

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO AGENTES FUSOGÉNICOS

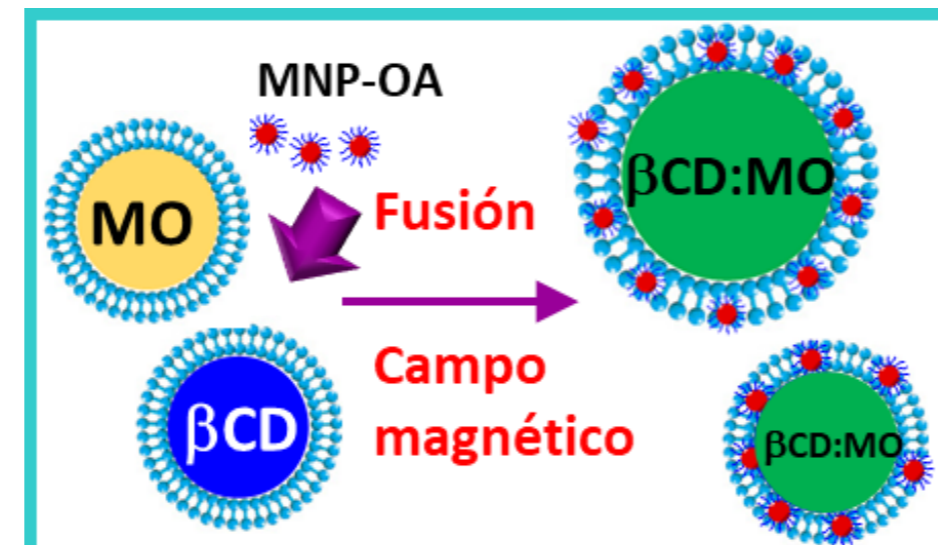
Villanueva, Martín E., Pineda, Juan Cruz y Vico, Raquel V.

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba-INFQC-CONICET, Córdoba, X5000HUA, Argentina. E-mail: raquel.vico@unc.edu.ar; martin.villanueva@unc.edu.ar; juan.cruz.pineda@unc.edu.ar

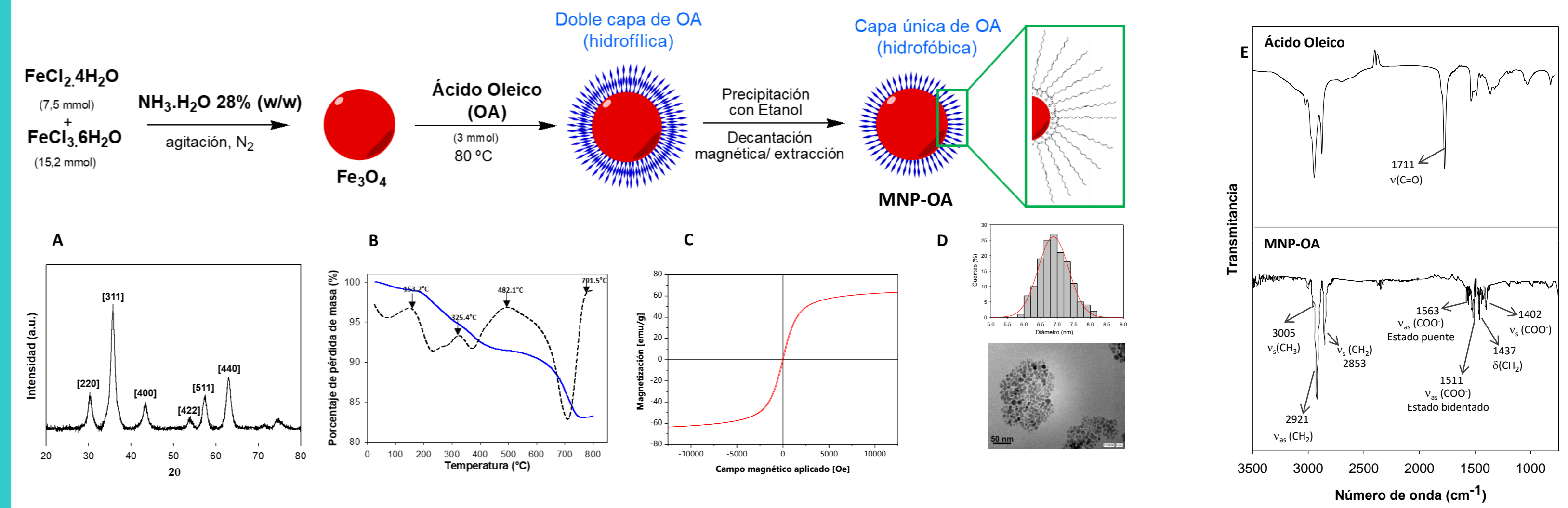
Introducción

La fusión controlada de vesículas constituye un factor clave para el diseño de nuevas aplicaciones bioquímicas y biotecnológicas. En nuestro laboratorio hemos desarrollado nanopartículas magnéticas estabilizadas con ácido oleico (MNP-OA) capaces de promover la fusión controlada de liposomas unilamelares (LUVs). La fusión de los liposomas, mediada por las MNP-OA en dispersión coloidal, se estudió por diferentes metodologías tales como DLS, TEM, microscopía confocal y ensayos de mezclado del contenido interno de las vesículas. Se evaluó la formación del complejo fluorescente entre Tb³⁺ y DPA (ácido dipicolínico) que representa un ensayo clásico para el estudio de fusión de vesículas. Otra estrategia para evidenciar el mezclado del contenido interno involucró la preparación de una población de LUVs conteniendo β-ciclodextrina (β-CD) y otra conteniendo naranja de metilo (MO), como modelo de pro-droga; se evaluó la formación del complejo de inclusión β-CD:MO mediante dicroísmo circular (CD).

El sistema β-CD:MO se seleccionó dado el interés actual en tecnologías de activación de pro-drogas mediante la formación controlada de complejos de inclusión. Adicionalmente, se estudio el efecto de la aplicación de campos magnéticos débiles sobre el proceso de fusión mediado por las MNP-OA.



Síntesis y caracterización de IOMNP-OA

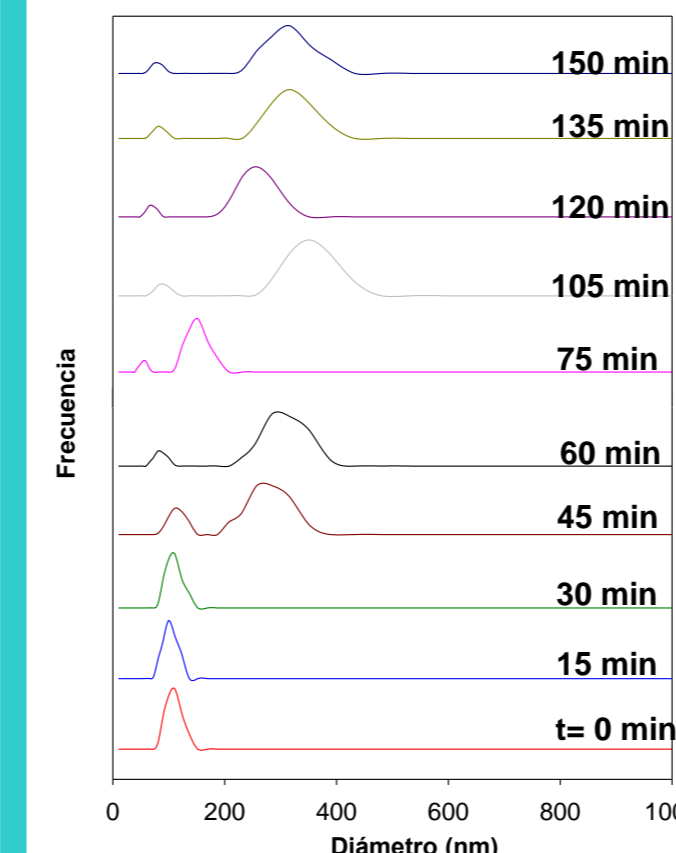


Caracterización de IOMNP-OA por A) Difracción de Rayos X en polvo, B) Termogravimetría, C) Magnetometría, D) Microscopía de transmisión electrónica, y E) FT-IR.

Las nanopartículas poseen un núcleo de magnetita (Fe₃O₄), están estabilizadas por una única capa de OA, son hidrofóbicas y superparamagnéticas.

Actividad de MNP-OA como fusógenos

Perfil de distribución de tamaños (DLS) de LUVs en presencia de MNPs-OA a lo largo del tiempo.

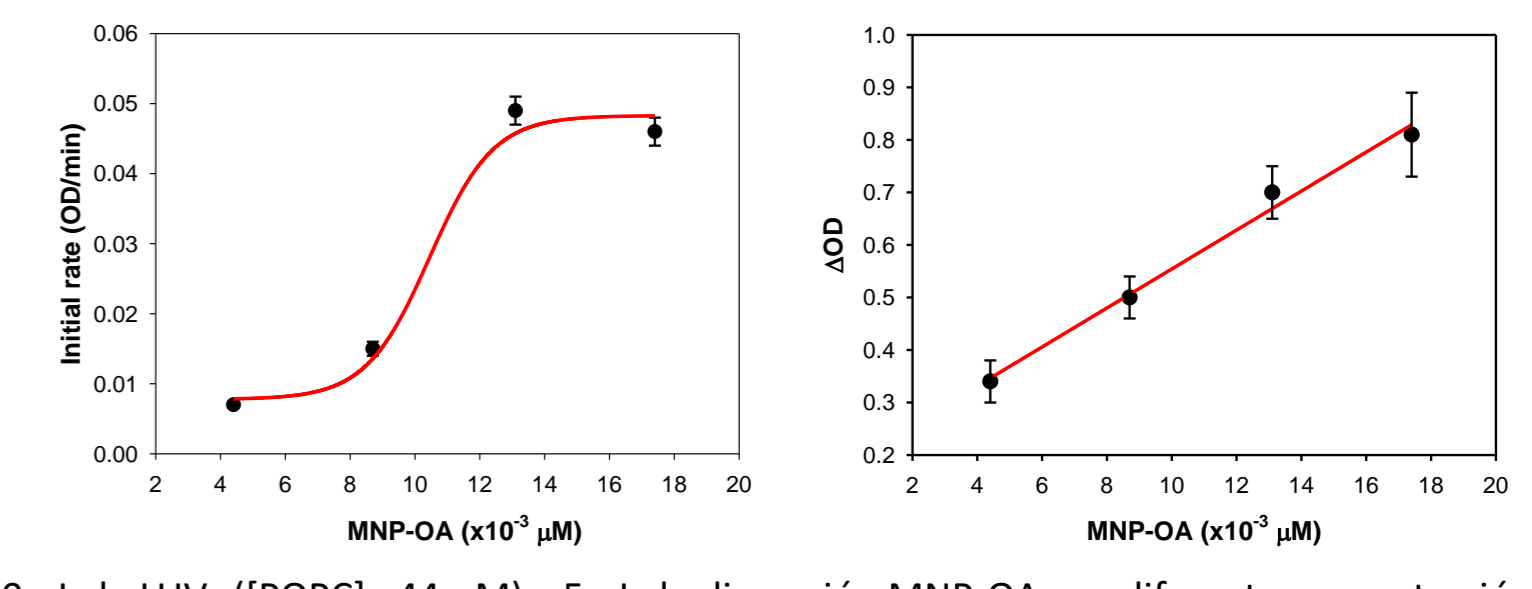


Porcentaje de áreas relativas entre las poblaciones I (~90 nm) y II (~265 nm)

250 μL de LUVs ([POPC]= 44 μM) y 5 μL MNP-OA 2,66 μM, X^{MNP-OA} = 0,0012

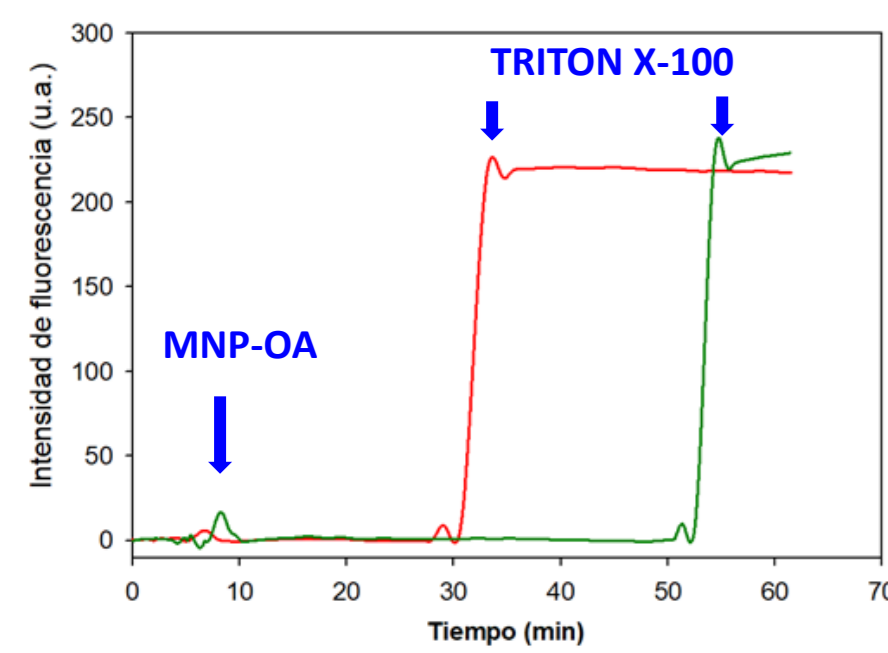
Efecto de la concentración de IOMNP-OA en la velocidad inicial (v₀) del proceso de agregación/fusión de LUVs.

MNP-OA (μM)	ΔOD ^{400 nm}	v ₀ (Abs/min)	r ²
0,0174	(0,81 ± 0,08)	(0,046 ± 0,002)	0,9960
0,0131	(0,70 ± 0,05)	(0,049 ± 0,002)	0,9958
0,0087	(0,50 ± 0,04)	(0,015 ± 0,001)	0,9968
0,0044	(0,34 ± 0,04)	(0,0070 ± 0,0002)	0,9988



250 μL de LUVs ([POPC]= 44 μM) y 5 μL de dispersión MNP-OA con diferente concentración

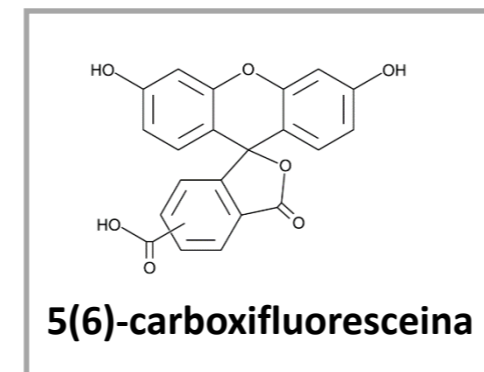
Cambio en la permeabilidad de la membrana de LUVs producidos por el agregado de MNP-OA



Se prepararon LUVs con CF 20 mM (TES 2 mM, citrato de sodio 100 mM, pH 7,4). A dicha concentración CF no emite fluorescencia debido a auto-quenching. La adición de Tritón X-100 produce la ruptura de los liposomas generando la liberación de CF al medio, su dilución, y emisión de fluorescencia. 250 μL de LUVs ([POPC]= 44 μM) con [CF]= 20 mM y 5 μL MNP-OA 2,66 μM en THF.

Curva roja: liberación de CF en ausencia de campo magnético.
Curva verde: liberación de CF en presencia de un campo magnético de 0,45 mT.

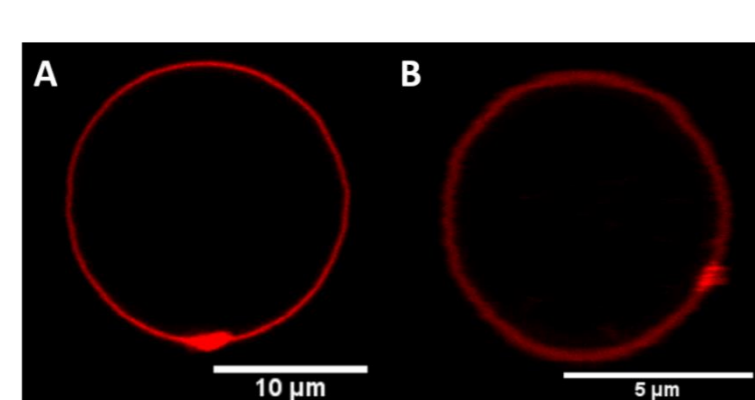
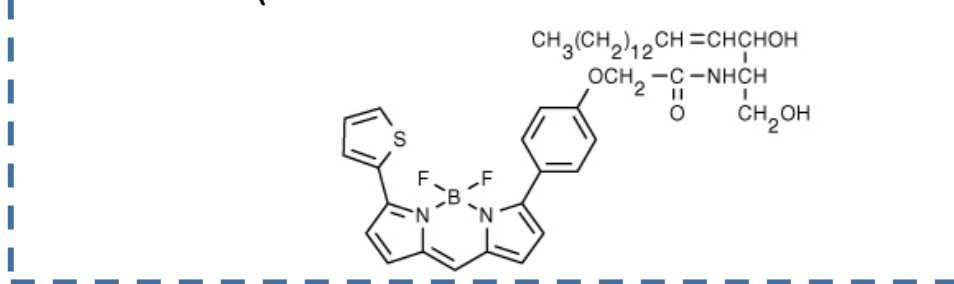
La adición de MNP-OA a los liposomas no genera cambios significativos en la permeabilidad de la bicapa (en ausencia y presencia de campos magnéticos) y no se evidencia liberación de CF durante el proceso de fusión.



Microscopía de fluorescencia confocal

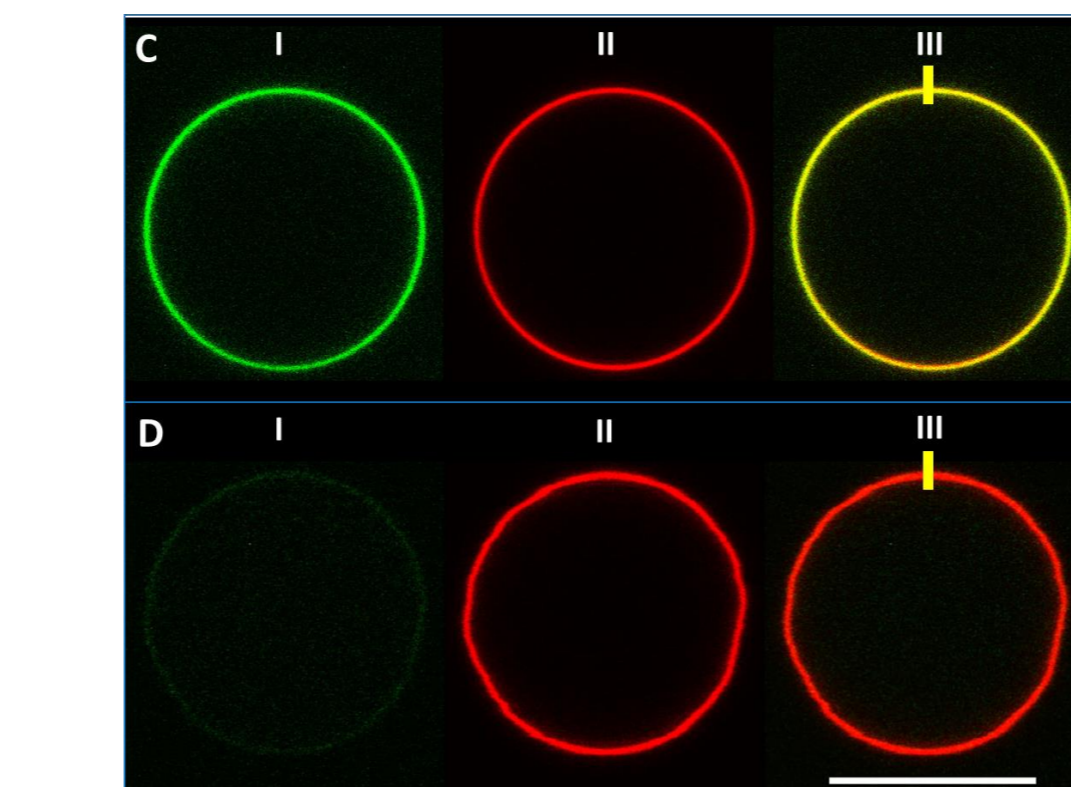
Las MNP-OA se marcaron con la sonda fluorescente 16:0 NBD-PE (canal verde) a través de interacciones no covalentes.

Las GUVs de POPC se obtuvieron por electroformación y su bicapa se marcó con 0,5% mol de la sonda fluorescente Bodipy-TR-Ceramide (canal rojo).



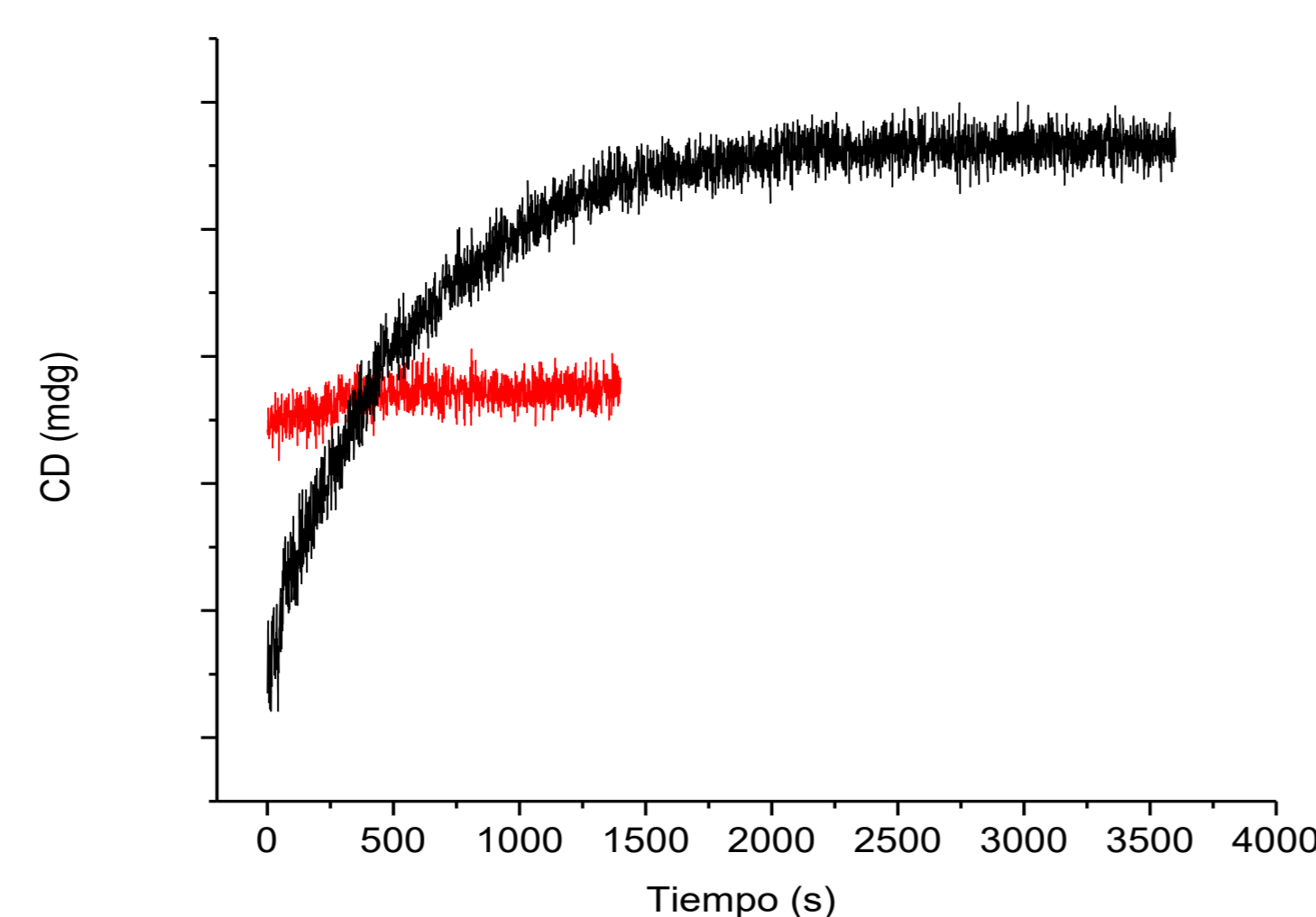
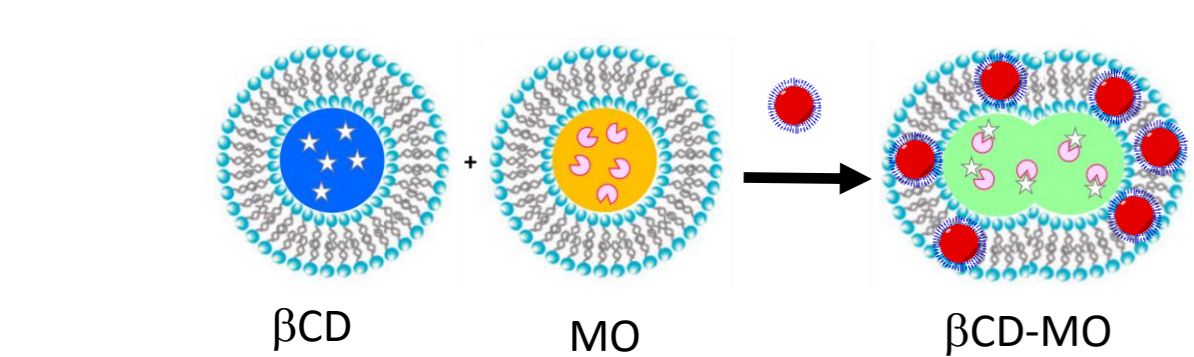
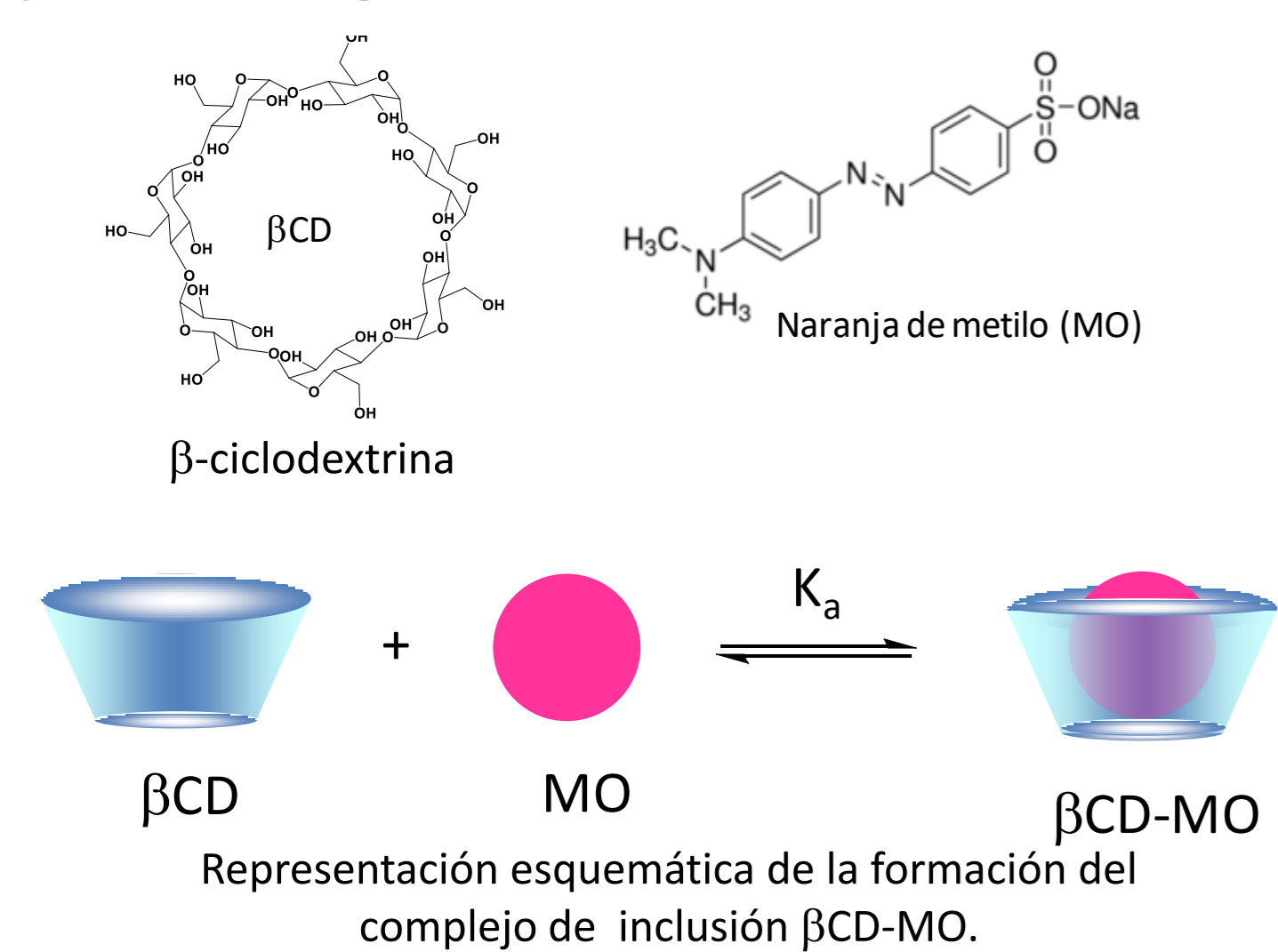
Controles de estabilidad de GUVs marcadas con Bodipy-TR-Ceramide (canal rojo). A) Agregado de MNP-OA sin marcar con sonda fluorescente NBD-PE 16:0. B) Agregado de solvente orgánico (THF) en el que se dispersan las MNP-OA.

En ambos casos la morfología de la bicapa permanece inalterada ante el agregado de los componentes puros.



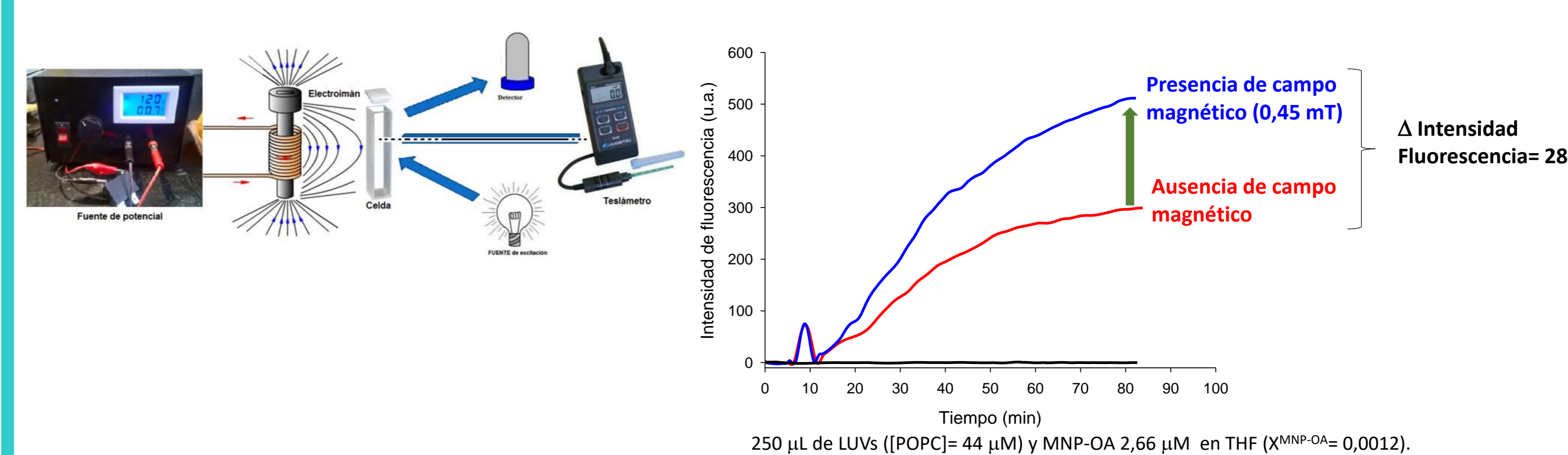
C) GUVs incubadas con MNP-OA/NBD-PE y D) control realizado incubando un volumen del sobrenadante obtenido luego del proceso de marcación de las NPs, con GUVs. La diferenciación de los canales de izquierda a derecha para los paneles C y D está definida como sigue: MNP-OA/NBD-PE (verde, I), marcador de membrana Bodipy-ceramide (rojo, II), y co-localización de las sondas (superposición de canales I y II).

Fusión mediada por MNP-OA aplicado a modelo de activación de pro-drogas



Elipticidad en función del tiempo de una mezcla de dos poblaciones de liposomas conteniendo βCD (0,4 mM) y MO (13 μM), respectivamente. Señales dicroicas correspondientes a experimentos en ausencia (rojo) y luego del agregado (negro) de MNP-OA (X^{MNP-OA} = 0,0012) a tiempo cero. Los liposomas se encuentran suspendidos en buffer TES 2 mM, citrato de sodio 10 mM, pH=7,4.

Efecto de la aplicación de campos magnéticos externos en la fusión de liposomas mediada por MNP-OA



Referencias

Marsden, H. R.; Tomatsu, I.; Kros, A.; Marsden, H. R. Model Systems for Membrane Fusion. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1572–1585.
P.H.; Tolia, N.H. Liposome Disruption Assay to Examine Lytic Properties of Biomolecules. *Bio Protoc.* **2017**, *7*(15), N°2433.
Düzgünes, N.; Jimah, J.R.; Schlesinger-Faneca, H.; Lima, M. Methods to Monitor Liposome Fusion, Permeability, and Interaction with Cells. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *606*, 209–232.
Matshaya, T. J.; Lanterna, A. E.; Granados, A. M.; Krause, R. W. M.; Maggio, B.; Vico, R. V. Distinctive Interactions of Oleic Acid Covered Magnetic Nanoparticles with Saturated and Unsaturated Phospholipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5888–5896.

Financiación

SECyT-UNC
FONCyT PICT 2016-0262
CONICET

Conclusiones

- Los resultados demuestran el potencial de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA) para actuar como fusógenos y promover la fusión de vesículas lipídicas en dispersión coloidal.
- Los experimentos cinéticos y los ensayos de mezclado de contenido mostraron una dependencia entre las cantidades de nanopartícula empleadas y la eficiencia en el proceso de fusión de bicapas. Adicionalmente, se demostró que las MNP-OA son capaces de promover la aproximación y mezclado de contenidos internos de vesículas lipídicas con una alta eficiencia, empleando concentraciones de nanopartícula que representan aproximadamente el 0,1 % de las cantidades de agente fusogénico, empleados por sistemas reportados previamente en la literatura.
- Las técnicas de microscopía empleadas, permitieron corroborar que luego de la interacción con las MNP-OA, la integridad de las bicapas lipídicas se preserva. La evidencia experimental indica que las nanopartículas se distribuyen prácticamente de manera homogénea sobre la superficie de las vesículas lipídicas.
- La presencia de campos magnéticos débiles de hasta 0,45 mT incrementa la extensión en la cual ocurre la fusión de liposomas.
- El proceso de fusión de liposomas mediado por las MNP-OA, transcurre de una manera tal en que no se libera el contenido interno de las vesículas.
- Las MNP-OA demostraron ser altamente eficaces en la promoción del proceso de fusión de liposomas conteniendo moléculas modelo de pro-droga y la posterior formación controlada del complejo de inclusión.