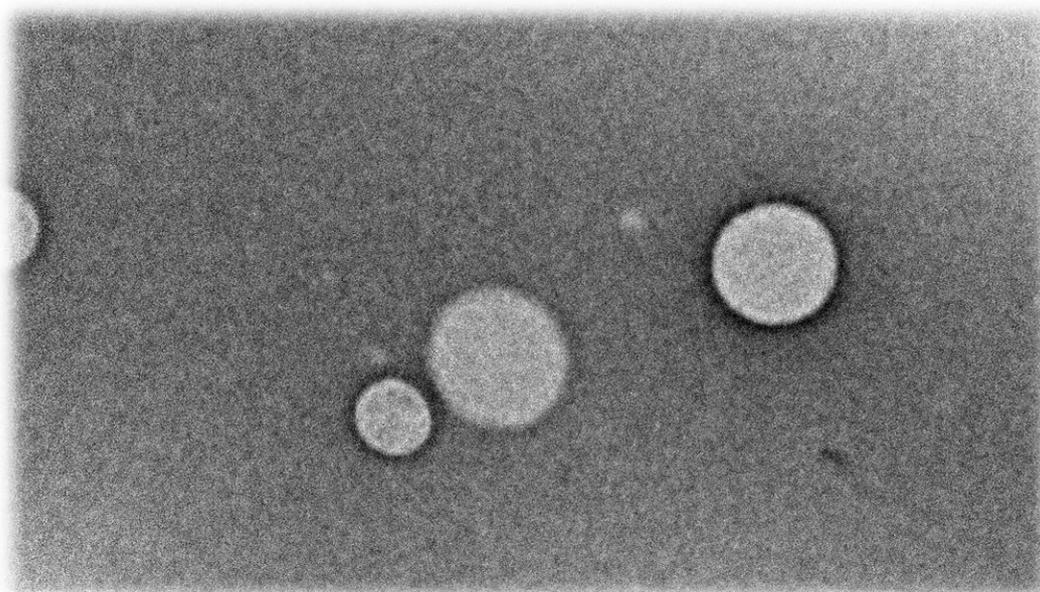


Nanovesículas para la encapsulación de fármacos antitumorales: biomimesis de estrategias de transporte



Óscar Rafael Estupiñán Sánchez

Departamento de Química Física y Analítica; Área de Analítica.



Universidad de Oviedo



Julio/2016

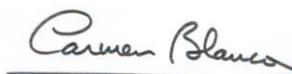
Máster en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud

Dña. MARÍA DEL CARMEN BLANCO LÓPEZ, Profesora titular en el departamento de Química Física y Analítica en la Universidad de Oviedo, y codirectora del grupo de investigación de “Emulsiones, Nanovesículas y Bioanálisis”, y Dña. MARÍA MATOS GONZÁLEZ, profesora asociada en el departamento de Ingeniería Química en la Universidad de Oviedo.

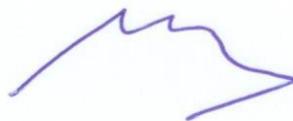
CERTIFICAN: que el graduado en Biotecnología OSCAR RAFAEL ESTUPIÑÁN SÁNCHEZ, ha realizado en los laboratorios de investigación del Departamento de Ingeniería Química en la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo, y en los laboratorios de investigación del grupo de “Sarcomas y Células Madre Carcinogénicas”, en las dependencias de la Fundación para la Investigación e Innovación Biosanitaria de Asturias, y bajo su dirección, el Trabajo de Fin de Master titulado: NANOVESÍCULAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS ANTITUMORALES: BIOMIMESIS DE ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE y que dicho trabajo tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el tribunal que se designe al efecto.

Para que así conste, firman la presente certificación en Oviedo a 14 de junio de 2016.

Fdo. Dra. María del Carmen Blanco López

Handwritten signature of Carmen Blanco in blue ink, underlined.

Fdo. Dra. María Matos González

Handwritten signature of María Matos González in blue ink.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las oportunidades que se nos presentan para dar muestra de todos los conocimientos y experiencias que adquirimos cuando desempeñamos nuestro trabajo. Sin embargo, no siempre podemos mencionar a aquellos que hacen posible que sigamos adelante, prestándonos su apoyo y sus conocimientos cuando el estrés o la frustración nos vence.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directoras, la doctora María del Carmen Blanco, y la doctora María Matos, por depositar en mí su confianza desde el primer momento. Supieron orientarme en los arduos primeros pasos dentro del mundo de la investigación, abriéndome las puertas a diferentes oportunidades dentro de mi carrera laboral, e impulsándome y dándome la motivación necesaria cuando los resultados no fueron favorables.

Además, no quiero dejar atrás al resto de compañeros del grupo de investigación. Agradecer a la catedrática y codirectora del grupo, María del Carmen Pazos por su increíble amabilidad y disposición a la hora de prestar consejo, tanto en el ámbito de la investigación como laboral y académico. No puedo sino mencionar a la doctora Gemma Gutiérrez por ejercer en muchas ocasiones como tutora, orientándome y prestándome su ayuda siempre que ha sido necesario; y al doctorando Pablo Manrique por su compañerismo y predisposición a la hora de colaborar desinteresadamente en la investigación.

Asimismo, debo nombrar al doctor René Rodríguez y a su doctoranda Lucía Martínez por depositar también su confianza en mí, permitiéndome entrar en su campo de investigación e iniciar el camino hacia la tesis doctoral.

También quiero dedicar unas palabras a la doctora María Teresa Fernández por ser una referencia no sólo para mí (desde mi primer año de la carrera universitaria hasta el último de máster), sino para cualquier estudiante de biotecnología de la Universidad de Oviedo. Como Maite, cabe nombrar a otro referente para la biotecnología en Asturias, el catedrático José Francisco Parra, el cual me ha posibilitado continuar avanzando con la investigación poniéndome en contacto con la doctora Inés, a la que agradezco su gran amabilidad al echarme una mano.

No puedo acabar sin agradecer a mis padres Rafael y Teresa, y a mi hermana Andrea su apoyo constante y sus ánimos que, aún en la distancia, siempre son necesarios. También mencionar a mis amigos por estar siempre ahí y brindarme una vía de desconexión cuando era necesario.

Por último, pero por supuesto no menos importante, tengo que agradecer a Iddún que permaneciera junto a mí durante todo este tiempo permitiéndome llegar a la meta sin perderme a mitad del camino.

RESUMEN

Resulta innegable la importancia de la observación de los sistemas biológicos como base para el desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas. El uso de estas estrategias de biomimesis, puede aplicarse al estudio de los sistemas vesiculares de transporte utilizados naturalmente en organismos complejos. Estos sistemas presentan unas características fisicoquímicas ideales para el transporte a través de fluidos biológicos, la encapsulación de elementos funcionales y la liberación controlada de los mismos.

La creación de nanovesículas sintéticas con propiedades similares a las naturales, permite el desarrollo de vectores de características controladas con sus mismas ventajas. Esto tiene un especial interés en la administración de compuestos en el organismo. Dentro de las formulaciones de nanovesículas más usadas, empiezan a destacar nuevas composiciones que incluyen el uso de tensioactivos como sustitutos parciales (transfersomas) o totales (niosomas), de los fosfolípidos usados clásicamente.

En este trabajo se realizó un análisis de los parámetros más influyentes durante la preparación de nanovesículas por el método de inyección en etanol, siendo estos la amplitud de ultrasonidos durante la sonicación, concentración de componentes de membrana y el volumen de fase orgánica en relación con la acuosa. Por otro lado, se obtuvo una formulación de transfersomas estabilizada con un recubrimiento de polietilenglicol, relativamente monodispersa y cuya media de dispersión de tamaños se sitúa en torno a los 100 nm, rango en el que las nanovesículas tienden a acumularse en tejido tumoral debido a la defenestración de los vasos sanguíneos de la región afectada. Se probaron técnicas para encapsular el fármaco mitramicina en las nanovesículas obteniendo bajas eficacias de encapsulación. Finalmente, se realizaron pruebas preliminares a la interacción entre nanovesículas y células madre carcinogénicas viéndolas al microscopio confocal, comprobando una interacción positiva entre las mismas. A partir de los ensayos de citotoxicidad, se concluyó que las nanovesículas no era tóxicas para las células.

ABSTRACT

The importance of the observation of biological systems as a base for the development of new biotechnological approaches is undeniable. Use of this biomimesis strategies can be applied for the study of transport vesicular systems commonly used by complex organisms. These systems have ideal physicochemical features for the transport across biological fluids, functional elements encapsulation as well as their controlled release.

The synthesis of nanovesicles with properties similar to those of natural origin, allows the development of vectors with controlled features which have their same advantages. This has an especial interest in the field of drug delivery. Novel formulations including the use of surfactants as partial (transfersomes) or total (niosomes) substitutes of traditionally used phospholipids, are starting to stand out for pharmaceutical applications.

In this master thesis, an analysis of the most influent parameters for nanovesicles preparation by the ethanol injection method, was carried out. Those parameters were ultrasound amplitude during sonication step, membrane components concentration, and organic phase volume relative to aqueous phase. On the other hand, a transfersome formulation was selected as reference. The vesicles were stable by means of a polyethylene glycol coating, they were relatively monodisperse, and their average size distribution was targeted at 100 nm. Nanoparticles of this size tend to accumulate in tumour tissue because the defenestration of blood vessels in the affected region. Different methods were tested for the encapsulation of the antitumor antibiotic named mithramycin, but the yield of the process was low. Finally, preliminary assays with the aim of evaluating nanovesicles-carcinogenic stem cells interaction, was carried out by means of confocal microscopy, and positive results were obtained. Cytotoxicity studies revealed that the empty nanocarriers weren't toxic for the cells

PALABRAS CLAVE

Administración de fármacos,
Células madre carcinogénicas
Encapsulación

Formulación
Funcionalización
Nanovesículas

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la Varianza
CEM	Cromatografía de Exclusión Molecular
CPP	Parámetro Crítico de Empaquetamiento
CryoTEM	Criomicroscopía de Transmisión Electrónica
CSC	Célula Madre Carcinogénica
d. nm	Diámetro medido en Nanómetros
DCP	Dicetil Fosfato
DLS	Dispersión Dinámica de la Luz
DMEM	Medio Eagle Modificado De Dulbecco
EE	Eficacia de Encapsulación
EIM	Método de Inyección en Etanol
EPR	Retención y Permeabilidad Mejorada
FBS	Suero Fetal Bobino
FIMBA	Fundación para la Investigación Biosanitaria de Asturias
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperatizinetanosulfónico
LUV	Vesícula Unilamelar Grande
MAU*s	Miliunidades de Absorbancia por Segundo
MET	Microscopía de Transmisión Electrónica
MLS	Dispersión Múltiple de la Luz
MLV	Vesícula Multilamelar Grande
MSC	Célula madre mesenquimal
MTR	Mitramicina
NBD	Nitrobenzoxadiazol
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCS	Espectroscopía de Correlación de Fotones
PDI	Índice de Polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
Rpm	Revoluciones Por Minuto
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
SUV	Vesícula unilamelar pequeña
T_c	Temperatura de fusión gel-líquido
TFH	Hidratación de Película Fina

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Relevancia de las nanopartículas en biomedicina	1
1.2. Nanopartículas para administración de fármacos	3
1.2.1. Ventajas del uso de nanotransportadores	3
1.2.2. Tipos de nanotransportadores	4
1.1. Nanovesículas como nanotransportadores	4
1.3.1 Tipos de nanovesículas artificiales	6
1.3.2. Elección de los componentes de membrana	11
1.3.3. Métodos de preparación y encapsulación	14
2. Marco de la investigación	15
3. Objetivos	16
3.1. Objetivos generales de la investigación	16
3.2. Objetivos específicos de la investigación	16
4. Materiales y procedimiento experimental	17
4.1. Diseño factorial de experimentos	17
4.2. Preparación de nanovesículas	18
4.2.1. Equipamiento	18
4.2.2. Componentes de membrana	18
4.2.3. Inyección en etanol	19
4.2.4. Hidratación en película fina	19
4.3. Caracterización de nanovesículas	19
4.4. Optimización del método	20
4.4.1. Tamaño	21
4.4.2. Encapsulación de fármacos	21
4.4.2.1. Encapsulación directa	21
4.4.2.2. Encapsulación por difusión pasiva	22
4.4.3. Purificación de nanovesículas	22
4.4.3.1. Cromatografía de exclusión molecular	23
4.4.3.2. Ultracentrifugación	23
4.4.4. Evaluación de la eficacia de encapsulación	23
4.5. Ensayos biológicos	24
4.5.1. Medio de cultivo y línea celular	24
4.5.2. Preparación y mantenimiento del cultivo	25
4.5.3. Citotoxicidad de las nanovesículas	25
4.5.4. Interacción célula-nanovesícula	26
5. Resultados y discusión	27
5.1. Modelización estadística	27
5.2. Optimización de la formulación	29
5.2.1. Formulación de componentes de membrana	29
5.2.2. Métodos de preparación	36
5.3. Encapsulación de mitramicina	36
5.3.1. Cuantificación del fármaco	36
5.3.2. Purificación de las nanovesículas	39
5.4. Interacción célula-vesícula	39
5.5. Citotoxicidad	40
6. Conclusiones	41
7. Referencias bibliográficas	42

1. INTRODUCCIÓN

Como ya aventuró a finales de los años cincuenta el que para muchos es el padre de la nanotecnología, *Richard P. Feynman*, en su célebre discurso “There’s plenty of room at the bottom” (Feynman 1961), los avances en el ámbito de la nanotecnología están enormemente influidos por su fuerte carácter interdisciplinar, nutriéndose de los avances de múltiples campos de la ciencia, desde la biología hasta la física cuántica.

El enorme avance científico-tecnológico en las últimas dos décadas confirma lo predicho por Feynman, siendo hoy en día posible el estudio y manipulación de materiales en el rango nanométrico (0,1-100 nm), cuyas propiedades difieren notablemente de las observadas en materiales a mayores escalas, ofreciendo principalmente una gran relación superficie/volumen y/o una mayor reactividad (Zhang *et al.* 2008, Guler and Tekinay 2016).

La posibilidad de sintetizar sistemas nanométricos abre nuevas vías de investigación, en las que cobra un interés especial los aspectos biomiméticos, es decir, el estudio de sistemas naturales como base para nuevos desarrollos. De esta manera, la posibilidad de caracterizar nanoestructuras biológicas y mimetizarlas en diseños sintéticos presenta un enorme potencial, por ejemplo, en el desarrollo de biosensores o mejora de sistemas analíticos de biodetección, administración mejorada de fármacos, desarrollo de nanoestructuras con propiedades especiales, optimización cultivos celulares o una mejor comprensión de mecanismos biológicos (Moreira *et al.* 2015).

1.1. RELEVANCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS EN BIOMEDICINA

La nanotecnología ha permitido avanzar en nuevos sistemas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes, el asma, alergias, infecciones o en el alivio de dolor (Brannon-Peppas and Blanchette 2004, Kawasaki and Player 2005). Este avance ha permitido conseguir un mayor control sobre las rutas de administración de fármacos, toxicidad, dispersión del fármaco en el organismo o incluso en los costes de los fármacos o sistemas de diagnóstico (Zhang *et al.* 2008). Las principales aplicaciones de las nanopartículas en el campo de la biomedicina son:

A) Diagnóstico de enfermedades

Cabe resaltar el enorme potencial en este ámbito las nanopartículas superparamagnéticas. Estas nanopartículas, normalmente de óxido de hierro, se emplean comúnmente como

agentes de contraste en resonancia magnética nuclear, permitiendo la detección de tejido tumoral (Polito *et al.* 2008), o como transductores de señal en biosensores de magnetoimpedancia o magnetoresistencia (Chen *et al.* 2011, Devkota *et al.* 2013).

Otros ejemplos son las nanopartículas de oro, que son idóneas para la fijación de moléculas biológicas o como superficie de transporte electrónico entre enzimas RedOx como marca o transductor en biosensores (Pingarrón *et al.* 2008).

Además, se han empleado nanopartículas poliméricas o sistemas vesiculares para encapsular otras nanopartículas de cara a acumularlas e intensificar su efecto sobre la señal del sensor. A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestra un sistema vesicular lipídico (liposoma) funcionalizado con polietilenglicol (PEG), con un tamaño medio en torno a los 200 nm, en el cual se han encapsulado nanopartículas de óxido de hierro con un tamaño medio de entre 3 y 17 nm (Martina *et al.* 2005).

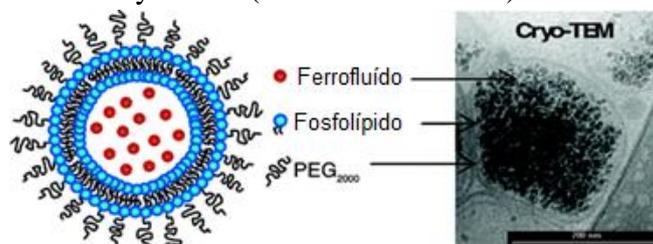


Figura 1: Imagen a crio-microscopía electrónica de transmisión (cryoTEM) de liposoma con PEG encapsulando nanopartículas superparamagnéticas. Fuente: Martina *et al.* (2005).

B) Terapia

Recientemente, las nanopartículas han cobrado una gran relevancia en tratamientos de regeneración de tejidos. De esta manera, se han empleado nanopartículas de oro encapsuladas en hidrogeles para el favorecimiento de la regeneración de tejido óseo (Heo *et al.* 2014). Además, se han empleado nanopartículas de polidopamina, con gran afinidad de unión a proteínas, como elementos estructurales en moldes para cultivos celulares en tres dimensiones (Wang *et al.* 2016).

Por otro lado, las nanopartículas superparamagnéticas pueden usarse para ciertos tratamientos como la eliminación de tumores por hipertermia (Alonso *et al.* 2016).

C) Administración de fármacos

Otra aplicación de las nanopartículas es la mejora de parámetros relacionados con la administración de fármacos. Este trabajo de investigación se enmarca en este contexto.

1.2. NANOPARTÍCULAS PARA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

La administración convencional de fármacos suele presentar un gran número de limitaciones relacionadas con la necesidad de traspasar múltiples barreras físicas, fisiológicas o biofísicas de camino a su diana de acción. Esto se traduce en una reducción de la cantidad efectiva de fármaco que llega a dicha diana; así como la posible exposición al fármaco de regiones no afectadas por la patología que pueden sufrir algún tipo de daño (esto resulta especialmente importante en tratamientos contra el cáncer) (Tanaka *et al.* 2009).

El uso de nanopartículas que actúen como nanotransportadores (“nanocarriers”), permite solventar, en gran medida, estos problemas; mejorando la especificidad, seguridad y eficiencia del tratamiento en cuestión. Se han usado nanopartículas para encapsular fármacos antitumorales para la eliminación dirigida de las llamadas “Células Madre Cancerígenas” (CSCs, del inglés “Cancer Stem Cells”) (Hong *et al.* 2015, Malhi and Gu 2015). Este tipo de células son comunes en la mayoría de los sarcomas y presentan quimioresistencia, reincidencia de procesos oncogénicos y metástasis (Nassar and Blanpain 2016).

1.2.1. VENTAJAS DEL USO DE NANOTRANSPORTADORES

Entre las ventajas que el uso de nanotransportadores presenta frente al uso de drogas “desnudas” aparecen:

- Favorecimiento de la absorción, biodistribución y estabilidad de fármacos administrados gracias a la elevada relación entre área superficial y volumen de los nanotransportadores (Pardakhty and Moazeni 2013). De esta manera, las concentraciones efectivas alcanzadas en la diana son significativamente más altas que en los fármacos libres que, además, son eliminados más rápidamente del cuerpo. El tiempo de retención del fármaco en el torrente sanguíneo así como en el interior de las células también se ve aumentado (Akbari *et al.* 2013).
- Posibilidad de funcionalización de las nanopartículas con diferentes elementos en su superficie (como por ejemplo el PEG), lo que les confiere propiedades de interés. Esta ventaja, además, permite dirigir de forma controlada la acción del fármaco hacia receptores concretos (como las CSCs), mediante la incorporación de ligandos o anticuerpos que interaccionen con receptores específicos.

- Posibilidad de establecer cotratamientos usando estrategias de sensibilización de las poblaciones celulares diana. De este modo, los fármacos pueden ser encapsulados con inhibidores, siRNAs o miRNAs que bloqueen mecanismos de resistencia o rutas de señalización específicas para mejorar la eficacia de actuación del fármaco (Gandhi *et al.* 2014).
- Debido a su reducido tamaño (0,1 – 100 nm); tienen la capacidad de eludir, en parte, al sistema fagocítico mononucleado (lo que se traduce en una menor reacción del sistema inmune contra los nanotransportadores). Además, en el caso concreto de tratamiento de tumores, en el cual está focalizada esta tesis, las partículas de tamaños próximas a los 100 nm presentan el llamado efecto “EPR”, por sus siglas en inglés “enhanced permeability and retention”. Este efecto se basa en la acumulación de moléculas de un tamaño determinado (en este caso las próximas a 100 nm) en un tejido tumoral durante periodos de tiempo mayores a lo que lo hacen en tejidos “sanos”, debido a la presencia de estructuras vasculares aberrantes dentro de los tumores (Maeda 2012), lo cual permite una reducción de los efectos secundarios asociados a los fármacos quimioterapéuticos.

1.2.2. TIPOS DE NANOTRANSPORTADORES

Los materiales susceptibles de ser empleados como nanotransportadores son sistemas vesiculares (niosomas, transfersomas, liposomas, etosomas, proveículas...), dendrímeros, polímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas u orgánicas, quantum dots (nanoestructuras semiconductoras), nanogeles o partículas peptídicas (Lehner *et al.* 2013).

Dentro de todos estos materiales mencionados, este trabajo se centrará en el uso de sistemas vesiculares debido a sus múltiples ventajas, tales como: posibilidad de encapsular elementos tanto hidrófilos como lipófilos, alta capacidad para atravesar barreras biológicas, rápida preparación sin requerimiento de metodologías complejas, componentes relativamente baratos, fácil funcionalización y la elevada versatilidad debido a la capacidad de encapsular más de un compuesto de manera simultánea (incluyendo nanopartículas magnéticas).

1.3. NANOVESÍCULAS COMO NANOTRANSPORTADORES

La compartimentación controlada de volúmenes acuosos resulta necesaria en los sistemas biológicos para garantizar las condiciones (composiciones y concentraciones) adecuadas para llevar a cabo sus procesos bioquímicos. Esto es posible mediante el uso de

membranas fluidas compuestas por moléculas anfífilas como son los fosfolípidos, esfingolípidos o glicolípidos (Canton and Battaglia 2012). Las zonas hidrofílicas y lipofílicas interactúan en un medio acuoso autoensamblándose dando lugar a una bicapa semipermeable que evita el paso de muchas proteínas, iones o compuestos polares (Krimm 1980).

En células eucariotas, el tráfico intercelular se lleva a cabo mediante vesículas de similar naturaleza encapsulando elementos de interés que pueden estar relacionados con la excreción celular, regulación o señalización.

Estas vesículas normalmente están recubiertas por elementos funcionales o pueden contener en su membrana proteínas específicas de cara a conseguir una interacción específica con su diana; la cual puede ser otra célula que captura la vesícula por endocitosis (Canton and Battaglia 2012). De esta manera, quedan definidos los exosomas, pequeñas vesículas (normalmente con un tamaño medio en torno a 30-120 nm, aunque pueden ser mayores) secretadas por células eucariotas a su microambiente extracelular y que se forman a partir de insipiencias formadas en las membranas interiores de endosomas tardíos (Ludwig and Giebel 2012, El Andaloussi *et al.* 2013).

Las características y funciones de los exosomas dependen de la célula que las libera pudiendo incluir en su composición diferentes elementos estructurales o proteínas de unión específica; así como encapsular diferentes elementos funcionales. Entre sus funciones de mayor interés biomédico está el inicio de procesos tumorales o la regulación inmunológica así como procesos regenerativos o degenerativos (Ludwig and Giebel 2012).

Los exosomas presentan unas características ideales para el transporte de elementos a través de fluidos biológicos, sea por su capacidad de atravesar barreras fisiológicas que normalmente presentan un obstáculo en administración de fármacos, o por su capacidad para contener tanto moléculas hidrófilas (en el núcleo acuoso) como lipófilas (en membrana). Por ello, muchos investigadores han considerado su uso con fines biomédicos, especialmente como biomarcadores o como vectores para la administración de compuestos. Es posible encontrar algunos ejemplos en fase preclínica I (Gyorgy *et al.* 2015). De este modo, se han obtenido vesículas para el tratamiento de melanomas a partir de células dendríticas expuestas a antígenos tumorales (Escudier *et al.* 2005, Morse *et al.* 2005). Por otro lado, se han extraído vesículas de líquido peritoneal en pacientes de ascitis para el tratamiento de cáncer colorrectal (Dai *et al.* 2008), o vesículas de microorganismos patógenos para vacunas por administración intravenosa (Sandbu *et al.* 2007). En todos

estos ejemplos, se obtuvieron tasas de respuesta positivas entre el 10 y el 20% de los pacientes presentando una toxicidad muy baja o nula (Gyorgy *et al.* 2015). Otros estudios toman las vesículas como diana para frenar procesos tumorales (Vader *et al.* 2014).

Una de las principales limitaciones que presenta el uso de vesículas extracelulares en el tratamiento de patologías, es la gran heterogeneidad de componentes que presentan, muchos de los cuales aún no han podido caracterizarse (El Andaloussi *et al.* 2013, Ascenso *et al.* 2015). Esto puede resultar peligroso en su uso como terapia y generar una respuesta inmune. Para solventar este problema, se está dedicando mucho esfuerzo para diseñar sistemas vesiculares que mimetizan las características de los exosomas naturales, lo que permitiría, además, el control de sus características fisicoquímicas, así como su composición tanto en la membrana como en el núcleo acuoso (De La Pena *et al.* 2009). Estos sistemas se han usado tradicionalmente para la elaboración de pomadas dada su facilidad para atravesar la dermis. Sin embargo, su uso para fines biomédicos más complejos está empezando a desempeñar un papel importante en los últimos años.

1.3.1. TIPOS DE NANOVESÍCULAS ARTIFICIALES

Las nanovesículas artificiales se componen básicamente de moléculas anfífilas. Presentan unas características que dependen principalmente de la formulación utilizada, la carga superficial resultante, el tamaño medio y método de preparación empleado (Akbarzadeh *et al.* 2013, Sachan *et al.* 2013, Moghassemi and Hadjizadeh 2014). Es importante considerar que para su aplicación biomédica es necesario que las vesículas sean biocompatibles, biodegradables y capaces de proteger el compuesto encapsulado de su degradación metabólica o inmunogénica (Ahmed 2015).

Las vesículas pueden presentar una lamela o varias, lo cual está determinado fundamentalmente por el método por el que son preparadas y por el tamaño. De esta manera es posible tener vesículas unilamelares pequeñas (SUV), las cuales miden hasta 100 nm, unilamelares grandes (LUV), para rangos mayores; o multilamelares (MLV) con un amplio rango de tamaños (Moghassemi and Hadjizadeh 2014). El tamaño de las vesículas cobra una relevancia crucial puesto que partículas demasiado pequeñas serán completamente excluidas vía renal, mientras que las demasiado grandes pueden ser eliminadas por el sistema fagocítico mononucleado. Por otro lado la carga y el tamaño de las vesículas también influyen en su tendencia a la acumulación en diferentes tejidos como se muestra en la Figura 2 (Blanco *et al.* 2015).

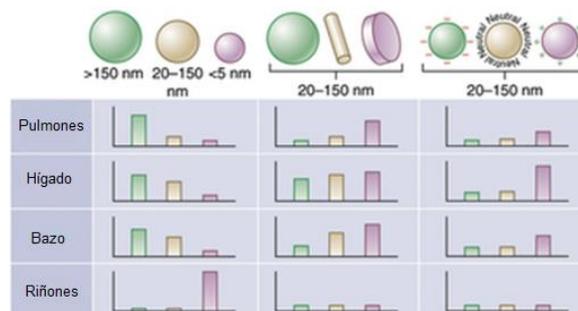


Figura 2: Acumulación de diferentes tipos de nanomateriales en tejidos de pacientes reales según su tamaño y carga. Fuente: esquema modificado, Blanco *et al* (2015)

Existen múltiples clasificaciones de nanovesículas según la composición de su membrana (Touitou and Godin 2006). En términos de biocompatibilidad y uso generalizado, en esta tesis se considerarán los liposomas, niosomas y transfersomas, especialmente los dos últimos que serán la base del trabajo experimental.

C) Liposomas

Las nanovesículas más comúnmente usadas son los liposomas, cuya membrana está compuesta básicamente por fosfolípidos (aunque también pueden incorporarse elementos estabilizadores de membrana como el colesterol).

El uso de fosfolípidos como nanotransportadores presenta las ventajas y características de interés citadas en los apartados 1.3 y 1.3.1. Sin embargo, los liposomas presentan algunas limitaciones importantes que han llevado al diseño de nuevas formulaciones más versátiles. Entre dichas limitaciones cabe destacar que los fosfolípidos son más inestables que otros componentes de membrana puesto a que son más sensibles a la fotodegradación y a la oxidación, lo que se traduce en un tiempo de vida menor. Además, aunque tienen una baja toxicidad, se les ha relacionado con un aumento en el estrés oxidativo y en la muerte celular debido a altas exposiciones, lo cual representa también un problema medioambiental con los fosfolípidos desechados. También pueden presentar ciertas interacciones con los compuestos encapsulados y son económicamente más costosos que otros elementos de membrana usados en otros tipos de vesículas (Touitou and Godin 2006, Mansoori *et al.* 2012).

Se han utilizado liposomas cuando los compuestos administrados son especialmente sensibles al medio biológico (como los ácidos nucleicos en el torrente sanguíneo, susceptibles de degradación por nucleasas), o cuando el tejido diana se encuentra protegido con barreras altamente selectivas al flujo de sustancias, especialmente de

naturaleza exógena al organismo, como puede ser el sistema nervioso central. De hecho, ya existen algunos tratamientos aplicados en los que el fármaco encapsulado presenta una actividad similar al fármaco no encapsulado, pero con una toxicidad reducida para el tejido no tumoral (Chang and Yeh 2012). Sin embargo, en estos ensayos las vesículas resultaron tener una elevada heterogeneidad con tamaños mayores a 150 nm, lo que condujo a su acumulación en hígado y bazo hasta alcanzar niveles tóxicos para los macrófagos locales (Chang and Yeh 2012). Algunos fármacos liposomales comercializados son: daunorrubicina liposomal (DaunoXome®), doxorrubicina liposomal (D-99 Myocet TM), o doxorrubicina liposomal funcionalizada con polietilenglicol (Doxil®) (Tanaka *et al.* 2009).

Como muestra de los estudios más recientes con estas vesículas, en la Tabla 1 se exponen diferentes formulaciones liposomas estudiadas para pruebas de encapsulación y/o funcionalización de vesículas.

Tabla 1: Recopilación de formulaciones de liposomas

Composición	Preparación	Tamaño	Otros	Referencia
Fosfatidilcolina, 1 % biotinilada	TFH	100 nm	Funcionalización con biotina	(Benitez <i>et al.</i> 2010)
Fosfatidilcolina + fosfatidiletanolamina + colesterol	Inyección en éter	130-160 nm	-	(Justo and Moraes 2011)
Lipoid E80+ colesterol	Inyección en etanol	80-95 nm	Encapsula Cafeína y Espironolactona	(Pham <i>et al.</i> 2012)
Fosfatidilcolina + colesterol	Inyección en etanol	150 nm	Encapsula Carbopol 914	(Ghanbarzadeh and Arami 2013)
Diesteroilfosfatidilcolina + colesterol + dicetilfosfato	TFH	100 nm	Encapsula Quantum dots	(Tahara <i>et al.</i> 2013)
Fosfatidilcolina + colesterol + fosfatidilglicerol/Dioleiltrimethyl ammoniumpropane chloride	Inyección en etanol	80-350 nm	Encapsula 5,6-carboxifluoresceína	(Gentine <i>et al.</i> 2013)

Cabe mencionar que el tamaño indicado en la tabla es el rango de tamaños medio expresados en diámetro hidrodinámico, es decir, el diámetro de la vesícula incluyendo la capa eléctrica dipolar que se forma alrededor de su membrana a causa de la carga asociada a la misma.

D) Niosomas y transfersomas

Estas nanovesículas son sistemas coloidales más novedosos que los liposomas, aunque comparten gran similitud con los mismos. La principal diferencia es que los fosfolípidos de la membrana vesicular han sido parcial (transfersoma), o totalmente (niosoma) sustituidos por tensioactivos no iónicos, generalmente de cadena única. De esta manera, se consigue que la membrana sea menos rígida, dando mayor flexibilidad y permeabilidad al sistema vesicular, siendo consideradas vesículas ultradeformables, lo cual permite mejorar su capacidad de biodistribución (Vikas *et al.* 2011).

Numerosos estudios muestran que los tensioactivos no iónicos pueden mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles facilitando la administración transdérmica por encapsulación; aunque su aplicación se está extendiendo a administración por otras vías por su facilidad de traspasar otras barreras biológicas (Dragicevic-Curic *et al.* 2008, Manconi *et al.* 2009, Sinico and Fadda 2009, Celia *et al.* 2012, Manca *et al.* 2013, Mehanna *et al.* 2015, Pando *et al.* 2015). Además, los tensioactivos no iónicos son químicamente más estables a la oxidación y a la temperatura que los fosfolípidos lo que facilita su manipulación. Por otro lado, son compuestos más económicos y versátiles de cara a paso de escala de producción (Pardakhty and Moazeni 2013). En la Figura 3, se puede ver un ejemplo de un niosoma (Moghassemi and Hadjizadeh 2014).

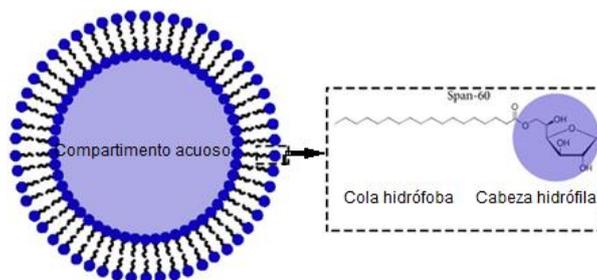


Figura 3: Esquema de niosoma compuesto por el tensioactivo de nombre comercial Span 60. Fuente: Moghassemi and Hadjizadeh (2014)

En cuanto a su aplicación, se ha demostrado que la administración a modelos animales de fármacos antitumorales encapsulados en niosomas, presenta menor toxicidad y mayor efecto anticancerígeno que la droga libre (Parthasarathi *et al.* 1994, Naresh *et al.* 1996). También existen pruebas de administración de compuestos encapsulados en transfersomas con resultados favorables para la administración de insulina, corticoesteroides, anestésicos o anticancerígenos como el metrotrexato (Benson 2006, Modi and Bharadia 2012, Sachan *et al.* 2013).

En la Tabla 2 y en la Tabla 3, se muestran las formulaciones más representativas de transfersomas y niosomas probadas en diferentes estudios para encapsulación de compuestos y/o pruebas de encapsulación de membrana.

Tabla 2: Formulaciones de niosomas con sus características

Composición	Preparación	Tamaños	Otros	Referencias
Span 60 + colesterol	EIM	160-210 nm	Encapsula Ciclopiroxolamina	(Shaikh <i>et al.</i> 2010)
Tween 20, 60, 80 + Span 20, 60, 80 + Monosuccinato de glicerilo	Ultra-centrifugación directa	60-100 nm	Funcionalización con ácido hialurónico	(Kong <i>et al.</i> 2011)
Tween 80/Span 80	Espontáneo	160-580 nm	Encapsula Capsaicina	(Tavano <i>et al.</i> 2011)
Span 60/Tween 60 + colesterol	EIM	30-130 nm	Espironolactona Cafeína	(Pham <i>et al.</i> 2012)
Span 60 + colesterol + solulan	TFH/Evaporación en fase reversa	150-310 nm	Funcionalización con N-palmitoil-glucosamina	(Bragagni <i>et al.</i> 2012)
Span 40 + colesterol + dicetil fosfato	TFH	210-420 nm	Encapsula Plaquitaxel	(Sezgin-Bayindir and Yuksel 2012)
Span 60/ Tween 20 + colesterol + DCP	Inyección en etanol	150-470 nm	Encapsula Minoxidil	(Mali <i>et al.</i> 2013)
Span 80 + Colesterol	Inyección en etanol	200 nm	Encapsula Diclofenac-sodio	(Ghanbarzadeh and Arami 2013)
Tween 20 + colesterol	TFH	215-440 nm	Funcionalizado con glicerol	(Marianecci <i>et al.</i> 2013)
Span 20, 40, 60/Tween 20, 40, 60 + colesterol + Solutol HS 5	Inyección en etanol	60-200 nm	Funcionalización con PEG	(Lin <i>et al.</i> 2013)
Poligliceril, dialquil éteres	Ultrasonidos directamente	100 nm	X	(Aramaki <i>et al.</i> 2015)
Span 61 + colesterol	TFH	30-50 nm	Encapsula Nanopartículas de galodínio y protoporfirina IX	(Barlas <i>et al.</i> 2016)

Tabla 3: Formulaciones de transfersomas con sus características

Composición	Preparación	Tamaño	Otros	Referencias
Tween 80 + Fosfatidilcolina	TFH	330 nm	Encapsula Curcumina	(Patel <i>et al.</i> 2009)
Phospholipon 90 G + deoxicolato de sodio	TFH	75-190 nm	Encapsula Valsartan	(Ahad <i>et al.</i> 2012)
Fosfatidilcolina + colesterol + Span 80	Inyección en etanol	145 nm	Encapsula Carbopol	(Ghanbarzadeh and Arami 2013)
Phospholipon 90 G + colato de sodio	TFH	65-120 nm	Encapsula curcumina y dietamina diclofenac	(Chaudhary <i>et al.</i> 2013)
Fosfatidilcolina + colesterol + Tween 80	Evaporación en fase reversa	130-450 nm	Encapsula Lornoxicam	(Taha 2014)
Fosfatidilcolina + Deoxicolato de sodio	TFH	80-150 nm	Encapsula Hidrocloruro radoxifeno	(Mahmood <i>et al.</i> 2014)
Fosfatidilcolina+deoxicolato de sodio/Span 20	Agitación a tiempos largos	70-120 nm	Encapsula Cafeína, vitamina E	(Ascenso <i>et al.</i> 2015)

1.3.2. ELECCIÓN DE LOS COMPONENTES DE MEMBRANA

Sea cual sea el tipo de vesícula que interese preparar, la elección de una formulación adecuada resulta fundamental puesto que son los componentes de membrana los que determinan su rigidez, fluidez o cómo de compacta es. Esto afectará al tamaño de la vesícula, a la eficacia de encapsulación o a la estabilidad. Los parámetros más importantes que deben considerarse en el diseño de una formulación son:

A) Temperatura de transición gel-líquido (T_c)

Depende de la estructura molecular del componente de la membrana vesicular y, a su vez, tiene un efecto directo en la eficacia de encapsulación, siendo normalmente mayor a valores más altos de T_c (Kumar and Rajeshwarrao 2011). El Span 60 es uno de los surfactantes con mejor eficacia de encapsulación, teniendo una T_c de 55-57°C.

B) Parámetro crítico de empaquetamiento (CPP, de “critical packing parameters”)

Parámetro adimensional que determina la capacidad de formación de vesículas que tiene la molécula, y está definida por su estructura química entre otros factores (Moghassemi and Hadjizadeh 2014). La ecuación 1 permite el cálculo de la CPP para un tensioactivo (Uchegbu and Vyas 1998), cuyos parámetros quedan definidos en la Figura 4.

$$CPP = \frac{v}{l_c a_0} \quad (1)$$

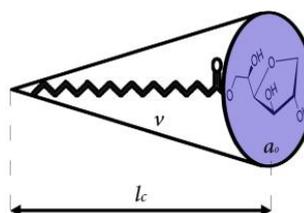


Figura 4: Parámetros relacionados con la CPP en una molécula del tensioactivo Span 60; siendo V al volumen y a_0 el área de la cabeza hidrofílica; y l_c la longitud de la cadena lipofílica. Fuente: Moghassemi and Hadjizadeh (2014).

Las moléculas con un CPP menor a $1/3$ son capaces de formar micelas esféricas, mientras que valores entre $1/3$ y $1/2$ indican que son moléculas con capacidad de formar vesículas con bicapas, a la vez que valores superiores a $1/2$ se obtienen en moléculas que forman micelas invertidas (Kumar and Rajeshwarrao 2011, Pardakhty and Moazeni 2013).

Además de los parámetros anteriores; la membrana puede contener o estar compuesta de otros elementos aparte de los fosfolípidos y los tensioactivos.

C) Balance hidrofílico-lipofílico (HLB, de “Hydrophilic-lipophilic balance”)

Es un parámetro adimensional especialmente usado para tensioactivos. Es determinante en la EE que presenta la membrana (Kumar and Rajeshwarrao 2011).

Para tensioactivos no iónicos (los usados normalmente en la preparación de niosomas y transfersomas), el HLB toma valores de 0 a 20. Valores bajos de HLB son indicativos de tensioactivos con un mayor carácter lipófilo, mientras que valores más altos son característicos de tensioactivos hidrófilos (Marwa *et al.* 2013). En la Figura 5 se muestra la escala de mayor a menor HLB para las diferentes “Span” existentes en el mercado.

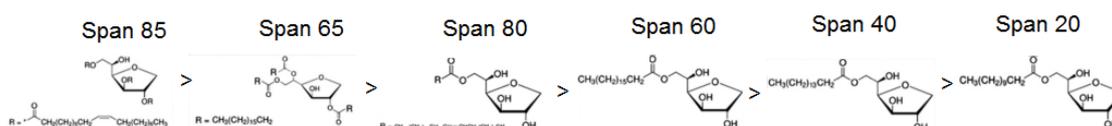


Figura 5: Escala de HLB (de mayor a menor yendo de izquierda a derecha) para la familia “Span”. Fuente: Moghassemi and Hadjizadeh (2014)

D) Compuestos estructurales

Como se ha dicho anteriormente, puede ser necesaria la adición de un elemento estructural en la composición de la membrana de cara a conseguir unas características determinadas en la vesícula o incluso para garantizar la formación de una vesícula estable. El compuesto más comúnmente usado es el colesterol, el cual es una molécula más compacta y rígida que los fosfolípidos y tensioactivos. Se sitúa en la bicapa formando puentes de hidrógeno con los grupos ésteres situados entre la cabeza polar y la cola hidrofóbica tal y como se muestra en la Figura 6 (Moghassemi and Hadjizadeh 2014).

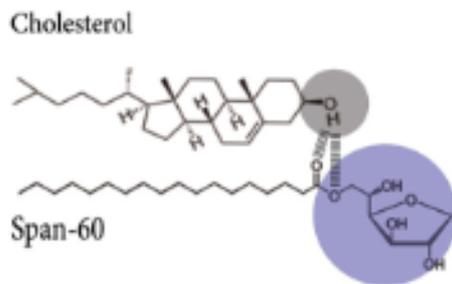


Figura 6: Molécula de colesterol formando puentes de hidrógeno con una molécula de Span 60. Fuente: Moghassemi and Hadjizadeh (2014)

El uso del colesterol provoca un aumento de la T_c de la mezcla de componentes de membrana, de manera que afecta al tamaño, estabilidad, rigidez y fluidez de la membrana vesicular, así como a la eficacia de encapsulación, tiempo de retención del fármaco y liberación controlada del mismo (Kumar and Rajeshwarrao 2011, Shilpa *et al.* 2011).

Así, se ha publicado que, para algunas drogas, el aumento de la rigidez de la membrana mediante la adición de colesterol a bajas concentraciones mejora la eficacia de encapsulación y la capacidad de retención del fármaco en la vesícula; mientras que a mayores concentraciones la eficacia de encapsulación se ve disminuida. Por otro lado, la presencia de colesterol en la formulación generalmente tiende a aumentar el tamaño de los sistemas vesiculares más rígidos, mientras que en otros más flexibles da a la membrana una mayor rigidez evitando la aglomeración en vesículas mayores (Shaikh *et al.* 2010, Pham *et al.* 2012, Mali *et al.* 2013).

Otro aditivo de membrana muy usado es el dicetilfosfato (DCP de sus siglas en inglés, “Dicetyl phosphate”) el cual es un inductor de carga negativa que aporta mayor estabilidad a las vesículas puesto que evita la agregación favoreciendo la repulsión entre vesículas. Además, afecta a la encapsulación de moléculas cargadas y aporta a las vesículas movilidad electroforética (Moghassemi and Hadjizadeh 2014). Este efecto también se puede conseguir usando moléculas anfífilas iónicas como componentes de membrana (Rosen and Kunjappu 2012).

E) Funcionalización

La membrana de las nanovesículas puede funcionalizarse, es decir, recubrirse con diferentes compuestos funcionales según interese dependiendo de la aplicación de las mismas. El procedimiento más común para funcionalizar las nanovesículas es el uso de componentes de membrana covalentemente unidos al PEG (Barenholz 2001, Gómez-Hens and Fernández-Romero 2006). Esto da más estabilidad a la vesícula y disminuye su capacidad de generar una respuesta inmunogénica (Jokerst *et al.* 2011).

El recubrimiento de las vesículas también puede estar dirigido a que la vesícula interaccione específicamente con un receptor. A modo de ejemplo, cabe nombrar el uso de anticuerpos, o de ácido hialurónico (su ligando natural), contra el marcador CD44 sobreexpresado en la superficie de la membrana de muchos tipos de CSCs durante el proceso carcinogénico (Naor *et al.* 2002). Esto tiene importancia en tratamiento y detección de sarcomas (Rodriguez *et al.* 2012).

1.3.3. MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y ENCAPSULACIÓN

A grandes rasgos, las vesículas se crean a partir de la exposición de las moléculas anfífilas a un entorno acuoso, en el que tienden a organizarse de manera que las regiones polares queden enfocadas hacia al medio acuoso y las apolares se cubran entre sí. Bajo determinadas condiciones termodinámicas, esa organización cobra una estructura coloidal formando las vesículas.

Las características fisicoquímicas de las vesículas dependen en gran medida del método de preparación empleado. Las técnicas más usadas emplean soluciones orgánicas para disolver los componentes de membrana de manera previa a su exposición al ambiente acuoso, además de incorporar una etapa de ultrasonidos, filtrado o extrusión para obtener tamaños menores y más monodispersos.

Cabe destacar el método de hidratación de película fina o “Thin film hydration” (TFH), el cual da a lugar vesículas, normalmente, MLVs. El disolvente orgánico con los componentes disueltos se evapora lo que da a lugar a una fina película en las paredes del recipiente, que luego será hidratada con el disolvente acuoso para formar las vesículas (Uchegbu and Vyas 1998, Shilpa *et al.* 2011, Moghassemi and Hadjizadeh 2014).

Otro método muy usado por su sencillez y por la posibilidad de diseño a mayores escalas es la inyección de la fase orgánica, normalmente éteres o etanol, en la acuosa para la posterior evaporación del disolvente orgánico. Este método se conoce como “Ethanol

injection method” (EIM) y es similar a la llamada evaporación en fase reversa en la que el disolvente orgánico se mezcla directamente con el acuoso. Sin embargo, el EIM puede dar LUV y SUVs, mientras que el segundo genera únicamente SUVs (Uchegbu and Vyas 1998, Shilpa *et al.* 2011, Moghassemi and Hadjizadeh 2014).

Además de los métodos explicados, existen otras aproximaciones que evitan el uso de una fase orgánica, como la agitación directa, ultrasonidos o calor. Por otro lado, están cobrando importancia los métodos de preparación por microfluídica debido a los grandes resultados obtenidos en términos de tamaño, eficacia de encapsulación, y gasto de reactivos (Hood *et al.* 2014).

En cuanto a los métodos de encapsulación, también puede clasificarse en directos si el fármaco en cuestión se añade directamente en el proceso de formación de la vesícula, quedando atrapado en la misma (es un método que suele funcionar con compuestos lipófilos); o remotos, en los que se fuerza la creación de un gradiente iónico (normalmente pHs o iones específicos que interaccionen con la molécula que va a ser encapsulada) entre el interior de la vesícula y el medio externo, de manera que los compuestos que difundan a su interior cambien su naturaleza y no puedan salir de las vesículas (Eloy *et al.* 2014, Moghassemi and Hadjizadeh 2014).

2. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación expuesta en este trabajo de fin de máster se inicia a partir de los resultados y experiencia previa del grupo de “Emulsiones, nanovesículas y bioanálisis”, que pertenece a los departamentos de Química Analítica e Ingeniería Química de la Universidad de Oviedo. Así, Los primeros resultados forman parte de los proyectos de investigación: Mineco-13-CTQ2013-47396-R and FC-14-GRUPIN-21.

Por otro lado, a lo largo de este trabajo se ha iniciado una cooperación con el grupo de “Sarcomas y células madre carcinogénicas”, localizada en la Fundación para la Investigación Biosanitaria de Asturias (FINBA), estableciendo las bases para el desarrollo de un proyecto de investigación en conjunto para un futuro cercano.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GENERALES DE LA INVESTIGACIÓN

El objetivo principal de esta tesis de investigación es, en términos generales, la preparación nanovesículas de formulación novedosa, para la encapsulación eficiente de fármacos antitumorales. Con este fin, se contempla realizar subsecuentemente pruebas biológicas de cara a asentar las bases para el futuro desarrollo de tratamientos anticancerígenos. Para ello, se plantea la puesta a punto de una metodología de preparación de nanovesículas, así como la búsqueda de una formulación óptima de sus componentes, de manera que se obtenga un nano-transportador de características adecuadas para la administración del fármaco en tumores, es decir: biocompatible, estable, no inmunogénico, selectivo y económico. A continuación, se desarrollará una metodología de encapsulación eficiente de fármacos de naturaleza determinada. Finalmente, se realizarán ensayos biológicos en cultivo de células animales, analizando citotoxicidad e interacción célula-vesícula; para comprobar el potencial del sistema desarrollado como tratamiento antitumoral. Los resultados de este proyecto se plantean como un paso previo a la realización de una tesis doctoral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA INVESTIGACIÓN

Los objetivos que se persiguen en esta investigación se detallan a continuación:

- 1- Reconocimiento de los parámetros de mayor importancia a la hora de diseñar formulaciones de sistemas vesiculares
- 2- Establecimiento de los parámetros de operación óptimos para la preparación de nanovesículas estables con una dispersión de tamaños media cercana a 100 nm.
- 3- Funcionalización de la membrana vesicular, para mejorar sus capacidades como nanotransportadores en fluidos biológicos.
- 4- Caracterización de las propiedades interfaciales y fisicoquímicas de las nanovesículas.
- 5- Encapsulación eficiente de fármacos antitumorales, específicamente mitramicina y su análogo EC 8042.
- 6- Caracterización de la interacción célula-vesícula por microscopía confocal.
- 7- Evaluación de la citotoxicidad del sistema vesicular.
- 8- Análisis del efecto de la encapsulación en la citotoxicidad de la mitramicina y el análogo EC 8042

4. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los estudios descritos en este trabajo de fin de Máster parten de algunos resultados obtenidos previamente por otros miembros del grupo de investigación. Se ha realizado previamente un diseño factorial de experimentos (Plackett-Burman con 2 niveles y resolución 3 para 16 ciclos) para -la selección de los parámetros de mayor influencia durante la preparación de vesículas por el método de inyección en etanol (escogido por su sencillez y escalabilidad en el tamaño y polidispersidad de las vesículas). En base a estos resultados, se escogieron como parámetros de mayor importancia la proporción de fases orgánica y acuosa, amplitud de ultrasonidos y concentración de componentes de membrana.

4.1. DISEÑO FACTORIAL DE EXPERIMENTOS

Partiendo de las variables fijadas en los estudios previos expuestos en el anterior apartado, se planteó un diseño de experimentos que permitiera la creación de un modelo matemático para la obtención de vesículas de tamaño y polidispersidad controlada. De esta manera es posible alcanzar un mayor conocimiento sobre el comportamiento de los sistemas vesiculares preparados por inyección en etanol. Para ello, se ha empleado el software estadístico MINITAB v 17 en la realización de un diseño factorial con 3 factores y dos niveles (2^3) factores. Se incluyó también un punto central para intentar ajustar la curvatura de la tendencia. Se realizaron 5 repeticiones del punto central y se aleatorizaron los ensayos, para minimizar posibles errores sistemáticos y evaluar el error experimental. En la Tabla 4 se muestran los valores considerados en el diseño factorial.

La composición de los niosomas se basaba en una relación 1:0,5 de Span 60 y colesterol. Las condiciones experimentales para la preparación de las formulaciones usadas en este trabajo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4: Valores del diseño experimental

Niveles	Relación de fases orgánica:acuosa (ml)	Masa de componentes de membrana (mg)	Amplitud de ultrasonidos (%)
-1	5:50	100	30
0	12.5:50	250	42.5
1	20:50	400	55

Los valores óptimos se eligieron en base a dos parámetros: el tamaño de las vesículas y el índice de polidispersidad (PDI). La relación entre estos parámetros y factores a

optimizar se evaluó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el programa Minitab v1.7. A partir de estos resultados se creó el modelo estadístico para cada respuesta.

Posteriormente se utilizó la herramienta de optimización de respuesta del programa, para obtener una combinación de variables que minimice tamaño y PDI con una alta probabilidad de éxito ($\alpha=0.05$) y así establecer unos parámetros de referencia para los estudios posteriores.

4.2. PREPARACIÓN DE NANOVESÍCULAS

El método de preparación de nanovesículas optimizado en este estudio es el EIM. Sin embargo, también se realizan preparaciones por el método de TFH de cara a comprobar diferencias estructurales, de estabilidad y eficacia de encapsulación de nanovesículas preparadas por ambos métodos. Para ello, se extrapolan en lo posible los parámetros de referencias establecidos en el apartado anterior, al método de TFH.

4.2.1. EQUIPAMIENTO

El equipamiento empleado para la preparación de nanovesículas es el siguiente: bomba de jeringa (KDS Scientifics, EEUU), rotavapor (Büchi R 205 con bomba de vacío Büchi V-500, Büchi Labortechnik AG, Suiza), Sonda de temperatura (IKA RCT basic, IKA ETS-DS, LLG Labware, EEUU), y sonicador (Optic Ivymen System, España).

Las fases acuosas se componen de agua ultrapura MQ tamponada con PBS 10 mM con 160 Mm de NaCl (tampón A), o HEPES 10 Mm, con 80 Mm DE CaCl₂ (tampón B)

4.2.2. COMPONENTES DE MEMBRANA

Los componentes de membrana empleados en las diferentes formulaciones son: Fosfatidilcolina de soja (fosfolípido, Phospholipon 90G; Lipoid, Alemania), monostearato de sorbitán (surfactante no iónico, Span 60, Sigma Aldrich, EEUU), monolaurato de sorbitán polietilenglicol (surfactante no iónico, Tween 20, Sigma Aldrich, EEUU), colesterol (estabilizante de membrana, Across organics, EEUU), dicetil fosfato (inductor de carga negativa, DCP, Sigma Aldrich, EEUU), colesterol pegilado (Sigma Aldrich, EEUU); fosfatidiletanolamina con rodamina B (grupo fluoróforo con $\lambda_{em}=585$ nm, $\lambda_{ex}= 533$ nm; Avanti Polar Lipids, EEUU), colesterol con 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD, grupo fluoróforo con $\lambda_{em}= 516$, $\lambda_{ex}= 485$; Avanti Polar Lipids, EEUU).

4.2.3. INYECCIÓN EN ETANOL

PROTOCOLO

- 1- En primer lugar, se diluyen los componentes de membrana en un volumen específico de etanol absoluto utilizando agitación magnética.
- 2- 50 ml de fase acuosa se calientan a 60 °C con agitación magnética a 500 rpm.
- 3- La fase orgánica con los componentes de membrana disueltos, se recoge en una jeringa de 20 ml en cuya boquilla se le añade un capilar acabado en una punta de pipeta de 20 µl.
- 4- Con la bomba de jeringa, se inyecta la fase orgánica en la acuosa a un caudal de 180 ml/h manteniendo la agitación magnética y la temperatura a 60°C.
- 5- Una vez se ha inyectado toda la fase orgánica; se deja estabilizar la dispersión a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 6- A continuación, se evapora la fracción de etanol en un rotavapor en un baño a 50 °C, con agitación de 35 rpm y una presión de 80 mbar durante 10 minutos.
- 7- Finalmente, la dispersión resultante se sonica durante 20 minutos a la amplitud determinada, refrigerando con un baño de hielo.

4.2.4. HIDRATACIÓN EN PELÍCULA FINA

PROTOCOLO

- 1- En primer lugar, los componentes de membrana se disuelven en 20 ml de etanol.
- 2- En un matraz de 250 ml, se evapora utilizando el rotavapor todo el etanol, lo que da lugar a la formación de una película fina que recubre las paredes del recipiente (la película debe estar completamente deshidratada, con apariencia vidriosa, lo cual puede llevar de 2 a 3 horas bajando la presión a 40 mbar).
- 3- El siguiente paso es rehidratar la película con 50 ml de fase acuosa aprovechando la agitación del propio rotavapor (a 90 rpm, sin hacer vacío).
- 4- Una vez formadas las nanovesículas, se sonica la muestra en un baño de hielo durante 20 minutos a una amplitud determinada.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE NANOVESÍCULAS

El diámetro medio de las nanovesículas, que se asumen son estructuras esféricas, se determinó mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS, Photon Correlation

Spectroscopy), técnica también denominada dispersión elástica de luz (DLS, Dynamic Light Scattering) utilizando el equipo Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Reino Unido). La técnica DLS proporciona de manera simultánea información sobre el diámetro medio y la distribución de tamaño de las nanovesículas. Este equipo permite medir en el rango de tamaño entre 0.3 nm y 10 μm . Las partículas en este rango de tamaños llevan asociado un movimiento browniano (el cual es más lento a mayor tamaño de partícula), que causa que la luz que incide se disperse en ángulos variantes con el movimiento. Por tanto, el total de la luz detectada en un ángulo determinado depende de la velocidad del movimiento browniano. Sin embargo, el principal inconveniente es que no permite conocer la forma de las vesículas y los agregados de dos más partículas son considerados como una única partícula de mayor tamaño.

La determinación de la estructura y morfología de las vesículas requiere el empleo de técnicas de microscopía. Para ello se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (MET Jeol-2000 EX-II, EEUU). Para una observación óptima de las vesículas, se realizó a las muestras un contraste negativo utilizando ácido fosfotúngstico.

La estabilidad de las nanovesículas se analizó, por un lado, midiendo los tamaños a diferentes tiempos puesto que las vesículas inestables tienen a aglomerarse y a aumentar su tamaño. Por otro lado, las nanovesículas también se analizaron en el Turbiscan Lab Expert (Formulation, Francia), cada 1 h durante 5 días. Este equipo analiza la estabilidad de emulsiones por dispersión múltiple de la luz (MLS o Multiple Light Scattering). Su funcionamiento se basa en la difracción que tiene lugar cuando una suspensión es atravesada por un haz de luz infrarroja la realización de múltiples medidas de la dispersión que sufre un haz de luz infrarroja ($\lambda=880\text{ nm}$) que incide sobre la muestra estática.

4.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

El método de preparación debe ser optimizado de manera que permita la obtención de nanovesículas estables, monodispersas, capaces de encapsular mitramicina y el análogo EC-8042, y cuya media de distribución de tamaños se sitúe en torno a los 100 nm. Esto resulta problemático por la naturaleza ampliamente hidrofílica de la mitramicina (MTR), así como su pequeño tamaño. Dicha optimización se realizará usando los transfersomas como referencia, dado que son los sistemas vesiculares más novedosos y con las características más adecuadas en términos de citotoxicidad, coste y flexibilidad.

Los ensayos realizados para la optimización del procedimiento operativo, se realizan, a excepción de las pruebas de encapsulación directa (que se mostrará en el apartado

4.4.2.1.), para nanovesículas preparadas por EIM. Esto se debe al hecho de que sea el método de referencia para el cual se han estudiado los parámetros de preparación.

4.4.1. TAMAÑO

A partir del modelo estadístico obtenido en el diseño de experimentos explicado en el apartado 4.1., así como la comparación con los resultados obtenidos por otros miembros del grupo con liposomas, se fijan los parámetros experimentales.

Partiendo de dichos parámetros, se modificó la composición de la membrana vesicular de los transfersomas de manera que se obtuvo un sistema próximo a las características requeridas. En la Tabla 6 se muestran las diferentes formulaciones estudiadas.

Una vez se obtuvieron transfersomas de tamaño medio cercano a los 100 nm, se incorporaron a las formulaciones componentes de membranas con PEG de manera que este recubra la membrana de las nanovesículas dándoles mayor estabilidad.

Finalmente, se escogió una formulación estable con una media de tamaños en torno a 100 nm, la cual se empleó como referencia para posteriores ensayos.

Una vez seleccionada la formulación de referencia, se realizaron pruebas en las diferentes condiciones de preparación mostradas en el apartado 4.2., con el fin de determinar las diferencias en las características de las nanovesículas preparadas.

4.4.2. ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS

Los compuestos hidrofóbicos, como es el caso de la mitramicina o el análogo EC 8042, resultan especialmente difíciles de encapsular debido a la gran proporción de fase acuosa que hay en el exterior de las nanovesículas. Por lo tanto, se probaron dos métodos de encapsulación diferentes con el objetivo de determinar aquel que muestre una mejor eficacia de encapsulación de mitramicina (Entrechem, España), empleando como referencia la formulación seleccionada en el apartado anterior.

4.4.2.1. ENCAPSULACIÓN DIRECTA

La mitramicina se disuelve directamente en la fase orgánica con el resto de componentes de membrana disueltos, de manera que queda encapsulada durante el propio proceso de formación de las nanovesículas. Teniendo en cuenta las limitaciones de disponibilidad del fármaco se disolvió una cantidad tal para que la concentración final de la mitramicina en fase acuosa fuera de 0,1 mM

4.4.2.2. ENCAPSULACIÓN POR DIFUSIÓN PASIVA

Esta técnica se basa en la capacidad de la mitramicina y sus análogos para formar complejos en presencia de iones bivalentes, como el Ca^{2+} , con el que forma el complejo $(\text{Ca}(\text{MTR})_4)^{2-}$.

El método de encapsulación por difusión pasiva parte de la creación de un gradiente iónico entre el núcleo acuoso de las vesículas (el cual contendrá cationes bivalentes) y el entorno acuoso exterior (con cationes monovalentes). De esta forma, cuando la muestra conteniendo las nanovesículas se pone en contacto con la mitramicina, parte de esta tiende a difundir hacia el interior de las mismas donde formará los complejos con los cationes Ca^{2+} lo cuales quedarán atrapados debido a su gran tamaño.

PROTOCOLO

- 1- En primer lugar, las nanovesículas se prepararon siguiendo el protocolo expuesto en el apartado 4.2.3, utilizando, como fase acuosa el tampón B.
- 2- Se centrifugaron 10 ml de preparación en ultracentrífuga (ProteomeLab™ XL-A/XL-I, Beckman.Coulter, EEUU), con un rotor SW40Ti a 35000 rpm (217485 g) por 2 h.
- 3- Se resuspende el pellet en 1 ml de tampón B con cationes sodio empleando un vórtex (Multi-votexer V-32, Grant Instruments, Reino Unido).
- 4- Se añadió mitramicina disuelta en el tampón A, probando concentraciones finales de 1 mM y 0,5 Mm, y se incubó la preparación 10 minutos a 37 °C.

4.4.3. PURIFICACIÓN DE NANOVESÍCULAS

Para determinar la cantidad de fármaco encapsulado en las nanovesículas es necesario separar la mitramicina no encapsulada en las nanovesículas. Se estudiaron dos métodos de separación diferentes con el fin de seleccionar aquel que mostrara mejores resultados sin alterar las propiedades de las nanovesículas durante el proceso de separación. Se midió por tanto el tamaño y la polidispersidad de las nanovesículas antes y después de cada proceso además de cuantificación la eficacia de encapsulación (EE) de la MTR. Los métodos estudiados se detallan en los siguientes apartados.

4.4.3.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Para la separación de los componentes por cromatografía de exclusión molecular, se emplearon columnas “Hitrap desalting” (GE Healthcare, Reino Unido) de 5 ml (1,5 ml de volumen hueco), con un límite de exclusión entre 1000 y 5000 daltons.

PROTOCOLO

- 1- Se inyectó en la columna cromatográfica un volumen de 0,5 a un caudal de 130 ml/h
- 2- A continuación, se eluyó con tampón PBS descartando el volumen que va saliendo de la columna hasta alcanzar 1,5 ml.
- 3- Finalmente, se recolectó la fracción que recogerá los elementos no retenidos en la columna, es decir, las nanovesículas. En este caso se inyectaron 0,5 ml de muestra y se recogieron 1,5 ml, de manera que el factor de dilución es de 3. La mitramicina no encapsulada se recogió en fracciones posteriores a estos volúmenes.
- 4- El mismo proceso se puso a prueba uniendo dos columnas cromatográficas descartando en la elución 1,5 ml más.

4.4.3.2. ULTRACENTRIFUGACIÓN

Los parámetros de centrifugación son los expuestos en la sección 4.4.2.2. (10 ml de muestra centrifugadas durante 2 horas a 217485 g).

Una vez formado el pellet de nanovesículas, estas se lavaron dos veces con tampón A antes de ser resuspendidas en 1 ml de tampón A con un vórtex. Finalmente, las muestras se pasaron por un filtro de 0,2 micras para separar cualquier aglomerado restante.

4.4.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

Las muestras tomadas antes y después de la separación, fueron analizadas por RP-HPLC con un equipo HP series 1100 (Hewlett Packard, EEUU), equipado con una columna C18 de 5 µm de tamaño de partícula y unas dimensiones de 3,5 mm x 150 mm (Agilent Technologies, EEUU).

Para ello, en primer lugar, se determinó la absorbancia a la cual se detecta de manera óptima la mitramicina libre o en forma de complejo, analizando muestras 0,1 mM de mitramicina en tampones A y B en el espectrofotómetro T80 UV/VIS Spetrometer (PG Instruments Ltd, Reino Unido).

Para la medida en el HPLC, cada muestra se diluyó con metanol (Sigma Aldrich, EEUU) en una proporción 1:10 para romper todas las vesículas liberando el fármaco encapsulado. A continuación, el contenido se purificó con un filtro de jeringa de 0,2 micras de fluoruro de polivilideno para eliminar cualquier impureza. Las muestras se inyectaron en el HPLC con un caudal de 0,8 ml/minuto durante 10 minutos a 30 °C. La fase móvil siguió una rampa de fases móviles que comenzó con un 80% de agua MQ y un 20% de metanol, de manera que la proporción de metanol fue subiendo hasta

llegar en el minuto 5 a un 100% de metanol. Tras cada muestra, se lavó la columna durante 2 minutos con metanol.

En primer lugar, se realizó una recta de calibrado empleando el método de mínimos cuadrados con concentraciones de MTR 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM y 1 mM. Este rango incluye las concentraciones finales de MTR encapsulada que podrían obtenerse.

Posteriormente, con el fin de obtener la EE (%) se compararon las áreas de los picos de las muestras inyectadas antes y después de la etapa de purificación. Esto proporciona el ratio de la concentración de MTR total presente en las nanovesículas contra la concentración de MTR contenida en su interior, aplicando la Ecuación 2.

$$EE = \frac{\text{Concentración de mitramicina encapsulada}}{\text{Concentración de mitramicina total}} \times 100 \quad (2)$$

4.5. ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.5.1. MEDIO DE CULTIVO Y LÍNEA CELULAR

La línea celular sobre la que se realizan los ensayos biológicos es una línea de células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea humana, obtenidas y modificadas previamente por el grupo de “Sarcomas y células madre carcinogénicas” para obtener un modelo próximo a las células que originan los sarcomas (Tornin *et al.* 2016).

Las células se cultivaron en monocapas adherentes en un frasco de cultivo T-75 (Eppendorf, Alemania), en medio Advanced DMEM (de sus siglas en inglés “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, Life technologies inc., EEUU) con un 10% de suero fetal bobino (FBS) y Glutamax diluido 1:1000 (Life technologies, EEUU). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

4.5.2. PREPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO

Una vez establecido el cultivo celular, es necesario realizar pases para su mantenimiento, siguiendo el protocolo expuesto a continuación.

PROTOCOLO

- 1- Se comprobó la confluencia del cultivo en un microscopio óptico. Con una confluencia cercana al 90%, se retiró el medio y se eliminaron los restos de suero lavando las células con PBS.

- 2- En el siguiente paso se retiró el PBS y se añadió tripsina 0,25%/EDTA (del inglés “ethylenediaminetetraacetic acid”, Life technologies, EEUU) y se incubaron durante 5 minutos para que las células dejaran de estar adheridas a la superficie del pocillo
- 3- Tras esto, la actividad de la tripsina se neutralizó añadiendo medio con FBS.
- 4- Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1300 rpm y resuspendidas en nuevo medio.
- 5- Finalmente, las células se plaquean en un nuevo frasco de cultivo.

4.5.3. CITOTOXICIDAD DE LAS NANOVESÍCULAS

La citotoxicidad de las nanovesículas para las MSC así como la eficacia de la mitramicina encapsulada en comparación con mitramicina sin encapsular se analizó siguiendo el protocolo expuesto a continuación.

PROTOCOLO

- 1- Se plaquearon en torno a 50000 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 horas en las condiciones especificadas en el apartado 4.5.1.
- 2- Pasado este tiempo, se renovó el medio de cultivo añadiendo concentraciones específicas de las muestras que fueron ensayadas y se incubaron durante 72 horas. Realizando cada tratamiento simultáneamente en tres pocillos, se prepararon dos controles negativos conteniendo únicamente medio de cultivo y diluciones 1/5, 1/10, 1/100 y 1/1000 de transfersomas. Además, se preparó un ensayo con una concentración 0,25 μ M de MTR.
- 3- Pasadas las 48 horas, se renovó el medio de cultivo añadiendo el colorante vital WST-1 en una concentración de 18 μ l/ml (Roche) a todos los pocillos incluyendo a dos pocillos sin células que serán tomadas como blanco. Estas células se dejaron incubar durante 1 hora y se transfirieron duplicados de 150 μ l a placas de 96 pocillos.
- 4- La absorbancia a 440 nm de las muestras en la placa se analizaron en el lector de placas Synergy HT (Biotek).

El análisis estadístico de los datos obtenidos se analizó mediante el software Minitab v1.7. De esta manera, se realizó un ANOVA a las medidas de absorbancia obtenidas para los controles y cada dilución de nanovesículas, habiendo previamente comprobado que las muestras presentaban una distribución normal (test Anderson-Darling), igualdad de varianzas (test de Barlet), y asumiendo independencia entre las variables. El intervalo de confianza se estableció en un 95 % con un valor crítico $\alpha=0,05$.

4.5.4. INTERACCIÓN CÉLULA-NANOVESÍCULA

Para el análisis de la interacción célula-vesícula, se prepararon los transfersomas de referencia funcionalizados con grupos fluoróforos para su vista al microscopio confocal. La preparación de las muestras siguió el protocolo expuesto a continuación.

PROTOCOLO

- 1- Se prepararon transfersomas de referencia siguiendo el protocolo del apartado 4.2.3., añadiendo a la disolución en fase orgánica un 1% de la masa total de colesterol-NBD. Las nanovesículas se concentraron por ultracentrifugación en 1 ml de PBS.
- 2- Por otro lado, se preparó una placa de 6 pocillos con cubreobjetos en su base, con 1 ml de medio y una concentración de 50000 células y se incubó durante 24 horas.
- 3- Pasado este tiempo, se renovó el medio de cultivo añadiendo cada uno de los tratamientos que iban a ser analizados. De esta manera, se prepararon dos pocillos con nanovesículas no fluorescentes en una dilución 1/10, dos pocillos con nanovesículas fluorescentes en dilución 1/10 junto y finalmente dos pocillos con una concentración 1 μ M de mitramicina, y se incubaron durante 48 horas.
- 4- Las células de las placas que contenían los cubreobjetos, fueron fijadas a los mismos empleando para-formaldehído al 2% durante 2 minutos lavando previa y posteriormente con Tween 20 al 10%. Cada cubreobjetos se secó y se colocó de manera inversa en un portaobjetos con 10 μ l de agente de montaje.
- 5- Las muestras se observaron al microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) en las instalaciones de los servicios científico técnicos de la universidad de Oviedo. Las muestras con NBD se excitaron a 485 nm y se observaron a 516 nm, mientras que las de mitramicina se excitaron a 470 nm y se observaron a 575 nm.

El tratamiento de las imágenes obtenidas se realizó empleando el software LAS-X (Leica Microsystems).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. MODELIZACIÓN ESTADÍSTICA

Tal y como se mostró en el apartado 4.1., se ha realizado un diseño factorial de experimentos de 5 niveles, incluyendo repeticiones en los puntos centrales, para la creación de modelo estadístico que defina la preparación de niosomas por EIM. Los niosomas se formularon con una relación fija 1:0,5 del tensioactivo Span 60 y colesterol. Como se puede observar en la Tabla 4, las variables consideradas en la modelización son la cantidad total de componentes de membrana, el volumen de fase orgánica, y la amplitud de ultrasonidos durante el paso de sonicación. De esta manera, se obtuvo la tabla secuencial de experimentos expuesto en la Tabla 5.

Tabla 5: Tabla obtenida en el diseño de experimentos para la modelización de la preparación de niosomas por el método EIM.

Experimento	Componentes de membrana (mg)	Volumen de fase orgánica (ml)	Amplitud sonicación (%)	Tamaño (nm)	PdI
1	100	20	55	305	0,075
2	400	20	30	362	0,136
3	400	5	30	294	0,206
4	400	5	55	262	0,291
5	100	5	55	242	0,120
6	400	20	30	360	0,143
7	400	20	55	241	0,182
8	100	5	30	235	0,078
9	250	12,5	42,5	301	0,195
10	100	20	30	253	0,032
11	400	5	55	276	0,235
12	400	5	30	275	0,145
13	100	20	55	248	0,066
14	100	20	30	268	0,045
15	100	5	30	238	0,094
16	250	12,5	42,5	305	0,253
17	250	12,5	42,5	317	0,118
18	400	20	55	224	0,203
19	250	12,5	30	308	0,241
20	250	12,5	42,5	337	0,171
21	100	5	55	233	0,124

El resultado del ANOVA realizado a las variables respuesta de la tabla, se puede observar en los diagramas de Pareto mostrada en la Figura 7.

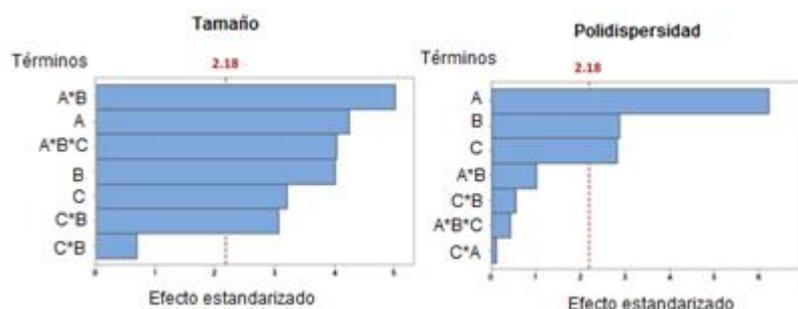


Figura 7: Diagramas de Pareto para los efectos de las variables en la polidispersidad y tamaño de lasnanovesículas.

Se puede observar que algunos de los efectos presentan interacciones. Así, por ejemplo, el efecto que tiene la amplitud de ultrasonidos (A) en el tamaño de los niosomas, va a depender de los niveles de masa de componentes de membrana (B) y/o volumen de fase orgánica (C). La gráfica indica, además, que el factor clave en el tamaño de los niosomas será la amplitud de sonicación. Por otro lado, los efectos de los otros factores también resultan significativos.

En cuanto a la polidispersidad, se puede observar que el efecto más importante lo produce también la amplitud de los ultrasonidos, a la vez que los otros factores también tienen bastante importancia. Sin embargo, no hay interacción entre las variables.

En términos generales, se puede concluir que la amplitud de sonicación es el factor más importante tanto en el tamaño como en la polidispersidad de las nanovesículas reduciendo el primero y ampliando el segundo a mayores valores. En cuanto a la cantidad de componentes de membrana, a mayores valores tienden a ampliar el tamaño y la polidispersidad. Finalmente, la proporción de fase orgánica con respecto a la acuosa parece aumentar el tamaño a mayores valores, así como disminuir la polidispersidad.

De este análisis se obtienen los modelos estadísticos para la preparación de niosomas en proporción 1:0,5 de Span 60 y colesterol, mostrados en la Ecuación 3 y en la Ecuación 4:

$$\text{Tamaño} = 236,9 - 4,31 C - 0,012 A - 0,56 B + 0,0461 C*A + 0,00363 A * B - 0,00114 A * B * C + 44,00 Ct Pt \quad (3)$$

$$R^2 = 91,27\%$$

$$\text{Pdl} = 0,053 - 0,00392 C + 0,000039 A + 0,00067 B + 0,0597 CtPt \quad (4)$$

$$R^2 = 84,73\%$$

Siendo Ct y Pt el efecto de la corrección de los puntos centrales, y las diferentes variables los valores estandarizados de los diferentes parámetros.

Con estos resultados es posible controlar el tamaño y polidispersidad de niosomas preparados por EIM, dentro del rango de variables de estudio y de una composición de membrana determinada. Aunque esto no es extrapolable a sistemas vesiculares con otras composiciones o preparados por otros métodos, gracias a la comparación con los resultados obtenidos por el grupo de investigación en estudios homólogos con liposomas, se ha alcanzado un mayor conocimiento sobre la importancia de las variables más relevantes en las características de sistemas vesiculares. Similares resultados han sido obtenidos por otros autores (Moghassemi and Hadjizadeh 2014).

Además, cabe mencionarse que se ha descubierto una correlación directa entre la cantidad de colesterol empleado en la formulación y el efecto de la sonicación las características de la misma (Padamwar and Pokharkar 2006)

En base a eso, para la realización de los estudios cuyos resultados se mostrarán en apartados posteriores, se establecieron como parámetros de referencia la sonicación a una amplitud del 55%, 5 ml de fase orgánica para 50 ml de acuosa, y 100 mg en masa de componentes de membrana para los 50 ml de fase acuosa.

Este análisis estadístico forma parte de una publicación científica que, en la fecha en la que se escribe este trabajo, está bajo revisión pendiente de publicación (García-Manrique P 2016)

5.2. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN

5.2.1. FORMULACIÓN DE COMPONENTES DE MEMBRANA

Partiendo de los parámetros de referencia establecidos en el apartado anterior, se probaron diversas formulaciones de transfersomas con el fin de obtener sistemas cuyo rango de tamaños medio esté en torno a los 100 nm manteniendo unos valores de polidispersidad por debajo de 0,3 y alta estabilidad.

En la Tabla 6, se muestran las formulaciones de vesículas estudiadas preparadas por EIM. Cabe mencionar que se analizaron formulaciones incluyendo otros agentes emulsificantes a los empleados en la Tabla 6, como el dodecanol o el ácido esteárico. Sin embargo, dichos compuestos no formaron vesículas estables. Como se observa, la formulación 3:3:3:1 de fosfatidilcolina, Span 60, Tween 20 y colesterol da los valores más próximos a las características requeridas.

Tabla 6: Formulaciones de nanovesículas probadas durante la búsqueda de las características de interés. Resaltado en rojo se muestra la formulación elegida como referencia para posteriores ensayos.

Estequiometría de componentes de membrana				Características	
PC	Span 60	Tween 20	Colesterol	Tamaño (nm)	PdI
0	1	0	0,5	240,6	0,102
0	1	1	1	177,1	0,215
0,5	1,5	1	1	168,8	0,198
1	0	0	0	77,14	0,277
1	1	0	1	243,26	0,171
1	1	0	0	174,8	0,302
1	0,5	0,5	0	93,76	0,321
1	1	1	1	133,3	0,203
1	0,5	0,5	1	135,9	0,191
1	0,5	0,5	0,5	114,6	0,225
1	1,5	1,5	1	129,7	0,180
1,5	0,5	1	1	137,73	0,218
1,5	1,5	0,5	0,5	142,7	0,168
1,5	1	0,5	1	136,1	0,172
1	1,5	0,5	1	140,4	0,211
1	1,5	1	0,5	159,2	0,181
3	3,5	3	0,5	118,0	0,227
3	3	3	1	106,1	0,23

Con los tensioactivos que se emplearon resulta complicado alcanzar formulaciones cuyo tamaño baje de los 100 nm. Tal y como se muestra en la Tabla 2, las formulaciones que cumplen este requisito suelen incorporar deoxicolato de sodio (Chaudhary *et al.* 2013, Mahmood *et al.* 2014, Ascenso *et al.* 2015). Este es un tensioactivo aniónico comúnmente usado en bioquímica para solubilizar proteínas de membrana externa en análisis electroforéticos. Sin embargo, el uso de este componente no se ha considerado para este estudio debido a su alta toxicidad para el ser humano (Merchán *et al.* 2011).

Otras formulaciones de interés, como puede ser la relación 1:0,5:0,5 de fosfatidilcolina, Span 60 y Tween 20, dieron valores de polidispersidad demasiado altos.

La estabilidad de la formulación seleccionadas fue analizada en el Turbiscan cada hora durante 5 días dando el perfil de retrodispersión (es decir, la luz dispersada a 180°) mostrado en la Figura 8.

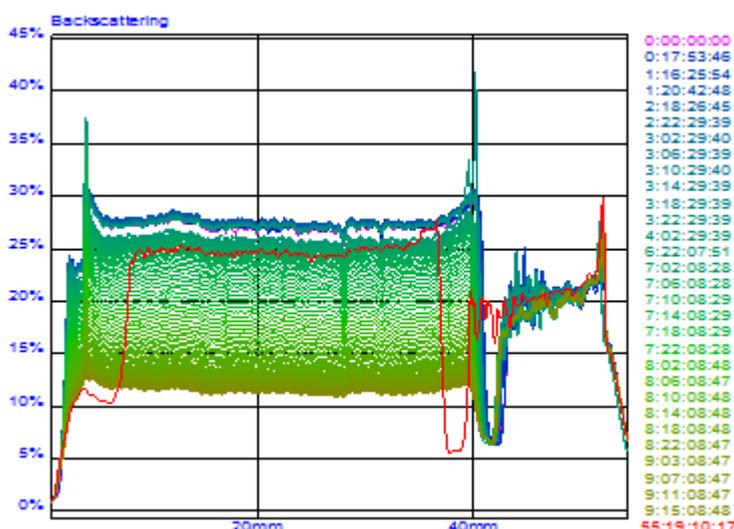


Figura 8: Perfil de retrodispersión de la muestra 3:3:3:1 de fosfatidilcolina, Span 60, Tween 20 y colesterol; medida durante 5 días. Se puede ver una gran variación con el tiempo de la cantidad de luz retrodispersada lo cual indica que hay una variación notable en las nanoestructuras de la muestra.

La Figura 8 muestra el perfil de luz retrodispersada a lo largo de la altura de la celda frente al tiempo. Como se puede observar, existe una gran variación en toda la muestra. Los valores de retrodispersión aumentan con el tiempo. Esta es la tendencia que cabe esperar cuando se produce un aumento en el tamaño medio en sistemas cuyo tamaño medio es inferior a la longitud de onda del equipo (880 nm) (López *et al.* 2015). Esto puede indicar a un efecto de migración (floculación o precipitación) o a la variación del tamaño de las vesículas de la muestra. El mismo comportamiento se pudo observar en el perfil de luz

reflejada, cuya figura no se muestra. Con el fin de determinar el origen de la variación de la retrodispersión, las vesículas fueron agitadas en un vórtex y medidas al DLS, observándose un aumento considerable del tamaño y polidispersidad por lo que se puede concluir que el sistema es inestable, de manera que las vesículas tienden a aglomerarse en otras más grandes.

Por otro lado, las nanovesículas preparadas con esta misma formulación de transfersoma analizaron al microscopio electrónico de transmisión, siendo sometida previamente a un tratamiento con ácido fosfotúngstico como tinción de contraste negativo. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 9.

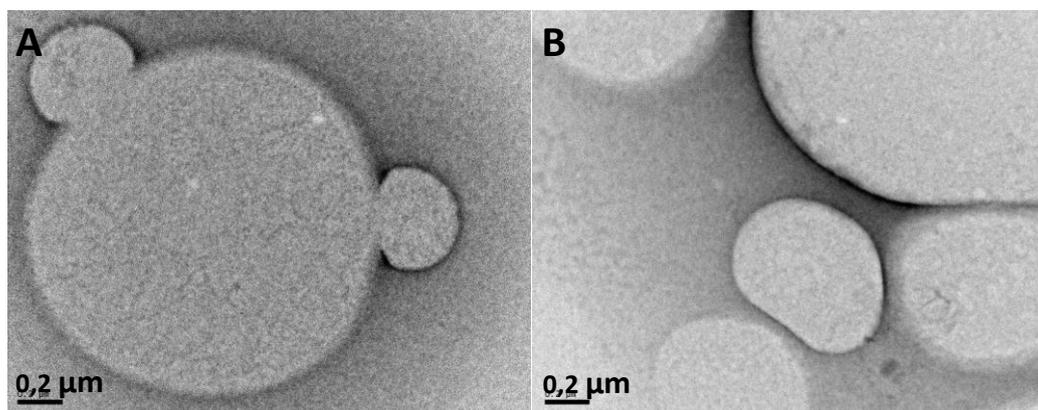


Figura 9: Imágenes al microscopio óptico de transmisión de la formulación de referencia inicial de transfersomas. En la imagen A) se muestran las nanovesículas en proceso de aglomeración. En la imagen B) se pueden ver las nanovesículas aproximándose unas a otras.

Como se puede ver en la Figura 9, las nanovesículas muestran un tamaño considerablemente mayor a las medidas del DLS. Esto se debe a que, durante el proceso de secado en la preparación de las para su análisis al microscopio, tienden a aglomerarse tal y como se ve en la imagen A. Este comportamiento fue publicado por otros autores a la hora de analizar vesículas por crio-TEM (Zheng *et al.* 2000).

En vista de que los sistemas vesiculares de menor tamaño resultaron ser inestables, además de presentar alta polidispersidad, se diseñaron formulaciones que incluían colesterol-PEG con el fin obtener nanovesículas más estables. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 7.

Como se indicó previamente en la Tabla 2, existen otros estudios en los que se funcionalizaron las nanovesículas con PEG obteniendo resultados muy positivos (Martina *et al.* 2005, Gómez-Hens and Fernández-Romero 2006, Lin *et al.* 2013)

Resaltado en rojo en la Tabla 7, se destaca la formulación finalmente seleccionada como referencia para posteriores ensayos (3:3:3:0,5 de PC, Span 60, Colesterol-PEG y colesterol), por estar dentro del rango de tamaños deseado y ser estable.

Tabla 7: Formulaciones de transfersomas funcionalizados con PEG

Proporción de componentes de membrana en 100 mg de componentes de membrana totales					Características		
PC	Span 60	Tween 20	Colesterol	Colesterol-PEG	Tamaño	PdI	Comentarios
3	3	3	0	1	95,97	0,273	Inestable a corto plazo
4	4	0	0	1	98,96	0,246	Inestable a corto plazo
3	3	0	0	2	125,3	0,205	Media de dispersión de tamaños muy por encima al objetivo
4	3	0	0	3	80,38	0,341	PDI fuera del límite establecido
3	3	0	0,5	3	109,9	0,256	Estable, formulación seleccionada

Algunas de las formulaciones estudiadas se descartaron debido a su inestabilidad o a su alta polidispersidad ya que estos parámetros aumentaban de manera significativa entre 24 y 72 horas después de su preparación. A modo de ejemplo se cita la formulación 3:3:3:1 de fosfatidilcolina, Span 60, Tween 20 y colesterol-PEG, cuyo tamaño aumentó de 95,97 nm a 109 nm y su PdI pasó de 0,273 a 0,350.

La distribución de tamaños medida en el DLS para la formulación seleccionada como referencia se muestra en la Figura 10. Resulta posible observar que el máximo de la distribución de tamaños se encuentra en torno a los 100 nm.

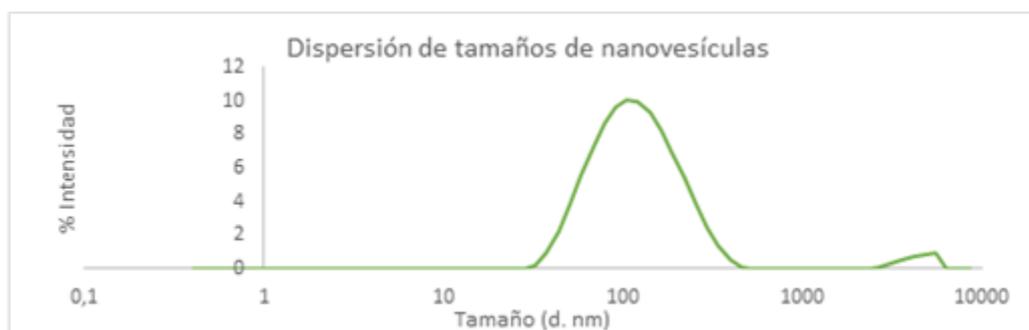


Figura 10: Distribución de tamaños de la muestra de referencia medidas en el DLS.

Se puede observar una pequeña curva en un rango de tamaños superior que se puede atribuir a pequeñas partículas liberadas por la sonda de ultrasonidos durante la etapa de sonicación, ya que los agregados quedaron descartados tras el análisis en el TEM, cuyas imágenes se muestran en la Figura 11.

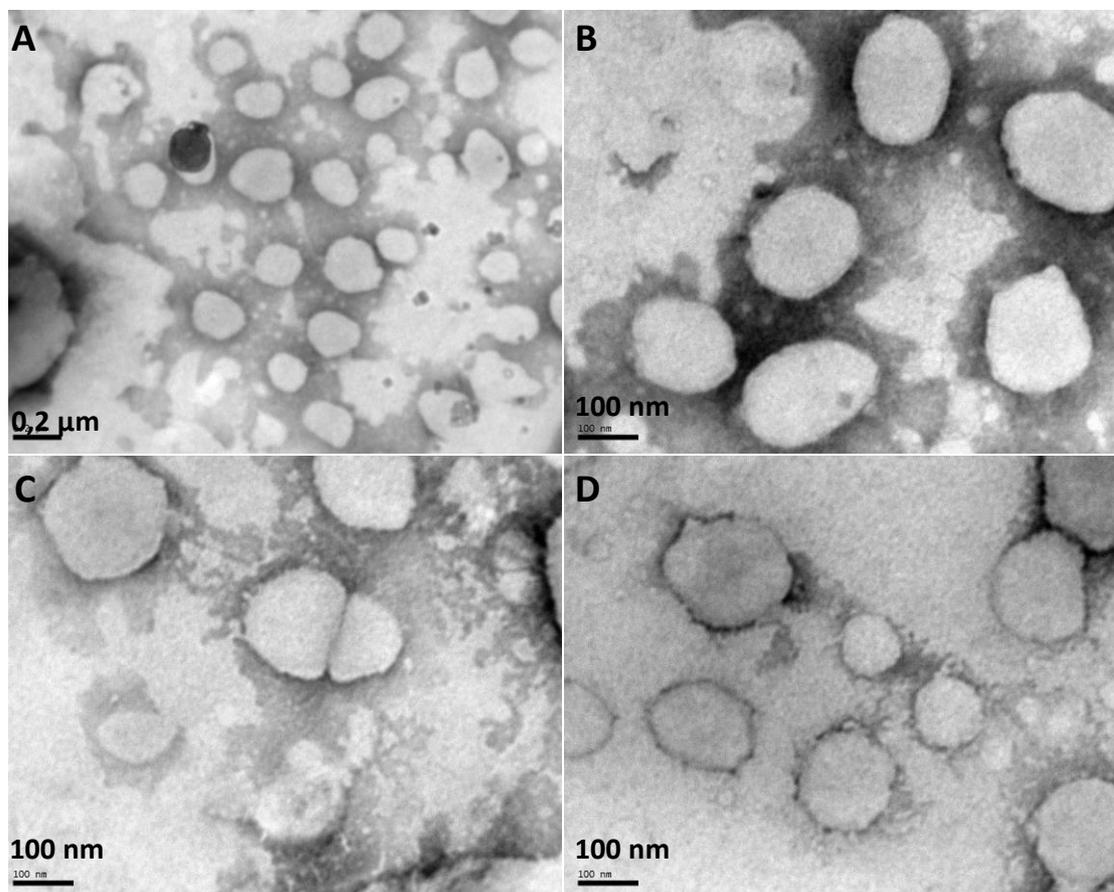


Figura 11: Imágenes tomadas al TEM de la formulación de transfersomas funcionalizados con polietilenglicol establecida como referencia para ensayos posteriores. En la imagen A), se muestra una imagen de campo de la muestra con nanovesículas de tamaños comprendidos entre 100 y 140 nm. En la imagen B) se muestra una imagen más cercana de las nanovesículas. En la imagen C) se muestran dos nanovesículas en proceso de aglomerarse para formar una de mayor tamaño. Finalmente, en la imagen D) se muestra una agrupación de nanovesículas de tamaños inferiores o iguales a 100 nm.

Como se puede ver, el tamaño de las vesículas es ligeramente mayor al esperado, estando comprendido entre 110 y 140 nm. Esto se debe a la aglomeración de las nanovesículas producida por el método de preparación antes mencionado. Un ejemplo de esta aglomeración puede verse en la imagen C de la Figura 12. Por otro lado, se puede apreciar que la mayor parte de las nanovesículas muestran una conformación esférica. Por todo lo

anterior, se puede observar que la formulación analizada forma unas nanovesículas cuya conformación denota estabilidad estructural.

A modo de comparación, también se observaron la formulación 3:3:3:1 de fosfatidilcolina, Span 60, Tween 20 y colesterol-PEG que puede observarse en las figuras A y B de la Figura 12.

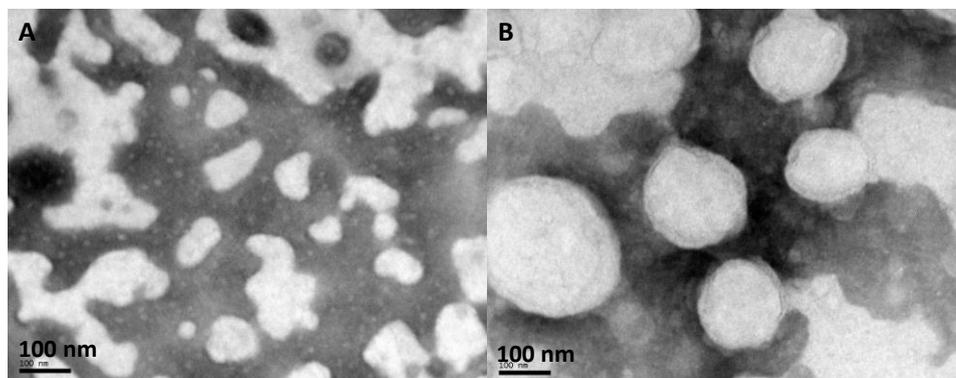


Figura 12: Imágenes tomadas al TEM de la formulación 3:3:3:1 de PC, Span 60, Tween 20 y colesterol-PEG. En la imagen A) se observa que las nanovesículas se muestran deformadas y tendiendo a aglomerarse. En la imagen B) se muestran vesículas de tamaños entre 80 y 100 nm.

En este caso se puede observar como las nanovesículas están completamente dañadas y han tendido a aglomerarse en formaciones mucho más grandes como se ve en la imagen A). Al analizarlas en el Turbiscan, se confirmó que estas vesículas eran bastante inestables. Además, las vesículas que aún mantienen un rango de tamaños dentro de la escala nanométrica se muestran bastante deformadas.

La medida de la estabilidad de los transersomas de referencia se muestra en la Figura 13.

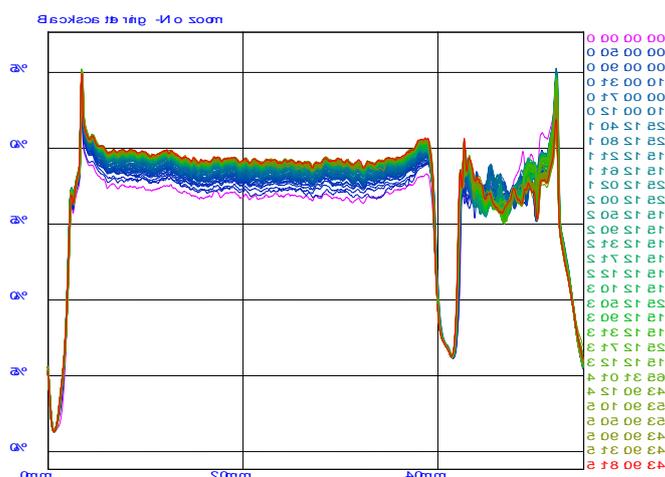


Figura 13: Perfil de “backscattering” medido en el TurbiScan durante 5 días para la formulación de referencia de transersoma funcionalizado con polietilenglicol.

En el perfil de retrodispersión se puede observar una ligera variación de entorno a un 2% lo cual indica que el sistema formulado tiene una elevada estabilidad. Además, al medir de nuevo el tamaño de la muestra al final del periodo de monitorización con el Turbiscan, se comprueba que tanto el tamaño como el PdI de las nanovesículas no varían con respecto a los valores iniciales.

A modo de resumen, se estableció de referencia para futuros ensayos una formulación 3:3:3:0,5 de fosfatidilcolina, Span 60, Tween 20, colesterol-PEG y colesterol.

5.2.2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Una vez determinados los parámetros de mayor importancia, se analizó el efecto que el método de preparación tenía sobre las características de las nanovesículas. De esta manera, se prepararon los transfersomas de referencia en las condiciones mínimas establecidas para EIM, y se intentaron extrapolar dichas condiciones al método de TFH, con la única variación del volumen de fase orgánica que se estableció en 20 ml para cubrir una mayor superficie de película cubriendo el recipiente una vez evaporado el etanol. Las diferencias entre ambos sistemas fueron leves, teniendo las nanovesículas preparadas por TFH una dispersión de tamaños media en torno a 10 nm inferior y un PdI en torno a 0,340. Este resultado contrasta con lo publicado en otros estudios (Moghassemi and Hadjizadeh 2014), lo cual puede explicarse por el enorme efecto que el paso de la sonicación tiene para formulaciones que incluyen tensioactivos.

En cuanto a la estabilidad, las preparaciones mostraron perfiles similares resultando igualmente estables en ambos casos.

Para acabar, cabe mencionar que, debido al alto coste de los fármacos, la reducción de los volúmenes de trabajo resulta trascendental para el desarrollo de un procedimiento económicamente viable. Por esta razón, se escalaron los métodos de preparación de nanovesículas para trabajar con la mitad de volúmenes y masas. En ambos casos se obtuvieron tamaños ligeramente inferiores y polidispersidades algo más grandes

5.3. ENCAPSULACIÓN DE MITRAMICINA

5.3.1. CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACO

Se probaron tres métodos de encapsulación diferentes, dos por encapsulación directa empleando los métodos de preparación EIM y TFH, y otro por encapsulación remota empleando un gradiente de cationes calcio en vesículas preparadas por EIM. En cada

prueba, se comprobaron las muestras antes y después de purificar y se analizaron en el HPLC de cara a determinar la eficacia de encapsulación.

De manera previa a las pruebas, se analizó el espectro de absorbancia de la mitramicina 0,1 mM diluida en tampón A y en tampón B (donde parte de la mitramicina formará complejo con el calcio) para obtener la longitud de onda óptima a la que puede ser analizada. Ambos espectros pueden observarse en la Figura 14.

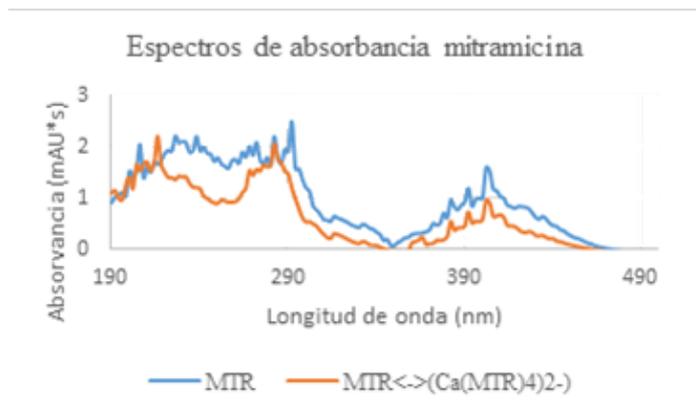


Figura 14: Espectros de absorbancia para diluciones 0,1 mM de mitramicina en los tampones A, con cationes sodio, y B, con cationes calcio con los cuales la mitramicina tiende a formar complejos

Como se puede observar, los espectros muestran algunas diferencias debido a la formación de los complejos con calcio de la mitramicina en el tampón B, los cuales alteran ligeramente el espectro de absorbancia. Hay que tener en cuenta que no toda la mitramicina forma complejo, de manera que se establece un equilibrio entre la forma con calcio y sin ella. Se estableció 280 nm (máximo común en ambos espectros) como longitud de onda de medida, de acuerdo a resultados obtenidos en estudios anteriores (Frezard, 1997).

Por otro lado, se preparó una curva de calibrado mediante el método de mínimos cuadrados de cara a cuantificar la cantidad exacta de mitramicina encapsulada obtenida en cada prueba. Se consideró un rango de concentraciones

El rango La curva de calibrado se puede observar en la Figura 15, de la cual se obtuvo una ecuación de la recta (Ecuación 5) con un coeficiente de correlación corregido $R^2=1$.

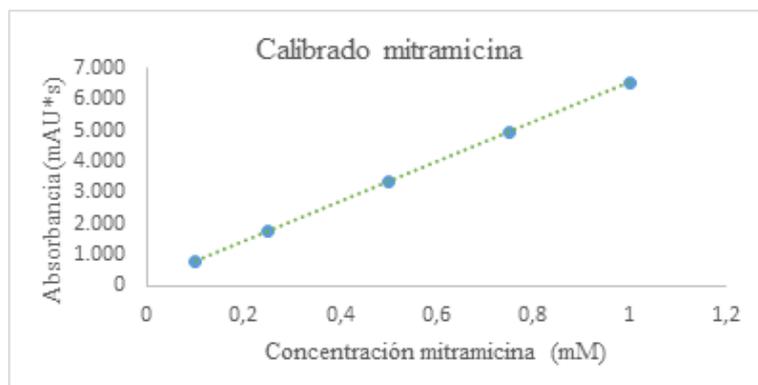


Figura 15: Recta de calibrado para la mitramicina con un coeficiente de correlación $R^2=1$

$$Y = 6407X + 152.29 \quad (5)$$

Siendo Y la señal medida y X la concentración en mM de mitramicina.

Por otro lado, el cromatograma de la mitramicina medida por absorbancia a 280 nm observado en el patrón 1mM de mitramicina se muestra en la Figura 16.

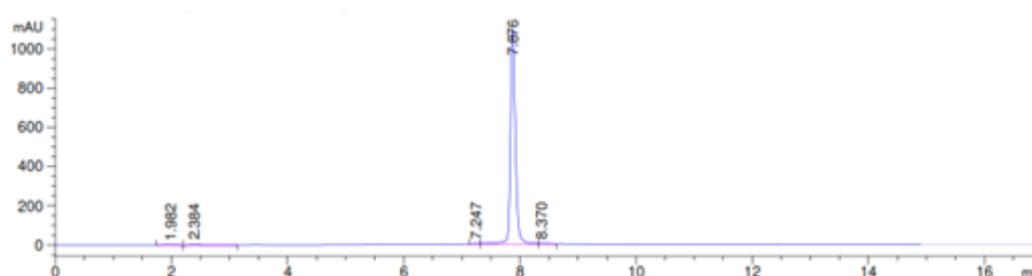


Figura 16: Cromatograma del patrón de mitramicina 1 mM a 280 nm.

A partir de las áreas tomadas de las señales de las muestras totales y purificadas de los diferentes métodos de encapsulación probados se obtuvieron las EE del fármaco.

En el caso de las técnicas de encapsulación directa, se obtuvieron eficacias inferiores al 1%, lo cual puede explicarse por la diferencia entre la cantidad de fase acuosa exterior en comparación con el interior de las nanovesículas, y las bajas concentraciones de mitramicina en disolución debido a limitaciones en disponibilidad y costes.

En cuanto a las pruebas de encapsulación indirecta, también se alcanzaron valores bastante bajos obteniendo:

- Eficacia de encapsulación de 0,5 mM: 8,97%
- Encapsulación de 1 mM: 9,90 %

Estos valores difieren considerablemente de las EE de mitramicina obtenidas en otros ensayos realizados por otros autores en los que se utilizaba la misma técnica (Frezard, *et al.* 1997). Esto puede deberse a las diferencias en la composición y el tamaño de las nanovesículas empleadas, que en este caso son mucho más pequeñas. Finalmente, se obtuvo una muestra con una concentración 58,1 μ M, suficiente para realizar ensayos de citotoxicidad preliminares en un futuro.

En el trabajo futuro se seguirá optimizando la formulación empleada de cara a encontrar nanovesículas con mayor capacidad de encapsulación. Para ello, se podría considerar el uso de nuevos tipos de nanovesículas o refinar el método de encapsulación. En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés por la preparación de nanovesículas y la encapsulación de compuestos hidrofílicos por microfluídica, (Stachowiak *et al.* 2008, Kong *et al.* 2014), lo cual puede plantearse como una posibilidad a explotar en el futuro.

5.3.1. PURIFICACIÓN DE LAS NANOVESÍCULAS

Se probaron dos métodos principales para separar la mitramicina de las vesículas. Ambos se pusieron a prueba con muestras conteniendo mitramicina sin vesículas y vesículas sin mitramicina para luego finalmente poder determinar la EE de las nanovesículas que contenían el fármaco.

Se observó que la cromatografía de exclusión molecular era incapaz de retener la mitramicina por lo que tuvo que ser descartada.

En cuanto a la ultracentrifugación, las nanovesículas fueron sometidas a dos etapas de ultracentrifugación a 35 000 rpm durante 2 h, siendo en ambos casos resuspendidas en 1 ml de PBS y filtradas para romper los agregados restantes. En ambos casos, las nanovesículas mantuvieron la media de la dispersión de los tamaños y permanecieron estables en el tiempo. De esta manera, la ultracentrifugación fue establecida como el método idóneo para la separación de fármaco encapsulado y no encapsulado.

5.4. INTERACCIÓN CÉLULA-VESÍCULA

Las muestras analizadas en el microscopio confocal se pueden observar en la Figura 17, donde se muestran las células tratadas con vesículas sin marcaje fluorescente a modo de control negativo.

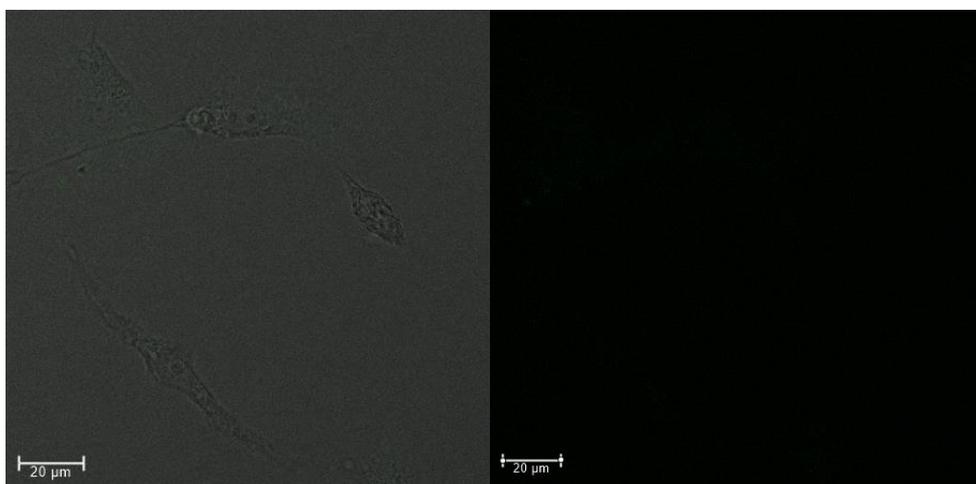


Figura 17: Muestra de MSC tratadas con transfersomas sin marcaje fluorescente a modo de control negativo. Las muestras fueron analizadas a las longitudes de onda de excitación y emisión tanto del NBD (excitación a 485 nm y emisión a 516 nm) como de la MTR (emisión a 470 nm y emisión a 575 nm).

Como se puede observar, la muestra no presenta auto-fluorescencia significativa que pueda afectar al análisis de los compuestos fluorescentes.

Por otro lado, en la Figura 18 se puede observar las muestras tratadas con transfersomas funcionalizados con NBD.

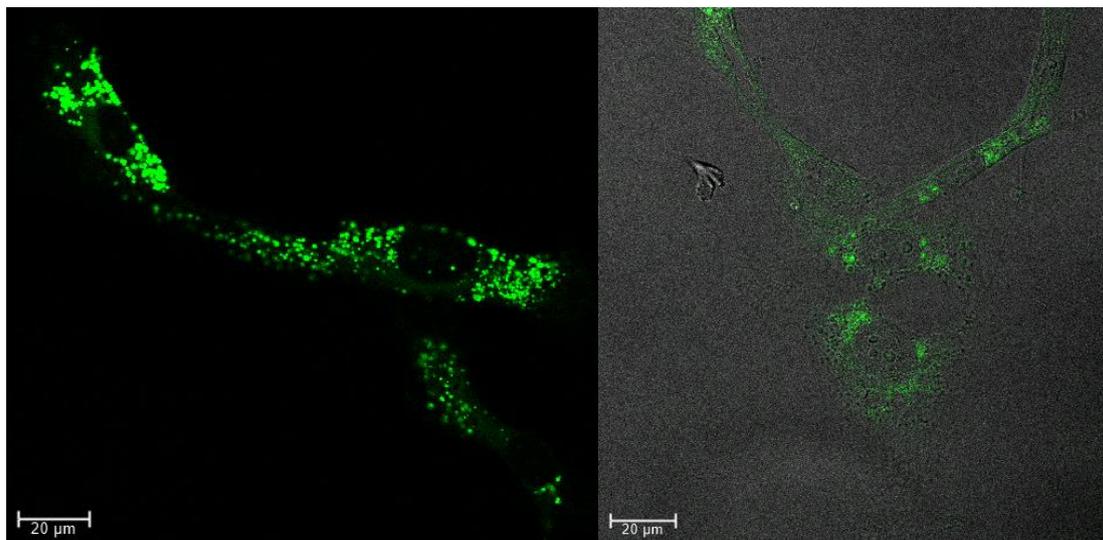


Figura 18: Imágenes tomadas en el microscopio confocal de las MSC tratadas con transfersomas funcionalizados con NBD. El análisis se realizó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y demisión de 516 nm. En verde se puede ver la fluorescencia característica del grupo fluoróforo que ha tendido a acumularse en el citoplasma de las MSC.

Como se puede observar, los transfersomas aparecen en el interior del citoplasma celular, por lo que parece que las nanovesículas han tendido a ser captadas por las células, lo cual puede resultar interesante como potencial vector para la administración de fármacos.

Finalmente, en la Figura 19, se muestran las células tratadas con MTR.

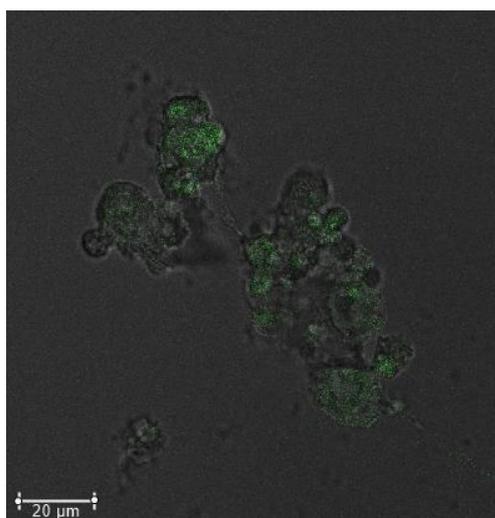


Figura 19: Imagen tomada en el microscopio confocal de MSC tratadas con MTR. La fluorescencia verde proviene de la mitramicina que ha sido excitada a una longitud de onda de 470 nm y medida a 575 nm. Las MTR ha tendido a acumularse en el núcleo de las MSC. Las células muestran una conformación ovalada que denota que están despegándose de la superficie debido a un proceso de muerte celular.

Como se puede observar, las células presentan una estructura circular indicativa de que las mismas están en un proceso de muerte debido, probablemente, a la acción de la propia mitramicina. Como este fármaco tiende a formar complejos con el ADN de las células

(Barcelo *et al.* 2010), es entendible que la fluorescencia se acumule en el núcleo de las células.

5.5. CITOTOXICIDAD

Tras la realización del ensayo WST-1 a las muestras, se comprobó que en todos los tratamientos había células supervivientes. Las viabilidades celulares obtenidas se muestran en la Figura 18.

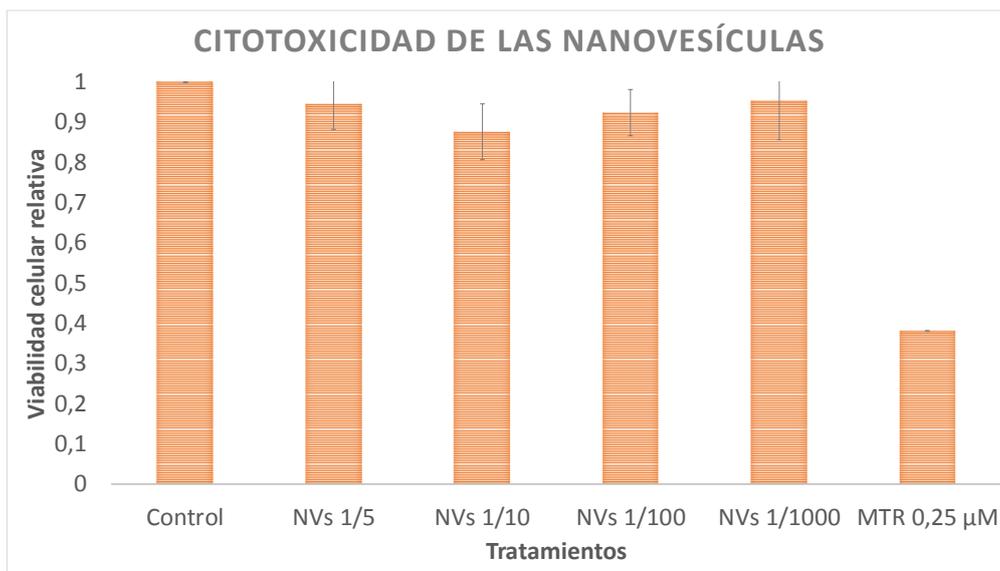


Figura 18: Gráfica con las viabilidades relativas de cada tratamiento en comparación con el control, obtenidas mediante el ensayo WST-1. Cada análisis se realizó por triplicado y cada medida por duplicado. Las diluciones de nanovesículas mostradas se consideraron a partir de una muestra 100 mg/ml de componentes de membrana.

A primera vista parece notable que existe una variación muy pequeña entre las células control y las tratadas con nanovesículas. En el ANOVA realizado a las diluciones de transfersomas se obtuvo, considerando como hipótesis nula la igualdad entre todas las variables, un p valor de 0,177, mayor al nivel de significancia $\alpha=0,05$. La diferencia entre las variables no resulta estadísticamente significativa, por lo que no se puede rechazar la hipótesis de que todas las variables son iguales. Estos resultados de citotoxicidad preliminares parecen indicar que los transfersomas de referencia no son tóxicos. Esta baja toxicidad ha sido estudiada en anteriores estudios (Alvi *et al.* 2011).

En cuanto al análisis con MTR, se obtuvo una viabilidad celular considerablemente menor al resto de ensayos debido a la toxicidad de la MTR, que ha sido estudiada en casos anteriores (Scott *et al.* 2011).

6. CONCLUSIONES

1- Mediante la realización de un diseño factorial de experimentos, se han determinado los principales parámetros que determinan las características de nanovesículas preparadas por EIM. La amplitud de los ultrasonidos durante el paso de sonicación es el factor más relevante afectando tanto a la media de la dispersión de tamaños de las nanovesículas, como a su polidispersidad. Además, la cantidad de fase orgánica y la concentración de componentes de membrana empleado también resultan determinantes.

2- Gracias a la funcionalización de las membranas de las nanovesículas con polietilenglicol, ha sido posible establecer formulaciones estables de transfersomas, relativamente monodispersos, y cuyos tamaños se sitúan en torno a los 100 nanómetros, rango en el que teóricamente se produce el efecto EPR, optimizando la acción de fármacos antitumorales encapsulados en las nanovesículas.

3- Debido a la naturaleza ampliamente hidrofílica de la mitramicina, así como a su pequeño tamaño, las técnicas de encapsulación tradicionales (directa) no resultaron efectivas, con valores inferiores al 2%. Sin embargo, el uso de técnicas más complejas, como la encapsulación por difusión pasiva, mostraron mejores resultados, lo que permitió alcanzar valores de en torno al 10%, suficiente para poder realizar ensayos biológicos. Por este motivo tanto la formulación como la estrategia de encapsulación debe ser optimizada en futuros estudios.

4- Los análisis al microscopio confocal parecen indicar que las células tienden a integrar a las nanovesículas, las cuales se acumulan en el citoplasma.

5- Las medidas de la citotoxicidad de las vesículas, así como el análisis estadístico de los resultados, parecen indicar que las nanovesículas seleccionadas no resultaron ser significativamente tóxicas para las MSC.

6- Pese a los bajos valores de EE obtenidos, los ensayos biológicos preliminares parecen sostener que los transfersomas resultan sistemas de transporte para administración de fármacos con un gran potencial, que ha de ser explotado en futuras investigaciones.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahad, A., M. Aqil, K. Kohli, Y. Sultana, M. Mujeeb and A. Ali (2012). "Formulation and optimization of nanotransfersomes using experimental design technique for accentuated transdermal delivery of valsartan." Nanomedicine **8**(2): 237-249.
- Ahmed, T. A. (2015). "Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett-Burman design and characterization." J Liposome Res **25**(1): 1-10.
- Akbari, V., D. Abedi, A. Pardakhty and H. Sadeghi-Aliabadi (2013). "Ciprofloxacin nano-niosomes for targeting intracellular infections: an in vitro evaluation." Journal of Nanoparticle Research **15**(4): 1-14.
- Akbarzadeh, A., R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi and K. Nejati-Koshki (2013). "Liposome: classification, preparation, and applications." Nanoscale Res Lett **8**(1): 102.
- Alonso, J., H. Khurshid, J. Devkota, Z. Nemati, N. K. Khadka, H. Srikanth, J. Pan and M.-H. Phan (2016). "Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in lipid vesicles for advanced magnetic hyperthermia and biodetection." Journal of Applied Physics **119**(8): 083904.
- Alvi, I. A., J. Madan, D. Kaushik, S. Sardana, R. S. Pandey and A. Ali (2011). "Comparative study of transfersomes, liposomes, and niosomes for topical delivery of 5-fluorouracil to skin cancer cells: preparation, characterization, in-vitro release, and cytotoxicity analysis." Anti-cancer drugs **22**(8): 774-782.
- Aramaki, K., J. Yamada, Y. Tsukijima, T. Maehara, D. Aburano, Y. Sakanishi and K. Kitao (2015). "Formation of bilayer membrane and niosomes by double-tailed polyglyceryl-type nonionic surfactant." Langmuir **31**(39): 10664-10671.
- Ascenso, A., S. Raposo, C. Batista, P. Cardoso, T. Mendes, F. G. Praca, M. V. Bentley and S. Simoes (2015). "Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes." Int J Nanomedicine **10**: 5837-5851.
- Barcelo, F., M. Ortiz-Lombardia, M. Martorell, M. Oliver, C. Mendez, J. A. Salas and J. Portugal (2010). "DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis." Biochemistry **49**(49): 10543-10552.
- Barenholz, Y. (2001). "Liposome application: problems and prospects." Current Opinion in Colloid & Interface Science **6**(1): 66-77.
- Barlas, F. B., B. Demir, E. Guler, A. M. Senisik, H. A. Arican, P. Unak and S. Timur (2016). "Multimodal theranostic assemblies: double encapsulation of protoporphyrine-IX/Gd³⁺ in niosomes." RSC Advances **6**(36): 30217-30225.
- Benitez, J. J., A. M. Keller and P. Chen (2010). "Nanovesicle trapping for studying weak protein interactions by single-molecule FRET." Methods Enzymol **472**: 41-60.
- Benson, H. A. (2006). "Transfersomes for transdermal drug delivery." Expert opinion on drug delivery **3**(6): 727-737.
- Blanco, E., H. Shen and M. Ferrari (2015). "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery." Nature biotechnology **33**(9): 941-951.
- Bragagni, M., N. Mennini, C. Ghelardini and P. Mura (2012). "Development and characterization of niosomal formulations of doxorubicin aimed at brain targeting." J Pharm Pharm Sci **15**(1): 184-196.
- Brannon-Peppas, L. and J. O. Blanchette (2004). "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy." Adv Drug Deliv Rev **56**(11): 1649-1659.
- Canton, I. and G. Battaglia (2012). "Endocytosis at the nanoscale." Chem Soc Rev **41**(7): 2718-2739.

- Celia, C., F. Cilurzo, E. Trapasso, D. Cosco, M. Fresta and D. Paolino (2012). "Ethosomes(R) and transfersomes(R) containing linoleic acid: physicochemical and technological features of topical drug delivery carriers for the potential treatment of melasma disorders." Bioméd Microdevices **14**(1): 119-130.
- Chang, H. I. and M. K. Yeh (2012). "Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy." Int J Nanomedicine **7**: 49-60.
- Chaudhary, H., K. Kohli and V. Kumar (2013). "Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery." Int J Pharm **454**(1): 367-380.
- Chen, L., C.-C. Bao, H. Yang, D. Li, C. Lei, T. Wang, H.-Y. Hu, M. He, Y. Zhou and D.-X. Cui (2011). "A prototype of giant magnetoimpedance-based biosensing system for targeted detection of gastric cancer cells." Biosensors and Bioelectronics **26**(7): 3246-3253.
- Dai, S., D. Wei, Z. Wu, X. Zhou, X. Wei, H. Huang and G. Li (2008). "Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer." Mol Ther **16**(4): 782-790.
- De La Pena, H., J. A. Madrigal, S. Rusakiewicz, M. Bencsik, G. W. Cave, A. Selman, R. C. Rees, P. J. Travers and I. A. Dodi (2009). "Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology." J Immunol Methods **344**(2): 121-132.
- Devkota, J., C. Wang, A. Ruiz, S. Mohapatra, P. Mukherjee, H. Srikanth and M. H. Phan (2013). "Detection of low-concentration superparamagnetic nanoparticles using an integrated radio frequency magnetic biosensor." Journal of Applied Physics **113**(10): 104701.
- Dragicevic-Curic, N., D. Scheglmann, V. Albrecht and A. Fahr (2008). "Temoporfin-loaded invasomes: development, characterization and in vitro skin penetration studies." J Control Release **127**(1): 59-69.
- El Andaloussi, S., I. Mager, X. O. Breakefield and M. J. A. Wood (2013). "Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities." Nat Rev Drug Discov **12**(5): 347-357.
- Eloy, J. O., M. Claro de Souza, R. Petrilli, J. P. Barcellos, R. J. Lee and J. M. Marchetti (2014). "Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery." Colloids Surf B Biointerfaces **123**: 345-363.
- Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. André, M.-P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulleire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J.-B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin and L. Zitvogel (2005). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial." Journal of Translational Medicine **3**: 10-10.
- Feynman, R. P. (1961). "There's plenty of room at the bottom." Miniaturization (HD Gilbert, ed.) Reinhold, New York.
- Frezard, F., A. Garnier-Suillerot and C. Demicheli (1997). "Encapsulation of mithramycin in liposomes in response to a transmembrane gradient of calcium ions." Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry **28**(1): 51-62.
- Gandhi, N. S., R. K. Tekade and M. B. Chougule (2014). "Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: current progress and advances." J Control Release **194**: 238-256.
- García-Manrique P, M. M., Gutiérrez G, Estupiñán OR, Pazos C, Blanco-López MC (2016). "Using factorial experimental design to synthesize size-tuned nanovesicles." Industrial & Engineering Chemistry Research.
- Gentine, P., L. Bourel-Bonnet and B. Frisch (2013). "Modified and derived ethanol injection toward liposomes: development of the process." J Liposome Res **23**(1): 11-19.

- Ghanbarzadeh, S. and S. Arami (2013). "Enhanced Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium via Conventional Liposomes, Ethosomes, and Transfersomes." BioMed Research International **2013**: 616810.
- Gómez-Hens, A. and J. M. Fernández-Romero (2006). "Analytical methods for the control of liposomal delivery systems." TrAC Trends in Analytical Chemistry **25**(2): 167-178.
- Guler, M. O. and A. B. Tekinay (2016). "Nanomaterials for Medicine." Therapeutic Nanomaterials: 1-6.
- Gyorgy, B., M. E. Hung, X. O. Breakefield and J. N. Leonard (2015). "Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions." Annu Rev Pharmacol Toxicol **55**: 439-464.
- Heo, D. N., W.-K. Ko, M. S. Bae, J. B. Lee, D.-W. Lee, W. Byun, C. H. Lee, E.-C. Kim, B.-Y. Jung and I. K. Kwon (2014). "Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle-hydrogel complex." Journal of Materials Chemistry B **2**(11): 1584-1593.
- Hong, I. S., G. B. Jang, H. Y. Lee and J. S. Nam (2015). "Targeting cancer stem cells by using the nanoparticles." Int J Nanomedicine **10**(Spec Iss): 251-260.
- Hood, R. R., E. L. Kendall, M. Junqueira, W. N. Vreeland, Z. Quezado, J. C. Finkel and D. L. DeVoe (2014). "Microfluidic-Enabled Liposomes Elucidate Size-Dependent Transdermal Transport." PLoS ONE **9**(3): e92978.
- Jokerst, J. V., T. Lobovkina, R. N. Zare and S. S. Gambhir (2011). "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy." Nanomedicine (Lond) **6**(4): 715-728.
- Justo, O. R. and Â. M. Moraes (2011). "Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume." Chemical Engineering Research and Design **89**(6): 785-792.
- Kawasaki, E. S. and A. Player (2005). "Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer." Nanomedicine **1**(2): 101-109.
- Kong, F., X. Zhang and M. Hai (2014). "Microfluidics Fabrication of Monodisperse Biocompatible Phospholipid Vesicles for Encapsulation and Delivery of Hydrophilic Drug or Active Compound." Langmuir **30**(13): 3905-3912.
- Kong, M., X. Chen and H. Park (2011). "Design and investigation of nanoemulsified carrier based on amphiphile-modified hyaluronic acid." Carbohydrate Polymers **83**(2): 462-469.
- Krimm, S. (1980). "The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, Charles Tanford, Wiley-Interscience, New York, 1980, 233 pp. price: \$18.50." Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition **18**(10): 687-687.
- Kumar, G. P. and P. Rajeshwarrao (2011). "Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview." Acta Pharmaceutica Sinica B **1**(4): 208-219.
- Lehner, R., X. Wang, S. Marsch and P. Hunziker (2013). "Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application." Nanomedicine **9**(6): 742-757.
- Lin, T., Q. Fang, D. Peng, X. Huang, T. Zhu, Q. Luo, K. Zhou and W. Chen (2013). "PEGylated non-ionic surfactant vesicles as drug delivery systems for Gambogic acid." Drug Deliv **20**(7): 277-284.
- López, T. D.-F., A. F. González, Á. Del Reguero, M. Matos, M. E. Díaz-García and R. Badía-Laiño (2015). "Engineered silica nanoparticles as additives in lubricant oils." Science and Technology of Advanced Materials **16**(5): 055005.
- Ludwig, A. K. and B. Giebel (2012). "Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication." Int J Biochem Cell Biol **44**(1): 11-15.

- Maeda, H. (2012). "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond." J Control Release **164**(2): 138-144.
- Mahmood, S., M. Taher and U. K. Mandal (2014). "Experimental design and optimization of raloxifene hydrochloride loaded nanotransfersomes for transdermal application." Int J Nanomedicine **9**: 4331-4346.
- Malhi, S. and X. Gu (2015). "Nanocarrier-mediated drugs targeting cancer stem cells: an emerging delivery approach." Expert Opin Drug Deliv **12**(7): 1177-1201.
- Mali, N., S. Darandale and P. Vavia (2013). "Niosomes as a vesicular carrier for topical administration of minoxidil: formulation and in vitro assessment." Drug Deliv Transl Res **3**(6): 587-592.
- Manca, M. L., M. Zaru, M. Manconi, F. Lai, D. Valenti, C. Sinico and A. M. Fadda (2013). "Glycosomes: a new tool for effective dermal and transdermal drug delivery." Int J Pharm **455**(1-2): 66-74.
- Manconi, M., S. Mura, C. Sinico, A. M. Fadda, A. O. Vila and F. Molina (2009). "Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **342**(1-3): 53-58.
- Mansoori, M., S. Agrawal, S. Jawade and M. Khan (2012). "A review on liposome." Int J Adv Res Pharm Biosci **2**: 453-464.
- Marianecchi, C., F. Rinaldi, L. Di Marzio, D. Pozzi, G. Caracciolo, D. Manno, L. Dini, D. Paolino, C. Celia and M. Carafa (2013). "Interaction of pH-sensitive non-phospholipid liposomes with cellular mimetic membranes." Biomed Microdevices **15**(2): 299-309.
- Martina, M.-S., J.-P. Fortin, C. Ménager, O. Clément, G. Barratt, C. Grabielle-Madelmont, F. Gazeau, V. Cabuil and S. Lesieur (2005). "Generation of Superparamagnetic Liposomes Revealed as Highly Efficient MRI Contrast Agents for in Vivo Imaging." Journal of the American Chemical Society **127**(30): 10676-10685.
- Marwa, A., S. Omaira, E.-G. Hanaa and A.-S. Mohammed (2013). "Preparation and in-vitro evaluation of diclofenac sodium niosomal formulations." International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research **4**(5): 1757.
- Mehanna, M. M., A. M. Motawaa and M. W. Samaha (2015). "Nanovesicular carrier-mediated transdermal delivery of tadalafil: i-formulation and physicochemical characterization." Drug Dev Ind Pharm **41**(5): 714-721.
- Merchán, Y., S. Lucangioli, C. Carducci, E. M. Fajardo, J. Rico, Y. Tamayo and I. Delgado (2011). "Determinación de residuos de deoxicolato de sodio en formulaciones vacunales por cromatografía electrocinética micelar." Vaccimonitor **20**: 27-33.
- Modi, C. and P. Bharadia (2012). "Transfersomes: new dominants for transdermal drug delivery." Am. J. Pharm Tech Res **2**(3).
- Moghassemi, S. and A. Hadjizadeh (2014). "Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review." J Control Release **185**: 22-36.
- Moreira, F. T. C., J. R. L. Guerreiro, L. Brandão and M. G. F. Sales (2015). 1 - Synthesis of molecular biomimetics A2 - Ngo, Trung Dung. Biomimetic Technologies, Woodhead Publishing: 3-31.
- Morse, M. A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T. M. Clay, N. Valente, R. Shreeniwas, M. A. Sutton, A. Delcayre, D.-H. Hsu, J.-B. Le Pecq and H. K. Lyster (2005). "A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer." Journal of Translational Medicine **3**(1): 1-8.
- Naor, D., S. Nedvetzki, I. Golan, L. Melnik and Y. Faitelson (2002). "CD44 in cancer." Crit Rev Clin Lab Sci **39**(6): 527-579.

- Naresh, R. A., N. Udupa and P. U. Devi (1996). "Niosomal plumbagin with reduced toxicity and improved anticancer activity in BALB/C mice." J Pharm Pharmacol **48**(11): 1128-1132.
- Nassar, D. and C. Blanpain (2016). "Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **11**(1).
- Padamwar, M. N. and V. B. Pokharkar (2006). "Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability." Int J Pharm **320**(1-2): 37-44.
- Pando, D., M. Matos, G. Gutierrez and C. Pazos (2015). "Formulation of resveratrol entrapped niosomes for topical use." Colloids Surf B Biointerfaces **128**: 398-404.
- Pardakhty, A. and E. Moazeni (2013). "Nano-niosomes in drug, vaccine and gene delivery: a rapid overview." Nanomedicine Journal **1**(1): 1-12.
- Parthasarathi, G., N. Udupa, P. Umadevi and G. K. Pillai (1994). "Niosome encapsulated of vincristine sulfate: improved anticancer activity with reduced toxicity in mice." J Drug Target **2**(2): 173-182.
- Patel, R., S. Singh, S. Singh, N. Sheth and R. Gendle (2009). "Development and characterization of curcumin loaded transfersome for transdermal delivery." J Pharm Sci Res **1**(4): 71-80.
- Pham, T. T., C. Jaafar-Maalej, C. Charcosset and H. Fessi (2012). "Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scale-up." Colloids Surf B Biointerfaces **94**: 15-21.
- Pingarrón, J. M., P. Yáñez-Sedeño and A. González-Cortés (2008). "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors." Electrochimica Acta **53**(19): 5848-5866.
- Polito, L., M. Colombo, D. Monti, S. Melato, E. Caneva and D. Prosperi (2008). "Resolving the Structure of Ligands Bound to the Surface of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy." Journal of the American Chemical Society **130**(38): 12712-12724.
- Rodriguez, R., J. Garcia-Castro, C. Trigueros, M. Garcia Arranz and P. Menendez (2012). "Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling." Adv Exp Med Biol **741**: 187-205.
- Rosen, M. J. and J. T. Kunjappu (2012). Surfactants and interfacial phenomena, John Wiley & Sons.
- Sachan, R., T. Parashar, V. S. Soniya, G. Singh, S. Tyagi, C. Patel and A. Gupta (2013). "Drug carrier transfersomes: a novel tool for transdermal drug delivery system." International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences **2**(2): 309-316.
- Sandbu, S., B. Feiring, P. Oster, O. S. Helland, H. S. Bakke, L. M. Naess, A. Aase, I. S. Aaberge, A. C. Kristoffersen, K. M. Rydland, S. Tilman, H. Nokleby and E. Rosenqvist (2007). "Immunogenicity and safety of a combination of two serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccines." Clin Vaccine Immunol **14**(9): 1062-1069.
- Scott, D., J. Rohr and Y. Bae (2011). "Nanoparticulate formulations of mithramycin analogs for enhanced cytotoxicity." Int J Nanomedicine **6**: 2757-2767.
- Sezgin-Bayindir, Z. and N. Yuksel (2012). "Investigation of formulation variables and excipient interaction on the production of niosomes." AAPS PharmSciTech **13**(3): 826-835.
- Shaikh, K. S., B. Chellampillai and A. P. Pawar (2010). "Studies on nonionic surfactant bilayer vesicles of ciclopirox olamine." Drug Dev Ind Pharm **36**(8): 946-953.
- Shilpa, S., B. P. Srinivasan and M. Chauhan (2011). "Niosomes as vesicular carriers for delivery of proteins and biologicals." International Journal of Drug Delivery **3**(1).

- Sinico, C. and A. M. Fadda (2009). "Vesicular carriers for dermal drug delivery." Expert Opin Drug Deliv **6**(8): 813-825.
- Stachowiak, J. C., D. L. Richmond, T. H. Li, A. P. Liu, S. H. Parekh and D. A. Fletcher (2008). "Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(12): 4697-4702.
- Taha, E. I. (2014). "Lipid vesicular systems: Formulation optimization and ex vivo comparative study." Journal of Molecular Liquids **196**: 211-216.
- Tahara, K., S. Fujimoto, F. Fujii, Y. Tozuka, T. Jin and H. Takeuchi (2013). "Quantum Dot-Loaded Liposomes to Evaluate the Behavior of Drug Carriers after Oral Administration." Journal of pharmaceutics **2013**.
- Tanaka, T., P. Decuzzi, M. Cristofanilli, J. H. Sakamoto, E. Tasciotti, F. M. Robertson and M. Ferrari (2009). "Nanotechnology for breast cancer therapy." Biomed Microdevices **11**(1): 49-63.
- Tavano, L., P. Alfano, R. Muzzalupo and B. de Cindio (2011). "Niosomes vs microemulsions: new carriers for topical delivery of Capsaicin." Colloids Surf B Biointerfaces **87**(2): 333-339.
- Tornin, J., L. Martinez-Cruzado, L. Santos, A. Rodriguez, L. E. Nunez, P. Oro, M. A. Hermosilla, E. Allonca, M. T. Fernandez-Garcia, A. Astudillo, C. Suarez, F. Moris and R. Rodriguez (2016). "Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma." Oncotarget.
- Touitou, E. and B. Godin (2006). "13 Vesicular Carriers for Enhanced Delivery through the Skin." Enhancement in Drug Delivery: 255.
- Uchegbu, I. F. and S. P. Vyas (1998). "Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery." International Journal of Pharmaceutics **172**(1-2): 33-70.
- Vader, P., X. O. Breakefield and M. J. A. Wood (2014). "Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy." Trends in Molecular Medicine **20**(7): 385-393.
- Vikas, K., S. Arvind, S. Ashish, J. Gourav and D. Vipasha (2011). "Recent Advances In NDDS (Novel Drug Delivery System) For Delivery Of Anti-Hypertensive Drugs." International Journal of Drug Development and Research.
- Wang, Z., K. Wang, Y. Zhang, Y. Jiang, X. Lu, L. Fang, D. Gan, C. Lv, H. Zhang and S. Qu (2016). "Protein-Affinitive Polydopamine Nanoparticles as an Efficient Surface Modification Strategy for Versatile Porous Scaffolds Enhancing Tissue Regeneration." Particle & Particle Systems Characterization **33**(2): 89-100.
- Zhang, L., F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer and O. C. Farokhzad (2008). "Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments." Clin Pharmacol Ther **83**(5): 761-769.
- Zheng, Y., Z. Lin, J. L. Zakin, Y. Talmon, H. T. Davis and L. E. Scriven (2000). "Cryo-TEM Imaging the Flow-Induced Transition from Vesicles to Threadlike Micelles." The Journal of Physical Chemistry B **104**(22): 5263-5271.