biotiniladas capaces de unirse específicamente a la estreptavidina.⁵ Este complejo se caracteriza por ser una de las interacción biológica no covalente más fuertes conocidas con una constante de disociación de 10^{-15} M.^{6,7}

- **Química covalente:** consiste en la formación de enlaces covalentes entre biomoléculas y grupos funcionales presentes en la superficie de las MNPs, siendo los más utilizados los grupos amino, ácido carboxílico y tiol. Estos grupos pueden unirse a diferentes biomoléculas ya sea directamente o mediante diversas estrategias de acoplamiento basadas en el grupo funcional implicado, formando un enlace fuerte y estable. Las estrategias de acoplamiento más comunes son:

a) Conjugación directa de MNPs con una determinada biomolécula, se produce gracias a los grupos funcionales presentes en la superficie de las MNPs, tales como amino, sulfhidrilo y aldehído (Figura 2). Esta estrategia es la más adecuada para la conjugación de biomoléculas como anticuerpos, azúcares y péptidos pequeños, puesto que no es necesario alterar la química de superficie de las MNPs. A excepción de las MNPs que presentan grupos amino en su superficie, estos métodos de conjugación son susceptibles de intercalación o reticulación, lo que hace que se vea limitado su uso en la conjugación de biomoléculas.⁸

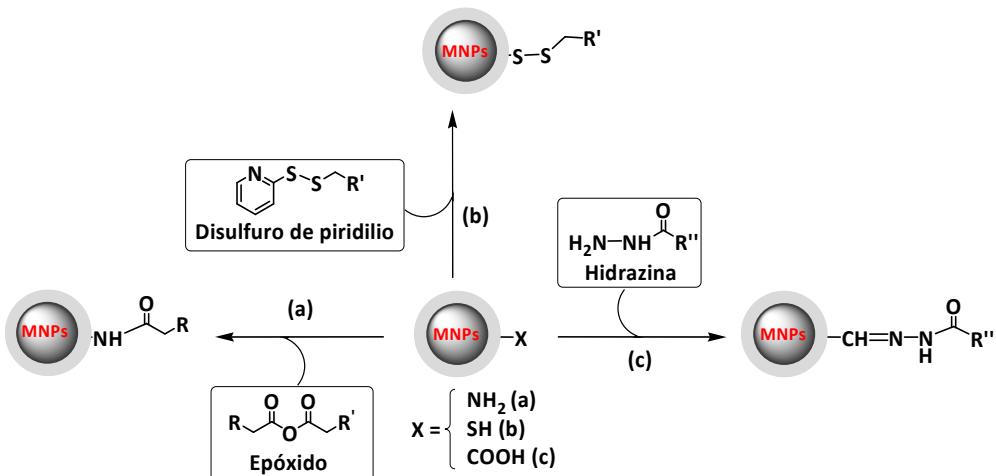


Figura 2. Esquema representativo de las diferentes estrategias de conjugación de MNPs con diferentes grupos funcionales, (a) amino (NH_2); (b) Sulfhidrilo (SH); y (c) carboxilo (COOH) de manera directa con diferentes reactivos.

b) Acoplamiento de maleimida entre aminas primarias presentes en la superficie de las MNPs y grupos tiol presentes en las proteínas. El reactivo de acoplamiento utilizado es un derivado de la maleimida, el más comúnmente empleado siendo el sulfosuccinimidil-4(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (Figura 3).⁹ El extremo de maleimida de SMCC puede dar una reacción de acoplamiento con grupos sulfhidrilo presentes en biomoléculas cuando el pH de la reacción está en el rango 6.5 – 7.5. A pH ≈ 7 la velocidad de reacción de los grupos sulfhidrilo es 1000 veces mayor que la de los grupos amino. Por lo contrario, a pHs más alcalinos la reacción con aminas se ve favorecida. Las desventajas de esta estrategia de acoplamiento son: i) el extremo de la maleimida puede sufrir hidrólisis a valores altos de pH, inactivando la molécula; ii) requiere una purificación del exceso de reactivo antes de hacer conjugar la biomolécula que presenta un grupo sulfhidrilo; y iii) el sulfo-SMCC tiene una solubilidad baja en agua (10 mg/ml) a temperatura ambiente, y debe usarse inmediatamente para evitar la pérdida excesiva de la capacidad de acoplamiento debido a la hidrólisis. Este método de acoplamiento se ha utilizado para conjugar biomoléculas, tales como ADN y proteínas, a la superficie de las MNPs.^{10,11}

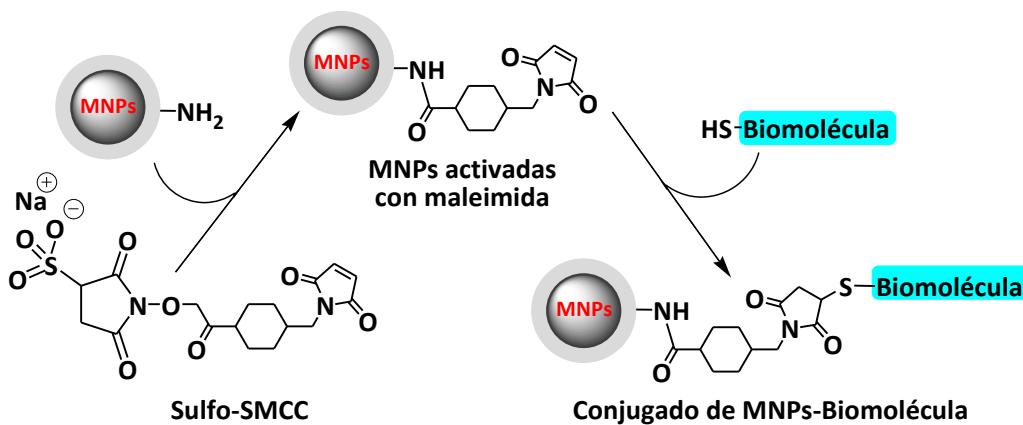


Figura 3. Esquema de reacción de la conjugación de MNPs mediante el agente de acoplamiento Sulfo-SMCC con biomoléculas con grupo tiol.

c) La química “click” es una estrategia de funcionalización basada normalmente en la reacción de cicloadición [3+2] entre una azida y un alquino catalizada por Cu(I) (Figura 4). Las reacciones “click” se caracterizan por su rapidez, altos rendimientos, eficacia y condiciones suaves de reacción. Además, este tipo de reacciones tienen lugar en medio acuoso, por lo que son ideales para funcionalizar MNPs estables en agua. Este método de conjugación ofrece características únicas. En primer lugar, los reactivos azida y alquino muestran una alta especificidad entre sí y no suelen presentar reactividad frente a otros

grupos funcionales. En segundo lugar, los enlaces formados son altamente estables y extremadamente rígidos, manteniendo así la conformación de ésta biomolécula.¹² Sin embargo, esta estrategia requiere la funcionalización de las MNPs y las biomoléculas con grupos azida o alquino, reacción que puede requerir un tiempo elevado y puede tener rendimientos bajos. Además, la presencia del catalizador Cu(I) puede resultar citotóxica si no se ha eliminado antes de su uso *in vitro* o *in vivo*.¹³ Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha puesto a punto un protocolo de funcionalización de MNPs con grupos ciclooctino, cuya reactividad superior a la de alquinos lineales elimina la necesidad de usar el catalizador de cobre (química “click” bioortogonal).¹⁴⁻¹⁷

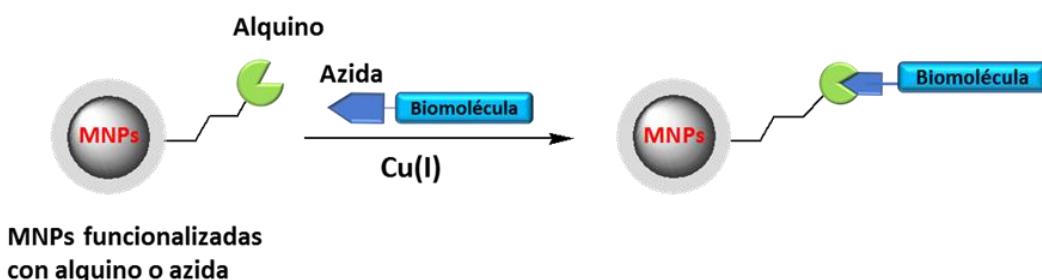


Figura 4. Ejemplo de acoplamiento mediante química “click” de MNPs modificadas tanto con grupos alquino o azida.

d) Formación de enlaces amida entre grupos carboxilo y aminas primarias, normalmente en presencia de un reactivo de acoplamiento como es la 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímida (EDC (Figura 5, apartado 1.1.1). Este tipo de estrategia es ventajosa debido a que no necesita ningún espaciador, por lo que minimiza el aumento del radio hidrodinámico de las MNPs. Mediante esta estrategia, moléculas pequeñas, carbohidratos, proteínas (enzimas o anticuerpos) y ácidos nucleicos con grupos amino se pueden conjugar a grupos carboxilo presentes en el recubrimiento de MNPs o viceversa.^{18,19} Este tipo de enlace amida se considera uno de los más populares en la formación de conjugados ya que dicha reacción de acoplamiento es muy eficiente. La formación de enlaces amida se puede llevar a cabo tanto en medio orgánico como acuoso, siendo este último el más común para bioconjugaciones, ya que la mayoría de las biomoléculas son solubles en tampones acuosos.

En el desarrollo de este trabajo, el objetivo principal de este capítulo es la optimización de la preparación de MNPs-1 funcionalizadas covalentemente con i) ácidos nucleicos y péptidonucleicos, utilizados como soporte de hebras de ADN”

complementarias y del fármaco doxorrubicina, así como vehículo en la liberación controlada de doxorrubicina y ii) un derivado de glucosa que proporciona estabilidad en medios biológicos, como se ha explicado con anterioridad en el capítulo 1.

3.1.1.1 Funcionalización con ácidos nucleicos (ADN) y péptidonucleicos (APN)

Un factor muy importante en la eficiencia del acoplamiento es el pH de la reacción. La activación de grupos carboxilos con EDC ocurre de manera más eficaz a pH 3.5-4.5, mientras que la formación de enlace amida se ve favorecida a pH 4-6. La estabilidad de la carbodiímida se ve favorecida de manera creciente a valores de pH superiores a 6.5. El uso de medios ligeramente alcalinos (pH 8.5) limita el entrecruzamiento, consecuencia de la presencia de grupos carboxilo y amina en una misma molécula presente en la reacción.²⁰

Como se ha indicado anteriormente, el reactivo de acoplamiento más popular para llevar a cabo la bioconjugación mediante la formación de enlaces amida es la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímida (EDC). La EDC es utilizado para activar los grupos carboxilo presentes en la superficie de las MNPs-1, formando el intermedio O-acilisourea, el cual es lábil en medios acuosos (Figura 5). Este intermedio presenta átomos de oxígeno que pueden actuar como nucleófilos y provocar la hidrólisis de éste, inactivándolo para su posterior acoplamiento con grupos amino. Una alternativa para minimizar los problemas de hidrólisis del intermedio O-acilisourea y crear un intermedio de reacción activo estable es la adición de un compuesto hidrofílico como la N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS). Éste se acopla rápidamente con grupos amino y junto con EDC, forman un intermedio de éster sulfo-NHS solubles en agua, más estable y que no se hidroliza con la misma rapidez que el intermedio O-acilisourea (Figura 5). Las reacciones en la que intervienen EDC y sulfo-NHS son altamente eficaces y generalmente aumentan la eficiencia de la conjugación comparado con la que se obtiene únicamente con EDC. La reacción de hidrólisis del intermedio éster de sulfo-NHS se ve desfavorecida a pH ligeramente ácidos, por lo que aumenta la capacidad de bioconjugación, ya que la especie activa permanece más tiempo inalterada.¹¹

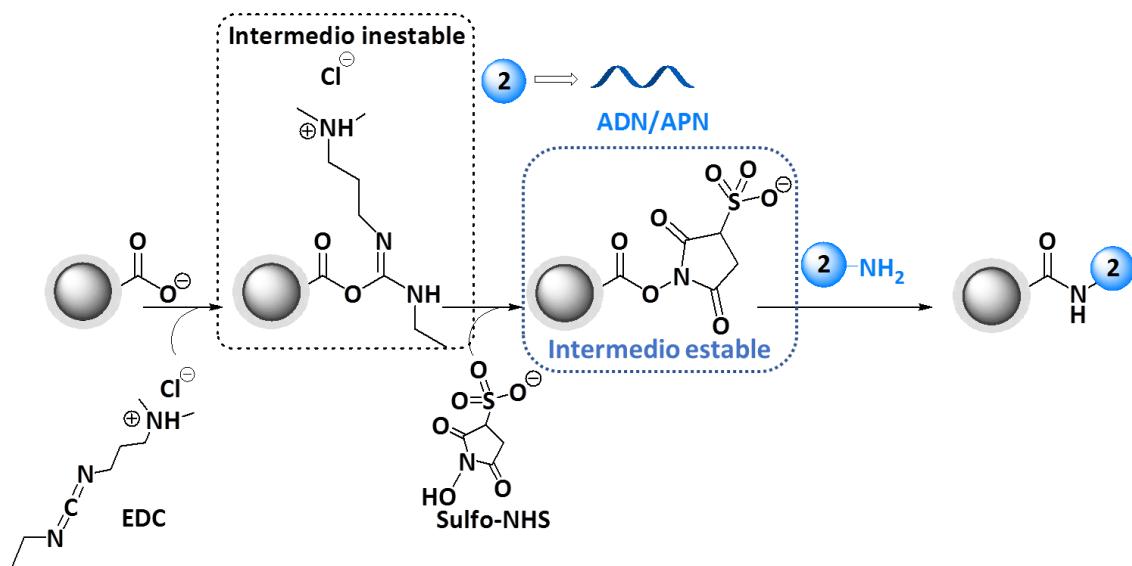


Figura 5. Esquema de activación de los grupos carboxilo de MNPs-1 con EDC y acoplamiento con ADN y APN.

Para la conjugación de nanopartículas, es importante mantener las fuerzas de repulsión adecuadas para asegurar la estabilidad coloidal de la suspensión, debido a que el intermediario formado en presencia de sulfo-NHS está fuertemente cargado negativamente.

Por todos los factores mencionados hasta el momento, en el protocolo de funcionalización desarrollado en este capítulo se han optimizado varios parámetros como pH, concentración, tipo de tampón y tiempos de reacción, para conseguir un mayor porcentaje de activación de grupos carboxilos presentes en la superficie de MNPs-1. Además, hay que tener en cuenta la influencia que los grupos fosfato del ADN ejercen en la estabilidad coloidal de las MNPs debido al aporte de cargas negativas, así como la presencia de grupos amino y carboxilos en una misma hebra de APN, dificultando una funcionalización adecuada debido a la probabilidad de entrecruzamiento con otra hebra de APN.

3.1.1.2 Funcionalización con glucosa (Glc)

La funcionalización de MNPs-1 con carbohidratos, concretamente un derivado de glucosa (4-aminofenil-D- β -glucopiranósido, Glc, figura 6), se realiza mediante el acoplamiento de EDC en una sola etapa, sin necesidad de adicionar sulfo-NHS, método apropiado para moléculas pequeñas y que presentan uno o varios grupos amino en ausencia de grupos carboxilo.¹¹ La funcionalización se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo previamente optimizado en nuestro grupo de investigación.^{21,22}

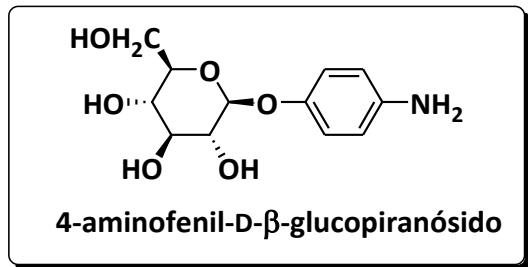


Figura 6. Estructura del carbohidrato 4-aminofenil-D-β-glucopiranósido (Glc)

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 Funcionalización del sistema MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN')

Como se ha descrito en el capítulo 2, la superficie de MNPs-1 se encuentra recubierta con grupos carboxilo orientado hacia el exterior, favoreciendo la solubilidad en medio acuoso y aportando grupos funcionales para la conjugación con diferentes biomoléculas. La funcionalización de las MNPs-1 con ácidos nucleicos se ha llevado a cabo mediante la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo presentes en la superficie de las MNPs-1 y los grupos amino del extremo 5' de las hebras de ADN', usando EDC y Sulfo-NHS como reactivos de acoplamiento. Se han optimizado diferentes parámetros, como pH, concentración de reactivos, tipo y concentración de tampón, así como tiempo de activación de los grupos carboxilo de las MNPs-1.

3.2.1.1. Búsqueda de las condiciones óptimas de reacción

La optimización de los diferentes parámetros descritos anteriormente se llevó a cabo empleando una hebra de ADN' modificada con un grupo amino en el extremo 5' (5'-CAGTCGCCAAGCT-3', ADN'). Para descartar la unión mediante interacciones inespecíficas, se diseñó un experimento control usando una hebra de ADN de secuencia complementaria, pero sin la presencia de grupo amino y marcada fluorescentemente con 6-carboxifluoresceina (FAM) en el extremo 5'. El aporte de cargas negativas, tanto de los grupos fosfato del ADN como de la superficie de las MNPs-1, hace que el entorno de las MNPs fuese adverso debido a efectos de repulsiones de cargas. Para favorecer la funcionalización es necesario evitar este efecto, buscando las condiciones óptimas de reacción.

El protocolo de funcionalización²³ de MNPs-1 con ADN' consistió inicialmente en la formación del intermedio estable activo entre la EDC y sulfo-NHS, seguido de la adición de las MNPs-1 para activar sus grupos carboxilo y dodecilsulfato sódico (SDS) como surfactante, reduciendo así posibles interacciones entre MNPs y evitando su posible

agregación.^{24,25} Finalmente se adicionó una cantidad fija para todas las pruebas de ADN' (4000 pmol) con y sin modificación en 5' con un grupo amina (figura 7). La reacción se llevó a cabo en tampón MES (ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico) en condiciones óptimas de concentración y pH. La elección de MES como tampón fue debido a sus efectos mínimos de sales y la buena estabilidad química y enzimática.²⁶

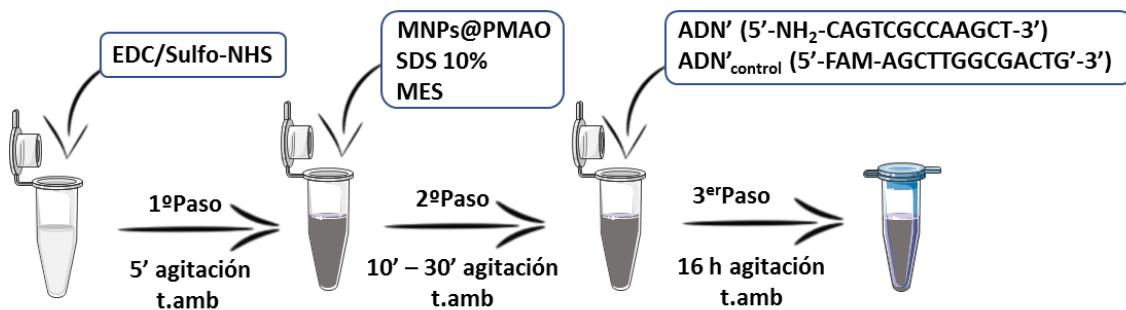


Figura 7. Esquema del procedimiento de funcionalización de MNPs-2

Los parámetros que se optimizaron en los diferentes ensayos llevados a cabo se encuentran resumidos en la tabla 1 e incluyen la cantidad de hierro, el tampón empleado, el pH de la reacción, la cantidad de agentes de acoplamiento, así como los tiempos de activación.

Prueba	MNPs-1 (mg de Fe)	Tampón (mM)	pH	EDC (μmol)	S-NHS (μmol)	Tiempo de activación	Vtotal (μl)	Aggregación
1	1	MES (10)	6.1	15	22.5	5'	1250	SI
2	0.33	MES (10)	6.1	15	22.5	5'	1250	SI
3	0.33	MES (50)	6.5	15	22.5	5'	1250	NO
4	0.33	MES (50)	6.5	15	22.5	30'	1250	NO
5	0.33	MES (50)	6.5	9.4	14	30'	1250	NO

Tabla 1. Búsqueda de las condiciones óptimas de reacción para la funcionalización de las MNPs-1 variando los diferentes parámetros.

El primer paso para llevar a cabo la optimización de las condiciones de reacción en el procedimiento de funcionalización de MNPs-1 con ADN' consistió en encontrar la cantidad de hierro de MNPs-1 (cuantificada mediante determinación de hierro) adecuada, en condiciones fijas de EDC/Sulfo-NHS con un tiempo corto de activación, sin verse afectada la estabilidad coloidal de las MNPs-1. Se comenzó realizando un ensayo con 1 mg de Fe de MNPs-1 en las condiciones indicadas en la tabla 1, prueba 1, observando la formación de agregados tras adicionar las MNPs-1 al intermedio EDC/Sulfo-NHS, por lo que se pensó en disminuir la cantidad de Fe. Este ensayo se realizó de nuevo disminuyendo la cantidad de hierro a 0.33 mg de MNPs-1 bajo idénticas condiciones de reacción (tabla 1, prueba 3). Los resultados obtenidos indicaron que la disminución de la cantidad de MNPs-1 manteniendo los equivalentes

de EDC/Sulfo-NHS iniciales, mejoraba la estabilidad coloidal. Posteriormente, al adicionar las hebras de ADN', se observó la desestabilización de las MNPs como consecuencia del exceso de aporte de carga negativa de los grupos fosfato, ocasionando la formación de agregados. Al observar que las condiciones de activación eran satisfactorias, puesto que las MNPs mantenían la estabilidad coloidal antes de adicionar el ADN', se planteó la opción de cambiar las características del tampón (tabla 1, prueba 4). El aumento tanto de la concentración como del pH (50 mM, pH = 6.5), compensó la inestabilidad provocada por el aporte de cargas negativas al funcionalizar las MNPs-1 con hebras de ADN', y no se observó agregación.

El siguiente paso en la optimización del proceso fue aumentar el tiempo de activación de los grupos carboxilos con el intermedio de reacción formado por EDC/Sulfo-NHS a 30 minutos (tabla 1, prueba 5), manteniendo las condiciones empleadas en el ensayo 4. Al comprobar que el aumento del tiempo de activación y la incorporación de las hebras de ADN' no afectaban a la estabilidad coloidal en el procedimiento de funcionalización, se pensó que era necesario dicho aumento para obtener un mayor número de grupos carboxilos activos. Para conseguir una relación adecuada entre la cantidad de intermedio formado y el mayor porcentaje de grupos carboxilos posibles para su posterior funcionalización, se llevó a cabo otro ensayo más, disminuyendo los equivalentes de EDC/Sulfo-NHS (tabla 1, pruebas 6). Esta disminución podía favorecer la estabilidad coloidal, así como reducir el exceso de intermedio formado. Al igual que en la prueba 5, las hebras de ADN' fueron adicionadas al intermedio estable de reacción, comprobando su estabilidad tras haberlo dejado reaccionar toda la noche.

La eliminación del exceso de reactivos se llevó a cabo mediante lavados con tampón MES (50 mM) pH= 6.5 por centrifugación a 25000 x g durante 1 h, consiguiendo así separar por peso y densidad las MNPs funcionalizadas con ADN de los subproductos formados en la reacción y las hebras de ADN en exceso. El procedimiento de lavado por centrifugación se realizó cuatro veces, dejando todas las muestras de los ensayos anteriormente mencionados a la misma concentración. Para establecer las condiciones óptimas del proceso de optimización y tener una estimación de la cantidad de ADN funcionalizado, se compararon las muestras de MNPs-2 de los ensayos 5 y 6 mediante la utilización de métodos indirectos (3.2.1.2).

Para descartar las uniones inespecíficas de las hebras de ADN a las MNPs-1 en el procedimiento de funcionalización, se llevaron a cabo experimentos control, con una hebra de ADN' marcada en 5' con fluoróforo (FAM) de la misma secuencia, pero careciendo de grupo amino terminal para MNPs-1 (Control-1) como se muestra en la Figura 8.

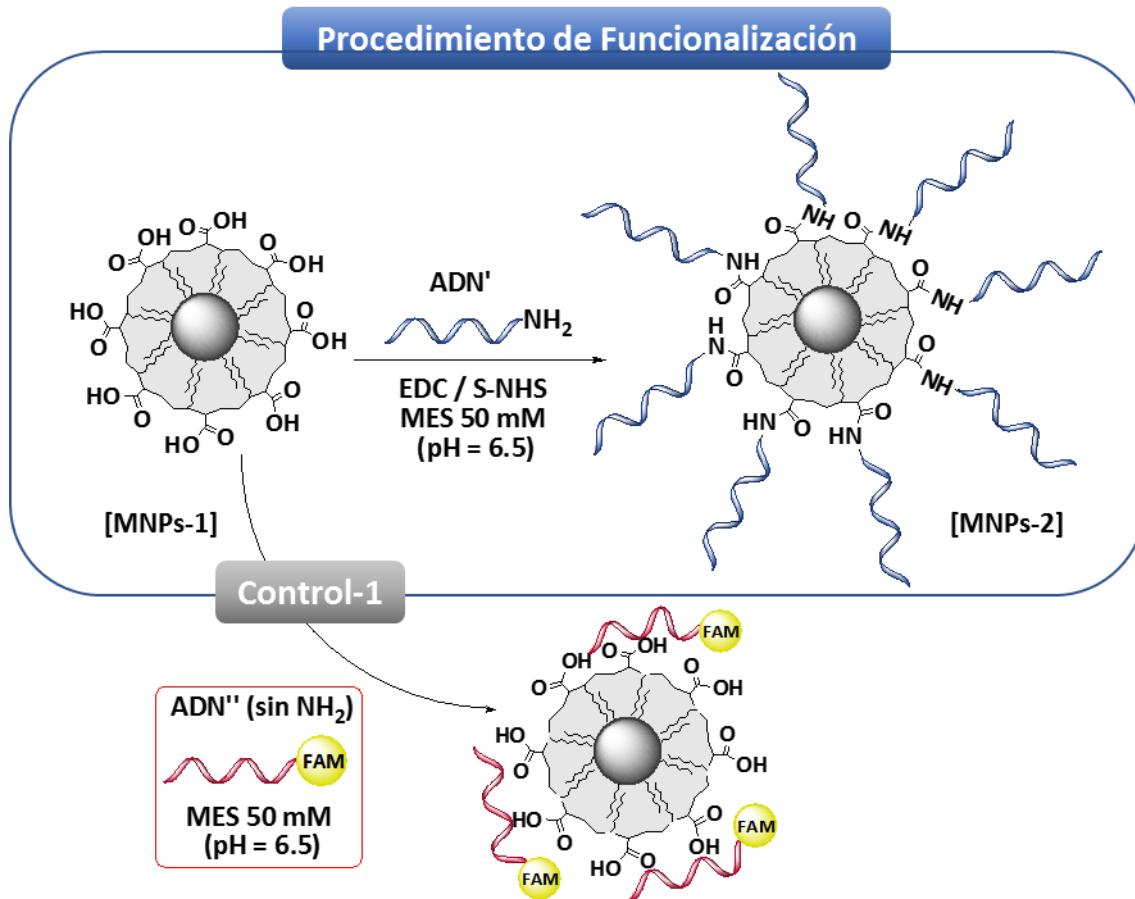


Figura 8. Esquema del procedimiento del procedimiento de funcionalización con hebras de ADN' y los controles realizados.

3.2.1.2. Cuantificación de la funcionalización mediante métodos indirectos

Debido al bajo número de moléculas de ADN presentes en las MNPs-1, la cuantificación directa de la cantidad de ADN' unida covalentemente a las MNPs-1 no era viable. La unión se cuantificó de manera indirecta, mediante un protocolo de hibridación y posterior desnaturalización de la hebra de ADN'' complementaria (5' FAM-AGCTTGGCGACTG 3') a la funcionalizada en las MNPs-1. Este método de cuantificación indirecto proporciona una estimación de la cantidad de ADN funcionalizado en la superficie de la MNPs-1, así como un análisis no destructivo de la muestra, sin llegar a ser una cuantificación exacta de la funcionalización. Sin embargo, es una aproximación suficiente y no destructiva para estimar la cantidad de ADN por miligramos de hierro la muestra.

El procedimiento de hibridación se llevó a cabo mezclando MNPs-2 con la hebra de ADN'' complementaria marcada con un fluoróforo (FAM) en tampón PBS (tampón fosfato salino) 10 mM (pH= 7.4). La mezcla se mantuvo durante una hora en reposo

favoreciendo el emparejamiento entre las bases de Watson-Crick mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Esta mezcla se mantuvo en ausencia de luz para asegurar la conservación de las propiedades del fluoróforo. Una vez finalizada la reacción, el exceso de hebras de ADN'' complementario se eliminó de igual manera que en la purificación del procedimiento de funcionalización (apartado 3.2.1.1). En este caso, se utilizó tampón PBS 10 mM (pH= 7.4) y se modificaron las condiciones de centrifugación (30 minutos, 20°C, figura 9). Al igual que en el proceso de funcionalización, para descartar las uniones inespecíficas de las hebras de ADN en MNPs-2, se llevaron a cabo experimentos control de hibridación con hebras de ADN'' marcada con fluoróforo (FAM) de secuencia no complementaria y careciendo de grupo amino terminal para MNPs-2 (Control-2).

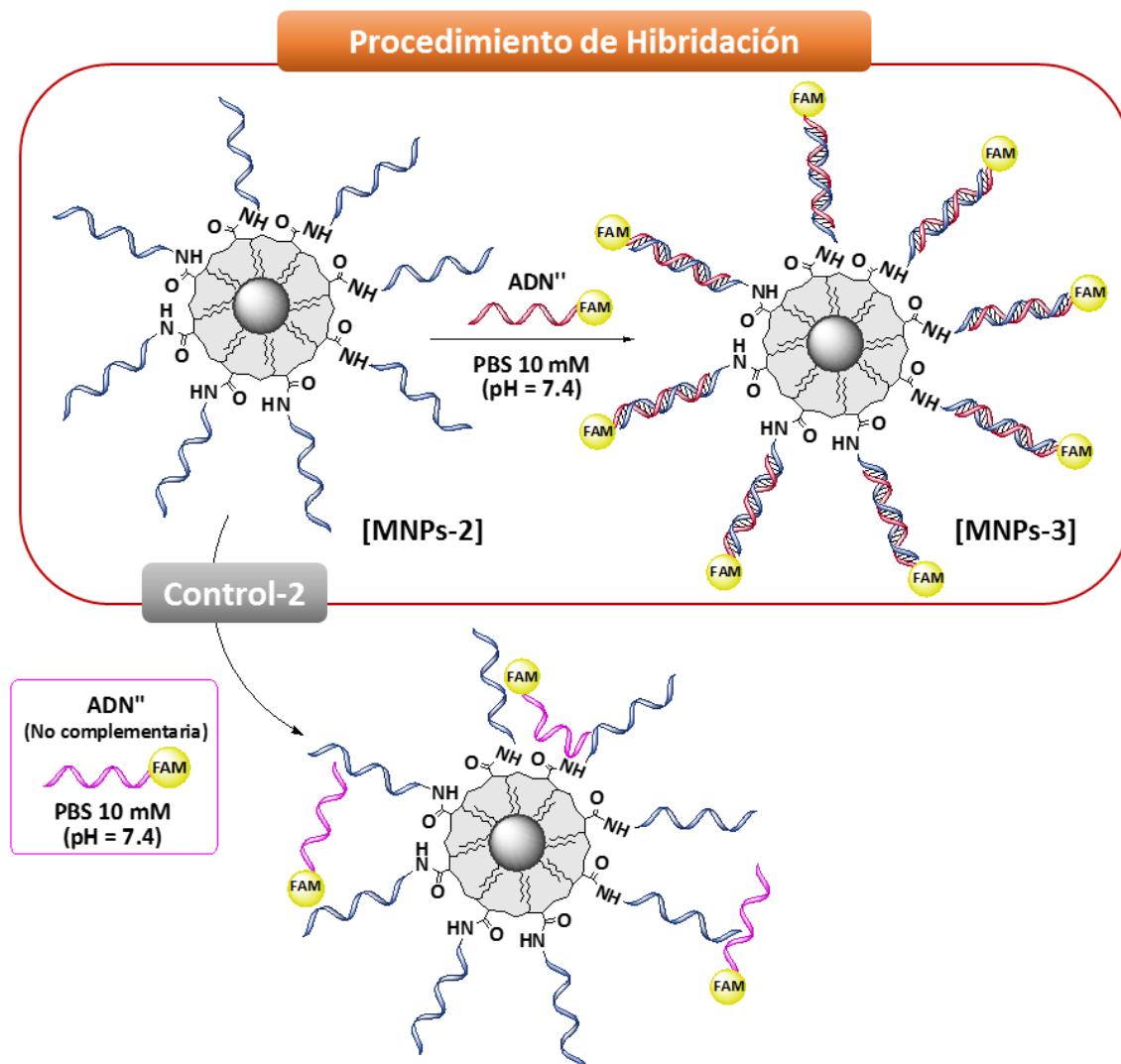


Figura 9. Esquema del procedimiento de hibridación de MNPs-2 para construir MNPs-3.

Una vez formada la plataforma funcional junto con los controles (1 y 2) descritos con anterioridad, se procedió a realizar las desnaturalizaciones de los conjugados en

medio básico²⁷ (NaOH, 2M) durante 2 h. Las hebras de ADN'' complementarias desnaturalizadas fueron separadas de las MNPs mediante centrifugación a 25000 x g durante 30 min a 20°C. Tras desnaturalizar la doble hebra se procedió a cuantificar la fluorescencia de los sobrenadantes, para así poder estimar la cantidad de ADN' unido a la superficie de la MNPs-1 en el primer paso de reacción (Figura 10).

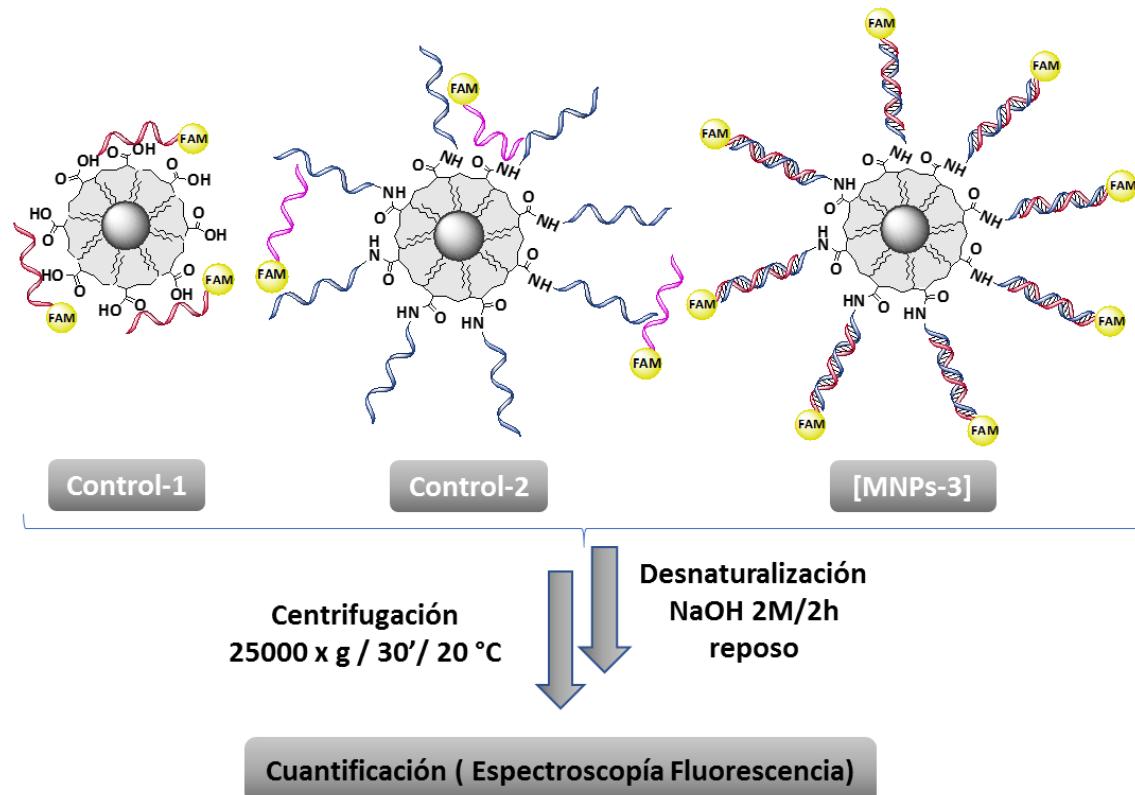


Figura 10. Esquema del proceso de desnaturalización de los controles y el sistema MNPs-3

En el procedimiento de cuantificación se prepararon disoluciones patrón de diferentes concentraciones, de la hebra complementaria marcada con FAM para obtener una recta de calibrado que permitiera la extrapolación de los resultados. Esta recta también se empleó para determinar las interacciones inespecíficas que se produjeron en el procedimiento de funcionalización (Control-1). Para determinar las interacciones inespecíficas del proceso de hibridación (Control-2), se utilizó otra recta de calibrado de iguales concentraciones, pero con una hebra de ADN'' no complementaria marcada con FAM (tabla 2).

ADN'' - FAM (PBS 10 mM, pH=7.4)	
Estándar	Concentración (μM)
A	0.2
B	0.05
C	1.25×10^{-2}
D	3.125×10^{-3}
E	7.81×10^{-4}
F	1.95×10^{-4}

Tabla 2. Concentraciones empleadas para la calibración de medidas de fluorescencia

Las hebras de ADN'' desnaturalizadas de las MNPs-3 y los patrones se excitaron a una longitud de onda de 495 nm y se recogió la emisión a 517 nm. Tras analizar los resultados obtenidos en los ensayos 5 y 6, se llegó a la conclusión de que las condiciones de funcionalización empleadas en el ensayo 6 eran las idóneas (Figura 11).

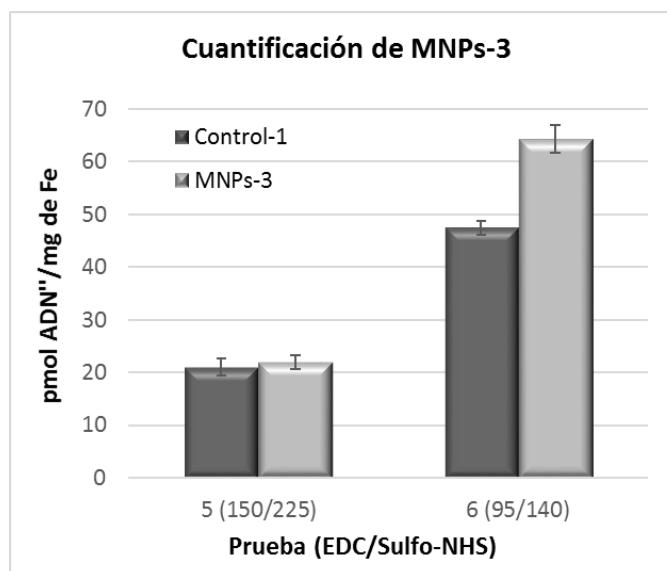


Figura 11. Representación gráfica de la cuantificación de MNPs-3 con dos relaciones de equivalentes diferentes de EDC/Sulfo-NHS.

3.2.2 Funcionalización de la plataforma MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN') y péptidonucleicos (APN')

3.2.2.1. Optimización de la proporción de ADN' y APN'

Los resultados obtenidos en el procedimiento de funcionalización descrito en el apartado anterior demostraron que, la utilización únicamente de hebras de ADN' no era favorable, ya que los grupos fosfato de las hebras de ADN', y la densidad de carga negativa de la superficie de las MNPs-1, aportaban un exceso de carga negativa en el

medio favoreciendo las repulsiones estéricas. Una estrategia planteada para solucionar este problema fue introducir hebras de APN', molécula artificial, sencilla y carente de cargas, capaz de almacenar información genética y que mantiene la complementariedad con hebras de ADN, como se indicó en el capítulo 1. La investigación que se llevó a cabo consistió en variar las proporciones de ADN'/APN' con las condiciones de reacción optimizadas anteriormente, para llegar a una proporción óptima. Esta proporción tenía que ser la idónea para la disminución de la densidad de carga del medio. (Tabla 3)

ADN'/APN'		
Ensayo	Porcentaje	pmol
1	100 / 0	2000 / 0
2	75 / 25	1500 / 500
3	50 / 50	1000 / 1000
4	25 / 75	500 / 1500
5	0 / 100	0 / 2000

Tabla 3. Diferentes ensayos realizados modificando las proporciones de ADN' y APN'.

La funcionalización de las MNPs-1 con las diferentes proporciones de ADN'(5' CAGTCGCCAAGCT 3') y APN' (ACCCAGTCGCCAAGC) se llevó a cabo de igual manera que en el apartado 3.2.1.1 en condiciones óptimas. En todos los ensayos realizados con diferentes porcentajes de ADN'/APN', las MNPs permanecieron estables en el medio de reacción, a excepción del ensayo utilizando 100 % de hebras de APN', en el cual al adicionar el APN' se produjo la agregación de las MNPs debido a la desestabilización de la plataforma funcional como consecuencia de la ausencia de carga del APN'.

La hibridación y desnaturalización del sistema formado para estimar el porcentaje óptimo en funcionalización de ADN' y APN' en MNPs-1, se llevó a cabo de igual manera que se encuentra descrito en el apartado 3.2.1.2.

Tras analizar los resultados obtenidos para diferentes proporciones, se observó que al aumentar la proporción de APN' y disminuyendo la de ADN', la cantidad de ADN'' hibridado/mg de Fe iba aumentando. Sin embargo, en el ensayo 4 usando 25% de ADN' y 75% de APN' la cantidad de ADN'' hibridada comenzó a disminuir en comparación con la proporción de ADN'/APN' 50/50. Se pudo concluir tras observar los resultados que la proporción óptima de ADN'/APN' en el proceso de funcionalización era 50/50. Esta proporción mantenía un equilibrio de densidad de carga en el medio entre la superficie de las MNPs-1 y los grupos fosfato de las hebras de ADN', favoreciendo una mayor funcionalización. Las uniones inespecíficas de las MNPs-1 con ADN'' sin grupo amino (control-1) se mantuvieron constantes en todos los ensayos

puesto que no se veían influenciadas por las diferentes proporciones de ADN'/APN'. En el control-2 se observó que las uniones inespecíficas que se producían en las MNPs-2 con hebras de ADN'' no complementarias, aumentaban al incrementar progresivamente el porcentaje de APN'. Por tanto, una disminución del aporte de cargas de los grupos fosfato del ADN' funcionalizado favorecía las uniones inespecíficas, como consecuencia de la disminución de repulsiones estéricas entre grupos fosfato del ADN' y el ADN'' no complementario. Todos estos resultados se muestran en la figura 12.

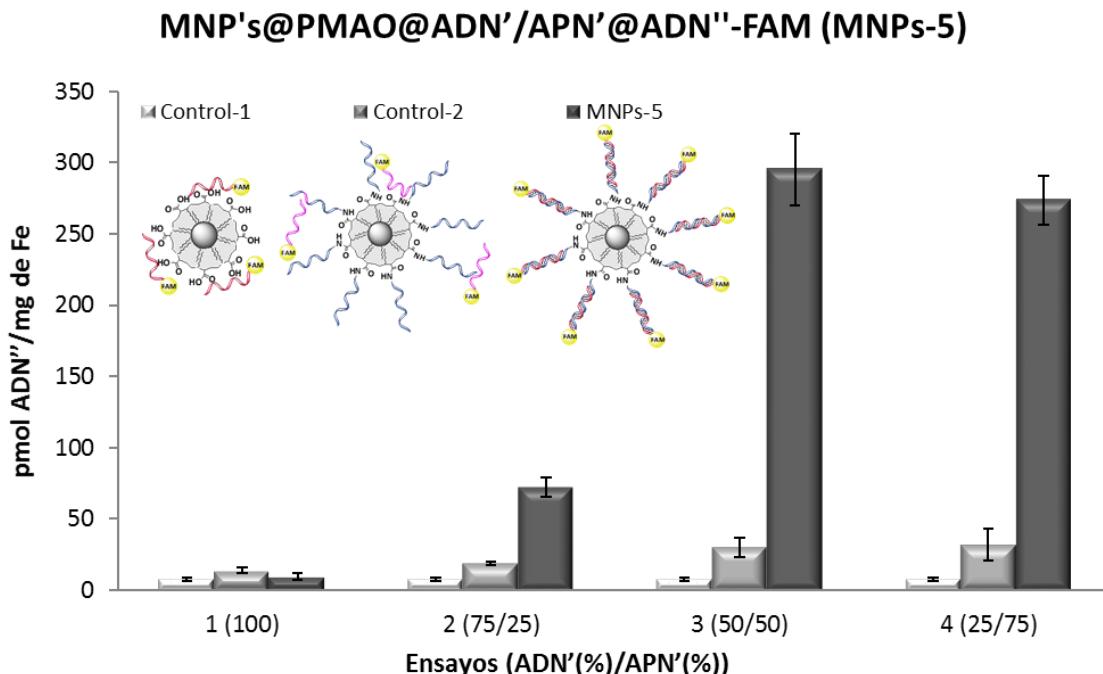


Figura 12. Funcionalización de las MNPs-1 con diferentes proporciones de ADN'/APN'

3.2.3 Estudios de estabilidad en medio de cultivo celular de la plataforma MNPs-5

Una vez optimizado el procedimiento de funcionalización de ADN'/APN' (50/50), era fundamental estudiar la estabilidad de las MNPs-5 en medio de cultivo celular. Para ello se realizaron estudios de estabilidad en medio de cultivo suplementado al 10% con suero fetal bovino, tanto de las MNPs-1, como las MNPs funcionalizadas con ADN'/APN' en proporciones óptimas (MNPs-4) y las conjugadas con su hebra de ADN'' complementaria (MNPs-5). Mediante microscopía óptica se observó agregación de las MNPs en los tres casos, como se muestra en la Figura 13.

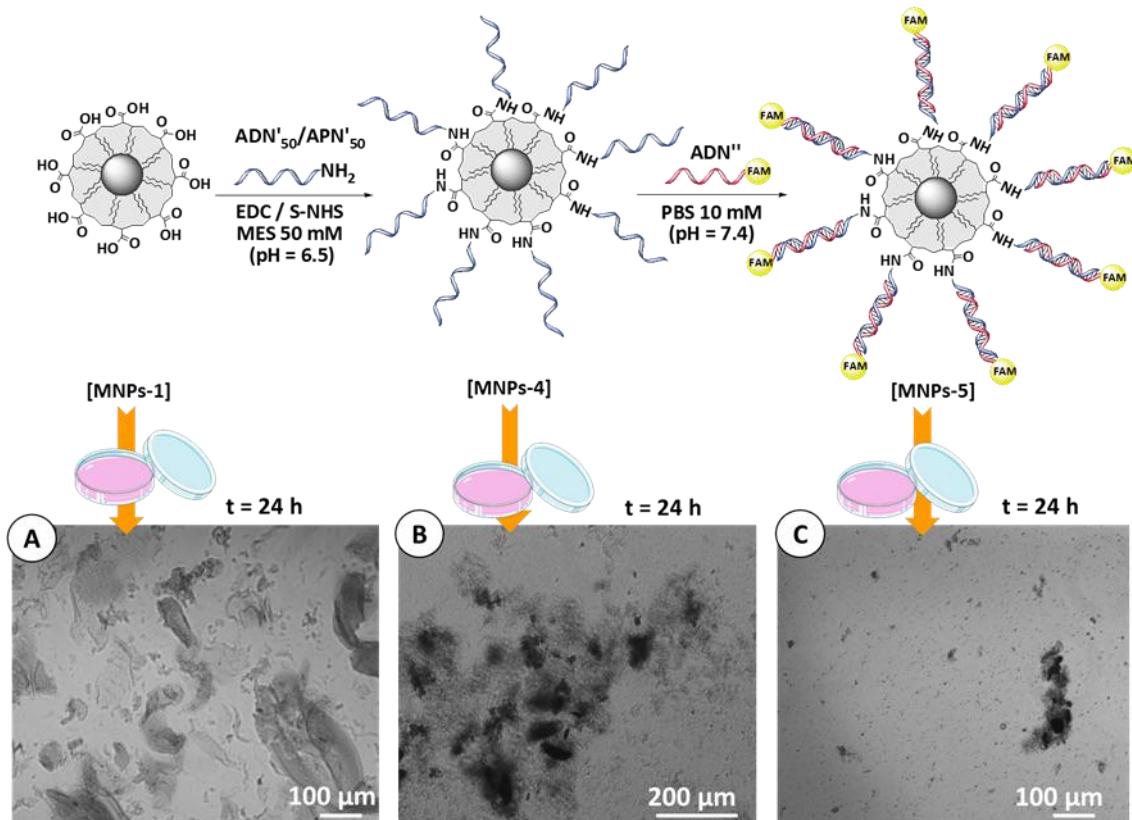


Figura 13. Imágenes del microscopio óptico: A) MNPs-1, B) MNPs-4 y C) MNPs-5

La plataforma funcional formada presentaba una baja estabilidad en medio de cultivo celular, por lo que fue necesario un nuevo planteamiento para conseguir un aumento de la estabilidad de las MNPs-1 funcionalizadas con ADN'/APN. Una alternativa para mejorar la estabilidad fue la funcionalización con un derivado de glucosa (Glc).

3.2.4 Estabilización de MNPs-5 mediante la funcionalización con glucosa (Glc)

La alternativa propuesta consistió en la funcionalización de las MNPs-1 con un derivado de glucosa (4-aminofenil-D- β -glucopiranósido), el cual proporcionaría mayor estabilidad en medio fisiológico y mejor internalización celular.²² Sin embargo, era imprescindible encontrar la densidad adecuada de moléculas de glucosa que proporcionara estabilidad y no bloqueara la superficie de las MNPs-1 para la posterior funcionalización con ADN' y APN'.

3.2.4.1. Optimización de las cantidades de glucosa

Se plantearon dos estrategias en el procedimiento de funcionalización con glucosa (Glc) en MNPs-1 de partida. La primera de ellas era funcionalizar con dos cantidades

distintas de glucosa (Glc-1, 33.2 µmol, 13.8 µmol / mg de Fe y Glc-2, 66.4 µmol, 27.7 µmol / mg de Fe). El procedimiento de funcionalización con Glc fue previamente optimizado en nuestro grupo de investigación.²² Seguidamente se funcionalizaron las MNPs-6 con hebras de ADN'/APN' en la proporción 50/50. Esta estrategia se planteó para garantizar inicialmente una estabilidad en medio fisiológico, sin saber cómo podía afectar a la funcionalización de hebras de ADN'/APN'. La segunda estrategia consistió primero en funcionalizar con hebras de ADN'/APN' y posteriormente con glucosa utilizando las mismas condiciones de reacción y cantidades anteriormente mencionadas (Figura 14). En esta plataforma funcional, la prioridad era obtener mejores resultados en la funcionalización de hebras de ADN'/APN' y que la posterior funcionalización con glucosa crease la estabilización necesaria en medio fisiológico.

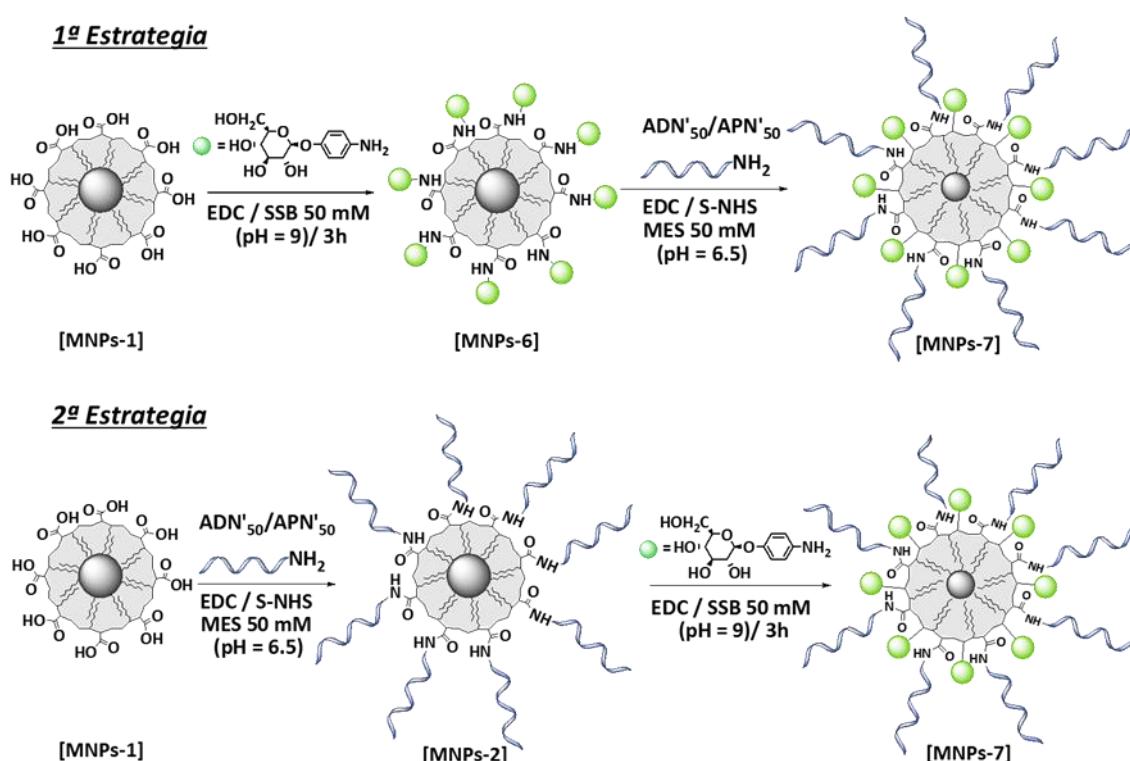


Figura 14. Esquema de las dos estrategias del proceso de funcionalización con glucosa.

Una vez formadas las dos plataformas funcionales mediante las dos estrategias planteadas, la conjugación con la hebra complementaria de ADN" se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Figura 15).

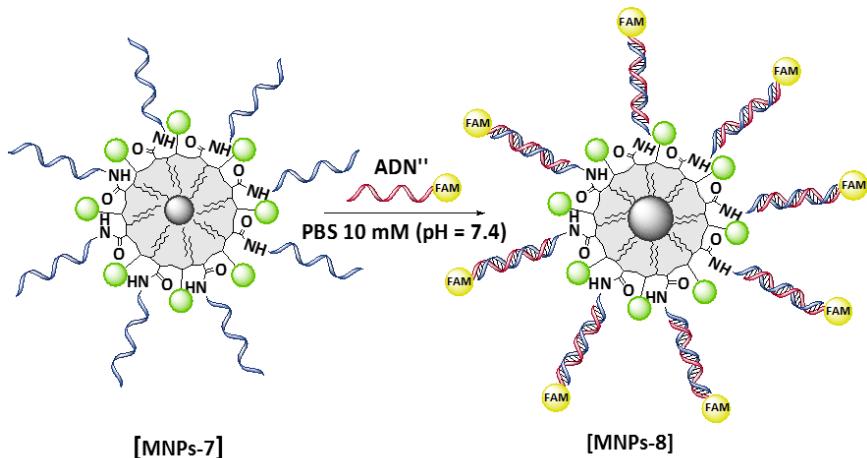


Figura 15. Esquema general del proceso de hibridación de las hebras de MNPs-7 con hebras de ADN'' complementarias para formar MNPs-8

Comparación de las dos estrategias en la funcionalización con glucosa

La cuantificación de la funcionalización de las MNPs-8 obtenidas en ambas estrategias y con dos cantidades de glucosa diferentes (Glc-1 y Glc-2), se llevó a cabo de manera indirecta usando el procedimiento de desnaturalización anteriormente descrito. Tras analizar los resultados obtenidos, en la 2^a estrategia se observaron valores similares en la cuantificación del proceso de hibridación con ambas cantidades de Glc. Dicho resultado indicaba que la funcionalización con hebras de ADN'/APN' en un primer paso, no se encontraba influenciada por la cantidad de Glc adicionada posteriormente. En cuanto a la 1^a estrategia, los resultados indicaron que con menor cantidad de Glc, la funcionalización con hebras de ADN'/APN' se veía favorecida, ya que la densidad de moléculas de Glc había dejado un mayor número de grupos carboxilo libres en las MNPs-1 (Figura 16). Asimismo, se observó que empleando menos cantidad de Glc, los resultados obtenidos eran similares, independientemente de la estrategia elegida (aproximadamente 140 pmol ADN''/mg de Fe en la primera estrategia y 160 pmol ADN''/mg de Fe en la segunda). Para concluir que estrategia y cantidad de Glc era la óptima para funcionalizar las MNPs-1, se llevaron a cabo estudios de estabilidad en medio de cultivo de celular.

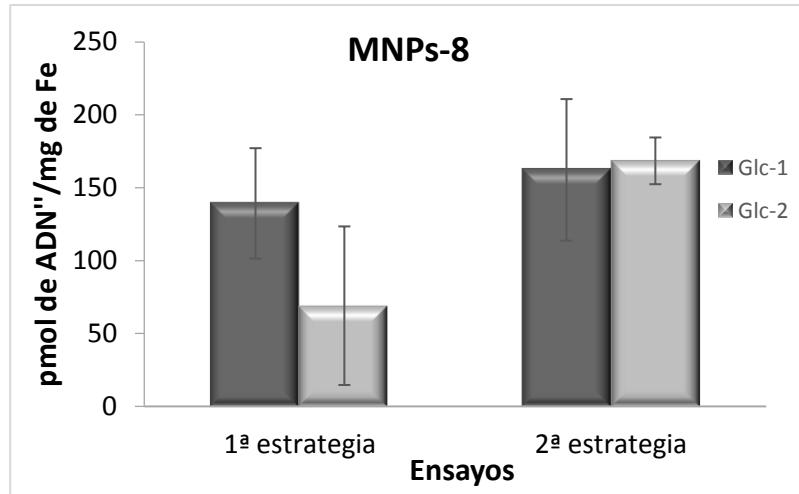


Figura 16. Gráfica resumen de los resultados obtenidos en las dos estrategias empleadas en la funcionalización con glucosa

Estudios de estabilidad de las estrategias de funcionalización con glucosa

Los estudios de estabilidad en medio de cultivo de las MNPs-8 indicaron una mejoría satisfactoria con respecto a las MNPs-5 que carecían de moléculas de glucosa, indicando que efectivamente la presencia del azúcar estabilizaba las MNPs en medios fisiológicos. Sin embargo, de las dos estrategias estudiadas fue la primera con una menor cantidad de glucosa (Glc-1) la que proporcionó una mayor estabilidad a la plataforma funcional (Figura 17). En adelante, todos los experimentos se llevaron a cabo usando la menor cantidad de glucosa (Glc, 33.2 μmol , 13.8 $\mu\text{mol} / \text{mg de Fe}$).

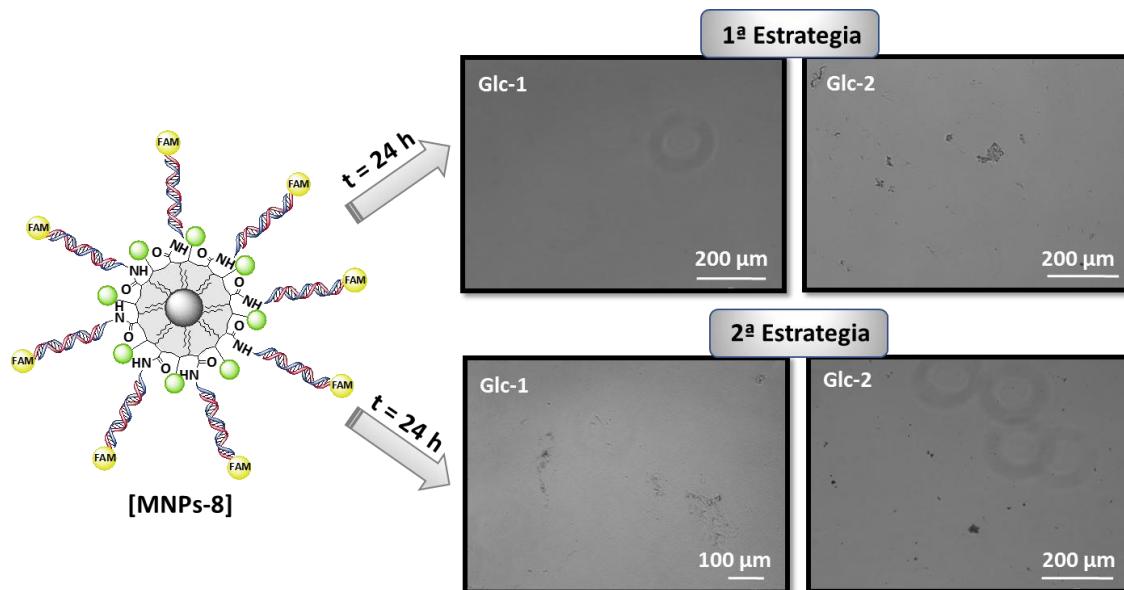


Figura 17. Imágenes del microscopio óptico de las MNPs-8 comparando las dos estrategias empleadas en la funcionalización con dos cantidades de glucosa (Glc-1, Glc-2)

Caracterización de la plataforma funcional MNPs-8

Una vez formada la plataforma MNPs-8 estable en medio fisiológico, se llevaron a cabo ensayos para cuantificar la carga de la superficie. Se compararon dos técnicas como la electroforesis y las medidas de potencial Z. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x, a 90 V de potencia durante 45 minutos, proporcionando de manera cualitativa información del comportamiento de la distribución de carga en la superficie de las MNPs. Estos resultados se compararon con las medidas cuantitativas de carga en la superficie mediante la técnica de potencial Z. Otra de las técnicas que se emplearon para caracterizar la distribución de tamaños de las MNPs funcionalizadas e hibridadas en suspensión, fue la de dispersión dinámica de luz (DLS), llevando a cabo las medidas de igual manera que en el capítulo 2 (Figura 18b).

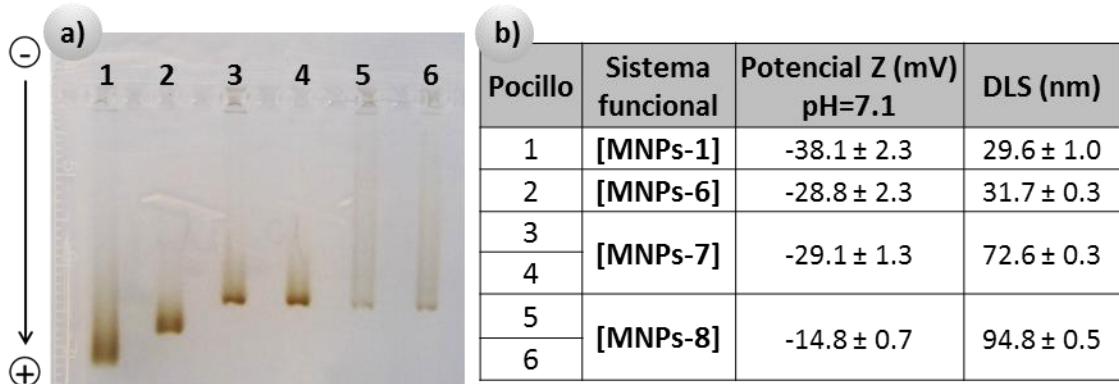


Figura 18. a) gel de agarosa indicando la movilidad electroforética de la plataforma funcional optimizado en cada paso de funcionalización e hibridación; b) medidas de DLS y potencial Z en PBS 10 mM relacionadas con las plataformas funcionalizadas del gel de agarosa en TBE 0.5 mM

➤ Electroforesis en gel de agarosa

En el pocillo 1 se depositaron las MNPs-1 de partida para poder comparar con las MNPs funcionalizadas e hibridadas posteriormente. El pocillo 2 corresponde a las MNPs-6 funcionalizadas con glucosa, en las que se observó una disminución de la movilidad electroforética con respecto a las MNPs-1 de partida, debido a la disminución del número de grupos carboxilo libres en la superficie de la MNPs-6. En cuanto a los pocillos 3 y 4 que corresponden a las MNPs-7 funcionalizadas con ADN'/APN' en proporciones óptimas (50/50) de dos lotes diferentes, se observó una migración similar en ambas muestras, demostrando la reproducibilidad del protocolo de funcionalización. Al comparar las MNPs-7 con las correspondientes MNPs-6 de partida, se observó también una reducción de la movilidad electroforética, como consecuencia de la funcionalización con ADN/APN que reducía aún más el número de

grupos COOH. En los pocillos 5 y 6 se observó un ligero aumento en la movilidad electroforética de las MNPs-8 tras el proceso de hibridación con las hebras de ADN'' complementarias al ADN'/APN', atribuido al aporte de carga negativa correspondiente a los grupos fosfato de las moléculas de ADN'' (Figura 18a).

➤ Potencial Z

Los resultados obtenidos en las medidas de potencial Z no se correspondían con la información aportada por el gel de electroforesis. Se observó una disminución de la carga negativa al funcionalizar las MNPs-1 con glucosa (MNPs-5). Sin embargo, al funcionalizar las MNPs-5 con ADN'/APN' la reducción de la carga negativa no fue significativa comparándola con la obtenida en el gel de electroforesis. Este resultado demostró que cuando se realizan medidas de potencial Z, hay muchos factores que pueden ocasionar la variación de resultados con respecto a los observados en electroforesis. Dichos factores incluyen el pH, la fuerza iónica, la concentración y la estabilidad coloidal de las MNPs, así como su carga superficial.^{28,29} Además de todos estos factores, el uso de determinados tampones con iones metálicos puede favorecer una reacción con los electrodos de la celda de medida, provocando su deterioro y la degradación la muestra.³⁰

➤ Dispersión dinámica de luz (DLS)

En cuanto a los resultados obtenidos en las medidas de los radios hidrodinámicos de las diferentes MNPs, se observó un aumento de tamaño progresivo con la funcionalización e hibridación de la superficie de las MNPs-1 (Figura 18b).

3.2.4.2. Funcionalización de MNPs-6 con hebras de ADN' y APN' en diferentes porcentajes

Una vez optimizada la funcionalización con glucosa para asegurar la estabilidad de las MNPs en medio de cultivo celular, se pasó a estudiar la influencia que podía tener la presencia de la glucosa en la funcionalización con diferentes porcentajes de ADN'/APN' con respecto al sistema que carecía de glucosa. Los ensayos se realizaron en iguales condiciones de reacción (variación de porcentajes de ADN'/APN' y experimentos como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.2.1 (Figura 19).

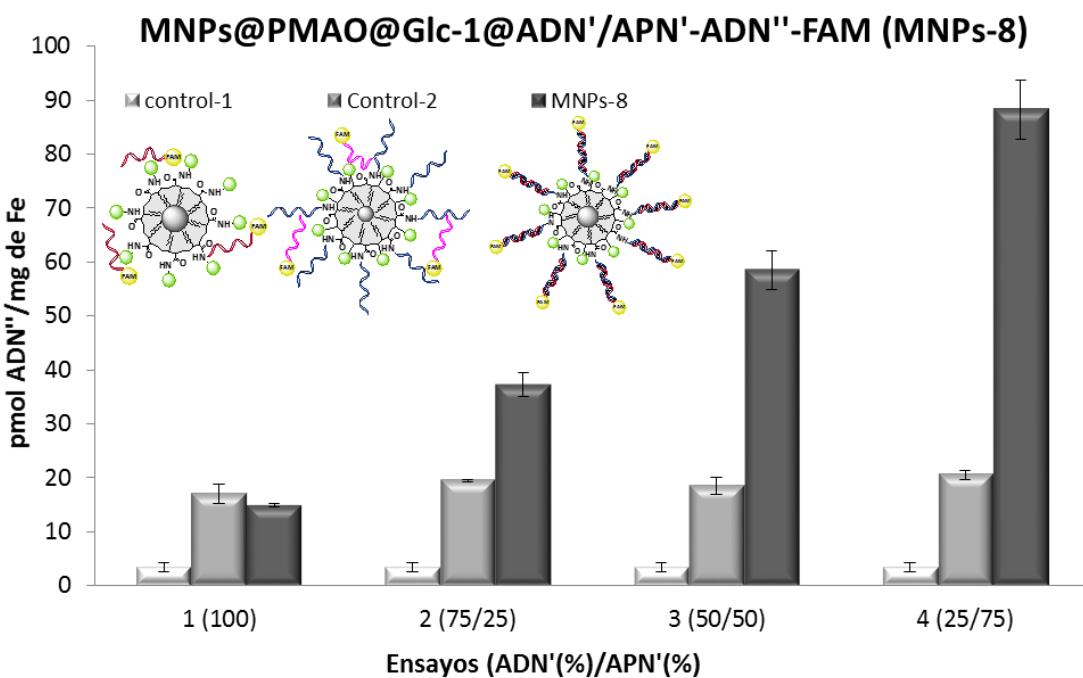


Figura 19. Resumen de los resultados obtenidos en la funcionalización con diferentes proporciones de ADN'/APN' de las MNPs-8

Tras comparar los resultados obtenidos de las plataformas funcionales con y sin glucosa (ver figura 12) y con las diferentes proporciones de ADN'/APN', se observó una tendencia similar en el proceso de funcionalización. En ambos casos (con y sin glucosa) la cantidad de ADN'/APN' conjugada a las MNPs se veía incrementada conforme aumentaba la cantidad de APN, con una excepción. Al emplear una relación 25/75 ADN'/APN', las MNPs sin glucosa mostraban una disminución de la cantidad de ADN'/APN' unida; sin embargo, en las MNPs funcionalizadas con glucosa (MNPs-6) la cantidad de ADN'/APN' seguía creciendo conforme se incrementaba la cantidad de APN. Esto nos llevó a estudiar si la excepción en el proceso de funcionalización de MNPs-6 se debía a la influencia que ejercía la glucosa en este proceso, estabilizando la plataforma al disminuir la densidad de carga. Por ello se llevaron a cabo estudios de los procesos de desnaturación mediante calentamiento global de la funcionalización de MNPs-6 con diferentes proporciones de ADN'/APN', como se detallará en el capítulo 4 y se observa en la tabla 5. Los resultados obtenidos demostraron que la proporción óptima obtenida mediante desnaturación por calentamiento global era de 50/50, en presencia y ausencia de glucosa en la plataforma funcional, confirmando que la presencia de la glucosa no influenciaba significativamente el procedimiento de funcionalización.

Proporción óptima de (ADN'/APN')		
	NaOH	Temperatura
MNPs-5	50 / 50	50 / 50
MNPs-8	25 / 75	50 / 50

Tabla 5. Comparación de las proporciones óptimas obtenidas por dos métodos de desnaturalización (NaOH y temperatura) para dos plataformas funcionales MNPs-5 y MNPs-8

3.2.5 Búsqueda de las condiciones óptimas de hibridación de la plataforma MNPs-8

Una vez obtenida la plataforma funcional estable en medio de cultivo celular (MNPs-8), se pasó a la optimización del proceso de hibridación. La ausencia de moléculas de Glc en el sistema MNPs-1 favorecía la unión de las hebras de ADN' /APN' debido a la disponibilidad de todos los grupos carboxilo activados. Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 3.2.4.1, tras funcionalizar las MNPs-1 con glucosa, la cantidad de ADN'/APN' disminuía. Por tanto, pensamos que la cantidad de ADN'' necesaria para hibridar y formar las MNPs-8 tendría que ser menor con respecto a la empleada inicialmente en la formación de MNPs-5.

En el procedimiento de optimización se estudió en primer lugar la influencia del tipo y concentración de tampón empleado en la hibridación, y en segundo lugar la cantidad de ADN'' complementario, ya que una adición en exceso era innecesaria, debido al elevado costo de los reactivos.

Influencia del tampón

Los tampones empleados para el procedimiento de hibridación tenían que presentar una eleva capacidad amortiguadora y no ser citotóxicos. El PBS ya utilizado en ensayos anteriores y el HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico) cumplían estos requisitos.

Para estudiar la influencia de los tampones, se llevaron a cabo ensayos con PBS 10 mM y HEPES en dos concentraciones diferentes 10 mM y 100 mM, todos ellos a pH = 7.4. El procedimiento de hibridación y su posterior cuantificación por métodos indirectos se realizaron en iguales condiciones de reacción que en el apartado 2.1.2. A la vista de los resultados mostrados en la figura 20, se pudo concluir que la mayor eficiencia en la hibridación del ADN'' se obtenía con PBS 10 mM y HEPES 10 mM. Ambos tampones presentaban la misma concentración y el mismo pH, lo cual indicaba que la presencia de sales a esas concentraciones podía influir en el procedimiento de hibridación.³¹ El HEPES 10 mM al tener menor fuerza iónica podía presentar una mayor eficiencia en la funcionalización. Sin embargo, el uso de una concentración elevada de

tampón, como fue el caso de HEPES 100 mM dio lugar a una disminución de la cantidad de ADN'' hibridado.

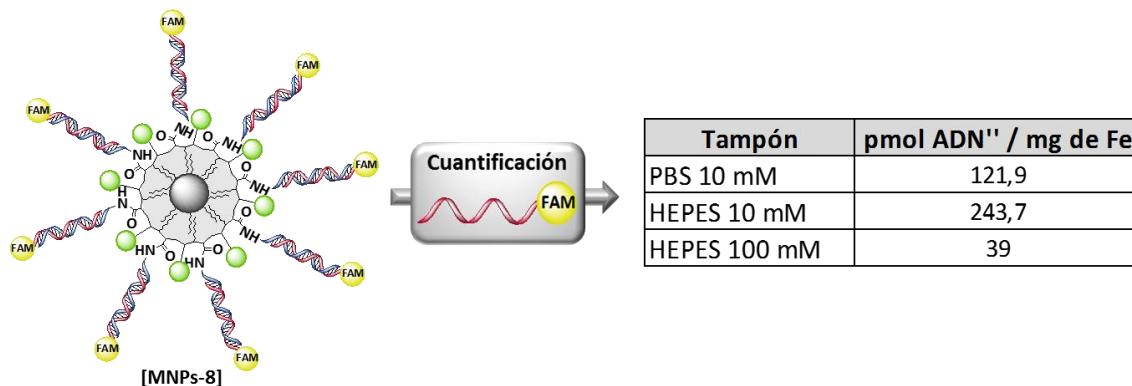


Figura 20. Esquema representativo de la influencia del tampón y su concentración en el procedimiento de hibridación

En vista de estos resultados iniciales, se diseñó un experimento para estudiar más a fondo la influencia de los dos tampones que mostraron más eficiencia en el proceso de hibridación, PBS y HEPES, ambos a 10 mM y pH = 7.4. Los experimentos consistieron en realizar la hibridación en dos pasos con dos estrategias diferentes. La primera estrategia empleada consistió en la hibridación de hebras de ADN'' complementarias, adicionando la mitad de la cantidad de ADN'' (200 pmol) con respecto al empleado anteriormente en tampón PBS. Una vez concluida la reacción, esta muestra fue dividida en dos, una de ellas se conservó para su posterior cuantificación y en la otra se procedió a una segunda hibridación adicionando otros 200 pmol de ADN'', pero en este caso se empleó el tampón HEPES. En cuanto a la segunda estrategia empleada, la hibridación se llevó a cabo igual que en la primera estrategia, con la salvedad que se utilizó HEPES en el primer paso de hibridación y PBS en el segundo. Una vez finalizado el procedimiento de hibridación con su posterior purificación, todas las muestras se desnaturalizaron y se cuantificaron como en procedimientos anteriores (Figura 21A).

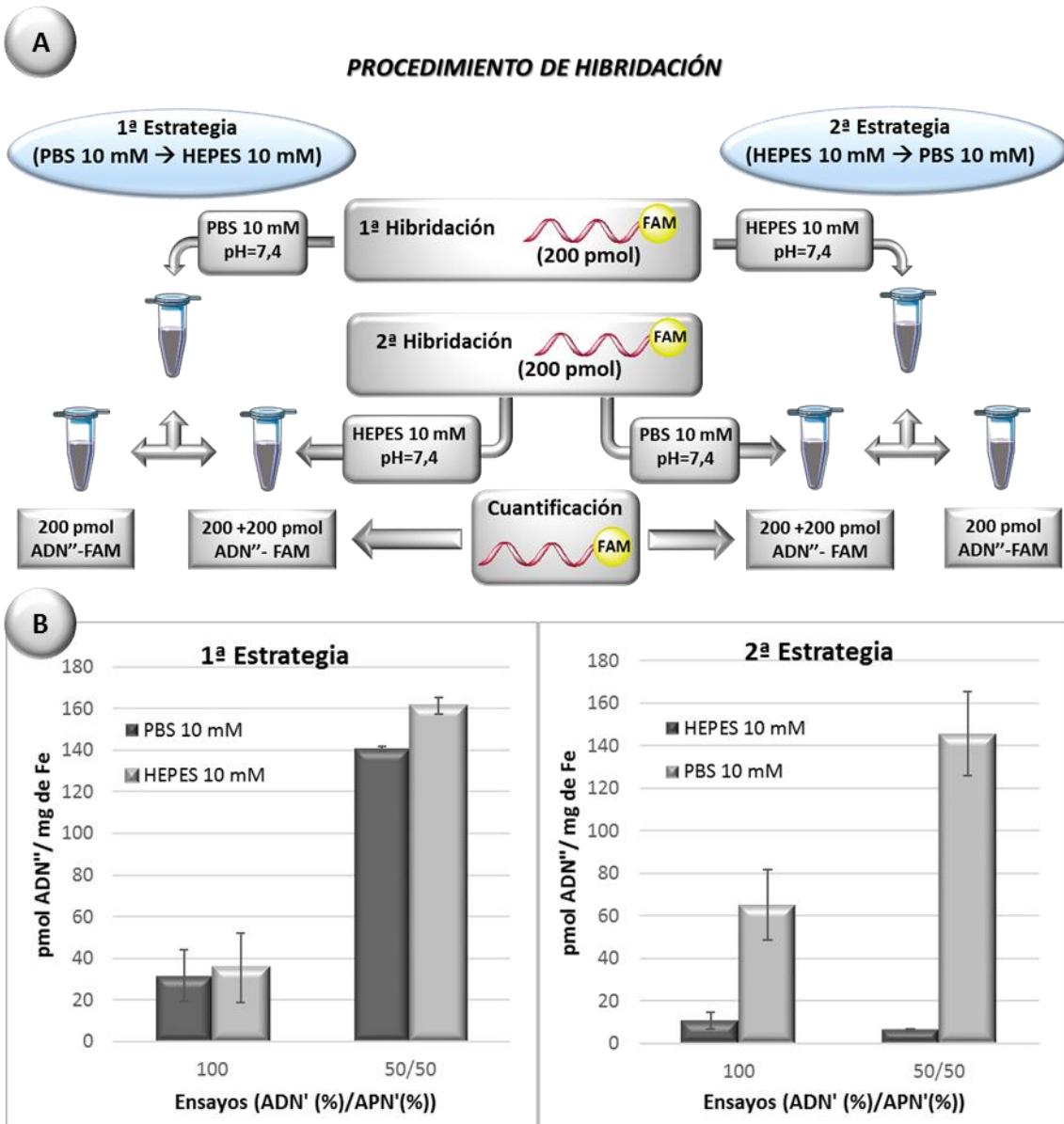


Figura 21. A) Esquema representativo de las dos estrategias empleadas en la optimización del procedimiento de hibridación; B) gráficas de la eficiencia de la funcionalización de las dos estrategias, comparando los resultados de funcionalización de ADN' (100%) con los obtenidos en condiciones óptimas de ADN'/APN' (50/50)

Tras analizar los resultados obtenidos en la figura 21B, en la primera estrategia se observó muy poca diferencia entre el primer paso de hibridación en PBS y el segundo que se llevó a cabo en HEPES, tanto usando ADN' (100 %) como ADN'/APN' (50/50). En cuanto a la segunda estrategia que se planteó, en el primer paso de hibridación en HEPES se observaron valores bajos con respecto al elevado aumento de la eficiencia en la posterior hibridación con PBS. Al comparar las MNPs-6 funcionalizadas sólo con ADN' en las 2 estrategias, la eficiencia en el proceso de hibridación era mayor en la 2^a estrategia, mientras que para las MNPs-6 funcionalizadas con hebras de ADN'/APN' en

condiciones óptimas (50/50), presentaban similares resultados, independientemente de estrategia empleada. Si se compara la naturaleza de ambos tampones, se puede concluir que la fuerza iónica del PBS 10 mM (137 mM de NaCl) hace que la conjugación de las hebras de ADN" complementario fuera más favorable (efecto que en el procedimiento de desnaturalización implica una mayor estabilidad como se detalla en el capítulo 4). En cambio, el tampón HEPES carecía de tan elevada fuerza iónica por lo que la conjugación se veía menos favorecida. Por tanto, se llegó a la conclusión que la utilización de PBS 10 mM en el procedimiento de hibridación era la más adecuada.

Optimización de la cantidad de ADN" complementario en la hibridación

En el procedimiento de hibridación inicial se partía de una cantidad de 400 pmol de ADN" complementario como se indicó anteriormente, pero la presencia de la glucosa disminuía la eficiencia de funcionalización con ADN'/APN' y como consecuencia, se observaba una menor hibridación. Por tanto, se pensó que probablemente se estaba adicionando innecesariamente un exceso de ADN" complementario. El planteamiento que se llevó a cabo para optimizar la cantidad adecuada en el proceso de hibridación fue la utilización de hebras de ADN" complementarias marcadas con un fluoróforo (Dy490), capaz de bloquear hebras de ADN'/APN', y no ser detectado en el espectrómetro de fluorescencia. El uso del fluoróforo Dy490 se había planteado inicialmente para poder seguir la internalización de la plataforma funcional de MNPs-8 en células, debido a su estabilidad a pH ácido. Sin embargo, este fluoróforo demostró una disminución significativa de la intensidad de emisión en las condiciones básicas (NaOH 2M) en las que se llevaba a cabo la desnaturalización. Esta propiedad fue aprovechada para la utilización del Dy490 como hebra bloqueante en el proceso de hibridación. La cuantificación de la cantidad optima de ADN" complementario se realizó con una segunda hibridación, adicionando una cantidad fija de hebras de ADN" complementario marcado con FAM, que a diferencia del Dy490, mostraba altos valores de emisión a pHs básicos (Figura 22).

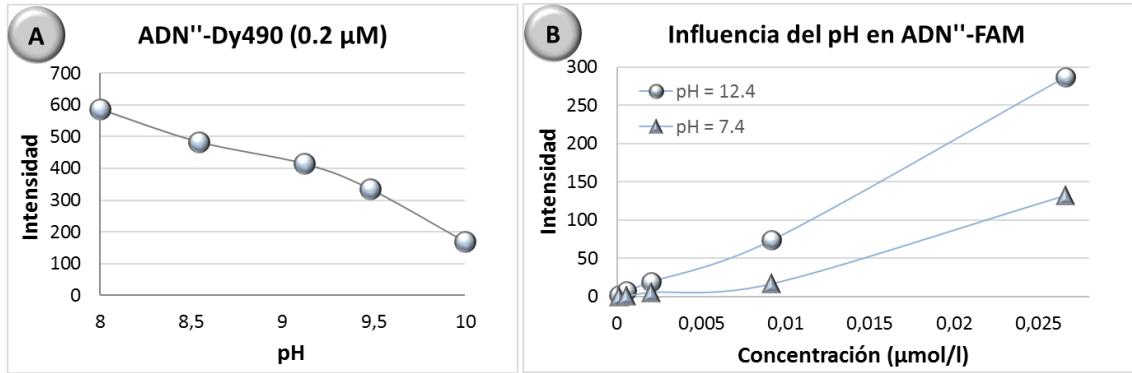


Figura 22. Representación gráfica de la influencia del pH en los fluoróforos Dy490 y FAM. A) Disminución de la intensidad del Dy490 al aumentar el pH para una misma concentración (estándar A (0.2 μ M); B) Variación de la intensidad del FAM al aumentar el pH con diferentes concentraciones.

El ensayo realizado en el procedimiento de optimización de la cantidad idónea de ADN'' complementario consistió en llevar a cabo una doble hibridación. En la primera hibridación se adicionó a las MNPs funcionalizadas una cantidad creciente de ADN'' complementario marcado con Dy490 actuando como bloqueante en PBS 10 mM (pH = 7.4). Tras la purificación, se procedió a la segunda hibridación adicionando una cantidad fija de ADN'' complementario marcado con FAM y su posterior cuantificación como se muestra en la figura 23.

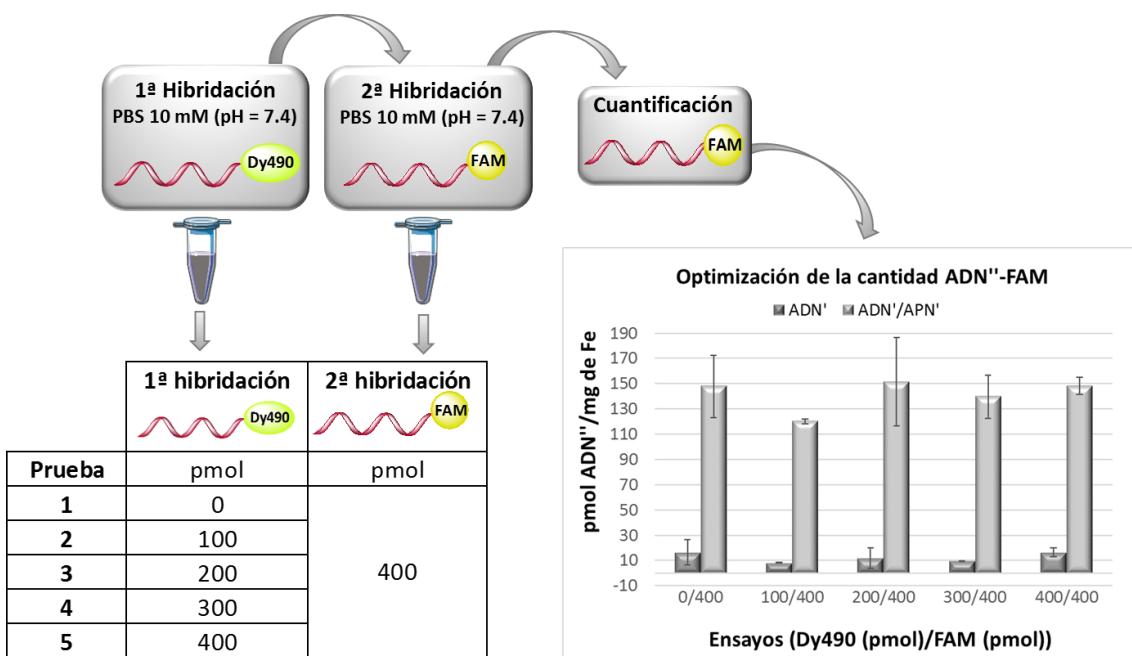


Figura 23. Procedimiento de optimización de la cantidad de ADN'' complementario

Los resultados obtenidos en la cuantificación de las diferentes pruebas realizadas demostraron que, en la prueba 2 donde se adicionaban 100 pmol de ADN''-Dy490

bloqueante y 400 pmol de ADN''-FAM se observaba un ligero descenso de la cantidad de ADN''-FAM con respecto a las demás pruebas. La adición de diferentes cantidades de ADN''-Dy490 (pruebas 3-5) no afectaba a la eficiencia de hibridación con ADN''-FAM manteniéndose prácticamente constante. En cuanto a los resultados obtenidos en la eficiencia de hibridación en la prueba 1, en ausencia de hebra de ADN''-Dy490, se observó una similitud con las pruebas 3-5 que presentaban hebras de ADN''-Dy490 bloqueante. Estos resultados indicaron que las cantidades óptimas en el proceso de hibridación correspondían a la prueba 1. Las pruebas 1-5 se llevaron a cabo funcionalizando las MNPs-6 con ADN' (100%) y en condiciones óptimas de ADN'/APN' (50/50), observando que las plataformas funcionales formadas presentaban la misma tendencia en ambos casos.

Influencia de la longitud de la hebra complementaria a la eficiencia de la hibridación

Otro parámetro que se debía tener en cuenta para obtener una plataforma adecuada para liberación controlada aplicando hipertermia magnética era la longitud de la hebra de ADN'' complementaria marcada con FAM. Como se indicó en el capítulo 1, la desnaturalización depende de varios factores, uno de ellos siendo la temperatura de desnaturalización, la cual depende de la naturaleza de las hebras y de la fortaleza de las conjugaciones de ADN'/ADN'' y APN'/ADN''. Por ello, se planteó la formación de la plataforma MNPs-8 con tres longitudes diferentes de hebras de ADN'' complementario con 9 (5'-FAM-AGCTTGGCG-3'), 11 (5'-FAM-AGCTTGGCGAC-3') y 13 (5'-FAM-AGCTTGGCGACTG-3') pares de bases (pb), respectivamente. La longitud de cadena influía en el proceso de hibridación ya que, a menor longitud de hebra, se necesitaba una menor temperatura de melting. El ensayo de la influencia de longitud de las hebras de ADN'' complementario se llevó a cabo mediante el proceso de funcionalización, hibridación y posterior desnaturalización como se ha descrito con anterioridad, cuantificando mediante espectroscopía de fluorescencia (Figura 24).

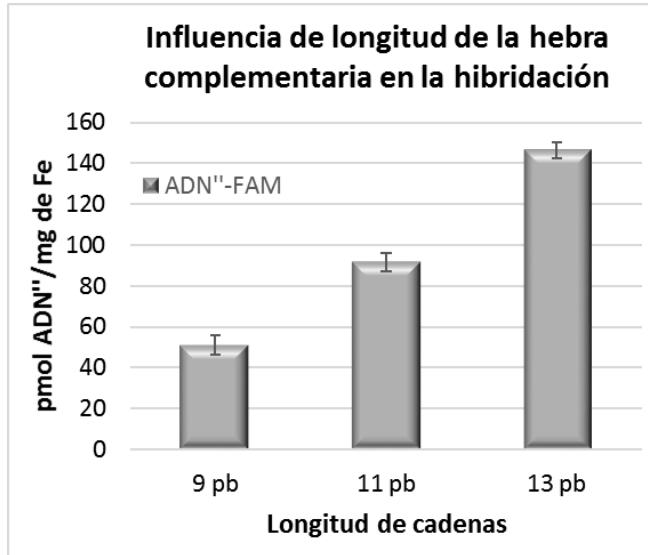


Figura 24. Representación gráfica de la influencia de la longitud de la hebra complementaria de ADN''-FAM en la eficiencia del procedimiento de hibridación

Con el planteamiento de este ensayo, se quería llegar a un equilibrio entre la eficiencia del procedimiento de hibridación y una fácil desnaturalización, estudios que se desarrollarán en el capítulo 4. Como cabía esperar, los resultados observados indicaron una mayor eficiencia de hibridación con la hebra de ADN''-FAM de 13 pb, y conforme iba disminuyendo la longitud de hebra esta eficiencia disminuía. La mayor eficiencia en la hibridación con hebras de ADN''-FAM de 13 pb era debida al mayor número de pares de bases unidos de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' formados. Las conjugaciones de ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' con un mayor número de pb, necesitaban un aporte mayor de energía para desnaturalizar sus hebras, por lo que eran mucho más robustas cuando se les aplicaban estímulos externos.

3.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha optimizado la formación de la plataforma funcional MNPs-8, formada por MNPs-1 funcionalizadas covalentemente con glucosa y ADN'/APN' en condiciones óptimas (50/50), y conjugadas con el ADN'' complementario.

En primer lugar, se ha llegado a la optimización de las condiciones de reacción de funcionalización estudiando parámetros como pH, tipo y concentración de tampón, concentraciones de reactivos, tiempos de activación de grupos carboxilo mediante la formación del intermedio estable EDC/Sulfo-NHS y cantidad de hierro de MNPs-1.

A continuación, se ha optimizado el procedimiento de funcionalización/hibridación. Para ello, las MNPs-1 se han funcionalizado con glucosa y diferentes proporciones de ADN' y APN' mediante uniones covalentes a la superficie de MNPs-1. En el procedimiento de hibridación se han utilizado dos hebras de ADN'' complementarias,

de igual secuencia y con dos fluoróforos diferentes (FAM y Dy490). El primer fluoróforo se ha utilizado en el proceso de cuantificación de la proporción óptima de ADN'/APN', y el segundo como agente bloqueante en la hibridación para optimizar la cantidad de ADN''. Los resultados obtenidos en el procedimiento de hibridación/ desnaturalización de las MNPs-5, han mostrado que la proporción óptima para la funcionalización de MNPs-1 con ADN/APN es de 50/50. El proceso de hibridación está influenciado por la concentración y naturaleza del tampón. Se han utilizado PBS y HEPES 10 mM pH=7.4 para optimizar las condiciones de hibridación, observando una mayor eficiencia utilizando el tampón PBS.

Los estudios de estabilidad en medio de cultivo celular han demostrado que las MNPs-8 funcionalizadas con glucosa tenían una estabilidad satisfactoria, a diferencia de las MNPs-5 que carecían de ella.

Los ensayos llevados a cabo para investigar la influencia que ejerce la longitud de las hebras de ADN'' complementario (13, 11 y 9 pb) en la hibridación han demostrado que la hebra de 13 pb es la más adecuada. El mayor número de pb coincidentes hace que la unión por puentes de hidrógeno sea mayor y como consecuencia estos conjugados sean más fuertes y estables a las respuestas de estímulos.

En resumen, se ha formado una plataforma funcional estable en medio de cultivo celular, capaz de hibridarse y desnaturalizarse con una eficiencia elevada, ideal para posteriores aplicaciones en liberación controlada mediante calentamiento global e hipertermia magnética que se describirán en el capítulo 4.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos y disolventes empleados en la realización de este trabajo fueron adquiridos en casas comerciales (Sigma Aldrich, Acros Organics), exceptuando los ADN y APN que fueron adquiridos en la empresa Nanoimmunotech (Zaragoza).

En todos los procedimientos que se describen a continuación se realizaron ensayos de cada muestra por triplicado, verificando así que los resultados obtenidos eran viables.

3.4.1 Funcionalización de MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN')

3.4.1.1. Procedimiento general de funcionalización

En un eppendorf se mezcló EDC (100 mM) con Sulfo-NHS (100 mM) en tampón MES durante 10 minutos en continua agitación a temperatura ambiente. A esta mezcla se añadieron las MNPs-1 junto con 10 µl SDS al 10% ajustando hasta un volumen final

de 1210 μl . La mezcla se mantuvo en agitación y se evaluó de manera visual la agregación de las MNPs.

- **Funcionalización con 1 mg de Fe de MNPs-1**

La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general mezclando 15 μmol de EDC con 22.5 μmol de Sulfo-NHS y 1 mg de MNPs@PMAO en MES (10 mM) pH = 6.1. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 5 minutos y se evaluó su agregación de manera visual.

- **Funcionalización de 0.33 mg de Fe de MNPs-1**

Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento general mezclando 15 μmol de EDC con 22.5 μmol de Sulfo-NHS y 0.33 mg de MNPs-1; en un eppendorf se adicionó tampón MES (10 mM) pH = 6.1 y en otro MES (50 mM) pH = 6.5. Las mezclas se mantuvieron en agitación durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 2000 pmol (50 pmol/ μl , 40 μl) de ADN' modificado en el extremo 5' con un grupo amino, observando visualmente la agregación de la mezcla en MES (10mM) pH = 6.1. La mezcla en tampón MES (50 mM) pH = 6.5 no presentó signos de agregación y se mantuvo en continua agitación durante toda la noche a temperatura ambiente.

- **Optimización de la funcionalización de 0.33 mg de Fe de MNPs-1 con MES (50 mM) pH = 6.5**

La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general mezclando 0.33 mg de Fe de MNPs-1 con cantidades crecientes de EDC (9.5 y 15 μmol) y Sulfo-NHS (14 y 22.5 μmol), en igual relación de equivalentes en un volumen de 1210 μl de MES (50 mM) pH = 6.5. Las mezclas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 2000 pmol (50 pmol/ μl , 40 μl) de ADN' modificado en el extremo 5' con un grupo amino y la reacción se mantuvo en continua agitación durante toda la noche a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó el tratamiento de purificación del exceso de reactivos. Para ello, la mezcla obtenida se centrifugó a 25000 x g durante 30 minutos a 4°C. Finalizado este tiempo, se eliminaron los sobrenadantes, y se resuspendieron las MNPs-2 en 1 ml de MES (50 mM) pH= 6.5, se centrifugaron de nuevo en las condiciones descritas anteriormente y se eliminó 1 ml de sobrenadante de cada muestra. El tratamiento de purificación mediante lavados por centrifugación se realizó 3 veces. Una vez terminada la purificación, las MNPs-2 formadas se guardaron a una concentración de 3.3 mg de Fe/ml.

3.4.1.2. Hibridación del sistema MNPs-2 con una hebra ADN''-fluoróforo (FAM)

En un eppendorf se mezclaron 52.8 µg de Fe (3.3 mg de Fe/ml) de MNPs-2 y 400 pmol de ADN'' complementario (100 µM) marcado con un fluoróforo (FAM), en tampón PBS 10 mM (pH = 7.4) hasta un volumen de 400 µl y la mezcla se mantuvo durante 1 hora en reposo, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, se procedió al tratamiento de purificación del exceso de ADN'' complementario que no había reaccionado, centrifugando las muestras a 25000 x g durante 20 minutos a 20 °C y eliminando los sobrenadantes. Posteriormente se resuspendieron las MNPs-3 precipitadas en 800 µl de PBS 10 mM (pH = 7.4), se centrifugaron a 25000 x g durante 20 minutos a 20 °C y se eliminaron los sobrenadantes. Este procedimiento de purificación se llevó a cabo 3 veces, seguidamente se adicionó un volumen de PBS 10 mM (pH = 7.4) para obtener MNPs-3 con una concentración de 0.132 mg de Fe/ml. Los sobrenadantes de todos los lavados se reservaron para posteriormente cuantificar la cantidad de ADN'' complementario no hibridado. En el apartado 4.5 se describe la utilización de la hibridación como método indirecto de cuantificación para estimar las condiciones óptimas de funcionalización de MNPs-1 con ADN'.

3.4.2 Funcionalización del sistema MNPs-1 con ácidos nucleicos (ADN') y péptidonucleicos (APN')

3.4.2.1. Búsqueda de las proporciones óptimas de ADN'/APN'

El procedimiento de funcionalización de MNPs-1 con ADN' y APN' se llevó a cabo de igual forma que en el apartado 4.1.1, con las condiciones de reacción ya optimizadas y adicionando ADN' y APN' en cantidades decrecientes de ADN' y crecientes de APN' respectivamente:

- i) $\text{ADN'}_{100} = 2000 \text{ pmol de ADN'} (50 \text{ pmol}/\mu\text{l})$
- ii) $\text{ADN'}_{75}/\text{APN'}_{25} = 1500 \text{ pmol de ADN'} \text{ y } 500 \text{ pmol de APN'} \text{ ambos de } (50 \text{ pmol}/\mu\text{l})$
- iii) $\text{ADN'}_{50}/\text{APN'}_{50} = 1000 \text{ pmol de ADN'} \text{ y } 1000 \text{ pmol de APN'} \text{ ambos de } (50 \text{ pmol}/\mu\text{l})$
- iv) $\text{ADN'}_{25}/\text{APN'}_{75} = 500 \text{ pmol de ADN'} \text{ y } 1500 \text{ pmol de APN'} \text{ ambos de } (50 \text{ pmol}/\mu\text{l})$
- v) $\text{APN'}_{100} = 2000 \text{ pmol de APN'} (50 \text{ pmol}/\mu\text{l})$

Estas mezclas se mantuvieron en continua agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. El tratamiento de purificación se realizó como en el

procedimiento general descrito en el apartado 3.4.1.1. Una vez terminada la purificación, las MNPs-2 se dejaron a una concentración de 3.3 mg de Fe/ml.

La cuantificación de las MNPs-1 funcionalizadas con ADN' y APN' se llevó a cabo mediante métodos indirectos de hibridación y posterior deshibridación de las hebras de ADN'' complementaria marcada con un fluoróforo (FAM) descritos en el apartado 3.4.5.

3.4.3 Optimización de la funcionalización con glucosa de la plataforma MNPs-4

- 1^a Estrategia**

En un eppendorf de 2 ml se mezclaron dos cantidades de 4-aminoenil-β-D-glucopiranósido (Glc-1, 10 mg, 33.2 µmol, 13.8 µmol / mg de Fe y Glc-2, 20 mg, 66.4 µmol, 27.7 µmol / mg de Fe) en 960 µl de tampón tetraborato sódico SSB (50 mM, pH = 9.0), junto con 2.4 mg de Fe de MNPs-1. Posteriormente se añadió EDC (25, 50 µmol) en 50 µl de SSB, en proporción de 0.75 equivalentes con respecto a la cantidad de Glc-1 o Glc-2. Se agitaron las mezclas durante 30 minutos y se adicionó de nuevo EDC (25, 50 µmol) en 50 µl de SSB, manteniendo las mezclas de reacción en continua agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Los excesos de reactivos añadidos fueron eliminados realizando 4 lavados con agua Mili-Q (4620 x g, 8 min) utilizando dispositivos de filtración por centrifugación con membranas de celulosa (Amicon, Millipore, 100 kDa). Finalizado el proceso de lavado, las mezclas obtenidas fueron filtradas usando filtros de acetato de celulosa (diámetro de poro 0.22 µm, Millipore) y se determinó la concentración de Fe de las muestras siguiendo el método descrito en el apartado 3.4.6.2.

- 2^a Estrategia**

A las MNPs-4 disueltas en 1020 µl de MES (50 mM, pH = 6.5), se le añadió la cantidad de Glc correspondiente ((1x, 13.8 µmol / mg de Fe), (2x, 27.7 µmol / mg de Fe)) en 130 µl de SSB, con respecto a los 52.8 µg de Fe presentes en cada muestra. Seguidamente se llevó a cabo el mismo procedimiento de funcionalización que en la 1^a estrategia. Terminado el tiempo de reacción, se eliminaron los reactivos en exceso mediante el protocolo de purificación descrito anteriormente y las MNPs-1 funcionalizadas se dejaron a una concentración de 3.3 mg de Fe/ml.

Para estimar la funcionalización de ADN'/APN' en ambas estrategias, se realizó una hibridación/deshibridación de las hebras de ADN'' complementarias modificadas con FAM (apartado 3.4.5).

Una vez formada la plataforma funcional, se comprobó la estabilidad coloidal que presentaban dichas MNPs (apartado 3.4.6.5)

3.4.4 Optimización de la hibridación de MNPs-7

3.4.4.1. Hebra ADN'' actuando de bloqueante

En un eppendorf se mezclaron 52.8 µg de Fe (3.3 mg de Fe/ml) de MNPs-7 con cantidades crecientes (0, 100, 200, 300 y 400 pmol) de ADN'' complementario (100 µM) marcado con un fluoróforo (Dy490), en tampón PBS 10 mM (pH = 7.4) hasta un volumen de 400 µl. La mezcla se mantuvo durante 1 hora en reposo, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Transcurrido ese tiempo, se procedió al tratamiento de purificación del exceso de ADN'' complementario que no había reaccionado, realizó como en el apartado 3.4.1.2. Este procedimiento de purificación se llevó a cabo 3 veces. Seguidamente se realizó una segunda hibridación, añadiendo 400 pmol de ADN'' complementario (100 µM) marcado con FAM, en tampón PBS 10 mM (pH = 7.4) hasta un volumen de 400 µl, en reposo durante una hora, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. El tratamiento de purificación para eliminar el exceso de ADN''-FAM, se realizó como explicado anteriormente. A las MNPs-7 ya purificadas se les adicionó un volumen de 320 µl de PBS 10 mM (pH = 7.4) para que su concentración fuera 0.132 mg Fe/ml. Esta doble hibridación se realizó para MNPs-6 funcionalizadas con 100% de ADN' y para ADN'/APN' (50/50).

3.4.4.2. Longitud de la cadena de la hebra de ADN''

400 pmol de ADN''-FAM complementario conteniendo 9, 11 y 13 pb (100 µM) se mezclaron con 52.8 µg de Fe (3.3 mg de Fe/ml) de MNPs-1 funcionalizadas con ADN'/APN' y la mezcla se mantuvo durante 1 hora en reposo, en ausencia de luz y a temperatura ambiente. La eliminación del exceso de ADN''-FAM se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que en el apartado 3.4.3.1.

Las cuantificaciones de las hibridaciones de ambos ensayos se realizaron mediante la deshibridación de las hebras de ADN'' complementarias (apartado 3.4.5).

3.4.5 Cuantificación de la funcionalización/hibridación

La cuantificación de la funcionalización MNPs se llevó a cabo mediante la desnaturalización de las hebras de ADN'' complementarias marcadas con FAM. A las muestras de concentración 0.132 mg de Fe/ml en 400 µl de tampón PBS 10 mM se les adicionó NaOH (2M, 4 µl) y se dejaron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente, en reposo y en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo se centrifugaron las muestras a

25000 x g, durante 30 minutos a 20 °C. Se tomaron 320 µl de los sobrenadantes, reservándolos para la posterior cuantificación usando espectrometría de fluorescencia. Las medidas se realizaron excitando el fluoróforo (FAM) a $\lambda = 495$ nm y midiendo la emisión a $\lambda = 517$ nm. Los datos obtenidos fueron extrapolados a una recta de calibrado (apartado 3.4.6.1).

La cuantificación de la hibridación de las MNPs se llevó a cabo midiendo los 4 sobrenadantes reservados en el procedimiento de purificación, para ello se tomaron 100 µl de los 2 primeros sobrenadantes y se diluyeron hasta 1 ml con PBS 10 mM, los otros dos sobrenadantes se tomaron 100 µl y fueron medidos directamente en el espectrofotómetro de fluorescencia. Todas las muestras fueron medidas con las mismas condiciones de excitación y emisión anteriormente mencionadas, y extrapoladas a la recta de calibrado correspondiente.

Los controles 1 y 2 se obtuvieron mediante el método de hibridación descrito en el apartado 4.1.2. y posteriormente se cuantificó de igual forma que la cuantificación de la funcionalización de MNPs descrita en este apartado.

- Control-1: 52.8 µg de Fe de MNPs -1 se mezclaron con 400 pmol de hebra complementaria ADN''-FAM, la cual carecía de grupo amino, junto EDC (9.5 µmol) y Sulfo-NHS (14 µmol) en MES 50 mM (pH = 6.5)
- Control-2: 52.8 µg de Fe MNPs-1 funcionalizadas con ADN' o ADN'/APN' se mezclaron con 400 pmol de hebra no complementaria ADN''-FAM a PBS 10 mM (pH = 7.4).

Para formar los patrones estándar se tomaron 400 pmol de ADN''-FAM (100 µM) y se diluyeron hasta 2 ml en tampón PBS 10 mM (Estándar A, 0.2 µM) a partir éste patrón se realizaron éstas diluciones: Estándar B (0.05 µM), C (1.25*10⁻² µM), D (3.125*10⁻³ µM), E (7.81*10⁻⁴ µM), F (1.95*10⁻⁴ µM). Seguidamente se tomaron 500 µL de estos patrones y se les adicionaron 10 µl de NaOH. Estos patrones se han utilizado para la representación de la recta de calibrado y para cuantificar la funcionalización de las diferentes plataformas. Para representar la recta de calibrado y cuantificar los sobrenadantes de los lavados, se tomaron 100 µl de cada patrón anteriormente mencionado, sin ningún tratamiento. Todos los patrones se midieron en iguales condiciones que las plataformas funcionales formadas.

3.4.6 Métodos de caracterización

3.4.6.1. Cuantificación de la fluorescencia

La fluorescencia se midió en un espectrómetro de fluorescencia (Perkin Elmer LS 55, 120V) a temperatura ambiente en una cubeta de cuarzo Suprasil® de 3 ventanas (QS-3 mm, 45 µl, ultra Micro Hellma). Los patrones y los sobrenadantes de las muestras MNPs-3, MNPs-5, MNPs-8 y MNPs-10 se excitaron a una longitud de onda de 495 nm, emitiendo a una longitud de onda del rango de 517 - 518 nm. Los valores de emisión obtenidos de los patrones fueron empleados para representar una recta de calibrado y poder extraer los valores de emisión obtenidos de las muestras anteriormente mencionadas.

3.4.6.2. Determinación de la concentración de hierro

La determinación de la concentración de Fe de todas las muestras de este capítulo se llevó a cabo de igual forma que en el capítulo 2 (apartado 2.4.3).

3.4.6.3. Electroforesis en gel de agarosa

La preparación del gel de agarosa, posterior carga de todas las muestras de este capítulo y aplicación de voltaje se llevó a cabo de igual forma que en el capítulo 2 (apartado 2.4.3).

3.4.6.4. DLS

Se midió el radio hidrodinámico de cada muestra, a pH en torno a 7 y con una concentración estimada de 0.1 mg de Fe/ml en KCl. Los valores obtenidos fueron tratados en función de la distribución en intensidad y número a temperatura ambiente y realizando 5 medidas. El equipo empleado fue un Brookhaven Zeta PALS.

3.4.6.5. Potencial Z

En cuanto a las medidas de potencial Z para determinar la carga superficial de cada muestra, se tomaron en un equipo Malvern Zetasizer a 25°C y realizando 5 medidas

3.4.6.6. Estudio de estabilidad en medio de cultivo celular

Se mezclaron 50 µl de medio de cultivo suplementado al 10% de suero fetal bovino (CDMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, terminología en inglés) con 5 µg de Fe de cada muestra de MNPs (MNPs-1 a MNPs-10). La placa de 96 pocillos en la

que se adicionaron las muestras se mantuvo a temperatura ambiente en reposo y las muestras fueron observadas en el microscopio óptico transcurridas 24 h.

3.5. AGRADECIMIENTO

Quería agradecer a Raluca Fratila la ayuda en la optimización de las condiciones de reacción y realización de experimentos, a María Moros y Grazyna Stepien por la ayuda en la toma de imágenes de microscopía óptica mostradas en este capítulo, así como al Profesor Javier Galbán por el acceso a su espectrómetro de fluorescencia del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

3.6. REFERENCIAS

- (1) Chorny, M.; Polyak, B.; Alferiev, I. S.; Walsh, K.; Friedman, G.; Levy, R. J. Magnetically Driven Plasmid DNA Delivery with Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *FASEB J.* **2016**, *21*, 2510–2519.
- (2) McBain, S. C.; Yiu, H. H. P.; El Haj, A.; Dobson, J. Polyethyleneimine Functionalized Iron Oxide Nanoparticles as Agents for DNA Delivery and Transfection. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2561.
- (3) Liu, Y.; Zhang, B.; Yan, B. Enabling Anticancer Therapeutics by Nanoparticle Carriers: The Delivery of Paclitaxel. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 4395–4413.
- (4) Schettters, H. Avidin and Streptavidin in Clinical Diagnostics. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 73–78.
- (5) Gunn, J.; Wallen, H.; Veiseh, O.; Sun, C.; Fang, C.; Cao, J.; Yee, C.; Zhang, M. A Multimodal Targeting Nanoparticle for Selectively Labeling T. Cells. *Small* **2008**, *4*, 712–715.
- (6) Zhang, K.; Liu, G.; Goldys, E. M. Robust Immunosensing System Based on Biotin-Streptavidin Coupling for Spatially Localized Femtogram mL–1level Detection of Interleukin-6. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 80–86.
- (7) Holmberg, A.; Blomstergren, A.; Nord, O.; Lukacs, M.; Lundeberg, J.; Uhlén, M. The Biotin-Streptavidin Interaction Can Be Reversibly Broken Using Water at Elevated Temperatures. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 501–510.
- (8) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368*, 1333–1383.
- (9) Brinkley, M. A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens and Crosslinking Reagents. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 2–13.
- (10) Smyth, D. G.; Blumenfeld, O. O.; Konigsberg, W. Reactions of N-Ethylmaleimide with Peptides and Amino Acids. *Biochem. J.* **1964**, *91*, 589–595.

- (11) Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques 2ed. In *Academic Press*; 2008.
- (12) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (13) Li, N.; Binder, W. H. Click-Chemistry for Nanoparticle-Modification. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16717.
- (14) Fratila, R. M.; Navascuez, M.; Idiago-López, J.; Eceiza, M.; Miranda, J. I.; Aizpurua, J. M.; de la Fuente, J. M. Covalent Immobilisation of Magnetic Nanoparticles on Surfaces via Strain-Promoted Azide–alkyne Click Chemistry. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 10835–10840.
- (15) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Cu-Free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.
- (16) King, M.; Wagner, A. Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions-Past and Present Trends. *Bioconjugate Chemistry*, 2014, *25*, 825–839.
- (17) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chemical Biology*, 2014, *9*, 592–605.
- (18) Kumar, S.; Jana, A. K.; Maiti, M.; Dhamija, I. Carbodiimide-Mediated Immobilization of Serratiopeptidase on Amino-, Carboxyl-Functionalized Magnetic Nanoparticles and Characterization for Target Delivery. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, *16*.
- (19) Hoare, D. G.; Koshland, D. E. A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2057–2058.
- (20) Nakajima, N.; Ikada, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 123–130.
- (21) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martín, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1746.
- (22) Moros, M.; Hernaez, B.; Garet, E.; Dias, J. T.; Saez, B.; Grazu, V.; Gonzalez-Fernandez, A.; Alonso, C.; de La Fuente, J. M. Monosaccharides versus PEG-Functionalized NPs : In Fluence in the Cellular Uptake. *ACS Nano* **2012**, 1565–1577.
- (23) Dias, J. T.; Moros, M.; Del Pino, P.; Rivera, S.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 11526–11529.
- (24) Morsy, S. Role of Surfactants in Nanotechnology and Their Applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **2014**, *3*, 237–260.

- (25) Choi, Y. W.; Lee, H.; Song, Y.; Sohn, D. Colloidal Stability of Iron Oxide Nanoparticles with Multivalent Polymer Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *443*, 8–12.
- (26) Good, N. E.; Winget, G. D.; Winter, W.; Connolly, T. N.; Izawa, S.; Singh, R. M. M. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research *. *Biochemistry* **1966**, *5*, 467–477.
- (27) Birnboim, H. .; Doly, J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 1513–1523.
- (28) Clavier, A.; Seijo, M.; Carnal, F.; Stoll, S. Surface Charging Behavior of Nanoparticles by Considering Site Distribution and Density, Dielectric Constant and pH Changes - a Monte Carlo Approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 4346–4353.
- (29) Pillai, P. P.; Kowalczyk, B.; Pudlo, W. J.; Grzybowski, B. A. Electrostatic Titrations Reveal Surface Compositions of Mixed, On-Nanoparticle Monolayers Comprising Positively and Negatively Charged Ligands. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 4139–4144.
- (30) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351.
- (31) Park, H.; Germin, A.; Sforza, S.; Corradini, R.; Marchelli, R.; Knoll, W. Effect of Ionic Strength on PNA-DNA Hybridization on Surfaces and in Solution. *Biointerphases* **2007**, *2*, 80–88.

Capítulo 4

Estudios de desnaturización de ADN” mediante calentamiento global e hipertermia magnética

4.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 3, se ha diseñado una plataforma funcionalizada con ácidos nucleicos y péptidonucleicos estable en medio fisiológico para aplicaciones en liberación controlada de fármacos mediante hipertermia magnética. Para ello se necesita un estudio previo de los factores que pueden influir en la liberación. Uno de los factores más importantes para la liberación es la fuerza de unión entre las hebras de ADN y APN, directamente relacionada con la temperatura de desnaturización de los conjugados a estudiar.

Como se indicó en el capítulo 1, los oligonucleótidos y sus análogos son cada vez más interesante debido a sus aplicaciones biomédicas.¹ Cabe destacar a los ácidos péptidonucleicos (APN), los cuales además de ser capaces de conjugar ADN con alta afinidad y selectividad,² presentan una carga neutra en su cadena principal.³ La unión de los conjugados APN/ADN es más fuerte en comparación con la conjugación ADN/ADN, debido a la falta de repulsión de cargas entre las cadenas, por lo que sus temperaturas de desnaturización al 50 % o temperaturas de *melting* (Tm) generalmente son más altas.⁴ Hay numerosos estudios sobre como la naturaleza y concentración de la solución en la que se encuentran, la longitud de cadena a conjugar, así como la existencia de pares de bases despareados, afectan a la estabilidad térmica de los conjugados formados dependiendo si se encuentran en disolución o inmovilizados en superficies.^{5,6} Todo esto se traduce en una temperatura

de desnaturalización (T_m) que puede favorecer en menor o mayor medida el proceso de liberación de hebras de ADN” del conjugado (Figura 1).

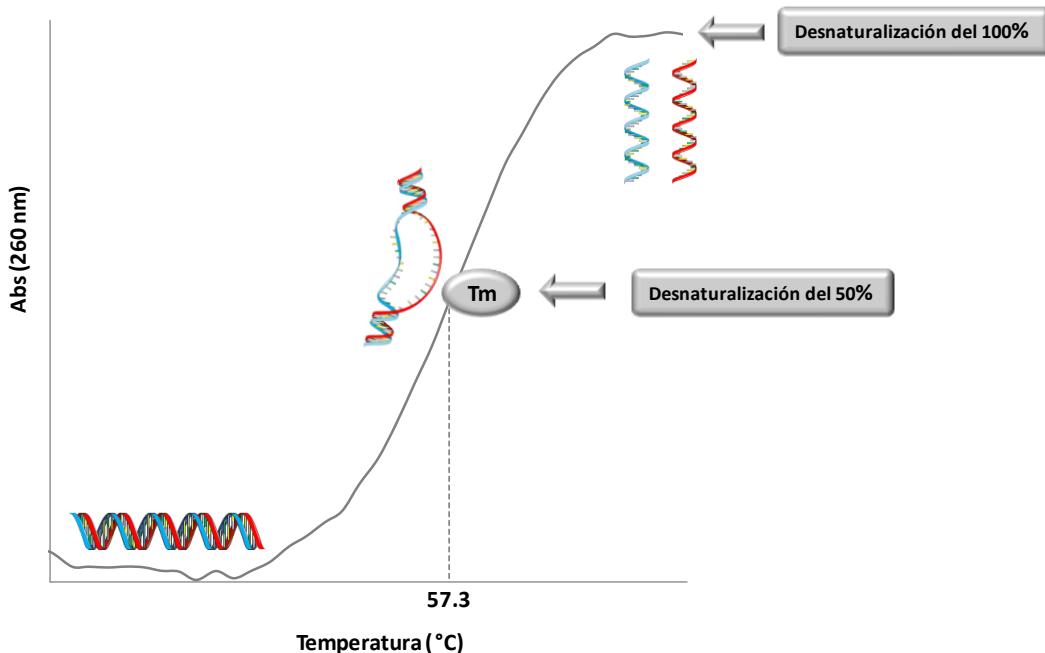


Figura 1. Representación del proceso de desnaturalización de dos hebras de ADN. La desnaturalización del 50 % (T_m) corresponde a la temperatura que se aplica para deshíbridar la mitad de los pares de bases que componen las hebras. La desnaturalización al 100% indica la temperatura a la cual las hebras de ADN se encuentran completamente deshíbridas.

Para evaluar los efectos de la fuerza iónica en la conjugación de APN/ADN y ADN/ADN, Park y colaboradores⁷ llevaron a cabo estudios con diferentes soluciones salinas (NaCl 137 mM y 20 mM), observando la estabilidad térmica que presentaba cada conjugado. De este estudio se deduce que la estabilidad de los conjugados APN/ADN depende de la fuerza iónica de manera diferente que en los conjugados ADN/ADN. Mientras que para APN/ADN el conjugado se desestabiliza ligeramente al aumentar la concentración de sal, para el conjugado ADN/APN se estabiliza fuertemente. El comportamiento de ambos conjugados se comparó además usando 3 longitudes diferentes de APN con tampones de alta y baja fuerza iónica, obteniéndose resultados concordantes con el estudio anterior.⁸ En todos los casos, las T_m aumentaban con la longitud de la cadena APN, como era de esperar, debido a que para un mayor número de pares de bases conjugadas se necesitaba un mayor aporte de energía para poder romper los enlaces de hidrógeno que mantienen las dobles hebras.⁹

Cabe destacar el incremento de estabilidad en la hibridación de APN/ADN con cadenas totalmente complementarias en disoluciones de baja fuerza iónica, debido a

la liberación de contraiones tras la conjugación.⁸ Si la conjugación no tiene todos los pares de bases complementarias este efecto se ve atenuado.

Sin embargo, este mismo estudio⁷ demostró que sobre superficies de oro, la estabilidad de los conjugados APN/ADN son independientes de la fuerza iónica del tampón utilizado.

4.1.1 Métodos de liberación controlada

En la última década, se han logrado grandes avances en el diseño y desarrollo de plataformas funcionales basadas en nanopartículas para la liberación controlada de principios activos. Siempre lo que se pretende es mejorar la estabilidad y la farmacocinética del principio activo. Uno de los principales atractivos en el empleo de NPs, es la posibilidad de diseñar sistemas multifuncionales (Figura 3). El empleo de MNPs puede resultar muy interesante, ya que de esta manera se puede incluir la funcionalidad propia de la MNPs a la biofuncionalidad de las biomoléculas conjugadas a su superficie (agentes estabilizantes, principios activos, , ADN, APN, etc.).

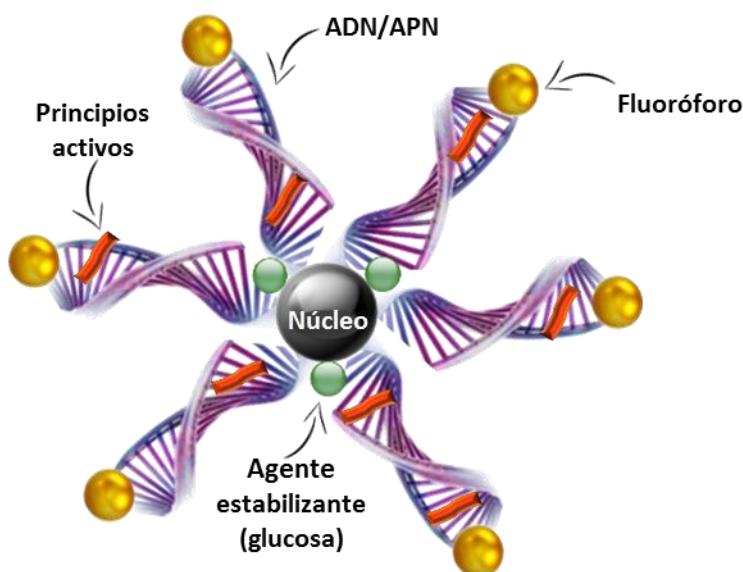


Figura 3. Diseño de MNPs multifuncionales recubiertas con varios agentes para permitir aplicaciones con múltiples fines.

Como se menciona en el capítulo 1, los métodos de liberación de fármacos se pueden clasificar en dos categorías: liberación sostenida y liberación mediante estímulos internos (variación de pH, concentraciones de iones o enzimas)¹⁰ o externos (luz, ultrasonido, campo eléctrico, campo magnético y calentamiento).¹¹⁻¹³ La ventaja del empleo de sistemas de liberación controlada de principios activos empleando estímulos externos, es que se pueden emplear para controlar a tiempo real la dosis deseada.

En este trabajo presentamos un sistema de liberación de doxorrubicina, mediante el empleo de hebras de ácidos nucleicos y péptidonucleicos hibridados a las presentes sobre la plataforma funcional MNPs-8. Para ello, se utilizarán campos magnéticos alternos como estímulo externo para inducir un calor local en la superficie de las nanopartículas.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Estudios de la temperatura de desnaturización (T_m) en hebras conjugadas de ADN' y APN'

Uno de los objetivos principales de este trabajo era conseguir una plataforma funcional capaz de liberar mediante la aplicación de hipertermia magnética hebras de ADN unidas con diferentes biomoléculas como pueden ser marcadores tumorales, fluoróforos o fármacos. Para ello, el estudio de la temperatura de desnaturización de los conjugados de ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' es un aspecto fundamental.

Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de APN tenía una serie de beneficios debidos a su estructura, pero como desventaja hay que señalar la mayor robustez y estabilidad que presentan los conjugados APN'/ADN'' con respecto a los conjugados ADN'/ADN''. El carácter neutral que presenta el APN hace que las temperaturas de desnaturización (T_m) de sus conjugados con el ADN complementario sean más elevadas con respecto a los conjugados que carecen de él.¹⁴ Por ello, se llevaron a cabo estudios de la T_m tanto en solución como en la superficie de las MNPs de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN''. Cabe esperar que las temperaturas de melting dependan del carácter iónico del tampón, así como de la longitud de cadena de las hebras hibridadas de ADN''.⁷

4.2.1.1. Conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' en disolución

En el desarrollo de este estudio, se partió de los mismos tampones y longitudes de cadenas de ADN'' empleados en el procedimiento de optimización de la hibridación de MNPs-8 del capítulo 3 (apartado 3.2.5). El procedimiento de formación de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' consistió en mezclar las hebras a conjugar en el tampón correspondiente y dejar reposar durante 1 hora. Seguidamente se llevaron a cabo las medidas de T_m en un espectrómetro UV-Vis, en un rango de temperatura y velocidad de calentamiento determinada para cada conjugado como se observa en la Figura 4.

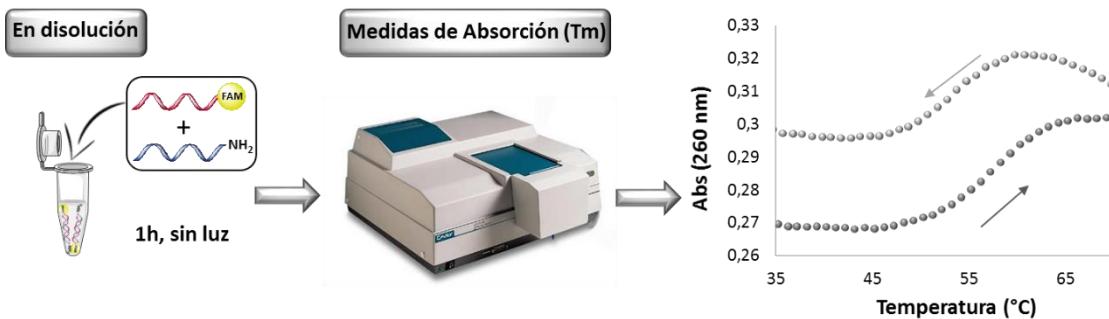


Figura 4. Esquema del procedimiento general de formación y medición de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' en disolución

• Influencia de la naturaleza y concentración del tampón

Siguiendo el procedimiento general descrito en el párrafo anterior, se pasó a evaluar la influencia que tenían diferentes tampones a diferentes concentraciones en las conjugaciones ADN'/ADN'' y APN'/ADN''. El PBS está compuesto por varias sales, (mayoritariamente NaCl) que influyen en la estabilidad térmica del conjugado debido al efecto iónico en disolución, a diferencia del tampón HEPES que carece de sales. Para observar la influencia que ejercía la fuerza iónica en la estabilidad de los conjugados, se emplearon PBS 5 mM (70 mM de NaCl), PBS 10 mM (140 mM de NaCl) y HEPES 10 mM, todos a pH = 7.4. Los valores de temperaturas de desnaturación del 50% (Tm) de las hebras de ADN obtenidos se resumen en la Tabla 1.

5' FAM-AGC TTG GCG ACT G 3' (ADN'')		
Tampón	(ADN'/ADN''-FAM)	(APN'/ADN''-FAM)
PBS (mM)/ NaCl (mM)	Tm (°C)	Tm (°C)
10 / 140	62.2	74.3
5 / 70	57.2	93.3
HEPES (mM)	Tm (°C)	Tm (°C)
10	41.2	78.8

Tabla 1. Temperaturas de desnaturación de hebras de ADN' y APN' con su hebra de ADN'' complementaria a distintas concentraciones y distintos tampones.

Los ensayos realizados en disolución demostraron la gran influencia que ejerce la naturaleza y concentración del tampón empleado, tanto a conjugados ADN'/ADN'' como APN'/ADN''. Para el tampón PBS, variando la concentración de NaCl, se observó en el conjugado ADN'/ADN'' un aumento del valor de Tm al aumentar la concentración, debido a la elevada fuerza iónica del medio la cual estabiliza las posibles repulsiones estéricas ocasionadas por los grupos fosfato del ADN. En cuanto al conjugado APN'/ADN'', se observó el efecto contrario: al disminuir la concentración del tampón se estabilizaba más el conjugado puesto que no se veía tan influenciado por la fuerza iónica del medio. Si se comparan ambos conjugados (ADN'/ADN'' y

APN'/ADN''), la mayor estabilidad se observó en el conjugado de APN'/ADN'' a PBS 5 mM debido a la disminución de fuerzas iónicas del tampón, así como por el carácter neutral del APN. En el estudio llevado a cabo con un tampón que carecía de fuerza iónica, en este caso el HEPES, la influencia de la fuerza iónica del disolvente se vio claramente reflejada en el conjugado ADN'/ADN'', disminuyendo su temperatura de desnaturalización (T_m) 21°C con respecto al PBS. En el caso del conjugado APN'/ADN'' se observó una variación más pequeña con respecto al PBS. La temperatura de desnaturalización aumento ligeramente de 74.3 a 78.7°C si comparábamos el HEPES con PBS 10 mM, confirmando así que este conjugado no se veía influenciado por la fuerza iónica del disolvente. En cambio, al comparar la temperatura de desnaturalización del tampón HEPES con PBS 5 mM se observó un efecto contrario al indicado anteriormente, disminuyendo la T_m de 93.3 a 78.8°C. Por tanto, se puede concluir que la fuerza iónica en una determinada concentración favorece la estabilidad del complejo. En cuanto a la comparación de ambos conjugados, tanto en HEPES 10 mM como en PBS 5mM, su estabilidad térmica variaba en 37.6°C y 36.1°C respectivamente. La elección del tampón HEPES 10 mM para llevar a cabo los estudios posteriores fue debida a que presentaba una menor temperatura de desnaturalización, factor muy importante que hay que tener presente para obtener una liberación satisfactoria en aplicaciones *in vitro*.

• Influencia de la longitud de la cadena en hebras conjugadas

El siguiente factor cuya influencia en la temperatura de desnaturalización de los conjugados se ha estudiado en este trabajo, fue la longitud de cadena de las hebras de ADN'' complementarias. Nuestra hipótesis fue que la elección de cadenas de menor número de pares de bases se traduciría en T_m más bajas, en vista a posibles aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Para cada longitud de hebra, se llevaron a cabo los mismos experimentos que en el ensayo anterior, utilizando diferentes tampones y concentraciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

	(ADN'/ADN'')		(APN'/ADN'')		(ADN'/ADN'')		(APN'/ADN'')	
	PBS (mM)/ NaCl (mM)		PBS (mM)/ NaCl (mM)		HEPES (mM)		HEPES (mM)	
	10 /140	5 /70	10 /140	5 /70	10		10	
SECUENCIA (ADN''-FAM)	Tm (°C)	Tm (°C)	Tm (°C)	Tm (°C)	Tm (°C)		Tm (°C)	
13 pb	62.2	57.2	74.3	93.3	41.2		78.7	
11 pb	52.7	49.2	65.7	66.2	37.3		63.8	
9 pb	41.7	39.5	63.3	46.2	34.2		54.7	

Tabla 2. Temperaturas de desnaturalización de hebras de ADN' y APN' con su hebra de ADN'' complementaria a diferentes longitudes de cadena y diferentes tampones y concentraciones.

Como cabía esperar, se observó una disminución de la temperatura de desnaturización conforme se reducía la longitud de la cadena de ADN'' en el conjugado ADN'/ADN'', tanto en tampón PBS (para ambas concentraciones), como en tampón HEPES, debido al menor número de pares de bases coincidentes en la conjugación que dio lugar a la desestabilización del conjugado. En el caso del conjugado APN'/ADN'', aunque se observó la misma tendencia a disminuir la Tm que en el conjugado ADN'/ADN'' en ambos tampones, las Tm se mantuvieron más elevadas como consecuencia de la mayor estabilidad de este conjugado. En cuanto a la influencia de la fuerza iónica de cada tampón empleado (PBS y HEPES), sobre cada hebra de ADN'' complementario estudiada (13, 11 y 9 pb), se observó la misma tendencia en la variación de la Tm para las tres longitudes de cadena. Los conjugados APN'/ADN'' en tampón HEPES 10 mM con respecto a los ADN'/ADN'' en las 3 longitudes, tenían una diferencia de temperatura de desnaturización de 37.5, 26.5 y 20.5 °C al disminuir la longitud de la cadena.

4.2.1.2. Hebras conjugadas en la plataforma funcional MNPs-8

Se ha visto en estudios realizados por Neumann y colaboradores¹⁵ que los conjugados de ADN'/APN'' y APN'/ADN'' no se comportan de igual manera estando en disolución que unidos a la superficie de un determinado material. Para ello se decidió realizar un estudio de la Tm con la plataforma funcional MNPs-8 descrita en el capítulo 3, pero con la salvedad que la secuencias de ADN' (5' TATTCCACCGCG 3') y APN' (ACCCAGTCGCCACGC) a funcionalizar con diferentes secuencias, lo cual permitiría diferenciar la Tm del conjugado ADN'/ADN'' del conjugado APN'/ADN''. En el experimento se llevaron a cabo 3 tipos de conjugaciones, en la primera conjugación se utilizó sólo el ADN''(5' TEX CGCGGTGGAATA 3') complementario al ADN', mientras que la segunda se llevó a cabo con ADN''((5' FAM-AGCTTGGCGACTG 3', 13 pb), (5' FAM-AGCTTGGCGAC 3', 11 pb), (5' FAM-AGCTTGGCG 3', 9 pb)) complementario al APN' (con las 3 longitudes de cadena) y la última mezclando el ADN''(5' TEX CGCGGTGGAATA 3') complementario al ADN' y el ADN'' (5' FAM-AGCTTGGCGACTG 3') complementario de 13 pb al APN'. Esta última conjugación se llevó a cabo para observar si la presencia de dos hebras diferentes de ADN'' complementario afectaba a la Tm. Las medidas de las Tm se llevaron a cabo de igual manera que las realizadas en disolución, obteniendo los siguiente resultados. (Tabla 3)

PLATAFORMA MNPs-8		
	(ADN'/ADN"-TEX)	(APN'/ADN"-FAM)
SECUENCIA	Tm	Tm
5' TEX-TAT TCC ACC GCC 3'	59.2	
5' FAM-AGC TTG GCG ACT G 3'		57.5
5' FAM -AGC TTG GCG AC 3'		55.2
5' FAM- AGC TTG GCG 3'		55.5

Tabla 3. Temperaturas de desnaturación de hebras de ADN' y APN' en la plataforma MNPs-8

Tras este estudio, se puede concluir que los conjugados unidos a una superficie se comportan de manera diferente que en disolución. Todos los conjugados presentaban una Tm similar, independientemente de las longitudes de cadena y la secuencia del ADN'' que se había utilizado. Los conjugados APN'/ADN'' al unirse a la superficie presentaban una disminución de la Tm con respecto al conjugado en disolución, lo cual indicaba su desestabilización. En cuanto al conjugado de ADN'/ADN'', el efecto fue contrario al APN' aumentando su Tm en la plataforma, si se comparaba con el conjugado en disolución. La hipótesis planteada ante esta nivelación de temperaturas de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'', fue la posible distribución de cargas de manera homogénea en la plataforma funcionalizada MNPs-8, disminuyendo la densidad de carga global como consecuencia de la neutralidad del APN. Este fenómeno hizo disminuir en unos 20°C la Tm del conjugado APN'/ADN'' unido a la superficie con respecto a la Tm en disolución; en cambio, el conjugado ADN'/ADN'' presentó el efecto contrario, aumentando su Tm en aproximadamente 20°C.

4.2.2. Estudios de liberación de hebras de ADN'' conjugadas a la plataforma funcional

Una vez estudiadas las temperaturas de desnaturación (Tm) descritas en el apartado anterior, se llevaron a cabo estudios de liberación de las hebras de ADN'' mediante dos métodos, calentamiento global alcanzando la Tm para cada plataforma funcional, e hipertermia magnética aprovechando el calor generado por las MNPs al aplicarles un campo magnético alterno. Los estudios de liberación se llevaron a cabo variando diferentes parámetros como el fluoróforo empleado, la longitud de cadena de la hebra complementaria, los porcentajes de funcionalización y la presencia o ausencia de hebras de captura del ADN'' liberado en el medio.

El procedimiento general para la liberación consistió en aplicar calor seco con un baño termostatizado o hipertermia magnética a las plataformas funcionales y los correspondientes controles (ver capítulo 3) a estudiar durante 30 minutos.

Posteriormente se procedió a la separación de las MNPs del sobrenadante que contenía las hebras de ADN'' liberadas, mediante centrifugación. Una vez separadas las hebras, la cuantificación de la liberación se llevó a cabo mediante medidas de fluorescencia de igual forma que las descritas en el capítulo 3. (Figura 5)

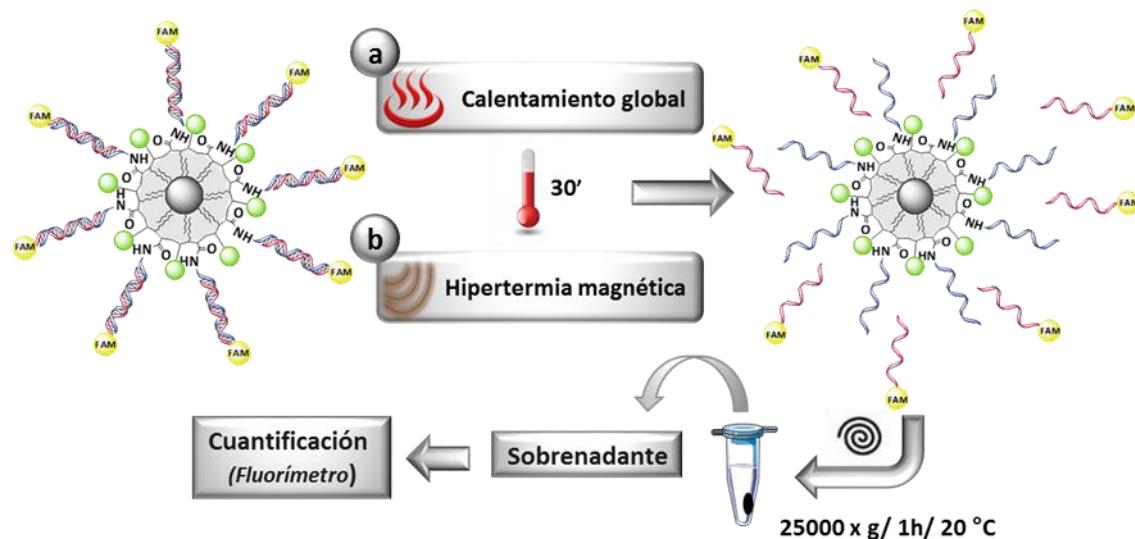


Figura 5. Esquema representativo del procedimiento general de liberación de ADN'' complementario mediante, a) calentamiento global y b) hipertermia magnética

4.2.2.1. Liberación mediante calentamiento global

4.2.2.1.1. Optimización del procedimiento general

La liberación de hebras de ADN', tanto de la plataforma funcional MNPs-8 con ADN'/APN' (50/50) como las MNPs -10 funcionalizadas solamente con ADN' (100%) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado anterior. Las muestras se calentaron aplicando las temperaturas óptimas de desnaturación (ver apartado 4.2.1.1.) de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' en HEPES 10 mM (pH = 7.4). La elección de aplicar las Tm de los conjugados en disolución, fue comprobar mediante la cantidad de ADN'' liberado en las plataformas funcionales, si se verifica o no el efecto producido en los conjugados unidos a la superficie (la nivelación de las temperaturas de desnaturación). Si era observado dicho efecto, los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' tendrían similares valores de ADN'' liberado.

El procedimiento de liberación se llevó a cabo siguiendo dos rutas diferentes.

1^a Ruta: Las plataformas funcionales MNPs-8 y MNPs-10 se calentaron inicialmente a una temperatura de desnaturación total (Ttotal) del conjugado ADN'/ADN'' ligeramente más elevada en comparación con su Tm (Tm/Ttotal 41.2/50°C) asegurando así la liberación al 100% de las hebras de ADN'' hibridadas con

el ADN', durante 30 minutos en termoblock. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron para separar las MNPs del sobrenadante que contenía las hebras de ADN'' a cuantificar. Del sobrenadante se tomó una alícuota y se midió su fluorescencia. Posteriormente, se dejaron reposar las muestras durante 1h para que tuviera lugar de nuevo la hibridación, y se volvió a realizar el mismo procedimiento, pero esta vez sólo a la plataforma MNPs-8, aplicando la temperatura de desnaturalización total del conjugado APN'/ADN'' también un poco más elevada que la Tm (Tm/Ttotal 78.7/90°C) para conseguir la liberación al 100% del ADN'' hibridado al APN', y posteriormente se cuantificó como anteriormente descrito. (Figura 6)

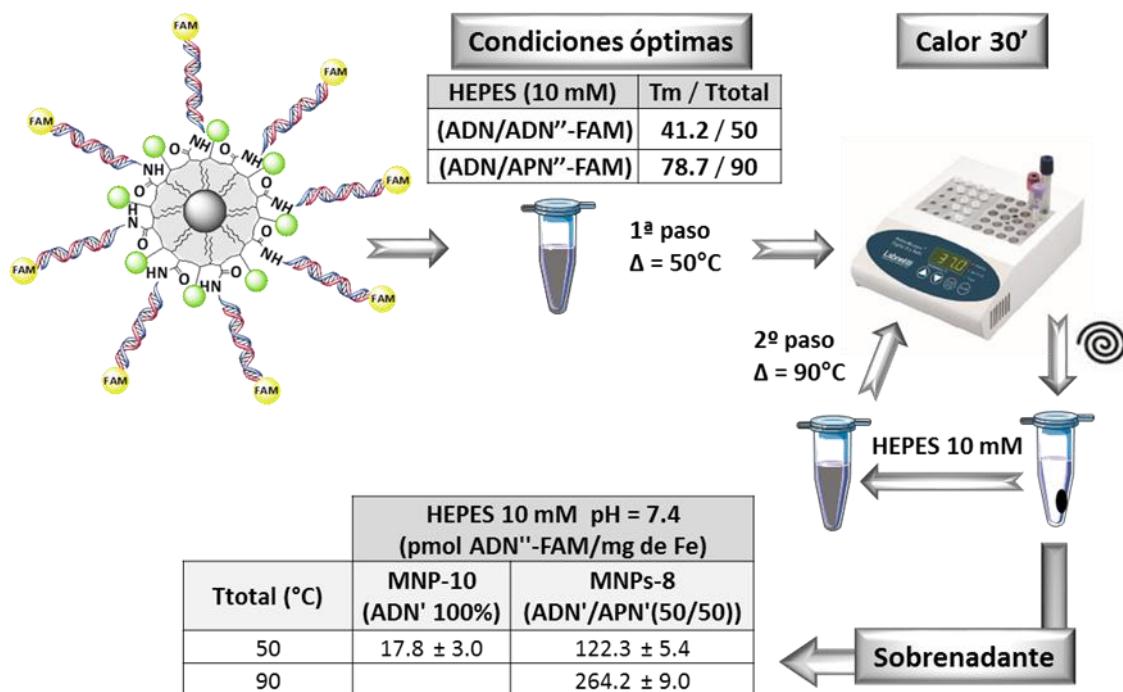


Figura 6. Esquema del procedimiento y cuantificación de la liberación de ADN'' complementario a través de la 1^a ruta planteada, partiendo de una sola muestra a la que se le aplicaron las dos temperaturas de desnaturalización (50 y 90°C). Tm es la temperatura a la cual se desnaturaliza el 50% del conjugado a estudiar y Ttotal es la temperatura a la cual se desnaturaliza todo el conjugado.

Tras analizar los resultados de la figura 6, se puede concluir que la liberación de hebras de ADN'' del conjugado ADN'/ADN'' de MNPs-10 (17.8 pmol ADN''/mg Fe) era 7 veces menor que en el conjugado de las MNPs-8 (122.3 pmol ADN''/mg Fe) a 50°C; esta tendencia se asemejaba a la liberación que se producía mediante la desnaturalización con NaOH 2M (capítulo 3), indicando la baja eficiencia de la funcionalización sólo con hebras de ADN'. En cuanto a la plataforma MNPs-8, el estudio de liberación correspondía a dos conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'', puesto que su funcionalización se había llevado a cabo con una proporción 50/50 de

ADN'/APN'. La liberación de ADN'' a la temperatura de desnaturalización del conjugado APN'/ADN'' fue de 264.2 pmol ADN''/mg de Fe, valor aproximadamente dos veces superior al obtenido del conjugado ADN'/ADN'' (122.3 pmol ADN''/mg Fe). Este resultado indicó que la funcionalización se acercaba a las proporciones óptimas puesto que la liberación del ADN'' a 90°C correspondía a la suma de las conjugaciones ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' presentes en la plataforma MNPs-8, a diferencia de la liberación de ADN'' a 50°C que era solamente del conjugado ADN'/ADN''.

2^a Ruta: Al igual que en la 1^a ruta, se partió de las mismas plataformas funcionales MNPs-8 y MNPs-10 y se les aplicaron las mismas temperaturas de desnaturalización, pero en este caso se utilizaron 2 réplicas por cada plataforma. Una de ellas se empleó para la aplicación de la temperatura de desnaturalización del conjugado ADN'/ADN'' y la otra para la temperatura de desnaturalización del conjugado APN'/ADN''. Cada muestra después del calentamiento correspondiente fue tratada de igual manera que en el procedimiento de separación y cuantificación empleado en la 1^a ruta. (Figura 7)

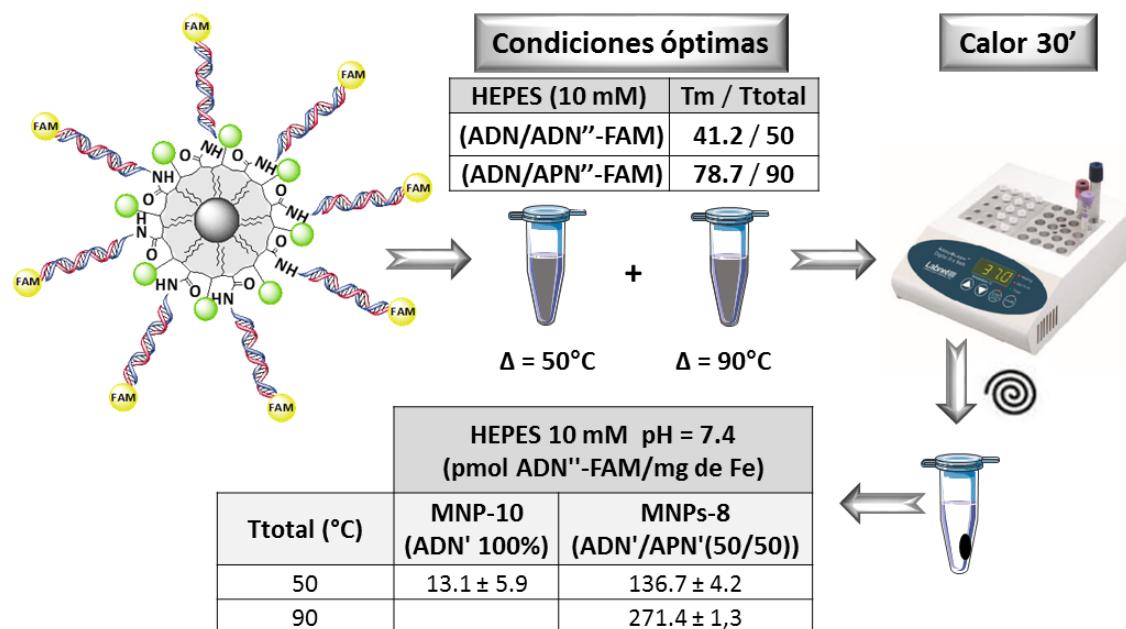


Figura 7. Esquema y cuantificación del procedimiento de liberación de ADN'' complementario correspondiente a la 2^a ruta, aplicando a cada muestra una temperatura de desnaturalización.

Los valores de liberación obtenidos mediante esta ruta fueron similares a los obtenidos en la 1^a ruta, para MNPs-8 y MNPs-10. En esta ruta, se observó de manera más clara que la funcionalización en proporciones óptimas de la plataforma MNPs-8 se había llevado a cabo satisfactoriamente, ya que la desnaturalización a 90°C (271.4 pmol ADN''/mg Fe) era el doble que la obtenida a 50°C (136.7 pmol ADN''/mg Fe).

Para concluir, en ambas rutas seguidas para la liberación de ADN'' mediante calentamiento global se obtuvieron resultados similares, por lo que se optó por la 2^a ruta para los posteriores ensayos, puesto que era más rápida y la manipulación de la muestra era menos laboriosa. Los resultados obtenidos en la liberación mediante calentamiento global fueron comparados con la desnaturización con NaOH (2M) empleada en el capítulo 3. (Tabla 4)

HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-FAM/mg de Fe)		
Ttotal (°C)	MNP-10 (ADN' 100%)	MNPs-8 (ADN'/APN'(50/50))
50	13.1 ± 5.9	136.7 ± 4.2
90		271.4 ± 1.3
NaOH 2M	16.4 ± 10.0	147.8 ± 24.8

Tabla 4. Comparación de valores de la cuantificación de la liberación de ADN'' complementario, mediante desnaturización con NaOH 2M y desnaturización mediante calentamiento global para los conjugados MNPs-8 y MNPs-10.

Como se puede observar, los valores obtenidos en la desnaturización con NaOH 2M fueron inferiores a los obtenidos en la liberación mediante calentamiento global. Ante este hecho, la hipótesis que se planteó para poder explicar los resultados obtenidos fue suponer que el NaOH 2M no presentaba suficiente fuerza para deshíbridar el conjugado APN'/ADN'' debido a la estabilidad que presenta con respecto al conjugado ADN'/ADN'', por lo que sólo se estaba cuantificando la liberación este último conjugado. Esta hipótesis además estaba respaldada por el hecho de que la plataforma MNPs-10, sólo funcionalizada con ADN', no presentaba una elevada variación de liberación de ADN'' con respecto a la plataforma MNPs-8. Por la hipótesis anteriormente mencionada se llevaron a cabo los experimentos descritos a continuación y los resultados obtenidos fueron comparados con la desnaturización mediante NaOH 2M.

4.2.2.1.2. Influencia en la conjugación del fluoróforo unido al ADN''

Debido a la sensibilidad del fluoróforo Dy490 a pH básico (ver apartado 3.2.5), no se pudo estimar la cantidad de ADN''-Dy490 en la plataforma MNPs-8, por lo que se llevó a cabo el estudio de la liberación de ADN'' por calentamiento global con los fluoróforos FAM y Dy490. Los valores obtenidos de ambos fluoróforos darían información de su comportamiento en la liberación del ADN'', valor que se podría relacionar con la eficiencia de hibridación del ADN''.

Para observar la influencia del fluoróforo en las plataformas MNPs-8 y MNPs-10, se llevó a cabo la liberación de hebras de ADN'' (de igual secuencia) marcadas con FAM y Dy490 mediante el procedimiento general descrito con anterioridad a través de la 2^a ruta. La liberación del ADN'' complementario (FAM y Dy490), se llevó a cabo mediante calentamiento hasta alcanzar las temperaturas Ttotal de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' y posterior cuantificación, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 5.

Ttotal (°C)	HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-FAM/mg de Fe)		HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-Dy490/mg de Fe)	
	MNP-10 (ADN' 100%)	MNPs-8 (ADN'/APN'(50/50))	MNP-10 (ADN' 100%)	MNPs-8 (ADN'/APN'(50/50))
50	13.1 ± 5.9	136.7 ± 4.2	18.8 ± 7.3	43.9 ± 9.4
90		271.4 ± 1.3		61.9 ± 6.7

Tabla 5. Comparación de valores de la liberación de ADN'' complementario con dos fluoróforos diferentes, FAM y Dy490

Los ensayos de liberación de ADN'' y posterior cuantificación indicaron que las hebras de ADN'' marcadas con Dy490 y FAM presentaban una liberación de ADN'' correspondiente al conjugado ADN'/ADN'', puesto que la liberación producida en el conjugado APN'/ADN'' era casi el doble que la del conjugado ADN'/APN'' para ambos fluoróforos. Esto indica que la funcionalización se asemejaba a las proporciones óptimas de la plataforma MNPs-8. La desnaturalización a 90°C (61.4 pmol/mg Fe) era 1.5 veces superior a la obtenida a 50°C (43.9 pmol/mg Fe). Si se analiza la conjugación ADN'/ADN'' de la plataforma MNPs-10 de ambos fluoróforos, apenas se observa variación en la liberación de ADN'' (13.1 pmol ADN''-FAM frente a 18.8 pmol ADN''-DY490). En cuanto a la plataforma MNPs-8, si se comparan los resultados obtenidos con los dos fluoróforos, al aplicar la temperatura de desnaturalización del conjugado ADN'/ADN'' se observó una elevada diferencia en la cantidad de ADN'' liberado, siendo ADN''-FAM muy superior al ADN''-Dy490. Este resultado se observó también para el conjugado APN'/ADN''. Para explicar la diferencia observada en la cantidad de ADN'' liberado por cada fluoróforo, se planteó que la disposición que presenta cada fluoróforo en la hebra de ADN'' en la que se encuentra unida, así como su volumen y distribución de cargas, podría afectar en el proceso de hibridación, dando lugar a diferentes conjugaciones con las hebras de ADN' y APN'. Sin embargo, esta hipótesis no explicaba el resultado obtenido para el conjugado ADN'/ADN'' de la plataforma MNPs-10, en el que no se observaba diferencia entre los dos fluoróforos. Por ello, se pensó que una combinación de factores entre el APN' y el fluoróforo Dy490 provocaba una disminución en la hibridación del ADN''-Dy490 con ADN' y APN', viéndose

reflejado en los valores liberación de ADN'. Una hipótesis que surgió para comprender esta diminución de hibridación fue atribuir este comportamiento al carácter neutral del APN'. Al formar el conjugado APN'/ADN''-Dy490, debido a la disminución de cargas la conjugación se vea desfavorecida. Esta hipótesis fue descartada puesto que al observar los resultados de la plataforma MNPs-8 en tabla 5, existía conjugación en proporciones óptimas (50/50) ADN'/APN'. Por lo que se pensó que el fluoróforo Dy 490 presentaba un volumen y orientación que desfavorecían la conjugación con las hebras de ADN'/APN' y como consecuencia presentar una disminución en la hibridación del ADN''-Dy490.

4.2.2.1.3. Influencia del porcentaje de funcionalización con ADN'/APN'

El siguiente ensayo planteado fue comparar la cantidad de ADN'' liberado mediante calentamiento global variando los porcentajes de ADN'/APN' en el proceso de funcionalización de MNPs-1 (en ausencia de glucosa) y MNPs-6 (funcionalizadas con glucosa), ensayos similares a los llevados a cabo en el capítulo 3 (ver detalles apartado 3.2.2.1 y 3.2.4.2), pero en este caso aplicando las temperaturas de desnaturalización de ADN y APN (50 y 90°C). Estos resultados permitirían una comparación de la eficacia de los dos procesos de desnaturalización (NaOH 2M y calentamiento global). El procedimiento de liberación de las hebras de ADN'' tanto en la plataforma MNPs-5 como en la MNPs-8 funcionalizadas con diferentes proporciones de ADN' y APN', se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente mediante la 2^a ruta. Los resultados obtenidos para ambas plataformas se representan en la Figura 8.

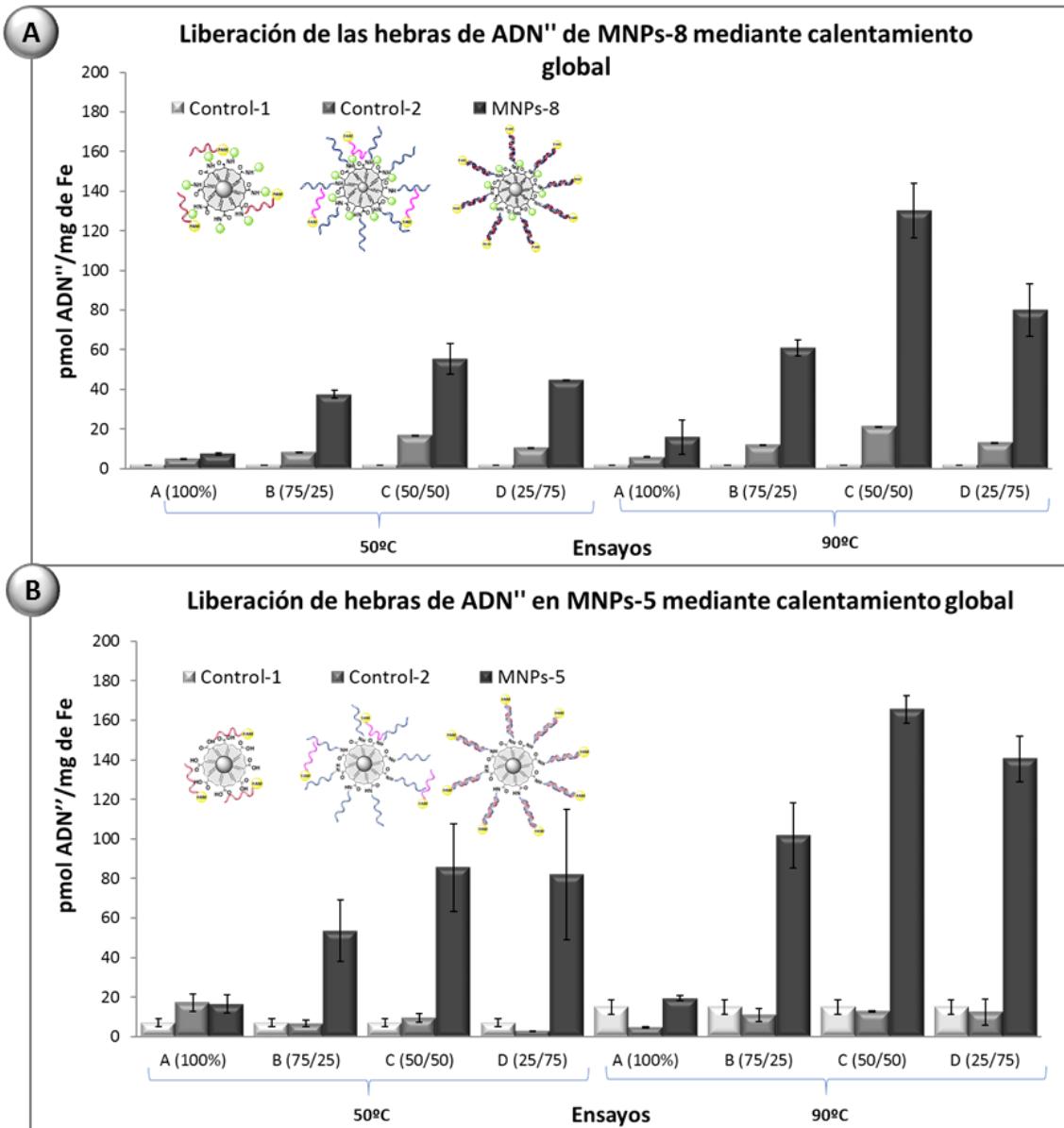


Figura 8. Cuantificación de la cantidad de hebras de ADN'' liberadas mediante la aplicación del calentamiento global a las temperaturas de desnaturación en las plataformas funcionales con diferentes proporciones de ADN'/APN'. A) Liberación de ADN'' a 50 y 90°C en la plataforma MNPs-8 B) Liberación de ADN'' a 50 y 90°C en la plataforma MNPs-5.

Tras analizar los resultados obtenidos en la cuantificación del ADN'' complementario mediante liberación por calentamiento global a la Ttotal de 50 y 90°C, se puede confirmar que tanto para las MNPs-8 como para las MNPs-5 (funcionalizadas o no con glucosa) la proporción óptima en la funcionalización era la de ADN'/APN' 50/50. A continuación, se comparó la desnaturación por calentamiento global con la desnaturación con NaOH en las plataformas MNPs-8 (funcionalización con la proporción optima ADN'/APN' 50/50) y MNPs-10 (funcionalización solamente con ADN'), obteniendo los resultados recogidos en la Tabla 6.

HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-FAM/mg de Fe)			NaOH	
Proporción ADN'/APN'	Ttotal (°C)			
	50	90		
100 / 0 (MNPs-10)	7.4 ± 0.6	15.9 ± 8.6	14.9 ± 0.3	
50 / 50 (MNPs-8)	55.3 ± 7.8	130.2 ± 13.9	58.5 ± 3.5	

Tabla 6. Comparación de la cantidad estimada de ADN'' en MNPs-8 y MNPs-10 mediante la liberación por calentamiento global y NaOH 2M

Este estudio permitió verificar la hipótesis planteada en el apartado 4.2.2.1.1, en la cual se asumía que el NaOH 2M no presentaba la suficiente fuerza para deshibridar el conjugado APN'/ADN'' debido a su estabilidad con respecto al conjugado ADN'/ADN'', cuantificando sólo la liberación de este último. En este estudio se observó que el conjugado de ADN'/ADN'' de MNPs-10 presentaba similar liberación de ADN'' en ambos métodos (15.9 y 14.9 pmol de ADN''/mg de Fe), pero en este caso aplicándole una temperatura de 90°C; esto hizo pensar que la desnaturalización completa de ADN'' de MNPs-10 no se había producido al aplicarle la temperatura de desnaturalización (50°C), temperatura a la cual se había visto en los ensayos realizados anteriormente que se desnaturizaba por completo (ver 4.2.1.1., tabla 1). En cuanto al conjugado de MNPs-8, se observaron cantidades similares de ADN'' liberado mediante la aplicación de la temperatura de desnaturalización del ADN (50°C) y la liberación con NaOH, confirmando la hipótesis planteada, la cual hacía referencia a la incapacidad del NaOH de romper el conjugado APN'/ADN''. Los valores obtenidos en la liberación a 90°C demostraron que la desnaturalización completa de la plataforma MNPs-8 no se había producido con NaOH. Además, de nuevo fue verificada la proporción óptima (50/50) de ADN'/APN'. La liberación de ADN'' (130.2 pmol ADN''/mg de Fe) correspondiente a la liberación de ambos conjugados, fue 2 veces superior a la observada a 50°C (55.3 pmol/mg de Fe) correspondiente a la liberación del conjugado ADN'/ADN''.

4.2.2.1.4. Influencia de la longitud de la hebra complementaria en la liberación

En el capítulo 3 se llevó a cabo el estudio de la influencia de longitud de cadena de las hebras complementarias en el proceso de hibridación, disminuyendo su eficacia al reducir la longitud de la cadena. En este capítulo, se realizó un estudio similar para comparar el comportamiento de liberación de hebras de ADN'' con ambos métodos de desnaturalización (calentamiento global y NaOH). El procedimiento de

desnaturalización se realizó como anteriormente explicado, aplicando a cada plataforma funcional (MNPs-8), hibridada con ADN'' de diferentes longitudes de cadena (9, 11, y 13 pb), su temperatura de desnaturalización en disolución. Las temperaturas de desnaturalización estudiadas para cada hebra de una longitud (ver apartado 4.2.1.1, tabla 2) se detallan en la Figura 9.

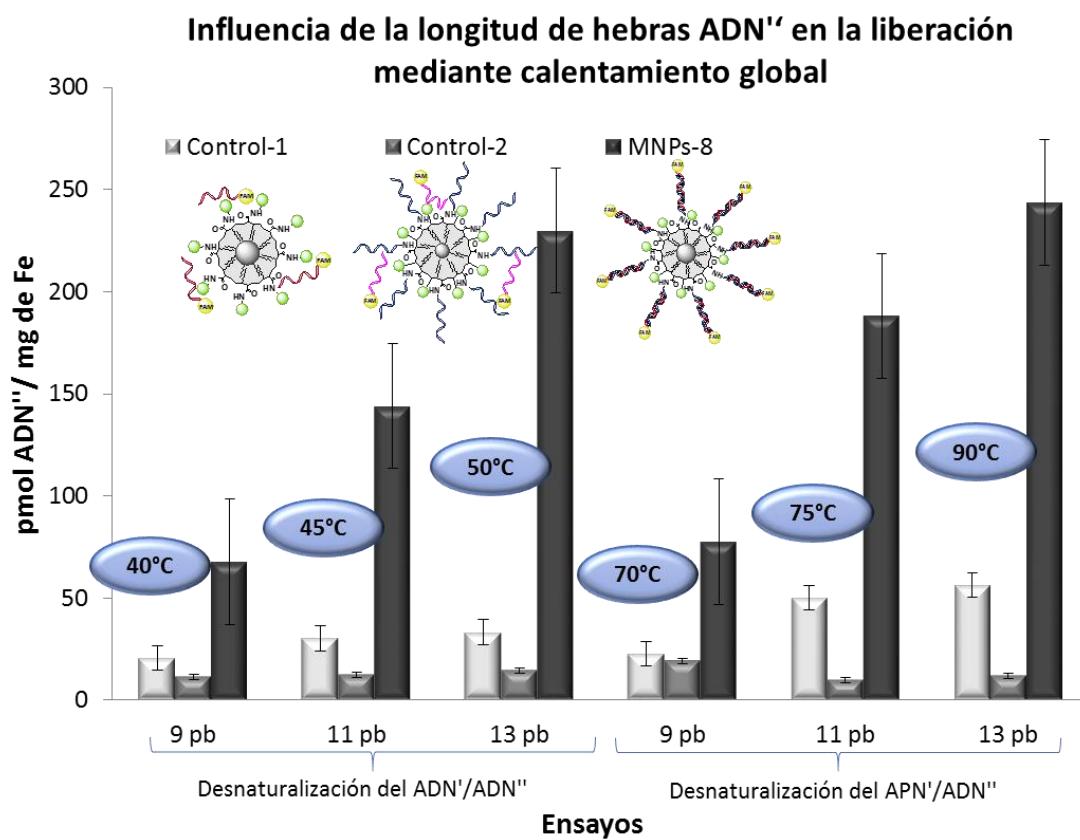


Figura 9. Representación gráfica de la influencia de la longitud de la hebra complementaria de ADN''-FAM en la eficiencia la liberación del ADN'' mediante calentamiento global.

La liberación de hebras de ADN'' complementario de 9, 11, y 13 pb del conjugado ADN''/ADN'' de la plataforma funcional MNPs-8, se llevó a cabo aplicando una temperatura superior a la temperatura de desnaturalización de 40, 45 y 50°C, respectivamente (de manera similar a anteriores experimentos). Estas temperaturas fueron más altas conforme aumentaba la longitud de cadena, observando asimismo un incremento progresivo en la liberación de ADN''. Como cabía esperar, la mayor eficacia en la liberación de ADN'' fue observada para la cadena de 13 pb. La misma tendencia en la liberación de ADN'' al aplicarle la temperatura de desnaturalización correspondiente para cada longitud de cadena fue observada para los conjugados APN'/ADN''. Además, al comparar los conjugados ADN'/ADN'' y APN''/ADN'' de la

plataforma MNPs-8 para cada longitud de hebra, se observó que las cantidades de ADN'' liberadas eran similares, como se detalla en la Tabla 7.

MNPs-8 (ADN'/APN') 50/50	HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-FAM/mg de Fe)	
	Ttotal (°C)	
ADN''-FAM	ADN'/ADN''	APN'/ADN''
9 pb	40	70
	67.8 ± 4.1	77.7 ± 8.4
11 pb	45	75
	144.0 ± 11.6	188.1 ± 12.9
13 pb	50	90
	229.9 ± 38.6	243.6 ± 8.7

Tabla 7. Comparación de la cantidad de ADN'' liberado aplicando las dos temperaturas de desnaturalización con 3 longitudes de hebra complementaria

Para explicar este efecto, el cual no se había observado en el transcurso de todos los ensayos realizados hasta el momento mediante la liberación de ADN'' por calentamiento global, detallados en el apartado 4.2.2.1, se plantearon dos hipótesis. La primera de ellas fue que las temperaturas de desnaturalización en superficie variaban drásticamente en comparación con las temperaturas de desnaturalización, equilibrando las temperaturas en ambos conjugados (ver el apartado 4.2.1). Esta hipótesis respaldaría los resultados obtenidos, ya que eran similares para cada longitud de hebra de ADN'' complementario, pero sorprendía que en todos ensayos realizados aplicando calentamiento global para la liberación de ADN'', no fuera observado este efecto. Se pensó por tanto que la liberación de ADN'' se producía satisfactoriamente, pero el problema residía en la cuantificación de éste. Al llevar a cabo los estudios de temperaturas de desnaturalización tanto en disolución como en la superficie, al aplicar calor en un rango de temperaturas determinado las hebras se desnaturalizaban, pero al finalizar el ensayo, el descenso de la temperatura conducía a una (parcial) re-hibridación de las hebras de ADN''. Esto hacía pensar que la velocidad de re-hibridación de los conjugados era superior a la de separación de las hebras de ADN'' liberadas llevada a cabo mediante centrifugación. Para comprobar si esta hipótesis era verídica, se llevó a cabo un ensayo sencillo con MNPs-8 y la hebra complementaria de 13 pb aplicando la temperatura de desnaturalización del conjugado ADN'/ADN''. En el momento de aplicar calor, en una muestra se adicionó una hebra de ADN' de secuencia complementaria al ADN'', actuando como hebra de captura, mientras que en la otra muestra no se adicionó la hebra de captura. La

liberación y cuantificación se realizaron como anteriormente descrito, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 8.

MNPs-8 (ADN'/APN')	HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN"-FAM/mg de Fe)	
	Ttotal (50°C)	
ADN"-FAM	Sin ADN' de captura	Con ADN' de captura
	288.6 ± 62.7	462.4 ± 38.7

Tabla 8. Cuantificación de la liberación de ADN" por calentamiento del conjugado ADN'/ADN" con y sin hebra ADN' de captura

Los resultados obtenidos corroboraron la hipótesis propuesta, observando un valor mucho más elevado en la cuantificación de ADN" cuando la liberación se llevaba cabo en presencia de la hebra de captura.

Los ensayos realizados en este apartado (4.2.2.1) se llevaron a cabo aplicando las Tm de cada conjugado (apartado 4.2.1) en disolución y no en la superficie. Esto fue debido a que los resultados obtenidos corroboraban las hipótesis planteadas en cada estudio desarrollado por aplicación de calor. Al concluir el estudio de la liberación de ADN" mediante calentamiento global, la hipótesis planteada inicialmente sobre el efecto de nivelación de temperatura que presentaban los conjugados de ADN'/ADN" y APN'/ADN" sobre la superficie de las MNPs no fue observado en ningún estudio de liberación de ADN" mediante calentamiento global, por lo pensó que este efecto de nivelación observado se debía a una elevada absorción de las MNPs, enmascarando los pequeños cambios de absorbancia que presentaban los conjugados a medir y no de la posible variación de carga que existe en el entorno de la plataforma funcional.

4.2.2.2. Liberación mediante aplicación de hipertermia magnética

Tras llevar a cabo todos los ensayos anteriormente descritos aplicando calentamiento global para la liberación del ADN' complementario, se pasó a estudiar la liberación mediante aplicación de hipertermia magnética. La comparación de ambos métodos de liberación podía dar una estimación de la liberación de ADN" a nivel macroscópico (mediante calentamiento global) y a nanoscala (mediante hipertermia magnética).

Tanto las plataformas funcionales (MNPs-8 y MNPs-10) como los estudios llevados a cabo en la liberación con hipertermia magnética fueron iguales a los experimentos de liberación mediante calentamiento global. Sin embargo, en este

método no se podía controlar la liberación del conjugado ADN'/ADN'' o del conjugado APN'/ADN'' como sucedía en la liberación por calentamiento global. Esto es debido a que no se puede aplicar una temperatura determinada, sino que el calentamiento inducido por las MNPs-8 y MNPs-10 depende de sus propiedades magnéticas, así como del campo aplicado. La temperatura monitorizada correspondía al medio en el que se encontraban las MNPs, pero era diferente a la temperatura alcanzada en la superficie de las MNPs. Una forma para estimar la temperatura alcanzada en las MNPs al aplicarles un campo magnético era comparar la cantidad de ADN'' liberado mediante hipertermia magnética con la cantidad de ADN'' liberado mediante la aplicación de calentamiento global y estimar el rango de temperaturas que correspondería a esa cantidad.

Para la liberación por hipertermia magnética se plantearon los siguientes ensayos utilizando las diferentes plataformas funcionales MNPs-8 y MNPs-10: i) cuantificar la cantidad de ADN'' liberado en presencia o ausencia de hebra de ADN' de captura, y ii) observar la influencia que ejercía en ausencia o no de un control de temperatura en la muestra.

4.2.2.2.1. Procedimiento general

El procedimiento general en la liberación de ADN'' complementario mediante hipertermia magnética, consistió en la aplicación de un campo magnético alterno con una frecuencia y amplitud de campo fijas durante 30 minutos, midiendo la temperatura al comienzo y final a través de una sonda de temperatura introducida dentro de la muestra para cada ensayo. El procedimiento de separación de las hebras de ADN'' de las MNPs y de cuantificación se llevó a cabo de igual manera que en el procedimiento de liberación mediante calentamiento global (ver figura 5).

4.2.2.2.2. Estudio de liberación con y sin ADN' de captura

El primer ensayo planteado fue comparar la liberación de hebra de ADN'' complementario en presencia y ausencia de una hebra de ADN' de captura. Este planteamiento surgió a raíz de los resultados observados en la liberación por calentamiento global. El procedimiento de liberación y cuantificación de ADN'' complementario se llevó a cabo mediante el procedimiento general descrito en el apartado 2.2.2.1, partiendo de dos muestras de cada plataforma funcional (MNPs-8 y MNPs-10); una de ellas carecía de hebra de ADN' de captura y la otra muestra sí que disponía de ella. A ambas muestras se les aplicó el campo magnético alterno con las condiciones experimentales anteriormente mencionadas, midiendo la temperatura

inicial y final del ensayo. Finalmente se cuantificaron las muestras como se ha indicado con anterioridad (Figura 10).

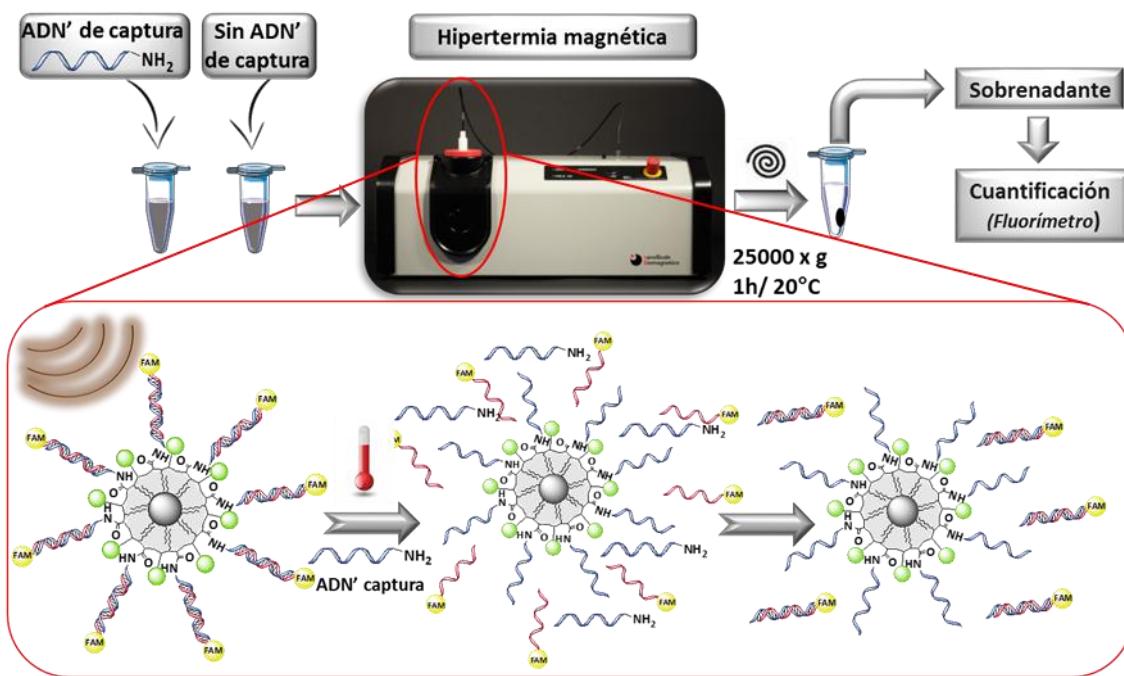


Figura 10. Esquema representativo del procedimiento de liberación de ADN'' aplicando hipertermia magnética con y sin hebra de ADN' de captura para MNPs-8 y MNPs-10

HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-FAM/mg de Fe)				
Hipertermia magnética (Tf – Ti = ΔT, 29.7-23.9 = 5.8°C)		Calentamiento global		
Sin ADN' Captura	con ADN' captura	37°C	50°C	
MNPs-10 (ADN' 100%)	-10.2	19.8 ± 2.2	2.3 ± 0.6	1.8 ± 0.3
MNPs-8 (ADN'/APN'(50/50))	-3.8	24.5 ± 1.4	1.8 ± 0.7	74.2 ± 5.6

Tabla 9. Cuantificación de la liberación de ADN'' de las plataformas MNPs-8 y MNPs-10 en presencia y ausencia de hebras de ADN' de captura mediante hipertermia magnética y comparación con la liberación por calentamiento global a 37 y 50°C.

Los valores negativos obtenidos para la liberación del ADN'' complementario en ausencia de hebra de ADN' de captura, tanto en MNPs-8 como en MNPs-10 indicaban que la liberación de ADN'' o bien no alcanzaba los límites de sensibilidad del espectrómetro de fluorescencia , o se encontraba enmascarada por la señal de ruido; otra explicación sería que debido a la poca variación de temperatura que presentaba la muestra (de 23.6°C a 29.4°C, $\Delta T = 5.8^\circ\text{C}$), las hebras de ADN'' se habían re-hibridado.

En presencia de ADN' de captura, se pudo concluir que ambas plataformas presentaban liberación de ADN'' complementario detectable, variando de manera similar la temperatura en el ensayo, partiendo de una temperatura inicial de 23.9°C hasta 29.7°C como temperatura final ($\Delta T = 5.8^\circ\text{C}$). Si comparábamos ambas plataformas, como era de esperar las MNPs-8 presentaban mayor liberación de ADN'' ($24.5 \pm 1.4 \text{ pmol ADN''/mg de Fe}$), que las MNPs-10 ($19.8 \pm 2.2 \text{ pmol ADN''/mg de Fe}$) repitiéndose esta tendencia a lo largo de todo el trabajo desarrollado. Estos resultados se compararon con los valores obtenidos mediante liberación de ADN'' por calentamiento global (37 y 50°C), proporcionando una estimación de la temperatura que se alcanzaba en las MNPs ($\approx 40^\circ\text{C}$). El estudio de la liberación de ADN'' a 37°C podría proporcionar información de la cantidad de ADN'' que se podría liberar en condiciones fisiológicas. Para la plataforma funcional óptima MNPs-8, se podía concluir que la cantidad de ADN'' liberado mediante hipertermia magnética ($24.5 \pm 1.4 \text{ pmol ADN''/mg de Fe}$), se encontraba en los valores correspondientes a una temperatura de entre 37 y 50°C mediante liberación por calentamiento global ($1.8 \pm 0.7 \text{ y } 74.2 \pm 5.6 \text{ pmol ADN''/mg de Fe}$). Estos resultados indicaron un aumento de aproximadamente 16°C en las MNPs a nivel nanométrico, esta temperatura fue obtenida de medir la temperatura inicial de la muestra 23.9°C y la temperatura final estimada que alcanza las MNPs a nivel nanométrico. Esta temperatura final estimada se obtuvo de correlacionar la cantidad de ADN'' liberado mediante hipertermia con la cantidad de ADN'' liberado a una determinada temperatura (37 y 50°C), ésta temperatura de liberación proporcionó una estimación de final ($\approx 40^\circ\text{C}$). Esta variación de 16°C a nivel nanométrico correspondía a solamente 5.8°C a nivel macroscópico en el medio. Para concluir, al aplicar hipertermia magnética se consiguió una mayor liberación a menor temperatura, puesto que la temperatura alcanzada en el medio no superaba los 30°C, mientras que en la MNPs se alcanzaban valores superiores, en torno a los 40-44°C.

4.2.2.2.3. Influencia de la temperatura inicial de la muestra

En el siguiente ensayo llevado a cabo mediante la aplicación de hipertermia magnética se comparó la liberación de ADN'' de las plataformas MNPs-8 y MNPs-10 (ambas con hebra de captura), manteniendo las muestras a una temperatura constante o no. El mantenimiento de la muestra a una temperatura constante se planteó para estudiar el comportamiento de liberación partiendo de una temperatura determinada; se eligió el valor de 37°C por ser la temperatura fisiológica. Para ello se llevó a cabo el estudio siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente, con la salvedad que en el ensayo manteniendo constante la temperatura del medio se estabilizó la muestra usando un circuito cerrado contenido agua a 37°C. Una vez la muestra se mantuvo estable a 37°C, se procedió a la aplicación del campo magnético

durante 30 minutos y la liberación se cuantificó de manera similar a los anteriores ensayos (Figura 11).

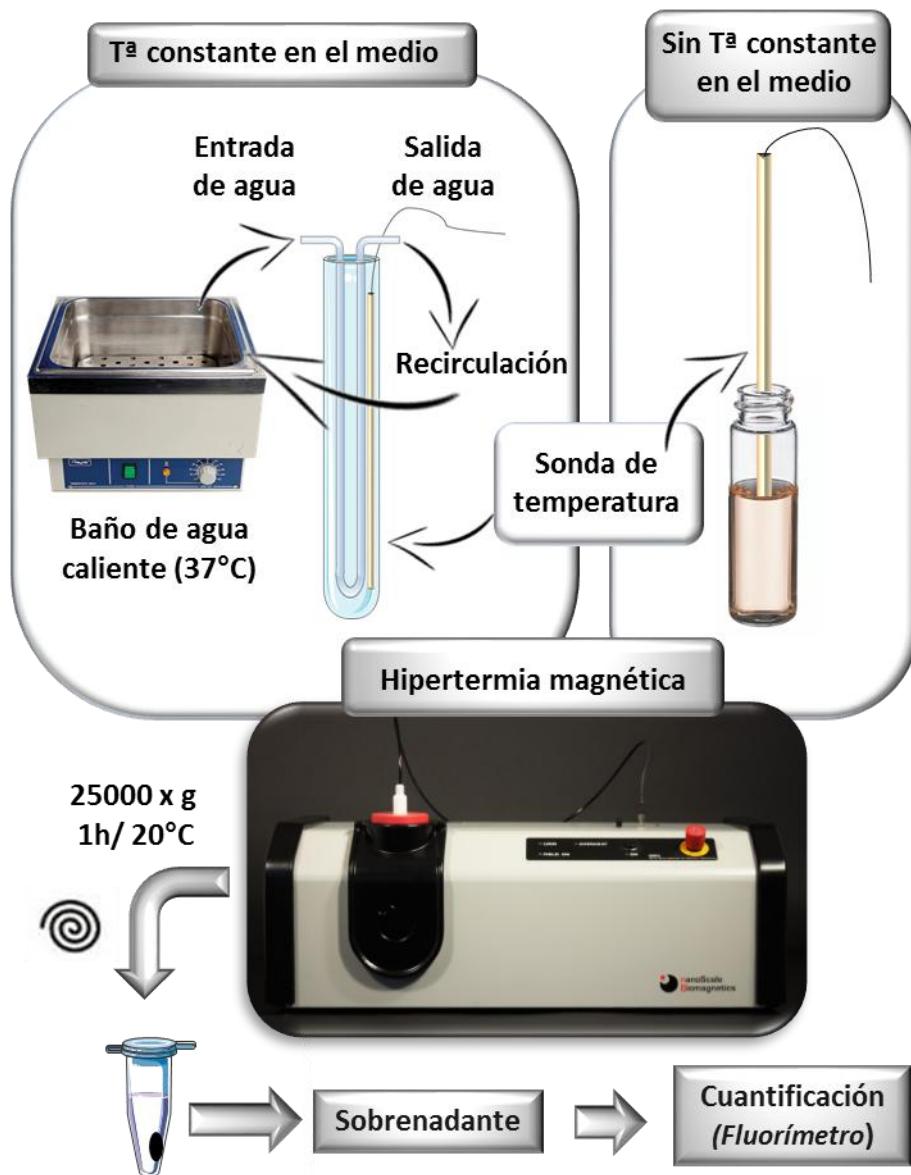


Figura 11. Esquema de los dos ensayos de liberación de ADN'' mediante hipertermia magnética llevados a cabo a con y sin temperatura constante en el medio

Al comparar los resultados obtenidos se pudo comprobar que existía una gran diferencia en la liberación, dependiendo de si se usaban condiciones de temperatura constante inicial del medio o no. En medio a 37°C, tanto en las MNPs-10 como en las MNPs-8, los valores de liberación de ADN'' alcanzaban casi el doble del valor sin mantener la temperatura constante del medio, con una pequeña variación de la temperatura (0.4°C) partiendo de una temperatura inicial de 37.5°C. Al comparar la liberación de ADN'' bajo la aplicación de hipertermia magnética o con calentamiento global, se pudo observar una mayor liberación aplicando hipertermia magnética en

ambas plataformas. En cuanto a la plataforma óptima MNPs-8, los resultados obtenidos en la liberación de ADN'' sin control de temperatura constante en el medio (147.2 pmol ADN''/ mg de Fe) se asemejaban a los obtenidos a 50°C (115.4 pmol ADN''/mg de Fe) mediante calentamiento global. La liberación de ADN'' por hipertermia magnética en condiciones en las que la temperatura se mantiene constante en el medio, era casi el doble (223.7 pmol ADN''/mg de Fe) con respecto a la liberación por calentamiento a 50°C, indicando la posibilidad de que la liberación se haya producido por completo. Se pudo concluir que la liberación de ADN'' mediante hipertermia (manteniendo o no la temperatura constante del medio), se encontraba por encima de los valores correspondientes a una liberación por calentamiento global a una temperatura de 50°. Estos resultados indicaron estimación de la temperatura en las MNPs, siendo unos 25°C superior a la temperatura inicial del medio tanto en las muestras con temperatura constante o no en el medio (Tabla 10).

HEPES 10 mM pH = 7.4 (pmol ADN''-FAM/mg de Fe)						
	Hipertermia con ADN' captura			Calentamiento global		
	Sin T ^a constante	T _f -T _i = ΔT (°C)	Con T ^a constante	T _f -T _i = ΔT (°C)	37°C	50°C
MNPs-10 (ADN' 100%)	59.7 ± 4.4	29.2- 23.6= 5.6	80.6 ± 4.9	37.5-37.1= 0.4	14.7 ± 1.3	7.7 ± 0.8
MNPs-8 (ADN'/APN') (50/50)	147.2 ± 25.8	29.3- 23.8= 5.5	223.7 ± 7.7	37.5-37.2= 0.3	14.9 ± 1.1	115.4 ± 10.2

Tabla 10. Cuantificación de la hebra de ADN'' de las plataformas MNPs-8 y MNPs-10 con temperatura constante en el medio o no, con hebras de ADN' de captura, mediante hipertermia magnética y comparación con la liberación por calentamiento global a 37 y 50°C.

Estos datos eran esperanzadores para futuras aplicaciones de liberación de fármacos *in vitro* e *in vivo*, ya que el aumento de temperatura se producía a nanoescala y no a nivel macroscópico.

4.3. CONCLUSIONES

En primer lugar, se ha estudiado la temperatura necesaria para la liberación controlada de las hebras conjugadas ADN'-ADN'' y APN'-ADN'' en disolución, así como las hebras conjugadas ADN'-ADN'' y APN'-ADN'' unidas a la plataforma MNPs-8. En este estudio se ha observado la influencia de la fuerza iónica y concentración del tampón utilizado (PBS o HEPES), así como de las diferentes longitudes de las cadenas de ADN'' complementario, tanto en disolución como en la plataforma funcional MNPs-8. Se ha observado que el conjugado APN'-ADN'' tiene una temperatura de

desnaturalización superior al conjugado ADN'-ADN'', pudiéndose alcanzar hasta 40 °C de diferencia, dependiendo del tampón utilizado y de su concentración.

Seguidamente se llevaron a cabo ensayos de liberación mediante calentamiento global de la plataforma MNPs-8 funcionalizada/hibridada con sus hebras complementarias de ADN'' de iguales secuencias, pero con diferente número de pares de bases, y diferentes fluoróforos. Las plataformas funcionales fueron calentadas a varias temperaturas (37, 50 y 90 °C) tanto para ADN'/ADN'' como APN'/ADN'', para su completa desnaturalización. La cuantificación del ADN'' liberado se llevó a cabo por espectroscopia de fluorescencia, observando la misma tendencia en la desnaturalización por calentamiento como con NaOH, con respecto al tipo de fluoróforo, los porcentajes de ADN/APN, así como la presencia o ausencia de glucosa en las plataformas funcionales, tanto para ADN'/ADN'' como APN'/ADN''.

Los ensayos llevados a cabo en la hibridación con diferentes longitudes de cadenas de ADN'' complementario demostraron una menor conjugación y por tanto liberación de ADN'' a longitudes más pequeñas, debido a que la conjugación es mucho más débil, puesto que existe un número menor de interacciones por enlaces de hidrógeno.

Finalmente, se realizaron dos tipos de ensayos de liberación mediante hipertermia magnética de la plataforma funcional MNPs-8 (en presencia y ausencia de una hebra de ADN' de captura para las hebras de ADN'' liberadas). El primer ensayo se realizó sin mantener una temperatura constante en el medio y en el segundo manteniendo la temperatura en el medio a 37°C. Ambos métodos de liberación mediante hipertermia magnética (manteniendo la temperatura constante en el medio o no), se compararon con los resultados obtenidos en la liberación aplicando calentamiento global, observando una mayor liberación en ambos métodos de liberación mediante hipertermia magnética. cuando se aplica hipertermia magnética. El ensayo llevado a cabo con la temperatura constante en el medio de 37°C, se obtuvo mayor liberación sin alcanzar, en disolución, unas temperaturas tan elevadas como cuando se usa el calentamiento global. La temperatura que alcanza la plataforma funcional a nivel macroscópico cuando se le aplica un campo magnético es alrededor de 30 °C sin mantener la temperatura constante, pero a nivel microscópico se asemeja a una liberación que se alcanza a una temperatura superior a 50 °C, lo cual indica que la superficie de las MNPs-8 genera unos 20 °C más que a nivel macroscópico, cuando se le aplica hipertermia. Si a esta plataforma se le aplica hipertermia magnética manteniendo la temperatura constante en el medio (37.5°C) la liberación de ADN'' dos veces superior a la obtenida mediante liberación por calentamiento global a 50 °C, indicando que a nivel nanoscópico, la temperatura es muy superior en relación a la obtenida sin mantener la temperatura constante en el medio.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos y disolventes empleados en la realización de este trabajo han sido adquiridos en diferentes casas comerciales (Sigma-Aldrich, Acros Organics) a excepción de los ADN y APN que han sido adquiridos en Nanoimmunotech (Zaragoza).

Las secuencias de ADN y APN utilizadas son las mismas que se han empleado en el capítulo 3 salvo que se indique lo contrario. En todos los ensayos realizados la longitud de las hebras de ADN'' complementario será de 13 pb y marcado con fluoróforo FAM, exceptuando en determinados ensayos para los que se especifica la longitud y el tipo de fluoróforo.

Los ensayos descritos a continuación fueron realizados por triplicado para cada muestra.

4.4.1. Estudios de Tm en conjugados ADN'/ADN'' y APN'/APN''

4.4.1.1. Procedimiento general de conjugación en disolución

En un eppendorf se mezcló ADN' ó APN' (1000 pmol, 50 µM) con su hebra complementaria de ADN'' (1000 pmol, 50 µM) en un tipo de tampón y concentración determinada (indicado en cada procedimiento) hasta un volumen de 2 ml, obteniendo una mezcla con concentración total 1 µM. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora hasta formar el conjugado correspondiente en disolución.

- 1º Ensayo: Búsqueda del tampón adecuado para los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN''

Las conjugaciones ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' se llevaron a cabo mediante el procedimiento general con dos tampones diferentes con dos concentraciones diferentes, PBS (5 y 10 mM) y HEPES (10 mM), todos a pH = 7.4.

- 2º Ensayo: Influencia de la longitud de cadena de ADN'' en la Tm de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN''

Los dos tipos de conjugaciones ADN'/ADN'' y APN'/ADN'', se llevaron a cabo mediante el procedimiento general de conjugación, utilizando tres hebras de ADN'' complementarias de igual secuencia, pero con diferente longitud de cadena (9, 11 y 13 pb). Los conjugados se mezclaron con los mismos tampones empleados en el 1º Ensayo.

4.4.1.2. Estudio de la Tm en la plataforma funcional MNP-8

Las MNPs-6 se funcionalizaron en este caso con ADN' (5'-TATTCCACCGCG-3') de diferente secuencia que el APN' mediante el mismo procedimiento de funcionalización descrito en el capítulo 3 (apartado 3.4.4.2) y posteriormente se hibridó el APN' con las hebras de ADN'' complementario con tres longitudes diferentes (9, 11, y 13 pb) y el ADN' con la nueva hebra de ADN'' complementaria (5'-TEX-CGCGGTGGAATAG-3'). Todas las muestras fueron disueltas en HEPES 10 mM, pH = 7.4, hasta un volumen de 400 µl.

La cuantificación de las temperaturas de desnaturalización (Tm) de todos los ensayos descritos anteriormente se realizó mediante medidas de absorbancia con una rampa de temperatura determinada para cada muestra (ver el apartado 4.1.3).

4.4.1.3. Cuantificación de la Tm de los conjugados ADN'/ADN'' Y APN'/ADN''

La cuantificación de la temperatura de desnaturalización de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' en disolución se llevó a cabo tomando 500 µl de todos los conjugados formados descritos en el apartado 4.1.1 y se midió la absorbancia en un espectrómetro UV-Vis. Para ello se calentaron las muestras en el rango de 25-90 °C (10 °C/min) en una primera aproximación general, y posteriormente con los valores obtenidos de Tm y temperatura de desnaturalización total, se refinó el rango de temperaturas para cada conjugado aplicando una velocidad de calentamiento de 2 °C/min. Con anterioridad a cada medida se realizó un blanco de absorción, en cada ensayo correspondiente al tampón empleado (PBS 5 y 10 mM, pH = 7.4) o HEPES (10 mM, pH = 7.4).

De igual forma se cuantificó la temperatura de desnaturalización de las plataformas funcionales MNPs-8 formadas, salvo que en este caso el blanco de referencia utilizado fueron las MNPs-6 en HEPES 10 mM, pH = 7.4 a una concentración de 0.132 mg de Fe/ml.

4.4.2. Métodos de liberación de las hebras de ADN'' de MNPs-8

La liberación de ADN'' de los controles (control-1 y control-2) y de las muestras MNPs-8 obtenidas con diferentes longitudes de cadena de ADN'' (9, 11 y 13 pb) y diferentes fluoróforos, se llevaron a cabo mediante dos procedimientos de liberación, calentamiento global e hipertermia magnética.

4.4.2.1. Liberación por calentamiento global

El procedimiento de liberación de las hebras de ADN” complementarias, se llevó a cabo de dos modos distintos:

- I. En el primer ensayo las muestras de MNPs-8 y los controles se calentaron durante 30 minutos en el baño termostatizado (sistema de calentamiento en seco mediante un bloque metálico, el cual mantiene la temperatura de una manera precisa y uniforme) a 50°C. Transcurrido dicho tiempo, las muestras se centrifugaron a 25000 x g a 20°C separando las MNPs de las hebras de ADN” presentes en el sobrenadante. Seguidamente se tomaron 50 µl del sobrenadante y se cuantificó la cantidad de ADN” liberado mediante espectroscopía de fluorescencia (apartado 4.4). Se dejaron reposar las muestras MNPs-8 y controles durante 1 h y posteriormente se volvieron a calentar a 90°C durante otros 30 minutos, repitiendo el procedimiento de centrifugación y posterior medida de fluorescencia.
- II. Los controles y las muestras MNPs-8 obtenidas, en los siguientes ensayos realizados, se analizaron por triplicado para cada una de las temperaturas que se emplearon, calentando las muestras a 37, 50 y 90°C durante 30 minutos. Para el ADN” de 11 pb las temperaturas empleadas fueron 45 y 75°C y para el ADN” de 9 pb fueron de 40 y 70°C. Posteriormente se llevó a cabo el mismo procedimiento de separación mediante centrifugación y cuantificación de las hebras de ADN” liberadas.

4.4.2.2. Liberación mediante aplicación de hipertermia magnética

La liberación de las hebras de ADN” en los controles y muestras MNPs-8 mediante hipertermia magnética se llevó a cabo aplicando un campo magnético alterno con una frecuencia de 829 kHz y una amplitud de campo de 20.10 kA/m durante 30 minutos. Estos ensayos se realizaron de dos formas diferentes descritas a continuación:

- I. Sin temperatura constante en el medio: se toma la temperatura inicial y final de la muestra.
- II. Con temperatura constante en el medio: las muestras se encuentran a una temperatura constante de 37 °C durante todo el ensayo, mediante la recirculación de agua a 37°C a través de un circuito cerrado.

Las muestras MNPs-8 y los controles se estudiaron en ausencia y presencia de hebra de ADN' de captura para cada tipo de ensayo anteriormente descrito. En una muestra se adicionó ADN' de secuencia complementaria a las hebras de ADN'' liberadas antes de la aplicación del campo (400 pmol), mientras que en la otra muestra se aplicó directamente el campo en ausencia de hebra de ADN' de captura. La separación de las MNPs del sobrenadante y cuantificación de la cantidad de hebras de ADN'' se llevó a cabo de igual forma que en el método de liberación por calentamiento global.

4.4.3. Cuantificación de la liberación de ADN''

La cuantificación de la liberación de las hebras de ADN'' marcadas con fluoróforos se llevó a cabo mediante medidas de fluorescencia. En ambos métodos, las muestras de concentración 0.13 mg de Fe/ml en HEPES 10 mM, pH = 7.4 tras la liberación del ADN'', se cuantificaron de igual manera que anteriormente descrito en el capítulo 3 (apartado 3.4.5) con la salvedad que tanto en las muestras MNPs-8, controles y patrones estándar no se adicionó NaOH 2M.

4.4.4. Métodos de caracterización

4.4.4.1. Cuantificación de la temperatura de desnaturalización

La temperatura de desnaturalización (T_m) se midió en un espectrofotómetro de Absorbancia UV-Vis (*Varian Cary 100 UV-Visible*) de doble haz, provisto de un soporte termostatizado multicelular Peltier con capacidad para 12 cubetas que permite un control muy preciso de la temperatura. Las cubetas empleadas fueron de cuarzo de 2 ventanas (QS-10 mm, 500 μ l, Micro Hellma). Las absorbancias de los conjugados formados en disolución, así como de las plataformas MNPs-8 fueron medidas a una longitud de onda de 260 nm. Los valores obtenidos se midieron en un rango de temperatura de 25 – 90°C, con una velocidad de calentamiento 2°C/min.

4.4.4.2. Métodos de liberación de hebras de ADN'' complementario

La liberación de hebras de ADN'' complementario de la plataforma funcional MNPs-8 se llevó a cabo siguiendo dos métodos:

- I. Liberación por calentamiento global: las muestras se calentaron durante 30 minutos a las temperaturas de desnaturalización del ADN'' complementario (37, 50, 90°C) en un termoblock de bloque metálico en seco (*JP Selecta, 56 eppendorf, 0-200°C*).
- II. Liberación aplicando hipertermia magnética: las muestras se introdujeron en un equipo de hipertermia magnética serie DM100 (*nanoScaleBiomagnetics*) a

una concentración de 0.13 mg de Fe/ml aplicando un campo magnético alterno con una frecuencia de 829 kHz y una amplitud de campo de 20.10 kA/m durante 30 minutos. Los ensayos se llevaron a cabo de dos modos diferentes, uno de ellos sin temperatura constante en el medio (aumento de la temperatura propio de la muestra) y otro con una temperatura constante en el medio, en el que a través de un sistema de recirculación cerrado en forma de U pasa agua a 37°C. Este sistema se introduce dentro de la muestra y una vez que se alcanza la temperatura y se mantiene constante, se aplica el campo magnético anteriormente indicado. La temperatura de todos los ensayos se midió usando una sonda de temperatura introducida en la muestra.

En ambos métodos de liberación, terminado el proceso de calentamiento o aplicación de hipertermia magnética, se pasa a medir el sobrenadante que contiene el ADN'' liberado tras centrifugar a 25000 x g durante 1 h a 20°C. La fluorescencia de la muestra y por tanto la cuantificación de la cantidad de ADN'' liberado se miden usando un espectrómetro de fluorescencia (apartado 4.5.3).

4.4.4.3. Cuantificación de la fluorescencia

La fluorescencia de todas las muestras de este capítulo se midió de igual forma que en el capítulo 3 (apartado 3.4.6.1)

4.4.4.4. Determinación de la concentración de hierro

La determinación de la concentración de Fe de todas las muestras de este capítulo se llevó a cabo de igual forma que en el capítulo 2 (apartado 2.4.3).

4.5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Sonia Vega por el acceso al espectrómetro de UV-vis del Instituto de biocomputación y física de sistemas complejos (BIFI) de la universidad de Zaragoza.

4.6. REFERENCIAS

- (1) Gupta, A.; Mishra, A.; Puri, N. Peptide Nucleic Acids: Advanced Tools for Biomedical Applications. *J. Biotechnol.* **2017**, *259*, 148–159.
- (2) Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. Recognition of Guanine and Adenine in DNA by Cytosine and Thymine Containing Peptide Nucleic Acids (PNA). *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677–9678.

- (3) Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895–1897.
- (4) Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Norden, B.; Graslund, A. Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544–5552.
- (5) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P.; Su, X. Biosensors and Bioelectronics Comparison of DNA , Aminoethylglycyl PNA and Pyrrolidinyl PNA as Probes for Detection of DNA Hybridization Using Surface Plasmon Resonance Technique. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1064–1069.
- (6) Ieng, A.; Lao, K.; Su, X.; Moh, K.; Aung, M. Biosensors and Bioelectronics SPR Study of DNA Hybridization with DNA and PNA Probes under Stringent Conditions. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1717–1722.
- (7) Park, H.; Germin, A.; Sforza, S.; Corradini, R.; Marchelli, R.; Knoll, W. Effect of Ionic Strength on PNA-DNA Hybridization on Surfaces and in Solution. *Biointerphases* **2007**, *2*, 80–88.
- (8) Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Norden, B.; Graslund, A. Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544–5552.
- (9) Giesen, U.; Kleider, W.; Berding, C.; Geiger, A.; Ørum, H.; Nielsen, P. E. A Formula for Thermal Stability T(m) Prediction of PNA/DNA Duplexes. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5004–5006.
- (10) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003.
- (11) Zhang, Y.; Chan, H. F.; Leong, K. W. Advanced Materials and Processing for Drug Delivery: The Past and the Future. *2Advanced Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 104–120.
- (12) Cheng, R.; Meng, F.; Deng, C.; Klok, H. A.; Zhong, Z. Dual and Multi-Stimuli Responsive Polymeric Nanoparticles for Programmed Site-Specific Drug Delivery. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3647–3657.
- (13) Pillay, V.; Tsai, T. S.; Choonara, Y. E.; Du Toit, L. C.; Kumar, P.; Modi, G.; Naidoo, D.; Tomar, L. K.; Tyagi, C.; Ndesendo, V. M. K. A Review of Integrating Electroactive Polymers as Responsive Systems for Specialized Drug Delivery Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, *102*, 2039–2054.
- (14) Ratilainen, T.; Holmén, A.; Tuite, E.; Haaima, G.; Christensen, L.; Nielsen, P. E.; Nordén, B. Hybridization of Peptide Nucleic Acid. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12331–12342.
- (15) Neumann, T.; Johansson, M. L.; Kambhampati, D.; Knoll, W. Surface-Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 575–586.

Capítulo 5

Estudios de liberación de Doxorrubicina y ensayos preliminares *in vitro*

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. Doxorrubicina

La doxorrubicina (Dox) es uno de los agentes quimioterapéuticos más potentes y es comúnmente utilizada en el tratamiento de varios tipos de cáncer.¹ Este medicamento pertenece a una clase de compuestos llamados antraciclinas y fue el primer compuesto de esta familia aislado de la bacteria *Streptomyces peucetius*.² El mayor inconveniente asociado al uso de la doxorrubicina es su alta toxicidad sistémica en tejidos sanos,^{3,4} provocando efectos secundarios graves como la cardiotoxicidad, mielosupresión, neurotoxicidad periférica, ulceración y necrosis de colón.⁵

Para minimizar estos efectos secundarios una alternativa prometedora era el uso de la nanotecnología con varias nanopartículas como portadoras de principios activos, aumentándola concentración local y controlar su liberación al alcanzar los sitios diana.⁶

5.1.1.1. Mecanismos de acción de la doxorrubicina

Los fármacos de la familia de las antraciclinas, como la doxorrubicina, son principalmente moléculas planas que se intercalan preferentemente entre pares de bases de ADN, inhibiendo así la síntesis de ADN y ARN en células en crecimiento mediante el bloqueo de los procesos de replicación y transcripción.⁷ La intercalación de principios activos en el ADN puede distorsionar su estructura y dar como resultado

la inhibición de la enzima topoisomerasa II relacionada con la replicación y transcripción del ADN. Estudios llevados a cabo con algunas antraciclinas sugieren que la fuerza de la intercalación depende de la capacidad de formar complejos de topoisomerasa II, en los que la enzima está unida covalentemente a la cadena de ADN que ha sufrido la ruptura (Figura 1).^{8,9}

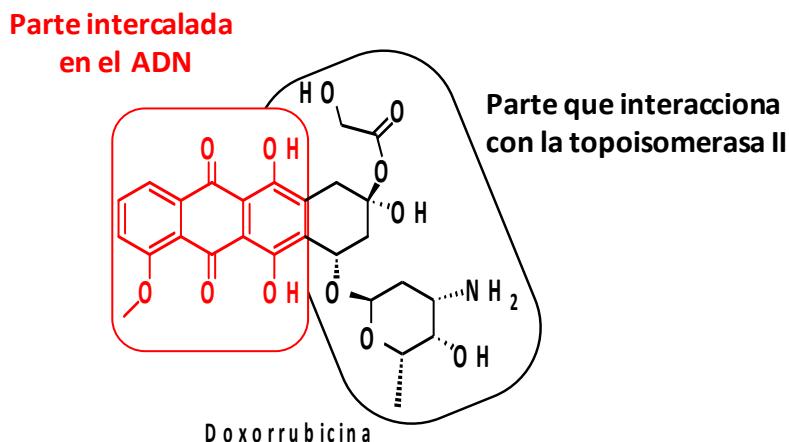


Figura 1. Representación de la estructura de la doxorrubicina, en rojo la parte que se intercala entre los pares de bases del ADN, y en negro la parte que interactúa con la enzima topoisomerasa II interfiriendo en su ciclo catalítico.

Además del efecto de inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, se cree que la doxorrubicina puede inducir la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).¹⁰ Varios estudios del mecanismo de intercalación de intercalación de la doxorrubicina se han centrado en la importancia del grupo amino libre en la interacción con el ADN. Un estudio llevado a cabo por Aguelo y colaboradores⁴ buscó verificar el impacto que ocasionaba en la doxorrubicina la modificación del grupo NH₂. Para ello, se realizaron ensayos bloqueando el grupo amino y estudiando la eficacia del principio activo y la conjugación de este con el ADN. La comparación entre la doxorrubicina con el grupo amino libre y bloqueado mostró que, si bien ambas moléculas se intercalaban en la doble hebra de ADN, la interacción de Dox con amino libre era más fuerte y daba lugar a cambios conformacionales en el ADN a diferencia de la Dox con amino bloqueado, más débil y que no alteraba la conformación. Los cambios conformacionales del ADN inducidos por la doxorrubicina libre pueden ser responsables de su actividad anticancerígena. Esta hipótesis se ve respaldada por estudios de la actividad biológica *in vitro* en células de carcinoma de colon con valores de actividad de Dox con amino libre dos veces superior a la Dox con su grupo amino bloqueado.

Pérez-Ariza y colaboradores⁹ llevaron a cabo una investigación exhaustiva sobre el mecanismo de intercalación de doxorrubicina-ADN y los factores que influyen en su eficacia, como la naturaleza y fuerza iónica del tampón utilizado (evitando su dimerización en condiciones fisiológicas), así como las características termodinámicas y

cinéticas de la intercalación. Observando una estabilidad térmica de la Dox intercalada, la cual no presentaba degradación al desnaturalizar las hebras de ADN. También se vio una diferencia en la naturaleza de intercalación de la doxorrubicina con la secuencia rica en Guanina-Citosina (GC), que con la secuencia rica en Adenina-Timina (AT). En estudios de fluorescencia se observó una unión rápida de la doxorrubicina en el surco que se encuentra presente la secuencia AT del resto de aminoazúcar formando un complejo con fluorescencia de baja intensidad. La unión de la doxorrubicina con la secuencia CG es más lenta ya que corresponde a la intercalación del núcleo aromático dando paso a un compuesto no fluorescente.

5.1.1.2. Doxorrubicina en combinación con la nanotecnología

Los primeros nanosistemas se desarrollaron para mejorar los métodos de diagnóstico, así como la eficacia y seguridad de los fármacos que presentaban baja biodisponibilidad y efectos adversos por la dosis suministrada. En la actualidad existen tres tipos de nanopartículas conjugadas con doxorrubicina utilizadas en la terapia contra el cáncer: i) nanopartículas inorgánicas (oro, óxido de hierro, etc.), ii) nanopartículas orgánicas (polímeros, liposomas, micelas, etc.) y iii) nanopartículas integradas en matrices polimericas.¹¹

Este trabajo se centra en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, funcionalizadas con ADN y APN, formando conjugados con su hebra de ADN complementaria. El principio activo utilizado (doxorrubicina), se intercala dentro de los puentes de hidrógeno de la doble hebra. Este diseño de plataforma funcional puede actuar dirigiendo agentes terapéuticos al sitio deseado con una disminución de los efectos secundarios. Además, la liberación de la doxorrubicina puede tener lugar bajo la aplicación de hipertermia magnética. El calor generado por las MNPs al ser expuestas a un campo magnético alterno daría lugar a la desnaturalización de las hebras de ADN y la posterior liberación del fármaco.^{12,13} Existen varios estudios de diseños de nanoplataformas magnéticas para la combinación de hipertermia magnética y quimioterapia en el tratamiento del cáncer.¹⁴ Un ejemplo donde el principio activo es protegido fue el de Taratula y colaboradores¹⁵, ellos diseñaron una plataforma multifuncional en las que las MNPs se encontraban recubiertas con poli (anhídrido maleíco-alt-1-octadeceno) (PMAO) (para garantizar la estabilidad en medio acuoso) y con una capa adicional de polietilenimina (PEI) que proporcionaba grupos amino para la funcionalización con polietilenglicol (PEG) para estabilizar las nanopartículas en medio biológico. El PEG permitió también la unión de la hormona LHRH para así obtener un sistema dirigido a los receptores de LHRH en células de cáncer de ovario. La doxorrubicina se cargó mediante encapsulación física en el complejo polimérico (Figura 2). La liberación de la doxorrubicina se produjo mediante

la aplicación de campo magnético alterno (AMF). *In vitro*, en el tratamiento de quimioterapia convencional con la nanoplataforma diseñada se observó una disminución del 27 % en la viabilidad celular. Al combinar la quimioterapia con la hipertermia magnética se alcanzó un nivel de muerte celular del 95 %, demostrando el efecto sinérgico de los dos tratamientos.

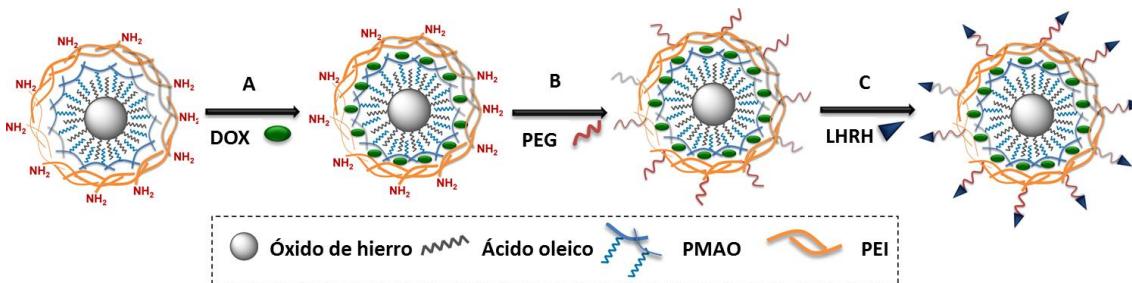


Figura 2. Diseño de la nanoplataforma de nanopartículas de óxido de hierro encapsulando doxorubicina entre el polímero (A), las nanopartículas se funcionalizan con PEG (B) y se conjuga el péptido LHRH al PEG (C).

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. Intercalación de Doxorrubicia en MNPs-8 y MNPs-10

El objetivo principal en el desarrollo de esta tesis era obtener una plataforma funcional estable, para la liberación controlada de doxorubicina. En este capítulo se ha llevado a cabo la intercalación de la doxorubicina entre las dobles hebras de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' de las plataformas optimizadas en el capítulo 3.

5.2.1.1. Procedimiento general de reacción

Existen varios estudios llevados a cabo sobre los mecanismos de transferencia de electrones que conducen a la intercalación de la doxorubicina en las dobles hebras de ADN, y mantener la doxorubicina estable en su interior. Además de factores cinéticos y termodinámicos, los cuales influyen en la interacción del ADN y la doxorubicina.^{9,16}

El procedimiento utilizado para la intercalación de doxorubicina en la plataforma MNPs-8@Dox, consistió en adicionar 7.57 nmol Dox/mg Fe bajo agitación suave durante 30 minutos (Figura 3). Trascurrido dicho tiempo se realizaron cuatro lavados mediante centrifugación a 25000 x g, 20°C durante 1h para eliminar el exceso de doxorubicina no intercalada (proceso similar al realizado en la etapa de purificación del procedimiento de hibridación, ver capítulo 3, apartado 3.4.1.2). Los correspondientes sobrenadantes fueron cuantificados mediante espectroscopía de fluorescencia para estimar de manera indirecta la cantidad de doxorubicina intercalada entre las dobles hélices de la plataforma.

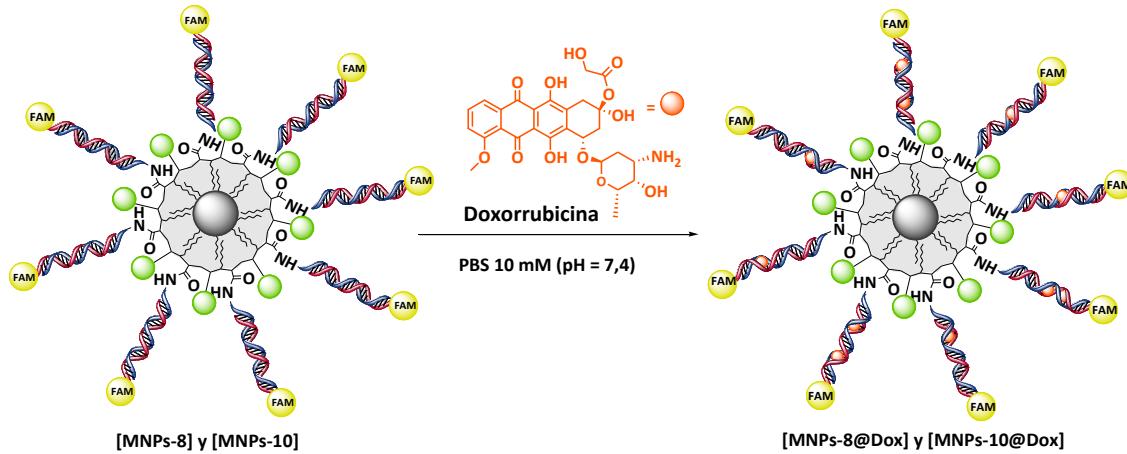


Figura 3. Representación esquemática del procedimiento de intercalación de la doxorrubicina en la plataforma MNPs-8@Dox

La intercalación de la doxorrubicina se ha estudiado en la plataforma MNPs-8 con diferentes longitudes de cadena de ADN” complementario (13, 11 y 9 pb) así como con diferentes fluoróforos (FAM y Dy490) en la cadena de ADN” complementario de mayor longitud y con ADN” complementario de 13 pb en ausencia de fluoróforo. La liberación de la doxorrubicina se ha llevado a cabo utilizando los dos métodos estudiados en el capítulo 4 (calentamiento global e hipertermia magnética) y se ha cuantificado midiendo su fluorescencia a 592 nm.

5.2.1.2. Cuantificación de la intercalación de doxorrubicina en las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox

La cuantificación de la intercalación de doxorrubicina se llevó a cabo midiendo la de fluorescencia de los sobrenadantes reservados en los lavados (excitación a 480 nm y emisión a 592 nm). De manera similar a la cuantificación de las hebras de ADN” complementario marcadas con fluoróforo FAM, los datos obtenidos fueron extrapolados a una recta de calibrado realizada a partir de muestras estándar. Los porcentajes de intercalación de doxorrubicina indicados en la Tabla 1 corresponden a la diferencia entre la cantidad de doxorrubicina inicial (400 pmol, correspondiendo a 7.57 nmol Dox/mg Fe) y la doxorrubicina cuantificada en los sobrenadantes de cada plataforma estudiada.

	pmol de Dox añadidos ^{a)}	Estimación de sobrenadantes (pmol)	Estimación de intercalación (pmol)	% INTERCALACIÓN
MNPs-6@Dox (Control-1)	400	204.3 ± 34.2	195.7 ± 34.2	48.1
MNPs-10@Dox (100% ADN')		184.5 ± 20.6	215.5 ± 20.6	53.9
MNPs-8@Dox (ADN'/APN') (50/50)		214.6 ± 7.8	185.4 ± 7.8	46.4

Tabla 1. Valores obtenidos en la estimación de la intercalación de Dox en las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox con ADN' marcado con fluoróforo FAM. ^{a)} Los 400 pmol corresponden a la concentración de 7.57 nmol Dox/mg Fe.

Los resultados obtenidos demostraron una tendencia similar de intercalación de la doxorubicina tanto en el experimento control (MNPs que carecen de ADN' y APN', para observar las interacciones inespecíficas de la doxorubicina con el recubrimiento polimérico de las MNPs) como en las dos plataformas funcionalizadas con ADN' y ADN'/APN', respectivamente. Inicialmente, nos planteamos que la intercalación de la doxorubicina en la plataforma MNPs-8 tenía lugar de manera inespecífica, debido a que el conjugado APN'/ADN'' no presenta la misma disponibilidad de unión entre los pares de bases debido a la forma de su estructura de doble hélice. La intercalación es ligeramente superior en la plataforma MNPs-10@Dox con respecto al control y la MNPs-8@Dox; esta mayor unión podía deberse a las interacciones inespecíficas como se ha observado en el control, en combinación con la mayor facilidad de la doxorubicina de intercalarse en el conjugado ADN'/ADN'' debido a la disposición de la estructura de doble hélice a través de su surco mayor debido a su mayor espacio, y menor impedimento estérico.

Otro estudio que se llevó a cabo consistió en intercalar doxorubicina del mismo modo que el procedimiento de intercalación descrito en este apartado, pero en este caso, las plataformas funcionales carecían de fluoróforo en sus hebras de ADN'' complementario. Este ensayo proporcionaría información sobre la influencia que ejerce el fluoróforo a la hora de intercalarse las moléculas de doxorubicina (Tabla 2).

	pmol de Doxo añadidos ^{a)}	Estimación de sobrenadantes (pmol)	Estimación de intercalación (pmol)	% INTERCALACIÓN
MNPs-10@Dox (100% ADN')	400	252.7 ± 9.3	147.3 ± 9.3	36.8
MNPs-8@Dox (ADN'/APN') (50/50)		258.3 ± 14.4	141.7 ± 14.4	35.4

Tabla 2. Valores obtenidos en la estimación de la intercalación de Dox en las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox sin fluoróforo en el ADN'' complementario ^{a)} Los 400 pmol corresponden a la concentración de 7.57 nmol Dox/mg Fe.

Los valores obtenidos en la intercalación demostraron una unión similar de doxorrubicina en ambas plataformas. Este hecho podía deberse a que la doxorrubicina no se intercalaba en el conjugado APN'/ADN'', como se ha comentado en el ensayo anterior, debido a la menor transferencia de electrones que puede presentar el núcleo de anillos aromáticos de la doxorrubicina. Esta al intercalarse en el conjugado APN'/ADN'' crearía una inestabilidad y solo se encontraría intercalada en el conjugado ADN'/ADN''. Este primer planteamiento contradecía los estudios hasta ahora llevados a cabo en los que la plataforma MNPs-8 (ADN'/APN', 50/50) presentaba mayor hibridación que la MNPs-10 (ADN', 100%). Otra hipótesis planteada en el ensayo con hebras de ADN'' marcadas con fluoróforo, era que la unión inespecífica de la doxorrubicina a la superficie de las MNPs-6, era superior a la intercalación en las doble hebras y enmascarando la liberación de las plataformas. Por último, se pensó que el fluoróforo FAM interfería en las medidas de fluorescencia, enmascarando la señal emitida por la doxorrubicina.

Si se comparaban las plataformas MNPs-8@Dox (46.4 frente a 35.4 % de intercalación respectivamente) y MNPs-10@Dox (53.9 frente a los 36.8% de intercalación), ambas con y sin fluoróforo, se observó una disminución del porcentaje de intercalación en ambas plataformas en ausencia de fluoróforo. Este hecho también contradecía los estudios realizados hasta el momento, puesto que, si el fluoróforo favorecía la intercalación de doxorrubicina por los resultados observados, debía de ser mayor para las MNPs-8@Dox puesto que la hibridación con ADN'' complementario y posterior liberación, con respecto a la MNPs-10@Dox en estudios realizados en el capítulo 3. La presencia de hebras de ADN'' complementario marcado con fluoróforo al producirse la liberación, interferiría en la señal de doxorrubicina, provocando un aumento del valor cuantificado de liberación de doxorrubicina.

Se pudo concluir con los resultados observados que el fluoróforo no interfiere en la intercalación de doxorrubicina, pero si en su cuantificación, enmascarando su señal

de emisión. La similitud de los resultados observados de ambas plataformas en la intercalación de la doxorrubicina (147.3 ± 9.3 pmol de Dox en la plataforma MNPs-10@Dox frente a los 141.7 ± 14.4 pmol de la plataforma MNPs-8@Dox) podía deberse también a la unión de doxorrubicina de manera inespecífica y no por intercalación en la doble hebra de los conjugados presentes en las plataformas funcionales.

Estos resultados fueron comparados con la liberación de Dox unida a las plataformas para ver el comportamiento de la Dox, si se encuentra unida inespecíficamente o no, presentando una estabilidad es menor y como consecuencia se liberaría mayor cantidad de Dox a diferencia si se encuentra intercalada, su estabilidad térmica sería mayor.

5.2.2. Liberación de doxorrubicina mediante estímulos externos

La liberación de la doxorrubicina de la plataforma funcional se llevó a cabo usando los mismos métodos utilizados para la desnaturalización de las dobles hebras de ADN (capítulo 4): calentamiento global e hipertermia magnética. Se ha estudiado la liberación de la doxorrubicina a diferentes temperaturas y en ausencia y presencia de fluoróforo en el ADN” complementario de la plataforma funcional. Así como en la liberación de doxorrubicina manteniendo la temperatura constante o no, al aplicar campo magnético en la liberación mediante hipertermia magnética.

5.2.2.1. Liberación mediante calentamiento global

Para la liberación de doxorrubicina mediante calentamiento global se siguió el procedimiento general puesto a punto para la liberación de ADN” complementario (ver capítulo 4, apartado 4.2.2.1.1), empleando una muestra para cada temperatura aplicada en la liberación de doxorrubicina. Los estudios se realizaron utilizando las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox, así como sus correspondientes controles (control-1@Dox y control-2@Dox) en HEPES 10 mM (pH = 7.4) calentando a: 37°C, para observar la liberación que se produciría a temperatura fisiológica sin aplicar ningún estímulo externo; 50°C (temperatura de desnaturalización Ttotal del conjugado ADN'/ADN'') y 90°C (temperatura de desnaturalización Ttotal del conjugado APN'/ADN'') durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo se procedió a separar la doxorrubicina liberada de las MNPs mediante centrifugación a 25000 x g, 20°C durante 1h. Su cuantificación se llevó a cabo mediante espectroscopía de fluorescencia excitando a $\lambda = 480$ nm y recogiendo la emisión a $\lambda = 592$ nm. Los valores obtenidos se encuentran representados en la Figura 4.

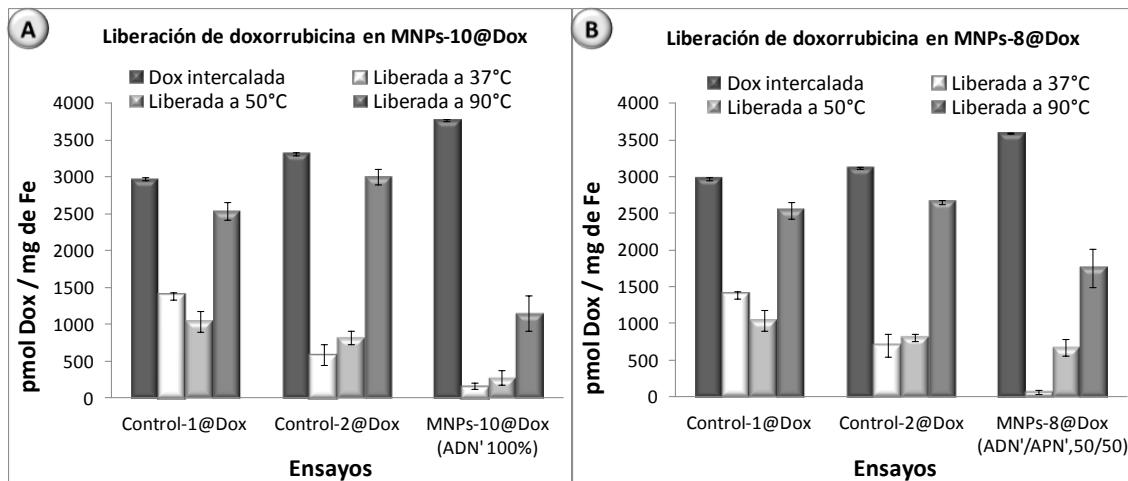


Figura 4. Representación gráfica de la doxorrubicina intercalada y liberada a diferentes temperaturas en: A) control-1@Dox, control-2@Dox y las plataformas MNPs-10@Dox y B) control-1@Dox, control-2@Dox y MNPs-8@Dox, en presencia de fluoróforo FAM en el ADN” complementario.

Tras analizar los resultados obtenidos en la liberación de doxorrubicina mediante calentamiento global, se compararon las cantidades intercaladas de doxorrubicina para ambas plataformas como se muestra en la figura 4 A y B. En cuanto a la liberación de doxorrubicina de la plataforma MNPs-10@Dox (Figura 4 A), se pudo observar un aumento de la cantidad de doxorrubicina liberada al aumentar la temperatura. En los correspondientes controles se observó la liberación de una mayor cantidad de doxorrubicina con respecto a la plataforma funcional, con una liberación casi total a 90°C. La plataforma funcional MNPs-8@Dox y los correspondientes controles (Figura 4 B), mostraron una tendencia similar, pero con valores ligeramente inferiores a la plataforma MNPs-10@Dox. Ambas plataformas funcionales presentaron una liberación gradual de la doxorrubicina al aumentar la temperatura. A 37°C, la liberación de la plataforma MNPs-8@Dox a 37°C fue inferior con respecto a MNPs-10@Dox, indicando una mayor estabilidad de la doxorrubicina en dicha plataforma a temperatura fisiológica. La aplicación de 90°C en ambas plataformas no llevó a la liberación total de la doxorrubicina intercalada, sino a aproximadamente un 30% para la plataforma MNPs-10@Dox y un 49% para la plataforma MNPs-8@Dox. Para los controles (control-1@Dox y control-2@Dox) se observó una mayor liberación de doxorrubicina a todas las temperaturas en comparación con las plataformas, debido a la mayor inestabilidad de la unión inespecífica de la doxorrubicina con el recubrimiento polimérico de las MNPs, llegando hasta un rango de 85 a 90% a temperatura 90°C como se muestra en la Tabla 3.

	% Dox Intercalada	% Dox Intercalada	% Dox liberada 37°C	% Dox liberada 50°C	% Dox liberada 90°C
100 % ADN'	control-1@Dox	39.3	46.6	35.1	85.4
	control-2@Dox	43.8	17.8	27.8	90.6
	MNPs-10@Dox	49.8	4.4	7.5	30.5
(50/50) ADN'/APN'	control-1@Dox	39.3	46.6	35.1	85.4
	control-2@Dox	41.2	22.5	25.9	85.1
	MNPs-8@Dox	47.5	1.6	18.8	48.9

Tabla 3. Valores obtenidos expresados en porcentajes en la intercalación y liberación de doxorrubicina a diferentes temperaturas en el control-1@Dox y control-2@Dox, y las plataformas MNPs-10@Dox y MNPs-8@Dox

Los resultados recogidos en la tabla 3 indicaban los valores esperados, ya que la intercalación de la doxorrubicina era superior en las plataformas funcionalizadas. El hecho de que a 37°C la liberación de la doxorrubicina de la plataforma MNPs-8@Dox fuese muy baja sugiere que el uso de nanopartículas puede prevenir la liberación a temperaturas fisiológicas y es un resultado prometedor de cara a los estudios de liberación por hipertermia magnética. Estos resultados sin embargo no respaldaban la hipótesis planteada anteriormente, en la que se indicaba que el porcentaje de unión tanto de MNPs-10@Dox como MNPs-8@Dox era similar debido a interacciones inespecíficas. Pero la variación del resultado pudo deberse a la influencia del fluoróforo FAM en la señal de emisión de la doxorrubicina, esto es debido a que la emisión del fluoróforo FAM se produce a 517 nm, manteniendo una cola emisión en disminución hasta 600 nm. Sabiendo que la doxorrubicina emite a 592 nm y su intensidad es mucho menos marcada que el fluoróforo, enmascarando la señal de doxorrubicina,

Influencia de la longitud de cadena de ADN" complementario

A continuación, se estudió la influencia de la longitud de la cadena de ADN" complementario (13, 11 y 9 pb, ver capítulo 3, apartado 3.2.5) en la intercalación de la doxorrubicina. Para ello se siguió el mismo procedimiento general de intercalación descrito en el apartado anterior con la plataforma MNPs-8 (con ADN"-FAM de 13, 11 y 9 pb). Tras la purificación, se procedió a la liberación de doxorrubicina aplicando calentamiento global (37, 50 y 90°C). Hay que destacar que en este ensayo se tomó como control MNPs-8@Dox con ADN" con 13 pb, para comparar liberaciones de las plataformas con menor longitud de cadena de ADN" complementario. Los resultados mostrados en la Figura 5 indicaban que la liberación de cantidad de doxorrubicina era mayor al aumentar la longitud de cadena, dato que indicaba una mayor intercalación en las dobles hebras, afianzando la hipótesis indicada con anterioridad que existía

intercalación en la doble hebra y que no se trataba solamente de una unión mediante interacciones inespecíficas. Para las tres longitudes de cadena se observó una liberación progresiva al aumentar la temperatura.

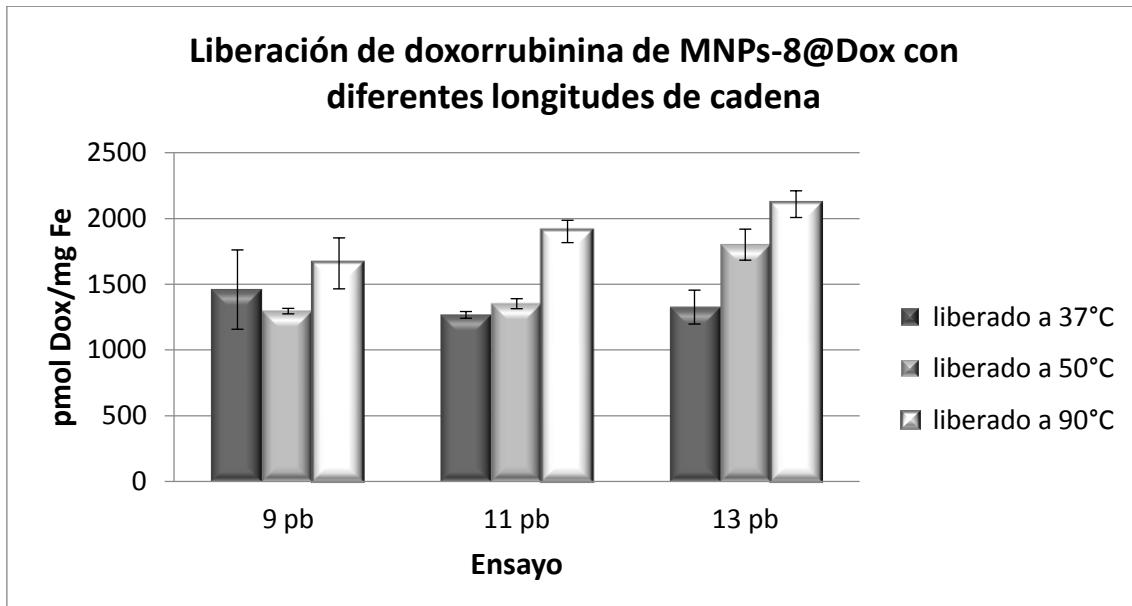


Figura 5. Representación gráfica de la liberación de doxorrubicina intercalada en las dobles hebras variando la longitud de cadena de ADN''-FAM complementario (13, 11, 9 pb) con diferentes longitudes de cadena a diferentes temperaturas

5.2.2.2. Liberación mediante la aplicación de hipertermia magnética

El siguiente estudio de liberación de doxorrubicina con las plataformas anteriormente mencionadas se llevó a cabo aplicando hipertermia magnética, y al igual que en el capítulo 4, se compararon ambos métodos de liberación. De esta manera se podía estimar la doxorrubicina liberada a nivel macroscópico (liberación mediante calentamiento global) y la obtenida a nivel de nanoescala (mediante hipertermia magnética). Se relacionó la cantidad de doxorrubicina liberada por ambos métodos, en el caso de calentamiento global, esta cantidad llevaba asociada una determinada temperatura, por lo que podíamos estimar la temperatura que había alcanzado la MNPs en su superficie, como se detalla en el capítulo 4 (apartado 4.2.2.2.1).

El procedimiento utilizado para la liberación de doxorrubicina mediante hipertermia magnética consistió en la aplicación de un campo magnético alterno con una frecuencia y campo fijas durante 30 minutos, midiendo la temperatura al comienzo y final de cada ensayo. Al igual que en los estudios descritos en el capítulo 4, se llevaron a cabo experimentos tanto sin como con mantenimiento de la muestra a una temperatura constante (37°C) en el medio mediante un baño termostatizado de

circuito cerrado. El procedimiento de separación de las muestras se llevó a cabo por centrifugación a 25000 x g, 20°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se cuantificó la doxorrubicina liberada mediante medidas de fluorescencia como en el caso de la liberación por calentamiento global.

En un primer ensayo se comparó la liberación de doxorrubicina de las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox manteniendo la temperatura constante en el medio o no durante la aplicación de hipertermia magnética. Los resultados obtenidos indicaron que la liberación de doxorrubicina era similar para la plataforma MNPs-10@Dox (63% de la cantidad de doxorrubicina que se intercaló, que correspondía a un 49,8%) tanto si se mantenía constante la temperatura, como si no. Para la plataforma MNPs-8@Dox se intercaló un 47.5%, de los cuales se observó fueron liberados un 53% en el caso de mantener @Dox manteniendo la temperatura constante. Si se comparaban las dos plataformas, se observó en las MNPs-10@Dox una liberación de doxorrubicina ligeramente superior a la obtenida con las MNPs-8@Dox cuando se mantenía constante la temperatura en el medio, y una diferencia mayor si no se controlaba la temperatura (Figura 6).

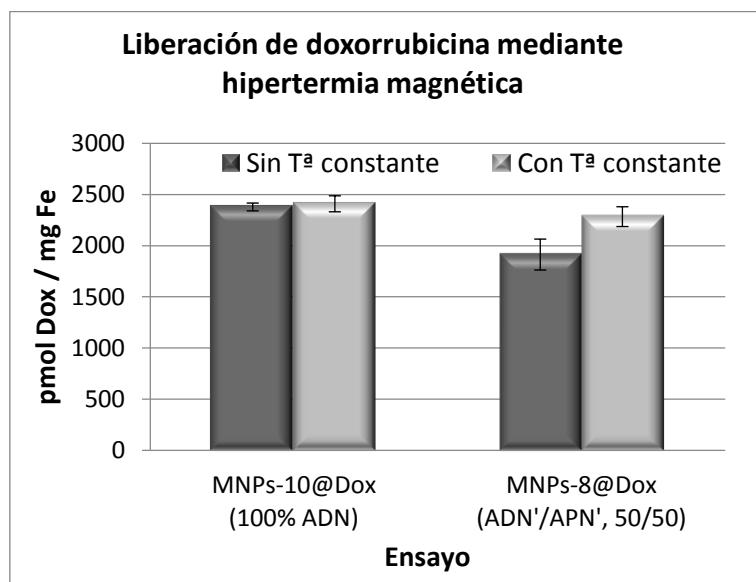


Figura 6. Representación gráfica de la liberación de doxorrubicina de las plataformas MNPs-10@Dox y MNPs-8@Dox aplicando hipertermia magnética.

Estos resultados se compararon con los obtenidos por calentamiento global (Tabla 4), y se pudo estimar la temperatura estimada que alcanzaba la MNPs en el medio y la cantidad liberada sin un aumento elevado de temperatura.

	Hipertermia magnética		Calentamiento global		
	Sin T^a constante T_f-T_i = ΔT (°C) 29.4-24.1 = 5.3	Con T^a constante T_f-T_i = ΔT (°C) 37.6-37.0 = 0.6	37°C	50°C	90°C
MNPs-10@Dox (100% ADN) pmol Dox/mg Fe	2378.6 ± 38.5	2409.1 ± 78.2	677.5 ± 108.8	578.0 ± 27.4	1042.0 ± 151.0
MNPs-8@Dox (ADN'/APN') (50/50) pmol Dox/mg Fe	1913.7 ± 151.1	2283.8 ± 96.6	538.4 ± 53.2	411.1 ± 157.8	1326.7 ± 222.7

Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos en la liberación de doxorrubicina por los dos métodos de liberación empleados para las plataformas MNPs-10@Dox y MNPs-8@Dox

Como sucedió en el estudio de la liberación del ADN''-FAM en el capítulo 4, en el caso de ambas plataformas (MNPs-10@Dox y MNPs-8@Dox) se observó una mayor liberación de doxorrubicina al aplicar hipertermia magnética (tanto con como sin mantenimiento de la temperatura constante en el medio) que en el caso de la liberación por calentamiento global. En la plataforma MNPs-8@Dox, al aplicar hipertermia magnética a temperatura constante (37°C), la cantidad de doxorrubicina liberada era 1.7 veces superior a la obtenida al calentar a 90°C. Esto ocasionó un aumento de temperatura en la superficie de las MNPs, que a diferencia del medio en el que se encontraba disuelta la MNPs no superó los 38°C.

Influencia del fluoróforo FAM en el ADN'' complementario

Otro parámetro a tener en cuenta en los estudios de liberación es la influencia del fluoróforo, ya que el fluoróforo debido a su naturaleza y su estructura pueden desfavorecer el procedimiento de intercalación; por ello, se planteó un ensayo donde las plataformas se encontraban hibridadas con ADN'' con y sin fluoróforo. El procedimiento de liberación y cuantificación fue el mismo que el descrito en el apartado anterior, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 5.

Hipertermia Magnética				
	ADN'' -sin fluoróforo		ADN''-FAM	
	Sin T ^a constante	Con T ^a constante	Sin T ^a constante	Con T ^a constante
MNPs-10@Dox (100% ADN)	1774.8 ± 26.5	2524,4 ± 57.3	2378.6 ± 38.5	2409.1 ± 78.2
MNPs-8@Dox (ADN'/APN') (50/50)	2095.4 ± 68.1	2954.3 ± 39.7	1913.7 ± 151.1	2283.8 ± 96.6

Tabla 5. Resultados de la liberación de doxorrubicina mediante hipertermia magnética de las plataformas MNPs-10@Dox y MNPs-8@Dox en presencia y ausencia de fluoróforo en la hebra de ADN'' hibridadas en las plataformas.

Como se puede observar, la cantidad de doxorrubicina liberada de la plataforma MNPs-8@Dox en ausencia de fluoróforo en las hebras de ADN complementario era superior a la liberada cuando la hibridación se había llevado a cabo con ADN''-FAM. En cambio, para la plataforma MNPs-10@Dox se observó una disminución de la cantidad liberada en ausencia de fluoróforo cuando en el ensayo no se mantenía la temperatura constante y aumentaba ligeramente sin fluoróforo cuando la temperatura del medio permanecía constante. Esto llevó a pensar que la doxorrubicina presente en la plataforma MNPs-10@Dox con fluoróforo se encontraba enmascarada por la señal residual del FAM, cuantificando una liberación que no se correspondía con la real. Además, también se ha descrito en bibliografía¹⁷ que la disposición de la doxorrubicina en la doble hebra de ADN puede dar lugar a una perdida en la intensidad de emisión.

5.2.3. Estudios preliminares de viabilidad celular y liberación *in vitro*

La capacidad de liberación de doxorrubicina de la plataforma funcional MNPs-8@Dox bajo el estímulo de hipertermia magnética se estudió *in vitro* en la línea celular HCT116 (células derivadas de carcinoma de colon humano). Asimismo, se realizó un estudio preliminar de la citotoxicidad de las MNPs en dos líneas celulares: MCF-7 (células derivadas de adenocarcinoma de mama humano).

5.2.3.1. Estudios de citotoxicidad

En la práctica no existen protocolos estandarizados para medir la citotoxicidad, por tanto, es necesario realizar ensayos con diferentes líneas celulares puesto que cada una de ellas puede presentar una respuesta diferente debido a su naturaleza o a la capacidad de reproducirse.¹⁸ En este trabajo se emplearon dos líneas celulares para estudiar la viabilidad celular utilizando el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), sal de tetrazolio que es transformada por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, reacción acompañada por un

cambio de color de amarillo a azul.¹⁹ Los experimentos fueron realizados incubando las dos líneas celulares durante 24 h tanto con las plataformas MNPs-6, MNPs-8 (Dy490) y MNPs-8@Dox en concentraciones crecientes (10 a 200 µg Fe/ml) como con doxorrubicina libre (0.05 a 20 µM). Tras la eliminación de las MNPs eliminaron las plataformas y la doxorrubicina mediante lavados con medio de cultivo celular, se añadió el reactivo MTT y se incubaron las células durante 24 h. Los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 550 nm. La Figura 7 muestra que tanto en la línea celular HCT116 como en la MCF-7 había una disminución progresiva de la viabilidad celular al aumentar la concentración de MNPs, llegando hasta una reducción de 35 – 40% en la viabilidad celular. Sin embargo, si se comparan las diferentes plataformas a una misma concentración, no se observan diferencias significativas entre las dos líneas celulares.

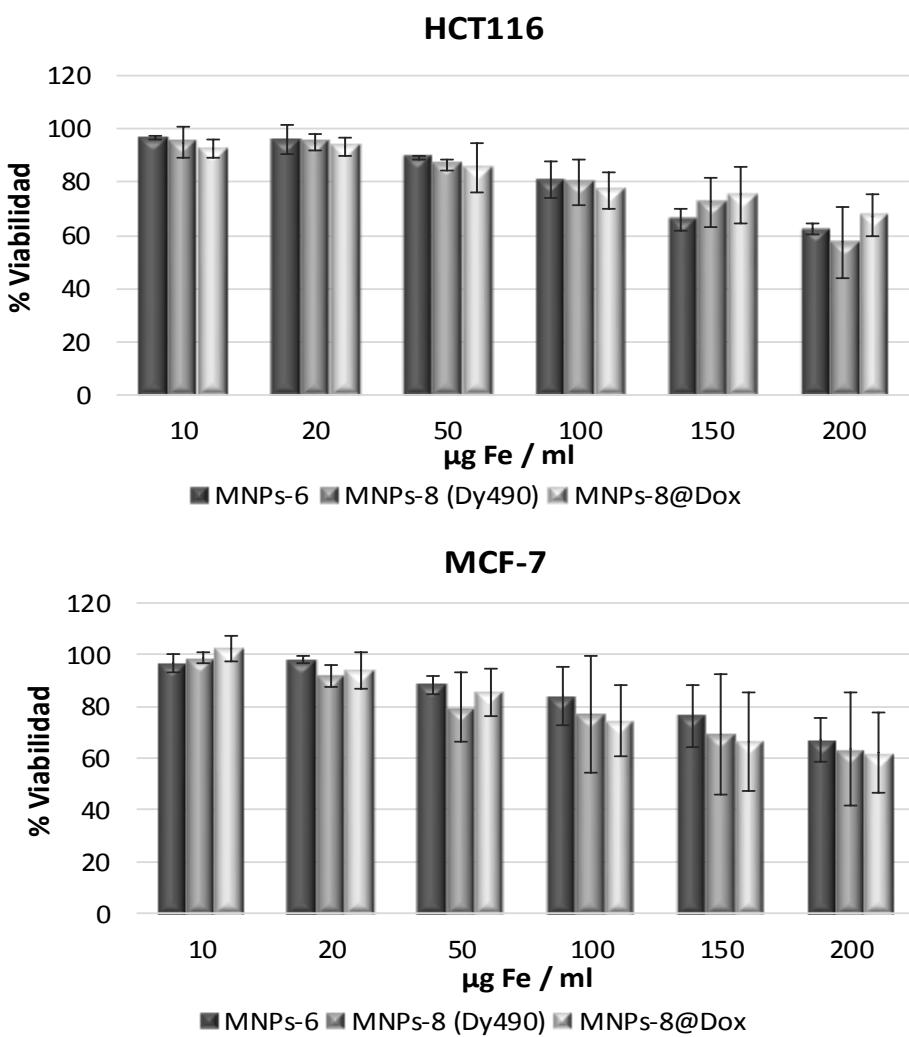


Figura 7. Representación de los ensayos de citotoxicidad mediante el reactivo MTT de las plataformas funcionales MNPs-6, MNPs-8(Dy490) y MNPs-8@Dox a diferentes concentraciones en las líneas celulares HCT116 y MCF-7

En los experimentos llevados a cabo con doxorrubicina libre, se observó una diferencia muy clara entre las dos líneas celulares. En las células MCF-7, si bien se observó una disminución progresiva en la viabilidad al aumentar la concentración de doxorrubicina, a la concentración más elevada ($20 \mu\text{M}$) las células seguían manteniendo un 50% de viabilidad. Por lo contrario, las células HCT116 experimentaron una disminución muy marcada de la viabilidad celular al aumentar la concentración de doxorrubicina, traducida en aproximadamente un 25 % de viabilidad celular a una concentración de $10 \mu\text{M}$ de doxorrubicina libre. Estos resultados demostraron que el mecanismo de acción de la doxorrubicina varía dependiendo del tipo de línea celular, siendo su toxicidad más elevada en la línea celular HCT116 (Figura 8).

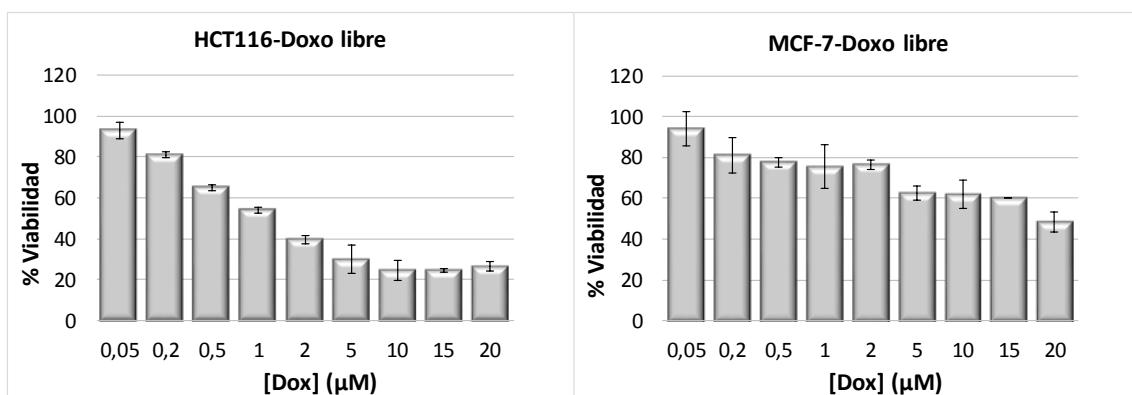


Figura 8. Análisis de la citotoxicidad de la doxorrubicina libre a diferentes concentraciones en las líneas celulares HCT116 y MCF-7

La comparación del efecto de la doxorrubicina libre con la presente en la plataforma MNPs-8@Dox a la misma concentración, nos permitiría estimar la capacidad de la plataforma para actuar como sistema de liberación controlada. En la situación ideal, las MNPs permitirían alcanzar el efecto terapéutico utilizando una dosis significativamente inferior de principio activo, aumentando así la eficacia del tratamiento y a la vez disminuyendo los efectos secundarios de la doxorrubicina libre. Para ello, se calcularon las concentraciones de doxorrubicina presente en la plataforma MNPs-8@Dox a las distintas concentraciones empleadas en el ensayo MTT (Tabla 6).

Dox (μ M) en MNPs-8@Dox	HCT116 (%) Viabilidad	MCF-7 (%) Viabilidad	Dox libre (μ M)	HCT116 (%) Viabilidad	MCF-7 (%) Viabilidad
0,023	92,5	102,5	0,05	93	94
0,045	93,5	94	0,2	81	81
0,114	85,5	85,5	0,5	65	77,5
0,227	77	74,5	1	54	75,5
0,341	75,5	66,5	2	39,5	76,5
0,454	67,5	62	5	30	62,5
			10	24,5	62
			15	24,5	60
			20	26,5	48,5

Tabla 6. Comparación de la viabilidad de dos líneas celulares HCT116 y MCF-7 con las plataformas MNPs-8@Dox y doxorrubicina libre a distintas concentraciones en los ensayos MTT a la concentración resaltada en negrita.

Al comparar la citotoxicidad de las MNPs-8@Dox a la máxima concentración estudiada (200 μ g Fe/ml, equivalente a una concentración 0.454 μ M de doxorrubicina) con la concentración correspondiente de doxorrubicina libre (0.5 μ M), se puede concluir que la viabilidad celular era muy similar para las células HCT116 (60% de viabilidad). Esta similitud de resultados pudo deberse a que la doxorrubicina no se hubiera intercalado en las hebras de ADN y se encontrara unida inespecíficamente en la cubierta de polímero de las MNPs. Esta hipótesis fue corroborada por los ensayos realizados en la liberación mediante calentamiento global e hipertermia, donde la doxorrubicina liberada en el control-2@Dox (estima la unión inespecífica de la doxorrubicina en la superficie) se asemejaba a la liberada en la plataforma MNPs-8@Dox. Además, si se comparaba el control con las plataformas MNPs-8(Dy490) y MNPs-8@Dox en el estudio de MTT, el porcentaje de viabilidad era muy similar, por lo que la toxicidad podía deberse a la plataforma misma y no a la doxorrubicina intercalada. Esta plataforma podía tener una mayor cantidad de doxorrubicina unida de manera inespecífica creando la toxicidad como se mostró en los resultados. En cuanto a las células MCF-7 era ligeramente superior el % de viabilidad en doxorrubicina libre que, en la plataforma, lo que afianzaba la teoría de que la plataforma tenía una citotoxicidad superior a la Dox libre por lo expuesto en este párrafo con las células HCT116.

5.2.3.2. Estudios preliminares de hipertermia magnética en células HCT116 con MNPs-8@Dox

Una vez estudiada la citotoxicidad de las plataformas MNPs-6, MNPs-8 (Dy490) y MNPs-8@Dox, además de la de doxorrubicina libre en las líneas celulares empleadas (HCT116 y MCF-7), se llevó a cabo un estudio preliminar de liberación de doxorrubicina de la plataforma MNPs-8@Dox mediante aplicación de hipertermia magnética en la línea celular HCT116. La elección de esta línea celular fue motivada por los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, los cuales mostraban que la doxorrubicina libre tenía un mayor efecto citotóxico en las células HCT116 que en las MCF-7. Para poder descartar el efecto de la aplicación del campo magnético en la viabilidad celular, se estudiaron tres condiciones experimentales diferentes: 1) Control (células sin incubar con MNPs y sin aplicación de hipertermia magnética, MNP-HT-); 2) Células sin incubar con MNPs, pero expuestas al campo magnético (MNP-HT+); 3) Células incubadas con MNPs y expuestas al campo magnético (MNP+HT+). Las células fueron sembradas en cubreobjetos e incubadas en una placa de 24 pocillos durante 48 h antes de incubar durante 90 min con MNPs-8@Dox (150 µg Fe/ml, concentración equivalente a 0.34 µM de doxorrubicina libre). Tras eliminar las MNPs mediante lavados con PBS, los cubreobjetos correspondientes a los experimentos 2 y 3 se introdujeron en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo celular a 37°C. La temperatura se mantuvo constante a 37°C durante todo el experimento utilizando un circuito cerrado de baño termostatizado de agua a 36.4°C (Figura 9). Tras la aplicación de un campo magnético (829 kHz y 20.10 kA/m) durante 30 minutos, se observó un aumento de temperatura de 36.4 a 38.6°C en el medio. Transcurrido el tiempo de aplicación de hipertermia magnética, se extrajeron los cubreobjetos y se volvieron a colocar en la placa de 24 pocillos en presencia de medio de cultivo fresco y se incubaron durante toda la noche. El efecto de la liberación de doxorrubicina se analizó transcurridas 24 h desde la aplicación de hipertermia magnética, mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) y el análisis de la morfología celular por microscopía óptica.

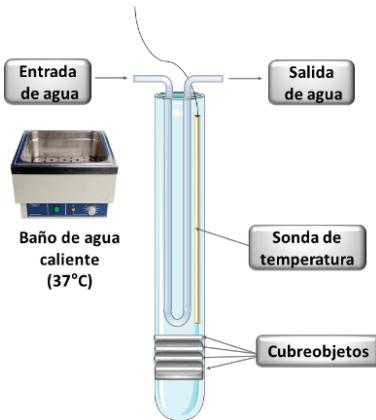


Figura 9. Esquema del diseño del experimento de HT *in vitro*

Estudio de viabilidad celular (MTT)

Los resultados obtenidos en el análisis de la viabilidad celular 24 h después de la aplicación de la hipertermia magnética demostraron la ausencia de muerte celular inducida por la liberación de doxorrubicina. Las viabilidades celulares observadas en los experimentos 2 y 3 fueron similares (aproximadamente 80%); la reducción en la viabilidad celular en comparación con la muestra control fue atribuida a la manipulación física de las muestras, hipótesis corroborada por las imágenes de microscopía óptica (ver el siguiente apartado).

	Absorbancia (muestra 1)	Absorbancia (muestra 2)	Media	% Viabilidad
1) Control - MNP-HT-	0.542	0.431	0.487	100%
2) MNP-HT+	0.27	0.490	0.380	78%
3) MNP+HT+	0.29	0.484	0.387	79%

Tabla 7. % de viabilidad celular mediante MTT tras la aplicación de hipertermia magnética

Ánalysis de la morfología celular (microscopía óptica)

La morfología celular se analizó tras la aplicación del campo magnético ($t=0$) y transcurridas 24 h, como se muestra en la Figura 10. Como se puede comprobar en las imágenes, no se aprecian alteraciones morfológicas que puedan ser indicativas de muerte celular atribuida a la liberación de la doxorrubicina de la plataforma MNPs-8@Dox. La disminución de la viabilidad celular observada por MTT tanto en el experimento 2 (MNP-HT+) como en el 3 (MNP+HT+) fue atribuida a la compleja manipulación de los cubreobjetos, ocasionando la muerte de las células situadas en los bordes del cubreobjetos debido al secado parcial de los mismos.

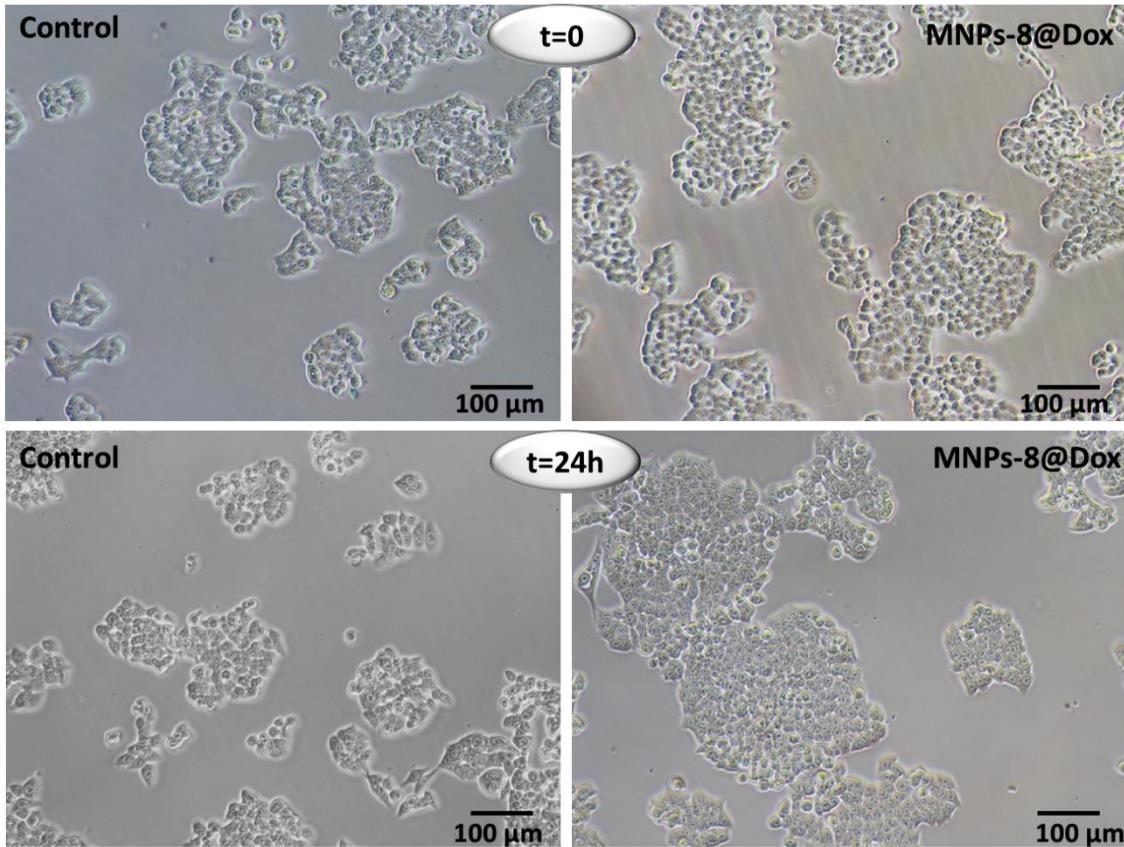


Figura 10. Imágenes de microscopía óptica de células HCT116 con y sin MNPs-8@Dox tomadas tras la aplicación del campo magnético (arriba: 0 h; abajo: 24 h).

5.3. CONCLUSIONES

En primer lugar, se ha estudiado la liberación de doxorrubicina en condiciones óptimas de funcionalización ADN'/APN' (50/50) de la plataforma funcional MNPs-8@Dox, mediante calentamiento global y localizado (hipertermia magnética), demostrando una mayor liberación en el segundo caso.

Los estudios de liberación de la doxorrubicina calentando a la temperatura de desnaturalización de los conjugados ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' han demostrado que, a temperatura fisiológica, la liberación del fármaco es mínima, si bien aumentando la temperatura se observó un incremento de la cantidad de doxorrubicina liberada. Se observó que la presencia del APN' en el sistema aumentaba la capacidad de intercalación con respecto a la existencia de sólo ADN'-ADN'', y que la presencia de fluoróforo no parece influir en la intercalación y liberación de doxorrubicina, pero si en el proceso de cuantificación.

Se han llevado a cabo estudios preliminares de citotoxicidad de la plataforma optimizada en dos líneas celulares MCF-7 y HCT116, observando una disminución de viabilidad similar a la doxorrubicina libre en las mismas concentraciones.

Finalmente, se ha realizado un ensayo de liberación de doxorrubicina mediante hipertermia magnética en células HCT116 incubadas con la plataforma funcional MNPs-8@Dox. Tanto los ensayos de viabilidad celular, como la observación de la morfología celular indicaron que no existía muerte celular que pudiera ser atribuida al efecto citotóxico de la doxorrubicina liberada.

5.4. MATERIALES Y METODOS

Los reactivos y disolventes que han sido empleados en la realización de este trabajo fueron adquiridos en casas comerciales (Sigma Aldrich, Acros Organics), salvo que se especifique lo contrario.

Las plataformas utilizadas en todos los ensayos son MNPs-6, MNPs-7, MNPs-8 y MNPs-10 optimizadas en el capítulo 3, con ADN' (5' CAGTCGCCAGCT 3') y APN' (ACCCAGTCGCCAAGC) y ADN''-FAM (5' FAM-AGCTTGGCGACTG 3'), salvo que se especifique lo contrario en cada caso.

Todos los ensayos que se describen a continuación fueron realizados por triplicado.

5.4.1 Intercalación de Doxorrubicina en MNPs-8 y MNPs-10

5.4.1.1. Procedimiento general de reacción

A cada eppendorf conteniendo las plataformas funcionales MNPs-8 y MNPs-10 y los controles (control-1 y 2), a una concentración de 0.2 mg Fe/ml en PBS 10 mM (pH = 7.4), se la adicionaron gota a gota 400 pmol de doxorrubicina (100 µM). Las muestras se mantuvieron en continua agitación durante 30 minutos y transcurrido el tiempo se centrifugaron a 25000 x g durante 1 h a 20°C. Los sobrenadantes se eliminaron y posteriormente se resuspendieron las plataformas en 400 µl de PBS 10 mM (pH = 7.4), se centrifugaron de nuevo en iguales condiciones y se eliminó de nuevo el sobrenadante. El procedimiento de purificación de las plataformas enumeradas en este párrafo se llevó a cabo 3 veces. Seguidamente se adicionó el volumen de PBS necesario para obtener una concentración de las plataformas de 0.132 mg Fe/ml. Los sobrenadantes de cada lavado se reservaron para cuantificar la cantidad de doxorrubicina intercalada (apartado 5.4.1.2). La liberación de doxorrubicina se llevó a cabo siguiendo los procedimientos de calentamiento global e hipertermia magnética descritos en el apartado 5.4.2. La cuantificación de la cantidad de doxorrubicina liberada de las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox, junto con las MNPs-6@Dox y MNPs-7@Dox (controles-1 y 2) se llevó a cabo mediante medidas de fluorescencia (ver apartado 5.4.2.3).

5.4.1.2. Cuantificación de la intercalación de Doxorrubicina

La cuantificación de la intercalación de doxorrubicina entre las doble hebras de ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' de las plataformas y controles utilizados, se llevó a cabo mediante medidas de espectroscopía de fluorescencia de los sobrenadantes del proceso de purificación. Los espectros se tomaron excitando la doxorrubicina a una longitud de onda $\lambda = 480$ nm y midiendo la emisión a $\lambda = 592$ nm. Los datos obtenidos fueron extrapolados a una recta de calibrado de muestras estándar. Los valores de intercalación fueron obtenidos en porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Unión Dox} = \left(\frac{\text{pmol Dox inicial} - X \text{ pmol sobrenadante}}{\text{pmol Dox inicial}} \right) \times 100$$

Las muestras estándar se prepararon tomando 400 pmol de Dox (100 μM) y diluyendo hasta 2 ml en PBS 10 mM (pH = 7.4) (Estándar 1, 5 μM). Seguidamente se realizaron las siguientes diluciones en PBS 10 mM (pH = 7.4): Estándar 2: (2.5 μM), Estándar 3: (1.25 μM), Estándar 4: (6.25×10^{-1} μM), Estándar 5: (3.125×10^{-1} μM), Estándar 6: (1.56×10^{-1} μM), Estándar 7 (7.8×10^{-2} μM)).

5.4.2. Métodos de liberación de doxorrubicina

La liberación de doxorrubicina de los controles (control-1@Dox y control-2@Dox) y de las muestras MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox, se llevó a cabo mediante calentamiento global e hipertermia magnética, de manera similar a la liberación de ADN'' complementario, capítulo 4 (ver apartado 4.4.2).

5.4.2.1. Liberación por calentamiento global

- I. Los controles (control-1@Dox y control-2@Dox) y las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox se analizaron por triplicado para cada temperatura empleada (37, 50, y 90°C)
- II. Para las plataformas MNPs-8@Dox hibridadas con 3 longitudes de hebras de ADN'' complementario (13, 11 y 9 pb) se aplicaron las mismas temperaturas de desnaturización (37, 50, 90°C).
- III. A las plataformas MNPs-8@Dox y MNPs-10@Dox, en las que el ADN'' complementario (13 pb) se encuentra o no marcado con fluoróforo (FAM) y se les aplicaron las temperaturas de liberación detalladas en el punto I de este apartado.

5.4.2.2. Liberación mediante aplicación de hipertermia magnética

La liberación de doxorrubicina, tanto en los controles como las plataformas mencionadas al inicio del apartado 5.4.2, se llevó a cabo aplicando un campo magnético alterno con una frecuencia de 829 kHz y una amplitud de 20.10 kA/m durante 30 minutos. Los ensayos se llevaron a cabo con y sin temperatura constante en el medio, de igual manera que en el capítulo 4 (apartado 4.4.2.2.)

5.4.2.3. Cuantificación de la liberación de Doxorrubicina

La cuantificación de la liberación de doxorrubicina en las diferentes plataformas se llevó a cabo mediante medidas de fluorescencia para ambos métodos (calentamiento global e hipertermia magnética).

La cantidad de doxorrubicina liberada fue calculada mediante la diferencia entre la cantidad de doxorrubicina unida y la cantidad liberada y fue expresada en porcentaje como muestra la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Dox liberada} = \left(\frac{\text{pmol Dox unida} - \text{pmol Dox liberada}}{\text{pmol Dox unida}} \right) \times 100$$

5.4.3. Estudios preliminares de viabilidad celular y liberación *in vitro*

5.4.3.1. Ensayos de citotoxicidad HCT116 y MCF-7

Los ensayos de toxicidad fueron llevados a cabo con las plataformas funcionales MNPs-6, MNPs-8, MNPs-8@Dox y doxorrubicina libre, calculando el porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Las líneas celulares empleadas fueron las MCF-7 (células derivadas de adenocarcinoma de mama humano) y HCT116 (células derivadas de carcinoma de colon humano). Todas las MNPs fueron filtradas en condiciones estériles usando filtros de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore) antes de emplearlas en los ensayos *in vitro*.

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 6000 células/pocillo (MCF-7) y 5000 células/pocillo (HCT116) en 200 µl de medio de cultivo. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C en medio de cultivo completo (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10 %), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y glutamina (2 mM), en atmósfera húmeda con 5 % CO₂. Tras 24 h, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con 200 µl de medio de cultivo con las plataformas funcionales MNPs-6, MNPs-8 (Dy490), MNPs-8@Dox, a diferentes concentraciones (10, 20, 50, 100, 150, 200 µg Fe/ml) y para la

doxorrubicina libre (0, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2, 10, 15, 20 µM) en 200 µl de medio de cultivo suplementado con 10 % de SFB. Tras 48 h de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se retiró el medio tras centrifugar las células, a 700 x g durante 25 minutos. Se añadieron 200 µl de medio de cultivo con 20 µl de MTT (5 mg/ml) en PBS. Tras 90 minutos de incubación a 37°C con 5 % de CO₂, se centrifugaron de nuevo las células y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 200 µl de DMSO y se mezclaron cuidadosamente con las células para disolver los cristales formados de azul de formazán. A continuación, se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Multiskan™ Go UV/Vis (*Thermo Scientific*) y mediante una relación de absorbancia se determinó el porcentaje de viabilidad (ver apartado 5.4.4.4). Los experimentos fueron realizados por triplicado y se repitieron dos veces. Los valores de absorbancia fueron corregidos con un blanco (medio de cultivo) y un control negativo (células no tratadas).

5.4.3.2. Aplicación de hipertermia magnética en HCT116

El ensayo de hipertermia magnética en células HCT116 se llevó a cabo usando la plataforma funcional MNPs-8@Dox a una concentración de 150 µg de Fe/ml. Todos los pasos descritos a continuación se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad.

Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos con cubreobjetos (12 mm de diámetro) a una densidad de 25000 células/pocillo (HCT116) en 300 µl de medio de cultivo. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C en medio de cultivo completo (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) suplementado con suero fetal bovino (10 %), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y glutamina (2 mM), en atmósfera húmeda con 5 % CO₂. Se sembraron 3 pocillos con las siguientes condiciones: 1) Control (células sin incubar con MNPs y sin aplicación de hipertermia magnética, MNP-HT-); 2) Células sin incubar con MNPs, pero expuestas al campo magnético (MNP-HT+); 3) Células incubadas con MNPs y expuestas al campo magnético (MNP+HT+). Tras 48h de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se retiró el medio de cultivo, y se adicionaron las MNPs-8@Dox (MNP+HT+, 150 µg de Fe/ml) en cDMEM o medio fresco (MNP-HT- y MNP-HT+) y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Tras eliminar las MNPs mediante lavados con PBS, los cubreobjetos correspondientes a los experimentos 2 y 3 se introdujeron en un tubo de ensayo contenido 6 ml de medio de cultivo celular a 37°C durante todo el experimento, a través de baño termostatizado de agua a 36.4°C. Se aplicó campo magnético (829 kHz y 20.10 kA/m) durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se trajeron los cubreobjetos y se volvieron a colocar en la placa de 24 pocillos en presencia de medio de cultivo fresco y se incubaron durante toda la noche.

El efecto de la liberación de doxorrubicina se analizó transcurridas 24 h desde la aplicación de hipertermia magnética, mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) (ver apartado 5.4.3.1). Las células (MNP-HT-), (MNP-HT+) y (MNP+HT+) se incubaron en la misma placa de 24 pocillos con 40 µl de cDMEM y 360 µl de MTT (5 mg/ml) durante 1 h. El porcentaje de viabilidad se determinó mediante las medidas de absorbancia de las muestras (ver apartado 5.4.4.4).

El análisis de la morfología celular se observó tras la aplicación de campo magnético ($t = 0$) y transcurridas 24 h por microscopía óptica.

5.4.4. Métodos de caracterización

5.4.4.1. Métodos de liberación de Doxorrubicina

La liberación de doxorrubicina se llevó a cabo mediante calentamiento global e hipertermia magnética y se cuantificó mediante medidas de fluorescencia, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 4.4.4.2 del capítulo 4.

5.4.4.2. Cuantificación de la fluorescencia

La fluorescencia de todas las muestras de doxorrubicina se midió de igual forma que en el capítulo 3 (apartado 3.4.6.1), con la salvedad que las muestras se excitaron a una longitud de onda de 480 nm, emitiendo a una longitud de onda de 592 nm.

5.4.4.3. Determinación de la concentración de hierro

La determinación de la concentración de hierro se llevó a cabo de igual forma que en el apartado 2.4.3 del capítulo 2.

5.4.4.4. Cálculo de la concentración de doxorrubicina en la plataforma para ensayos de MTT

Para calcular la concentración de Dox en la plataforma, a los 400 pmol de doxorrubicina iniciales, se les resto la doxorrubicina no intercalada, cuantificada midiendo los sobrenadantes de la plataforma por espectroscopía de fluorescencia, obteniendo 120 pmol de doxorrubicina. Con este dato y la cantidad de mg de Fe presentes en la muestra (0.0528 mg de Fe), se obtuvo la concentración de pmol de Dox/mg de Fe (2.27 pmol/µg de Fe). Esta concentración, fue multiplicada a las diferentes concentraciones empleadas en el ensayo expresada en mg de Fe/ml, obteniendo la concentración de doxorrubicina en µM en la plataforma funcionalizada. En la tabla se muestran los valores obtenidos.

pmol Dox inicial	pmol Dox unida (30%)	μg Fe	pmol Dox / μg Fe	MNPs-8@Dox (μg Fe/ml)	Dox (μM) en MNPs-8@Dox
400 pmol	120 pmol	52,8	2,27	10	0,023
				20	0,045
				50	0,114
				100	0,227
				150	0,341
				200	0,454

5.4.4.5. Cálculo del porcentaje de viabilidad celular

La viabilidad celular (%) se calculó como se muestra en la siguiente formula:

$$\%V = \left(\frac{Abs(MNPs + células + medio)}{Abs(células + medio) - Abs (medio)} \right) \times 100$$

Los resultados obtenidos se muestran como la media de los dos ensayos realizados con muestras por triplicado para las plataformas funcionales y por quintuplicado para la doxorubicina libre.

5.5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Javier Iñaki Idiago la realización de los ensayos *in vitro* descritos en este capítulo, así como al Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) de la Universidad de Zaragoza por el acceso a sus equipos de centrifugación.

5.6. REFERENCIAS

- (1) Mohan, P.; Rapoport, N. Doxorubicin as a Molecular Nanotherapeutic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 1959–1973.
- (2) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2014**, 1845, 84–89.
- (3) Minotti, G. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56, 185–229.
- (4) Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. A. Intercalation of Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue by DNA Duplex: Structural Features and Biological Implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 66, 144–150.

- (5) Takemura, G.; Fujiwara, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *49*, 330–352.
- (6) Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161–171.
- (7) Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, R. Doxorubicin Pathways: pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genomics* **2012**, *21*, 440–446.
- (8) Bodley, A.; Liu, L. F.; Israel, M.; Seshadri, R.; Koseki, Y.; Giuliani, F. C.; Kirschenbaum, S.; Silber, R.; Potmesil, M. DNA Topoisomerase II-Mediated Interaction of Doxorubicin and Daunorubicin Congeners with DNA. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5969–5978.
- (9) Pérez-Arnaiz, C.; Bustos, N.; Leal, J. M.; García, B. New Insights into the Mechanism of the DNA/doxorubicin Interaction. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1288–1295.
- (10) Sinha, B. K.; Mimnaugh, E. G. Free Radicals and Anticancer Drug Resistance: Oxygen Free Radicals in the Mechanisms of Drug Cytotoxicity and Resistance by Certain Tumors. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8*, 567–581.
- (11) Shafei, A.; El-Bakly, W.; Sobhy, A.; Wagdy, O.; Reda, A.; Aboelenin, O.; Marzouk, A.; El Habak, K.; Mostafa, R.; Ali, M. A.; et al. A Review on the Efficacy and Toxicity of Different Doxorubicin Nanoparticles for Targeted Therapy in Metastatic Breast Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 1209–1218.
- (12) Lübbe, A. S.; Alexiou, C.; Bergemann, C. Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting. *J. Surg. Res.* **2001**, *95*, 200–206.
- (13) Torchilin, V. P. Multifunctional Nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 302–315.
- (14) Iglesias, G. R.; Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Ramos-Tejada, M. M. Simultaneous Hyperthermia and Doxorubicin Delivery from Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2017**, *431*, 294–296.
- (15) Taratula, O.; Dani, R. K.; Schumann, C.; Xu, H.; Wang, A.; Song, H.; Dhagat, P.; Taratula, O. Multifunctional Nanomedicine Platform for Concurrent Delivery of Chemotherapeutic Drugs and Mild Hyperthermia to Ovarian Cancer Cells. *Int. J. Pharm.* **2013**, *458*, 169–180.
- (16) Box, V. G. S. The Intercalation of DNA Double Helices with Doxorubicin and Nagalomycin. *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, *26*, 14–19.

- (17) Lee, J. H.; Yigit, M. V.; Mazumdar, D.; Lu, Y. Molecular Diagnostic and Drug Delivery Agents Based on Aptamer-Nanomaterial Conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 592–605.
- (18) Díaz, B.; Sánchez-Espinel, C.; Arruebo, M.; Faro, J.; De Miguel, E.; Magadán, S.; Yagüe, C.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J.; *et al.* Assessing Methods for Blood Cell Cytotoxic Responses to Inorganic Nanoparticles and Nanoparticle Aggregates. *Small* **2008**, *4*, 2025–2034.
- (19) Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauwboer, B. J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J. C.; Pieters, R.; *et al.* Methods of in Vitro Toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 193–236.

Conclusiones

Durante el trascurso de este trabajo se han ido nombrando las conclusiones específicas en cada capítulo, aquí se van a describir las más relevantes.

En esta tesis se han sintetizado NPs magnéticas esféricas hidrófobas de 12 nm de diámetro mediante descomposición térmica de un precursor organometálico en un disolvente de alto punto de ebullición, favoreciendo la obtención de MNPs monodispersas, con una estrecha distribución de tamaños y elevada cristalinidad. Las MNPs fueron posteriormente recubiertas con un polímero anfifílico [poli (anhídrido maleico-*alt*-1-octadeceno) –PMAO] que además de estabilizar las MNPs en medio acuoso proporciona grupos funcionales para posteriores conjugaciones. La caracterización de las MNPs-1 demostró que las NPs sintetizadas en medio orgánico conservan su morfología y tamaño tras el paso de transferencia a medio acuoso, al igual que su comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente. Las medidas de SAR muestran la alta capacidad de absorber energía y transformarla en calor.

La funcionalización de las nanopartículas se ha llevado a cabo con un derivado de glucosa (4-aminofenil β-D-glucopiranósido) y hebras de ADN'/APN', modificando los porcentajes de estas hebras y las condiciones de reacción, llegando a su optimización (50/50) y posterior conjugación con su hebra complementaria (ADN'') para estimar la cantidad de ADN'/APN' unida covalentemente a las nanopartículas. Se realizaron estudios de estabilización de dicha plataforma, observando que únicamente las MNPs-6 funcionalizadas con glucosa tenían una estabilidad satisfactoria.

Una vez formado la plataforma funcional se desarrollaron unos estudios de la temperatura adecuada para la liberación controlada de las hebras conjugadas APN'-ADN'' y ADN'-ADN'' en disolución, así como las hebras conjugadas APN'-ADN'' y ADN'-ADN'' unidas a las MNPs-6, observando la influencia del tampón (PBS o Hepes 10 mM) utilizado, su concentración, así como las diferentes longitudes de las cadenas de ADN'' marcadas con fluoróforo y si se encuentran en disolución o en la plataforma funcional MNPs-8.

Se estudió la liberación de las hebras complementarias de ADN'' de diferentes longitudes (13, 11 y 9 pares de bases) marcadas con fluoróforo (FAM) y el fármaco (Dox), en condiciones óptimas de funcionalización ADN'/APN' (50/50) de la plataforma anteriormente mencionada, mediante calentamiento global y localizado (hipertermia magnética), demostraron mayores grados de liberación en el segundo caso.

Los estudios de intercalación y posterior liberación de la Doxorrubicina calentando a la temperatura de desnaturalización del conjugado ADN'/ADN'' y APN'/ADN'' demostraron que existe menor absorción inespecífica en nuestro sistema por lo que, en condiciones fisiológicas de temperatura, la liberación del fármaco es mínima, aumentando al incrementar la temperatura. Se observó que la presencia del APN' en el sistema aumentaba la capacidad de intercalación con respecto a la existencia de sólo ADN'-ADN''.

Los resultados obtenidos en el diseño de la plataforma de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ADN'/APN' (50/50) en condiciones óptimas y la posterior intercalación del fármaco (Dox) para la liberación mediante hipertermia magnética demostraron la optimización del sistema.

Se han llevado a cabo estudios preliminares de citotoxicidad de la plataforma optimizada en dos líneas celulares MCF-7 y HCT116, observando una disminución de viabilidad similar a la doxorrubicina libre en las mismas concentraciones.

Finalmente, se ha realizado un ensayo de liberación de doxorrubicina mediante hipertermia magnética en células HCT116 incubadas con la plataforma funcional MNPs-8@Dox. Tanto los ensayos de viabilidad celular, como la observación de la morfología celular indicaron que no existía muerte celular que pudiera ser atribuida al efecto citotóxico de la doxorrubicina liberada.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
λem	Longitud de emisión
λexc	Longitud de excitación
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMF	Campo Magnético Alterno
APN	Ácido Péptidonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMEM	<i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímida
Glc	4-aminofenil β-D-glucopiranósido
Hc	Coercitividad
HEPES	Ácido 2-[4-hidroximetil piperazina-1-il] etanosulfónico
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MNPs	Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro
Mr	Magnetización remanente
Ms	Magnetización de saturación
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Tampón fosfato salino

Abreviaturas

PMAO	Poli (anhídrido maleico- <i>alt</i> -1-octadeceno)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAR	Tasa de absorción específica
SDS	Sodio dodecilsulfato
SQUID	<i>Superconducting quantum Interference devide</i>
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
t.a	Temperatura ambiente
TGA	Análisis Termogravimétrico
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
Tf	Temperatura final
Ti	Temperatura inicial
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
Ttotal	Temperatura total de desnaturización
UV-Vis	Ultravioleta-visible