Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA FUNCIONALIZADAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Autor: Ana Arranz Sordo

Tutor: Dra. Sandra Sánchez Salcedo

Convocatoria: Junio 2016

ÍNDICE

Página

Resúmen……... 3

Introducción y Antecedentes……..... 4

Objetivos……..…. 9

Metodología……..…… 9

Ensayo 1…… 12

Ensayo 2…… 12

Ensayo 3……..…. 13

Resultados y Discusión……... 14

Conclusiones……... 18

Bibliografía……..…… 19

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

RESÚMEN

Las nanopartículas (NPs) de sílice mesoporosa son nanomateriales de gran utilidad ya que tienen la capacidad de contener, transportar y liberar sustancias biológicamente activas de forma modificada por la mediación de nanoválvulas que regulan su salida como reacción frente a un estimulo. Los nanocristales magnéticos presentan efectos hipertérmicos cuando son sometidos a un campo magnético oscilante que actúa como estímulo externo. Este trabajo se centra en el diseño de un sistema en el que se combinan ambos materiales (NPs y nanocristales magnéticos) junto con una nanoválvula sensible a la temperatura, por lo que se obtiene un sistema único para el transporte de fármacos.

En este caso se han utilizado nanocristales de óxido de hierro dopados con zinc y un material mesoporoso de sílice con un elevado número de grupos silanol en la superficie (MCSNs) para diseñar un sistema de transporte de fármacos con liberación controlada. Este sistema diseñado no es invasivo e irá cargado de un fármaco antitumoral que será liberado bajo el control de un estímulo externo.

Una vez sobre el tejido tumoral, al aplicar sobre el sistema de transporte un campo magnético alterno, los nanocristales generan de forma local calor (42 – 47 ºC) provocando la apertura de las nanoválvulas y permitiendo la liberación del fármaco cargado sobre el tumor donde debe ejercer su acción. El diseño de estos nanotransportadores está pensado para el tratamiento de tumores sólidos y aplicaciones diagnósticas.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El desarrollo de nuevos nanotransportadores, que son capaces de transportar y liberar compuestos terapéuticos en tejidos específicos dañados de manera selectiva y controlada, está ganando importancia entre la comunidad científica. Este tipo de dispositivos tienen gran utilidad terapéutica, como puede ser en el campo de la oncología, ya que se trata de patologías tratadas con fármacos de elevada toxicidad y que generan en el paciente numerosos efectos adversos[1].

Los nanomateriales inorgánicos presentan grandes ventajas comparados con sus equivalentes biológicos como las proteínas, péptidos o anticuerpos, incluída su elevada estabilidad térmica, química y mecánica en condiciones fisiológicas. También presentan elevada biocompatibilidad pero tienen relativamente bajos ratios de degradación antes de ejercer su acción terapéutica[2].

Entre los diferentes materiales que pueden componer dichos nanotransportadores, las nanopartículas de sílice mesoporosa son unos de los materiales más prometedores debido a sus interesantes propiedades como la elevada capacidad de carga, su biocompatibilidad, facilidad de producción y el alto grado de ajuste que tiene respecto a la morfología, tamaño y diámetro del poro para cargar de fármaco y liberarlo. Además, presentan alta densidad de grupos silanol en su superficie, la reactividad de estos grupos es adecuada para la incorporación de una amplia variedad de grupos funcionales y ligandos específicos para el reconocimiento de células tumorales y su acción sobre ellas.

Estas matrices porosas tienen excelentes propiedades texturales y estructurales, siendo capaces de albergar una elevada carga de fármacos que posteriormente serán liberados sobre los tejidos diana de manera controlada. Estos materiales han demostrado una excelente reactividad en su superficie y, por tanto, pueden ser funcionalizados con moléculas de diferentes tamaños, formas y funciones con capacidad de respuesta frente a un estímulo provocando un cambio en sus propiedades y, como consecuencia, se producirá la liberación controlada del fármaco cargado en las NPs[1].

Las nanopartículas de sílice mesoporosa pueden ser sintetizadas fácilmente a gran escala presentando gran variedad de formas y superficies funcionalizadas utilizando diferentes estrategias.

Es muy importante que la unión de las nanopartículas sobre los tejidos diana sea de forma selectiva, cuanto mayor sea la selectividad, menores serán los efectos secundarios del

tratamiento, ya que los tratamientos oncológicos convencionales son muy agresivos, con este tipo de sistemas diseñados, al presentar una liberación tan controlada y selectiva del fármaco, se reduciría dicha agresividad frente a los tratamientos convencionales, porque entre otras cosas se evita la liberación inespecífica del fármaco sobre el tejido sano. Esta acción selectiva sobre los tejidos diana puede ser inespecífica, específica o una combinación de ambas.

La acción inespecífica sobre los tejidos tumorales se debe al fenómeno conocido como "efecto EPR" (Enhanced Permeability and Retention). El rápido crecimiento de los tumores sólidos se atribuye a la presencia de huecos o defectos en los vasos sanguíneos tumorales, lo cual facilita la permeabilidad y el pobre drenaje linfático en el tejido, lo que favorece la retención en el mismo. Esta mayor permeabilidad y retención favorece la acumulación preferente de NPs superiores a 50 kDa en el intersticio del tumor sólido permaneciendo en ese lugar durante mucho tiempo y aumentando sus concentraciones en el intersticio. El "efecto EPR" se está convirtiendo en el estándar de oro para el diseño de este tipo de tratamientos. Para conseguir una unión inespecífica con éxito hay que tener en cuenta tres factores: el tamaño de partícula, la forma de la partícula y las características de la superficie.

La partícula debe tener un diámentro de, al menos, 10 nm para evitar el aclaramiento renal ya que si no sería directamente eliminado, partículas mayores de 400 nm no pueden difundir hacia el intersticio del tumor en cantidades suficientes como para alcanzar las dosis terapéuticas necesarias. Por tanto, el tamaño óptimo de partícula para garantizar un elevado tiempo de circulación e incrementar la acumulación en el intersticio tumoral y su captación celular es de 50 a 300 nm.

La superficie de la nanopartícula es lo primero que entra en contacto con el medio biológico. Se trata de modificar las nanopartículas de sílice mesoporosa para incrementar lo máximo posible el tiempo que permanecen en circulación para garantizar la acumulación en el tumor. El fin último, es tratar de minimizar la opsonización generada por el sistema inmune ya que si fuesen opsonizadas no llegarían a ejercer su acción en el tejido diana. Decorar la superficie externa de las nanopartículas con polímeros hidrofílicos, como polietilenglicol (PEG) y sus derivados, es una buena estrategia que confiere a las NPs propiedades adecuadas. Las partículas decoradas con PEG mejoran su estabilidad en el medio biológico. Estudios *in vivo* han demostrado que las nanopartículas de sílice mesoporosa PEGiladas disminuyen su retención en el hígado, bazo o tejidos pulmonares, lo cual incrementa su semivida plasmática y disminuye la biodegradación.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Existen ciertas limitaciones respecto a la unión inespecífica de los tejidos tumorales, hay que tener en cuenta que el "efecto EPR" no es universal de todos los tipos de tumores, tanto el grado de vascularización tumoral como la porosidad del tumor pueden variar con el tipo de tumor y estado en el que se encuentra. Además, el hecho de PEGilar las NPs para evitar la opsonización de las mismas implica, por otra parte, que disminuya la interacción de las NPs con la superficie de las células tumorales.

Sin embargo, la presión intersticial del fluido en los tumores sólidos es la mayor limitación que presenta este tipo de unión. Dicha presión es mayor en el centro del tumor y conforme va aumentando de tamaño éste. Esa presión intersticial puede impedir la penetración de las NPs extravasadas y en algunos casos puede incluso promover la intravasación de las NPs al torrente sanguíneo de nuevo. Esto va, por tanto, asociado a una falta de efecto terapéutico y puede provocar toxicidad sistémica, además de permitir a las células tumorales desarrollar resistencia a algunos fármacos. Una de las estrategias para superar estas limitaciones consiste en fijar a la superficie de las NPs moléculas que las funcionalicen.

La acción específica sobre los tejidos tumorales permite que las nanopartículas de sílice mesoporosa se unan de forma específica a células diana a través de una unión ligando-receptor mediada por endocitosis y posterior liberación del fármaco dentro de la célula.

Este tipo de unión se produce porque las nanopartículas llevan fijo en la superficie un ligando específico que será reconocido por las células tumorales de interés. Los ligandos son elegidos para que se unan a la superficie de moléculas o receptores sobreexpresados en órganos, tejidos, células u orgánulos afectados. Los ligandos más comunmente utilizados son anticuerpos, proteínas, péptidos, optámeros, sacáridos y pequeñas moléculas, como vitaminas.

Proporcionando a las nanopartículas de sílice mesoporosa la capacidad de unión específica al tejido diana, es considerada una estrategia complementaria al "efecto EPR" para aumentar la eficiencia de la nanoterapéutica del cáncer.

La capacidad de unión no depende únicamente de la abundancia y función de los receptores sobreexpresados en las células, sino también de la cantidad de ligandos que presentan las NPs[2].

Una vez en el interior del organismo las nanopartículas cargadas con el fármaco necesario deben liberarlo en el tejido diana para que éste ejerza su efecto, esa liberación puede ser controlada por la respuesta a ciertos estímulos tanto externos como internos.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

El material mesoporoso de sílice tipo MCM-41 tiene una red porosa compuesta por poros paralelos sin conexión entre ellos con un área superficial de entre 500 y 1000 m^2/g, gracias a esto es posible la síntesis de sistemas de transporte de fármacos con "liberación cero" antes de llegar a la zona de actuación. Así se evita la liberación prematura del fármaco cargado en el interior del poro que está bloqueado por nanoválvulas de diferentes materiales que pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos[3].

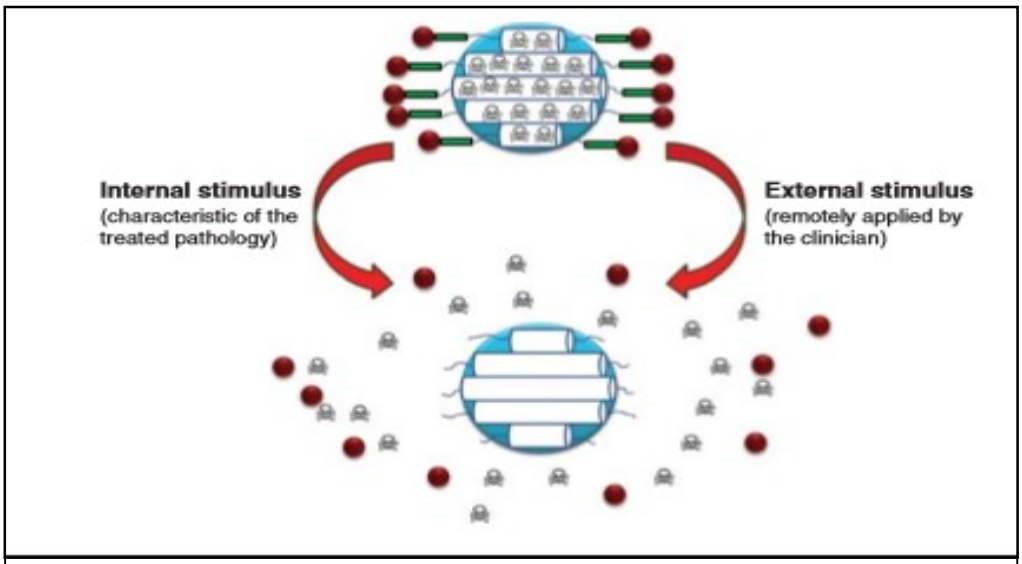

Figura 1[2]**.** Representación esquemática de nanopartículas mesoporosas de sílice con respuesta a estímulos internos y externos.

El comportamiento frente a la respuesta de estímulos puede ser llevado a cabo por la formación de diferentes enlaces alrededor de la superficie de la NP y la variación de la física o química de dichas nanoválvulas como respuesta al estímulo. Estos nanotransportadores pueden transportar el fármaco hasta el tejido diana y una vez allí, en presencia de ciertos estímulos (internos o externos) se producirá la liberación del fármaco transportado, produciéndose un mejor control de la dosis administrada.

Los estímulos internos serían las variaciones del pH, reacciones Redox, la acción de determinadas enzimas y acumulación de diferentes sustancias biológicas.

Las variaciones de pH son bastante comunes, ya que diferentes patologías como el cáncer o procesos inflamatorios sufren cambios de pH durante su evolución, dicha variación de pH provocaría la apertura de la nanoválvula y posterior liberación del fármaco cargado; las reacciones Redox se deben al desequilibrio entre las especies reductoras (como el glutation) fuera y dentro de las células y también entre tejidos sanos y tejidos tumorales y, como en todo sistema biológico, la presencia y acción de determinadas enzimas intervienen en muchos de los procesos endógenos, puesto que determinadas patologías cursan con la sobreexpresión de

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

ciertas enzimas (como las metaloproteasas) que participan en la progresión tumoral y metástasis; cabe mencionar también que el acúmulo de ciertas especies químicas y lípidos fusogénicos en tejidos anómalos son empleados como estímulos internos para la liberación controlada del fármaco en el tejido diana.

De gran importancia y utilidad son también los estímulos externos como son la luz, la temperatura y susceptibilidad a sus variaciones y la exposición frente a un campo magnético.

La luz permite un mejor control de la administración del fármaco porque puede ser fácilmente focalizada en pequeñas regiones reduciendo efectos adversos en zonas cercanas a la afectada; la temperatura y las variaciones de la misma utilizando diferentes gradientes es una buena técnica para una liberación controlada; por último el uso del campo magnético como estímulo externo para la liberación del fármaco, tiene una estrecha relación con las variaciones de temperatura ya que influyen en gran medida[4].

En nuestro caso, se han diseñado nanopartículas mesoporosas magnéticas de sílice con óxido de hierro/zinc embebido (MCSNs), funcionalizadas en su superficie externa con nanoválvulas sensibles a un campo magnético oscilante. Las NPs diseñadas liberarán el fármaco cuando se vean sometidas a un campo magnético oscilante una vez se encuentren en el tumor sólido a tratar. Esto se basa en que la encapsulación de las partículas magnéticas que tienen una matriz de sílice es capaz de generar una energía térmica produciéndose el efecto de hipertermia bajo la aplicación de un campo magnético oscilante, y por tanto el efecto de hipertermia y la aplicación del campo magnético favorecen la apertura y consiguiente liberación controlada del fármaco cargado sobre el tumor a tratar de manera localizada.

Se ha demostrado que el alto magnetismo de las nanopartículas férricas puede ser modulado muy eficazmente y llevado acabo por la presencia de un dopaje con zinc controlado. El adecuado dopaje de estas nanopartículas de óxido de hierro con zinc puede suponer un aumento de hasta catorce veces el contraste en Resonancia Magnética por Imagen (MRI) y hasta cuatro veces el calor disipado cuando se aplica el campo magnético oscilante respecto de las NPs convencionales de óxido de hierro (sin dopar), de manera que es posible aumentar la eficacia del sistema con una menor dosis en el tratamiento gracias a la hipertermia generada. Cabe añadir, que estas NPs no presentan toxicidad, por lo que podría implicar una gran mejora y avance en la actualidad para los diagnósticos, tratamientos y otro tipo de estudios como los de los mecanismos de acción celular .

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo, se basa en la combinación de las ventajas de las nanopartículas de sílice mesoporosa con nanoválvulas con aquellas partículas magnéticas de óxido de hierro y zinc, para crear una nueva generación de sistemas de transporte de fármacos que responde a la activación por calor para el tratamiento de tumores sólidos.

Se tratará de sintetizar MCSNs de tamaño y volúmen suficiente para que puedan ser cargadas con la cantidad necesaria de fármaco antitumoral y que se libere de forma controlada sobre el tejido diana.

Dichos sistemas se funcionalizarán con nanoválvulas sensibles a campos magnéticos oscilantes. Para ello, la nanoválvula elegida no se abre por sí misma en el sistema biológico para favorecer así que llegue al tejido diana la dosis completa de fármaco y se eviten daños y efectos adversos en tejidos sanos. Presenta una estabilidad térmica a temperatura ambiente y empieza a activarse cuando aumenta la temperatura como consecuencia de encontrarse sometida a un campo magnético (CM).

Una vez sintetizado y funcionalizado el nanosistema será muy útil para el tratamiento de tumores sólidos, sobre los cuales se podrá liberar la dosis íntegra de forma controlada y localizada sobre el tejido tumoral al responder frente al estímulo externo que provocará dicha liberación.

METODOLOGÍA

Las nanopartículas dopadas con ion de Zn^{2+} han sido sintetizadas utilizando el método desarrollado por Jang et al[5]. La síntesis típica para producir nanopartículas de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ ha sido la siguiente: $ZnCl_2$ (30 mg), $FeCl_2$ (40mg), y $Fe(acac)_3$ (353 mg) son introducidos en un matraz de fondo redondo de tres bocas en presencia de surfactantes (ácido oleico y oleilamina), todo ello disuelto en octil éter. La mezcla de reacción fue calentada a 300 ºC durante 1 hora y los productos de reacción fueron enfriados a temperatura ambiente.

Tras la adición de etanol, precipitó un polvo negro que fue aislado por centrifugación. Las nanopartículas aisladas fueron dispersas en un disolvente como el tolueno. Las nanopartículas siguiendo este protocolo deberían tener un tamaño de 15 nm con una estrecha distribución de tamaño ($\sigma < 5\%$). De esta forma, ya estarían sintetizados los nanocristales de óxido de hierro dopados con zinc.

Los nanocristales de óxido de hierro dopados con zinc fueron disueltos en cloroformo a una concentración de 50 mg/mL. Un mililitro de dicha disolución fue añadido a una solución de 100 mg de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB, Aldrich, 95%) en 5 mL de agua. La mezcla fue sonicada y el cloroformo se evaporó de la solución con una agitación rápida.

La solución acuosa estabilizada de CTAB-nanocristales de óxido de hierro dopados con zinc fue añadida a una solución de 43 mL de agua destilada a 80 ºC con 350 µL de NaOH 2.0 M, y 500 µL de tetraetil ortosilicato (TEOS, Aldrich, 98 %) fueron añadidos lentamente. Tras dos horas de rápida agitación a 80 ºC, el núcleo magnético de nanopartículas de sílice fue recogido por centrifugación y seguidamente se lavó con etanol y agua.

El CTAB se eliminó mediante la dispersión de los materiales sintetizados en una solución de 133,3 mg de nitrato de amonio (Fisher) y 50 mL de etanol 95%. Esta mezcla fue calentada a 60 ºC durante 15 minutos, posteriormente las partículas fueron recogidas por centrifugación y lavadas con etanol. La completa eliminación del surfactante fue verificada por espectroscopía infrarroja.

Para hacer posible la monitorización óptica de las nanopartículas, en las células se funcionalizaron las NPs con moléculas fluorescentes, moléculas de isocianato de fluoresceína, que fue anclado al entramado de sílice mesoporosa. 3mg de isocianato de fluoresceína (FITC, Sigma, 90%) fueron disueltos en 1 mL de etanol, y posteriormente se añadieron 12 µL de 3-aminopropiltrietoxisilano (3-APTES, Aldrich, 98%). Esta solución se hizo reaccionar durante 2 horas bajo atmósfera de nitrógeno, y posteriormente se añadió a una solución acuosa de hidróxido de sodio a 80 ºC. Tras 10 minutos, se añadió la solución de CTAB-ZnNC, y se siguió el mismo procedimiento que el ya citado. Las partículas marcadas tienen gran utilidad en estudios biológicos para monitorizar el sistema de liberación activado por la aplicación de un campo magnético en células de cáncer de mama (MDA-MB-231 cells).

Otra de las fases importantes de la síntesis de las NPs es el anclaje de las nanoválvulas al sistema. Los nanocristales de óxido de hierro dopados con zinc se introducen en el núcleo de cada una de las nanopartículas de sílice, posteriormente, la base de la fibra molecular es ancalda a la superficie de la nanopartícula.

Después, la estructura se carga con el fármaco en cuestión y se tapa para completar el sistema. Una vez se tiene el sistema completo, la liberación del fármaco de forma localizada se puede realizar utilizando un sistema de calentamiento de la estructura al someterla a un campo magnético oscilante.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

La nanoválvula fue anclada por una reacción a reflujo de 100 mg del núcleo magnético de las nanopartículas de sílice con $4x10^{-4}$ moles de N-(6-N-aminohexil)-aminoetil trietoxisilano en tolueno, la reacción se mantuvo durante toda una noche. Las partículas fueron recogidas por centrifugación y lavadas con metanol.

Para cargar las nanopartículas con las moléculas del fármaco o de marcador, fueron bañadas en una solución de fármaco o marcador (Doxorrubicina o Rodamina B) durante 24 horas para cargar la estructura mesoporosa por difusión.

A la solución a cargar se le añadió una solución que contenía 80 mg de Curcubit [6] uril (CB [6]) en 15 mL de HCl 1 mM. La CB [6] une electrostáticamente la fibra molecular a la superficie de la nanopartícula de sílice con el interior de 1 nm de la cavidad cíclica de CB [6]. De esta manera ya se tiene la nanopartícula cargada de fármaco o marcador y con la nanoválvula anclada.

La reacción de cerrado continuó durante 3 días, seguida de la recolección de las nanopartículas ya cargadas por centrifugación y posteriormente lavadas con agua hasta que el sobrenadante se encontró libre de fármaco o marcador que haya podido quedar adherido a la superficie de las NPs[6].

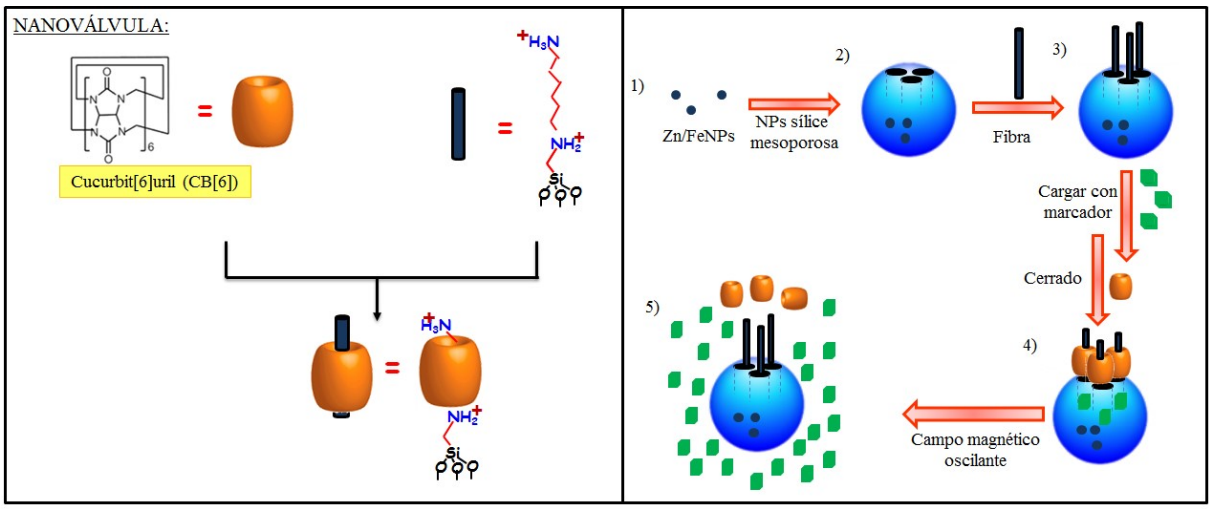

Figura 2. Síntesis de las MCSNs siguiendo el método desarrollado por Jang et al[5]. (1) Las partículas de Zn se posicionan en el núcleo de la NP de sílice mesoporosa (MCSNs). (2) La amina se ancla a la superficie. (3) Las MCSNs se cargan con el marcador (4) para completar el sistema se cierra con la nanoválvula. (5) Ante un estímulo externo (CM) el contenido cargado en el interior se libera en el medio celular.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Una vez sintetizadas las MCSNs se relizaron diferentes ensayos modificando diferentes factores para estudiar la respuesta de las nanopartículas.

Ensayo 1

El sistema completo (con núcleo magnético) de liberación activado por la aplicación de un campo magnético oscilante, fue ensayado para determinar si el calor producido por un campo magnético era capaz de permitir la apertura de las nanoválvulas de las NPs funcionalizadas provocando la liberación de la sustancia fluorescente contenida en ellas. Para llevar a cabo este experimento, a temperatura ambiente sobre las MCSNs se aplicó un campo magnético oscilante lo cual aumentó la temperatura del núcleo magnético y la liberación de la sustancia fluorescente se produjo en función del tiempo. La fuente de calor en este caso es interna generada gracias a la activación del núcleo magnético por la aplicación de un campo magnético oscilante (estímulo externo).

Ensayo 2

Otro experimento control consistió en someter a un campo magnético oscilante NPs que no contenían nanocristales magnéticos en el núcleo. En este experimento, las partículas no aumentan su temperatura y no se observó liberación del marcador.

Los experimentos magnéticos fueron llevados a cabo de la siguiente manera. Las MCSNs dispersas en agua (1mg/mL) se introdujeron en una bobina de cobre refrigerado, la cual producía un campo magnético alterno con un rango de frecuencia de 500 kHz y una amplitud de hasta 37,4 kAm^{-1}.

Para el experimento termostatizado la solución muestra debe ser conservada a 0 ºC mientras el campo magnético está siendo aplicado. La temperatura se mide con un termómetro colocado en el centro de la muestra.

La cantidad de marcador liberada por calentamiento magnético se midió de la siguiente manera. Se cogió una pequeña alícuota (10 µL) de la solución y la fluorescencia se midió con un espectrofotómetro fotoluminiscente. De este experimento se obtiene el perfil de calentamiento de las MCSNs en agua.

Cuando se disolvieron 10 mg de MCSNs en 1 mL de agua y se expusieron a un campo magnético oscilante, la temperatura de la disolución aumentó en función del tiempo al que estuvo siendo expuesta dicha muestra frente al campo magnético aplicado. Dicho aumento de temperatura es progesivo hasta que se alcanza un máximo de unos 52 ºC al cabo de 15

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

minutos de exposición, a partir de ese momento esa temperatura permanece constante durante los 60 minutos de duración del experimento.

Para las aplicaciones terapéuticas es importante tener en cuenta que la apertura de la nanoválvula es el resultado de un incremento de la temperatura interna de dicha nanopartícula o un incremento de la temperatura en el ambiente en el que se encuentra la partícula en cuestión.

Para determinar si el aumento de temperatura interna solo provoca la apertura de la nanoválvula se cogió una muestra de MCSNs y se conservó a 0 ºC bajo un campo magnético oscilante. Las MCSNs fueron activadas al aplicarles durante 1 minuto un campo de corriente alterna.

Ensayo 3

Para estudiar las MCSNs *in vitro*, se realizó un test de hipertermia con células de cáncer de mama (MDA-MB-231). Las células fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) con un suplemento de 10% de serum fetal bovino (Invitrogen) y 25 mM HEPES. Las condiciones de cultivo fueron: 37 ºC en 5% de CO_2.

Una solución de 50 µg/mL de MCSNs en 1x Tampón salino de fosfato de Dulbecco (Sigma-Aldrich) fue tratada con células MDA-MB-231 para tener un cultivo celular en una placa de ocho pocillos (2,5 x 10^4 células/mL por pocillo). 24 horas después de la transfección de MCSNs, el cultivo de células de cáncer de mama MDA-MB-231 fue lavado tres veces con 1x Tampón salino de fosfato de Dulbecco.

La placa de ocho pocillos se colocó dentro del sistema de campo magnético alterno descrito anteriormente. Tras 5 minutos de aplicación del campo magnético, se mide la viabilidad celular con Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo co.). Primero, la suspensión de células (100 µL/pocillo) se inocula en una placa de 96 pocillos, y la placa es pre-incubada en un incubador humidificado a 37 ºC, 5% CO_2. Después, 10 µL de solución de CCK-8 se añaden a cada pocillo de la placa y se incuba durante 3 horas en la incubadora. Finalmente se mide la viabilidad celular a 450 nm con WST-8 reducido usando un lector de microplacas[6].

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

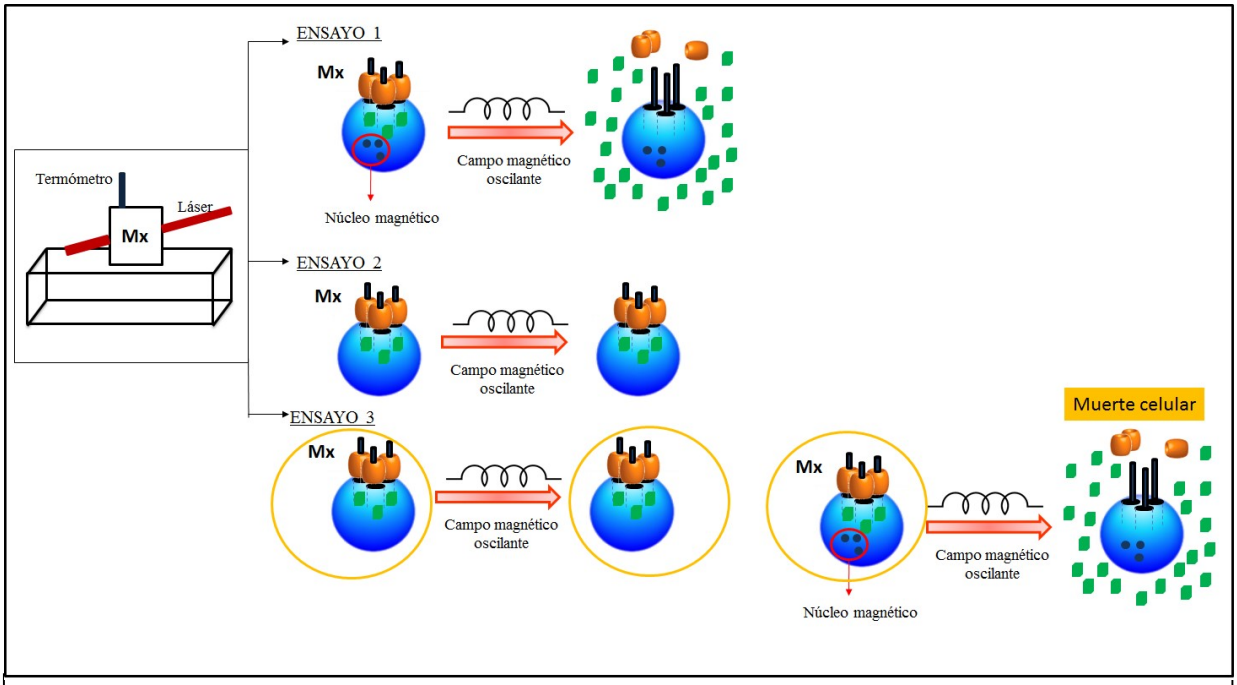

Figura 3. La muestra se encuentra dentro del equipo termostatizado. En el ensayo 1 las NPs presentan un núcleo magnético (NM) liberando la doxorrubicina (producto antitumoral) al aplicar un campo magnético (CM). En el ensayo 2 las NPs no presentan núcleo magnético y por tanto no se activa el sistema, por lo no se abren las nanoválvulas al aplicar el mismo estímulo y no hay liberación de la sustancia cargada. El ensayo 3 se realiza en presencia de células cancerígenas que al fagocitar las NPs cargadas y al aplicar el CM se libera el antitumoral por lo que se observa una menor viabilidad celular en el caso de las células que fagocitan las NPs con NM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez finalizada la síntesis hay que comprobar que las NPs sintetizadas son las que se estaban buscando con las características adecuadas, para ello se utiliza la espectroscopía infrarroja (IR) para comprobar que la composición química es la adecuada y los rayos X para asegurarnos de que la estructura final mantiene la estructura mesoporosa con los canales que forman los poros del tamaño deseado y en posción paralela unos con otros, ya que esto determinará la capacidad del nanosistema para albergar más o menos cantidad de fármaco en su interior. En ambos casos se realizan espectros tanto antes como después de la extracción del surfactante para comparar ambos.

Con la caracterización de las NPs se confirma el tamaño de las mismas y el diámetro del poro. La inclusión del núcleo magnético se confirma mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

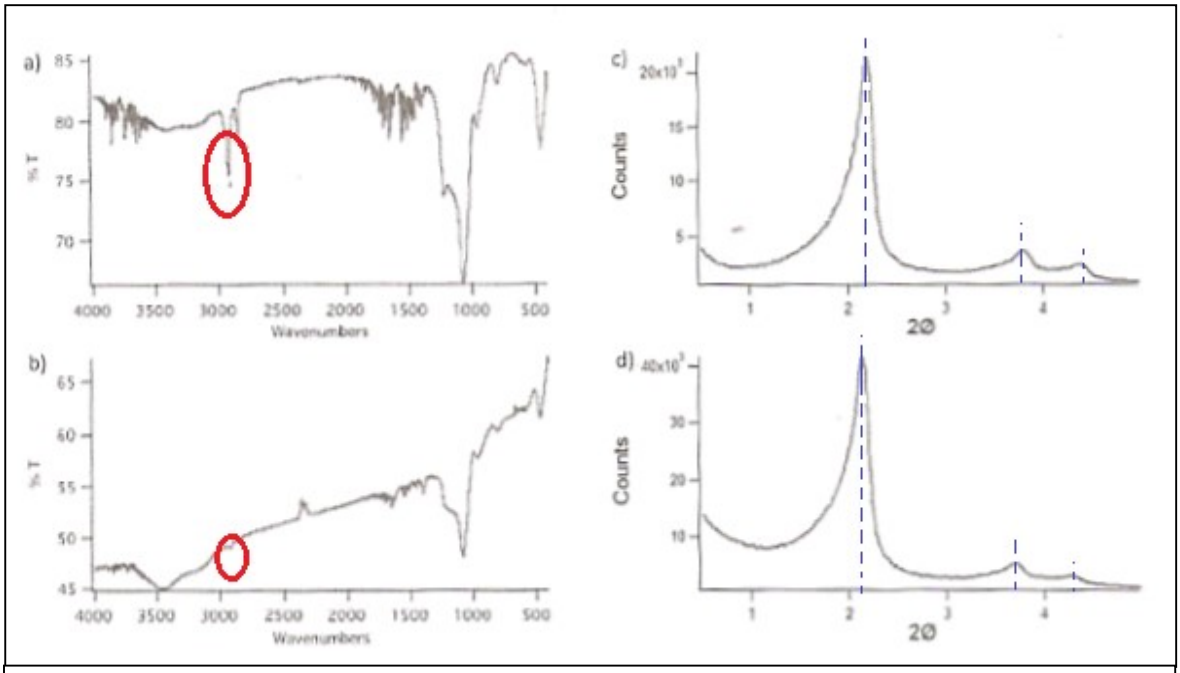

Figura 4[6]**.** Los espectros IR de las nanopartículas MCM-41 (a) antes y (b) después de la extracción del surfactante. Se observa la pérdida de las bandas correspondientes a grupos C-H a 2900 cm^{-1}. La difracción de Rayos X (c) antes y (d) después presentan la misma retención, lo que indica que se mantiene la mesoestructura de las nanopartículas MCM-41.

En la espectroscopía IR se observa que desaparece una banda cerca de 2900 cm^{-1}, la cual corresponde a grupos C-H, lo que indica que se ha eliminado el surfactante de las partículas obtenidas. (Figura 4, a y b).

Por otra parte, la difracción de Rayos X indica que la mesoestructura se ha mantenido tras retirar el surfactante, ya que la retención de ambos difractogramas (antes y después) es prácticamente la misma. De los Rayos X se puede obtener también que el diámetro de las nanopartículas es de 2 nm. (Figura 4, c y d).

Por lo tanto, a partir de la espectroscopía infrarroja podemos saber si se ha eliminado todo el surfactante o no y, con los Rayos X, si se mantiene la estructura mesoporosa con las características iniciales una vez finalizado el proceso de síntesis. (Figura 5).

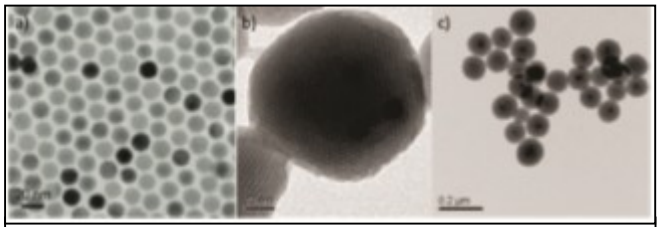

Figura 5[7]**.** Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). MCSNs

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

En el estudio de la liberación de agentes terapéuticos por separado y combinado con la hipertermia dirigidas a células tumorales, cabe destacar, que de los ensayos 1 y 2 indicados con anterioridad, sobre las MCSNs (Ensayo 1) y sometidas a un campo magnético alterno se produce liberación del fármaco, mientras que no ocurre en las que no presentan núcleo magnético (Ensayo 2).

Estos datos permiten evaluar el grado de internalización de estas nanopartículas y el grado de mortalidad con la intención de mejorar la relación eficacia/dosis de nanopartículas necesaria para la eliminación de células malignas de tumores sólidos respecto de los nanosistemas ya existentes realizando ensayos *in vitro* con diferentes líneas celulares cancerosas, como es el caso del ensayo 3 con células MDA-MB-231, en dicho estudio se observa que la viabilidad celular es menor en las NPs que presentan núcleo magnético frente a las que no lo tienen.

En el ensayo 3, el efecto de las MCSNs en las células examinadas se estudiaron sin fármaco cargado bajo las mismas condiciones que con fármaco en el interior de las nanopartículas. En este estudio se observó que cuando una muestra que no contenía doxorrubicina era endocitada por las células y expuesta a un campo magnético oscilante se observaba un 16 % de muerte celular, mientras que en el caso de las nanopartículas cargadas con doxorrubicina se produce un 37 % de muerte celular. Por lo tanto, se observó que tanto el proceso de hipertermia como la liberación del fármaco antitumoral favorecen la muerte celular. (Figura 6).

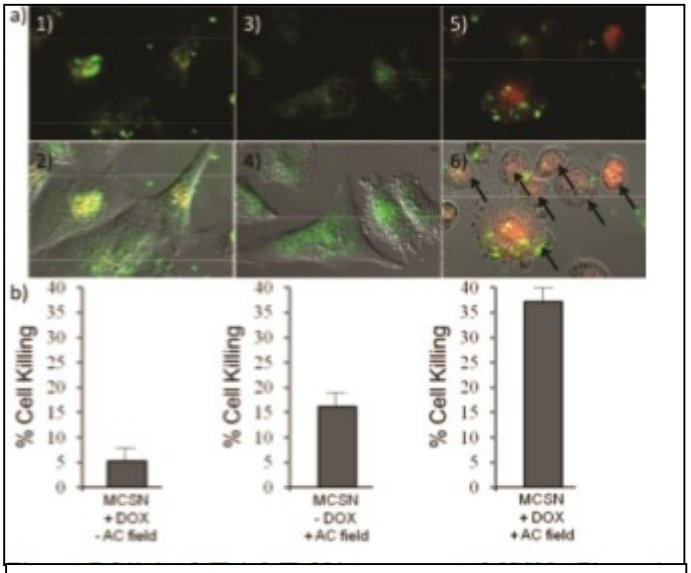

Figura 6[7]**.** Células MDA-MB-231 expuestas a MCSNs. El histograma e imágenes de fluorescencia (a) indica células con MCSNs cargadas de doxorrubicina, pero no expuestas a un campo magnético (5 % muerte celular). (b) Células con MCSNs sin doxorrubicina sometidas a un campo magnético (16 % muerte celular). (c) Células con MCSNs cargadas de doxorrubicina y sometidas a un campo magnético (37 % muerte celular).

Además, en otro ensayo se observó que un único pulso de corriente provoca la liberación del 40% de Rodamina B, lo cual se atribuye al rápido aumento de temperatura y la consecuente apertura de la válvula. También se comparó con una segunda muestra a la que se

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

le aplicaron pulsos intermitentes de corriente alterna de campo magnético, en ella se observó la misma liberación inicial que al aplicar un único pulso, pero además se aprecia cada vez una mayor liberación de sustancia cargada, que va en aumento de forma paulatina hasta llegar a la liberación del 100% de la sustancia[7].

La incorporación de nanocristales de óxido de hierro con propiedades superparamagnéticas embebidas dentro de la matriz de sílice mesoporosa representa una alternativa muy interesante en el diseño de nanotransportadores de fármacos. Su capacidad de ser guiado magnéticamente por un campo magnético externo, permite que se concentren en el tejido dañado.

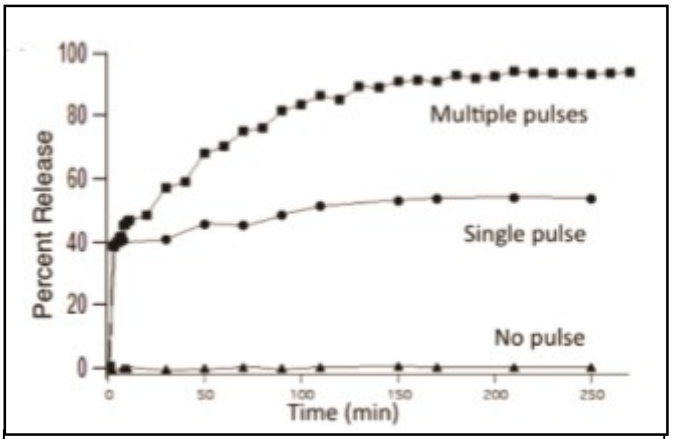

Figura 7[7]. Liberación del material cargado por estimulación magnética con un único pulso y con pulsos intermitentes. Indicando liberación de la doxorrubicina cuando se aplica el estímulo externo de CM.

Esto es debido a la combinación del efecto inmunoestimulador de la temperatura asociado a la hipertermia producida por la aplicación de dicho campo magnético oscilante, se logra por tanto un efecto sinérgico que podría mejorar notablemente las terapias actuales contra el cáncer. Todo eso, junto con la posibilidad de ser retirados al final de la terapia, ofrece una buena alternativa para mejorar significativamente la eficacia del tratamiento no invasivo. (Figura 7).

Cuando estas partículas están expuestas a un campo magnético oscilante, son capaces de aumentar la temperatura de los alrededores hasta alcanzar el rango de hipertermia (42-47 ºC) y lograr un efecto inmunoestimulador provocando el calentamiento de la región afectada para potenciar así la respuesta inmune local e inhibiendo los procesos de la regulación y el crecimiento de células tumorales[8].

Así, se consigue promover la muerte inmunogénica de las células malignas y generar una mayor sensibilidad a los efectos quimioterapéuticos. El seguimiento teragnóstico del tratamiento es también posible, ya que los nanomateriales simultáneamente podrían ser utilizados como agentes de contraste en Resonancia Magnética por Imagen (MRI) siendo por tanto multifuncionales.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Las nanoválvulas están formadas por macromoléculas polimacrocíclicas complejas como CB[6] y ciclodextrinas (CDs). Estas macromoléculas tienen la capacidad de proteger al fármaco de la degradación química, física y enzimática hasta que llegue al lugar exacto para su liberación, así como para mejorar la permeabilidad de las nanopartículas a la membrana de las células tumorales, aumentando su eficacia. Estas nanoválvulas son sensibles a estímulos externos como el campo magnético oscilante[9].

CONCLUSIONES

Estos materiales son de gran utilidad para la liberación de fármacos *in vitro*, como se ha demostrado en la liberación de fármacos antitumorales en líneas celulares de tumores de mama (MDA-MB-231). Las MCSNs son captadas por células y se observa una mínima liberación de las sustancias que contienen, pero al aplicarles un campo magnético oscilante se produce un aumento de la temperatura local generado por el núcleo magnético de las MCSNs, lo cual provoca la apertura de la nanoválvula y esto facilita la liberación del fármaco (doxorrubicina) a través de los poros de la mesoestructura de sílice, induciendo la apoptosis de las células tumorales.

Una de las principales limitaciones de los tratamientos oncológicos actuales es la toxicidad de las dosis administradas al paciente. Por esta razón los pacientes sufren a largo plazo los efectos secundarios tan agresivos relacionados con este tipo de tratamientos. Por esto, el diseño de este sistema que permite la administración de la dosis de forma localizada, específica y con una liberación controlada supone un gran logro para este tipo de tratamientos favoreciendo la tolerancia a los mismos.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

BIBLIOGRAFÍA

[1] W. Ambrogio M, R. Thomas C, Zhao Y, I. Zink J and F. Stoddart J. "Mechanized silica nanoparticles: A new frontier in theranostic nanomedicine". *Accounts of Chemical Research*. 2011 January;44(10):903-913. <doi: 10.1021/ar200018x>.

[2] Baeza A, Colilla M and Vallet- Regí M. "Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery". *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015 February;12(2):319-37. <doi: 10.1517/17425247.2014.953051>.

[3] Li Z, C. Barnes J, Bosoy A, F. Stoddart J and I. Zink J. "Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications". *The Royal Society of Chemistry*. 2012 January; 41:2590-2605. <doi:10.1039/c1cs15246g>.

[4] Colilla M, Baeza A and Vallet-Regí M. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Controlled Release Applications". *The Sol-Gel Handbook; Synthesis, Characterization, and Applications.* First Edition. Published 2015 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

[5] Jang, J.-T.; Nah, H.; Lee, J.-H.; Moon, S.H.; Kim, M.G.; Cheon, J. *Angew. Chem. Int.* Ed. 2009, 48, 1234-1238.

[6] R. Thomas C, P. Ferris D, Lee J.H, Choi E, H. Cho M, S. Kim E, et al. "Noninvasive Remote-Controlled Release of Drug Molecules in Vitro Using Magnetic Actuation of Mechanized Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2010 July;132(31):10623-10625. <doi: 10.1021/ja1022267>. Supporting Information.

[7] R. Thomas C, P. Ferris D, Lee J.H, Choi E, H. Cho M, S. Kim E, et al. "Noninvasive Remote-Controlled Release of Drug Molecules in Vitro Using Magnetic Actuation of Mechanized Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2010 July;132(31):10623-10625. <doi: 10.1021/ja1022267>.

[8] Lagona, J., et al. Angew. Chem., Int. Ed., (2005), 44, 4844–4870; Liu, S., et al. J. *Am. Chem. Soc*., (2005) 127, 15959–15967.

[9] Chen, T., et al. (2013) *Chem. Commun*., 49, 6555–57. Dong, et al. (2013) Nanoscale, 5, 10300–06; Du, L., J. *Am. Chem. Soc*., (2009) 131, 15136–15142; Meng, et al. (2010) J. Am. Chem. Soc., 132, 12690–97; Park, C., et al. (2007) Angew. Chem., Int. Ed., 46, 1455–1457; Zhao, et al. (2010) J. *Am. Chem. Soc.,* 132, 13016–25.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.