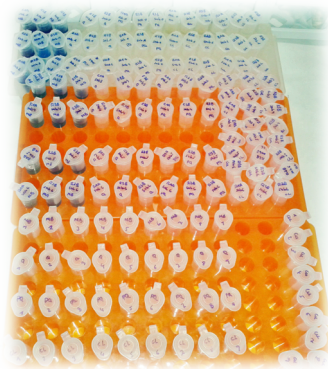


Treball final de grau

**Estudi de noves estratègies encapsuladores
d'antimalàrics i distribució de nanovectors
polimèrics en *Anopheles atroparvus***



Paula Pérez González-Anguiano

Grau en Biotecnologia

Tutor:

Josep Bau Macià (Il·licenciat i doctor en Biologia. Professor de biologia animal i tècniques de laboratori a la Universitat de Vic).

Director:

Xavier Fernández Busquets (Investigador sènior de l'IBEC, Institut de Bioenginyeria de Catalunya; Grup de Nanomalària del CRESIB, Centre de Recerca en Salut Internacional).



ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	
1.1 Raó del treball.....	4
1.2 Què és un nanovector?.....	5
1.3 Nanopartícules.....	6
1.4 Fàrmacs utilitzats.....	7
1.5 Liposomes	10
1.6 Cicle biològic de la malària	12
1.7 RBC vs pRBC.....	13
1.8 Característiques mosquit <i>Anopheles</i>	14
1.9 Característiques polímers ISA1-FITC i PU15.....	17
1.10 Raó experiments <i>Anophles</i> -ISA1-FITC.....	18
2. HIPÒTESIS i OBJECTIUS	19
3. MATERIALS I MÈTODES	20
3.1 Preparació de portes per la visualització de les diferents formes del paràsit.....	20
3.2 Mètodes espectrofotomètrics.....	20
3.2.1 Nanopartícules amb fàrmac.....	20
3.2.1.1 Encapsulació i “release” disseny primer protocol.....	21
3.2.1.2 Encapsulació i “release” disseny segon protocol.....	22
3.3 Preparació de liposomes	22
3.4 Cryo-electron microscopi.....	23
3.4.1 Formació de <i>protocells</i> sense fàrmac	24
3.4.1.1 Primera observació (Nps&lipo0).....	26
3.4.1.2 Segona observació (Nps&lipo-,+0).....	26
3.5 Resultats per espectrofotometria de la formació de <i>protocells</i>	26
3.6 Preparació d' <i>Anopheles</i> proves i experiments.....	27
3.6.1 Preparació <i>sugarwater</i> (sw) amb polímer ISA1-FITC i polímer PU15.....	29
3.6.2 Microscopia confocal de fluorescència.....	30
3.6.2.1 Preparació <i>Anopheles</i> per visualització al microscopi.....	30
3.6.3 Visualització al microscopi de fluorescència.....	31
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	32
4.1. Estadis del paràsit vs bibliografia.....	32
4.2. Caracterització nanopartícules.....	33

4.3. Resultats nanopartícules amb fàrmac.....	36
4.3.1. Primer protocol.....	36
4.3.2. Segon protocol.....	42
4.4. Caracterització de liposomes.....	44
4.5. Cryo-TEM per la formació de <i>protocells</i>	48
4.5.1. Nps&lipos0.....	48
4.5.2. Nps&lipos+/-/0.....	49
4.6 Resultats per espectrofotometria de la formació de <i>protocells</i> amb fàrmac.....	51
4.7 Imatges per microscopia de fluorescència <i>Anopheles Atroparvus</i>	52
4.8 Imatges per microscopia confocal <i>Anopheles Atroparvus</i>	55
5. CONCLUSIONS.....	60
6. BIBLIOGRAFIA.....	61
7. AGRAÏMENTS.....	63
8. ANNEXES	64

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Raó del treball

La malària, també anomenada paludisme és una malaltia crònica causada per protozous del gènere *Plasmodium*. És un dels principals problemes mèdics a tot el món, per la quantitat de gent a la que afecta, la severitat de la malaltia i la complexitat del cicle biològic del paràsit que la causa. Durant els últims 100 anys s'ha intentat controlar per a acabar eradicant-la, però sense èxit fins ara. És una de les causes majoritàries de morbiditat i mortalitat en els tròpics, causant de 1,5 a 2,7 milions de morts, de les quals la majoria són nens menors de cinc anys. En els casos en què la malaltia s'aguditza pot provocar anèmia severa, acidosis metabòlica, malària cerebral i fallo multiorgànic que pot induir al coma i a la mort. És necessària la creació de noves estratègies per tractar la malària, ja que s'estan generant resistències als agents antimalàrics, especialment en zones on *P.falciparum* és endèmic. Hi ha quatre espècies que provoquen la malaltia en humans: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium falciparum*. Aquest últim és el més letal i provoca els casos més severos. L'etapa d'infecció dels eritròcits és la que provoca els símptomes de la malària, i per tant aquestes cèl·lules seran la diana per l'antimalàric.

Una de les barreres que ha estat identificada com a principal obstacle per a una millora encara més gran de l'eficàcia dels antimalàrics és la limitació en la quantitat de fàrmac que pot ser encapsulada dins un liposoma, i que depèn de la seva solubilitat en medi aquós. Amb la inspiració de la descripció d'un nou tipus de nanocàpsules amb aplicacions oncològiques capaces d'encapsular grans quantitats de fàrmacs (*protocells*, Ashley et al., 2011). Els constructes formats per liposomes amb un nucli d'òxid de silici capaç de contenir el fàrmac, s'anomenen "protocells", que en comparació als liposomes, tenen una major selectivitat i estabilitat, i permeten alliberar altes concentracions de droga directament al citosol de les cèl·lules cancerígenes, degut a l'alta porositat de les partícules de silici. Aquest estudi es basa en l'aplicació d'aquest nou tipus de nanovectors a l'alliberament dirigit de compostos antimalàrics. A més, aquests estudis permeten plantejar el fet d'utilitzar altres antimalàrics que no s'han provat degut a la seva alta toxicitat o elevada inespecificitat.

En la *figura 1* es mostra el procés des de que es forma el constructe "protocell" fins a que el fàrmac és alliberat als pRBCs.

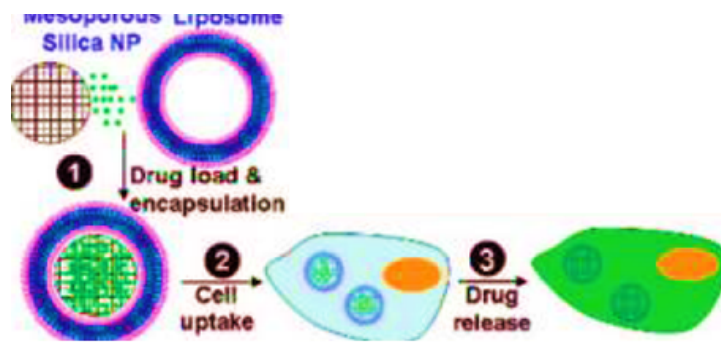


Figura 1. Il·lustració de *Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (protocells) as Delivery Vehicles*, J.Liu et al. 2011

Un equilibri entre complexitat, eficàcia i cost serà necessari per obtenir el sistema més senzill i econòmic capaç de reduir significativament o eliminar la parasitemia detectable en les zones de malària endèmica.

Els mètodes actuals que hi ha, es basen en l'administració del fàrmac en el torrent sanguini des d'on els teixits i òrgans el poden captar, fet que provoca que el fàrmac es trobi menys accessible als eritròcits infectats. Aquesta poca especificitat fa que es requereixin dosis molt altes. Tot i això, aquests fàrmacs provoquen efectes secundaris de manera que s'ha d'optimitzar la dosi per reduir-los i a la vegada tingui un efecte en l'eliminació dels eritròcits infectats. Els nanovectors o "nanosized carriers" poden complir amb l'objectiu d'aconseguir que les dosis totals siguin suficientment baixes perquè siguin inoques pel pacient però que siguin prou altes per provocar letalitat en el paràsit. En aquest projecte s'ha treballat en el desenvolupament de nanovectors construïts específicament per ser dirigits en els eritròcits infectats (pRBCs).

1.2 Què és un nanovector?

En aquest treball, quan parlem de nanovectors es fa referència a estructures lipídiques que envolten partícules de SiO_2 (nanopartícules), les quals contenen una quantitat de fàrmac encapsulada. Aquests constructes s'anomenen *protocells*.

Les partícules de SiO_2 en comparació amb els liposomes sols, els nanovectors més extensament estudiats, hi ha un increment en la capacitat, selectivitat i estabilitat i possibilita un alliberament controlat d'altres concentracions de fàrmac. Aquest cor de SiO_2 evita les fluctuacions que tenen els liposomes sols i per això l'estabilitat és més gran.

Per aconseguir encapsular el fàrmac en les nanopartícules, aquestes es van incubar amb l'antimalàric durant diferents temps per veure quin era el temps òptim d'encapsulació. Un cop determinat això, es va seleccionar el fàrmac que permetia una entrada de major quantitat de compost. Quan els "nanosized carriers" ja estaven fets, la idea era fusionar-los amb els liposomes fer la observació per microscopia

electrònica de transmissió. Aquesta tècnica s'estudia a temperatura criogènica generalment en nitrogen líquid.

1.3 Nanopartícules

Les nanopartícules poden estar compostes de diferents materials. Les que són utilitzades en nanomedicina han de complir les següents característiques:

- Poder-se utilitzar en cultius *in vitro*
- Poder-se utilitzar en microscopia electrònica de transmissió (TEM)
- Han de tenir una mínima citotoxicitat
- No han d'establir interaccions amb proteïnes plasmàtiques
- S'han de mantenir estables a pH fisiològic
- Els seus efectes en cèl·lules vives han de ser predirts i controlats
- Han de permetre encapsular una quantitat de fàrmac adient ("cargó") perquè tingui efecte en les cèl·lules en les que van dirigides.
- Han de permetre un alliberament progressiu del "cargó", evitant que es produeixi massa ràpid.
- Bona compatibilitat amb liposomes per poder-se fusionar
- Transfecció relativament fàcil

Les nanopartícules (Nps) més adequades per aplicació biomèdica són les de SiO₂. Es poden construir de diferents mides, tot i que aquesta característica afecta a les seves propietats.

Les nanopartícules van ser cedides pel grup d'Amílac Labarta de l'Institut de Nanociència i Nanotecnologia de la Universitat de Barcelona (IN2UB) i van ser sintetitzades per l'anomenat mètode Stöber pel científic que el va descobrir, Werner Stöber l'any 1968.

Es basa en afegir tetraetil silicat en un excés d'aigua que contingui etanol i amoni, i es barreja fins a obtenir productes de mides molt variables. La mida i morfologia de les Nps estaran influenciades per el pH, la temperatura i el temps.

El cor de les Nps contenen SiO₂ i al seu voltant s'hi poden conjugar lligands iònics que els hi confereixin càrrega, de manera que en sistemes biològics l'estabilitat de la Np pot variar significativament. Les carregades positivament tendeixen a ser eliminades de la sang, acabant en el fetge o la melsa, mentre que les negatives estan més temps en circulació i són captades majoritàriament pels nodes limfàtics. Aquesta és una dada important a tenir en compte, pels experiments en cultius. Després de mirar la càrrega de les Nps serà important escollir la que tingui càrrega negativa i mida adequada.

Quant s'hi afegeixen lligands a la superfície externa de les Nps provoca la modificació exterior d'aquestes, i a més poden formar-se unions covalents entre el lligant que ja hi havia i el nou que afegim com pot ser triethoxysilane (MPTES) i teraethyl orthosilicate (TEOS) en etanol: aigua. Alterant aquesta última proporció i el pH, es pot variar la mida de la Np. Hi ha un altre component, el cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) que permet la formació de porcs d'entre 2-4 nm. En la *figura 2* es mostra la Np amb el lligant inicial, i amb el CTAB que afegim per permetre la formació de mesopors.

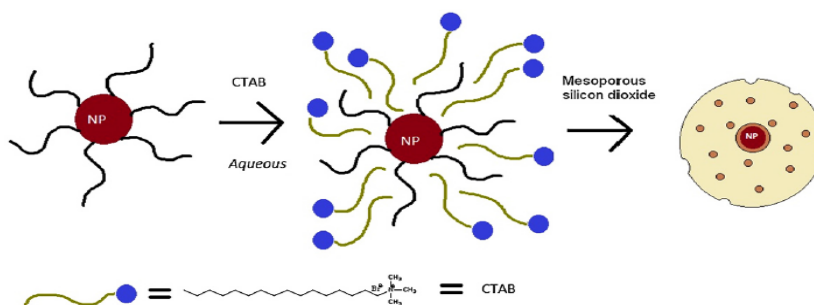


Figura 2. Il·lustració de Nguyen T.K. Than, Luke A.W.Green, *Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications*.

L'àrea específica de les Nps de mida aproximada 150nm de 34 m²/g, tot i això, s'ha de destacar el fet que s'ha realitzat l'estudi amb mides aproximades de 300nm, 100nm i 75nm.

Possible toxicitat: efectes en el sistema immunitari. Encara es requereix més investigació sobre els efectes que poden tenir les Nps en el sistema immunitari. Sabem que poden transportar altes quantitats de fàrmac en el seu interior degut a la porositat que tenen, tenen estabilitat *in vivo*, i pel que s'ha vist pocs efectes secundaris. Tot i això, algunes poden ser captades per macròfags i fagòcits i l'efecte en el sistema immunitari podria provocar un increment en la susceptibilitat de l'hoste a infeccions i càncer.

Altres possibles "cargos":

Es poden unir a les Nps àcids nucleics com DNA, o proteïnes d'interès a més d'algunes com l'albumina o la transferrina que permeten reduir la citotoxicitat i faciliten la captació de la Np per part de les cèl·lules, pèptids o carbohidrats.

1.4 Fàrmacs utilitzats

La **cloroquina** és el fàrmac més àmpliament utilitzat per tractar tots els tipus de malària. El compost lleugerament groc, inodor, que forma una pols cristal·lina i té un sabor amargant. És soluble en aigua, alcohol, éter, PBS i àcids diluïts. És efectiva en les formes eritrocítiques de *P.vivax*, *P.ovale* i *P.malariae*, algunes soques de *P.falciparum* sensibles al fàrmac i les formes gametocítiques de *P.vivax*. *Taula 1*

El grup heme és la part no proteica de l'hemoglobina i és producte de la digestió que en fan els paràsits de malària en la vacuola parasitària. El grup heme lliure és tòxic per les cèl·lules, de manera que els paràsits el transformen en hemozoïna que és una forma cristal·litzada insoluble que els hi és essencial per sobreviure. La cloroquina entra a la vacuola digestiva per difusió simple i s'uneix a les molècules d'hemozoïna formant un complex altament tòxic per la cèl·lula, produint la seva llisi i l'autodigestió de la paret del paràsit.

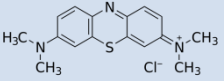
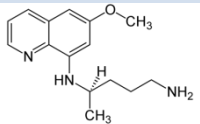
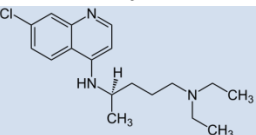
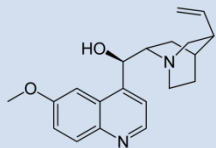
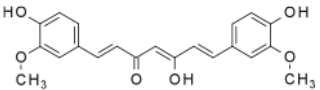
El **blau de metilè** és un compost sòlid en pols de color verd fosc, inodor que esdevé blau quan es dissol en aigua, és soluble en aquesta i en PBS a temperatura ambient. Va ser identificat per Paul Ehrlich l'any 1891 per a ser utilitzat com a fàrmac contra la malària durant la segona guerra mundial, però es va eliminar com a antimalàric perquè tenyia l'orina de color verd i tornava blau el blanc dels ulls. És actiu *in vitro* i *in vivo* no només en els pRBCs en estadi de schizont sinó també contra els gametòcits de *P. falciparum*.

Aquest fàrmac és un inhibidor de l'enzim glutatió reductasa de *P. falciparum* i com la cloroquina, prevé la polimerització del grup heme. Es van fer estudis per tractar la malària cerebral, una forma molt avançada de la malaltia, combinant el blau de metilè amb atrovastatina i van veure que es reduïa la parasitemia i el tractament incrementava significativament la supervivència. Es va deixar d'utilitzar pels seus efectes secundaris però actualment s'estan fent estudis amb aquest fàrmac sol i amb combinació amb altres, ja que té l'avantatge de que és econòmic i eficaç.

La **primaquina** és un compost sòlid en pols de color taronja-vermell, inodor, de sabor amargant, soluble en aigua i PBS i insoluble en alcohol, cloroform i èter. Actua interferint en una part de la mitocòndria del paràsit que és responsable d'aportar-li energia, sense aquesta el paràsit mor i la infecció no pot continuar. És activa en les formes intrahepàtiques de *P. vivax* i *P. ovale* i prevé el desenvolupament de les formes eritrocítiques responsables de les recaigudes. També actua contra els gametòcits en *P. falciparum*. La primaquina no s'utilitza per la prevenció de la malària, però sí pel seu tractament. S'utilitza en conjunció amb un shizonticida (fàrmac que actua en l'estadi de schizont) *taula 1*, i mai com a agent sol ja que ofereix una millora en la progressió de la malaltia de només el 20%, per això requereix la presència de quinina i cloroquina perquè aquest percentatge incrementi. El compost és absorbit pel tracte gastrointestinal i distribuït pels teixits de l'organisme en 1-3 hores.

La **quinina** s'utilitza com a estàndard fluorescent en contacte amb H_2SO_4 , a part de l'ús que se li dona com a antimalàric. És un compost inodor i amargant, soluble en alcohol, èter, cloroform i PBS i va ser el primer fàrmac efectiu que hi va haver per tractar la malària que va aparèixer al segle XVII i es va utilitzar fins al 1940, moment en què van sortir altres fàrmacs com la cloroquina, de menys toxicitat i efectes adversos. El seu mecanisme d'acció no s'ha resolt del tot, es creu que actua d'una manera semblant a la cloroquina, inhibint la cristal·litazació del grup heme. Encara s'utilitza perquè a més de ser econòmic, permet tractar infeccions severes com les causades per *P. falciparum* que són resistents a la cloroquina. Actua com a esquizonticida tot i que també té activitat gametocítica en *P. vivax* i *P. malariae*, *taula 1*.

La **curcumina** és un compost groc-taronja fluorescent poc soluble en aigua i PBS. S'extreu de la cúrcuma longa, una planta del sud d'Índia i Indonèsia. Fins ara se sap que és un agent antitumoral, antioxidant i antiinflamatori, però també podria ser un dels compostos capaços de cobrir la necessitat de trobar fàrmacs alternatius i més barats per la malària. Estudis realitzats l'any 2005 per Raju C. Reddy et al. van demostrar que la curcumina inhibia el paràsit *P. falciparum* resistent a la cloroquina en cultiu i l'administració oral del fàrmac en ratolins reduïa la parasitemia de *P. berghei* en un 80-90%. El seu mecanisme d'acció encara està en estudi.

TAULA DE FÀRMACS	FÓRMULA ESTRUCTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PES MOLECULAR	LONGITUD D'ONA A LA QUE ABSORBEIX
Blau de metilè		$C_{16}H_{18}ClN_3S$	319,86 g/mol	660nm
Primaquina		$C_{15}H_{21}N_3O$	455,35 g/mol	350nm
Cloroquina		$C_{18}H_{26}N_3Cl$	515,86 g/mol	330nm
Quinina		$C_{20}H_{24}N_2O_2$	324,42 g/mol	330nm
Curcumina		$C_{21}H_{20}O_6$	368,38 g/mol	400nm

Taula 1

Drug	TISSUE STAGES		BLOOD STAGES	
	primary	latent	schizonts	gametocytes
quinine			+++	++
chloroquine			+++	++
proguanil	++		++	++
pyrimethamine	++	+	++	+++
sulphadoxine/dapsone	?		+	
primaquine	++	+++	++	+++
doxycycline	+	?	++	
mefloquine			+++	
halofantrine			+++	
artemisinin			+++	+
	causal prophylaxis	santirelapse radical cure	suppression clinical cure	prevent spread

Taula on es mostren alguns dels fàrmacs i en quin estadi del paràsit actuen

1.5 Liposomes

Els liposomes poden ser un mecanisme eficaç per a l'administració de fàrmac antimalàric, tot i això sempre es poden introduir millores en aquests vectors per tal de que es pugui incrementar la concentració de fàrmac encapsulat, una possible millora podria ser la formació de les "protocells".

Els liposomes tenen les següents característiques:

1. Tenen una bicapa fosfolipídica que pot tenir vàries esferes concèntriques de bicapa
2. Tenen un interior hidrofílic on es pot encapsular fàrmac i un exterior hidrofòbic
3. Té una resposta farmacològica efectiva i segura
4. No són tòxics
5. No són immunògens
6. Es poden dirigir mitjançant anticossos a la seva superfície
7. Durant el pas per l'organisme no pateixen accions enzimàtiques
8. Es poden modificar exteriorment amb anticossos o polietilenglicol

Amb els liposomes s'han d'utilitzar fàrmacs que siguin: amfifílics (tenen una part hidrofòbica i una altra hidrofílica), lipofílics (tenen afinitat pels lípids) i hidrofílics (solubles en aigua i solvents polars). Els liposomes amb fàrmac encapsulat funcionen millor en els pRBCs quan són capaços de reconèixer-los gràcies als anticossos que reconeixeran proteïnes en la superfície dels infectats que només aquests expressaran. Quan hi entrin en contacte, es fusionaran amb la membrana i alliberaran el fàrmac sempre i quan el pH de dins el pRBC sigui igual al de dins del liposoma, aproximadament pH 7, figura 3. El fàrmac lliure és més fàcil de que sigui eliminat del medi. En canvi, si el fàrmac està encapsulat, aquest estarà present per un temps més llarg en el torrent sanguini.

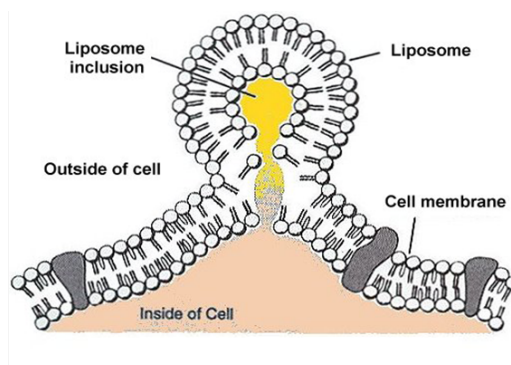


Figura 3. Fusió liposoma amb el pRBC

Es poden construir diferents tipus de liposomes segons el seu contingut de lípid. Els neutres, tenen una temperatura de fusió elevada perquè són saturats i formen la composició de les membranes lipídiques de les cèl·lules animals. Els negatius que contenen lípid aniònic, el DMPG. Per últim, els positius amb lípid catiònic, el DOTAP. En la *taula 2* es mostra la composició dels liposomes, i en la *taula 3* la descripció i composició dels lípids.

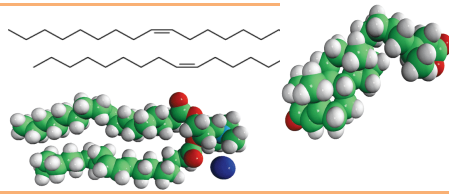
TAULA DE LIPOSOMES	CONTINGUT
Neutres	80 DOPC: 20CHOL
Negatius	50 DOPC: 20 CHOL: 30 DMPG
Positius	50 DOPC: 20 CHOL: 30 DOTAP

Taula 2

TAULA DE LÍPIDS	NOM COMPLET	FÓRMULA ESTRUCTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PES MOLECULAR	COMPOSICIÓ DELS SEU ELEMENTS EN %
DOPC	1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine		$C_{44}H_{84}NO_8P$	786.11 g/mol	C 67.23%, H 10.77%, N 1.78%, O 16.28%, P 3.94%
DMPG	1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)		$C_{34}H_{66}O_{10}PNa$	688.85 g/mol	C 59.28%, H 9.66%, Na 3.34%, O 23.23%, P 4.50%
CHOL	7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid (25R)-cholest-4-en-26-oic acid, 7 α -hydroxy-3-oxo		$C_{27}H_{42}O_4$	386,65 g/mol	C 75.31%, H 9.83%, O 14.86%

DOTAP

1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)


 $C_{42}H_{80}NO_4Cl$

698.54
g/mol

C 72.22%,
H 11.54%,
Cl 5.08%,
N 2.01%,
O 9.16%

Taula 3

1.6 Cicle biològic de la malària

El mosquit infectat *Anopheles* femella inocula esporozoïts de *Plasmodium*, és una etapa del cicle de vida d'un paràsit protozoari durant la qual pot infectar nous hostes, ja que els porta en les glàndules salivals. Quan el mosquit pica a una persona, els esporozoïts entren, migren al fetge i infecten els hepatòcits i es multipliquen dins d'aquests mitjançant divisió asexual múltiple. Esdevenen merozoïts que entraran al torrent sanguini i entraran als eritròcits. En aquests, *Plasmodium* creix i forma una cèl·lula anomenada trofozoït, primer immadur ("ring stage"), després esdevenen trofozoïts madurs que es dividiran asexualment per donar lloc a esquizonts que contenen de 6 a 24 nuclis i es produiran els merozoïts mononucleats. Quan l'eritròcit es llisa els merozoïts s'alliberen i poden infectar altres eritròcits. Els merozoïts es diferencien en cèl·lules relativament grans (macrogametòcits) i en cèl·lules allargades (microgametòcits) sense causar la llixi de l'eritròcit. Quan el mosquit pica, els ingereix, fent que es desenvolupin en gàmetes femenins i masculins. A l'interior de l'intestí del mosquit, els eritròcits infectats es llisen i els gàmetes es fusionen donant lloc a un zigot i occinet, que atravesarà la paret intestinal del mosquit i formarà un ooquist. Aquest es divideix per meiosis i forma esporozoïts (procés anomenat esporogònia) que migren a les glàndules salivals del mosquit i els injectarà en el moment de picar, completant el cicle vital. *Figura 4*

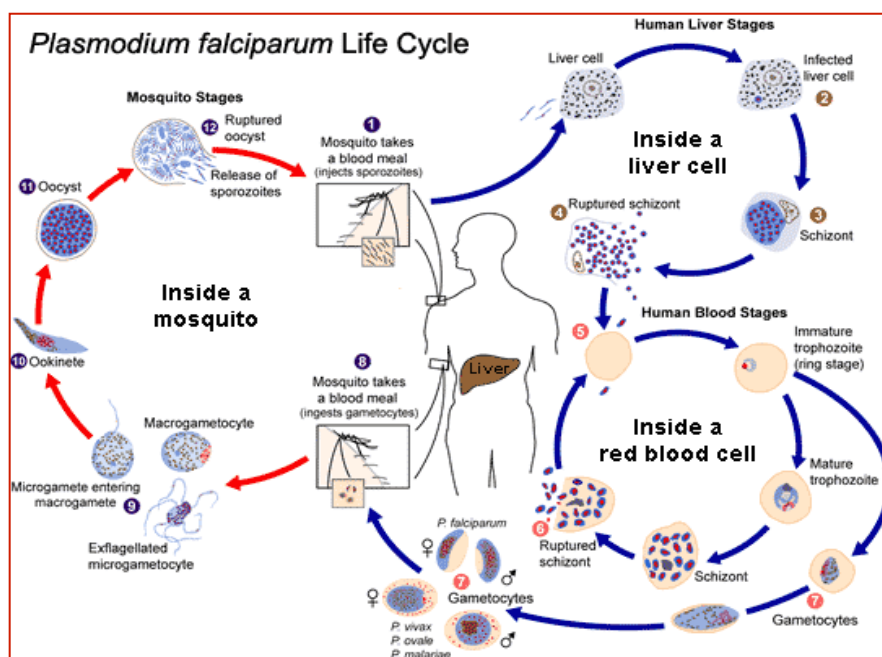


Figura 4. Cicle biològic de la malària

1.7 RBC vs pRBC

Quan l'eritròcit és parasitat, es produeixen canvis lipídics i proteics en la membrana fent-la més fluida, *figura 5*. Es formen els *New Permeability Pathways* (NPP) que són vies d'entrada de nutrients que es creen en els eritròcits infectats i que podrien ser vies d'entrada de fosfolípids a l'interior de *Plasmodium*. La morfologia, permeabilitat i altres característiques de les membranes canvien, així com també ho fa la composició lipídica. En els pRBCs s'ha vist que hi ha un increment en el contingut lipídic, havent-hi com a lípids majoritaris, els següents: fosfatidilcolina (PC) 30-45%, fosfatidiletanolamina (PE) 25-40%, fosfatidilserina (PS) 10% i esfingomièlina (S): 10%. Això és degut a la capacitat d'incorporar lípids del medi i de produir-los ell mateix. Això últim els eritròcits sans no ho poden fer perquè no tenen els enzims que sintetitzen fosfolípids.

Aquesta producció de lípids que fan els pRBCs és degut a la necessitat de produir estructures membranoses, el que s'anomena biogènesi de membranes durant el cicle intraeritrocitari de *Plasmodium*. Això pot portar a pensar en el fet de contruir liposomes amb lípids tòxics pel paràsit. Però trobar un sistema clarament efectiu que pugui arribar al paràsit és difícil, sabent que quan *Plasmodium* infecta, entra a dins de l'eritròcit de manera que els antimalàrics han d'atravesar diferents membranes fins a arribar al lloc d'acció. Per una banda hi ha la membrana de l'eritròcit (*host cell membrane*), després es troba la vacuola parasitòfora (*parasitophorus vacuolar membrane*) que és produïda pel procés de desenvolupament del paràsit. Llavors trobem la membrana plasmàtica del paràsit i per últim altres membranes com la mitocondrial.

Transport system in normal and parasitized RBC

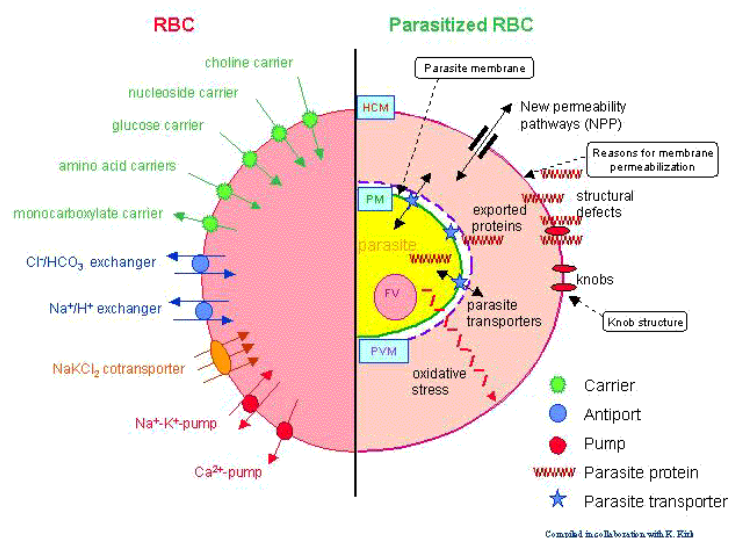


Figura 5. Mostra les diferències en el transport de substàncies a través de la membrana entre dos eritròcits (sà; esquerra i infectat; dreta)(imatge facilitada per IBEC

1.8 Característiques mosquit *Anopheles*

Com s'ha explicat en el cicle biològic de la malària, el mosquit *Anopheles* femella pica a un animal infectat per *Plasmodium* i absorbeix els gametòctis (forma masculina i femenina). Ho fa per la hipofaringe *figura 6*, que segrega saliva anticoagulant per mantenir la succió. La sang infectada va a l'abdomen, els eritròcits es llisten i els gàmetes es fusionen donant lloc al zigot que travessa la paret intestinal del mosquit formant l'ooquist *figura 7*. Llavors es formen els esporozoïts que van a les glàndules salivals. Aquest procés es dona més ràpidament a alta temperatura i amb unes condicions d'humitat determinades per el paràsit, però sol durar de 10 a 21 dies, de manera que si el mosquit no viu tot aquest temps no podrà transmetre el paràsit.

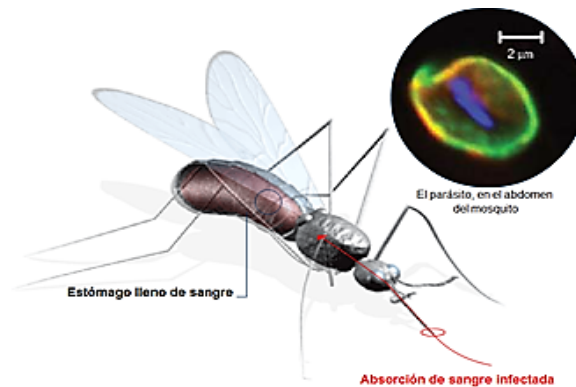


Figura 6. Hipofaringe del mosquit absorbint els eritròcits parasitats

Per al mosquit, el paràsit no li és perjudicial però tampoc li aporta cap benefici, mentre que al paràsit li permet completar una part del cicle vital, establint una relació biòtica de començalisme. Perquè es completi el cicle, el mosquit ha de picar a un altre hoste, alliberant alguns d'aquests esporozoïts que són la forma infecciosa del paràsit.

Les femelles d'*Anopheles* es reproduïxen quan els mascles formen grans eixams i aquestes hi van per reproduir-se. Produeixen ous varies vegades al llarg de la seva vida, la qual pot durar des d'unes setmanes fins a un mes, i això és produït sempre després d'aver-se alimentat de sang. Els mascles, a diferència de les femelles viuen aproximadament una setmana i s'alimenten de nèctar o altres fonts que continguin sucre. Elles també poden alimentar-se'n per obtenir energia. Per aquest motiu, sabent prèviament això, es va pensar en elaborar l'aliment dels mosquits amb H₂O destil·lada i dextrosa.

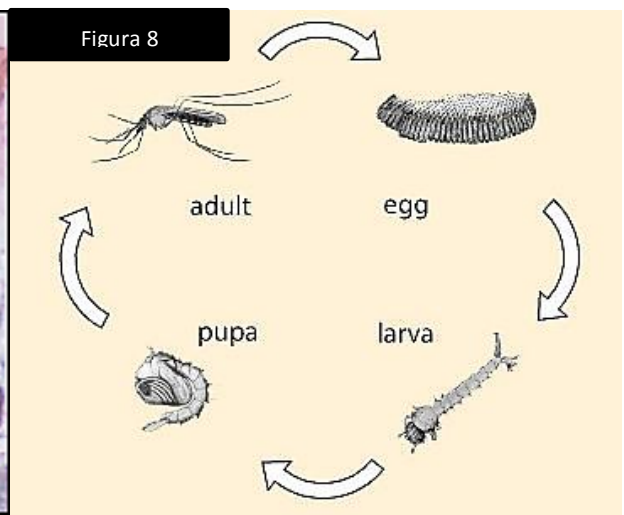
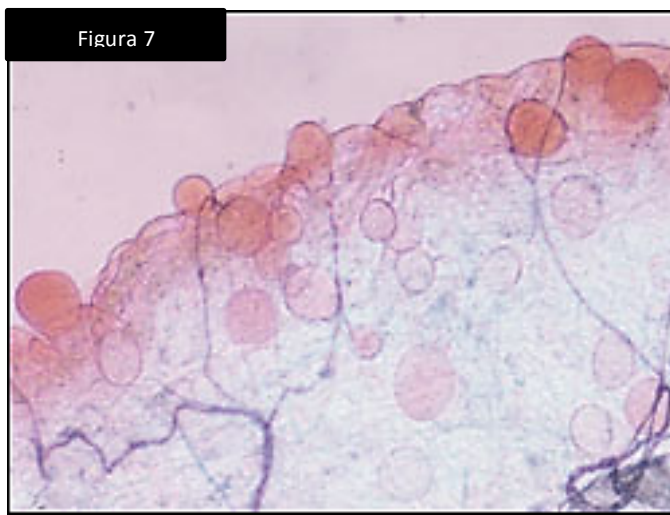


Figura 7. Imatge extreta de CDC (Centers for Disease Control and Prevention);
malaria. Figura 8. Cicle vital del mosquit *Anopheles*

Les femelles poden arribar a produir fins a 200 ous que dipositen sobre la superfície de l'aigua. Els ous triguen des de dos dies a tres setmanes a obrir-se depenent de la temperatura i presenten unes estructures laterals que els fan de flotadors en l'aigua.

L'anatomia de la larva està composta per el cap que té uns raspalls que els serveixen per alimentar-se, un tòrax llarg i un abdomen segmentat, manquen d'extremitats. Respiren a través d'espíracles abdominals que els obliguen a sortir sovint a la superfície a respirar, i s'alimenten d'algues, bacteries i petits organismes que troben a la superfície. Quan es submergeixen es propulsen a través dels raspalls de la boca i també mitjançant moviments espasmòdics. La metamorfosis de larva a pupa es desenvolupa en quatre estadis, al final de cadascun s'allibera una part d'exosquelet.

La pupa té una forma de coma quan es mira de costat. El cap i el tòrax estan units en un cefalotòrax i l'abdomen es troba a sota. La larva també ha de sortir a la superfície a respirar i ho fa pel cefalotòrax, després d'uns dies en aquest estadi (2 dies aproximadament), es trenca el cefalotòrax donant lloc al mosquit adult. *figura 8*.

Quan les condicions de temperatura i ambient són adequades, el procés de desenvolupament d'ou a adult es produeix en 5 dies aproximadament però en els experiments realitzats, aquests no estaven en les condicions en què idealment es troben, de manera que van trigar dues setmanes a esdevenir adults.

Els adults estan formats per el cap, el tòrax i l'abdomen. El primer *figura 9*, conté els ulls i les antenes que detecten la olor dels llocs on les femelles han dipositat els ous i també la de l'hoste. Hi ha la probòscide que permet alimentar-se i els palps maxil·lars.

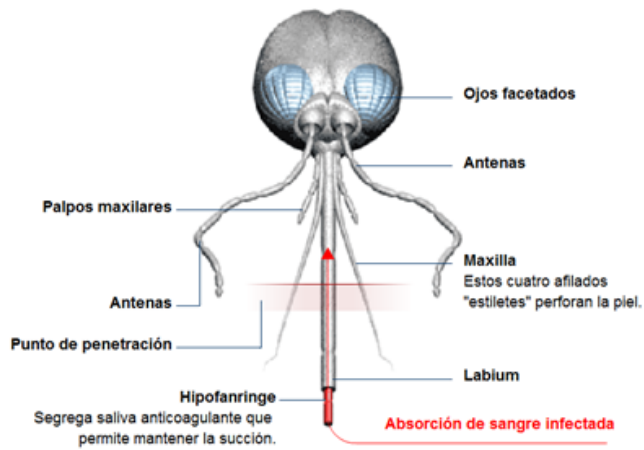


Figura 9. Imatge anatòmica del cap d'*Anopheles*

Del tòrax surten tres parells de potes per la locomoció i dues ales. Per últim, l'abdomen és la secció on es produeix la digestió i el desenvolupament dels ous. El mosquit *Anopheles* es distingeix de les altres espècies per els palps maxil·lars, que són tant llargs com la probòscide i també per la presència de zones blanques i negres en les ales.

Dels 3.500 mosquits del gènere *Anopheles* que causen malària, aproximadament 40 espècies són capaces de transmetre-la als humans i produint-los fins i tot la mort.

En el mapa figura 10, s'observa que el vector més present a Àfrica és *Anopheles Gambiae* i *Anopheles funestus*, els quals són molt antropofílics (adaptat per infectar a l'humà) i per això es diu que de tots els vectors que hi ha, són els vectors més eficients. Si observem europa, el subgènere predominant és *Anopheles Atroparvus* (emprat en els experiments d'aquest treball) ambdós es reproduïxen en hàbitats com els camps d'arròs o les zones d'irrigació.

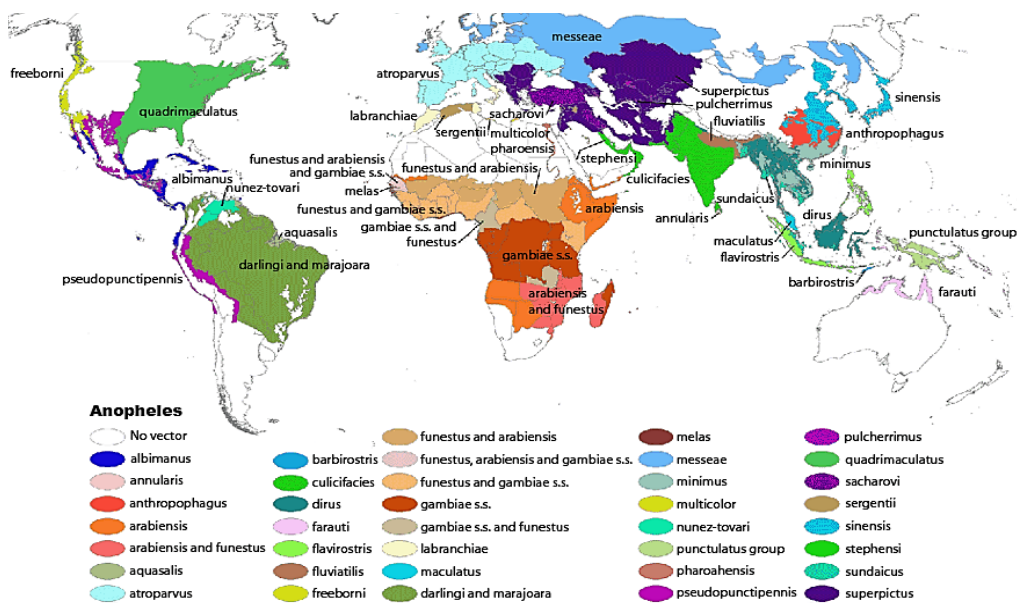


Figura 10. Imatge extreta de CDC (Centers for Disease Control and Prevention); malaria

El Map (Malaria atlas project) és un programa que ofereix informació actualitzada en relació a la malària i està organitzat en funció de la regió geogràfica de la que se'n vol extreure informació. Les prediccions es generen mitjançant BRT (Boosted Regression Tree) modelling, que amb unes variables mediambientals determinades es pot predir la presència d'una espècie concreta d'*Anopheles*. Les zones en vermell són les que amb alta probabilitat, el model prediu la presència del subgènere que hem demanat que busqui, mentre que les zones en blau són les de més baixa probabilitat, els punts negres indiquen les zones on hi ha hagut una gran ocurrencia del vector el algun moment concret. Fixant-nos en la península ibèrica, al Delta de l'Ebre se n'observa un i sobretot al sud de Portugal. *Figura 11*

Les mesures de prevenció que s'empren en les zones amb casos de malària són bàsicament els insecticides, el problema són les resistències que es generen, fins ara 125 espècies resistents documentades.

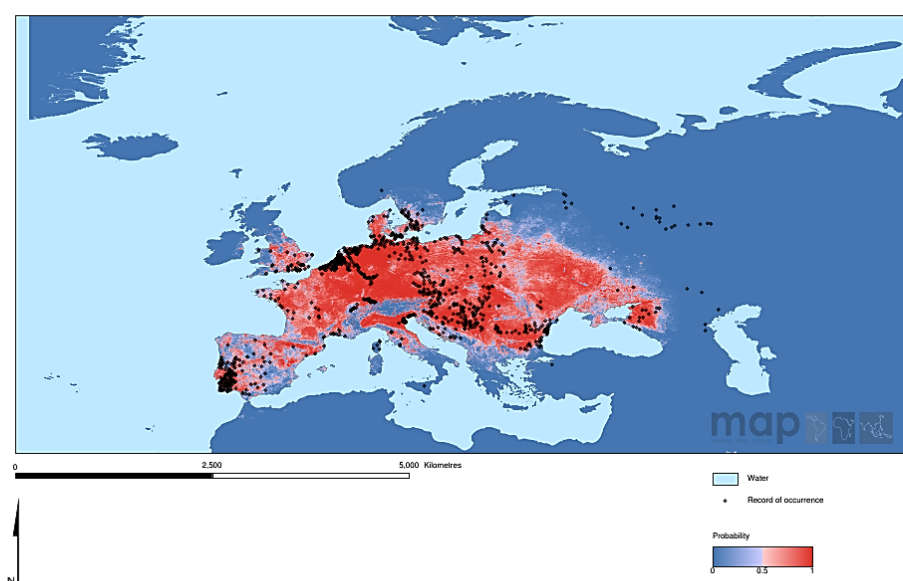


Figura 11. Imatge extreta de "Map, malaria atlas project"

1.9 Característiques polímers ISA1-FITC i PU15

Les poly(amodoamine)s (PAAs) són una família de polímers sintètics. Són amfotèrics (reaccionen tant amb àcids com amb bases), amb un punt isoelèctric ~ 10.0 .

ISA1 és un polímer purament catiònic a pH 7,4. Es va obtenir addicionant bis(acryloyl) piperazine amb 2-methylpiperazine i bis(hidroxyethylethylenediamine) allargant el temps de reacció fins a 7 dies i fraccionant-ho per ultrafiltració, a través de membranes (Millipore) fins a obtenir fragments de polímer de massa molecular desitjada. Per unir FITC, es posava un excés del compost amb metanol i es mantenia en agitació *overnight* a temperatura ambient i mitjançant diàlisi es quedava la fracció de polímer-FITC retinuda, s'assecava aquesta fracció i es mesurava la intensitat de fluorescència a $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ comparant amb la intensitat que dona FITC sol.

El ISA1-FITC utilitzat amb codi: ISA1FITC_{FF484} tenia un pes molecular mig de \overline{Mn} = 17800 Da, una polidispersitat (PD) = 1.36 i un percentatge de fluoresceïna del 5%. Es va obtenir a través d'una ultrafiltració per membrana de cut-off 3000 Da. *Figura 12*

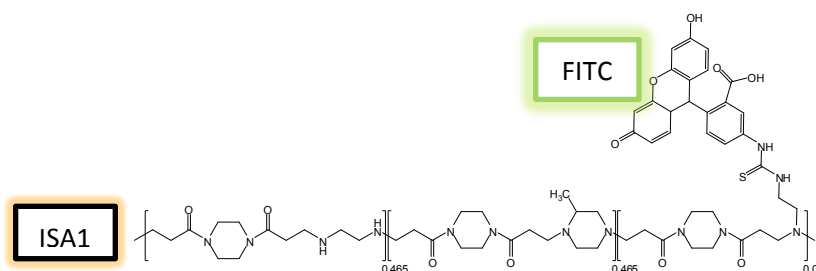


Figura 12. Polímer ISA1 marcat amb FITC

Altres experiments previs que s'havien realitzat al laboratori, van fraccionar ISA1 de 4 KDa a 70 KDa. Per l'experiment es va seleccionar un de 6,7 KDa anomenat PU15 (era el que quedava en "stock"). El pes molecular és inferior al de ISA1, és l'únic inconvenient perquè l'experiment fos reproduïble tot i això, no és un gran handicap ja que aquest polímer serveix de control positiu.

Aquestes mostres havien estat sintetitzades per la Dr P.Urban, investigadora a European Commission, Joint Research Center.

1.10 Raó experiments *Anophles* -ISA1-FITC

Estudis previs fets, han demostrat que alguns polímers poly(amodoamine)s (PAAs) han estat utilitzats com a transportadors antimalàrics que faciliten l'accés del fàrmac als pRBCs ja que són solubles en aigua, biodegradables en qüestió de dies o setmanes depenent de l'estructura, presenten baixa toxicitat, són biocompatibles i permeables en la membrana dels pRBCs però no en els eritròcits sans.

Durant el cicle intraeritrocític, *Plasmodium* modifica la membrana de la cèl·lula per poder obtenir nutrients del plasma fent que la membrana no s'acabi de tancar deixant porcs i petits conductes que s'estenen fins a la vacuola parasitària. Aquest fet ofereix una entrada a macromolècules com són els polímers (PAAs) o els liposomes, la diferència està en què els PAAs no necessiten estar units a anticossos, els quals suposen un cost elevat, i són més aptes per formulació oral. Així doncs, els polímers podrien ser uns potencials antimalàrics capaços de transportar fàrmac eficientment i amb direcció als pRBCs.

L'entrada del polímer en els pRBCs i en el paràsit suggereix realitzar futurs estudis més exhaustius per acabar definir-los potser, com a possibles antimalàrics.

Per altra banda, i paral·lelament als experiments dirigits als assajos de cultius *in vivo* de pRBCs es va pensar en l'opció d'eliminar el paràsit a dins del mateix mosquit, com una alternativa a tot el estudis

realitzats fins ara centrats en les etapes d'infecció de l'hoste. La idea és atacar el paràsit dins del vector. Per aquest motiu es va idear l'experiment pensant en aquests polímers amb la intenció de veure la seva localització en el mosquit, ja que no portaven fàrmac unit i la intenció no era veure la possible eliminació del paràsit sinó on es dirigia el polímer.

Sabent que quan el mosquit pica ingereix micro i macrogametòcits que van a l'intestí, si els mosquits haguessin ingerit prèviament el polímer antimalàric, aquest podria actuar en els eritròcits infectats abans de que es lisessin i formessin el oocist.

Per altra banda, si el polímer difongués, podria actuar en diferents zones de l'anatomia del mosquit com podria ser en la paret intestinal on hi haurà l'ooquist o fins i tot en les glàndules salivals on hi hauran els esporozoïts.

2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Hipòtesi 1:

Si una *protocell* amb fàrmac encapsulat és capaç de mitigar els efectes adversos en la quimioteràpia convencional ja que pot contenir fàrmac millorant 10^6 vegades l'eficiència del liposomes en quant a concentració de "carga" que poden encapsular. Segons l'article (Ashley et al. 2011). Aleshores una *protocell* amb fàrmac antimalàric podria ser un bon vehicle per ser dirigit a eritròcits infectats per *Plasmodium*.

Hipòtesi 2:

Si tractem la malària des del vector que la transmet, abans de produir-se la infecció, suposaria una alternativa als tractaments destinats a l'hoste. Sabent la direcció del polímer antimalàric ISA1 en l'anatomia d'*Anopheles*, podria ser un primer pas per posteriors estudis exhaustius dirigits a l'insecte que transmet *Plasmodium*.

Objectius:

En base a les hipòtesis de treball plantejades es van fixar els següents objectius:

1. Anàlisi de la capacitat encapsuladora de diferents polímers basats en SiO_2 (nanopartícules) per encapsular els fàrmacs antimalàrics: blau de metilè, primaquina, cloroquina, quinina i curcumina.
2. Formació de *protocells* amb diferents nanopartícules i composicions lipídiques. Optimització del procés formant *protocells* amb un polímer concret de SiO_2 , una composició lipídica establerta i fàrmac determinat.
3. Posta a punt d'un protocol per a determinar si és factible l'administració d'un polímer antimalàric al mosquit *Anopheles atroparvus* per veure com es distribueix en el seu organisme.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Preparació de portes per la visualització de les diferents formes del paràsit

S'ha d'homogeneïtzar el cultiu i agafar una petita quantitat, 200µl aproximadament en un *ependorf*. Es fa una centrifugació de 2 minuts a 1000 rpm i es descarta el sobrenedant. Per últim, es posen dues gotes amb un volum de 3µl i es fa un "smear". Després de 3 segons es fa la tinció Giemsa¹.

Es posa metanol al portaobjectes i es prepara la solució de tinció amb 4,5ml de "soreson's buffer solution" i 0,5ml de la solució Giemsa. Es treu el metanol i s'aplica la solució de tinció preparada. Després de 10 minuts es neteja amb aigua destil·lada i es deixa assecar i es fa el comptatge al microscopi.

Es compten tots els eritròcits de dins del camp infectats i no infectats cinc vegades i es fa la mitjana. Al denominador hi ha tots els RBCs sans i es multiplica per 2,25 perquè ens doni tot el camp. Després de multiplicar el resultat per 100, s'obté el % de parasitemia d'aquell cultiu, *equació 1*.

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\overline{x(1,2,3,4,5)}}{RBCs \times 2,25}$$

Equació 1.

3.2 Mètodes espectrofotomètrics

Els mètodes espectrofotomètrics permeten mesurar la refracció o transmissió d'un material en funció de la seva longitud d'ona. Es basen en mesurar la concentració de soluts en solució, mitjançant la fracció de llum que absorbeix la mostra. L'espectrofotòmetre utilitzat permetrà llegir l'absorbància de cada fàrmac, que s'utilitzi, cadascun dels quals amb una longitud d'ona a la que absorbeix la llum diferent (veure annexes).

3.2.1 Nanopartícules amb fàrmac

Els experiments tenen com a objectiu determinar la concentració de fàrmac antimalàric que les nanopartícules (Nps) de SiO₂ poden encapsular². Es disposaven de tres mides de nanopartícules 300nm, 100nm i 75nm amb els noms de R1A, R2B i R3B respectivament, i cinc fàrmacs; el blau de metilè, la primaquina, la cloroquina, la quinina i la curcumina. Tots a una concentració 1mM, preparats amb PBS i amb un pH ajustat a 7,4. És molt important el pH en la preparació del fàrmac ja que la intenció és que es pugui alliberar a l'interior dels pRBCs i per tant, l'antimalàric haurà d'estar a un pH proper o igual al fisiològic.

¹ Utilitzada en hematologia, permet diferenciar les cèl·lules sanguínies donant color als eritròcits, basòfils, eosinòfils, limfòcits, plaquetes i la cromatina dels nuclis.

² Capacitat d'adsorció del fàrmac a la superfície i interior dels pors de les nanopartícules (Nps)

Tot i això, cada fàrmac té unes propietats diferents en quan a càrrega, solubilitat, punt de fusió, estat físic, estabilitat, etc. Es van haver de preparar tenint en compte els seus límits de solubilitat, el seu comportament en PBS³ i el pH.

Cada *stock* de Nps estava a una concentració diferent, i més elevada de la requerida, de manera que es van diluir per poder-les utilitzar a 10mg/ml. Es van centrifugar 30 minuts, a temperatura 4°C i 20.000g (RCF; Relative Centrifugal Force), aquestes condicions van anar optimitzant al llarg dels experiments al veure que les Nps precipitaven millor.

3.2.1.1 Encapsulació i “release” disseny primer protocol

Amb un volum aproximat de 300µl de Nps es podia obtenir un volum de pellet de 30µl al qual, un cop preparada la solució de treball del fàrmac, s’afegia 1500µl a les Nps i es van fer incubacions amb una agitació suau a diferents temps; 30’, 1:30’, 3h, 6h, i 24h. Passat cada temps es centrifugava durant el mateix temps, temperatura i força centrífuga que amb les Nps soles (30’, 4°C, 20000g) i es guardava el sobrenedant per a analitzar-lo per absorbància. Això es realitzava per cada mida de Np i per cadascuna hi havia tres rèpliques de manera que s’obtenien 45 mostres per analitzar. A temps d’incubació curts s’espera detectar major concentració de fàrmac al sobrenedant degut a una menor adsorció sobre les nanopartícules que després de centrifugar quedaven al pellet.

Aquest primer experiment d’encapsulació es va realitzar per cada fàrmac.

Es va determinar un temps òptim d’encapsulació de 24 hores, de manera que per veure a quin ritme s’alliberava el fàrmac, es va repetir el procés de d’alt però aquesta vegada només fins a un temps de 24 hores *overnight* es va centrifugar (30’, 4°C, 20000g), i el pellet que s’obtenia era idealment les Nps amb el fàrmac encapsulat. Per estudiar el “release” es van resuspendre els pellets amb PBS (per simular les condicions fisiològiques) i a temps; 30’, 1:30’, 3h, 6h, i 24h es va anar guardant el sobrenedant per analitzar.

Per cada experiment es feia una estàndard del fàrmac de 1mM a 10⁻³mM. Les mostres i l’estàndard es carregaven en una placa microtiter de 96 pous i es llegia posant prèviament la longitud d’ona a la que absorbia l’antimalàric. Un cop obtingudes les lectures d’absorbància es feia la recta patró amb les concentracions conegudes i l’absorbància donada, llavors amb l’equació de la recta es trobaven les concentracions de les mostres. Amb aquestes, es podien elaborar les gràfiques comparant temps d’incubació i temps d’alliberament per cada mida de Np.

³ PBS (Phosphate Buffered Saline) és una solució isotònica salina que simula les condicions en les que es troben els eritròcits a l’interior de l’organisme.

3.2.1.2 Encapsulació i “release” disseny segon protocol

En funció dels resultats obtinguts amb el primer protocol, es va decidir canviar-lo augmentant el volum de Nps.

Es va agafar 1000µl de Nps que després de centrifugar s’obtenia un pellet d’aproximadament 100µl, al qual s’hi afegia també 1000µl de fàrmac. S’incubava en agitació *overnight* i després de centrifugar es guardava el sobrenedant resultat de l’encapsulació. El pellet es resuspenia amb PBS deixant incubat 30’, passat aquest temps es centrifugava i s’hi tornava a afegir PBS repetint el procés fins a 6 vegades (3 hores).

Com abans, es feia un estàndard, es llegia per absorbència i amb la recta patró s’obtenia la concentració. Aquest protocol es va realitzar per cada mida de nanopartícula, realitzant tres rèpliques per cadascuna i per cadascun dels fàrmacs citats.

3.3 Preparació de liposomes

Les propietats dels lípids poden variar en funció de la seva composició, n’hi ha de catiónics, aniónics i neutres i en funció de la càrrega que es vulgui que tinguin, es prepararan amb el tipus de lípid i el % corresponent. Però s’utilitza el mateix mètode de preparació per a tots, independentment de la seva composició. Els lípids s’hidraten, s’agiten i se separen per mida per tenir una distribució homogènia de les vesícules.

Els liposomes es van preparar combinant fosfolípids en les quantitats d’interès dissolts en cloroform: metanol (2:1 v/v) en un matràs que va girant i es forma una pel·lícula de lípid en les parets quan s’evaporen els dissolvents orgànics sota pressió reduïda i a 37°C en el rotavapor (veure annexes), que és l’aparell amb el que es poden evaporar dissolvents orgànics.

Seguidament es va deixar el flascó 30 minuts sota un flux de nitrogen per eliminar les restes de dissolvents orgànics i es va procedir amb la hidratació, amb PBS a 37°C ja que es volia una concentració final de 10mM de liposomes multilamel·lars. Si s’haguessin volgut fer liposomes amb fàrmac a dins, enlloc d’hidratar-los amb PBS s’hauria fet amb antimalàric.

Llavors es van fer tres cicles de 4 minuts de vòrtex i 4 minuts de sonicació en el bany a 37°C per separar les capes de fosfolípids. Per últim, per obtenir les vesícules unilamel·lars es va realitzar l’extrusió. Aquesta és una tècnica en què la suspensió lipídica que tenim es fa passar per un filtre de policarbonat amb una mida de por definit i així es poden obtenir partícules amb un diàmetre pròxim al por del filtre. El liposomes que es van fer tenien una mida de 200nm, i es va aconseguir realitzant l’extrusió 21 vegades a través de les membranes de 200nm. *Figura 13*

Per comprovar la mida i polidispersitat es va utilitzar l'equip Z-sizer que mesura la dispersió de la radiació (*light scattering*) i dóna un pic que correspon a la mida a la que s'han preparat els liposomes. Quan més estret i ajustat a 200nm és el pic, menys polidispersitat hi ha.

LIPID FILM HYDRATION METHOD

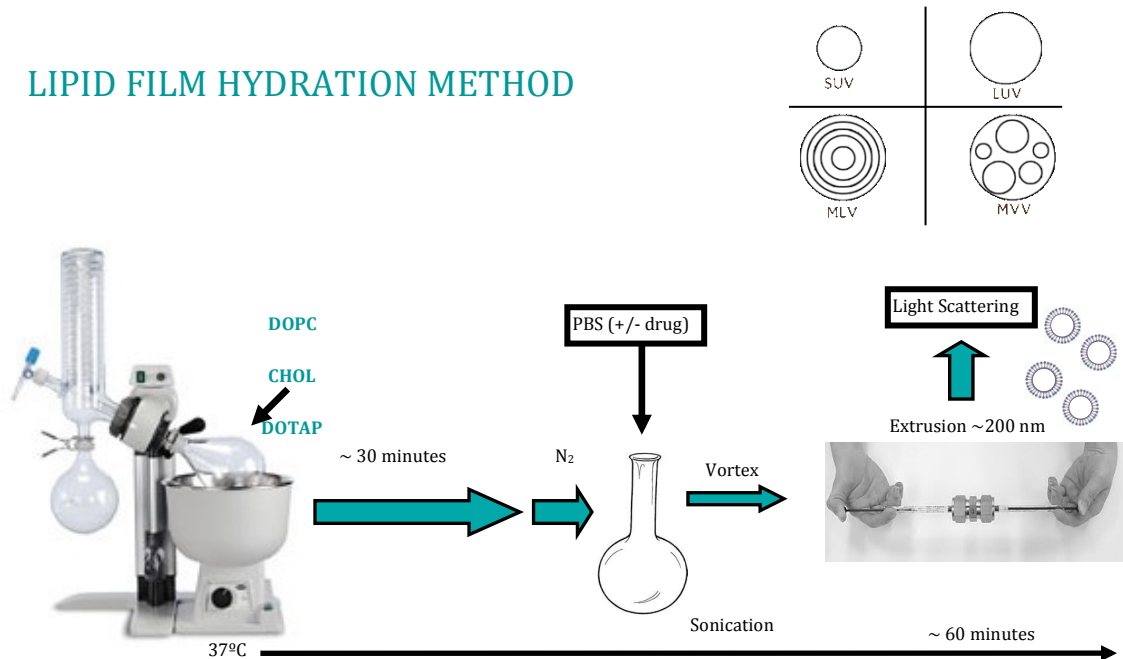


Figura 13. Mostra el procés que es segueix en la preparació de liposomes

3.4 Cryo-electron microscopi

El microscopi electrònic de transmissió utilitza un feix d'electrons per il·luminar i crear imatges augmentades de la mostra. Els electrons substitueixen la llum i tenen una longitud d'ona unes 100.000 vegades més gran que la llum visible (1000 vegades superior al microscopi òptic).

En el cas de la visualització de mostres per Cryo-TEM, la mostra s'ha de vitrificar que es tracta de fer un refredament molt ràpid utilitzant una solució que no cristal·litza durant la congelació. Aquesta tècnica es fa servir en embrions ja que permet congelar-los sense danyar-los i que puguin sobreviure intactes.

Les *protocells* s'observaran per Cryo-TEM igual com ho fan en l'article (Ashley et al., 2011) ja que és el millor mètode per aconseguir visualitzar el liposoma al voltant de la Np.

La tècnica consisteix en vitrificar la mostra primer amb el "Vitrobot" un aparell que permetrà congelar per immersió en un líquid criogènic, que és l'età líquid (de normal està en estat gas però el líquem) que després sublima en la columna del microscopi. També es podria utilitzar el nitrogen líquid però té una conductivitat menor que l'hidrocarbur alifàtic. *Figura 14*

Es prepara l'equip controlant la temperatura i la humitat fent que aquesta última sigui del 100%, important perquè els liposomes, proteïnes o polímers que se solen analitzar no s'assequin. Llavors es posa la reixeta de coure, que conté una làmina de carboni, on es posarà un volum petit de mostra (1 μ l). Quan entra en contacte amb l'età, es produeix la vitrificació en milisegons i un cop fet això, la mostra s'ha de transferir al *holder* que és el braç que l'aguanta i llavors es posa a l'estació de treball on es controlarà la temperatura perquè baixi fins a -192°C. Per últim, es transfereix al microscopi (veure annexes) aconseguint que la temperatura s'equilibri sempre per sota de 170°C perquè sinó es podrien formar cristalls. Ja es pot visualitzar la mostra modificant la intensitat del feix de llum, la magnificació i el *focus step* que permetrà adquirir imatges amb més o menys augments.

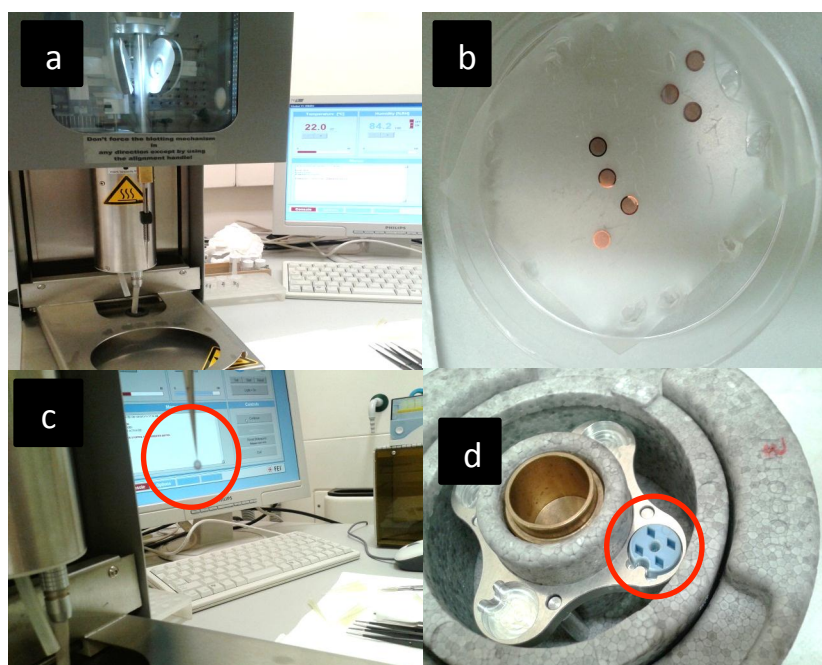


Figura 14. Procés de vitrificació: (a) "vitrobot" que consisteix en l'aparell on es poden veure els filtres que treuen l'excés de mostra i l'equip on es controlen els paràmetres de temperatura, humitat i altres: (b) reixetes de coure amb làmina de carboni on s'hi posa la mostra: (c) pinça sostenint la reixeta que es posa en el "vitrobot", des d'allà s'hi diposita la mostra i se n'eixuga l'accés: (d) un cop vitrificada la mostra per acció de l'età, es treu la pinça de l'aparell sense treure-la de l'hidrocarbur (estarà dins del compartiment central) i a poc a poc es treu d'aquest i es posa en nitrogen líquid, després es posa la reixeta en un dels foradets en forma de rombe en la superfície blava. Finalment la mostra es posa en un falcon amb N liq. i es monta al *holder* del microscopi electrònic.

3.4.1 Formació de *protocells* sense fàrmac

Quan es fusiona la nanopartícula amb el liposoma, es crea un constructe anomenat *protocell*.

El primer experiment per a la formació de les *protocells* es va fer barrejant amb la pipeta les nanopartícules amb els liposomes. Es va deixar incubar *overnight* i passat aquest temps, es va centrifugar durant 30 minuts, a temperatura 4°C i 20.000g. Es va separar el sobrenedant i al pellet és on quedaven els liposomes fusionats amb les Nps. També però, hi haurà les Nps que no s'hagin fusionat i

potser algun liposoma, tot i que aquests precipiten a 100.000g, a temperatura 4°C, durant un temps òptim de 45 minuts.

El pellet que queda es resuspèn amb PBS i es torna a fer una centrifugació durant 30 minuts, a temperatura 4°C i 20.000g. Es descarta el sobrenedant i el pellet que queda es torna a resuspendre amb PBS, aquest volum és el que s'analitzarà al Cryo-TEM.

S'ha vist que s'han realitzat altres estudis per comprovar la fusió. Utilitzant tècniques com la microscopia confocal. En la imatge següent s'observa la part central de sílice marcada amb FITC i la part lipídica amb Texas Red. *Figura 15*

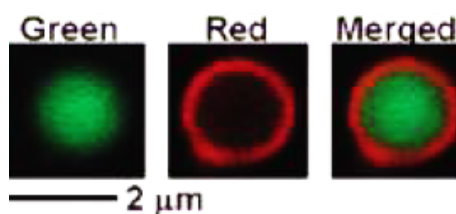


Figura 15. Imatge feta per microscopia confocal. *Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (protocells) as Delivery Vehicles*, J.Liu et al. 2009.

Les *protocells* són més estables que els liposomes i tenen l'avantatge que al tenir l'interior porós es pot controlar més la càrrega i l'alliberament.

Es va observar per Cryo-TEM la formació de *protocells*, però en funció dels resultats obtinguts es van canviar algunes condicions en la seva preparació. L'article J. Liu et al. 2009 va servir com a pauta per a la modificació d'aquests paràmetres .

Es va mirar la càrrega de les tres mides de Nps utilitzades i en funció d'això es van sintetitzar liposomes amb diferents percentatges de lípid; zwiteriònic (DOPC), positius (DOTAP) i negatius (DMPG). Es van mesclar els lípids positius amb les Nps negatives i viceversa, també es van utilitzar els zwiteriònics amb les dues mides de Nps més petites. A part de la resuspensió amb pipeta es va fer un vòrtex durant 2 minuts, i les condicions de temperatura, velocitat i temps no es van modificar.

Segons l'article de J.Liu et al. 2009, la fusió de liposomes carregats positivament amb nanopartícules de sílice carregades negativament creen una sinergia que permet, gràcies al liposoma, un major control en l'alliberament del contingut interior i gràcies a la partícula de sílice es pot alliberar un alt contingut de fàrmac. Cal preparar les *protocells* a un pH igual al fisiològic perquè es produeixi alliberament a l'interior de l'eritròcit infectat.

3.4.1.1 Primera observació (Nps&lipos0)

A La facultat de farmàcia de la UB es van anar a preparar els liposomes neutres. Aquests contenen 80 DOPC: 20 CHOL i 1% DOPE-RHO. Aquest últim és un fosfolípid al que se li afegeix la rhodamina, una molècula fluorescent.

Les *protocells* es van preparar barrejant els liposomes amb cadascuna de les nanopartícules R1A, R2B i R3B en una proporció 1:2 (lípid:silica), diluint els liposomes fins a una concentració de 5mg/ml i de nanopartícules 10mg/ml. Es van barrejar per pipeteig i vòrtex de 2 minuts, llavors es va deixar incubar en agitació suau *overnight* i després de centrifugar, el pellet es va resuspendre amb PBS, es va tornar a repetir la centrifugació i el pellet resultant es va tornar a hidratar amb el buffer. Les dues centrifugacions ens permeten descartar els liposomes que queden sols en el sobrenedant i aconseguir el pellet que conté les Nps fusionades amb el liposoma (*protocells*), aquesta fracció és la que m'interessa.

Tot i que l'objectiu era fer la visualització al Cryo-TEM també hi havia l'alternativa de fer una lectura per fluorescència, per això es van preparar amb rhodamina.

3.4.1.2 Segona observació (Nps&lipos-,+,0)

En funció dels resultats anteriors, es va analitzar la càrrega de les Nps al Z-Potential (facultat de farmàcia UB). S'esperava que fos la mateixa per cadascuna, ja que estaven fabricades totes de SiO₂. Tot i això, les càrregues eren diferents probablement degut a la metodologia de fabricació, de manera que es va decidir mesclar-les amb tres tipus de liposomes: positius (50 DOPC: 20CHOL: 30 DOTAP) negatius (50 DOPC: 20 CHOL: 30 DMPG) i neutres (80 DOPC: 20CHOL), aquests últims sense rho.

Es van barrejar aquelles Nps amb càrrega oposada a la del liposoma i els liposomes neutres es volien fusionar amb totes però es va decidir només amb les Nps de mida intermitja i petita (R2B i R3B). El mètode és reproducible per cada experiment de preparació de *protocells*.

3.5 Resultats per espectrofotometria de la formació de *protocells* amb fàrmac

Es va escollir la Np R3B, els liposomes positius i dos antimalàrics es funció de la seva capacitat d'encapsulació. Amb una concentració de 10mg/ml de Nps agafant un volum de 105µl es va incubar *overnight* amb un volum de fàrmac de 875µl a concentració 1mM, a excepció de la curcumina (0,1mM). Després de centrifugar, el pellet es va barrejar seguidament d'un vòrtex amb el mateix volum de liposomes positius a 5mg/ml, després es va deixar incubar i es va centrifugar, el pellet es va hidratar amb PBS (sob. 0) i a partir d'aquí, es tornava a afegir PBS fent una incubació de 30', passat aquests es centrifugava guardant el sobrenedant per analitzar per espectrofotometria i es repetia el procés fins a 4 vegades.

3.6 Preparació d'*Anopheles* proves i experiments

Els assajos realitzats es van fer amb *Anopheles atroparvus*, espècie del Delta de l'Ebre (fig. 17). Estaven lliures de *Plasmodium*. Eren totalment innocus i no comportaven cap risc potencial pels humans. Un estudi que va realitzar la universitat de València al 2010, explicava que el Delta de l'Ebre era un territori on es podrien donar les condicions adequades per a una transmissió de malària, sobretot en els mesos de més calor, entre juliol i agost. Tot i això, la reaparició de la malaltia al Delta és improbable sabent que es disposa d'un sistema sanitari altament eficaç per detectar i tractar la malaltia.

Es van extreure d'una granja de bestiar porcí del Delta amb la col·laboració del Consorci de Serveis Agroambientals de les comarques del Baix Ebre i Montsià (CODE).

Aquest organisme que està integrat als municipis del Delta va néixer fa 22 anys per tractar dues grans àrees; la de planificació ambiental, i l'àrea de serveis. Aquesta última, el que fa és portar un control dels mosquits, de la mosca negra i la salubritat pública. El control de mosquits es porta a terme en la fase larvària que és quan està fix al substrat.

Els mosquits es van agafar mitjançant un mètode d'aspiració, que consistia en un aparell com es mostra en la figura 16 i es van posar en uns receptacles en forma de cub coberts per una malla.

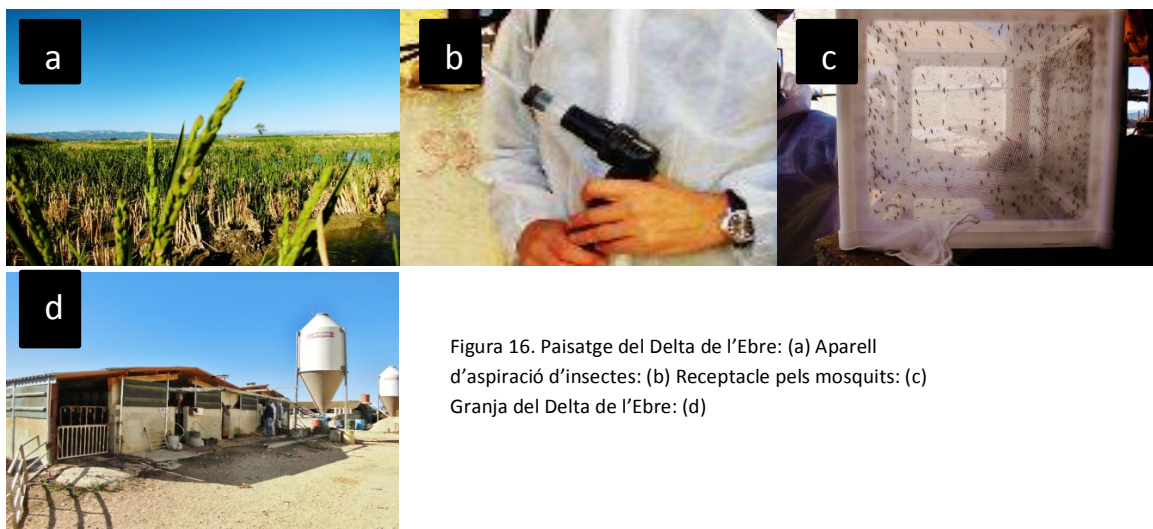


Figura 16. Paisatge del Delta de l'Ebre: (a) Aparell d'aspiració d'insectes; (b) Receptacle pels mosquits; (c) Granja del Delta de l'Ebre; (d) Granja del Delta de l'Ebre.

Se'n van poder agafar uns 1000 aproximadament i tots ells eren heterogenis, de diferents edats i sexe i per iniciar l'experiment era necessari tenir-los tots amb les mateixes característiques.

Es van preparar 4 solucions per alimentar als insectes: aigua amb sucre o *sugarwater* (sw), sw amb polímer ISA1, sw amb ISA1-FITC, sw amb FITC. Aquestes dues últimes solucions es van preparar a llum apagada ja que el compost fluorescent és fotosensible.

La primera, és una solució per mantenir-los vius, tot i que el que els hi és indispensable a les femelles perquè puguin posar ous és sang. La segona actua com a control positiu ja que conté el polímer d'interès i ens permetrà veure com actua en l'animal, si li és innocu o bé per altra banda té efectes letals. La

següent, és la més important ja que conté el polímer marcat amb Fluorescein isothiocyanate (FITC) que és un compost que aporta fluorescència i permet veure a quin lloc de l'anatomia del mosquit va a parar el polímer, si es queda a l'estómac o bé difon per tots els teixits interns. La última serveix de control negatiu que conté només la molècula fluorescent.

Amb els que es van agafar, es van fer proves. Després de deixar-los dos dies de dejuni, se'ls va administrar les solucions que s'havien preparat, i es van seleccionar només les femelles, anàticament discernibles dels mascles *figura 17a*. Després de dues hores d'haver-les deixat amb les solucions, es van fixar en un portaobjectes rodó i es van mirar pel microscopi confocal.

Aquests primers experiments eren proves per veure quin efecte es produïa en el mosquit i com era la visualització ja que aquestes experiments no s'havien realitzat abans amb *Anopheles*. Un cop fet això, i vistos els resultats es van dissenyar els següents experiments.

Amb algunes femelles es va fer el control amb la solució de sw amb ISA1, i es van enregistrar quins efectes produïa en el mosquit. A unes altres se'ls va administrar ISA1-FITC i després de dues hores es va fer la visualització per confocal.

Algunes d'elles, s'esperà a que possessin ous alimentant-les amb sang (*blood-meal*) *figura 17b*. Després de tres setmanes es van obtenir les larves i en dues setmanes més ja teníem el mosquit adult per iniciar l'experiment.

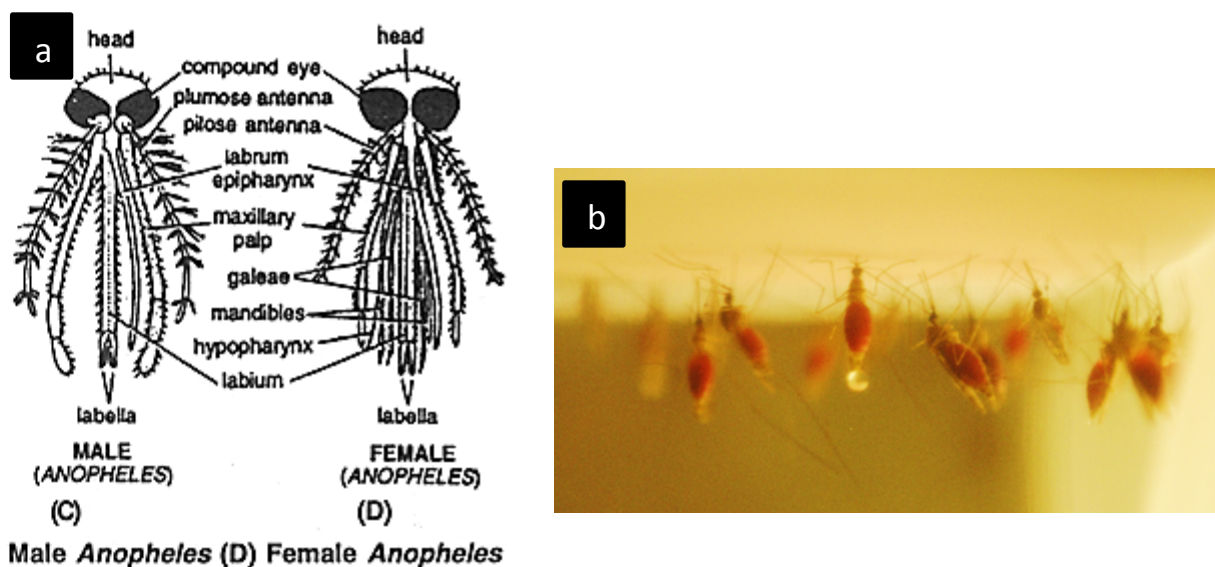


Figura 17. Diferències mascle-femella *Anopheles*: (a) Mosquits després d'haver menjat ("blood-meal"), fotografia de Krijn Paaijmans: (b)

Les proves i experiments es van portar a terme a l'Hospital Clínic, a la unitat de microscopia confocal (SCT-UB)-IDIBAPS amb la col·laboració del Dr. Krijn Paaijmans, entomòleg i Dr. En biologia de CRESIB, institut de recerca ISGlobal. També gràcies a la Dra. Maria Calvo tècnic superior i cap de la Unitat de Microscopia Confocal (IDIBAPS).

S'estan fent gestions per tal de disposar d'una zona habilitada específicament per al cultiu controlat d'*Anopheles* per tal d'encaminar posteriors estudis amb l'insecte portador del protozou *Plasmodium*, cosa que requerirà un espai ben equipat amb un nivell de seguretat adequat al risc que suposa. La Fundació Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), creada per la Universitat Autònoma de Barcelona, és un centre de recerca i desenvolupament en el camp de la sanitat animal. Podria ser un centre que ens permetés disposar de les seves instal·lacions en un futur per els experiments amb mosquits del gènere *Anopheles*.

Calendari del procés (veure annexes).

3.6.1 Preparació *sugarwater* (sw) amb polímer ISA1-FITC i polímer PU15

La sw es va preparar a una concentració de 0,1mg/ml, preparant una solució inicial de 25g de dextrosa en 250ml d'aigua destil·lada.

Després de preparar la solució de sw es va mirar el % de FITC i la concentració de polímer necessaris. Per determinar-ho es van consultar experiments que s'havien fet en el mateix grup de nanomalària, dirigint polímers com a nanovectors a pRBCs.

Segons les gràfiques de GIAs (Growth Inhibition Assay), es va mirar el % de parasitemia en la fase de ring emprant diferents concentracions del polímer. Amb una concentració de 0,2 a 0,5mg/ml s'inhibia el creixement, determinant com a suficient 0,25mg/ml per inhibir el creixement en un 10%.

Es va pensar que el fet de produir-se aquest efecte en els pRBCs, es podria traslladar l'efecte a dins del mosquit. Tot i això cal tenir en compte que a dins d'*Anopheles* el paràsit no es troba en estadi de ring sinó en forma de gàmetes (prèvia llisi dels pRBCs a l'intestí de l'insecte), ooquistes o bé d'espozoïts. Cal remarcar el fet que els insectes emprats en els experiments no estaven infectats pel paràsit i per tant eren només assajos per determinar la direcció del polímer.

Sabent això, es va preparar la solució de polímer ja amb un % de FITC incorporat del 5% (òptim per a la correcta visualització de fluorescència), de 3,75mg de polímer en 15ml de sw per obtenir una concentració de 0,25mg/ml.

El control negatiu conté només FITC al 5% a una concentració de 0,0125mg/ml (adequada per veure fluorescència) Preparat amb 0,5mg FITC en 40ml de sw.

El control positiu es va preparar amb el polímer ISA1 sense FITC que s'anomena PU15. Es va administrar per comprovar que els insectes no experimentaven cap efecte que pogués ser perjudicial, escurçant el seu temps de vida, o bé causant letalitat.

3.6.2 Microscopia confocal de fluorescència (CSLM)

El microscopi confocal utilitza un raig làser en una mostra tenyida per fluorescència i permet l'observació i anàlisi per microscopia òptica de mostres com cèl·lules, teixits, i altres materials.

Permet l'obtenció de seccions òptiques del material a observar mitjançant làsers, diafragmes i un sistema electrònic de captació d'imatge digital que és un ordinador que digitalitza cada pla de la mostra que s'està examinant. La presència de marcadors fluorescents en la mostra permet la localització de components cel·lulars en seccions concretes. Per exemple, es poden fer estudis de colocalització de proteïnes i altres tipus de molècules i estudis en cèl·lules vives.

Per portar a terme els experiments es va utilitzar el microscopi confocal del (SCT-UB)-IDIBAPS de la unitat de microscopia confocal de l'Hospital Clínic (veure annexes).

Les preparacions van ser visualitzades segons les longituds d'ona. Sabent que el FITC té una longitud d'ona d'excitació i emissió de 495nm i 519nm respectivament, franja corresponent a la zona verda de llum visible, es veien les estructures de l'insecte d'aquest color (veure annexes).

3.6.2.1 Preparació *Anopheles* per visualització al microscopi

Es va realitzar una primera prova amb els insectes que es van agafar del Delta, abans de fer l'experiment amb la primera generació, per determinar la forma de preparació de les mostres i veure si la concentració i % de de polímer i FITC eren adequats.

Es van preparar tres gots, un que contenia ISA-FITC, l'altre FITC i l'altre polímer sense FITC (PU15) i en cadascun s'hi van posar 20 mosquits. Els dos primers es van tapar amb paper de plata per la fotosensibilitat. Amb un tub s'aspiraven només les femelles distingibles per dimorfisme sexual, veient la diferència en les antenes, menys piloses. Llavors es posaven en el got de plàstic tapat amb una malla amb una petita obertura *figura 18b*. Després de dues hores d'haver-les alimentat, es van adormir posant un cotó banyat en èter en la malla. Una altra opció era el CO₂ però la primera garantia un període més llarg d'anestèsia i per tant una més fàcil manipulació. Es van seleccionar les que tenien l'abdomen inflat, signe que havien menjat i es van preparar en un portaobjectes rodó fixant-lo primer amb agar (es va descartar perquè no s'adheria prou bé) i després amb vaselina *figura 18c* i posant una tira de Parafilm a l'abdomen ja que havia de quedar totalment en contacte al portaobjectes *figura 18d*. Aquest procés es va fer amb la lupa *figura 18e* ja que la seva mida és de 4-5cm de llargada del cap al final de l'abdomen.

Aquest procés es va fer amb un mosquit per cada solució i es va fer la visualització al (CSLM). (Veure annexes).

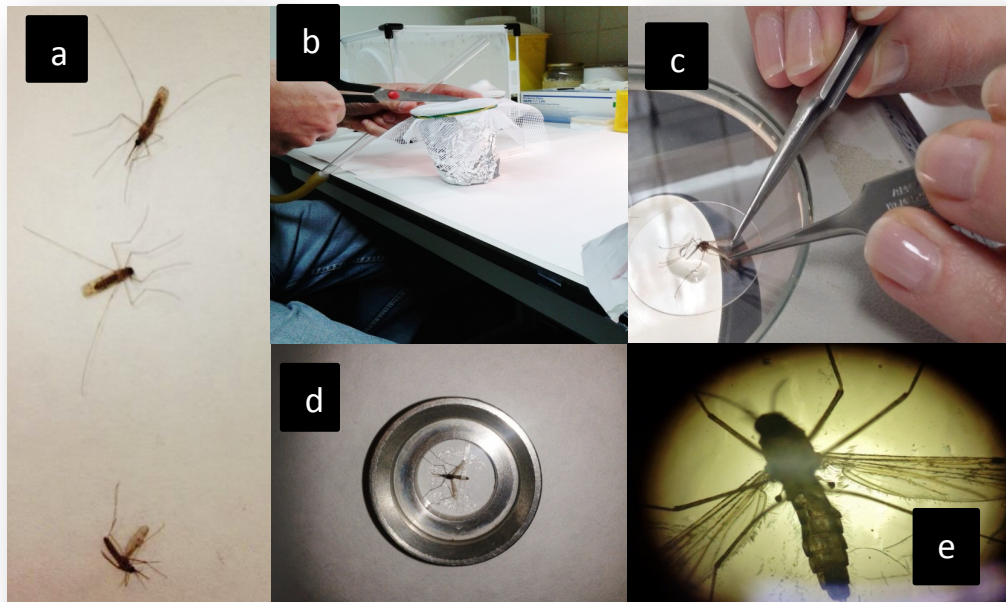


Figura 18. Mosquits adormits amb èter: (a) got de plàstic amb malla i solució fotosensible a l'interior: (b) preparació del mosquit en la posició que s'observa, apartant les ales i fixant-lo amb vaselina: (c) preparació feta ja en el suport per posar al microscopi: (d) visualització d'*Anopheles* amb lupa: (e)

3.6.3 Visualització al microscopi de fluorescència

Segons els resultats obtinguts amb les proves fetes al microscopi confocal es tornaren a alimentar els mosquits amb ISA-FITC i després de 48 hores es va decidir fer una visualització al microscopi de fluorescència. Aquest, exposa la mostra a la llum ultravioleta, violeta o blava i forma una imatge del objecte amb la llum fluorescent resultant. La llum d'excitació passa a través de la lent del objectiu fins a la mostra.

Permet que es rebi senyal de tota la mostra enlloc d'un sol pla com passa en el CSLM, tot i això amb la mostra que es vol visualitzar s'espera una millor visualització dels òrgans del mosquit, de manera que podria ajudar a identificar la zona interna més fluorescent.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Estadis del paràsit vs bibliografia

Estadi de merozoït:

Primera forma del paràsit quan surt d'un RBC i entra en el següent. Té una forma allargada i és la més petita de totes les de *Plasmodium* spp.

Estadi de ring i trofozoït:

És un estadi immadur del trofozoït, en què el paràsit s'aplana adoptant una forma d'anell, on hi ha la majoria d'òrgànuls, mentre que al centre hi ha poques estructures.

La distinció entre la forma de ring i estadi trofozoari és per la mida i forma, més que les diferències internes que s'hagin produït. El nombre de ribosomes lliures augmenta i el RE augmenta de mida, produint un increment en la síntesi proteica.

Estadi de schizont:

És l'estadi del paràsit intraeritrocític que va experimentant divisions nuclears repetitives, formant-se de 16 a 20 nuclis. Aquesta fase va seguida del començament de la formació de merozoïts. Abans de la separació completa, el nucli, mitocondria i plastidi es mouen des de la zona central del *schizont* cap a cada merozoït que es formarà, i un ring constrictor els separarà.

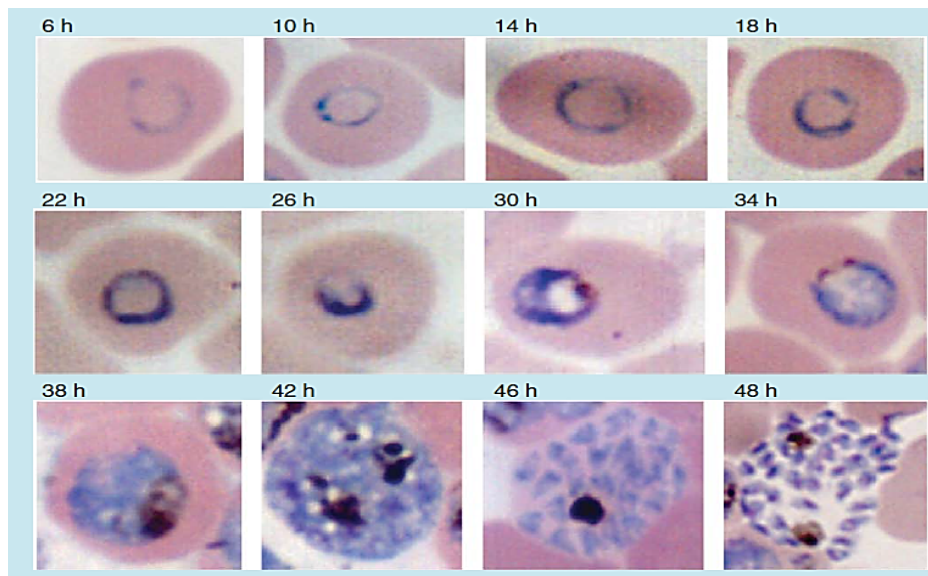


Figura 19. Es mostren els diferents estadis de *P.falciparum* durant la infecció. L'estadi de ring dura de 6 a 22 hores, l'estadi de trofozoït de 22 a 38 hores i l'estadi de *schizont* comprèn de 38 a 48 hores, després els eritròcits es llisen i s'alliberen els merozoïts que infectaran altres RBCs.

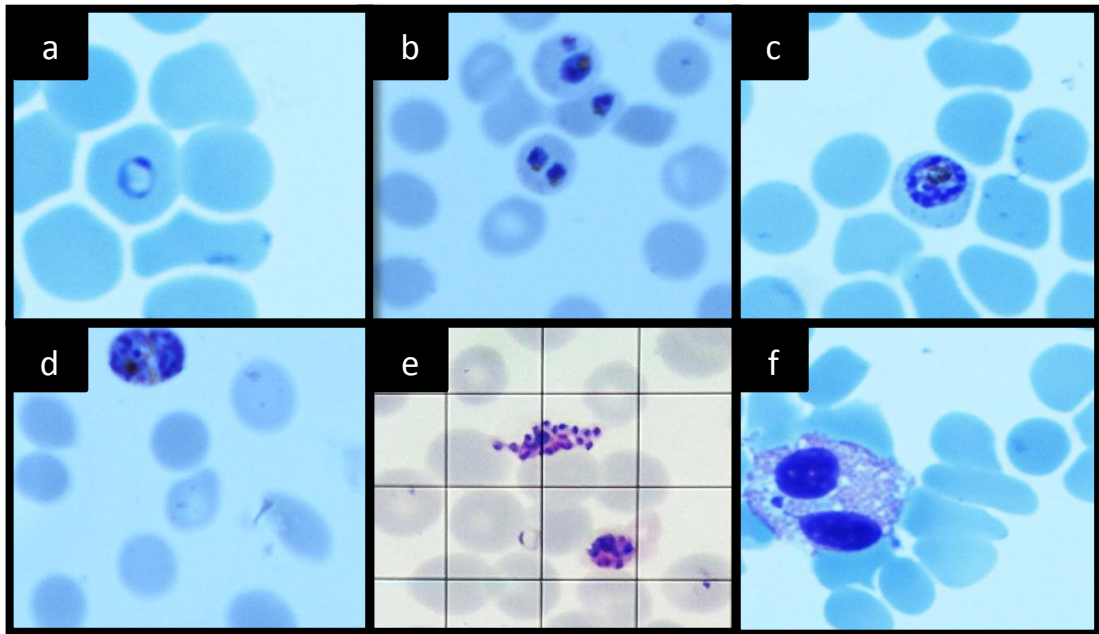


Figura 20. Aquestes imatges provenen de preparacions purificades en cada estadi, fetes amb un microscopi òptic que permet transferir les imatges a una carpeta de l'ordinador, (excepció de la figura; e). Estadi de ring havent passat unes 18 hores:(a) estadi de trofozoït primari, al mig se n'observen dos dins del mateix eritròcit:(b) estadi de trofozoït, 38 hores:(c) estadi de schizont a les 42 hores:(d) alliberació dels merozoïts per llisi del pRBC:(e) és un macròfag amb dos paràsits:(f).

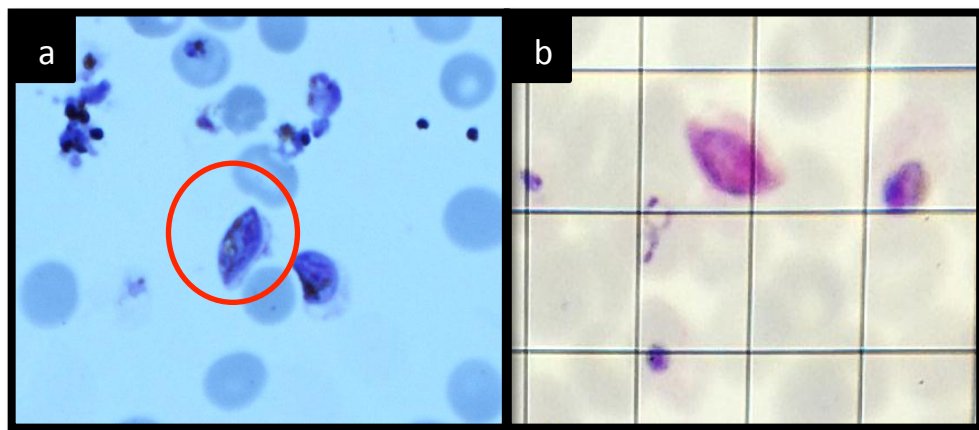


Figura 21. Els merozoït que han sortit de l'eritròcit es diferencien en macrogametòcits i microgametòcits. El de la figura és un gametòcit de forma allargada (microgametòcit) que es desenvoluparà en gametòcit masculí un cop dins del mosquit:(a;b)

4.2 Caracterització nanopartícules

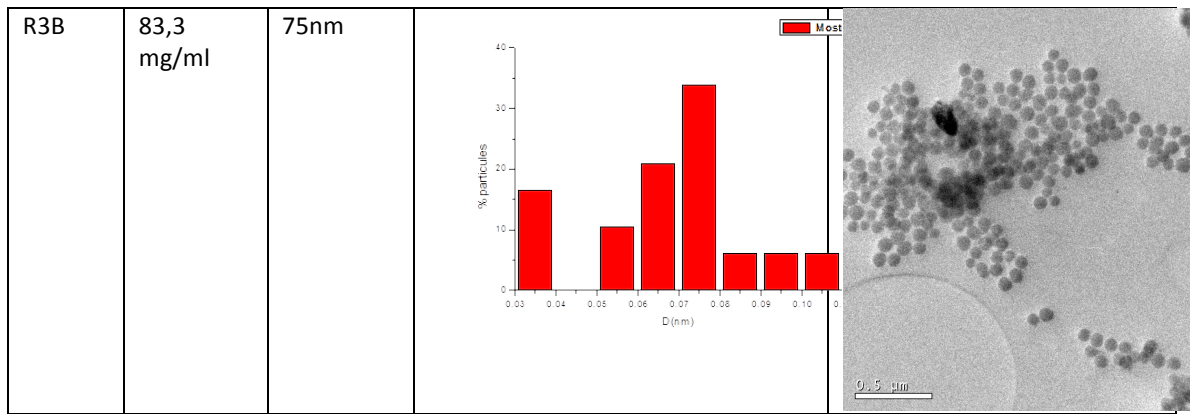
La *taula 4* mostra els estocs de nanopartícules de partida, amb un volum i concentració ja donats, faltava veure quines eren les millors per realitzar els experiments. Per saber-ho es va visualitzar al Cryo-TEM si formaven agregats. Tot i que en les imatges de TEM *taula 5* es veuen agregats, es van seleccionar les que en formaven menys. Aquestes eren: R1A, R2B, R3B. Aquest paràmetre era important corregir-lo d'entrada per tal que no suposés un problema per a l'encapsulació.

Mostra	Volum (ml)	Concentració (mg/ml)	Agregats
R1A	24,2	61,9835	No
R1B	21	71,4286	Sí
R2A	16,6	90,3514	Sí
R2B	16	93,7500	No
R3A	18,2	82,4176	Sí
R3B	18	83,3333	No

Taula 4

En la *taula 5* es mostra la distribució mitjana per cada mida adquirint forma d'histograma. A la dreta hi ha les imatges fetes amb els mateixos augments.

Taula protocols	Concentració	Mida (aproximada)	Distribució	Estructura
R1A	61,98 mg/ml	300nm		
R2B	93,75 mg/ml	100nm		



Taula 5

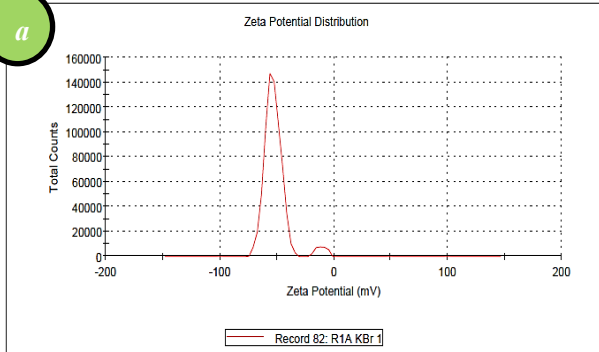
Les gràfiques a, b i c estan obtingudes amb l'aparell Z-potential, que dona la càrrega de la mostra que s'analitza. R1A: -51,7mv, R2B: 30,8mv, R3B: -35,9mv.

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -51,7	Peak 1: -53,5	95,7	6,87
Zeta Deviation (mV): 10,9	Peak 2: -11,1	4,3	4,48
Conductivity (mS/cm): 0,219	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**

a

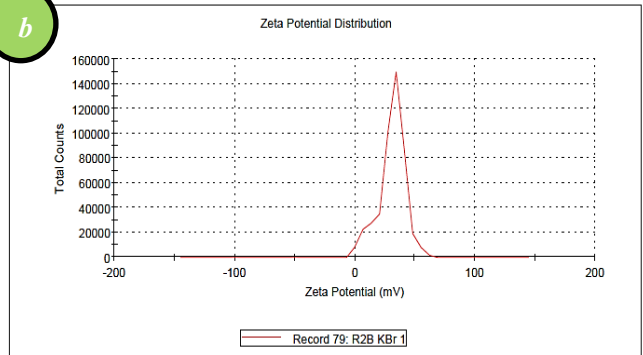


Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 30,8	Peak 1: 30,8	100,0	11,2
Zeta Deviation (mV): -11,2	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00131	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**

b

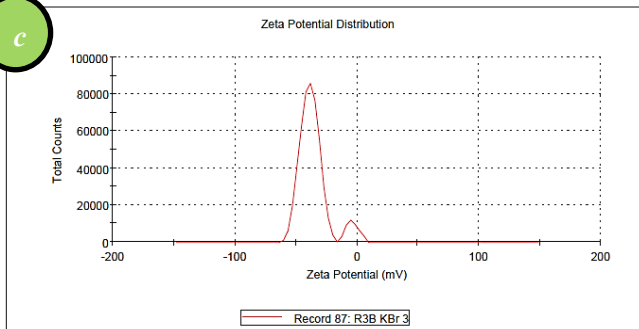


Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -35,9	Peak 1: -38,9	91,4	7,70
Zeta Deviation (mV): 12,4	Peak 2: -3,85	8,6	5,09
Conductivity (mS/cm): 0,279	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**

c

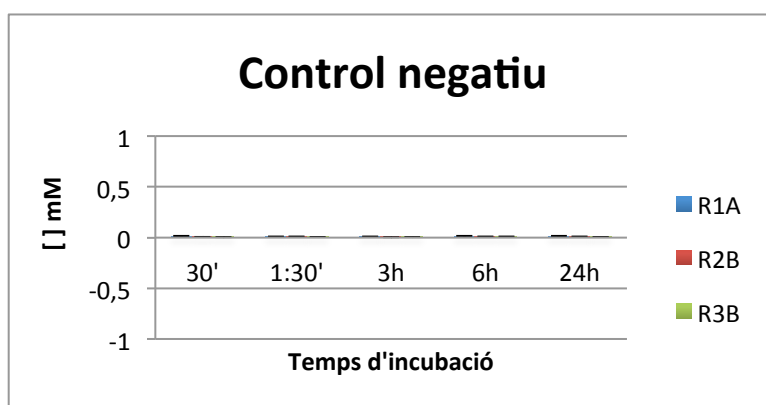


Gràfiques: (a,b,c)

4.3 Resultats de nanopartícules amb fàrmac

Els temps d'incubació al començament dels experiments eren de 30', 1h, 1:30', 2h, 4h, 6h, 24h però es van espaiar traient: 1h, 2h, 4h per veure resultats més clars.

Per fer el control negatiu es va substituir el fàrmac per PBS i la gràfica mostra uns resultats que podem considerar de concentració 0mM, d'aquesta manera es podien comparar els resultats de les Nps amb antimalàric. El que s'observa podria ser degut a error de pipeteig (s'han agafat Nps com a sobrenedant). No hi ha control positiu perquè, aquest seria el fàrmac sol i no té sentit posar-lo perquè no sabem quant encapsulen les Nps prèviament als experiments, les gràfiques ja donen la informació que es busca.



4.3.1 Primer protocol

Amb les tres mides de nanopartícula els resultats per cadascun dels fàrmacs són propers a 1mM que és la molaritat de partida de cada antimalàric. Aquests resultats es podrien explicar pel fet d'utilitzar un volum de fàrmac 5 vegades més gran que de Nps, tot i això, es van assignar aquesta relació pensant en una encapsulació gairebé segura d'aquests polímers i per tant, independentment del volum utilitzat, es veuria una concentració significativa de fàrmac encapsulat. L'equació 2 permet saber el % encapsulat en les Nps.

$$\frac{([\text{inicial}] - [\text{sobrenedant}])}{[\text{inicial}]} \times 100$$

Equació 2.

En els primers experiments s'analitzaven els pellets incubant-los amb PBS però es va veure que les Nps absorben a una longitud d'ona d'entre 300-360nm, la mateixa que la gran majoria de fàrmacs excepte el blau de metilè. D'aquesta manera l'absorbència llegida dels pellets a 660nm (absorbència blau de metilè) només podia donar valors del que podia haver quedat de fàrmac en les Nps.

Ja que els altres fàrmacs tenien una absorbència coincident amb la de les Nps, es van tractar els pellets amb SDS, un detergent aniònic tensioactiu que degrada els polímers permetent l'alliberació del fàrmac

que hagi pogut quedar. Per fer-ho, s'havia d'afegir al pellet incubat, un volum de SDS i esperats 30' centrifugar, de manera que el sobrenedat obtingut correspondria a la concentració de fàrmac contingut.

Els anàlisis de pellets però, es van descartar ja que amb les dades dels sobrenedant ja es podia estimar el que s'havia encapsulat.

Les desviació estàndard és petita perquè les diferències entre les tres rèpliques és insignificant ja que provablement el pipeteig i el tractament de les mostres és molt reproducible i permet estimar els resultats amb més marge de fiabilitat.

Amb el blau de metilè no es veuen diferències entre els temps i es pot considerar que no s'encapsula, en les *taules 6,7,8* s'observa una encapsulació negativa ja que les concentracions obtingudes són de l'ordre de 1mM, fins i tot lleugerament superiors provablement degut als agregats que pot formar el fàrmac al fer-se insoluble a baixa temperatura. Això és degut a que el blau precipita a pHs superiors a 3 degut a que predominen les formes desprotonades, de manera que es va pensar de baixar el pH a 3 però és tant àcid que seria un inconvenient tenint en compte que volem les solucions a pH fisiològic, *figura 22*. Una altra alternativa era utilitzar PB, que és el buffer sense sals però la condició necessària dels experiments era l'ús del PBS per simular les condicions dels eritròcits en posteriors estudis en cultius.

Les incubacions es van fer a *room temperature* amb la que el fàrmac es mantenia soluble, però si es disminuïa la temperatura deixant la solució a 4°C, aquest precipitava, de manera que tant la temperatura, com el buffer, com el pH influeixen en la seva solubilitat. Totes les centrifugacions eren a 4°C ja que era la temperatura òptima per precipitar les Nps, però no era l'adequada per al fàrmac.

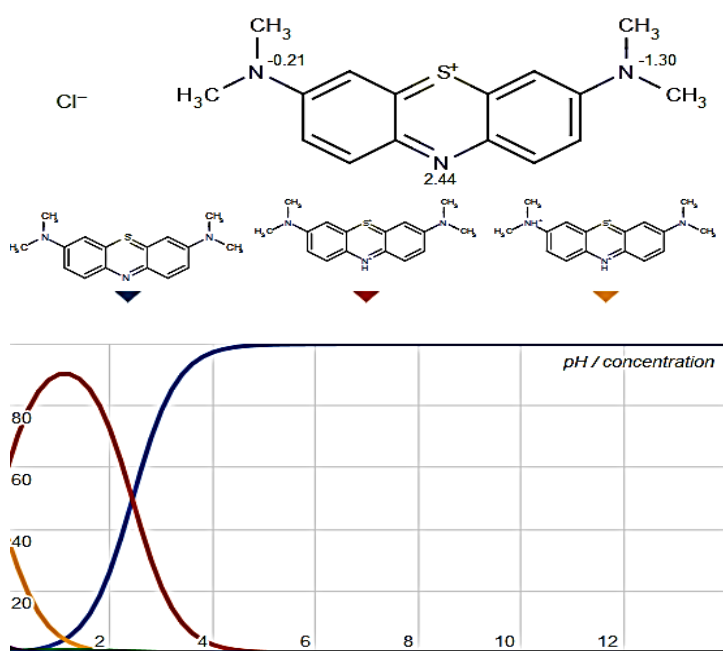


Figura 22. Imatge extreta de *chemicalize.org*, es pot veure que les espècies protonades tenen pHs baixos i al augmentar el pH es desprotonen donant com a forma majoritària la que correspon a la línia blava.

La primaquina, la cloroquina i la quinina tenen comportaments semblants. Van ser preparats segons el protocol i no es van observar insolubilitats. Presenten una concentració en el sobrenedant lleugerament inferior a la que s'observa en el blau. Les dades de la primaquina i cloroquina a les 24 hores no és molt fiable tenint en compte la variabilitat que hi va haver entre rèpliques, de manera que l'encapsulació més alta en la primaquina és als 30' amb un valor de 1,49%, *taula 6* de més avall.

En general, no s'observa encapsulació o bé és tant baixa que no es veu en les gràfiques (sí en les dades numèriques; *taules 6,7,8*). En el cas de la quinina, és el que dóna resultats d'encapsulació d'entre 2-6%, en especial amb els polímers de mida petita i intermitja. No s'observen massa variacions en el temps.

Amb la quinina es van analitzar els pellets tractant amb SDS i al sobrenedant resultant de la centrifugació s'hi va afegir H₂SO₄ 0,5M. En contacte amb aquest àcid la quinina és fluorescent però comparant amb el control negatiu (PBS) i la recta patró s'obtenien valors molt propers al PBS i molt inferiors a les molaritats més altes del fàrmac. Aquesta comprovació també servia de prova alternativa per corroborar els resultats de les gràfiques.

La curcumina preparada a una concentració 1mM i en PBS no solubilitza, de manera que es va baixar a 0,1mM però no és fins a pH 8,6 que la molècula es pot fer soluble ja que el logD és 0 trobant el 50% de les molècules en fase aquosa i l'altre 50% en fase orgànica, *equació 3* i *figura 23*. Aquestes condicions són ideals pels compostos antimalàrics ja que per una banda poden difondre per la bicapa lipídica de la membrana eritrocítica, i per l'altra poden mantenir-se dins el citoplasma aquós. L'artemether per exemple té un LogD alt, cosa que explica la seva tendència tant lipofílica.

$$\text{LogD} = \log_{10} \frac{[\text{molec. en fase orgànica}]}{[\text{molec. en fase aquosa}]}$$

Equació 3.

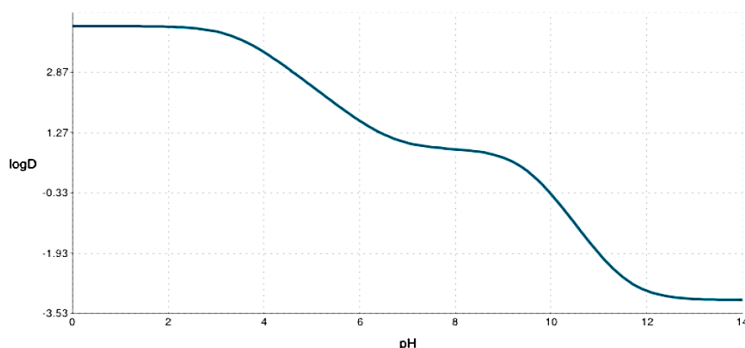
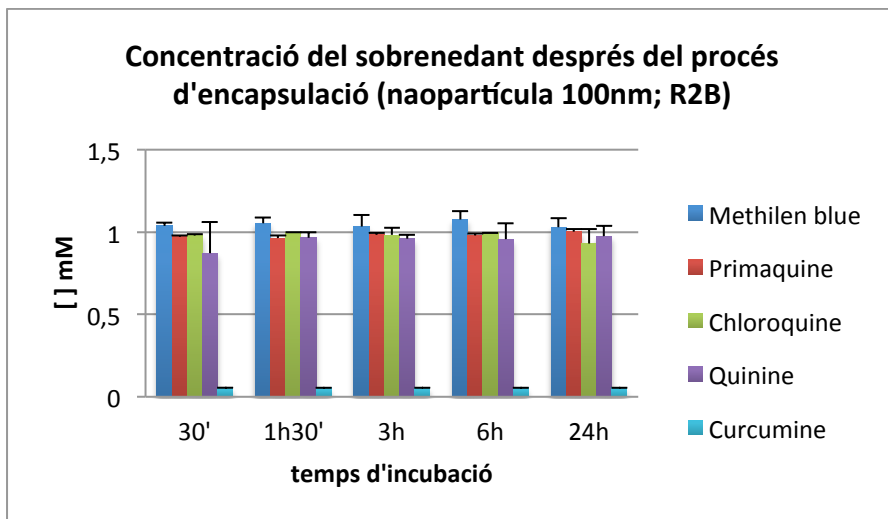
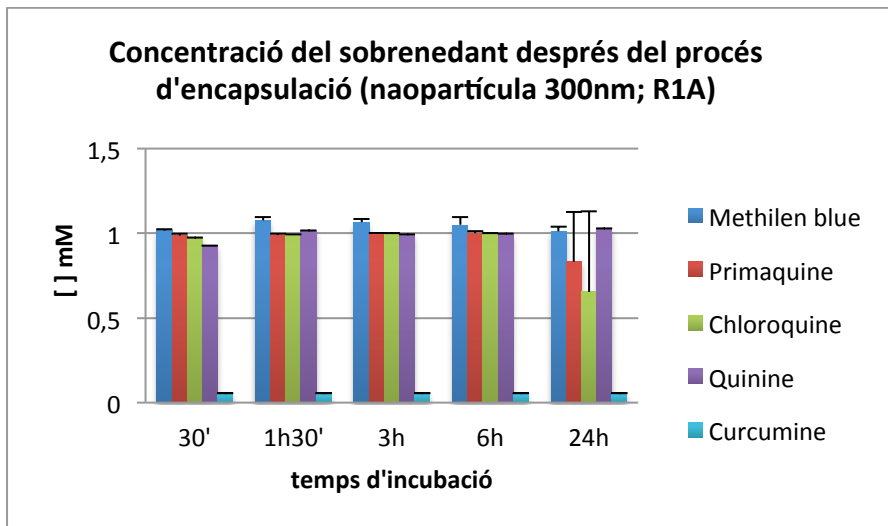
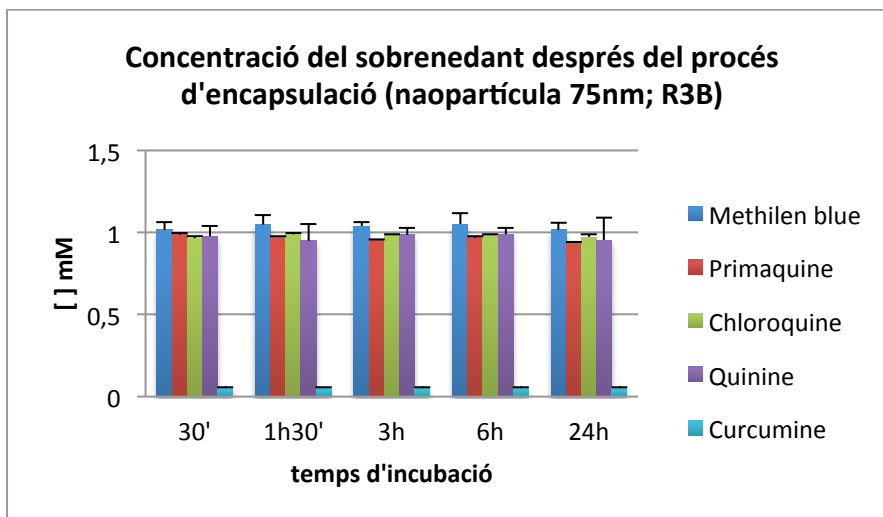


Figura 23.

Tot i canviar la molaritat i el pH, el fàrmac s'acabava fent insoluble passada mitja hora. Es va variar la temperatura, fent proves a 37°C i a RT (*room temperature*). A 37°C el compost es mantenia soluble però

per els experiments no es podia utilitzar sabent que les incubacions eren a RT i les centrifugacions a 4°C. Segons l'article de Chakrabarti R, et al. 2013, la curcumina es dissol en DMSO (Dimethyl sulfoxide) que permet dissoldre compostos polars i no polars, però al haver de canviar el buffer ja era un possible fàrmac a descartar. Els experiments però, es van fer igual a pH 8,6 amb PBS i s'observa una concentració molt baixa en tots els sobrenedants degut a que va precipitar juntament amb les Nps sense encapsular-se, agregant-se i precipitant al fons. Els % d'encapsulació són molt alts, propers al 100%, però són falsos positius. Això es pot comprovar fixant-nos amb les dades del *release*.





R1A	30'	1h30'	3h	6h	24h
% encaps. MB	-1,46	-7,52	-6,64	-4,86	-1,19
% encaps. P	1,49	1,16	-0,17	0,00	16,73
% encaps. CL	2,53	0,88	0,01	0,43	34,65
% encaps. Q	7,29	-1,65	0,63	0,19	-2,87
% encaps. Cu	94,28	94,50	94,44	94,51	94,30

Taula 6.

R2B	30'	1h30'	3h	6h	24h
% encaps. MB	-3,70	-5,35	-3,20	-7,47	-2,89
% encaps. P	2,65	3,64	1,78	2,07	-0,12
% encaps. CL	2,21	0,55	1,82	0,55	6,95
% encaps. Q	12,79	3,43	4,05	4,28	2,52
% encaps. Cu	94,50	94,54	94,53	94,54	94,54

Taula 7.

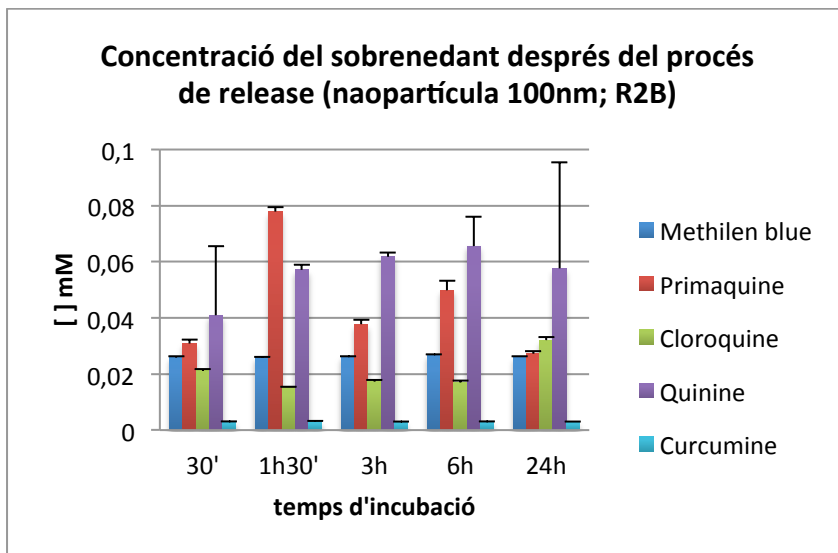
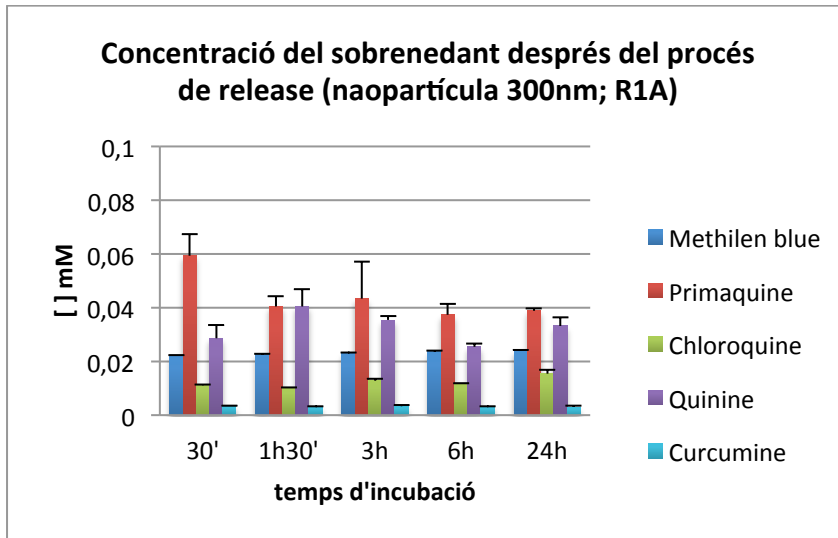
R3B	30'	1h30'	3h	6h	24h
% encaps. MB	-1,54	-4,84	-3,95	-4,97	-1,54
% encaps. P	1,41	2,82	4,68	3,31	5,84
% encaps. CL	3,38	1,25	1,34	1,38	2,74
% encaps. Q	2,26	5,09	1,38	1,04	4,72
% encaps. Cu	94,39	94,51	94,46	94,50	94,45

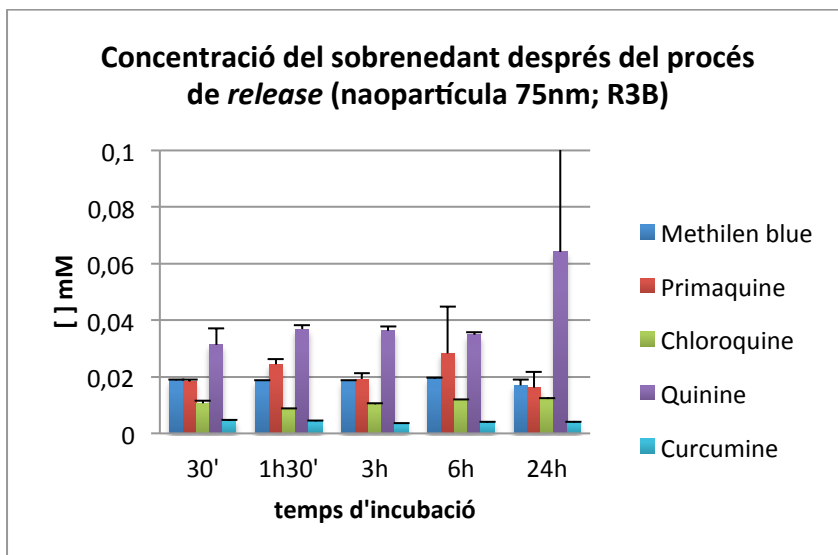
Taula 8.

La primaquina i la quinina són els fàrmacs que donen un *release* més bo i quadra amb els % d'encapsulació, observant com a més alts els d'aquests dos fàrmacs. Es pot determinar que no hi ha variacions en el temps tot i que hagués estat interessant veure un alliberament progressiu entre els 30' i les 3h i després que s'acabés d'alliberar part del que quedés, observant una davallada en les gràfiques.

En la R3B és son hi ha un *release* més baix comparant amb les altres provablement degut a les poques micres de la Np. El més alt correspon a les R2B però les desviacions donen força variabilitat.

El blau i la curcumina donen resultats semblants per la seva naturalesa insoluble. En el cas de la curcumina s'esperaven uns resultats molt baixos com els obtinguts, degut a que el fàrmac precipita amb les Nps i no s'adsorbeix. En general, els resultats del *release* són molt baixos, mostrant una relació lògica amb les dades obtingudes d'encapsulació.



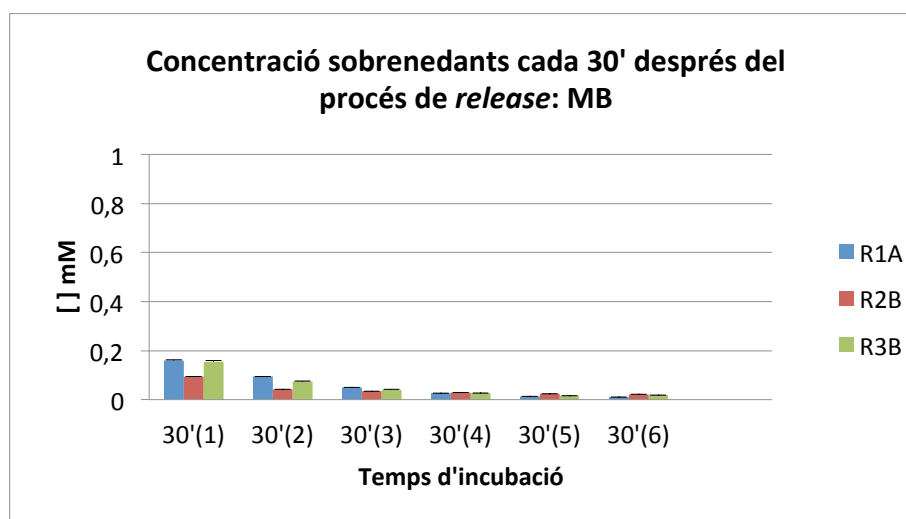


4.3.2 Segon protocol

(Veure annexes)

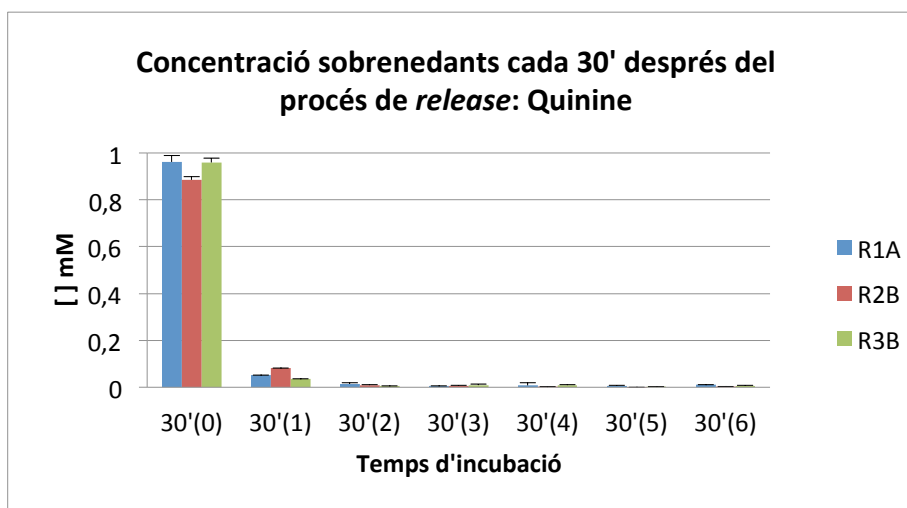
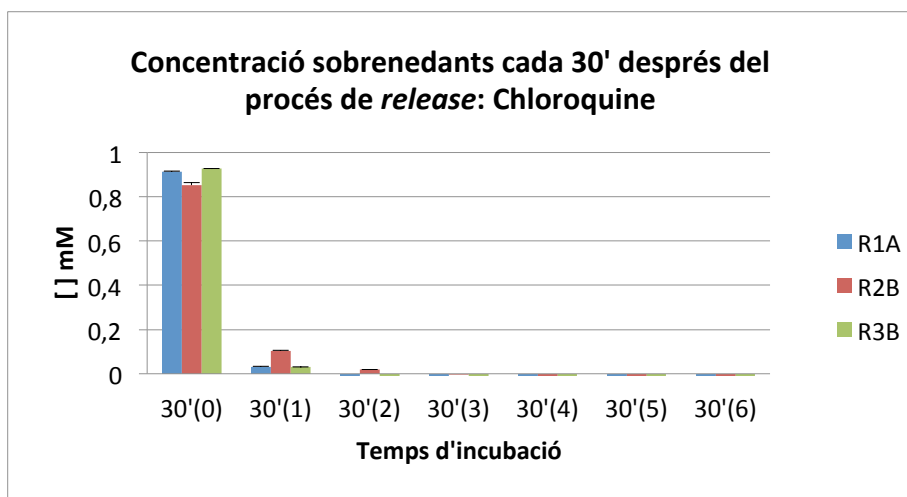
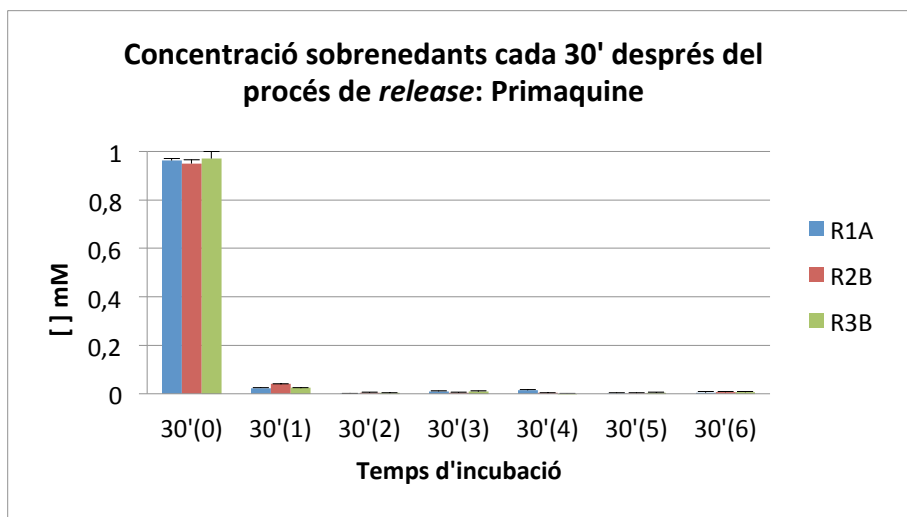
Aquests segons resultats estan obtinguts a partir d'un protocol que contempla un volum de fàrmac igual al volum de Nps, augmentant així el volum de Nps respecte el protocol anterior. Les tres Nps tenen un comportament força similar i s'ha treballat d'una manera reproducible veient les desviacions.

En el blau no hi ha resultat de sob 30'(0) corresponent al sobrenedant de la primera encapsulació. A mesura que es van fent períodes d'alliberament de fàrmac cada 30' hi ha una part de blau que s'allibera progressivament. És possible que el fàrmac s'adherís més a les Nps pel fet d'haver-n'hi més, sense entrar-hi i s'anés diluint amb el PBS amb el temps ja que si tenim en compte els experiments del primer protocol donen una de les encapsulacions més baixes.

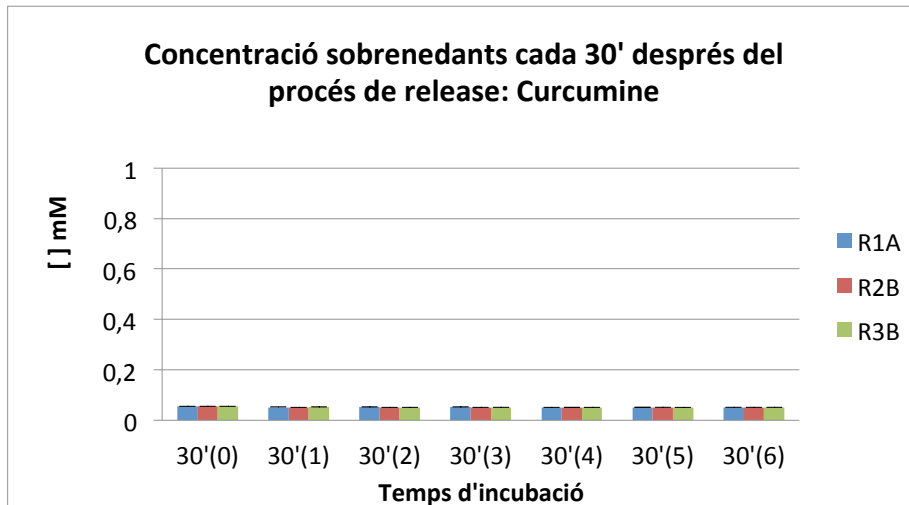


Les gràfiques de la primaquina, la cloroquina i la quinina són molt semblants.

Aquí sí que hi ha el resultat de l'encapsulació que és la fracció que queda per arribar a 1mM, el sob 30' (0). Aquesta fracció representa un % d'encapsulació aproximadament com l'obtingut en els primers experiments. Els sobredants següents són el resultat del *release* gairebé inapreciable degut a la poca encapsulació.



Veient experimentalment el comportament de la curcumina i les dades, aquests compost no és prou bo sota les condicions del protocol, però es va realitzar l'experiment igualment. En la línia de les primeres dades obtingudes la concentració inicial és de 0,055mM. La més alta (mirant les dades numèriques), en relació als següents temps potser degut al fàrmac que podria haver quedat en suspensió.

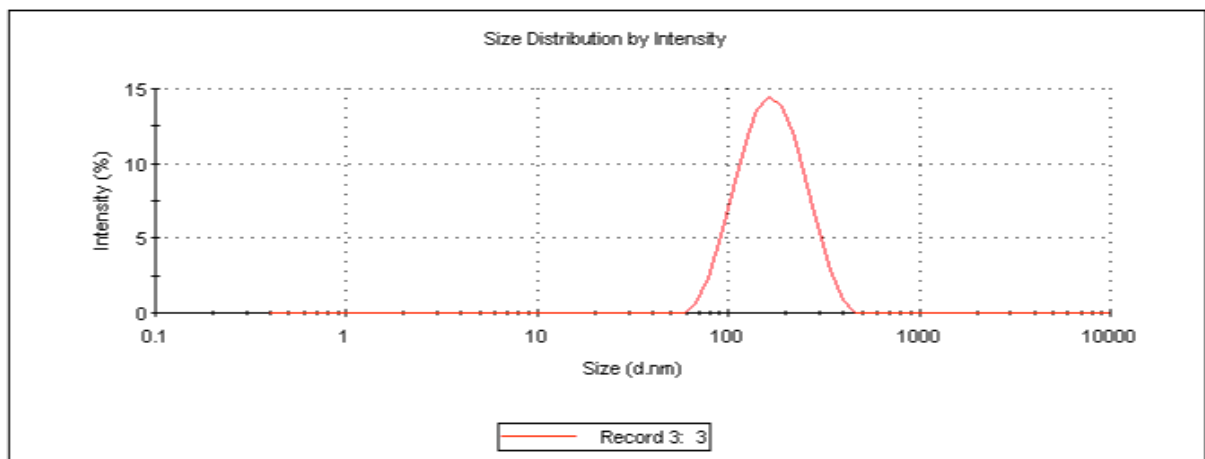


4.4 Caracterització de liposomes

Les gràfiques mostren la mida mitja dels liposomes que es van preparar, per comprovar que la seva mida era aproximadament de 200nm i que la qualitat de la preparació de la mostra era bona.

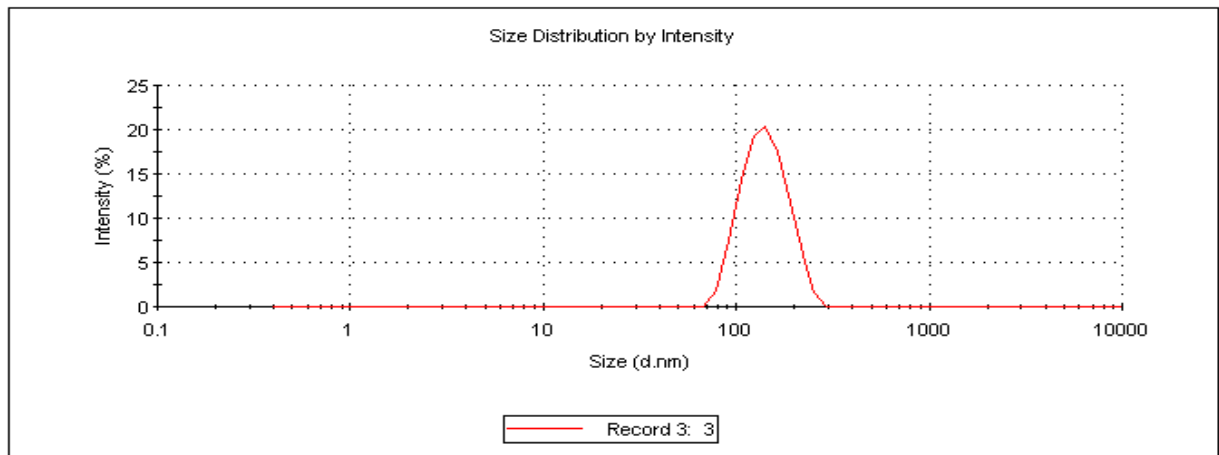
LIPOSOMES NEUTRES: (80 DOPC: 20CHOL)

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 156,0	Peak 1: 178,4	100,0	66,81
Pdl: 0,117	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,936	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



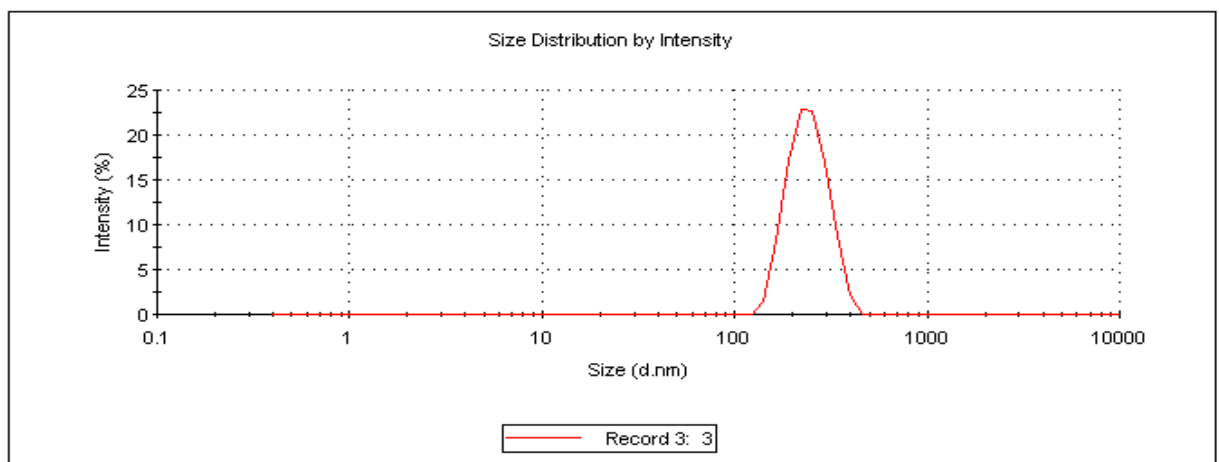
LIPOSOMES POSITIUS: (50 DOPC: 20CHOL: 30 DOTAP)

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 133,8	Peak 1: 144,1	100,0	38,03
Pdl: 0,107	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,951	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



LIPOSOMES NEGATIUS: (50 DOPC: 20 CHOL: 30 DMPG)

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 233,8	Peak 1: 244,4	100,0	55,70
Pdl: 0,018	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,942	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Els negatius ja estaven preparats i només es va comprovar que no estiguessin agregats abans de fer els experiments per formar les *protocells*. Es van preparar liposomes 0 i liposomes +.

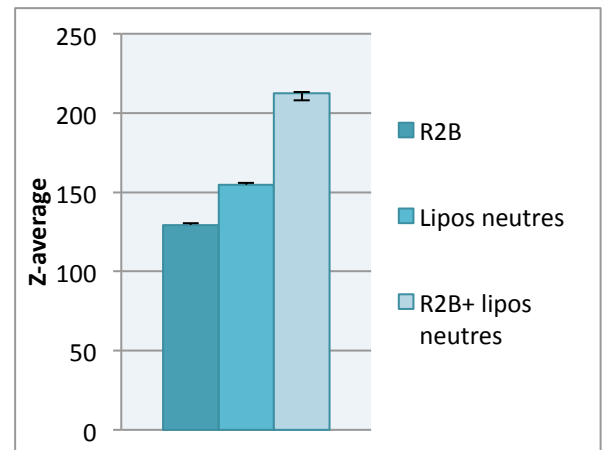
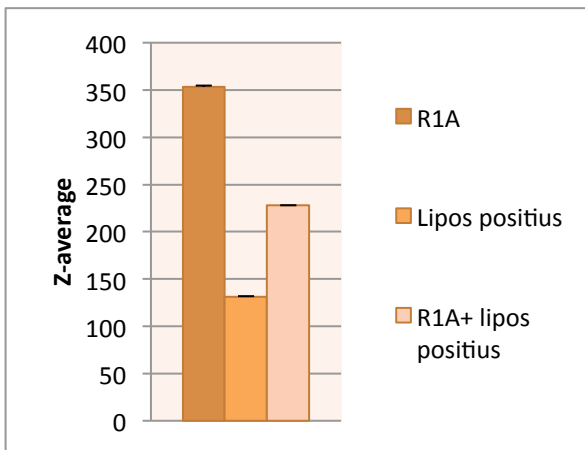
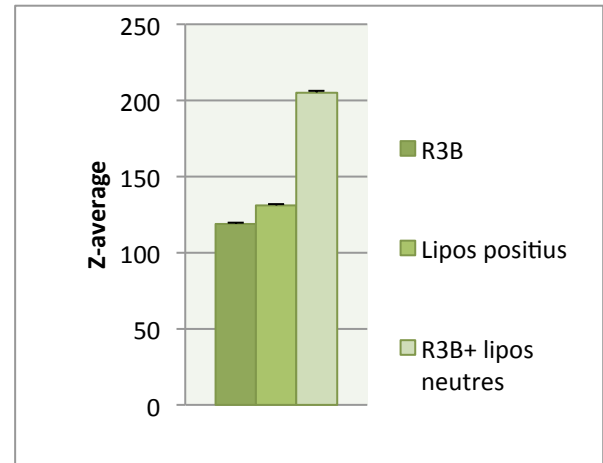
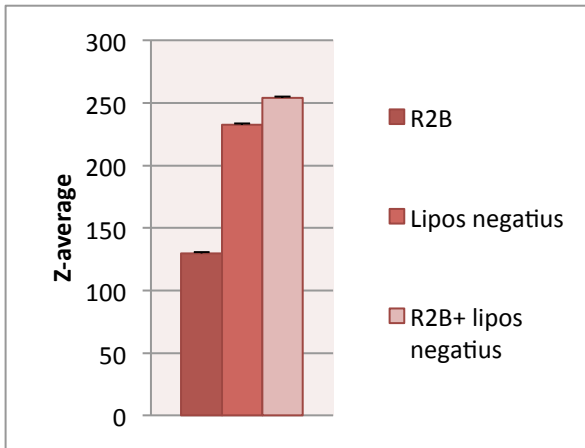
En la *taula 9* es veu que la unió de Np amb liposoma dóna un Z-average més gran que els Lps i Nps soles, cosa que podria indicar una possible formació de *protocells*. Per fer la comprovació final es van analitzar les mostres al Cryo-TEM. Això també s'indica en les gràfiques comparatives (excepció de R1A+liposomes positius).

També s'observa la polidispersitat de la mostra que indica com de diferents en la mida són entre ells.

MOSTRA	Z-average	desvest	PDI	desvest PDI
R3B+ lipos neutres	205,2nm	3,820	0,129nm	0,048
R1A+ lipos positius	228nm	5,55	0,185	0,017
R2B+ lipos negatius	253,9nm	9,627	0,320nm	0,024
R2B+ lipos neutres	212,5nm	4,38	0,239nm	0,029
R3B+ lipos positius	206,1nm	0,208	0,207nm	0,057
R1A	353,6nm	3,907	0,202nm	0,04
R2B	129,5nm	0,8505	0,084nm	0,014
R3B	118,8nm	2,139	0,212nm	0,056
Lipos positius	130,9nm	2,851	0,143nm	0,046
Lipos negatius	232,3nm	2,485	0,067nm	0,044
Lipos neutres	154,8nm	1,069	0,118nm	0,020

Taula 9.

GRÀFIQUES COMPARATIVES



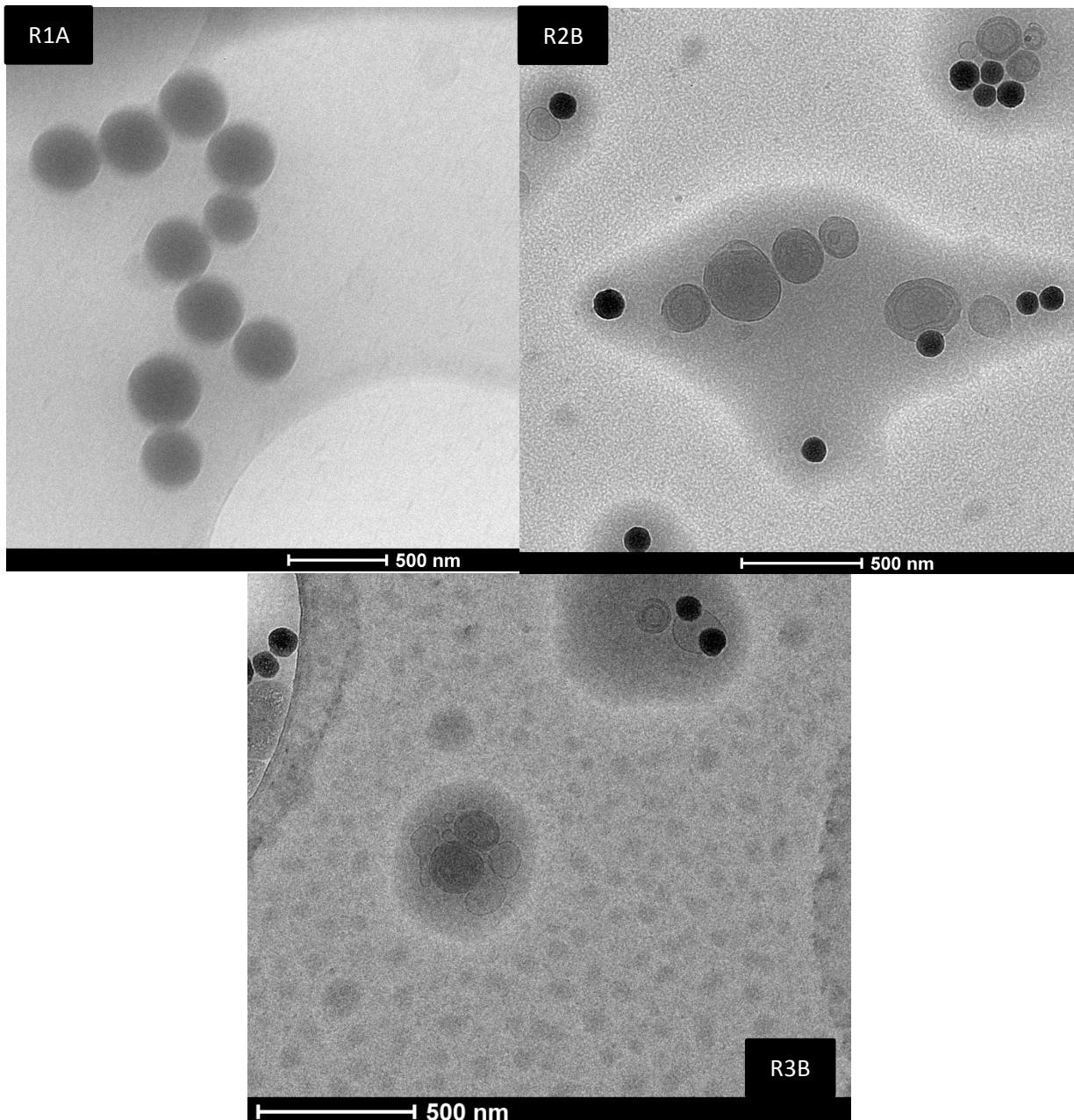
4.5 Cryo-TEM per la formació de *protocells*

(Veure annexes)

4.5.1 Nps&lipos0

Les imatges estan preses totes amb el mateix enfoc cosa que dificulta la visualització de la possible formació de *protocells*. Es mostren els liposomes i les nanopartícules per separat excepte en la R3B on dues nanopartícules se superposen a un liposoma o bé estan mig fusionats. La R1A és poc nítida per problemes d'ajust en el microscopi electrònic.

Després d'aquests resultats es va decidir guardar les imatges a més augments dels següents experiments que es van realitzar.



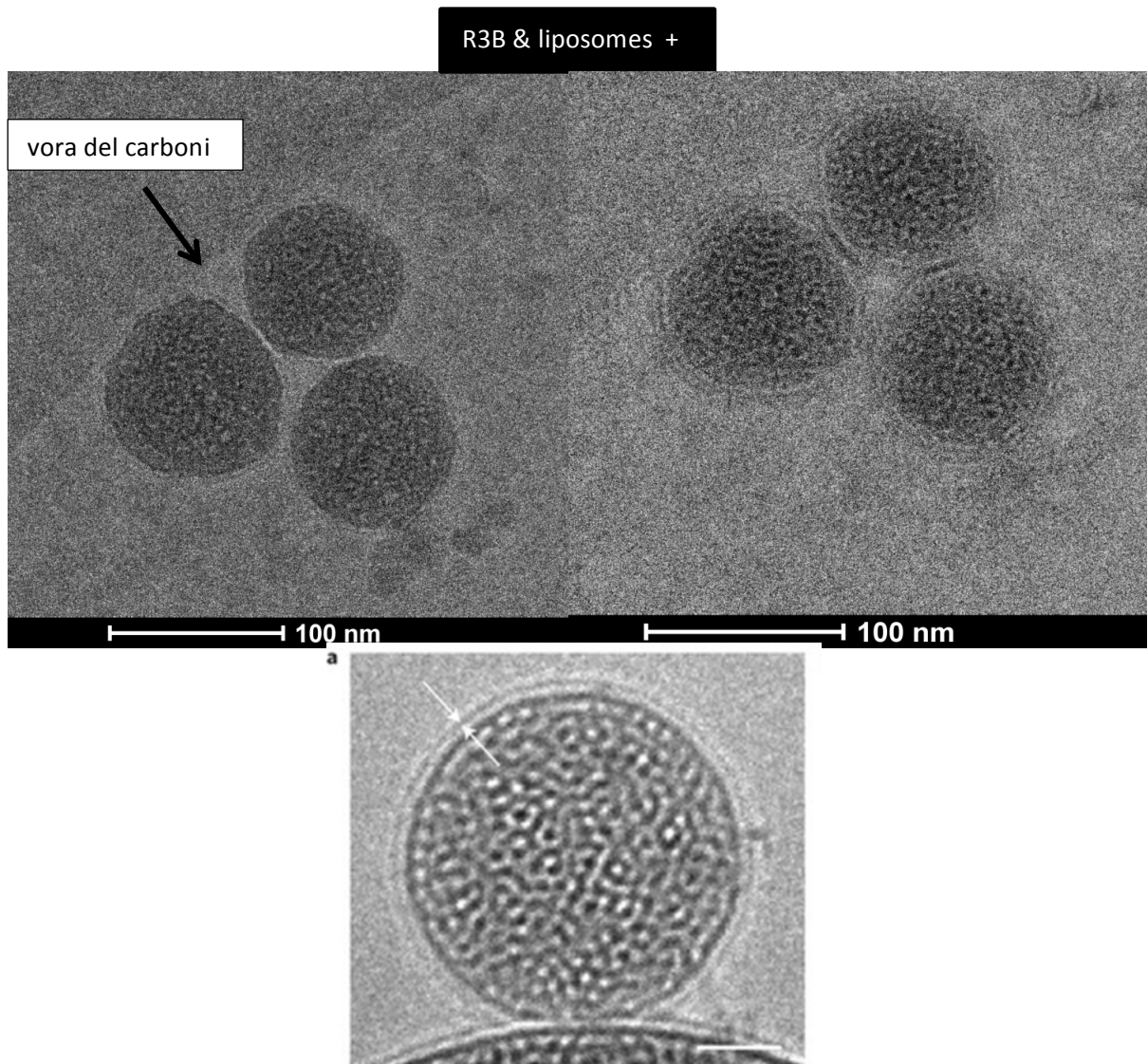
4.5.2 Nps&lipos+/-/0

Els punts que es veuen en les Nps són deguts a que la mostra es crema per el feix d'electrons si s'enfoca molta estona en aquella zona.

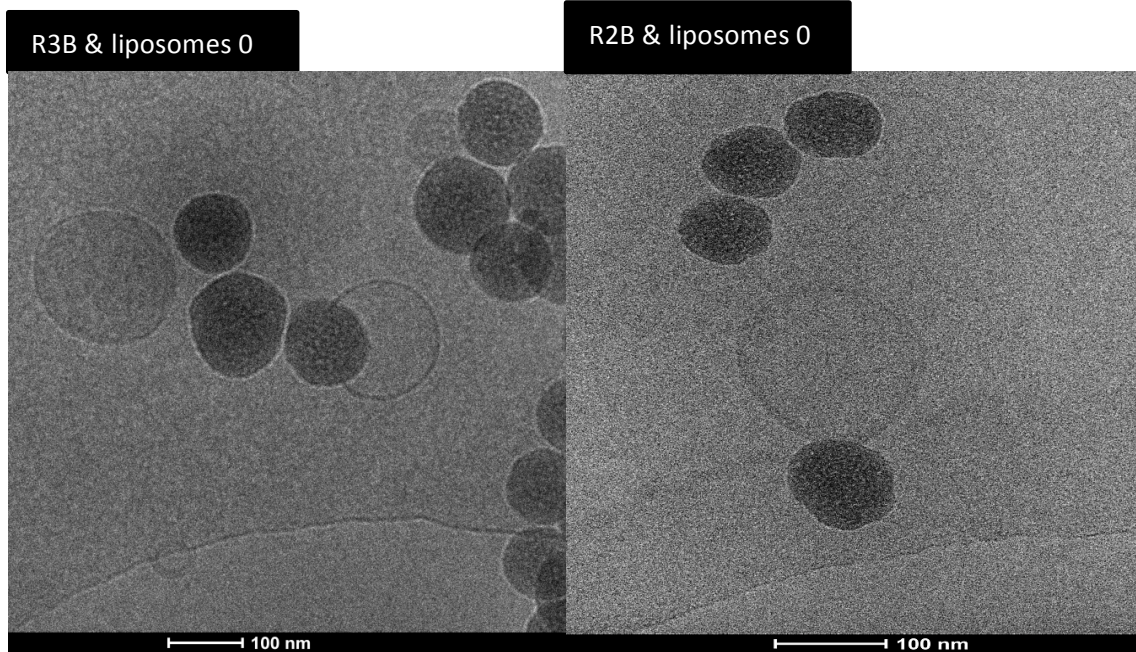
Movent el *defocus* es podia enfocar més al liposoma o bé la Np. Al enfocar més el liposoma, es perdia la refringència de la Np i es veia menys nítida, i si s'enfocava més la Np sortia un halus al voltant i el liposoma deixava de veure's, de manera que s'havia d'establir un equilibri en què es poguessin veure les dues estructures.

A 80.000X, són uns augments adequats per veure amb claredat la possible fusió. Depèn de com s'enfoqui es veu refringència de les Nps perquè són esferes però si comparem amb la vora del carboni la refringència és menor que amb la refringència de les Nps i l'alçada és la mateixa.

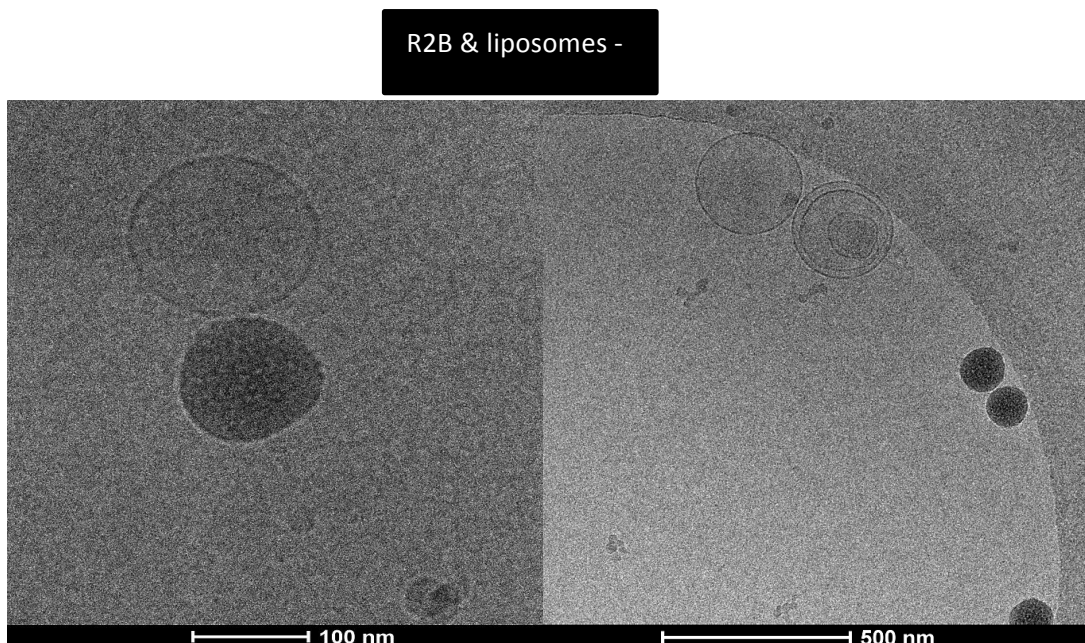
Això és un indicatiu que podria demostrar que s'ha format una *protocell*. A sota dels resultats, hi ha una imatge extreta de l'article Ashley et al. 2011 que va impulsar a realitzar aquest treball, s'observa una membrana al voltant de la Np, que mostra la formació d'una protocell, talment com es veu en els resultats de R3B i liposomes positius.



Es van combinar les Nps R2B i R3B amb liposomes neutres i es van veure les imatges a més augments per acabar de comprovar que no es veia fusió com es sospitava en la primera visualització per Cryo-TEM. No s'observa membrana liposomal al voltant de la Np.



En la primera imatge hi ha el liposoma a prop de la Np R2B però a aquesta no se li observa membrana al voltant. Al costat, els liposomes s'agregaven molt (feia temps que estaven preparats) i a conseqüència d'això alguns es veien més grans de 200nm.



La mostra R1A & liposomes + no es va observar perquè es va fer malbé al vitrificar-la. Tot i això, és la menys important tenint en compte que el Z-average dels liposomes era de 200nm (mida aproximada) i aquestes Nps són de 300nm (mida aproximada).

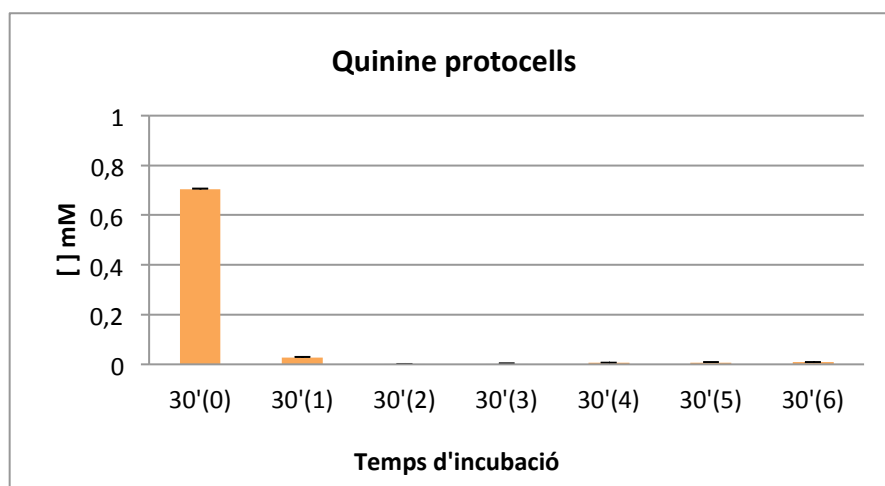
4.6 Resultats per espectrofotometria de la formació de protocells amb fàrmac

(Veure annexes)

Veient el comportament similar de la primaquina, la cloroquina i la quinina. Es va escollir la quinina per formar les protocells amb fàrmac, essent un antimalàric amb el que abans no s'hi havia treballat amb el grup d'investigació i també perquè és un dels que encapsula un % baix però més gran que els altres fàrmacs.

Es va decidir escollir també la R3B perquè era la que presentava millors resultats per Cryo-TEM.

El primer sobrenedant dóna una concentració de 0,7mM de manera que el 0,3mM restant podria ser que quedés encapsulat, estimant un 30% d'encapsulació.



Els experiments amb cultius de *P. falciparum* (GIAs) no es van fer perquè els resultats de tots els experiments amb Nps de SiO₂ no demostraven l'encapsulació de fàrmac esperada i prou significativa com per esperar un possible efecte inhibitori *in vivo*. Tot i això, es va buscar informació en la bibliografia i es va dissenyar un possible protocol per poder aplicar les protocells de quinina en un futur experiment.

En l'article de Mariano G. Zalis et al., 1998 es fan assajos d'inhibició amb pRBCs a diferent concentració de fàrmacs, un d'ells és la quinina. *Figura 24*

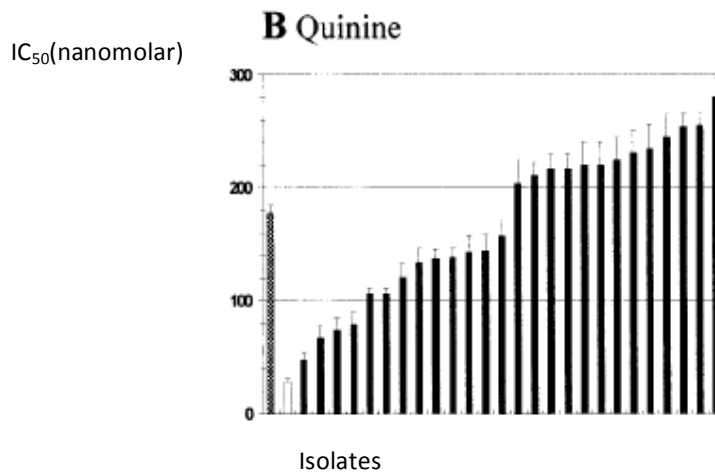


Figura 24. Extreta de l'article Mariano G. Zalis. 1998. En la gràfica s'observa la inhibició a diferents concentracions de fàrmac.

Si la concentració encapsulada és de 0,3mM i la IC₅₀ (*half maximal inhibitory concentration*) de la quinina és de 280nM i en el cultiu es dilueix 100 vegades, s'ha de preparar la mostra 100 vegades concentrada.
 $280\text{nM} \times 100 = 28.000\text{nM}$

Aleshores, decideixo la concentració de la quinina de partida. Si parteixo d'una concentració de 0,1mM, esperaré una encapsulació de 0,03mM=30.000nM. Aquesta serà la concentració que hi haurà dins les Nps incubades amb una concentració de partida de 0,1mM.

Si preparo les mostres a aquesta concentració, sabent que al cultiu es dilueix 100 vegades, llavors quedarà: $30.000\text{nM}/100=300\text{nM}$ similar a la IC₅₀ de la quinina =280nM.

Per construir les *protocells* amb una molaritat de fàrmac de 0,3mM dins les Nps de SiO₂, serà suficient per inhibir el creixement dels pRBCs.

4.7 Imatges per microscopia de fluorescència *Anopheles Atroparvus*

Important consultar taula dels annexes: calendari

Les imatges es van prendre el dia 20/11/13 (veure annexes) dos dies després d'haver estat alimentats amb ISA1-FITC.

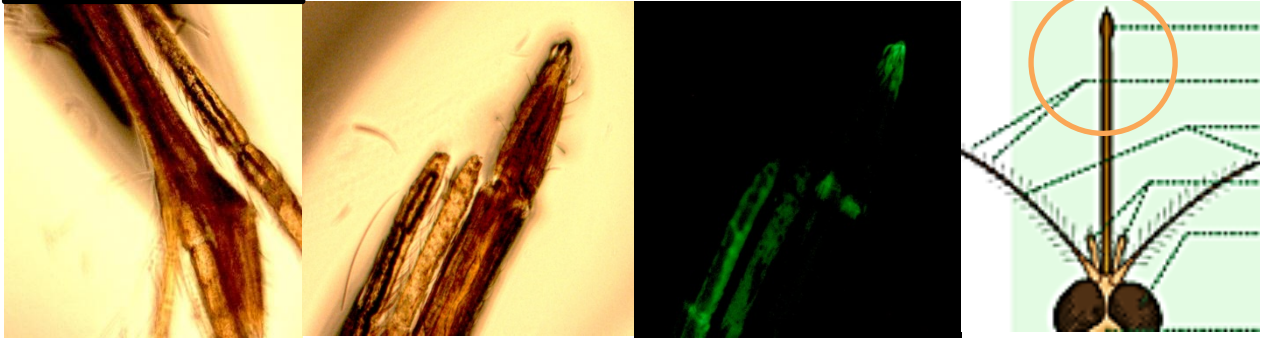
Només es veu detecció de FITC en zones per on circula l'hemolimfa que és un fluid equivalent a la sang d'alguns invertebrats com insectes, artròpodes i mol·luscs, per això en l'antena no n'hi ha, perquè és un òrgan sensitiu de la vibració, el tacte i l'olfacte.

La probòscide és per on s'alimenten i s'observa fluorescència en petites zones.

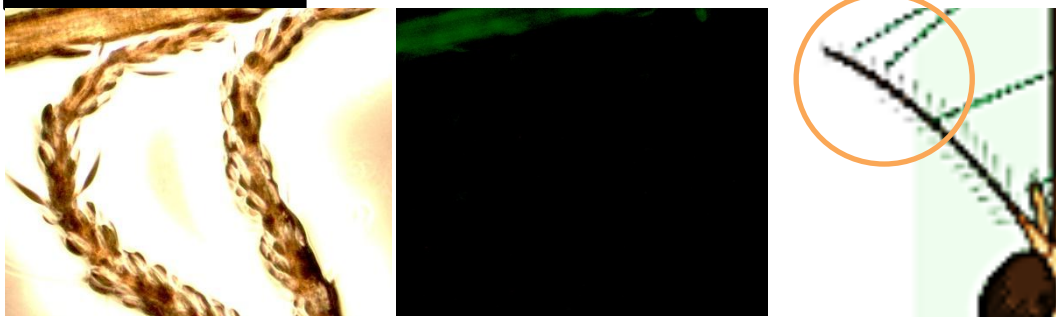
En el tòrax hi ha molta detecció perquè és una zona interna amb molts conductes com l'estómac, l'intestí i els tubs de malpighi.

En l'abdomen, el cercus i la pota també se n'observa, i en l'ala només en la vena costa longitudinal que és la que provablement porti més fluid limfàtic.

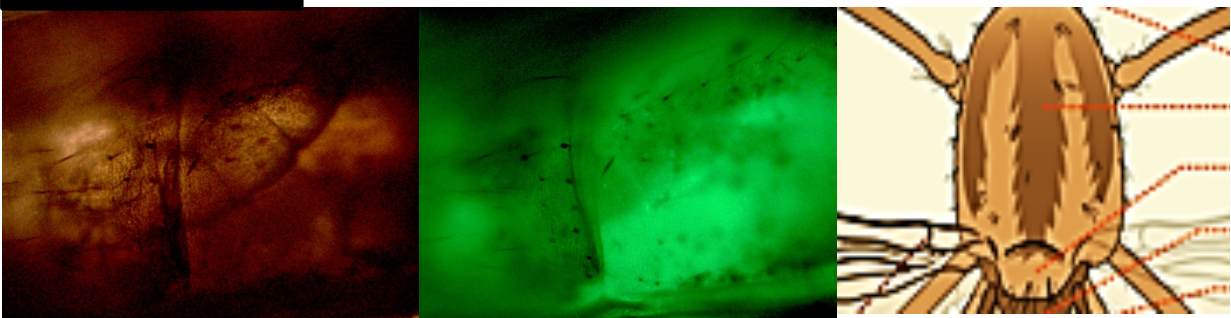
PROBÒSCIDE



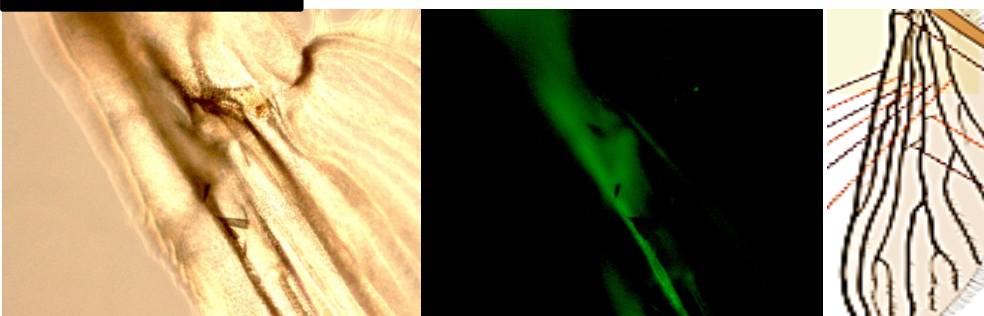
ANTENA



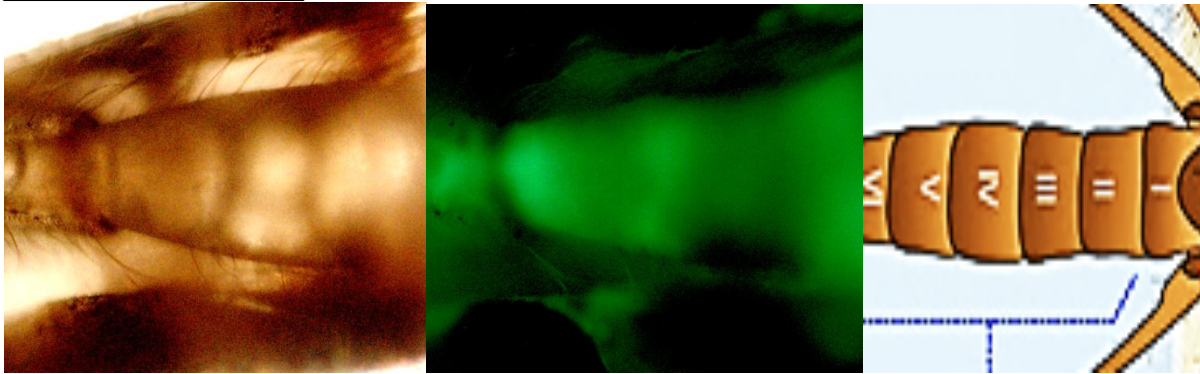
TÒRAX



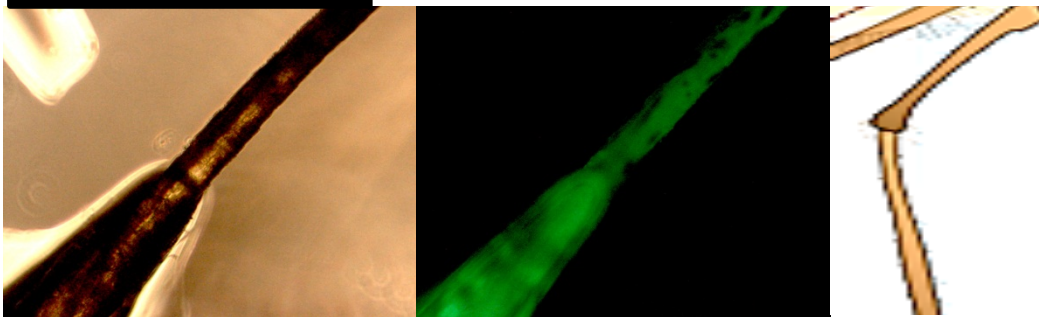
ALA



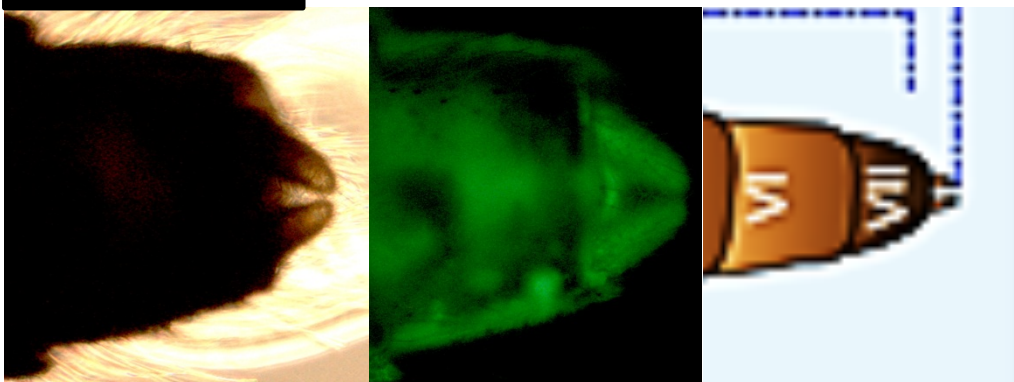
ABDOMEN



EXTREMITAT POSTERIOR
(hind leg)



CERCUS



4.8 Imatges per microscopia confocal *Anopheles Atroparvus*

L'interès d'aquests experiments rau en determinar a on va el polímer antimalàric i quant de temps s'hi pot quedar. Per estudiar-ho és important tenir una idea de les parts anatòmiques de l'insecte, *figura 25* i on hi ha més i menys detecció del polímer.

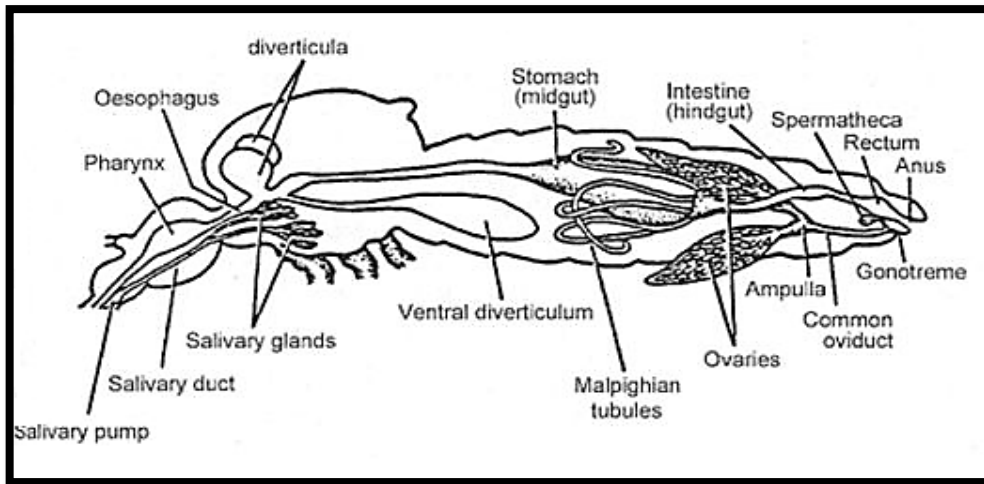
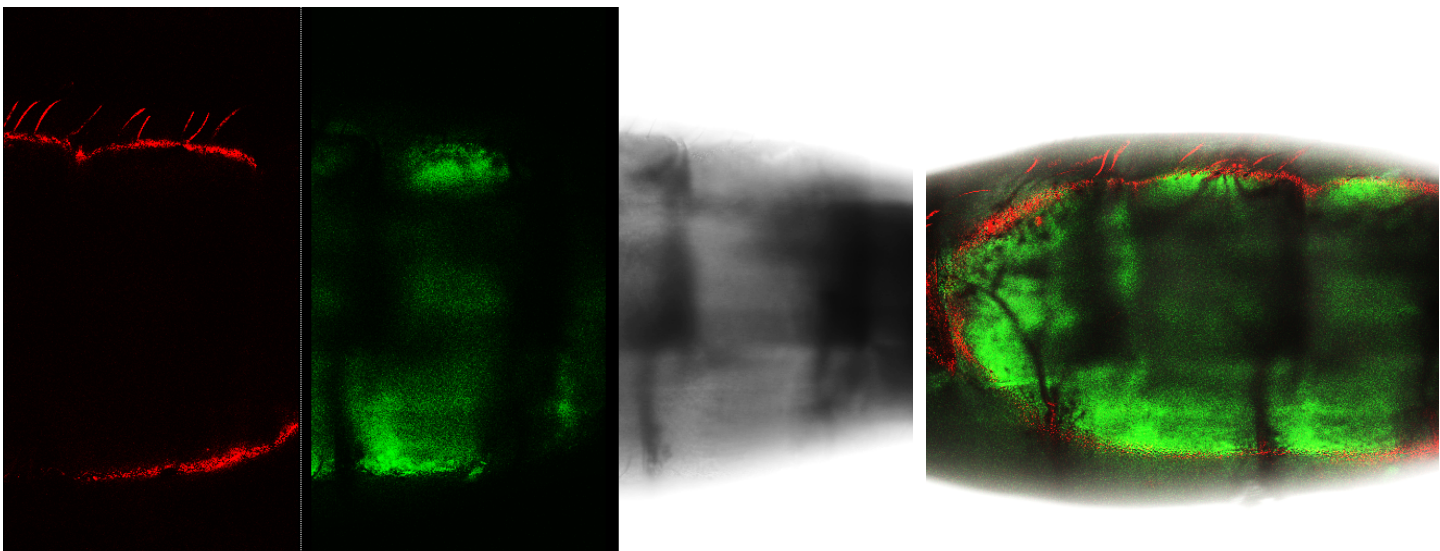
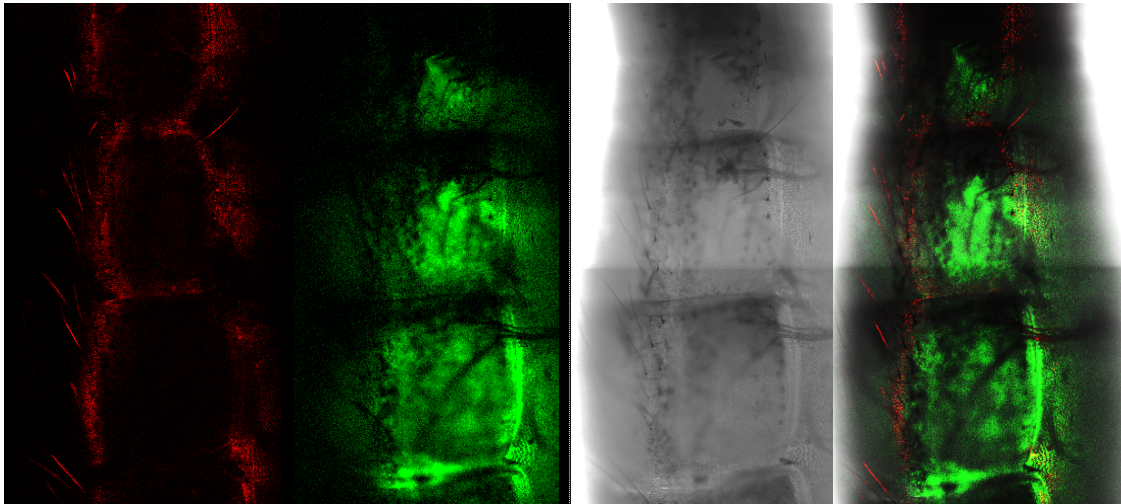


Figura 25.

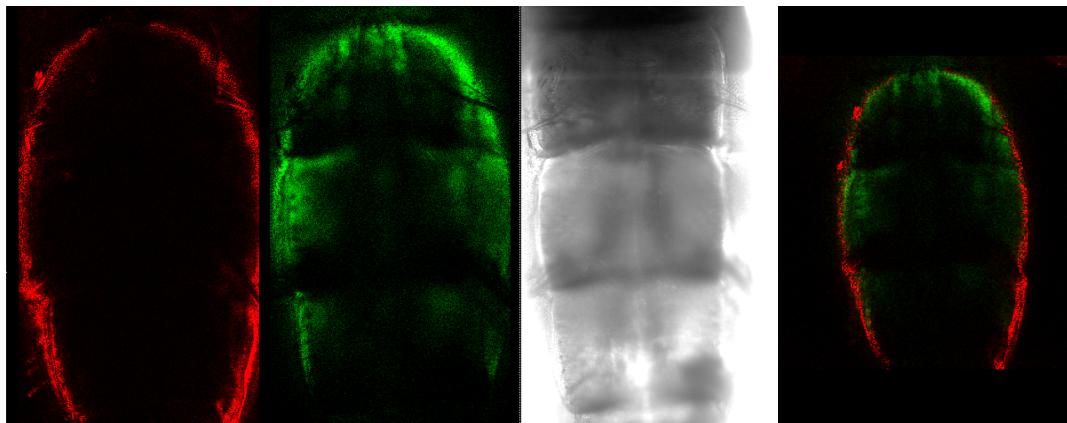
Els primers estudis estan fets després d'unes hores d'alimentar *Anopheles* amb FITC i ISA1-FITC. Les imatges preses són de la part superior i inferior de l'abdomen ja que era on es detectava més fluorescència degut a les poques hores que havien passat post-ingesta (el FITC encara es trobava en la part intestinal). En ambdues zones la detecció era interna, això es va comprovar amb la reflexió que és la senyal vermella. Quan la reflexió i fluorescència no se superposen es podia suggerir una entrada del FITC i ISA1-FITC per el fluid intern.

Mosquits amb FITC (control negatiu)





Mosquit ISA1-FITC



Després de la visualització pel microscopi confocal es va seguir amb el calendari tal i com indica als annexos i quan ja s'havien format els mosquits adults se'ls va alimentar amb ISA1-FITC el dia 12/12/13 però no va ser fins al dia següent que van menjar. A partir d'aquest dia es deixen en dejuni (només se'ls dóna aigua) fins a la observació del dia 16/12/13.

Dia 1: 16/12/13 (2 dies post-ingesta)

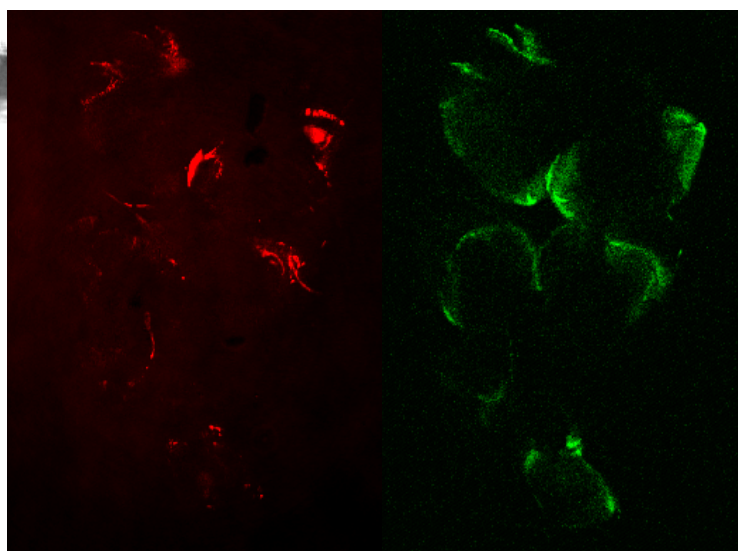
La part del tòrax amb 4 estructures arrodonides, zona on estan les glàndules salivals. La fluorescència podria ser interna perquè no se superposa amb el senyal de reflexió.

En l'abdomen hi ha una mica de fluorescència en la part inferior però aquí falta la imatge de reflexió, de manera que no es pot dir amb massa seguretat si és interna.

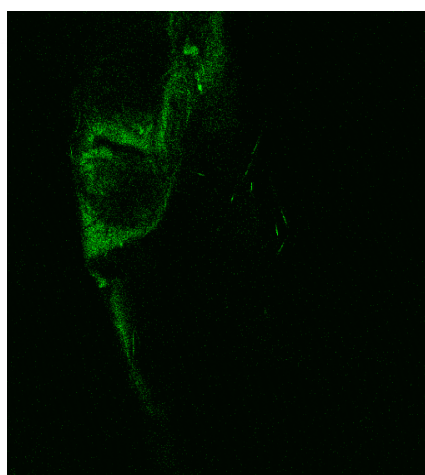
Es va administrar la meitat de la dosi per aquests experiment.

Al alimentar-los amb el control positiu (polímer ISA1 per determinar si era o no innocu per l'insecte), es va veure que no vivien tants dies, potser per el polímer o potser també pel fet de trobar-se en unes condicions d'humitat i temperatura no tant propícies. En qualsevol cas, es va decidir administrar la meitat de la dosi; 0,125mg/ml.

TÒRAX



ABDOMEN

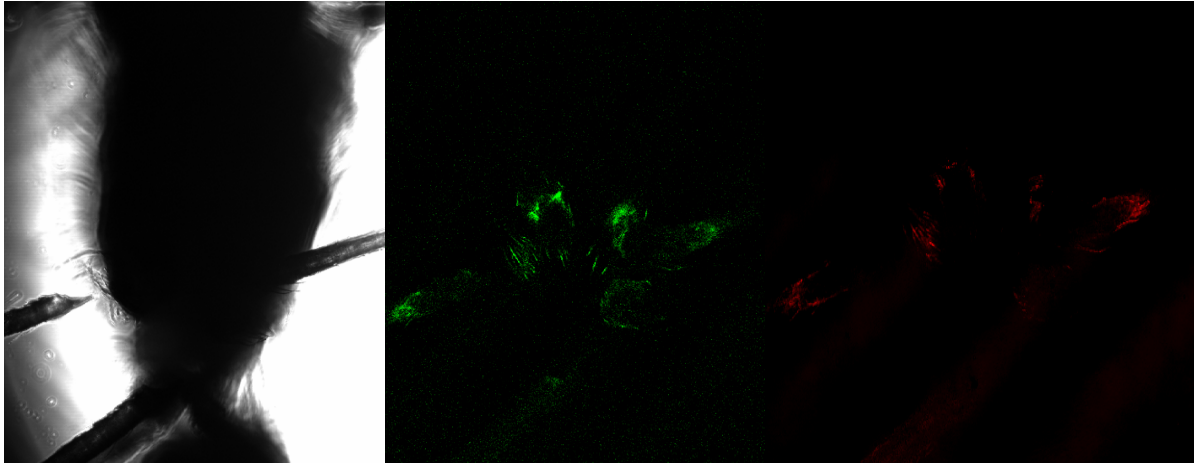


Dia 2: 18/12/13 (4 dies post-ingesta)

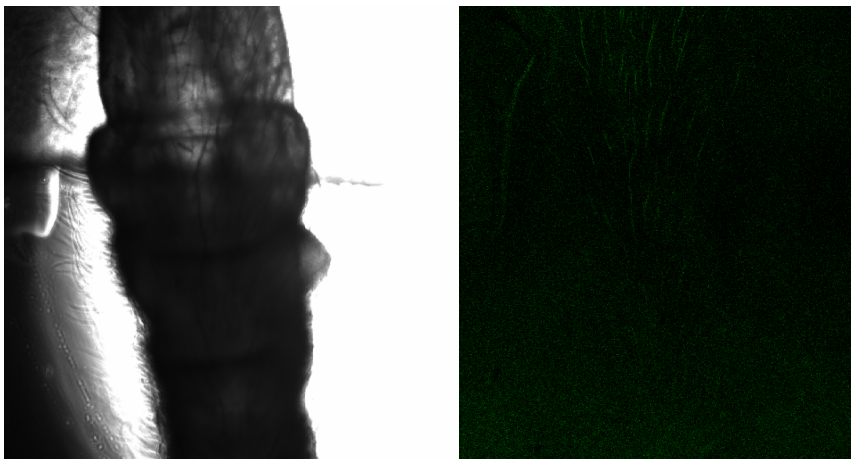
Com abans, hi ha una zona de 4 estructures però no és tant clara com en el dia 1 i no es veu que tinguin la mateixa disposició, potser per la manera de fer la preparació.

En l'abdomen no hi ha fluorescència.

TÒRAX



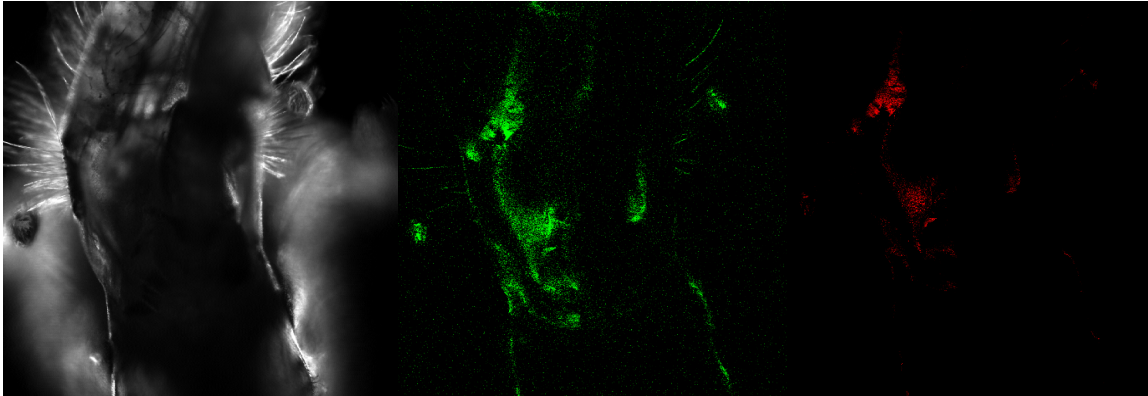
ABDOMEN



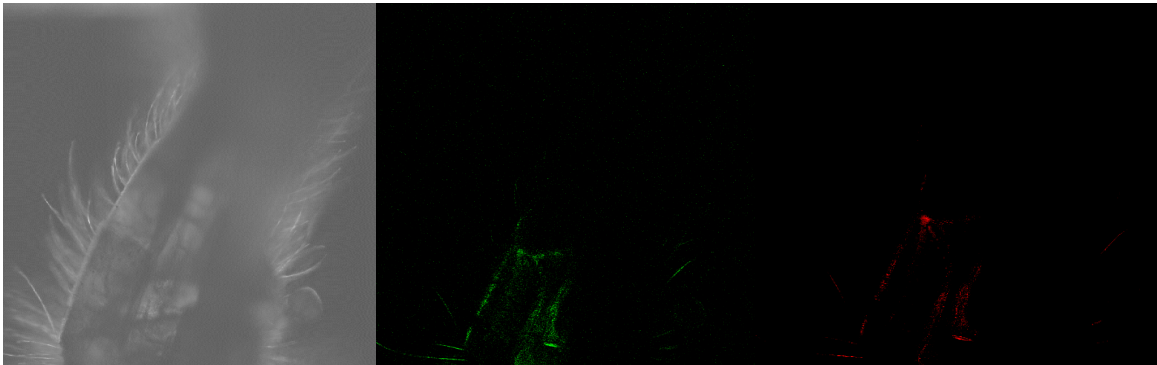
Dia 3: 20/12/13 (6 dies post-ingesta)

Veient les imatges no es pot assumir que hi hagi fluorescència en cap zona del cos de l'insecte excepte una part al tòrax. A mesura que passa el temps de post-ingesta del polímer, aquest va desapareixent progressivament de l'organisme.

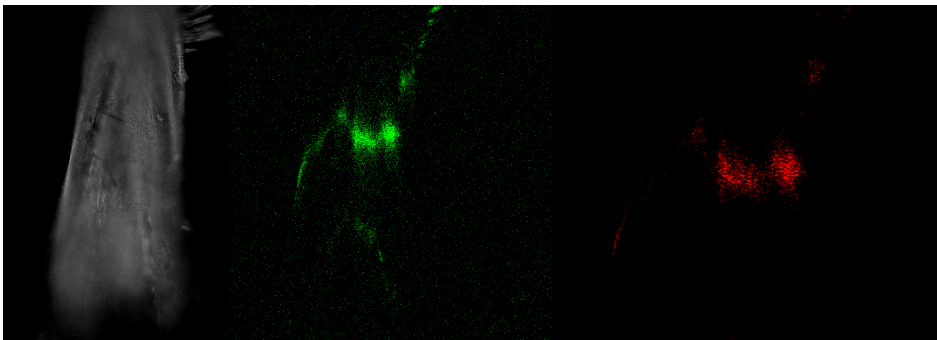
TÒRAX



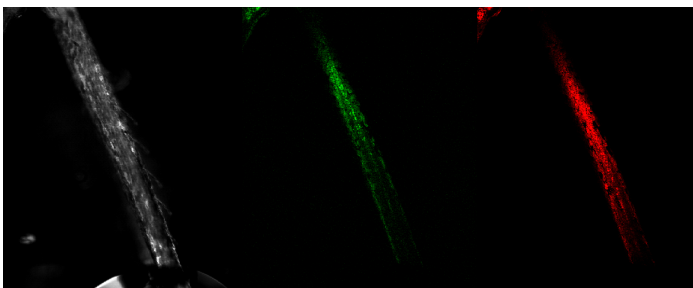
ABDOMEN



ALA



POTA



5. CONCLUSIONS

Nanovectors:

1. El procés d'encapsulació de fàrmac té poca eficiència. S'haurien de definir molt bé les propietats fisicoquímiques de les nanopartícules així com les del fàrmac per determinar a priori el millor candidat a ser encapsulat.
2. De la formació de *protocells* n'hi ha indicis emprant liposomes amb un contingut lipídic 50 DOPC: 20 CHOL: 30 DOTAP (amb càrrega positiva) i una mida de nanopartícula d'aproximadament 75nm. Tot i això, es podria proposar un mètode alternatiu variant el contingut lipídic i les concentracions lípid: sílice.

Anopheles i polímer fluorescent antimalàric:

3. Les zones que donen més detecció a les dues hores de la ingesta són el tòrax i l'abdomen perquè ISA1-FITC va a l'estómac i després a l'intestí. Més tard el polímer es distribueix per l'organisme difonent per l'hemolimfa i només aquells teixits que en continguin presenten fluorescència.
4. A mesura que passa el temps (2, 4 i 6 dies) després de la ingesta del polímer ISA1-FITC, aquest va desapareixent de l'organisme de l'insecte, essent quatre petites regions del tòrax les que encara donen detecció, trobant-se en la regió on es situarien les glàndules salivals on *Anopheles* guarda els esporozoïts. En aquesta zona és on roman més temps el polímer, essent un bon indicatiu per posterior estudis focalitzats a eliminar el paràsit a l'interior del mosquit.

6. Bibliografia

Adreces d'internet:

Fàrmacs i liposomes:

<http://www.drugbank.ca/drugs/>

www.sigmaaldrich.com

www.chemicalize.org

<http://avantilipids.com/>

Situació mundial malària:

<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>

<http://www.map.ox.ac.uk/explore/mosquito-malaria-vectors/>

WHO; World Malaria Report 2013

Articles científics:

1. Carlee E. Ashley, et al. "The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers". *Nat Mater*, 10 (2011): 389-397.
2. H. M. Shapiro, et al. "Cytometry in Malaria—A Practical Replacement for Microscopy?". *Current Protocols in Cytometry*, 65 (2013): 1-23.
3. L.H Bannister, et al. "A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages". *Parasitology Today*, 10 (2000): 427-433.
4. Urbán P., Estelrich J., Cortés A., Busquets X. F. "A nanovector with complete discrimination for targeted delivery to *Plasmodium falciparum*-infected versus non-infected red blood cells *in vitro*". *Journal of Controlled Release*, 151 (2011): 202-211.
5. Zhiqin C., Yuanjie H., Qian T., Quan Li, "Cellular uptake, evolution, and excretion of silica nanoparticles in human cells". *Nanoscale*, 3 (2011): 3291-3299.
6. Chakrabarti R. et al. "Cellular effects of curcumin on *Plasmodium falciparum* include disruption of microtubules". *PLoS ONE*, 8 (2013): 1-13.
7. J. Liu et al. "Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery Vehicles". *Journal of American Chemistry Society*, 131 (2009): 1354-1355.

8. Nguyen T.K.Thanh, Luke A.W.Green, "Functionalization of nanoparticles for biomedical applications". *Nano Today*, 5 (2010): 213-230.
9. X. F. Busquets, "Heparin-functionalized nanocapsules: enabling targeted delivery of antimalarial drugs". *Future Medical Chemistry*, 5 (2013): 737-739. (Article d'opinió).
10. W.Li, D.Zhao, "Extension of the Stöber Method to Construct Mesoporous SiO₂ and TiO₂ Shells for Uniform Multifunctional Core–Shell Structures". *Advanced Materials*, 25 (2013): 142–149.
11. Stober W. et al. "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range". *Journal of colloid and interface science*, 26 (1968): 62-69.
12. B.S. Zolnik, et al. "Nanoparticles and the immune system". *Endocrinology*, 151 (2010): 458-465.
13. Moneriz, C. et al. "Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia *Plasmodium* infected erythrocytes". *Malaria Journal*, 8 (2009): 1-10.
14. Moneriz, C. et al., "Ensayo Microfluorimétrico basado en el uso de PicoGreen para medir actividad de fármacos antimaláricos". *Journal Of Chromatography*, 12 (2008): 1-10
15. Azar Radfar A. et al. "Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels". *Nature protocols*, 4 (2009): 1899-1915.
16. R. E. Sinden, et al., "The design and interpretation of laboratory assays measuring mosquito transmission of plasmodium. *Trends in Parasitology*", 28 (2012): 457-465.
17. R. Heiner Schirmer et al. "Lest we forget you-methilen blue...". *Neurobiology of aging*, 32 (2010): 1-10.
18. M. G. Zalis et al. "Characterization of *plasmodium falciparum* isolated from the amazon region of brazil: evidence for quinine resistance". *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58 (1998): 630-637.

7. Agraïments

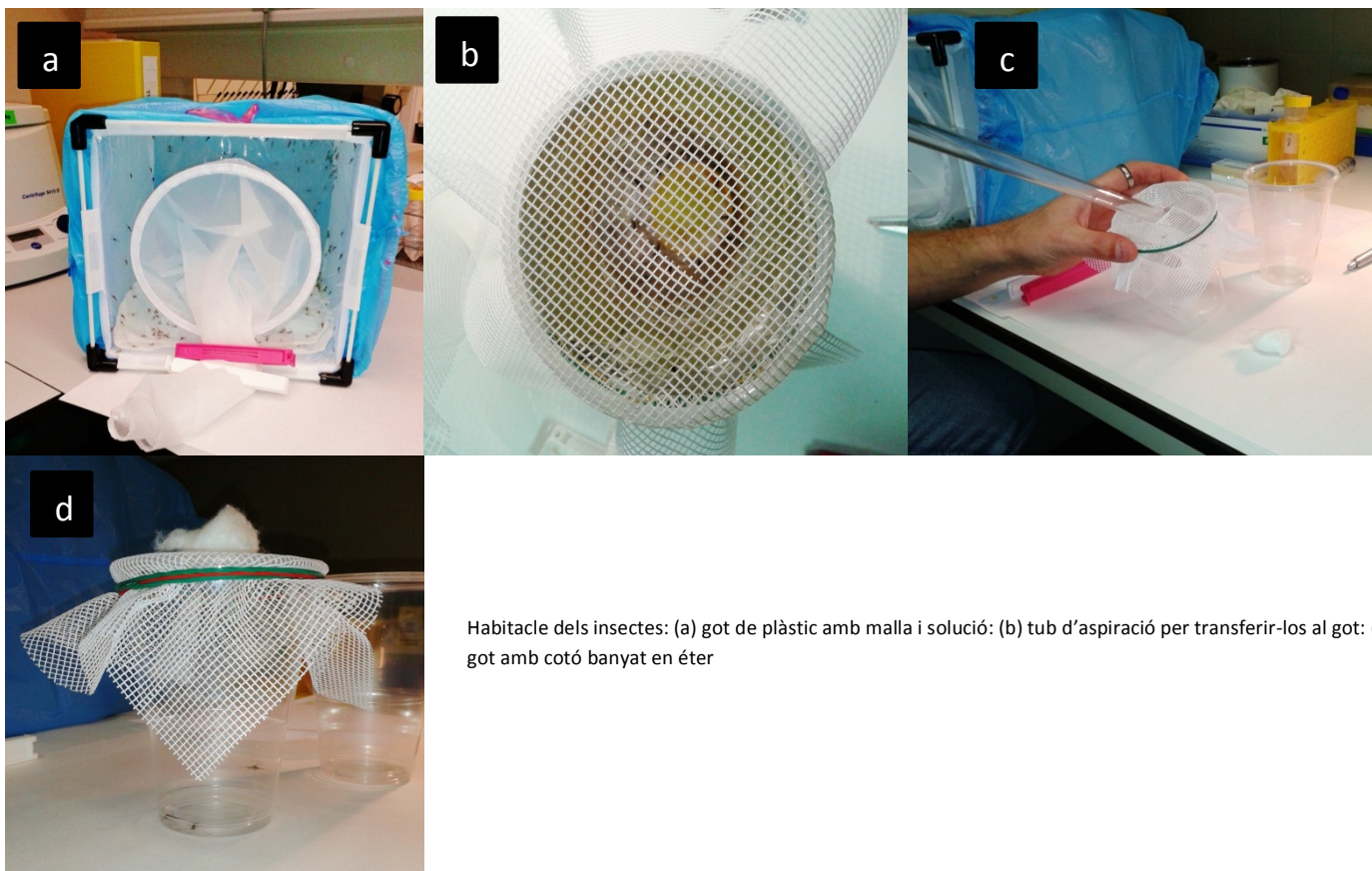
Volia agrair el suport dels meus tutors (Xavier Fernández-Busquets i Josep Bau), dels meus companys de grup (Joana Marques i Ernest Moles), així com la resta de companys de laboratori. També agrair als professionals de la facultat de farmàcia, del Parc Científic i del servei de microscopia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

A tots ells, donada la contribució de cadascun en el meu creixement professional i personal.

8. Annexes

DATA	PROCÉS	OBSERVACIONS
29/10/13	✓ Recol·lecció de mosquits al Delta	---
30/10/13	✓ Alimentació amb sang ✓ Reproducció	---
08/11/13	✓ Obtenció d'ous	Es va obtenir també alguna larva.
10/11/13	✓ Obtenció de larves	De normal triguen 2 dies aprox. a fer-se larves, en les condicions que estaven.
18/11/13 13:00h	✓ Alimentació: ISA1-FITC FITC PU15	---
18/11/13 15:00h	✓ Observació microscopi confocal	---
18/11/13 20:00h	✓ Alimentació: ISA1-FITC FITC	---
20/11/13	✓ Observació microscopi de fluorescència	Mosquits femella del dia 18/11/13, 20:00h.
28/11/13	✓ Obtenció de pupa	
30/11/13	✓ Obtenció adults	De pupa a adult triguen 2 dies aprox.
30/11/13-07/12/13	Esperem una setmana perquè acabin de sortir tots els adults	Les observacions al microscopi s'havien de fer la setmana del 09 al 13 però el microscopi només es podia reservar la setmana següent.
12/12/13	✓ Alimentació: ISA1-FITC	No van menjar fins al dia 13/12/13. A partir d'aquest dia es deixen en dejuni (només se'ls dóna aigua) fins a la observació del dia 16.
16/12/13	✓ Observació microscopi confocal	Tòrax, abdomen
18/12/13	✓ Observació microscopi confocal	Tòrax, abdomen
20/12/13	✓ Observació microscopi confocal	Tòrax, abdomen, ala i extremitat

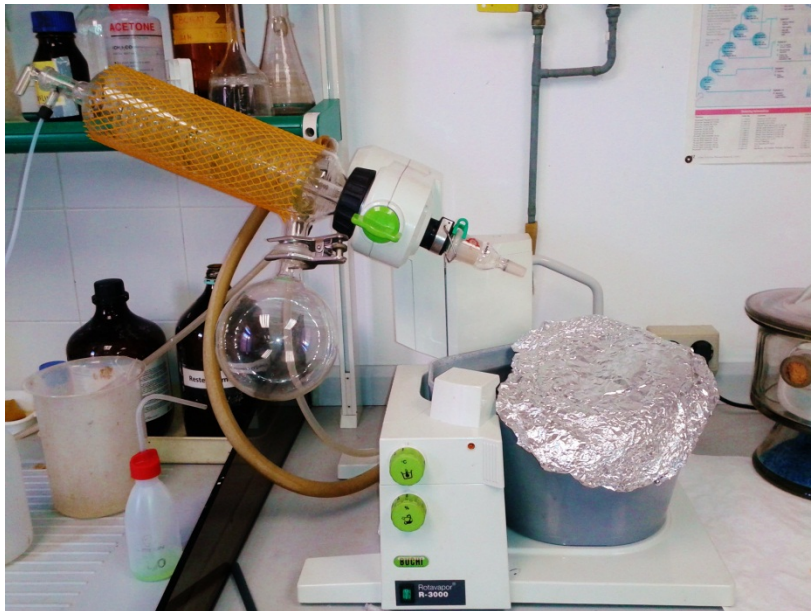
Aquesta taula mostra el calendari del procés seguit per portar a terme els experiments amb *Anopheles*



Habitacle dels insectes: (a) got de plàstic amb malla i solució: (b) tub d'aspiració per transferir-los al got: (c) got amb cotó banyat en éter



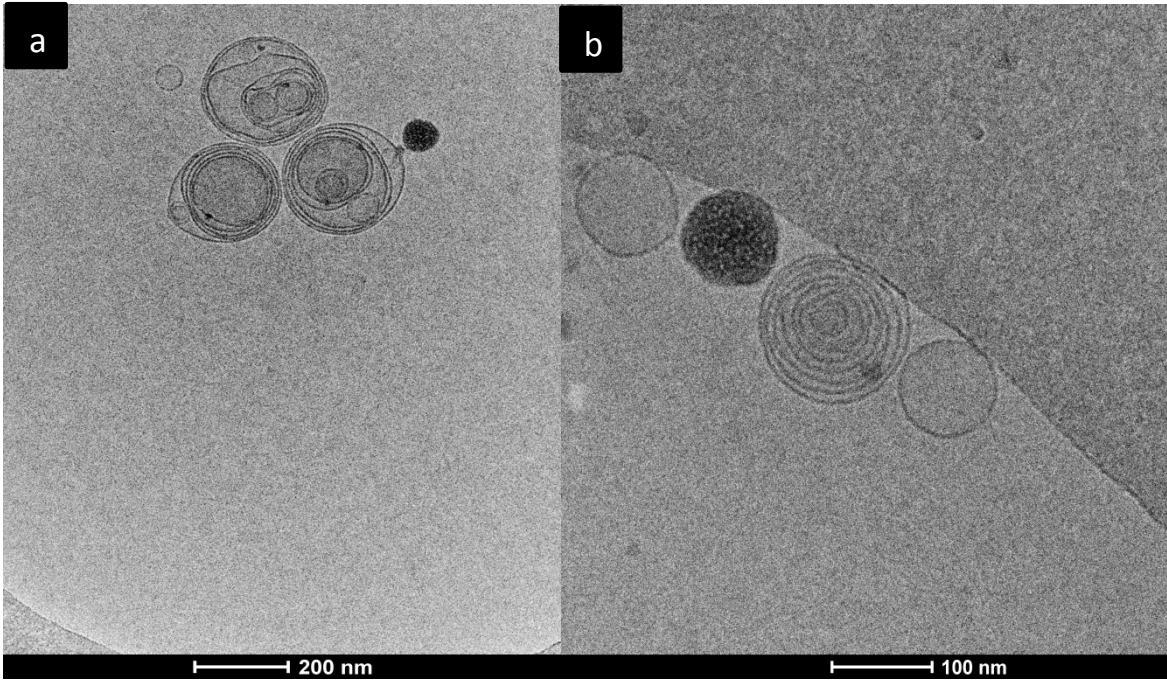
Lector d'absorbància "Epoch BioTek" treballant amb plaques microtiter



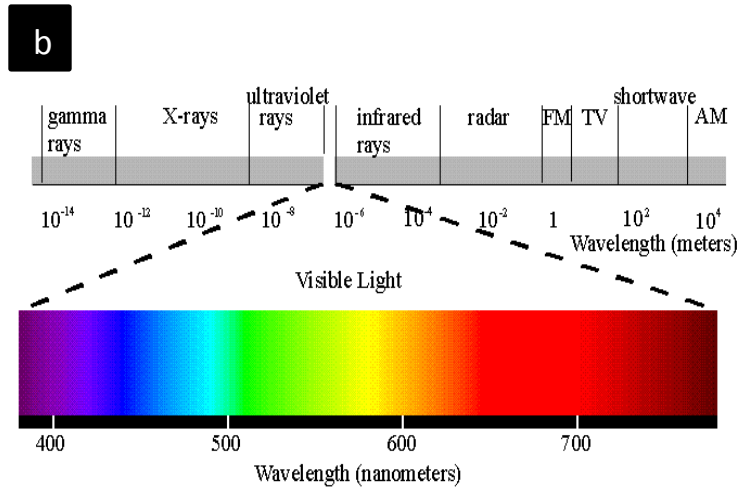
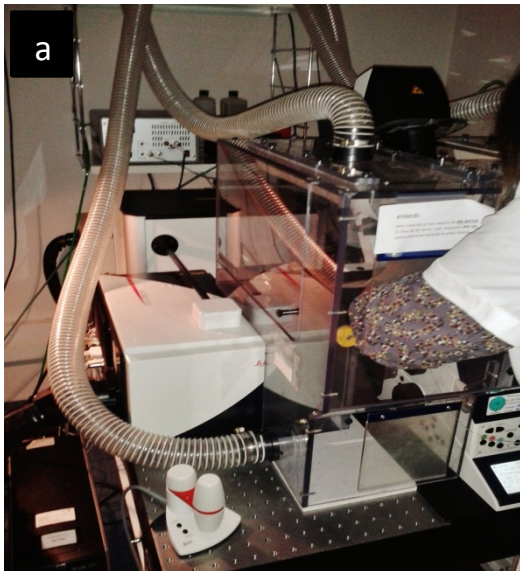
Rotavapor de la Facultat de Farmàcia (Universitat de Barcelona)



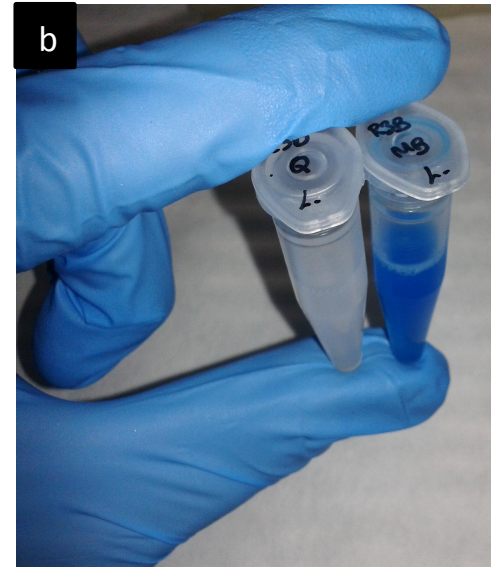
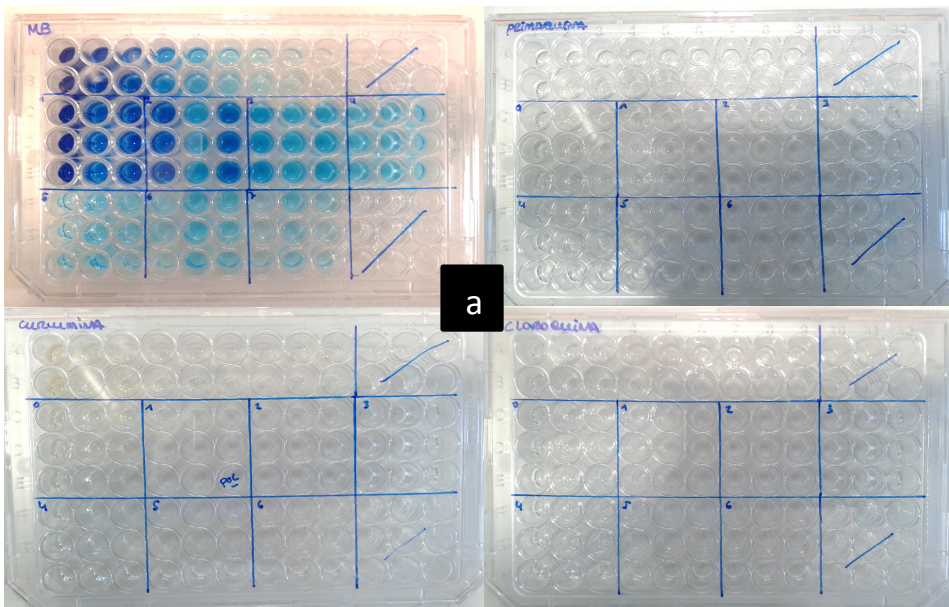
Microscopi electronic (FEI Tecnai™) del parc científic



Imatge de tres liposomes multilamelars i Np R3B: (a) Dos liposomes unilamelars de 100nm, tal i com es volen de mida aproximada i característiques, Nanopartícula R2B i liposoma multilamelar que forma esferes concèntriques (clara imatge de com no ha de ser el liposoma).



Microscopi confocal (SCT-UB)-IDIBAPS: (a) espectre electromagnètic amb les diferents longituds d'ona: (b)



Quatre dels cinc fàrmacs emprats en els assajos de *release*:(a) Formació de *protocells* usant quinina (resultats) i blau de metilè:(b)

