

*ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN. SANTANDER*

**COMPARATIVA DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS
COMPLEJAS POLIETILENIMINA – CITRATO PARA
LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS MEDIANTE
NANOPRECIPITACIÓN Y ELECTROSPRAYING**

TRABAJO FIN DE MÁSTER (TFM)

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA QUÍMICA
POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y LA UNIVERSIDAD DEL
PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA**

Alumna: Raquel de la Hoz Ruiz

Fecha: 20 Noviembre 2020

Firma:



Directora: Nazely Diban Gómez

Curso Académico: 2020/2021

Codirectora: Olga Tapia Martínez

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN	VI
SUMMARY.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONTEXTO: TERAPIAS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO	1
1.1.1. Sistema de distribución del fármaco, <i>drug delivery</i>	3
1.1.2. Liberación específica de fármacos, aptámeros.	3
1.2. LA POLIETILENIMINA COMO VEHÍCULO PARA EL TRANSPORTE DE MOLÉCULAS PARA TERAPIA GÉNICA	4
1.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	6
1.3.1. Método de nanoprecipitación	9
1.3.2. <i>Electrospraying</i>	9
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1. SÍNTESIS DEL NANOCOMPLEJO PEI – CITRATO.....	12
3.1.1. Reactivos empleados para la síntesis del nanocomplejo PEI-citrato	12
3.1.2. Preparación de la disolución de PEI y ajuste del pH.....	12
3.1.3. Preparación de la disolución de citrato de sodio	13
3.1.4. Nanoprecipitación del nanocomplejo PEI – citrato	13
3.1.5. <i>Electrospraying</i> del nanocomplejo PEI – citrato	14
3.1.5.1. Configuración 1: PEI sobre citrato de sodio	15
3.1.5.2. Configuración 2: citrato de sodio sobre PEI	17
3.1.6. Funcionalización del nanocomplejo PEI – citrato	18
3.1.6.1. Post-funcionalización con ADN de los nanocomplejos PEI – citrato	18

3.1.6.2.	<i>Electrospraying</i> coaxial de la disolución polimérica y de ADN.....	19
3.2.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DEL NANOCOMPLEJO PEI – CITRATO	20
3.2.1.	Técnica de dispersión de luz dinámica, DLS (<i>Dynamic Light Scattering</i>).....	20
3.2.2.	Técnica de movilidad electroforética	21
3.2.3.	Microscopía electrónica de transmisión, TEM	22
4.	RESULTADOS	24
4.1.	SÍNTESIS DE NANOCOMPLEJOS PEI – CITRATO MEDIANTE DE NANOPRECIPITACIÓN: INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN	24
4.1.1.	Influencia de la concentración de citrato de sodio	24
4.1.2.	Influencia de la introducción de una etapa de filtrado posterior a la síntesis	27
4.2.	SÍNTESIS DE NANOCOMPLEJOS PEI – CITRATO MEDIANTE ELECTROSPRAYING: INFLUENCIA DE LA CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL	28
4.3.	FUNCIONALIZACIÓN CON ASO – ISSN1 DE LOS NANOCOMPLEJOS PEI – CITRATO: INFLUENCIA SOBRE EL TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	32
5.	CONCLUSIONS	37
6.	NOMENCLATURA.....	38
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	40
8.	ANEXOS.....	43
8.1.	ANEXO I	43
8.2.	ANEXO II	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. (a) Estructura natural del ARN y modificaciones químicas de los ASOs de (b) primera y (c) segunda generación. Modificado de (Wang, 2018).	2
Figura 1.2. (a) Morfología de las motoneuronas afectadas por la AME y (b) alteración del splicing en el gen SMN2 produciendo proteínas SMN no funcionales. Modificado de (Darras y cols., 2015).	2
Figura 1.3. Estructura del aptámero A01B seleccionado mediante método SELEX de internalización (Philippou y cols., 2018).	4
Figura 1.4. Acomplejamiento del ADN/ARN mediante PEI por interacción electroestática. Modificado de (Zakeri y cols., 2018).	5
Figura 1.5. Formación del nanocomplejo PEI – citrato para la dispensación controlada del fármaco Nusinersen de manera selectiva con las miofibras. Basado en (Zhao y cols., 2011).	6
Figura 1.6. Mecanismo de formación de las NPs por la interacción Culómbica de cargas entre el líquido y el campo eléctrico aplicado. Modificado de (Saallah y Lenggono, 2018).	10
Figura 3.1. Procedimiento seguido para la preparación de las disoluciones de citrato de sodio a diferentes concentraciones de citrato de sodio (reticulante).	13
Figura 3.2. Reacción de condensación de las aminas primarias de la PEI con el citrato de sodio para la formación de los nanocomplejos PEI – citrato. Modificado de (Liu y cols., 2020).	14
Figura 3.3. Esquema del sistema de electrospraying desarrollado en el trabajo.	15
Figura 3.4. (a) Montaje experimental de la configuración PEI sobre citrato de sodio, 1:6, y (b) detalle de la conexión de los electrodos.	16
Figura 3.5. (a) Montaje experimental de la configuración citrato de sodio sobre PEI, 6:1, y (b) detalle de la conexión de los electrodos y la configuración de la aguja.	17
Figura 3.6. Montaje experimental de la configuración coaxial para el recubrimiento del ADN con la PEI.	19
Figura 3.7. Fundamente de la técnica de dispersión de luz dinámica, DLS (LS Instruments, 2020).	21
Figura 4.1. Distribución de tamaños de partícula obtenidos para el análisis de la (a) influencia de la concentración de reticulante y (b) de la incorporación de una etapa adicional de F – US – F, (c) resumen de los tamaños medios de partícula obtenidos y sus PDI, (d) imágenes TEM de los nanocomplejos a 14 μ M y (e) su distribución de tamaños obtenida en función de la medición de los núcleos de PEI o (f) de la red de nanocomplejos PEI – citrato generada.	25

Figura 4.2. (a) Distribución de tamaño de partícula para ambas configuraciones de síntesis mediante electrospraying, (b) tamaño medio de ambas configuraciones medido por DLS y sus PDIs asociados, (c) imágenes TEM de los nanocomplejos sintetizados por la 2ª configuración y (d) su distribución de tamaños obtenida en función de la medición de los núcleos de PEI..... 31

Figura 4.3. (a) Distribución de tamaño de partícula para ambas técnicas de funcionalización en las metodologías estudiadas, (b) tamaños medios, PDIs y potenciales zeta de los nanocomplejos antes y después de la funcionalización, (c) imágenes TEM de los nanocomplejos funcionalizados con electrospraying coaxial y (d) su distribución de tamaños en función de la medición de los núcleos de PEI..... 33

Figura A1. Imágenes TEM de los nanocomplejos PEI – citrato sintetizados por nanoprecipitación y tras la funcionalización dropwise con ASO-ISSN1 (200 nM), y su distribución de tamaño de partícula asociada. 43

Figura A2. Imágenes TEM de los nanocomplejos PEI – citrato sintetizados por electrospraying (2ª conf.) y tras la funcionalización dropwise con ASO – ISSN1 (200 nM), y su distribución de tamaño de partícula asociada. 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Técnicas disponibles actualmente para la síntesis de NPs poliméricas. 7

Tabla 3.1. Valores óptimos de las variables de operación del sistema de electrospraying PEI sobre citrato de sodio, 1:6. 17

Tabla 3.2. Valores óptimos de las variables de operación del sistema de electrospraying citrato de sodio sobre PEI, 6:1. 18

Tabla 3.3. Valores óptimos de las variables de operación del sistema de electrospraying coaxial para la encapsulación del ASO – ISSN1. 20

RESUMEN

MASTER UNIVERSITARIO EN INGENIERIA QUIMICA POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA			
RESUMEN DEL TRABAJO FIN DE MASTER			
TÍTULO	Comparativa de la síntesis de nanopartículas complejas polietilenimina-citrato para liberación controlada de fármacos mediante nanoprecipitación y electrospraying		
AUTOR	Raquel de la Hoz Ruiz		
DIRECTOR/CODIRECTOR	Nazely Diban Gómez/Olga Tapia Martínez	FECHA	20/11/2020

PLABRAS CLAVE

Dispensación controlada de fármacos, electrospraying, nanocomplejos PEI – citrato, nanoprecipitación, oligonucleótidos antisentido, terapias génicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, gracias a la revolución genética, se están llevando a cabo numerosas investigaciones sobre el desarrollo de terapias génicas viables para el tratamiento de enfermedades de base genética. El presente trabajo se centrará en desarrollar un vehículo seguro y eficaz para el transporte de oligonucleótidos antisentido (ASOs) utilizados como terapia génica para la atrofia muscular espinal (AME). La AME es una enfermedad infantil neurodegenerativa, causada por un defecto en la secuencia del gen SMN2, que afecta a las neuronas motoras de la médula espinal impidiendo su supervivencia. El descubrimiento de los ASOs (fragmentos de ADN o ARN) causó una revolución para el tratamiento de este tipo de enfermedades, ya que son capaces de unirse a la secuencia del gen defectuoso o de su correspondiente ARN mensajero y asegurar la síntesis de la proteína funcional que codifica permitiendo así superar el defecto genético de la enfermedad. En este trabajo se empleará un ASO sintético, análogo al fármaco Spinraza (BIOGEN, único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la AME), llamado Nusinersen, y que es complementario a la secuencia conocida como ISSN1 en el ARNm SMN2. Hoy en día, el tratamiento de esta enfermedad supone un coste muy elevado y por ello únicamente se trata el sistema nervioso central a través de una inyección intratecal, quedando el resto de órganos periféricos sin tratamiento. Por ello, se quiere desarrollar un vehículo para el transporte de los ASOs a través del torrente sanguíneo de manera que se preserve sus propiedades bioactivas, evite su degradación por nucleasas y reduzca el coste del tratamiento. De entre los vehículos disponibles actualmente, se han seleccionado las nanopartículas (NPs) de polímeros catiónicos, como en este caso la polietilenimina (PEI), por su simplicidad de síntesis, su excelente capacidad de transfección celular y compactación del ADN, y por preservar el material genético. De todas las metodologías disponibles para la síntesis de NPs poliméricas este trabajo se centró en dos: la nanoprecipitación y el electrospraying. Se sintetizaron nanocomplejos PEI – citrato por ambas metodologías poniendo a punto los sistemas experimentales, evaluando las configuraciones de trabajo y optimizando las variables de operación y analizando su influencia sobre el tamaño de los nanocomplejos. Además, se realizaron dos técnicas de funcionalización con el ASO-ISSN1, una funcionalización externa *dropwise* y una funcionalización interna mediante electrospraying coaxial.

RESULTADOS

Se comprobó que con ambas metodologías de síntesis se producían nanocomplejos PEI – citrato con tamaños de partícula adecuados para la transfección celular (~ 200 nm). Estos tamaños de partícula se obtuvieron tras someter a las muestras a un proceso de filtración – ultrasonificación – filtración (filtro de $0.45\ \mu\text{m}$) antes de su medición por DLS (Dynamic Light Scattering). De esta manera se aseguraba la eliminación de partículas o trazas demasiado grandes. De entre las dos metodologías de síntesis evaluadas, con el electrospraying se consiguieron nanocomplejos más monodispersos y estables con un tamaño por debajo de los 200 nm. Esto se confirmó analizando imágenes tomadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se comprobó la existencia de núcleos esféricos de PEI rodeados por una red de reticulación de PEI – citrato, la cual favorece el entrecruzamiento con otros núcleos de PEI. Por último, se evaluó la funcionalización de los nanocomplejos utilizando el ASO-ISSN1 mediante dos aproximaciones. Se comprobó que ambas técnicas de funcionalización fueron eficaces, es decir, los potenciales zeta de los nanocomplejos disminuían tras la adición de ASO, que presenta carga negativa. En el caso de la funcionalización externa *dropwise* se tuvo que aumentar la concentración de ASO (de 200 nM hasta $6.65\ \mu\text{M}$) para asegurar una correcta funcionalización. Por el contrario, con la funcionalización coaxial se consiguió una buena funcionalización, con concentraciones de sólo 200 nM de ASO y se obtuvo un mejor control del tamaño de los nanocomplejos y se puede eliminar la etapa de filtrado.

CONCLUSIONES

Se ha comprobado que ambas metodologías de síntesis son viables para sintetizar nanocomplejos con un tamaño de partícula controlado. De entre las dos metodologías, el *electrospraying* consigue mejores resultados en relación con el tamaño medio de partícula y la aglomeración. Además, se consiguió una funcionalización efectiva de los nanocomplejos con ASO-ISSN1 tanto con una etapa posterior de adición *dropwise*, como con una técnica de electrosprayado coaxial. Sin embargo, la funcionalización más eficaz fue la funcionalización coaxial, ya que la coextrusión de ambas soluciones (PEI por el exterior y ASO-ISSN1 por el interior) favorece la interacción electrostática entre ambas moléculas mejorando la carga del ASO-ISSN1 en el nanocomplejo, y el control del tamaño del nanocomplejo y la eliminación de la etapa subsiguiente de filtración. Como trabajo futuro se propone incorporar un aptámero (moléculas sintéticas de ARN altamente específicas con las células diana) a la superficie de los nanocomplejos PEI-citrato funcionalizados con ASO-ISSN1 para que sean específicos y selectivos a células diana afectadas por AME.

BIBLIOGRAFÍA

- Saallah, S., Lenggoro, I. W. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder Part. J.*, 35, 89-111. <https://doi.org/10.14356/kona.2018015> (2018).
- Zhao, N., Bagaria, H. G., Wong, M. S., Zu, Y. A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnology*, 9(2). <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-2> (2011).

SUMMARY

MASTER UNIVERSITARIO EN INGENIERIA QUIMICA POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA			
SUMMARY OF MASTER'S THESIS PROYECT			
TITLE	Comparison of the synthesis of complex polyethylenimine-citrate nanoparticles for drug delivery by nanoprecipitation and electrospraying		
AUTHOR	Raquel de la Hoz Ruiz		
DIRECTOR/CODIRECTOR	Nazely Diban Gómez/Olga Tapia Martínez	DATE	20/11/2020

KEY WORDS

Antisense oligonucleotides, drug delivery, electrospraying, gene therapies, nanoprecipitation, PEI – citrate nanocomplexes.

SCOPE

Nowadays, in the age of genetic revolution, many investigations aim at developing suitable gene therapies for treating genetic-based diseases. The present work will be focused on developing a secure and efficient vehicle to deliver antisense oligonucleotides (ASOs) as a gene therapy for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). The SMA is a neurodegenerative childhood disease, caused by a defect in the sequence of SMN2 gene, which affects the motoneurons of the spinal cord avoiding its survival. The discovery of ASOs (DNA or RNA fragments) caused a revolution for the treatment of this type of diseases. The ASOs can bind preferentially to the faulty gene sequence, or to its correspondent mRNA, and ensure the synthesis of the functional protein that encodes, thus allowing to overcome the illness genetic defect. In this work it will be used a synthetic ASO, analogous to Spinraza drug (BIOGEN, the only drug approved by FDA for the treatment of SMA), called Nusinersen, which is complementary to the sequence known as ISSN1 in the mRNA SMN2. Today, the SMA's treatment involves a huge cost. That's why nowadays only the central nervous system is treated, by an intrathecal injection, while the rest of peripheral organs don't received any treatment. Therefore, the solution for the treatment of SMA might be to develop a non – viral vehicle which can deliver ASOs through the bloodstream preserving its bioactive properties, avoiding the nuclease degradation and reducing the cytotoxicity and cost. Between all of non – viral vehicles available, it has been selected nanoparticles (NPs) of cationic polymers, as polyethylenimine (PEI), because of its simple synthesis, its excellent cell transfection and for preserving and condensing the genetic material.

In this work it has been selected two nanoparticle synthesis methodologies: nanoprecipitation and electrospraying. PEI – citrate nanocomplexes were synthesized by both methodologies and the experimental synthesis methods were tuned by evaluating work configurations and optimizing the operation variables and further evaluating their influence on the particle size. Finally, PEI-citrate nanocomplexes were functionalized with ISSN1 – ASO. Two functionalization methodologies were set, tested and compared, a dropwise external functionalization and a functionalization using coaxial electrospraying.

RESULTS

It has been proved that PEI – citrate nanocomplexes, with properly sizes for cell transfection (~ 200 nm), were formed with both synthesis methodologies by subjecting the nanocomplexes to a filtration – ultrasonication – filtration ($0.45\ \mu\text{m}$ filter) treatment. The PEI-citrate nanocomplexes hydrodynamic size was measured by DLS (Dynamic Light Scattering) and the morphology, shape and size was also evaluated using TEM. Between both nanocomplex synthesis methodologies (nanoprecipitation and electrospraying), electrospraying produced more monodisperse and stable nanocomplexes with sizes below 200 nm. TEM images showed spherical PEI nucleus surrounded by a crosslinking PEI – citrate net with other PEI nucleus at the highest sodium citrate concentration tested ($14\ \mu\text{M}$). High concentration of citrate caused big nanocomplexes, therefore the optimal sodium citrate concentration was found to be $2.8\ \mu\text{M}$. Finally, the nanocomplexes functionalization with ISSN1 – ASO was evaluated by measuring the zeta potential. With dropwise external functionalization, the concentration of ISSN1 – ASO has to be increased (from 200 nM to $6.65\ \mu\text{M}$) to visualize a zeta potential decrease (due to the negative charge of ISSN1-ASO surrounding the positively charged PEI-citrate nanocomplex). By contrast, with coaxial electrospraying functionalization, only 200 nM of ASO was necessary to achieve to produce a significant reduction on zeta potential. Furthermore, this technique allowed better particle size control without needing a subsequent filtration step.

CONCLUSIONS

Both synthesis methodologies are viable for synthesizing nanocomplexes, however, electrospraying achieves better results about the medium particle size and agglomeration. Moreover, an effective functionalization of nanocomplexes with ISSN1 – ASO was achieved with both, the subsequent dropwise addition and the coaxial electrospraying functionalization. Nevertheless, the most effective functionalization procedure was the one-step coaxial electrospraying, because the coextrusión of both solutions (PEI outside and ISSN1 – ASO inside) favors the electrostatic interactions between PEI and ISSN1 – ASO improving the ASO's charge in the nanocomplex, the control of nanocomplex size and the elimination of the subsequent filtration step.

As future work may be interesting to incorporate an aptamer (synthetic RNA molecules high – selective with the target cells) on the PEI – citrate – ISSN1 nanocomplexes surface. In this way, the loaded ISSN1/aptamer nanocomplexes will be specific and high – selective with the target cells affected by SMA and the drug required doses can be reduced.

REFERENCES

- Saallah, S., Lenggoro, I. W. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder Part. J.*, 35, 89-111. <https://doi.org/10.14356/kona.2018015> (2018).
- Zhao, N., Bagaria, H. G., Wong, M. S., Zu, Y. A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnology*, 9(2). <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-2> (2011).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTEXTO: TERAPIAS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

En los últimos años, y gracias a la revolución genética, se han podido identificar numerosos genes responsables de enfermedades neurológicas. Gracias a esto se han desarrollado terapias capaces de encontrar la proteína mutada, y con ella localizar el gen causante de la enfermedad o sus ARN mensajeros ¹ codificados (ARNm) (Scoles y cols., 2019).

De entre todas las terapias genéticas actualmente disponibles se va a prestar especial atención a las terapias “antisentido”. Estas terapias se basan en el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO, siglas en inglés) para tratar las enfermedades neurodegenerativas monogénicas, como la distrofia muscular de Duchene, la atrofia muscular espinal (AME) o la ELA. Los ASOs son moléculas sintéticas de ARN monocatenario cuya longitud está entre 18 – 30 nucleótidos. Éstos son capaces de unirse al ARNm en el núcleo celular y modificar la expresión genética, o alterar el *splicing* (empalme) del ARNm diana (Scoles y cols., 2019).

Los ASOs deben de ser capaces de penetrar dentro de la célula para unirse al ARNm diana, tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. Sin embargo, se degradan fácilmente con las nucleasas celulares y por tanto no son capaces de unirse eficazmente al ARNm. Es necesario modificarles químicamente para mejorar su estabilidad y su distribución *in vivo*, aumentar su resistencia a las nucleasas y promover la absorción celular (Atri y cols., 2019). Hay varias generaciones de ASOs, en función de las modificaciones químicas que se les hagan.

La primera generación fue introducida a finales de la década de 1960 por Eckstein. Esta técnica consiste en reemplazar un átomo de oxígeno en el radical fosfato del nucleótido por un átomo de azufre (Figura 1.1b). A esto se le denomina modificación del fosforotioato y se demostró que mejora la resistencia del ASO frente a las nucleasas citoplasmáticas, es más hidrofóbico y presenta mayor afinidad a las proteínas que los ASOs con enlaces fosfodiéster, presentes en la estructura natural del ADN y ARN (Figura 1.1a) (Crooke y cols., 2017; Wang, 2018). Sin embargo, esta primera generación tiene tendencia a unirse de manera no específica con ciertas proteínas, generando citotoxicidad cuando se administraba en elevadas concentraciones. Por ello se desarrolló una segunda generación, para evitar esta citotoxicidad, introduciendo modificaciones en la posición 2' de la ribosa del nucleótido (Figura 1.1c). De entre estas modificaciones, la más efectiva es el 2' – O – metoxietil (2'- MOE) ya que mejora la potencia y la farmacocinética del ASO (Crooke y cols., 2017; Wang, 2018).

En resumen, los ASOs de segunda generación que contienen modificaciones 2' – MOE presentan mejor resistencia a las nucleasas con una citotoxicidad mucho menor y una mayor afinidad de unión con el ARNm diana (Crooke y cols., 2017).

¹ El ARN mensajero (ARNm) es un ácido nucleico monocatenario encargado de transferir el código genético procedente del ADN nuclear a los ribosomas del citoplasma para sintetizar las proteínas expresadas por los genes.

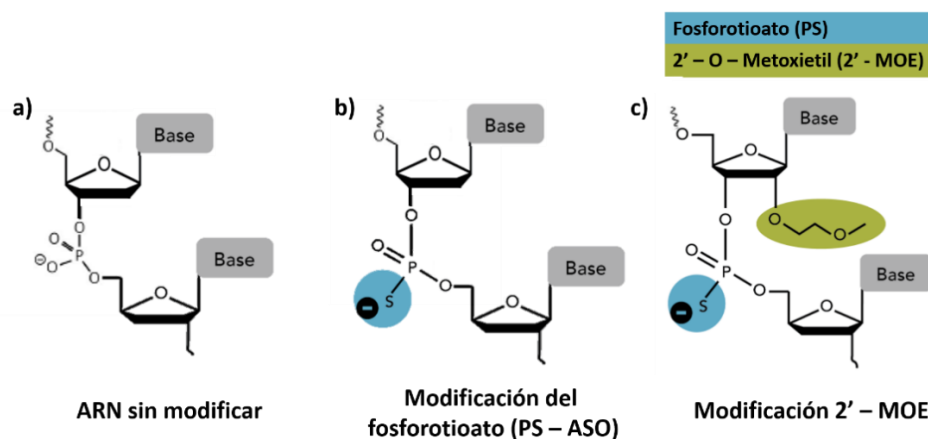


Figura 1.1. (a) Estructura natural del ARN y modificaciones químicas de los ASOs de (b) primera y (c) segunda generación. Modificado de (Wang, 2018).

De todos los fármacos, basados en ASOs, aprobados actualmente por la *Food and Drug Administration* (FDA, órgano que controla la medicación en Estados Unidos) este trabajo se va a centrar en el ASO – Nusinersen, comercializado como Spinraza por Biogen. En 2016, la FDA aprobó al fármaco Nusinersen para tratar múltiples formas de la AME en adultos y niños. Este fármaco también fue aprobado por la Agencia de Medicinas Europea (Crooke y cols., 2017; GARD, 2018).

La AME es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al gen de supervivencia de la motoneurona (SMN, siglas en inglés). En el genoma de los seres humanos hay dos copias de este gen, SMN1 y SMN2. El primero de ellos presenta una mutación en ambas copias, y a su vez, el gen SMN2 al transcribirse presenta una delección en el exón 7 (Figura 1.2a). Esto produce proteínas SMN no funcionales, que se degradan con facilidad, y que causan la degeneración de las motoneuronas (Figura 1.2b) (Darras y cols., 2015; Neil y Bisaccia, 2019). El fármaco Nusinersen es un ASO de segunda generación modificado completamente con 2' – MOE que precisamente modula el *splicing* producido en el gen SMN2 (permite que el exón 7 se incluya preferentemente) y lo convierte en lo que equivaldría al gen SMN1 sin mutar (GARD, 2018). De esta manera se pretende aumentar la cantidad de proteína SMN funcional producida y por tanto superar el defecto genético de la AME (Neil y Bisaccia, 2019).

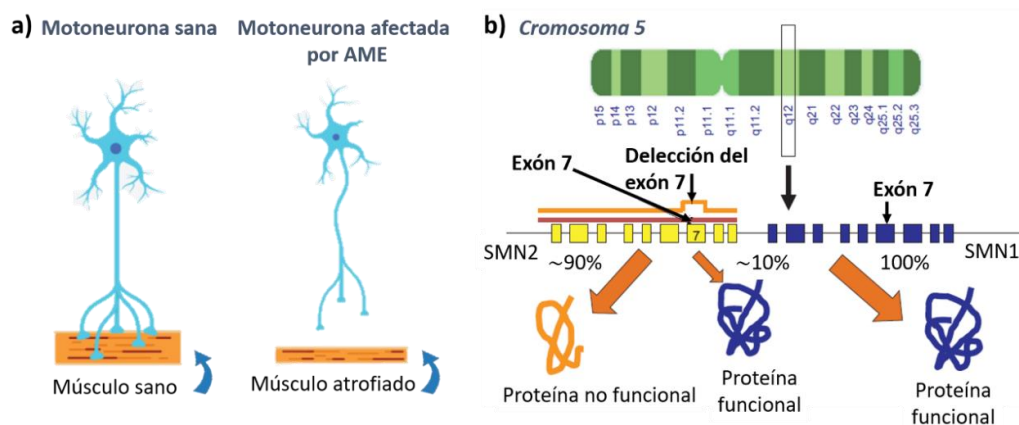


Figura 1.2. (a) Morfología de las motoneuronas afectadas por la AME y (b) alteración del *splicing* en el gen SMN2 produciendo proteínas SMN no funcionales. Modificado de (Darras y cols., 2015).

1.1.1. Sistema de distribución del fármaco, *drug delivery*.

Actualmente el ASO-Nusinersen se administra mediante dosis inyectadas en el líquido cefalorraquídeo de la columna vertebral (inyección intratecal). Como se ha explicado anteriormente, los ASOs presentan limitaciones en su distribución *in vivo*. En primer lugar, los ácidos nucleicos son altamente susceptibles a la degradación por nucleasas. Además, los ASOs sintéticos son moléculas bastante grandes (~30 kD) y con elevada carga negativa. Esto les impide atravesar las paredes celulares y nucleares para poder realizar conjugarse por complementariedad de bases con el ARNm diana. También, es necesario tener en cuenta que el efecto del ASO sintético, suministrado en grandes cantidades, fuera de la célula objetivo puede ocasionar reacciones adversas en el organismo, aparte de ser inmunogénico (genera respuesta inmune) (Verma, 2018).

La mayoría de estas limitaciones, como la degradación por las nucleasas, se solventaron con los ASOs de 1ª y 2ª generación. Sin embargo, sigue habiendo problemas con su modo de entrega a los sitios de destino y sus efectos secundarios. Es por tanto que se requiere estudiar un sistema de liberación del ASO innovador que sea capaz de solventar estos inconvenientes.

Actualmente, los investigadores se están centrando en desarrollar un vehículo seguro y eficiente de transporte de los ASOs capaz de superar las barreras *in vivo*. Recientemente se han desarrollado “vehículos” para el transporte de los ASOs sin sufrir degradación. Esta tecnología se conoce como *drug delivery* (dispensación de fármacos) y consiste en unir el ASO (cargado negativamente) a un portador o ligando cargado positivamente, como pueden ser, las partículas de lípidos y liposomas, los agentes virales o las nanopartículas (NPs) (Verma, 2018).

Estos vehículos pueden clasificarse como virales y no virales. Estudios previos se focalizaron en usar vehículos virales, como adenovirus o lentivirus, pero a pesar de su éxito presentan bastantes limitaciones. Presentan inmunogenicidad, tienen capacidad limitada de transporte de genes y un alto coste de producción a gran escala (Patnaik y Gupta, 2013).

Actualmente, uno de los vehículos no virales más estudiados en la actualidad es el empleo de nanopartículas poliméricas de polímeros catiónicos para el transporte de ASOs (Patnaik y Gupta, 2013). Este tipo de polímeros se caracterizan por ser bastante flexibles, robustos, fáciles de sintetizar, con elevada eficiencia de absorción celular, muy solubles en agua y con excelente transferibilidad, por ello son los idóneos para este tipo de tecnología. Los polímeros catiónicos más estudiados para la terapia génica son el copolímero poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA y la polietilenimina (PEI) (Sahiner, 2013; Zakeri y cols., 2018).

1.1.2. Liberación específica de fármacos, aptámeros.

A pesar de las numerosas ventajas que presentan las NPs como vehículos para el transporte de fármacos, actualmente, sigue habiendo un factor limitante en las terapias génicas disponibles y es la baja selectividad de las NPs con las células diana. La causa de esta dispensación indeseable obliga a incrementar la concentración de fármaco en los

nanocomplejos y suministrar mayor cantidad generando problemas citotóxicos y económicos (Philippou y cols., 2018). Para generar esta especificidad, numerosos estudios (Philippou y cols., 2018; Zhao y cols., 2011) utilizan como ligando de las nanopartículas moléculas que sean específicas con las células de destino. Normalmente se utilizan anticuerpos monoclonales de ratón pero se ha visto que son inmunogénicos *in vivo*, y los anticuerpos monoclonales humanos, que no tienen ese problema, son muy caros y solo están disponibles para un limitado número de ligandos. Es por tanto, que los científicos están buscando otro tipo de ligandos que sean más fáciles de producir y no generen una respuesta inmune.

Los aptámeros son un tipo de oligonucleótidos sintéticos monocatenarios (entre 30 – 50 bases) que han sido estudiados para actuar como ligando de las nanopartículas en la dispensación *in vivo* de fármacos. Estos presentan una inmunogenicidad mínima o nula y pueden ser sintetizados de manera relativamente sencilla. Se suelen modificar químicamente con 2' – fluoropirimidinas (2' – F) para evitar su degradación con las nucleasas (Philippou y cols., 2018; Zhao y cols., 2011). Al ser sintetizados específicamente presentan una elevada afinidad y especificidad con las células de destino. En su estudio, Philippou y cols. (2018) identificaron y sintetizaron un aptámero que se internaliza de manera selectiva y eficiente en las células musculares, las miofibras. Este aptámero de ARN es el A01B (Figura 1.3) y es el que se utilizará como ligando de los nanocomplejos por ser altamente específico con las células del músculo esquelético afectadas por la AME. El A01B fue seleccionado mediante el método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) de internalización celular.

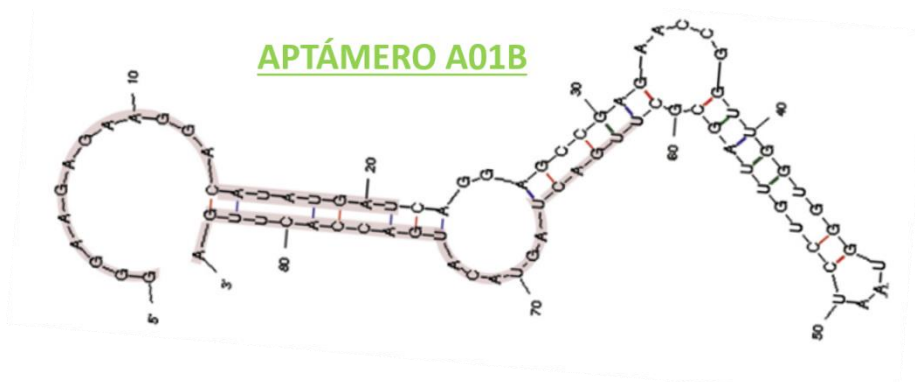


Figura 1.3. Estructura del aptámero A01B seleccionado mediante método SELEX de internalización (Philippou y cols., 2018).

1.2. LA POLIETILENIMINA COMO VEHÍCULO PARA EL TRANSPORTE DE MOLÉCULAS PARA TERAPIA GÉNICA

La PEI ha ganado especial atención en el diseño avanzado de materiales ya que posee unas propiedades intrínsecas muy interesantes. Se suele utilizar como material para la compactación y condensación de moléculas de ADN y ARN, mediante interacción electrostática (Figura 1.4). Además, es un polímero altamente cargado positivamente y con una gran eficiencia de transfección, lo que le hace perfecto para la entrega de genes y fármacos tanto *in vitro* como *in vivo* (Sahiner, 2013).

Sin embargo, a pesar de su eficacia para la transfección celular, presenta una elevada tasa de muerte celular debido a su potencial citotoxicidad. Varios estudios han relacionado esta citotoxicidad con las propiedades fisicoquímicas, el peso molecular y el grado de ramificación de la PEI (Sahiner, 2013; Zakeri y cols., 2018).

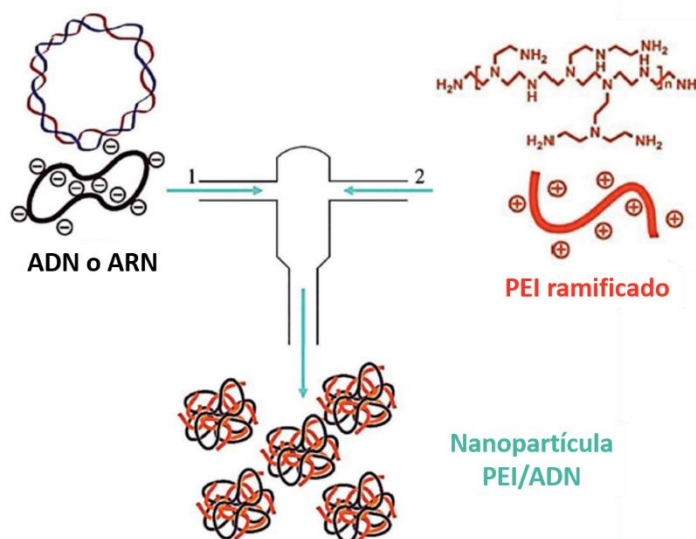


Figura 1.4. Acomplejamiento del ADN/ARN mediante PEI por interacción electrostática. Modificado de (Zakeri y cols., 2018).

En relación al grado de ramificación de la PEI se ha visto que las PEI ramificadas son capaces de complejar y condensar el ADN en vesículas nanométricas, mientras que las PEI lineales generan, en estos medios, complejos micrométricos mucho más grandes (Megías, 2017). Además, las PEI ramificadas se ha visto que son más eficaces a la hora de preservar el material genético dentro de la célula, en comparación con las lineales, gracias a su capacidad para mantener el pH del entorno de la vesícula endocítica (mecanismo de transfección celular). Sin embargo, las PEI ramificadas tienen menores eficacias de transfección en las células que las lineales. Algunos estudios demuestran (Brunner y cols., 2002) que la eficacia de transfección depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula a la hora de endocitar el nanocomplejo polimérico. Se ha comprobado que, en los ensayos en líneas celulares con altas tasas de crecimiento, las PEI ramificadas son más eficaces que las lineales.

En relación con el peso molecular, se ha visto que las de mayor peso molecular (800 kDa) son más citotóxicas que las de menores pesos moleculares (25 kDa). Sin embargo, las de mayor peso molecular tienen mejores eficacias de transfección. Finalmente, se consensuó que la PEI de 25 kDa es la más adecuada para las terapias génicas, por conseguir la mayor eficiencia de transfección en un margen de citotoxicidad controlada (Megías, 2017). Otros estudios proponen, para evitar los problemas de citotoxicidad y mejorar la transfección celular, modificar las PEI con otros péptidos, grupos funcionales u otros polímeros como el polietilenglicol (PEG) (Sahiner, 2013; Zakeri y cols., 2018).

Por otro lado, estudios como el de Zhao y cols. (2011), optan por reducir la dosis requerida de PEI en vez de modificarlo con otros compuestos. En este estudio se realizaron cultivos celulares a diferentes concentraciones de PEI. Al pasar 48h

determinaron la tasa supervivencia celular mediante citometría de flujo y obtuvieron como concentración máxima $\leq 1.10 \mu\text{g PEI/mL}$.

Otro factor importante para la transfección celular es el tamaño de partícula del complejo PEI – ARN. Por ello, Zakeri y cols. (2018) en su estudio determinan que el tamaño óptimo de nanopartícula debe estar entre 20 – 200 nm. De esta manera son suficientemente grandes para evitar que se filtren y suficientemente pequeñas para ser absorbidas a través de la membrana celular. Además del tamaño, la forma, la carga superficial y los grupos funcionales modificados de las nanopartículas pueden afectar a las propiedades de internalización celular, a la excreción, toxicidad y eficacia.

Por todo ello, en este trabajo se escogerá como material para la síntesis de nanocomplejos la PEI, reticulada con citrato de sodio, para su posterior funcionalización con el fármaco Nusinersen y el aptámero escogido (A01B). De esta manera el sistema final utilizado para la dispensación controlada de fármacos se muestra en la [Figura 1.5](#):

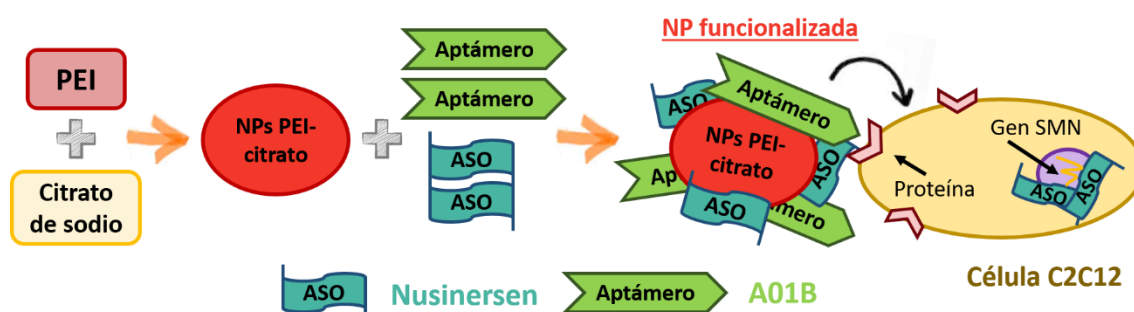



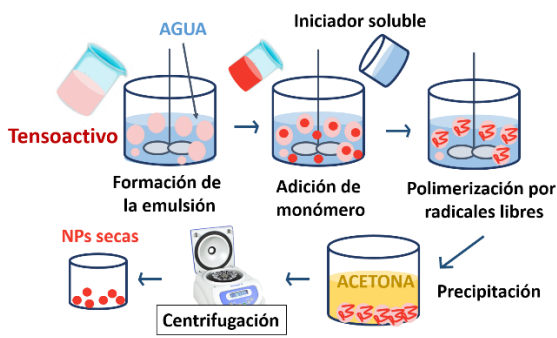


Figura 1.5. Formación del nanocomplejo PEI – citrato para la dispensación controlada del fármaco Nusinersen de manera selectiva con las miofibras. Basado en (Zhao y cols., 2011).

1.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Actualmente el uso de nanopartículas poliméricas como vehículos para el transporte de genes, fármacos, antígenos y proteínas está cobrando especial importancia, ya que son biodegradables y biocompatibles, además de bastante sencillas de sintetizar (Katmis y cols., 2018). Este interés por sintetizar NPs poliméricas ha desembocado en multitud de técnicas disponibles actualmente. En la [Tabla 1.1](#) se muestran las tecnologías convencionales actualmente disponibles y las tecnologías emergentes que han surgido en los últimos años:

Tabla 1.1. Técnicas disponibles actualmente para la síntesis de NPs poliméricas.

MÉTODO DE SÍNTESIS	DESCRIPCIÓN	REF.
Tecnologías Convencionales		
<p>EMULSIÓN SIMPLE ACEITE/AGUA (O/W)</p> 	<p>Es la técnica más utilizada actualmente. Consiste en mezclar una fase orgánica (polímero + fármaco + disolvente orgánico) con una fase acuosa (disolvente volátil como acetato de etilo). Mediante agitación vigorosa se genera una nanoemulsión y el disolvente volátil se extrae mediante evaporación.</p>	(Xu, 2016)
<p>EMULSIÓN DOBLE ACEITE/AGUA (W/O/W)</p> 	<p>Este método es un desarrollo adicional de la técnica O/W que permite encapsular fármacos hidrofóbicos de manera más eficiente. Normalmente se usa para encapsular hormonas, proteínas o ADN. El proceso es análogo a la emulsión O/W salvo que a la primera emulsión se le añade una segunda disolución acuosa que genera micelas formadas por la primera fase acuosa y el polímero con el fármaco.</p>	(Xu, 2016)
<p>EMULSIÓN SALTING-OUT</p> 	<p>Método basado en la emulsión O/W. Consiste en echar una fase orgánica gota a gota (polímero + fármaco + solvente orgánico soluble en agua, acetona) sobre una fase acuosa rica en sales para prevenir la difusión de la acetona en el agua. A esa emulsión O/W se la diluye con agua para que la acetona pase a la fase acuosa. Por último se realiza una filtración de flujo cruzado para obtener las NPs secas.</p>	(Katmis y cols., 2018)
<p>POLIMERIZACIÓN EN MICROEMULSIÓN</p> 	<p>Método para generar NPs mediante la polimerización por radicales libres de un monómero insoluble en agua. Primero se genera una emulsión en agua con un tensoactivo. Posteriormente se añade el monómero (parte se introduce dentro de las micelas y otra parte en suspensión) y un iniciador de la polimerización. El polímero crece dentro de las micelas hasta que se para la reacción.</p>	(Sahiner, 2013)

NANOPRECIPITACIÓN

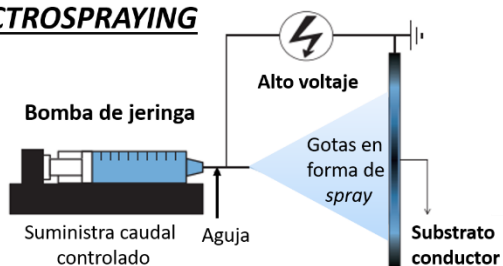


La nanoprecipitación consiste en disolver el polímero con el fármaco en un disolvente miscible en agua (como acetona). Posteriormente se añade gota a gota la fase acuosa (miscible con el disolvente orgánico, *crosslinker*). Inmediatamente se produce una insolubilización del polímero debido al desplazamiento interfacial del disolvente entre las dos fases. Las NPs se recogen por evaporación.

(Xu, 2016)

Tecnologías Emergentes

ELECTROSPRAYING



Se basa en una atomización electrohidrodinámica de la disolución polimérica en gotas de tamaño uniforme bajo la influencia de fuerzas eléctricas. La técnica de *electrospraying* ha tenido especial interés en aplicaciones de liberación de fármacos debido a sus numerosas ventajas frente a las técnicas convencionales. Preserva las propiedades bioactivas de las moléculas, evita la formación de aglomerados gracias a la micropulverización del polímero y es rentable y fácil de operar.

(Saallah y Lenggoro, 2018)

EMULSIFICACIÓN ACÚSTICA

una alternativa más ecológica

Ultrasonidos (US): la irradiación de líquidos mediante ultrasonidos permite llevar a cabo reacciones químicas (sonoquímica) a T^a ambiente que normalmente no podrían darse (NPs de plata con almidón como estabilizante). Esto permite generar NPs muy pequeñas de una manera eficiente, sencilla y no tóxica con elevados rendimientos.

(Mallakpour y Behranvand, 2016)

Radiación microondas (MW): al igual que los US, la síntesis de NPs con MW es una manera fácil y ecológica de generar nanocompuestos. Se necesita un solvente con elevada constante dieléctrica para que se dé la reacción (NMP, DMSO o DMF). Una aplicación actual para sintetizar nanomateriales es combinar las reacciones MW con los líquidos iónicos.

1.3.1. Método de nanoprecipitación

La nanoprecipitación es uno de los métodos más simples y extendidos para la síntesis de NPs funcionalizadas con fármacos. Este método es capaz de generar NPs con menores tamaños que las generadas por los métodos basados en emulsiones. Según lo comentado en la [Tabla 1.1](#) acerca del fundamento de la técnica, para el control del tamaño de partícula, su distribución y la eficiencia de encapsulación, se han de controlar parámetros tales como el ratio O/W, el pH, el solvente seleccionado y el ratio polímero/fármaco. Normalmente la eficiencia de encapsulación mediante nanoprecipitación de fármacos hidrófobos es inferior al 50%, mientras que la de los fármacos hidrófilos es bastante menor (Xu, 2016). Una ventaja de esta técnica es su versatilidad para la de numerosos fármacos (ciclosporina A, doctaxel, etc.) dentro de multitud de polímeros diferentes (PLGA, PLA, PCL, PMMA, PEI, etc.). Otra ventaja es que para la formación de las NPs no se requiere un aporte de energía externo ni el empleo de surfactantes. Esto hace del método de nanoprecipitación una tecnología limpia y económica. Sin embargo, un punto débil de esta técnica es su dificultad para la extracción y recuperación de las NPs sintetizadas (Xu, 2016). Por ello de todos los métodos convencionales disponibles en la actualidad se escogió la nanoprecipitación en este trabajo para la síntesis de los nanocomplejos.

1.3.2. *Electrospraying*

La técnica de *electrospraying* es una atomización electrohidrodinámica de un líquido, que genera pequeñas gotas cargadas de tamaño uniforme, bajo la influencia de fuerzas eléctricas. Esto se debe a que se produce una interacción Culombica de cargas entre el líquido y el campo eléctrico aplicado. Este fenómeno de interacción entre un líquido y un campo eléctrico fue reportado por primera vez en el siglo XVI por William Gilbert. Esta técnica consiste básicamente en dispensar una disolución conductora, mediante una bomba de jeringa que suministra un caudal controlado, a través de un capilar al que se le aplica un campo eléctrico externo. El líquido *esprayado* se recoge en un sustrato conectado a tierra. De esta manera se genera una diferencia de potencial entre el capilar cargado y el electrodo de descarga a tierra (Bagheri-Tar y cols., 2007; Saallah y Lenggoro, 2018). Cuando las fuerzas eléctricas, aplicadas sobre el líquido que sale del capilar, superan la tensión superficial del mismo se forma una especie de cono, conocido como cono de Taylor. Del cono de Taylor emerge un chorro que se rompe en pequeñas gotitas cargadas y monodispersas, como se puede apreciar en la [Figura 1.6](#). En el caso de que el líquido *esprayado* sea una disolución polimérica, al evaporarse el disolvente, conduce a la formación de pequeñas partículas esféricas monodispersas que suelen variar entre 60 nm hasta varias micras (Bagheri-Tar y cols., 2007).

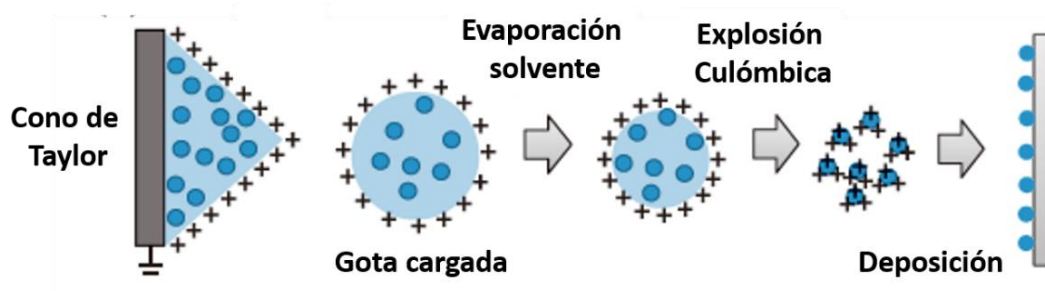


Figura 1.6. Mecanismo de formación de las NPs por la interacción Culómbica de cargas entre el líquido y el campo eléctrico aplicado. Modificado de (Saallah y Lenggoro, 2018).

En varios estudios realizados (Bagheri-Tar y cols., 2007; Saallah y Lenggoro, 2018) se demuestra que mediante esta técnica se es capaz de controlar el tamaño y la forma de las NPs producidas y por ello se escogió como metodología de síntesis de los nanocomplejos. Para ello se han de controlar las propiedades de la solución dispensada, como la conductividad o la tensión superficial, además del voltaje aplicado, la distancia entre los electrodos, el caudal y la concentración de la solución dispensada.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

En los últimos años, numerosos investigadores se han centrado en el desarrollo de las terapias génicas para la cura de multitud de enfermedades de base genética. Sin embargo, hoy en día no hay una cura testada para la enfermedad de la AME. El gran descubrimiento de los ASOs como potenciales fármacos para el tratamiento de las miopatías de base genética, ha llevado a los investigadores a estudiar métodos seguros y eficientes para su dispensación en el organismo. Actualmente hay dos tipos de vectores testados para el transporte de material genético *in vivo*, vectores virales y no virales. En este trabajo se escogerá el segundo tipo por las numerosas ventajas de transfección celular que presenta y por no generar respuesta inmune en el organismo.

Con este trabajo se pretende dar pasos hacia la obtención de un sistema de liberación del fármaco Nusinersen más eficiente y selectivo que los desarrollados hasta la fecha basado en vectores no virales, ya que se ha demostrado que las NPs poliméricas, utilizadas como vehículo de transporte del material genético y de fármacos, aseguran una dispensación segura en el organismo y preservan sus propiedades bioactivas. Además, este proyecto ofrece una ventaja adicional, ya que hace que la distribución del fármaco sea selectiva con las células diana mediante la funcionalización con aptámeros específicos para ellas. De esta manera se reducen notablemente las dosis requeridas de fármaco, abaratando los costes y reduciendo la citotoxicidad.

Es por ello que el objetivo principal del presente trabajo se enfocará en el estudio de las técnicas de procesado y la influencia de variables para el desarrollo de un sistema de NPs del polímero catiónico polietilenimina (PEI) con potencial para liberar el fármaco Nusinersen (testado clínicamente para el tratamiento de la AME). Para ello, se deberán cumplir los siguientes subobjetivos:

- Montaje y puesta a punto de los sistemas experimentales para la síntesis de nanocomplejos poliméricos de PEI-citrato empleando 2 metodologías: 1) nanoprecipitación y 2) *electrospraying*
- Definición y evaluación de la influencia de las variables de proceso sobre el tamaño de los nanocomplejos PEI – citrato.
- Análisis físico-químico y morfológico de los nanocomplejos sintetizados y comparativa de ambas metodologías de síntesis
- Evaluación de dos metodologías de funcionalización (dropwise y electrospraying coaxial) de los nanocomplejos PEI-citrato con un ASO sintético análogo del fármaco Nusinersen, el ASO – ISSN1.

3. METODOLOGÍA

3.1. SÍNTESIS DEL NANOCOMPLEJO PEI – CITRATO

Como se ha visto en apartados anteriores, hay numerosas metodologías disponibles en la bibliografía para sintetizar NPs poliméricas (Tabla 1.1). De todos ellos, en este trabajo se van a utilizar dos: 1) un método convencional de nanoprecipitación, basado en el trabajo desarrollado por Zhao y cols., (2011), y 2) la tecnología de *electrospraying*. Para ello se ha puesto a punto y se lleva a cabo el estudio de viabilidad, configuración y variables de proceso de la tecnología de *electrospraying*, que no ha sido utilizada hasta el momento para preparar NPs de complejo PEI – citrato y se ha comparado con los resultados obtenidos por nanoprecipitación. Es conveniente revisar el concepto de NPs en este sistema en particular. Hay estudios en la bibliografía (Liu y cols., 2020) que investigan la formación de nanocomplejos PEI – citrato, debido a la reticulación del polímero, que no son considerados como NPs esféricas cerradas, y por tanto de ahora en adelante se hablará de síntesis de nanocomplejos o NPs complejas. Más adelante se explicarán las reacciones que tienen lugar entre la PEI y el citrato de sodio.

3.1.1. Reactivos empleados para la síntesis del nanocomplejo PEI-citrato

Para la elaboración de las nanocomplejos PEI – citrato se utilizó solución de polietilenimina ramificada (60 kDa) en agua (50% w/v) suministrada por Sigma Aldrich (Nº de catálogo: P3143). Para la reticulación de la PEI y la formación de las NPs se utilizará citrato de sodio tribásico dihidrato (BioUltra, para biología molecular) con una pureza $\geq 99.5\%$ (NT), suministrado por Sigma Aldrich (Nº de catálogo: 71402).

Para el ajuste del pH de la disolución de PEI se utilizó ácido clorhídrico fumante (37%, EMSURE®, ACS, ISO) suministrado por Merck (Nº de catálogo 1.00317). Todas las disoluciones se llevaron a cabo con agua ultrapura, UP, (Mili-Q, Milipore).

Para la funcionalización de los nanocomplejos PEI – citrato se utilizó un ASO que imita al Nusinersen, el ASO – ISSN1, de 20 nucleótidos, cuya secuencia es 5'-ATCACTTTCATAATGCTGG-3' (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

3.1.2. Preparación de la disolución de PEI y ajuste del pH

Siguiendo el método propuesto por Zhao y cols. (2011), se procedió a preparar una disolución de PEI de 100 $\mu\text{g/mL}$ a pH 6, partiendo de una disolución madre de 10,000 $\mu\text{g/mL}$ para minimizar el error experimental en la pesada. Para la preparación de esta disolución madre se pesaron 500 mg de PEI disueltos en 50 mL de agua UP. La disolución se produjo mediante agitación magnética (1100 rpm). Una vez preparada la disolución madre, se diluye 1:100 en agua UP y se ajusta el pH de 8 – 9 a 6 utilizando una disolución de HCl fumante 0.1 N diluyendo 8.22 mL de HCl comercial en 1 L de agua UP. Para ello, midiendo con un pH – metro, se fue añadiendo la disolución de HCl 0.1 N gota a gota a la disolución preparada de PEI hasta obtener un pH final de 6.

3.1.3. Preparación de la disolución de citrato de sodio

Para obtener el tamaño óptimo de partícula, entrono a los 200 nm, se ha de variar la concentración de la disolución de citrato de sodio empleada, tal como demuestran en su trabajo Zhao y cols. (2011). Por lo tanto, el control de la concentración de reticulante es clave para encontrar el tamaño óptimo. Para este estudio se realizaron diferentes diluciones a partir de una disolución madre de citrato de sodio, a $100\ \mu\text{M}$, y comprobar así su efectividad en la formación de los nanocomplejos. Se parte de una disolución madre a $100\ \text{mM}$ de citrato de sodio y se realizan diluciones para preparar las disoluciones de diferentes concentraciones de citrato de sodio que se muestran en la Figura 3.1.

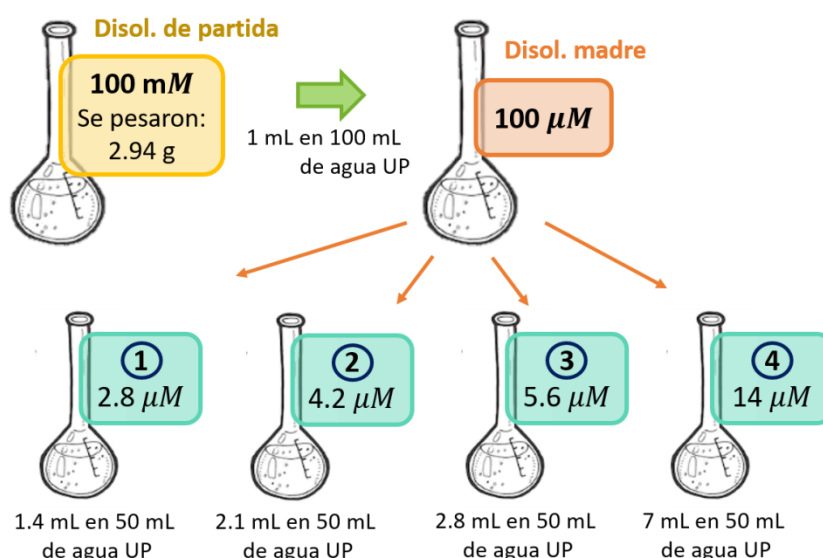


Figura 3.1. Procedimiento seguido para la preparación de las disoluciones de citrato de sodio a diferentes concentraciones de citrato de sodio (reticulante).

3.1.4. Nanoprecipitación del nanocomplejo PEI – citrato

En el sistema estudiado, PEI – citrato, la formación de los nanocomplejos tiene lugar mediante una reacción de condensación de amidas causada por la reticulación de las aminas primarias de la PEI en cuanto ésta entra en contacto con el reticulante, en este caso el citrato de sodio, como se muestra en la Figura 3.2 (Liu y cols., 2020). De esta manera se produce la reticulación del polímero dando lugar a pequeños complejos que constituyen las NPs complejas PEI – citrato deseadas. El tamaño de las mismas dependerá, en gran parte, de la concentración de reticulante utilizada. Basándose en trabajos previos (Li cols., 2015; Zhao y cols., 2011) se desarrollará un método de nanoprecipitación para la síntesis de los nanocomplejos. Como se ha explicado en la Tabla 1.1 el método de nanoprecipitación se basa en adicionar la disolución polimérica mediante la técnica *dropwise*, es decir, echar gota a gota sobre una fase acuosa donde se encuentra el *crosslinker* o reticulante. Para ello se adicionó la disolución de citrato de sodio (*dropwise*) sobre la disolución de PEI ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) ajustada a pH 6, mientras ésta es agitada, en una proporción 6:1. La concentración de citrato de sodio se variará según

se ha indicado anteriormente en la Figura 3.1 para ajustar el tamaño de partícula. Se dejará reaccionar durante 20 minutos.

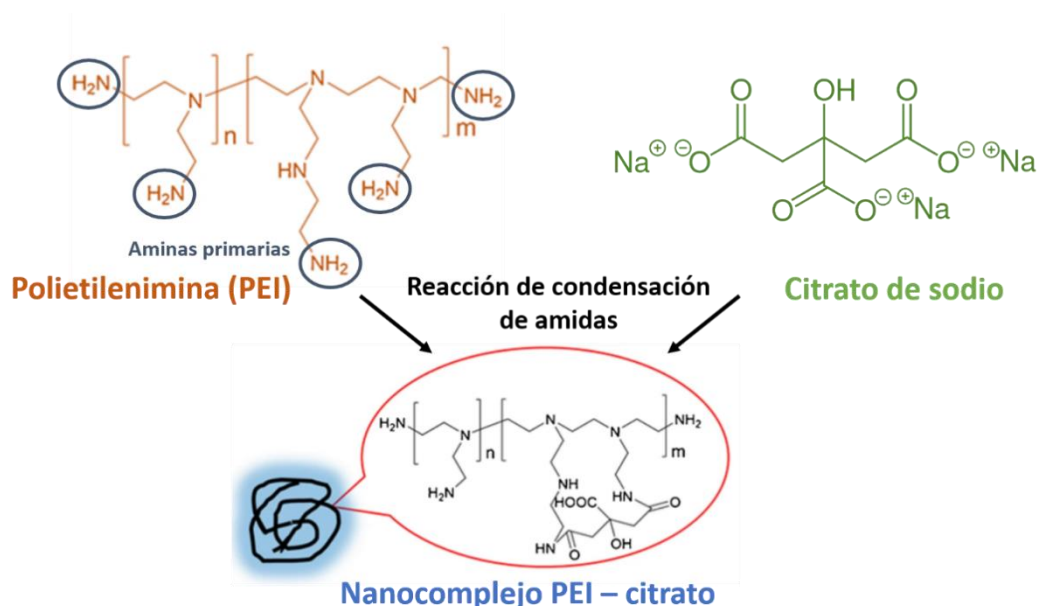


Figura 3.2. Reacción de condensación de las aminas primarias de la PEI con el citrato de sodio para la formación de los nanocomplejos PEI – citrato. Modificado de (Liu y cols., 2020).

Se usó agitación magnética para la dispersión del reticulante en la disolución polimérica. Se utilizó una placa agitadora a una velocidad de agitación de aproximadamente 1300 rpm para generar el menor tamaño del vórtice posible y conseguir así una agitación uniforme y eficaz.

Posteriormente al proceso de síntesis se decidió incluir un paso adicional antes de caracterizar las muestras, con el propósito de reducir la aglomeración. Este paso consiste en filtrar la muestra con un filtro de jeringa de $0.45 \mu\text{m}$, someter la muestra filtrada a ultrasonidos (20% de amplitud, durante 30 minutos en tandas de 10 minutos) para redispersar los nanocomplejos, y volver a filtrar con el mismo filtro de jeringa. De esta manera se pretenden mejorar las caracterizaciones de tamaño de los nanocomplejos. En la etapa de ultrasonidos, debido a la gran energía suministrada a la muestra, es necesario introducir la muestra en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la misma.

3.1.5. *Electrospraying* del nanocomplejo PEI – citrato

Como se ha explicado en el apartado 1.3.2, la técnica de *electrospraying* consiste en bombear mediante una bomba de jeringa una solución conductora a través de una aguja cargada. El campo eléctrico se sitúa entre la aguja y un electrodo de descarga a tierra produciendo una diferencia de potencial entre ambos.

Los elementos principales que conforman el sistema de *electrospraying* desarrollado en este trabajo (Figura 3.3) son los siguientes:

- Una fuente de potencia de alto voltaje, en el rango de kV
- Un capilar metálico, o aguja, por el que se dispensará la disolución deseada
- Un electrodo de descarga a tierra para generar un gradiente de potencial.
- Una bomba de jeringa que suministre un caudal controlado, normalmente mL/h

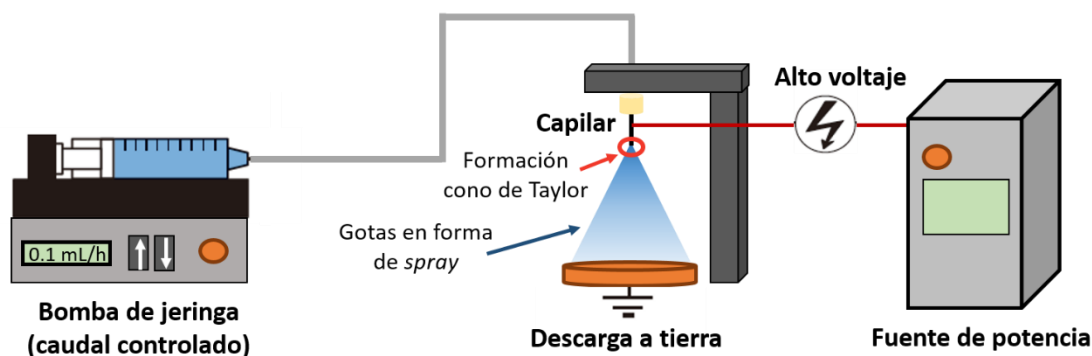


Figura 3.3. Esquema del sistema de *electrospraying* desarrollado en el trabajo.

El equipo de *electrospraying* utilizado en este trabajo pertenece a la casa comercial LINARI, NanoTech (Modelo: BI-ESS-TNT-AL-60P-KIT). Para la puesta a punto del sistema experimental se tuvieron que optimizar los siguientes parámetros: voltaje aplicado, distancia entre los electrodos y caudal y concentración de la solución dispensada. Además, se probaron 2 configuraciones diferentes que se detallarán a continuación. Todas las muestras sintetizadas fueron sometidas a la etapa de filtrado – ultrasonificación – filtrado descrita en el apartado 3.1.4.

3.1.5.1. Configuración 1: PEI sobre citrato de sodio

En esta primera configuración se decide evaluar la influencia de *esprayar* el polímero sobre la disolución reticulante de citrato de sodio que se mantenía con agitación magnética.

El montaje experimental del sistema final se muestra en la [Figura 3.4a](#). En primer lugar, se cargó la disolución polimérica (PEI 100 $\mu\text{g/mL}$) en la bomba de jeringa. Antes de su puesta en marcha es necesario dejar desgasificar la disolución polimérica dentro de la jeringa para que no quede ninguna burbuja dentro. Una vez asegurada la eliminación total de las burbujas se hará pasar la disolución polimérica, por un tubo de conexión, hasta su salida por la aguja (electrodo de aplicación de voltaje). En este paso también es necesario asegurarse de que no quede ninguna burbuja en el tubo de conexión, de lo contrario el *esprayado* sería ineficiente.

Tal y como se muestra en la [Figura 3.4b](#) se coloca una placa Petri de cristal sobre la placa agitadora. Sobre esta placa Petri se deposita un aro metálico (electrodo de descarga a tierra) y un frasco de vidrio que contiene 6 mL de disolución de citrato de sodio, 2.8 μM . Se escogió esta concentración de reticulante, por ser la que menor tamaño de partícula generaba, después de haber analizado los resultados obtenidos en el método de nanoprecipitación. Se comprobó que el bote del reticulante se situaba justo en el centro de la placa, y que el vórtice generado era pequeño, para asegurar una agitación eficaz.

Finalmente se activó la bomba de jeringa y se esperó a que cayese la primera gota por la aguja. Acto seguido se cerró la campana y se activó el filtro de carbono (para eliminar los disolventes volátiles) y la fuente de potencia. El voltaje se seleccionó en base a la estabilidad del cono de Taylor generado. Se *esprayó* un volumen total de 1 mL de PEI para cumplir el ratio 1:6.

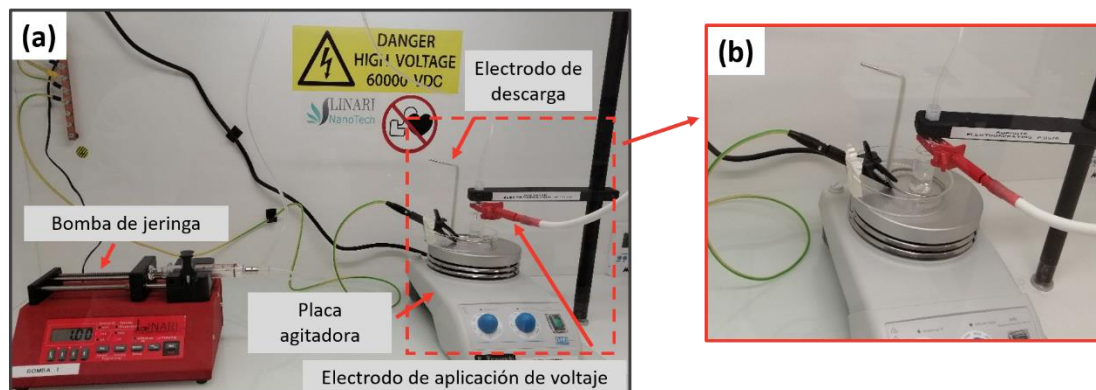


Figura 3.4. (a) Montaje experimental de la configuración PEI sobre citrato de sodio, 1:6, y (b) detalle de la conexión de los electrodos.

Para la puesta a punto del sistema experimental se fueron variando las condiciones de voltaje (10, 15 y 20 kV), caudal (0.5, 1 y 1.5 mL/h), distancia entre electrodos (2.5, 3 y 4 cm), configuración de la aguja (1 punta o 4 puntas) y velocidad de agitación (control del vórtice generado) para obtener el tamaño de partícula óptimo. Se realizaron diferentes pruebas combinando las diferentes condiciones, mencionadas anteriormente, hasta conseguir la combinación que produjese la distribución de tamaño de partícula óptima:

- 1ª prueba: variación del caudal dispensado a un voltaje fijo de 15 kV y una distancia entre electrodos de 2.5 cm.
- 2ª prueba: variación del voltaje aplicado a un caudal de 1 mL/h y una distancia entre electrodos de 2.5 cm.
- 3ª prueba: variación de la distancia entre electrodos a un voltaje de 15 kV y dispensando 1 mL/h.

La configuración de la aguja y la velocidad de agitación se ajustaron en la primera prueba hasta dar con las condiciones óptimas, y éstas se reprodujeron en la 2ª y 3ª prueba. Las condiciones finales se muestran en la [Tabla 3.1](#).

Como se está trabajando con un sistema que opera a voltajes muy elevados, en el rango de los kilovoltios [kV], las medidas de seguridad se han de cumplir estrictamente ya que supone un riesgo para la salud. Antes de operar con el equipo se recibieron las nociones básicas de seguridad en base a lo estipulado en el manual de seguridad y uso del equipo. Una vez se ha acabado el experimento, es necesario comprobar que el voltaje del sistema está en 0 kV para poder abrir la campana. Una vez abierta la campana es necesario tocar con un palo de punta metálica, conectado a tierra, todas las partes metálicas del sistema por si pudiera quedar alguna corriente residual. Una vez hecho esto ya se puede manipular el sistema de manera segura.

Tabla 3.1. Valores óptimos de las variables de operación del sistema de *electrospraying* PEI sobre citrato de sodio, 1:6.

VARIABLE DE OPERACIÓN	VALOR ÓPTIMO
Caudal de PEI esprayado [mL/h]	1
Volumen total dispensado [mL]	1
Concentración de PEI [$\mu\text{g/mL}$]	100
Voltaje aplicado [kV]	15
Distancia entre electrodos [cm]	3
Tipo de aguja [-]	1 punta
Diámetro de la aguja [mm]	0.8
Velocidad de agitación [rpm]	800

3.1.5.2. Configuración 2: citrato de sodio sobre PEI

También se ensayó la configuración inversa, citrato de sodio sobre disolución de PEI, semejante a la metodología utilizada en el método convencional de nanoprecipitación. En este caso se *esprayan* 6 mL la disolución de citrato de sodio ($2.8 \mu\text{M}$) sobre 1 mL de la disolución de PEI ($100 \mu\text{g/mL}$). En esta configuración en particular se decidió quitar la agitación magnética porque el bajo volumen de disolución de PEI en el vaso colector impedía alcanzar unas condiciones de agitación adecuadas. Se siguió el mismo método explicado en el apartado 3.1.5.1 pero invirtiendo las disoluciones. En esta configuración se utilizó como electrodo de descarga a tierra una placa metálica sobre la que se depositó un vaso de precipitados con la disolución de PEI (Figura 3.5a). Además, debido a que en este caso el volumen a dispensar era bastante elevado (6 mL), y que se trabaja a caudales bastante pequeños, se optó por utilizar una aguja de 4 puntas para aumentar el rendimiento (Figura 3.5b) y reducir el tiempo de operación.

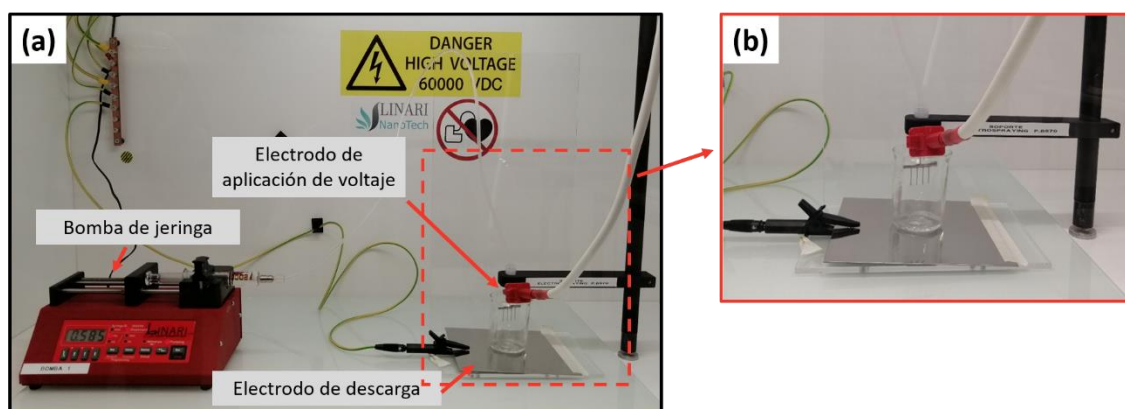


Figura 3.5. (a) Montaje experimental de la configuración citrato de sodio sobre PEI, 6:1, y (b) detalle de la conexión de los electrodos y la configuración de la aguja.

En este caso, al escoger una configuración de aguja de 4 puntas se necesitó aumentar el caudal para que se *esprayase* la disolución por las 4 agujas, por ello se fijó en 6 mL/h. A partir de este valor de caudal se realizaron varios experimentos preliminares variando

el voltaje aplicado (15, 20 y 22 kV) y la distancia entre electrodos (3 y 3.7 cm). Los valores óptimos de las variables de operación se muestran en la [Tabla 3.2](#).

Tabla 3.2. Valores óptimos de las variables de operación del sistema de *electrospraying* citrato de sodio sobre PEI, 6:1.

VARIABLE DE OPERACIÓN	VALOR ÓPTIMO
Caudal de citrato de sodio esprayado [mL/h]	6
Volumen total dispensado [mL]	6
Concentración de citrato de sodio [μ M]	2.8
Voltaje aplicado [kV]	20
Distancia entre electrodos [cm]	3.7
Tipo de aguja [-]	4 puntas
Diámetro de cada aguja [mm]	0.8
Velocidad de agitación [rpm]	Sin agitación

3.1.6. Funcionalización del nanocomplejo PEI – citrato

Como etapa final de ambos procesos de síntesis de los nanocomplejos PEI – citrato, se realizó una funcionalización con oligonucleótidos antisentido sintéticos, basados en ADN, para comprobar su influencia en la aglomeración de los nanocomplejos, así como su estabilidad en ellos, y asegurar de este modo su efectividad como vehículo para la liberación controlada de fármacos. Se probaron 2 configuraciones de trabajo:

3.1.6.1. Post-funcionalización con ADN de los nanocomplejos PEI – citrato

Para la funcionalización externa de los nanocomplejos PEI – citrato se escogió un análogo sintética de fármaco nusinersen, el ASO - ISSN1. La concentración que recomiendan otros autores (Pagliarini y cols., 2020) del ASO – ISSN1 para cultivos celulares es de 200 nM y por tanto fue la empleada en estos experimentos.

Basándose en los resultados obtenidos por Zhao y cols. (2011), se adicionaron mediante la técnica *dropwise* 3 partes por volumen de disolución de PEI (3:1) de una disolución de ASO – ISSN1 sobre la suspensión de nanocomplejos en agitación magnética, a los 5 minutos de reacción. Es importante escoger correctamente el tiempo de adición del ASO para tener un control aproximado del tamaño de partícula generado. Estos autores en su estudio, consiguen obtener un tamaño de partícula estable, de entre 120 – 140 nm, adicionando el fármaco a los 5 minutos de reacción, por tanto se escogió ese mismo tiempo para controlar el tamaño de los nanocomplejos PEI – citrato generados.

3.1.6.2. *Electrospraying* coaxial de la disolución polimérica y de ADN

Por último, se realizó una prueba de *electrospraying* coaxial para intentar recubrir, en la medida de lo posible, el ASO – ISSN1 con la PEI ya que no se cree la existencia de NPs PEI – citrato esféricas sino de nanocomplejos de PEI – citrato reticulados plegados sobre sí mismos. La ventaja de esta técnica para generar nanocomplejos PEI – ASO frente a las técnicas convencionales, como la aerosolización, es que los materiales biológicos (ADN, células o proteínas) pueden ser electroesprayados sin perder su actividad biológica ni ser dañados. Normalmente mediante el *electrospraying* coaxial se generan NPs *core – shell* (núcleo – carcasa) donde el material biológico se encuentra recubierto por el material polimérico. Aun así, hay muy pocas referencias en la literatura que apliquen esta técnica para dispensación de fármacos (Wu y cols., 2010). En este trabajo se pretende poner a punto este novedoso sistema para mejorar la eficiencia del sistema de dispensación del fármaco Nusinersen en el organismo.

El desarrollo de esta técnica se basó en el trabajo desarrollado por Wu y cols. (2010) pero aplicado a este sistema en concreto. La metodología seguida es similar a la explicada en las 2 configuraciones anteriores de *electrospraying* pero con alguna variación. En este caso se requieren 2 bombas de jeringa dispuestas en paralelo para la dispensación de ambas disoluciones, la polimérica y la del ASO – ISSN1. También se cambiará la aguja por una coaxial donde la disolución de ASO fluirá por el capilar interior y la disolución polimérica por el exterior. En este caso se optará por la configuración descrita en el apartado 3.1.5.2 donde las NPs *core – shell* se recogerán en un vaso de precipitados con 6 mL de disolución de citrato de sodio (2.8 μ M), es ahí donde se producirá la reticulación de la PEI. Se dispensaron 3 mL de una disolución de ASO a 200 nM, basándose en la concentración que recomiendan para cultivos celulares Pagliarini y cols. (2020) en su trabajo. El sistema experimental se muestra en la Figura 3.6.

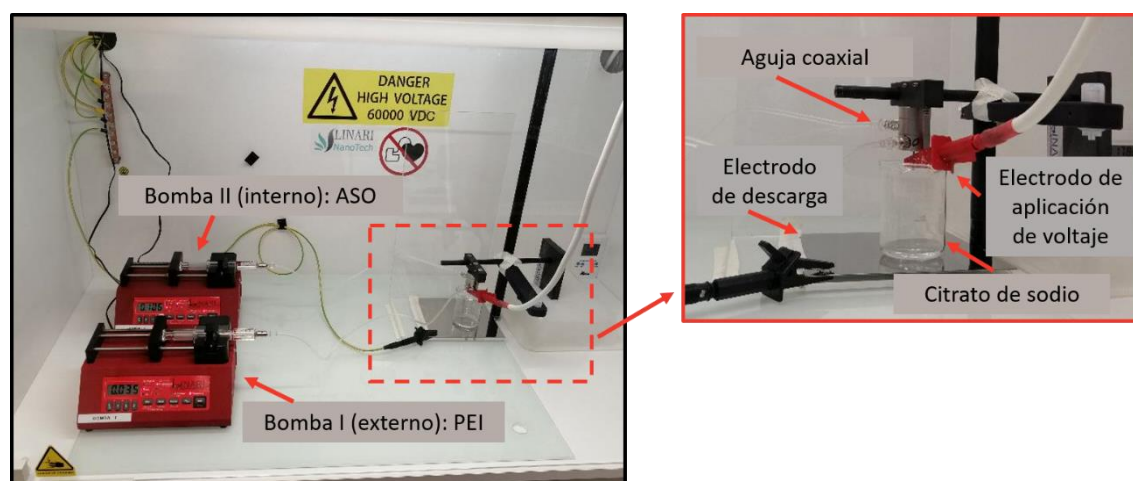


Figura 3.6. Montaje experimental de la configuración coaxial para el recubrimiento del ADN con la PEI.

Como en las configuraciones anteriores, se probaron diferentes combinaciones de caudales de polímero (0.5 y 1 mL/h) y ASO – ISSN1 (0.5, 1 y 3 mL/h), y voltaje (15, 17 y 20 kV) para conseguir el tamaño óptimo. Los valores finales de las variables de operación se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Valores óptimos de las variables de operación del sistema de *electrospraying* coaxial para la encapsulación del ASO – ISSN1.

VARIABLE DE OPERACIÓN	VALOR ÓPTIMO
Caudal de PEI esprayado [mL/h]	1
Caudal de ASO – ISSN1 esprayado [mL/h]	1
Concentración de PEI [$\mu\text{g/mL}$]	100
Concentración de ASO – ISSN1 [nM]	200
Voltaje aplicado [kV]	17
Distancia entre electrodos [cm]	6
Tipo de aguja [-]	Coaxial
Diámetro interno de la aguja [mm]	0.8
Diámetro externo de la aguja [mm]	1.65
Velocidad de agitación [rpm]	Sin agitación

3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DEL NANOCOMPLEJO PEI – CITRATO

Para la caracterización morfológica y físico – química de los nanocomplejos PEI – citrato sintetizados se realizaron diferentes técnicas analíticas.

3.2.1. Técnica de dispersión de luz dinámica, DLS (*Dynamic Light Scattering*)

La técnica DLS es una técnica físico – química que se utiliza para analizar las propiedades dinámicas y la distribución de tamaños de multitud de sistemas físicos, químicos y biológicos que están formados por material en suspensión. Este material en suspensión pueden ser macromoléculas (proteínas, polímeros, etc.), coloides, nanopartículas, micelas o emulsiones, entre otros (LS Instruments, 2020).

Esta técnica consiste en iluminar la muestra con un rayo láser. Las fluctuaciones de la luz dispersada por las partículas en suspensión de la muestra se traducen en un ángulo de dispersión (θ) detectado mediante un detector de fotones (Figura 3.7). Esto quiere decir que cuando una suspensión de partículas es golpeada por un haz de luz monocromática (láser), se producen ondas de luz dispersas que generan una intensidad de luz dispersa ($I_s(t)$). Debido al movimiento aleatorio de las partículas (movimiento *Browniano*) en suspensión dentro del volumen de la muestra, se generan fluctuaciones en las distancias entre las partículas, y por consiguiente, fluctuaciones de la luz dispersa. Por tanto, el análisis de la fluctuación de la luz dispersa proporciona información sobre el movimiento de las partículas, lo cual a su vez se traduce en un radio hidráulico. Este radio se obtiene a partir del coeficiente de difusión, calculado a partir de $I_s(t)$, mediante la ecuación de Stokes – Einstein (LS Instruments, 2020):

$$r = \frac{k_B T}{6 \pi \eta D} \quad (1)$$

Donde:

r = radio hidráulico de la partícula [m]

D = coeficiente de difusión [m^2/s]

k_B = constante de Boltzmann [J/K]

T = temperatura absoluta [K]

η = viscosidad dinámica de la muestra [$N \cdot s/m^2$]

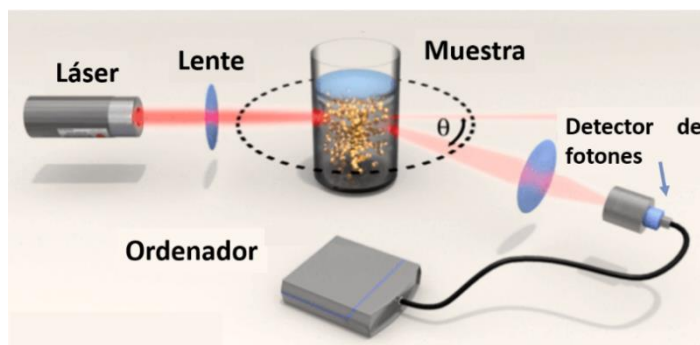


Figura 3.7. Fundamente de la técnica de dispersión de luz dinámica, DLS (LS Instruments, 2020).

Previamente a la medición de los nanocomplejos, se realizó a todas las muestras el pretratamiento de filtrado explicado en el apartado 3.1.4. Para la aplicación de esta técnica se utilizó el equipo Zetasizer (Nano ZS, Malvern Panalytical). Este equipo utiliza un láser He – Ne a una longitud de onda de 633 nm (máximo 4 mW) con una potencia de 100 VA a 25°C. Gracias a esta tecnología se permite medir muestras de entre 0.3 nm – 10 micras de diámetro con una precisión de $\pm 2\%$ (Malvern Panalytical, 2020).

3.2.2. Técnica de movilidad electroforética

Mediante esta técnica se permite calcular el potencial zeta de una suspensión de partículas cargadas. Cuando las NPs cargadas se dispersan en un líquido, alrededor de su superficie se genera una capa de iones de carga opuesta, denominada capa de Stern. La capa de Stern induce la formación de una segunda capa difusa compuesta por los iones del medio que se unen débilmente a ésta. Esto se conoce como la “doble capa eléctrica”. De esta manera, cuando las NPs se mueven aleatoriamente por el líquido, debido a la gravedad o a la actuación de un campo eléctrico externo, existe un límite entre los iones de la capa difusa y los que se mueven libremente en el seno del líquido. El potencial electrostático generado en ese plano se denomina potencial zeta (Caputo, 2015).

Por ello, para la medición del potencial zeta se suele aplicar un campo eléctrico a través de la muestra, induciendo el movimiento de las partículas cargadas. La relación entre la velocidad de las NPs y el campo eléctrico aplicado se conoce como movilidad electroforética (μ_e), la cual es medida y convertida en potencial zeta mediante la ecuación de Henry (Caputo, 2015):

$$\mu_e = \frac{2 \varepsilon z f(k \cdot \alpha)}{3 \eta_o} \quad (2)$$

Donde:

μ_e = movilidad electroforética [$m^2/V \cdot s$]

ε = constante dieléctrica del medio [-]

z = potencial zeta [mV]

$f(k \cdot \alpha)$ = función de Henry, donde α es el radio de la partícula y k es el parámetro de Debye, que representa el espesor de la doble capa eléctrica. EL valor de la función de Henry está comprendido entre 1 – 1.5 en función de la polaridad del medio. Normalmente para medios acuosos utilizados en aplicaciones biológicas el valor más apropiado es $f(k \cdot \alpha) = 1.5$.

η_o = viscosidad absoluta de corte cero (zero-shear viscosity) del medio [$mPa \cdot s$]

El equipo de medición, en este caso Zetasizer (Nano ZS, Malvern Panalytical), tiene una opción para cuantificar la movilidad electroforética iluminando la muestra con un láser y midiendo el desplazamiento de la frecuencia de la luz dispersada por las NPs cargadas de la disolución. El Zetasizer mide este cambio de frecuencia mediante una técnica interferométrica de laser Doppler patentada llamada M3 – PALS (dispersión de luz para análisis de fase, siglas en inglés) que permite calcular el potencial zeta y su distribución en la muestra. Este equipo permite medir NPs de entre 3.8 nm – 100 micras de diámetro (Caputo, 2015; Malvern Panalytical, 2020). Antes de la medición de las muestras se realizó el mismo pretratamiento de filtración explicado en el apartado 3.1.4.

3.2.3. Microscopía electrónica de transmisión, TEM

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, siglas en inglés) es una técnica analítica empleada para observar la ultraestructura y la morfología de especímenes de pequeño tamaño, como microorganismos, células o nanomateriales, entre otros. Esta tecnología fue desarrollada en 1931 por los científicos alemanes Max Knoll y Ernst Ruska y ha ido evolucionando hasta la actualidad para convertirse una de las técnicas más comunes y eficientes, dentro del campo de la ciencia y la ingeniería, para el análisis de micro- o nano-estructuras. El TEM permite observar los materiales objeto de análisis con una magnificación y resolución mucho mayor que lo permitido con un microscopio óptico. Esto se debe a que el TEM utiliza un haz acelerado de electrones en sustitución al haz de luz empleado en el microscopio óptico, y la longitud de onda de los electrones es mucho más pequeña que la de los fotones. De esta manera se permite un análisis de las muestras a nivel atómico, lo que significa una magnificación de menos de 1 nm (Fields, 2019).

El funcionamiento de esta técnica consiste básicamente en hacer pasar un haz de electrones a través de la muestra. El cañón de electrones los acelera a velocidades extremadamente altas utilizando bobinas electromagnéticas y voltajes de hasta varios millones de voltios. Mediante una lente condensadora el haz de electrones se enfoca en un haz pequeño y delgado que elimina los electrones de mayor ángulo. Este pequeño haz de electrones, de alta velocidad, atraviesa el espécimen (muestra) ultra delgado. Al atravesar la muestra, parte de ese haz se transmite en función de la transparencia que presente la muestra a los electrones. La lente del objetivo enfoca la parte del rayo que se emite desde la muestra y conforma una imagen. Esta imagen se llama micrografía y

es observada a través de su proyección en una pantalla fosforescente que, cuando es irradiada por el haz de electrones, emite fotones. Para la obtención de la imagen se puede utilizar una cámara, colocada debajo de la pantalla, o un dispositivo de carga acoplado (CCD). De esta manera se obtiene una imagen en donde aparecen las distintas partes y la morfología de la muestra en diferentes tonalidades, en función de su densidad (Fields, 2019).

Otra parte importante del TEM es el sistema integrado de vacío, esencial para garantizar que los electrones no choquen con los átomos de gas. Los TEMs que emplean elevados voltajes requieren de niveles de vacío bastante elevados, en cuyo caso se usa un sistema de vacío adicional (Fields, 2019).

En el presente trabajo, para el análisis de los nanocomplejos, es necesario que estén secos. Para ello, se dejó evaporar el disolvente, en este caso agua, a secación empleando una estufa de vacío a 100 mbar y aplicando temperatura para acelerar el proceso de evaporación (40°C). Posteriormente se añadieron, a los nanocomplejos secos, 100 μ L de agua UP para resuspenderlos y se depositaron sobre una rejilla de níquel recubierta de una película de formvar. El formvar es una resina polivinilformal termoplástica (un copolímero de alcohol polivinílico y formaldehído con acetato de polivinilo) utilizada normalmente como revestimiento o a modo de película soporte para microscopía electrónica. Para el análisis de los nanocomplejos se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL EM-1011 (Japan) que opera a 80 kV y está equipado con una cámara digital Orius 1200A (Gatan, USA) y el software Digital Micrograph (Gatan, USA).

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando un programa de procesamiento de imágenes (FIJI, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) para cuantificar el diámetro real de los nanocomplejos sintetizados.

4. RESULTADOS

Se realizó un estudio de la influencia de las variables de operación, y de la configuración del sistema experimental, sobre el tamaño de partícula y la monodispersidad de la muestra de las metodologías de síntesis de NPs empleadas (nanoprecipitación y *electrospraying*). Además, se evaluó la influencia de la funcionalización de los nanocomplejos con ADN sobre la distribución de tamaño de partícula empleando diferentes técnicas de funcionalización. Para la caracterización del tamaño de los nanocomplejos se utilizó la técnica DLS y análisis de imágenes TEM, esta última además permitió analizar la morfología de los nanocomplejos. Por último, para evaluar el grado de funcionalización de los nanocomplejos se analizó el potencial zeta mediante la técnica de movilidad electroforética.

4.1. SÍNTESIS DE NANOCOMPLEJOS PEI – CITRATO MEDIANTE DE NANOPRECIPITACIÓN: INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN

En primer lugar se optimizó la metodología de nanoprecipitación, para la síntesis de los nanocomplejos PEI – citrato, analizando la influencia que tienen sobre el tamaño de partícula, y su distribución en la muestra: (1) la concentración de reticulante (citrato de sodio) y (2) la introducción de una etapa de filtración – ultrasonicación – filtración posterior a la síntesis. Para este análisis se evaluarán los datos obtenidos por DLS y se confirmarán con las imágenes TEM obtenidas.

4.1.1. Influencia de la concentración de citrato de sodio

Como se explicó anteriormente en el apartado 3.1.3, la concentración de reticulante empleada es clave para controlar el tamaño de partícula. Cuanto mayor sea la concentración de éste, mayor será el índice de reticulación de la PEI y se generaran nanocomplejos de mayor tamaño, incluso aglomeraciones con los nanocomplejos cercanos. En la Figura 4.1a se muestran las distribuciones de tamaño de los nanocomplejos generados a diferentes concentraciones de reticulante, y su tamaño medio e índice de polidispersidad (PDI) se muestran en la tabla recogida en la Figura 4.1c .

Se observa que a medida que aumenta la concentración de reticulante la curva de la distribución de tamaños se ensancha (Figura 4.1a) y su tamaño medio aumenta considerablemente (Figura 4.1c), pasando de unos 427.4 ± 45.6 nm a la concentración más baja a unos 1284.7 ± 42.7 nm, a la concentración más elevada (14 μ M). Este último valor tan elevado del tamaño medio de partícula se debe a la existencia de dos poblaciones de nanocomplejos de diferente tamaño, siendo la última de estas cercana a los 5000 nm.

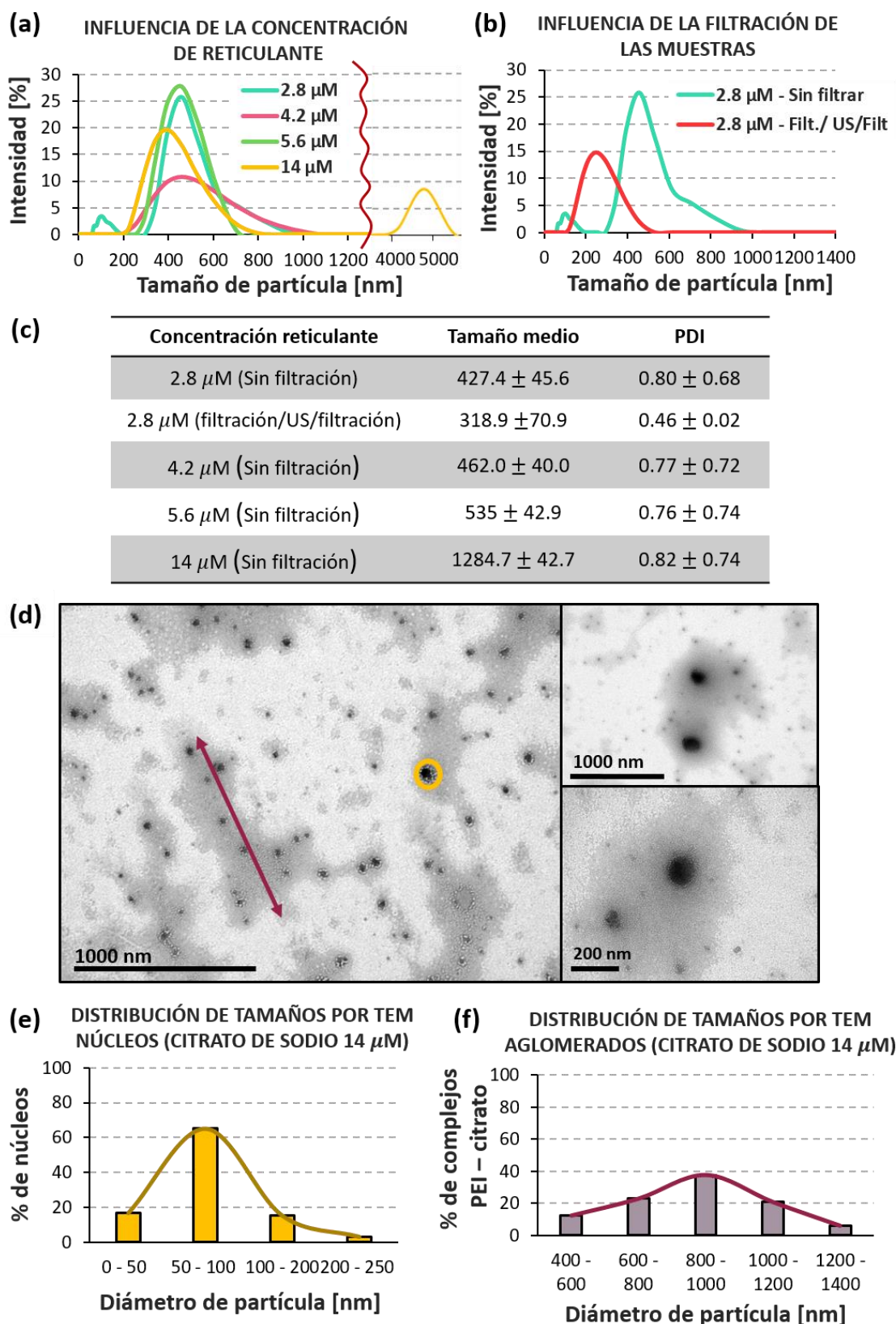


Figura 4.1. Distribución de tamaños de partícula obtenidos para el análisis de la **(a)** influencia de la concentración de reticulante y **(b)** de la incorporación de una etapa adicional de F – US – F, **(c)** resumen de los tamaños medios de partícula obtenidos y sus PDI, **(d)** imágenes TEM de los nanocomplejos a 14 μM y **(e)** su distribución de tamaños obtenida en función de la medición de los núcleos de PEI o **(f)** de la red de nanocomplejos PEI – citrato generada.

Según explican Zhao y cols. (2011) en su artículo, se corrobora que el tamaño de partícula está directamente relacionado con la concentración del reticulante. Ellos demuestran que a medida que aumentan la concentración de reticulante, pasan de tener un tamaño final de 120 nm (con la menor concentración) a un tamaño final de casi 1000 nm. Además, comprueban que los nanocomplejos con mayor cantidad de citrato de sodio son más inestables a medida que transcurre el tiempo de reacción, es decir, su tamaño sigue creciendo sin llegar a estabilizarse, hecho que sucede con los nanocomplejos a 14 μM de citrato de sodio que poseen poblaciones de tamaños excesivamente elevados. Esta relación tan estrecha entre la concentración de reticulante y el tamaño de partícula se debe a que, como se explicó en el apartado 3.1.4, la formación de los nanocomplejos PEI – citrato tiene lugar debido a la reticulación del polímero, por medio de las aminas primarias, cuando entra en contacto con el reticulante. Por lo tanto, a medida que la concentración de citrato de sodio aumenta, se produce una mayor reticulación del polímero a causa del aumento de las reacciones de condensación de amidas, generando así nanocomplejos de mayor tamaño. Es por ello que la concentración de citrato de sodio más favorable es la más pequeña (2.8 μM) y permitirá aproximar los tamaños de partícula a los 200 nm.

Por otro lado, para comprender las distribuciones de tamaños obtenidas es importante analizar el PDI de cada muestra. El PDI es una medida del grado de aglomeración de las partículas y está directamente relacionado con la distribución de tamaños de partícula. Un PDI cercano a 0 indica que la muestra es monodispersa, o lo que es lo mismo, que la distribución de tamaños de partícula es muy estrecha. Esto significa que en la muestra la gran mayoría de las NPs son del mismo tamaño. Por el contrario, si el PDI es cercano a la unidad se tiene una muestra muy polidispersa con agregados de partículas. Cuando el PDI es mayor de 0.7 la distribución de tamaños es demasiado amplia y probablemente la muestra no sea apta para ser medida por DLS. Si se presta atención a los PDI obtenidos a cada concentración de reticulante (Figura 4.1c), entre 0.7 – 0.8, se deduce que todas las muestras son demasiado polidispersas con nanocomplejos aglomerados. Esto se corresponde con las curvas de distribución de tamaños tan anchas que se obtuvieron (Figura 4.1a), viendo que hay diferentes poblaciones de tamaños y siendo la media de todas ellas el tamaño medio suministrado por DLS.

Por este motivo se obtienen tamaños medios de partícula muy superiores a los 200 nm, tamaño máximo recomendado para transfección celular (Zakeri y cols., 2018), incluso a la concentración más baja de reticulante (2.8 μM). La presencia de poblaciones de complejos de alto tamaño en estas muestras puede deberse un efecto de aglomeración de los nanocomplejos atribuible a su carga superficial ($+19.5 \pm 8.1$ mV) muy próxima a la neutralidad, similar con la reportada en la bibliografía para los nanocomplejos PEI – citrato (Zhao y cols., 2011), de unos $+10 \pm 0.6$ mV, lo que hace que las fuerzas de repulsión entre ellos sean casi nulas.

Por otro lado, para comprobar la morfología de los nanocomplejos se analizaron las imágenes TEM de los nanocomplejos PEI-citrato sintetizados. En la Figura 4.1d se observa que, utilizando una concentración de reticulante de 14 μM , se forman unos núcleos más oscuros (previsiblemente de polímero PEI) con una morfología esférica que se encuentran interconectados por un material grisáceo (previsiblemente el reticulante citrato) formando los nanocomplejos PEI – citrato.

Con el programa de análisis de imagen, ImageJ, se realizaron dos análisis de medición de diámetro de partícula: uno teniendo en cuenta solo los núcleos esféricos de polímero (señalado en amarillo en la Figura 4.1d) y un segundo análisis midiendo la longitud, en diferentes direcciones, de la red PEI – citrato que engloba varios núcleos de PEI (señalado en morado en la Figura 4.1d). En la Figura 4.1e se aprecia una distribución de tamaños bastante estrecha con un tamaño medio entre 50 – 100 nm de los núcleos de PEI. En contraposición, si se mide la red PEI – citrato que rodea a cada núcleo de PEI (Figura 4.1f) se observa que la distribución de tamaños es muy amplia, acorde con el elevado PDI obtenido por DLS (0.80 ± 0.68), y que el tamaño medio está entre 800 – 1000 nm, similar también al obtenido por DLS (1284.7 ± 42.7). De esta manera se ha comprobado que el tamaño medio obtenido en el DLS se corresponde aproximadamente con el de los nanocomplejos PEI-citrato observado en las imágenes TEM.

Que se obtenga por TEM un menor tamaño de partícula que con la técnica DLS se explica desde el punto de vista del diámetro hidrodinámico, medido por esta última. Cuando las partículas dispersas son movidas por un medio líquido, se les adhiere a su superficie una capa eléctrica dipolar que aumenta su tamaño. El diámetro generado por la adherencia de dicha capa eléctrica se conoce como diámetro hidrodinámico. El grosor de esta capa eléctrica depende de diversos factores físico – químicos del líquido donde están suspendidas, una de ellas la conductividad. Este diámetro normalmente es superior al que se puede observar en un microscopio electrónico de transmisión (FRITSCH, 2020). Por tanto, es razonable pensar que el diámetro observado por TEM disminuya respecto al obtenido por DLS, siendo el primero de estos el real de la muestra. Además hay que tener en cuenta, que en disolución la formación de los agregados en las condiciones de carga neutra de los nanocomplejos es muy factible, dando lugar a una medida de tamaño medio por DLS superior.

4.1.2. Influencia de la introducción de una etapa de filtrado posterior a la síntesis

En base a los resultados obtenidos, se decidió introducir una etapa adicional al proceso de síntesis de nanocomplejos. Debido al pequeño tamaño que presentan los nanocomplejos, cualquier traza de polvo o suciedad ambiente que pudiese depositarse en la muestra durante el proceso de síntesis perturbaría considerablemente la medición del tamaño de partícula por DLS. Por este motivo, entre otros, se decidió incorporar una etapa de filtrado ($0.45 \mu\text{m}$) justo al terminar el proceso de síntesis. Además, se decidió aplicarle ultrasonidos (US) para romper los aglomerados de partículas y favorecer la monodispersidad de la muestra. El proceso completo se detalla en el apartado 3.1.4. Se realizó un nuevo batch de nanocomplejos PEI – citrato por nanoprecipitación, a $2.8 \mu\text{M}$, y una vez finalizados los 20 minutos de reacción, los nanocomplejos fueron filtrados, ultrasonificados y de nuevo filtrados antes de su medición por DLS. El resultado obtenido se comparó con los nanocomplejos sintetizados a la misma concentración de citrato de sodio sin filtrar (Figura 4.1b).

Se observa que la distribución de tamaños de partícula se estrecha considerablemente cuando las muestras son filtradas, además de presentar una importante reducción del tamaño medio obtenido, $318.9 \pm 70.9 \text{ nm}$ frente a los $427.4 \pm 45.6 \text{ nm}$ anteriores (Figura 4.1c). Como era de esperar, el PDI disminuye hasta 0.46 ± 0.02 consecuencia de

la filtración de las partículas más grandes y de la redispersión por US de los nanocomplejos aglomerados. Por ello, para los futuros procedimientos de síntesis, se incluirá siempre este pretratamiento antes de la medición por DLS.

4.2. SÍNTESIS DE NANOCOMPLEJOS PEI – CITRATO MEDIANTE ELECTROSPRAYING: INFLUENCIA DE LA CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL

Como alternativa a la técnica de nanoprecipitación se propuso una nueva metodología de síntesis basada en el *electrospraying*. Este nuevo procedimiento se basa principalmente en la síntesis de los nanocomplejos PEI – citrato mediante la técnica de *electrospraying*. Seguido a este proceso se dejarán agitando 20 minutos hasta concluir el tiempo de reacción establecido. Todas las muestras fueron sometidas al pretratamiento de filtrado, explicado en apartados anteriores, antes de su análisis por DLS. Se escogió el *electrospraying*, como alternativa a la nanoprecipitación, para mejorar la redispersión *dropwise* del reticulante o, en su caso, del polímero y producir muestras más monodispersas. Gracias a esta nueva técnica, por interacción de las fuerzas eléctricas aplicadas, se generan gotas de menor tamaño y además les dota de carga superficial extra que evita en gran parte la aglomeración de los nanocomplejos sintetizados. Numerosos trabajos de la bibliografía (Bagheri-Tar y cols., 2007; Furtmann y cols., 2017) reportan tamaños de partícula entre 100 – 300 nm obtenidos con esta técnica, y en algunos casos incluso menores de 100 nm si se optimizan las variables de operación. Como se ha explicado en apartados anteriores, se realizó un análisis de las 2 configuraciones propuestas de *electrospraying*: *esprayar* la PEI sobre el citrato de sodio (1:6) o *esprayar* citrato de sodio sobre PEI (6:1), siendo esta última análoga al proceso de nanoprecipitación.

En primer lugar, para la puesta a punto del sistema experimental de *electrospraying* se analizó la influencia de las variables de operación sobre el proceso de síntesis. La optimización de los valores de estas variables es fundamental para la obtención de nanopartículas con una distribución de tamaños estrecha. En su artículo, Bagheri-Tar y cols. (2007), analizan esta influencia para optimizar el tamaño de las NPs de polieterimida (en disolución con diclorometano) que sintetizan. Demuestran que la distancia entre el capilar y el electrodo de descarga a tierra es clave para generar un cono de Taylor estable (*cone-jet mode*), esencial para producir un *esprayado* uniforme y eficaz. Ellos establecen como distancia óptima un rango entre 1 – 1.3 cm, si esta distancia se aumenta o disminuye el cono de Taylor se desestabiliza y en vez de producirse un *spray* se generan gotas grandes (*dripping mode*) que producen tamaños de partícula mayores. También, comprobaron que cuanto mayor era el voltaje aplicado se conseguía un cono de Taylor más estable y, por consiguiente, NPs monodispersas y estables. Establecieron un rango de voltaje óptimo entre 13 – 15 kV para la producción de NPs monodispersas y esféricas. Si el voltaje aplicado es demasiado bajo, obtenían partículas huecas (*donut-shaped*), de lo contrario, a voltajes demasiado elevados se puede producir la ruptura de las gotas y la formación de partículas polidispersas o chorros indeseables. Por último, demostraron la influencia del caudal dispensado y la concentración de polímero en el tamaño y la forma de las NPs. Comprobaron que a mayores caudales se generaban mayor cantidad de aglomerados, aumentaba la polidispersidad de la muestra y pasaban de obtener partículas esféricas a partículas

huecas (*donut-shaped*). En cuanto a la concentración de la disolución polimérica, vieron que cuanto mayor era la concentración empleada, mayores tamaños de partícula generaban, además de provocar un secado prematuro de las gotas en la punta del capilar y morfologías del tipo *donut-shaped*. Por el contrario, concentraciones excesivamente bajas pueden generar una evaporación incompleta del disolvente y producir partículas adheridas entre sí o en las paredes del vaso colector.

Basándose en los resultados reportados en la bibliografía se realizaron diferentes pruebas para optimizar los valores de las variables de operación en nuestro sistema en particular. En primer lugar se probó a variar el voltaje, entre 10 – 20 kV para la 1ª configuración, y entre 15 – 22 kV para la 2ª. Se observó que a medida que se aumentaba el voltaje se iba estabilizando el cono de Taylor, pero a voltajes demasiado elevados el cono de Taylor se desestabilizaba quedando toda la disolución *esprayada* en las paredes del vaso colector. Se estableció como rango de caudales óptimo 15 – 20 kV en base a la estabilidad del cono de Taylor. Por otro lado, fue imprescindible ajustar la distancia entre los electrodos. Se observó que a distancias elevadas el cono de Taylor era estable (mayor gradiente de potencial) pero el *spray* se perdía por las paredes del vaso colector, incluso fuera de éste. En el caso opuesto, distancias excesivamente pequeñas, se pasaba a un *dripping-mode* desestabilizándose el cono de Taylor y generándose gotas muy grandes. Esto se debía a que la diferencia de potencial generada entre ambos electrodos no era suficiente para generar un cono de Taylor estable. Se estableció como óptima una distancia entre 3 -3.7 cm.

En relación al caudal dispensado, se corroboró lo reportado en la bibliografía (Bagheri-Tar y cols., 2007). Cuanto mayor era el caudal dispensado, fijando como voltaje el considerado como óptimo (Tabla 3.1 y Tabla 3.2), el cono de Taylor se desestabilizaba, generando gotas grandes y un *esprayado* ineficiente. A caudales pequeños el cono de Taylor era más estable pero el proceso de síntesis era demasiado lento y producía rendimientos ineficientes. Se estableció como rango de caudales óptimo, entre 0.5 – 1 mL/h para la primera configuración, y entre 5 – 6 mL/h para la segunda. Las condiciones óptimas se recogen en detalle en la Tabla 3.1 y Tabla 3.2 del apartado METODOLOGÍA.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de operación se analizaron los resultados de tamaño de partícula obtenidos por DLS de ambas configuraciones. En la Figura 4.2a se observa que ambas distribuciones de tamaño de partícula son similares y bastante estrechas, lo que significa que ambas muestras son bastante monodispersas. Aun así, la 2ª configuración: “citrato sobre PEI” presenta una distribución de tamaños más estrecha que la 1ª configuración: “PEI sobre citrato”, con el pico predominante en torno a los 200 nm. Esto se confirma analizando los resultados recogidos en tabla de la Figura 4.2b, donde la 2ª configuración presenta un valor menor del PDI (0.35 ± 0.08 frente a 0.44 ± 0.08) confirmando que la muestra es más monodispersa que en la 1ª configuración. Además el tamaño medio de partícula cae drásticamente de una configuración a otra, siendo el menor de ellos el de la 2ª configuración (161.7 ± 23.8 nm). Gracias a la tecnología de *electrospraying* se ha conseguido reducir el tamaño medio de partícula por debajo de los 200 nm con la 2ª configuración experimental. Por todo lo comentado anteriormente, se consideró que la 2ª configuración de *electrospraying* era la metodología que cumplía con los objetivos de tamaño medio esperado de los nanocomplejos y producía muestras más monodispersas y estables. Además, es la

configuración análoga al método de nanoprecipitación, por lo que también se pudo concluir que la mejor metodología es dispersar el reticulante (citrato de sodio) sobre la PEI. Aun así, se espera obtener mejores resultados, en relación a la aglomeración y estabilidad de los nanocomplejos PEI – citrato, funcionalizándolos con ADN.

Por último, se realizó un análisis de las imágenes TEM obtenidas para la configuración de *electrospraying* que mejores resultados reportaba, la 2ª. Si se observa la Figura 4.2c se comprueba que con la técnica de *electrospraying* se obtienen nanocomplejos PEI – citrato mucho más monodispersos que en nanoprecipitación con una reducción significativa de su tamaño. Al utilizar una concentración de reticulante de $2.8 \mu\text{M}$, la red de PEI – citrato que rodeaba y entrecruzaba varios los núcleos de PEI, como se observaba con la concentración de $14 \mu\text{M}$ de citrato en la anterior metodología (Figura 4.1d), se aprecia solamente alrededor de cada núcleo. Con esto se confirma que la reticulación entre varios núcleos PEI es prácticamente nula y explica la reducción significativa del PDI y el tamaño medio de partícula medido por DLS. En cuanto a la distribución de tamaño de partícula obtenida por el análisis de las imágenes de TEM (Figura 4.2d), se confirma el tamaño medio obtenido por DLS, teniendo la mayor parte de ellos tamaños entre 150 -200 nm.

Por último, es necesario realizar una comparativa entre ambas metodologías de síntesis. En la Figura 4.2a se observa que la distribución de tamaño de partícula de la configuración análoga al método de nanoprecipitación (con etapa de filtración), la 2ª, es más estrecha y produce muestras más monodispersas que en la metodología anterior (Figura 4.1b). Esto se confirma con el descenso en el valor del PDI, 0.35 ± 0.08 en la 2ª configuración, a 0.46 ± 0.02 en nanoprecipitación. Además, el tamaño medio de partícula desciende considerablemente, de $318.9 \pm 70.9 \text{ nm}$ en nanoprecipitación a los $161.7 \pm 23.8 \text{ nm}$ comentados anteriormente en *electrospraying*. Sin embargo, para la 1ª configuración de *electrospraying* ($352.1 \pm 31.5 \text{ nm}$) el tamaño se mantiene respecto al método de nanoprecipitación y tienen valores de PDI análogos no aportando esta configuración una ventaja respecto de la metodología convencional de nanoprecipitación.

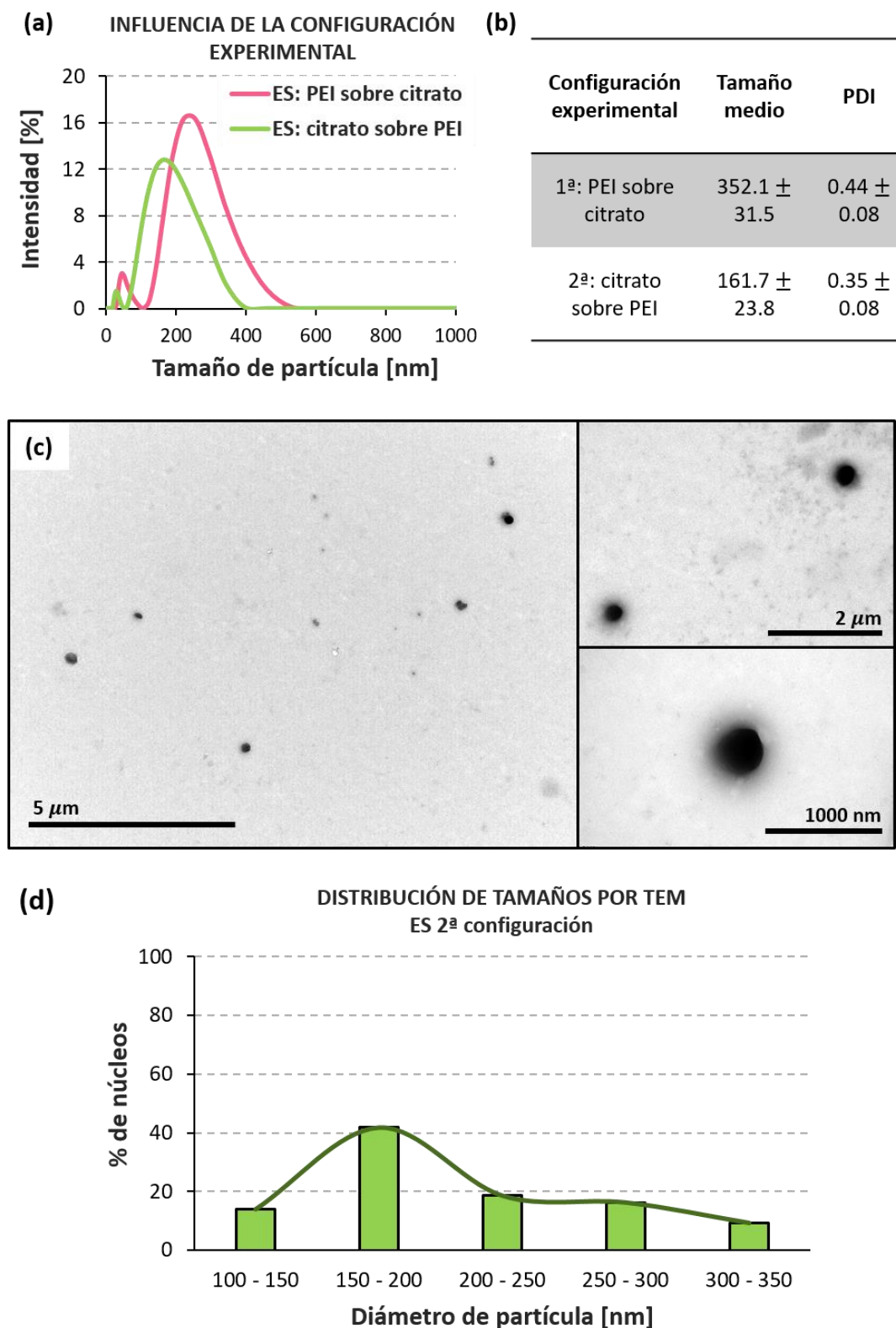


Figura 4.2. (a) Distribución de tamaño de partícula para ambas configuraciones de síntesis mediante *electrospraying*, (b) tamaño medio de ambas configuraciones medido por DLS y sus PDIs asociados, (c) imágenes TEM de los nanocomplejos sintetizados por la 2ª configuración y (d) su distribución de tamaños obtenida en función de la medición de los núcleos de PEI.

4.3.FUNCIONALIZACIÓN CON ASO – ISSN1 DE LOS NANOCOMPLEJOS PEI – CITRATO: INFLUENCIA SOBRE EL TAMAÑO DE PARTÍCULA

La finalidad de los nanocomplejos PEI – citrato es la dispensación controlada de fármacos en el organismo, por tanto, su configuración final incluye una funcionalización con el fármaco, en este caso el análogo sintético del Nusinersen, el ASO – ISSN1. Paralelamente a la medición del tamaño de partícula por DLS se realizaron pruebas, con ambas metodologías de síntesis, para estudiar la influencia de la funcionalización sobre la aglomeración de los nanocomplejos. Esta funcionalización se comprobó a través de análisis del potencial zeta, mediante la técnica de movilidad electroforética, y las imágenes TEM.

En este paso se realizaron dos técnicas de funcionalización diferentes, funcionalización *dropwise* por el exterior de los nanocomplejos y *electrospraying* coaxial. En la [Figura 4.3](#) se recoge el análisis de tamaño, por DLS y TEM, de ambas técnicas de funcionalización para cada una de las metodologías de síntesis empleada, y su correspondiente potencial zeta para comprobar la eficiencia de la funcionalización. Para analizar la influencia de la funcionalización con el ASO – ISSN1 sobre el tamaño de partícula se ha de prestar atención primero a las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas. En la metodología de funcionalización externa *dropwise*, el ASO – ISSN1 se adiciona a los 5 minutos de reacción para tener un control aproximado del tamaño de partícula generado. De esta manera se espera que al adicionar el ASO – ISSN1 (electronegativo) a ese tiempo, éste se enlace a la superficie del nanocomplejo de manera no covalente y le dote de una carga superficial negativa para reducir la aglomeración y obtener un tamaño medio de partícula controlado, entre los 100 – 200 nm. Se ha visto en la bibliografía (Zhao y cols., 2011) que al añadir ADN la carga de los nanocomplejos PEI – citrato (inicialmente entorno a $+10 \pm 0.6$ mV) puede caer hasta los -41 ± 0.9 mV.

En la [Figura 4.3a](#) se observa que las distribuciones de tamaños de la funcionalización exterior *dropwise*, en ambas metodologías de síntesis, son más estrechas que sus análogas sin funcionalizar. Esta mejora en la distribución de tamaño de partícula a priori puede significar que la funcionalización fue eficaz.

Si se observa, en primer lugar, la tabla recogida en la [Figura 4.3b](#), para el método de nanoprecipitación, se aprecia una reducción significativa del tamaño medio de partícula, desde 318.9 ± 70.9 nm hasta 156.4 ± 36.6 nm, que se corresponde con la disminución de la amplitud en la curva de distribución de tamaños de los nanocomplejos con ASO – ISSN1. Esta reducción en el tamaño no implica directamente que la funcionalización con ASO – ISSN1 ayude a reducir la aglomeración de los nanocomplejos, ya que el PDI de los nanocomplejos antes y después de la funcionalización prácticamente no varía (0.46 ± 0.02 y 0.42 ± 0.04). Esta reducción de tamaño puede deberse simplemente a que en este caso durante el proceso de síntesis la agitación haya conseguido romper los aglomerados de partículas. En la [Figura A1](#) del ANEXO I se recogen las imágenes TEM y su distribución de tamaños asociada. Se comprueba que el tamaño medio por TEM coincide con el obtenido por DLS (entre 140 – 180 nm) apreciando pequeños núcleos de PEI, monodispersos y compactos, rodeados por la red de PEI – citrato.

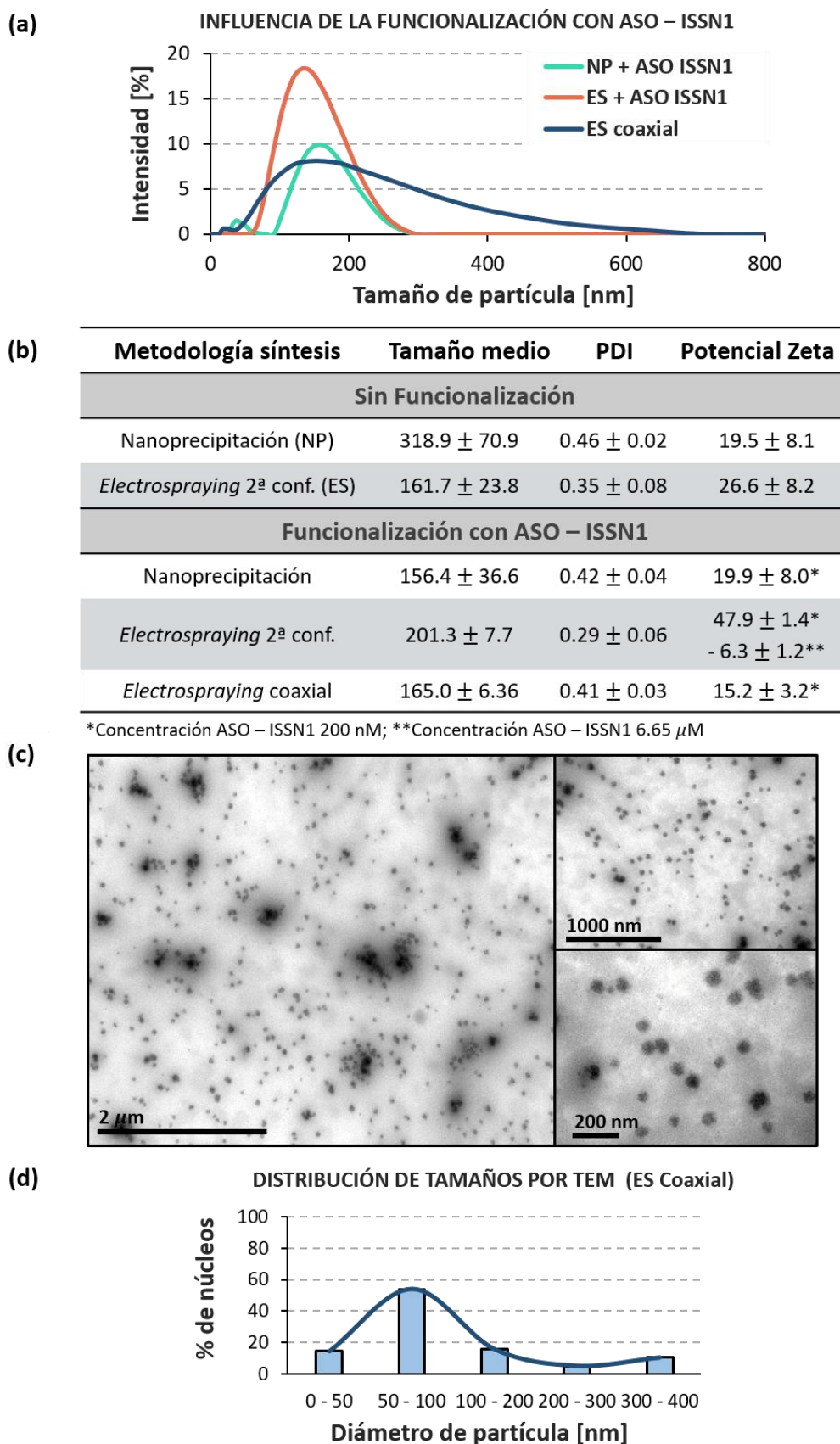


Figura 4.3. (a) Distribución de tamaño de partícula para ambas técnicas de funcionalización en las metodologías estudiadas, (b) tamaños medios, PDIs y potenciales zeta de los nanocomplejos antes y después de la funcionalización, (c) imágenes TEM de los nanocomplejos funcionalizados con *electrospraying* coaxial y (d) su distribución de tamaños en función de la medición de los núcleos de PEI.

En cuanto a la distribución de tamaños de la funcionalización externa *dropwise* en la 2ª configuración de *electrospraying* (Figura 4.3a), se observa que es más estrecha y puntiaguda que en el método de nanoprecipitación. Al tener mayor intensidad en el pico (tamaño mayoritario) significa que el porcentaje de nanocomplejos de ese tamaño predomina sobre el resto de tamaños de la muestra, con lo que se consigue mayor monodispersidad en este método. Esto se confirma observando la reducción en el PDI que presentan los nanocomplejos sintetizados por *electrospraying*, 0.29 ± 0.06 , en comparación con la otra metodología. Sin embargo, su tamaño medio asciende ligeramente al verse funcionalizadas con ASO – ISSN1 (de 161.7 ± 23.8 nm a 201 ± 7.7 nm). Esto puede suceder porque al adicionar una nueva molécula a la superficie del nanocomplejos es de esperar que su tamaño medio aumente ligeramente. Zhao y cols. (2011) en su estudio demuestran que, tras la funcionalización con material genético, sus NPs aumentaban algunas decenas de nanómetros. Para comprobar dicha reducción en el PDI se pueden analizar las imágenes TEM recogidas en la Figura A2 del ANEXO II, junto con su distribución de tamaño de partícula. Se pueden apreciar núcleos de PEI monodispersos con un tamaño predominante entre 100 – 150 nm, aunque también aunque también hay una fuerte presencia de nanocomplejos entre 150 – 200 nm.

En relación al potencial zeta potencial zeta de los nanocomplejos sintetizados por *electrospraying* (Figura 4.3b), se ve que antes de la funcionalización es algo más elevado que lo reportado en la bibliografía, de $+ 26.6 \pm 8.2$ mV. Esto puede deberse a la carga superficial que aporta el campo eléctrico a las nanogotas que emergen del capilar en el proceso de *electrospraying* (Furtmann y cols., 2017). Al incorporar a la estructura de estos nanocomplejos el ISSN1, el potencial zeta aumenta drásticamente hasta $+ 47.9 \pm 1.4$ mV. Era de esperar que al funcionalizar los nanocomplejos PEI – citrato con el ASO – ISSN1 negativo, el potencial zeta de todo el nanocomplejo se volviese negativo o disminuyese significativamente. Sin embargo, hay trabajos en la bibliografía (Mady y cols., 2011) que reportan valores positivos de nanocomplejos PEI/AND entorno a los 20 mV, aumentando considerablemente a medida que se aumenta el peso molecular de la PEI. Han reportado valores de $+ 27.9 \pm 0.6$ mV para PEI de 25 kDa, y en nuestro caso se trabaja con PEI de 60 kDa. A su vez, el potencial zeta de los nanocomplejos por nanoprecipitación se mantiene positivo e invariable al añadir el ASO – ISSN1 (entorno a los 19 mV). A la vista de los resultados obtenidos en ambas metodologías se quiso realizar una prueba aumentando la concentración de ISSN1 empleada (de 200 nM hasta $6.65 \mu\text{M}$). Se realizó esta prueba en la metodología de *electrospraying*. Como se muestra en la tabla recogida en la Figura 4.3b, al incorporar una mayor concentración de ASO – ISSN1 al nanocomplejo el potencial zeta disminuye hasta $- 6.3 \pm 1.2$ mV, por lo que se puede confirmar que la concentración de ASO – ISSN1 utilizada no era suficiente para compensar la fuerte carga positiva de la PEI.

Por último, se realizó una prueba de recubrimiento del ASO – ISSN1 por la PEI a modo de protección para su futura dispensación *in vivo*. Furtmann y cols. (2017), demuestran la importancia del recubrimiento, o si es posible encapsulación, de antígenos (proteínas o péptidos) con vectores no virales, NPs poliméricas, para su uso como vacunas más seguras. Este tipo de moléculas generan una respuesta inmune mucho más débil en comparación con organismos completos o toxinas de bacterias. Por este motivo, el recubrimiento o encapsulación de estos antígenos en NPs poliméricas es una de las estrategias más prometedoras para solventar este tipo de problemas en los métodos de

vacunación modernos. De esta manera se mantiene la integridad y la actividad biológica de estos materiales hasta su destino en las células diana.

Otros autores, Wu y cols. (2010), demuestran la viabilidad de encapsulación de material genético (ADN) dentro de nanocomplejos de PEI mediante *electrospraying* coaxial. Ellos sintetizan nanocomplejos pDNA/PEI para transfectarlos *in vitro* en fibroblastos NIH 3T3 y analizan cualitativa y cuantitativamente su eficiencia de transporte del material genético. Demuestran que mediante *electrospraying* coaxial mantienen la integridad y bioactividad del ADN y obtienen unas eficiencias de transporte muy buenas. Por ello, basándose en este estudio, se intentará reproducir este novedoso sistema para, en nuestro caso, recubrir el fármaco ASO – ISSN1 con PEI y recoger las nanogotas formadas en un baño de citrato de sodio (reticulante) donde se formará el nanocomplejo PEI – citrato – ISSN1 final.

Para la puesta a punto del sistema experimental, un factor determinante fue la selección de ambos caudales, PEI y ASO – ISSN1. Para encontrar la combinación óptima PEI: ASO – ISSN1 se probaron relaciones de caudales de: 1:3 mL/h, 1:1 mL/h y 1:0.5 mL/h. Se comprobó que cuando los caudales no eran iguales, la distribución de tamaño era muy ancha generando muestras polidispersas. Esto se debía a que las nanogotas formadas eran desiguales al no dispensarse ambas disoluciones al mismo ratio de caudal. Por ello la combinación de caudales óptima fue esprayar 1 mL/h de ASO – ISSN1 recubierto por 1 mL/h de PEI. El resto de condiciones de operación se optimizaron, siendo las condiciones finales las mostradas en la [Tabla 3.3](#).

Si se presta atención a la distribución de tamaño de partícula de la configuración coaxial ([Figura 4.3a](#)), se observa la existencia de una población muy ancha de tamaños. Además se observa que el pico de intensidad suministrado por DLS se alcanza a un menor porcentaje que en las otras muestras. En este caso, cabe destacar, que las muestras no fueron filtradas ni ultrasonificadas. En este caso, el PDI aumenta a valores de 0.41 ± 0.03 mV comparables con los de nanoprecipitación sometidos a filtración y por tanto aceptables. En este caso el tamaño medio de partícula también aumenta ligeramente si se compara con los nanocomplejos sintetizados por *electrospraying* sin funcionalizar, señal de que se les ha incorporado una molécula adicional.

La [Figura 4.3c](#) muestra imágenes TEM de los nanocomplejos PEI-citrato-ADN sintetizados mediante *electrospraying* coaxial. Se observa una gran cantidad de nanocomplejos monodispersos de pequeño tamaño y la presencia de aglomerados de partículas causantes del ensanchamiento de la curva de distribución de tamaños obtenida por DLS. El tamaño mayoritario de los nanocomplejos en las imágenes TEM ([Figura 4.3d](#)) está entorno a los 50 – 100 nm, mucho más pequeño que el tamaño medio obtenido por DLS. Si se presta atención al detalle sacado a 200 nm, se aprecia que los núcleos de PEI no son compactos sino que están reticulados, probablemente debido a la ‘encapsulación’ del ASO – ISSN1 o su entrecruzamiento con el PEI debido a fuerzas electrostáticas entre ambos materiales. También se aprecia la red PEI – citrato englobando a los núcleos PEI/ ASO – ISSN1 que fomenta en parte la unión entre núcleos e incrementa el tamaño medio de los complejos.

Con el análisis del potencial zeta se confirma la incorporación del ASO – ISSN1 en el nanocomplejo PEI – citrato (Figura 4.3b). Se observa una reducción significativa desde $+ 26.6 \pm 8.2$ mV hasta $+ 15.2 \pm 3.2$ mV. Esto es señal de la presencia del fármaco en la estructura PEI – citrato y se confirma observando la morfología de los nanocomplejos en las imágenes TEM. Aunque en este caso se utilizó la concentración de ASO de 200 nM, la coextrusión de PEI y ASO favorece la interacción electrostática entre ambas moléculas y mejora la carga de ASO en los nanocomplejos que el método de *dropwise*. La presencia de aglomerados de partículas puede deberse precisamente a esa reducción en el potencial zeta hacia valores más neutros, haciendo que las repulsiones entre nanocomplejos sea baja. Por ello se plantea probar con concentraciones mayores de ASO – ISSN1 y/o incorporar aptámero en la disolución colectora que puedan ayudar a mejorar la estabilidad del tamaño de partícula de los nanocomplejos.

5. CONCLUSIONS

In the present work, two techniques (nanoprecipitation and electrospraying) been developed and optimized to synthesize polymeric nanocomplex of polyethylenimine (PEI)-citrate in order to be used as non-viral vectors in gene therapy for drug delivery in body. In the framework of this work, PEI – sodium citrate nanocomplexes were further loaded with an antisense oligonucleotide, called ISSN1 – ASO, that mimic the commercial drug Nusinersen, that targets to treat the myoblasts affected with spinal muscular atrophy. The main conclusions as are follows:

1. It has been demonstrated the viability of both synthesis methodologies (nanoprecipitation and electrospraying) for producing PEI – citrate nanocomplexes for cell transfection below 200 nm of average size, after a filtration step.
2. The characterization of particle size by DLS and TEM, and the analysis of the particle size distributions, showed that the electrospraying technique (working spraying the sodium citrate over a PEI solution) is the one that provides the best characteristics, and control of the size of the nanocomplexes.
3. Regarding the morphology of nanocomplexes by TEM analysis, it has been shown the presence of spherical and compact nucleus (probably PEI) crosslinked by sodium citrate. This crosslinking net may be generated by the ionic interactions between PEI and sodium citrate. Through this analysis, it has been proved that the crosslinker concentration determines the amount of polymer crosslinking, and thus the size of the crosslinking net. The optimum concentration of sodium citrate was found to be 2.8 μM .
4. Finally, the functionalization of nanocomplexes with ISSN1 – ASO was analyzed by measuring the zeta potential. A high concentration of ISSN1 – ASO of 6.65 μM had to be used in a dropwise external functionalization to get observe the expected reduction in the zeta potential in the positively charge PEI – citrate nanocomplexes. Meanwhile, the functionalization using a coaxial electrospraying, reduced significantly the zeta potential of the PEI-citrate nanocomplexes using only a 200 nM concentration of ISSN1 – ASO. Furthermore, this working configuration allowed a small and uniform nanocomplex size without the need of a subsequent filtration step.

The future works will be focused on improving the functionalization of the nanocomplexes using in coaxial electrospraying, i.e. by increasing the drug concentration or replacing the sodium citrate by an aptamer (myoblasts selective molecule) solution with the appropriate concentration for selective transfection of PEI – citrate – ISSN1 nanocomplexes into affected myoblasts.

Furthermore, the viability of the cell transfection by the functionalized aptamer/ASO/nanocomplexes will be evaluated on target myoblast cells.

6. NOMENCLATURA

Agua UP	Agua Ultrapura
AME	Atrofia muscular espinal
ARNm	ARN mensajero
ASO	Oligonucleótidos antisentido
ASO – ISSN1	ASO sintético análogo al fármaco comercial Nusinersen
A01B	Aptámero selectivo con los mioblastos afectados por la AME
D	Coeficiente de difusión [m^2/s] (Ecuación 1)
DLS	Dynamic Light Scattering
EP	Electrospraying
FDA	Food and Drug Administration
Filt.	Filtración
$f(k \cdot \alpha)$	Función de Henry [-] (Ecuación 2)
HCl	Ácido Clorhídrico
$I_s(t)$	Intensidad de la luz dispersada
k	Parámetro de Debye [-] (Ecuación 2)
k_B	Constante de Boltzmann [J/K] (Ecuación 1)
Láser He-Ne	Láser Helio – Neón
NP	Nanoprecipitación
NPs	Nanopartículas
O/W	Técnica de emulsión simple aceite/agua
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de polidispersidad
PEI	Polietilenimina
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Copolímero poli (ácido láctico – co – glicólico)
PMMA	Polimetilmetacrilato
r	Radio hidráulico de la partícula [m] (Ecuación 1)
SMN1, SMN2	Copias 1 y 2 del gen de supervivencia de la motoneurona
T	Temperatura absoluta [K] (Ecuación 1)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión

US	Ultrasonidos
W/O/W	Técnica de emulsión doble aceite/agua
2' – MOE	Modificación 2' – O – metoxietil

Símbolos griegos

α	Radio de la partícula (Ecuación 2)
ε	Constante dieléctrica del medio [-] (Ecuación 2)
η	Viscosidad dinámica de la muestra [$N \cdot s/m^2$] (Ecuación 1)
η_o	Viscosidad absoluta de corte cero del medio [$mPa \cdot s$] (Ecuación 2)
θ	Ángulo de dispersión de la luz [°]
μ_e	Movilidad electroforética [$m^2/V \cdot s$] (Ecuación 2)

7. BIBLIOGRAFÍA

- Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. *MicroRNAs in diagnosis and therapeutics*. En *AGO-Driven Non-Coding RNAs*. cap. 6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815669-8.00006-3> (2019).
- Bagheri-Tar, F., Sahimi, M., Tsotsis, T. T. Preparation of polyetherimide nanoparticles by an electrospray technique. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 46(10), 3348-3357. <https://doi.org/10.1021/ie061151z> (2007).
- Brunner, S., Fürtbauer, E., Sauer, T., Kurs, M., Wagner, E. Overcoming the nuclear barrier: Cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol. Ther.*, 5(1), 80-86. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0509> (2002).
- Caputo, F. *Zeta potential determination of nanoparticles in aqueous dispersions by PALS*. Proyecto: European Nanomedicine Characterization Laboratory (EUNCL). <https://doi.org/EUNCL-PCC-002> (2015).
- Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., Liang, X. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, 35(3), 230-237. <https://doi.org/10.1038/nbt.3779> (2017).
- Darras, B. T., Markowitz, J. A., Monani, U. R., De Vivo, D. C. *Spinal Muscular Atrophies. Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach* (2ª ed.). cap. 8, 117-145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417044-5.00008-1>(2015).
- Fields, D. What is a Transmission Electron Microscopy? Recuperado 7 de noviembre de 2020, de <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Transmission-Electron-Microscopy.aspx> (2019).
- FRITSCH. Diámetro hidrodinámico. Recuperado 7 de noviembre de 2020, de <https://www.fritsch.es/medicion-de-particulas/conocimientos-de-fritsch/diametro-hidrodinamico/> (2020).
- Furtmann, B., Tang, J., Kramer, S., Eickner, T., Luderer, F., Fricker, G., Jähn, P. S. Electrospray Synthesis of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles Encapsulating Peptides to Enhance Proliferation of Antigen-Specific CD8+ T Cells. *J. Pharm. Sci.* 106(11), 3316-3327. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.06.013> (2017).
- Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD). Spinal muscular atrophy. Recuperado 5 de agosto de 2020, de <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/7674/spinal-muscular-atrophy> (2018).
- Katmis, A., Fide, S., Karaismailoglu, S., Derman, S. Synthesis and characterization methods of polymeric nanoparticles. *Charact. Appl. Nanomater.*, 1, 1-9. <https://doi.org/10.24294/can.v0i0.791> (2018).

- Li, C.-J., Cheng, P., Liang, M.-K., Chen, Y.-S., Lu, Q., Wang, J.-Y., Luo, X.-H. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.*, 125(4), 1509-1522. <https://doi.org/10.1172/JCI77716DS1> (2015).
- Liu, J., Wu, F., Xie, A., Liu, C., Bao, H. Preparation of nonconjugated fluorescent polymer nanoparticles for use as a fluorescent probe for detection of 2,4,6-trinitrophenol. *Anal. Bioanal. Chem.*, 412(5), 1235-1242. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02360-6> (2020).
- LS Instruments. Dynamic Light Scattering (DLS). Recuperado 11 de octubre de 2020, de <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/introduction#:~:text=The basic principle is simple,in a limited size range> (2020).
- Mady, M. M., Mohammed, W. A., El-Guendy, N. M., Elsayed, A. A. Effect of Polymer Molecular Weight on the DNA/PEI Polyplexes Properties. *Rom. J. Biophys.*, 21(2), 151-165 (2011).
- Mallakpour, S., Behranvand, V. Polymeric nanoparticles: Recent development in synthesis and application. *Express Polym. Lett.*, 10(11), 895-913. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.84> (2016).
- Malvern Panalytical. Zetasizer Nano ZS. Recuperado 11 de octubre de 2020, de <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs> (2020).
- Megías, J. R. *Desarrollo De Nanosistemas Híbridos Magnetita/Polietilenimina Con Fines Biomédicos*. Tesis doctoral en la Universidad de Granada (2017).
- Neil, E. E., Bisaccia, E. K. Nusinersen: A novel antisense oligonucleotide for the treatment of spinal muscular atrophy. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.*, 24(3), 194-203. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.3.194> (2019).
- Pagliarini, V., Guerra, M., Di Rosa, V., Compagnucci, C., Sette, C. Combined treatment with the histone deacetylase inhibitor LBH589 and a splice-switch antisense oligonucleotide enhances SMN2 splicing and SMN expression in Spinal Muscular Atrophy cells. *J. Neurochem.*, 153(2), 264-275. <https://doi.org/10.1111/jnc.14935> (2020).
- Patnaik, S., Gupta, K. C. Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 10(2), 215-228. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.744964> (2013).
- Philippou, S., Mastrogiannopoulos, N. P., Makrides, N., Lederer, C. W., Kleanthous, M., Phylactou, L. A. Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, 10, 199-214. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.004> (2018).
- Saallah, S., Lenggoro, I. W. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder Part. J.*, 35, 89-111.

- <https://doi.org/10.14356/kona.2018015> (2018).
- Sahiner, N. Preparation of poly(ethylene imine) particles for versatile applications. *Colloids and Surfaces A: Physic. Eng. Asp.*, 433, 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.05.029> (2013).
- Scoles, D. R., Minikel, E. V., Pulst, S. M. Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurol. Genet.*, 5(2). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000323> (2019).
- Verma, A. Recent advances in antisense oligonucleotide therapy in genetic neuromuscular diseases. *Ann. Indian Acad. Neurol.*, 21(1), 3-8. https://doi.org/10.4103/aian.AIAN_298_17 (2018).
- Wang, B. An ASO modification that enhances nuclease resistance, lowers toxicity and increases binding affinity. *Integrated DNA Technologies, IDT*. Recuperado 5 de agosto de 2020, de <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/an-aso-modification-that-enhances-nuclease-resistance-lowers-toxicity-and-increases-binding-affinity> (2018).
- Wu, Y., Fei, Z., Lee, L. J., Wyslouzil, B. E. Coaxial electrohydrodynamic spraying of plasmid DNA/polyethylenimine (PEI) polyplexes for enhanced nonviral gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.*, 105(4), 834-841. <https://doi.org/10.1002/bit.22583> (2010).
- Xu, J. (2016). *Synthesis of Polymeric Nanoparticles for the Controlled Release of Hydrophobic and Hydrophilic Therapeutic Compounds*. Tesis doctoral en la Universidad de Waterloo, Ontario, Canada (2016).
- Zakeri, A., Kouhbanani, M. A. J., Beheshtkhoo, N., Beigi, V., Mousavi, S. M., Hashemi, S. A. R., Movahedpour, A. Polyethylenimine-based nanocarriers in co-delivery of drug and gene: a developing horizon. *Nano Rev. Exp.*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20022727.2018.1488497> (2018).
- Zhao, N., Bagaria, H. G., Wong, M. S., Zu, Y. A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnology*, 9(2). <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-2> (2011).

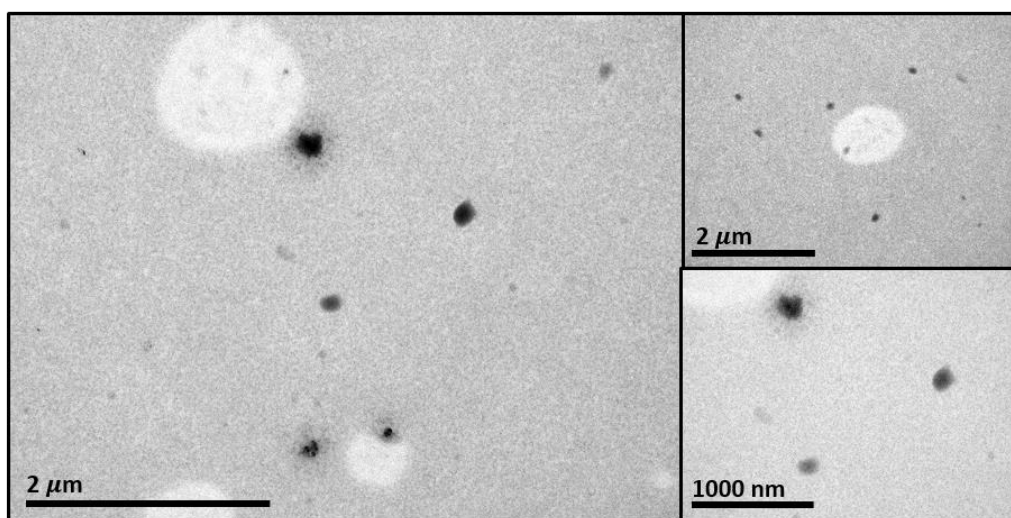
8. ANEXOS

En el presente apartado se recogen las imágenes TEM, junto con el análisis de distribución de tamaño de partícula asociado a ellas, de ambas metodologías de síntesis tras la funcionalización *dropwise* con el ASO – ISSN1.

8.1. ANEXO I

Imágenes TEM y distribución de tamaño de partícula de los nanocomplejos sintetizados por nanoprecipitación tras la funcionalización *dropwise* con ASO – ISSN1 (200 nM).

MÉTODO DE NANOPRECIPITACIÓN



DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR TEM (NP+ ASO – ISSN1)

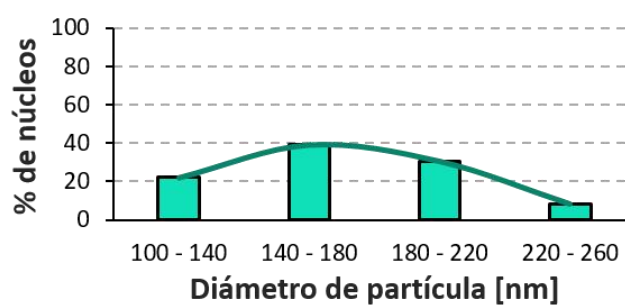
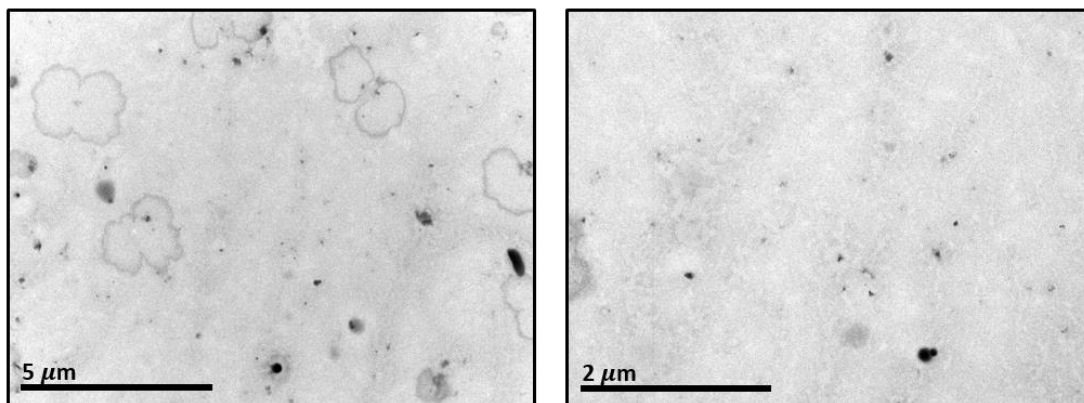


Figura A1. Imágenes TEM de los nanocomplejos PEI – citrato sintetizados por nanoprecipitación y tras la funcionalización *dropwise* con ASO-ISSN1 (200 nM), y su distribución de tamaño de partícula asociada.

8.2. ANEXO II

Imágenes TEM y distribución de tamaño de partícula de los nanocomplejos sintetizados por la 2ª configuración de *electrospraying* (citrato sobre PEI) tras la funcionalización *dropwise* con ASO – ISSN1 (200 nM).

MÉTODO DE ELECTROSPRAYING 2ª CONFIGURACIÓN



DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR TEM (ES + ASO – ISSN1)

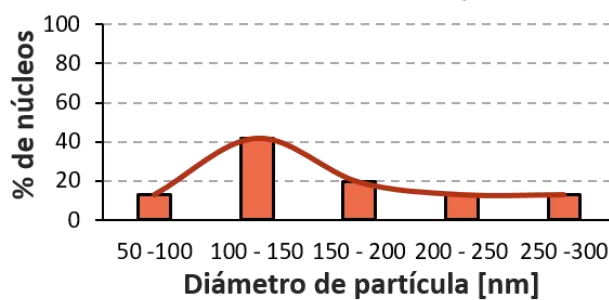


Figura A2. Imágenes TEM de los nanocomplejos PEI – citrato sintetizados por *electrospraying* (2ª conf.) y tras la funcionalización *dropwise* con ASO – ISSN1 (200 nM), y su distribución de tamaño de partícula asociada.