

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



***Diseño de Nanoplataformas Biocompatibles
con Potencial Actividad Antitumoral***

TESIS DOCTORAL

Elena Pretel Morrás

Granada, 30 octubre 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Elena Pretel Morrás
ISBN: 978-84-9163-711-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48861>

La doctoranda Elena Pretel Morrás, y los directores de la tesis, Dra. Dña. Beatriz Clares Naveros y Dr. D. José Luis Arias Mediano garantizamos, al firmar esta tesis doctoral que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo; se han respetado los datos de otros autores al ser citados cuando se han usado sus resultados y publicaciones.

Granada, 29 de septiembre 2017

Director/es Tesis

Doctoranda

Fdo.: Dra. Dña. Beatriz Clares Naveros

Fdo.: Elena Pretel Morrás

Fdo.: Dr. D. José Luis Arias Mediano

Dña. Beatriz Clares Naveros, Profesora contratada Doctora y Dr. D. José Luis Arias Mediano, Profesor Titular, pertenecientes al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la Universidad de Granada,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que presenta en ésta memoria titulado:

**“DISEÑO DE NANOPLATASFORMAS BIOCAMPATIBLES CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTITUMORAL”**

Ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la Universidad de Granada bajo nuestra dirección, por la Licenciada de Grado Dña Elena Pretel Morrás y constituye su Tesis Doctoral.

Con la presente fecha, autorizamos su presentación ante el Comité de la Dirección de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Granada.

Directores:

Granada, 29 de septiembre 2017

Fdo.: Dra. Dña. Beatriz Clares Naveros

Doctoranda:

Fdo.: Dr. D. José Luis Arias Mediano

Fdo.: Elena Pretel Morrás

Tutor:

Fdo: Dr. D. José Luis Arias Mediano

INDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. CÁNCER	18
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA	18
1.1.1.1. INCIDENCIA	19
1.1.1.2. PREVALENCIA	21
1.1.1.3. MORTALIDAD...	22
1.1.2. TERMINOLOGÍA DEL CANCER...	26
1.2. CANCER COLORRECTAL.....	27
1.2.1. ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CANCER...	30
1.2.2. CANCER ESPORÁDICO FRENTE CANCER FAMILIAR...	31
1.2.3. ESTADÍOS...	35
1.2.4. MICROENTORNO DE PROLIFERACIÓN TUMORAL.....	37
1.2.4.1. CELULAS DEL SISTEMA INMUNE	38
1.2.4.2. FIBROBLASTOS.....	39
1.2.4.3. INFLAMACIÓN.....	40
1.2.4.4. MATRIZ EXTRACELULAR Y MEMBRANA BASAL	40
1.2.4.5. HIPOXIA.....	41
1.2.4.6. ANGIOGÉNESIS	41
1.2.4.7. METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS TUMORALES..	42
1.2.4.8. METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CÉLULAS TUMORALES.	44
1.2.4.9. EFECTO WARBURG.....	45
1.2.4.10. POTENCIAL DE MEMBRANA.....	46
1.2.4.11. ALTERACIÓN EN LA ADHESION CELULAR.....	49
1.2.4.12. METÁSTASIS.....	50
1.2.5. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL.....	52
1.2.6. TRATAMIENTO	53
1.3. 5-FLUOROURACILO	55
1.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN	56

1.3.2. CITOTOXICIDAD.....	57
1.3.3. QUIMIORRESISTENCIA... ..	58
1.3.4. EFICACIA	59
1.3.5. FARMACOCINÉTICA	60
1.3.6. ADMINISTRACIÓN Y POSOLOGÍA	62
1.3.7. TOXICIDAD	63
1.4. NANOSISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS	65
1.4.1. BENEFICIOS TERAPÉUTICOS.	66
1.4.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA... ..	68
1.4.3. ESTRATEGIAS DE DISEÑO.	70
1.4.3.1. TRANSPORTE PASIVO.....	72
1.4.3.2. TRANSPORTE ACTIVO.....	73
1.4.3.2.1. CAMBIOS DE PH... ..	
1.4.3.2.2.-CAMBIOS DE TEMPERATURA	
1.4.3.2.3.-GRADIENTE MAGNÉTICO.	
1.4.3.2.4.-LA LUZ.	
1.4.3.2.5.-ULTRASONIDOS.	
1.4.3.2.6.-SISTEMAS ENZIMÁTICOS.....	
1.4.4. INTERNALIZACIÓN DEL SISTEMA TRANSPORTADOR EN LA CÉLULA...	80
1.4.5. PROGRESOS EN EL DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS...	82
1.5 MATERIALES POLIMÉRICOS... ..	83
1.5.1. BIOCOMPATIBILIDAD.....	83
1.5.2. BIODEGRADABILIDAD... ..	84
1.5.3. TIPOS DE POLÍMEROS NANOTRASPORTADORES.....	84
1.5.4 TIPOS DE SISTEMAS NANOTRASPORTADORES.....	85
1.6. POLI(D,L-LACTIDA-co-GLICOLIDA).....	90
1.6.1. LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO... ..	93
1.6.2. VARIABLES EN LA LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO.....	95

2. OBJETIVOS, CONTRIBUCIÓN Y PLAN DE TRABAJO	105
2.1. OBJETIVOS.....	107
2.2. CONTRIBUCIÓN	108
2.3. PLAN DE TRABAJO	109
3. FORMULACIÓN	111
3.1. METODOLOGÍA DE FORMULACIÓN.....	113
3.1.1. POLIMERIZACIÓN DEL MONÓMERO.....	114
3.1.1.1. POLIMERIZACIÓN MEDIANTE EMULSIÓN.....	114
3.1.1.2. POLIMERIZACIÓN INTERFACIAL.....	114
3.1.1.3. POLICONDENSACIÓN INTERFACIAL.....	115
3.1.2. OBTENCIÓN A PARTIR DE POLÍMEROS PREFORMADOS.....	116
3.1.2.1. EMULSIFICACIÓN/EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.....	116
3.1.2.2. DESPLAZAMIENTO DEL SOLVENTE (NANOPRECIPITACIÓN) Y DEPOSICIÓN INTERFACIAL... ..	120
3.1.2.3. EMULSIFICACIÓN/DIFUSIÓN DEL SOLVENTE	124
3.1.2.4. <i>SALTING OUT</i>	125
3.2 FORMULACIÓN EXPERIMENTAL.. ..	126
4. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS NANOSISTEMAS... ..	130
4.1 ESTUDIO GEOMÉTRICO.....	130
4.1.1 FORMA.....	131
4.2. TAMAÑO.....	135
4.2. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRNASFORMADOR DE FOURNIER.....	140
4.2.1. FUNDAMENTO DE FTIR... ..	140
4.2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL... ..	141
4.3. PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES	145
4.3.1. INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS.....	145
4.3.2. PROPIEDADES ELECTRICAS DE LA INTERFASE... ..	146

4.3.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA.....	146
4.3.3. POTENCIAL Z	152
4.3.3.1. PH	153
4.3.3.2. FUERZA GRAVITACIONAL... ..	155
4.3.3.3. FUERZA IONICA.....	156
4.3.4. ELECTROFORÉISIS... ..	158
4.3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL... ..	160
4.3.5.1. EFECTO DEL PH Y LA FUERZA IÓNICA... ..	167
4.4. ESTUDIO REOLÓGICO... ..	172
4.4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	175
4.5. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA MEDIANTE MÚLTIPLE <i>LIGHT SCATTERING</i>	177
4.5.1. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE TURBISCAN	177
4.5.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL... ..	180
4.5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS DISPERSIONES COLOIDALES Y ANÁLISIS DE ESTABILIDAD	185
5. CAPACIDAD DE VEHICULIZACIÓN DE 5-FLUOROURACILO	187
5.1. ESPECTOFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	190
5.2. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE FÁRMACO.....	200
5.2.1. INCORPORACIÓN DE FÁRMACO EN LA MATRIZ... ..	201
5.2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	203
5.3. ESTABILIDAD DEL 5-FLUOROURACILO VEHICULIZADO... ..	205
6. LIBERACIÓN Y CINÉTICA DE 5-FLUOROURACILO DESDE LOS NANOSISTEMAS.....	209
6.1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS... ..	211
6.2. MECANISMOS DE LIBERACIÓN... ..	213
6.2.1. DEGRADACIÓN... ..	213
6.2.2. EROSIÓN.....	214
6.2.3 TRANSPORTE DE FÁRMACOS.....	215

6.2.4. COMBINACIÓN DE MECANISMOS PARA LA LIBERACIÓN DEL FÁRMACO..	215
6.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	217
6.4. RESULTADOS.....	218
6.5. CINÉTICA	224
7. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE PROLIFERACIÓN	232
7.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	233
7.2. RESULTADOS.....	235
8. CONCLUSIONES.....	243
9. REFERENCIAS	249

1.- INTRODUCCIÓN

La administración de un fármaco se define por el proceso de liberación de éste a una determinada velocidad y en un sitio específico. Sin embargo una de las principales limitaciones de la terapéutica actual se basa en la dificultad de los fármacos por alcanzar su lugar de acción. En las últimas décadas ha tenido un espectacular desarrollo la investigación sobre vectorización de fármacos ya que modificando las características farmacocinéticas de los principios activos es posible aumentar su eficacia y restringir su toxicidad.

Las principales limitaciones por las que se ve mermada la eficacia de algunos principios activos se debe, entre otras causas a:

- La escasa solubilidad.
- La alta toxicidad.
- La posible precipitación a dosis altas.
- La corta vida media plasmática.
- La rápida biodegradación.

Nuestro trabajo de investigación se centra en el desarrollo de nanosistemas óptimos, potencialmente útiles en el tratamiento del cáncer de colon, pues la mayoría de los citostáticos actualmente utilizados se encuentran comprometidos de forma considerable; es conocida su eficacia terapéutica, pero fundamentalmente se frena por:

- Su inespecificidad de acción de células sanas y tumorales.
- Desarrollo de reacciones adversas consecuencia de la actividad del principio activo.

Actualmente el cáncer se le califica como uno de los principales problemas de la salud pública. En un análisis de morbilidad de la OMS, la incidencia del cáncer podría aumentar hasta un 50% hasta el año 2020, en el que habría 15 millones de nuevos casos. Sin embargo, dicho informe también anuncia que modos de vida saludable y actuaciones de gobiernos y sanitarios pueden frenar ésta tendencia y evitar hasta un tercio de cánceres en todo el mundo, curar otro tercio y proporcionar buena atención paliativa al tercio restante que la necesita (OMS, 2003).

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), los tumores constituyen una de las principales causas de ingreso hospitalario en nuestro país. En 2015 los tumores provocaron la tercera causa de estancia hospitalaria (3.599.306 estancias), por detrás de las enfermedades del aparato circulatorio (3.886.462 estancias) y respiratorio (3.886.462). Los ingresos provocados por tumores se mantuvieron relativamente estables con respecto a años anteriores (variación anual + 0,3).

1.1.-CÁNCER

Hoy se entiende el cáncer como un conjunto de enfermedades con capacidad ilimitada de proliferación, con errores en los mecanismos de división y en el ciclo celular. Los fenómenos de señalización (factores de crecimiento, receptores, proteínas citoplasmáticas), división celular (ciclinas, genes supresores), control de apoptosis, etc., están íntimamente implicados en el desarrollo del cáncer. Una vez formados y localizados los tumores, se sabe que necesitan la formación de vasos nuevos (neo-angiogénesis) que les asegurarán su supervivencia. El tratamiento médico del cáncer debe asentarse sobre unas bases racionales de conocimiento de la proliferación, diferenciación y apoptosis, y los fármacos deben ser diseñados de acuerdo a su mecanismo de acción y conociendo al detalle las funciones que pueden llegar a controlar (Rubio 2006).

1.1.1.- EPIDEMIOLOGÍA

Las cifras del Cáncer en España se editan por la Sociedad Española de Oncología Médica con una periodicidad anual. Se recogen datos de incidencia, mortalidad, supervivencia y prevalencia de cáncer en España.

La información revisada es susceptible de cambios en función de los últimos datos publicados. Se considera la bibliografía científica más relevante, los datos proporcionados por:

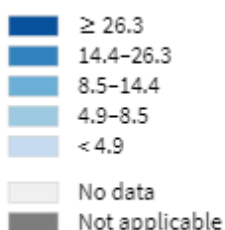
- el Instituto Nacional de Estadística (INE)
- el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III
- EUROCARE (EUROCARE-5)
- REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer)
- Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer* IARC) de la OMS, a través de la página web The Global Cancer Observatory (GCO), que recoge los datos más relevantes de seguimiento del cáncer de la IARC entre los que se encuentran GLOBOCAN y Cancer Incidence in Five Continents (CI5); además de EUCAN.

Las estimaciones presentadas se realizan a partir de los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que recoge a su vez los datos de los diferentes registros nacionales que cumplen los estándares de calidad de la IARC.

1.1.1.1.-INCIDENCIA

Estadísticas de incidencia recientes hablan del cáncer colorrectal como de uno de los más comunes en la población general. Según la SEOM (por estimaciones a partir de la OMS) en 2015, los números de casos nuevos de cáncer de colon y recto fueron de 41.441, en un total de 247.771 casos nuevos de cáncer. Por ello centraremos nuestro estudio en éste tipo de cáncer.

El cáncer colorrectal es la tercera neoplasia maligna más frecuente en los países occidentales. Según la IARC -datos de diciembre de 2012, es el tercer cáncer más común en los hombres (aproximadamente el 10% del total de los desarrollados) y el segundo en mujeres, así como el 9.4% del total en todo el mundo. Hay una variación geográfica sustancial en la incidencia en todo el mundo, los patrones geográficos son muy similares en hombres y mujeres. Casi el 60% de los casos se producen en regiones desarrolladas; las tasas más altas se encuentran en Australia, Nueva Zelanda y Europa Occidental; las más bajas en África (excepto Sudáfrica) y Asia Sur-Central; las tasas son intermedias en América Latina (Figura 1.1).



Hombres, cualquier edad				Mujeres, cualquier edad			Ambos sexos, cualquier edad		
POBLACION	Números	tasa por 100.000 habitantes	riesgo acumulado	Números	tasa por 100.000 habitantes	riesgo acumulado	Números	tasa por 100.000 habitantes	riesgo acumulado
MUNDIAL	746298	20.6	2.36	614304	14.3	1.57	1360602	17.2	1.95
ZONA MÁS DESARROLLADA	398903	36.3	4.30	337964	23.6	2.68	736867	29.2	3.42
ZONA MENOS DESARROLLADA	347395	13.7	1.55	276340	9.8	1.09	623735	11.7	1.31
MUY ALTO DESSARROLLO HUMANO	388706	37.9	4.46	313490	24.4	2.74	702196	30.6	3.55
ALTO DESARROLLO HUMANO	103872	19.9	2.40	106740	15.7	1.87	210612	17.5	2.10
DESARROLLO HUMANO MEDIO	232148	13.4	1.50	175212	9.3	1.02	407360	11.3	1.25
BAJO DESARROLLO HUMANO	21183	5.5	0.63	18506	4.4	0.51	39689	4.9	0.57
AFRICA	15505	6.7	0.79	15037	5.7	0.65	30542	6.1	0.71
AMÉRICA	125079	22.3	2.57	120564	17.6	1.96	245643	19.8	2.25
ZONA ESTE MEDITERRÁNEO	18105	8.3	0.95	14664	6.6	0.74	32769	7.4	0.84
EUROPA	254769	35.7	4.27	216471	22.6	2.61	471240	28.2	3.35
SUDESTE ASIÁTICO	68235	8.9	1.05	51990	6.3	0.72	120225	7.5	0.88
OESTE PACIFICO	264479	22.3	2.51	195479	14.6	1.58	459958	18.3	2.04
MEDIO ESTE Y NORTE DE ÁFRICA	21897	13.2	1.54	18134	9.8	1.11	40031	11.4	1.31
AFRICA SUBSAHARIANA	14386	6.4	0.76	13828	5.4	0.62	28214	5.8	0.68
AFRICA ORIENTAL	6228	7.1	0.86	6159	6.1	0.71	12387	6.5	0.78

Figura 1.1.-Estimación de las tasas estandarizadas de casos incidentes, ambos sexos, de cáncer colorrectal (2012), datos facilitados por *International Agency for Research on cancer* (todos los derechos reservados)

En cuanto a la esperanza de vida en pacientes con este tipo de neoplasia, se sabe que después de la resección completa (extirpación quirúrgica) del cáncer de colon, la supervivencia global a los 5 años varía en función de cómo fue la etapa inicial.

En España, según la SEOM, -que facilitó los datos de la incidencia-, dan valores muy parecidos a los indicados anteriormente a nivel mundial. En los varones el cáncer colorrectal es el tercero en incidencia, detrás del cáncer de pulmón y de próstata; en las mujeres, es el segundo más frecuente después del de mama. Teniendo en cuenta ambos sexos, el cáncer de mayor incidencia es el colorrectal (15%), (figura 1.2.). La mayoría de los casos que se diagnostican son en pacientes de entre 65 y 75 años, aunque se registran casos desde los 35-40 años asociados a una predisposición genética.

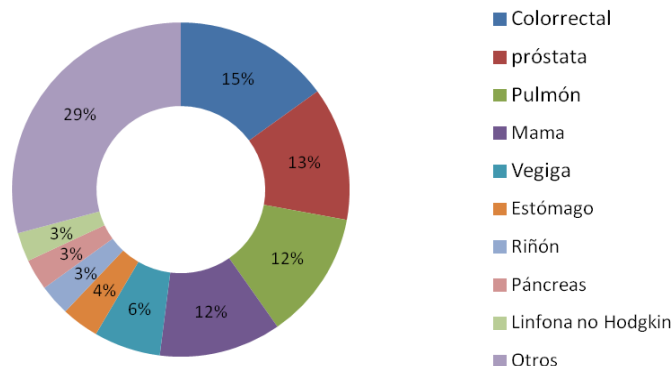


Figura 1.2. Incidencia en el año 2014 de tumores en España (Ferlay y cols., 2014).

1.1.1.2.- PREVALENCIA

La prevalencia hace referencia al número de pacientes con cáncer en una determinada población, independientemente del momento en que les fue diagnosticada esta enfermedad. La prevalencia depende de la frecuencia de la aparición de la enfermedad (incidencia) y de su letalidad (supervivencia). La prevalencia es el número o la proporción de la población durante un periodo o en un momento concreto; los datos

que se suelen emplear son el número de pacientes diagnosticados con un tipo concreto de tumor que continúan vivos al año, a los 3 o a los 5 años del diagnóstico, incluye por tanto los pacientes con diagnóstico reciente pero también los pacientes diagnosticados en el pasado. La prevalencia es más elevada en los tumores con mayor supervivencia; mientras que los tumores con supervivencia más cortas tienen una menor prevalencia aunque se diagnostiquen más frecuentemente. En España, el de mayor prevalencia a 5 años el de mama (17.9%).

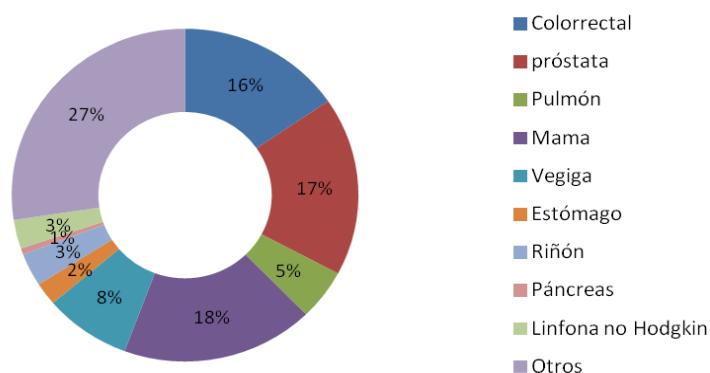


Figura 1.3. Prevalencia de cáncer en España a los 5 años, datos del año 2014 (Ferlay y cols., 2014).

1.1.1.3.-MORTALIDAD

La mortalidad es el número de fallecimientos ocurridos en un periodo concreto en una población determinada. Suele expresarse como el número de fallecimientos por año o como el número de fallecimientos por 100.000 personas por año.

De acuerdo con la última información proporcionada por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, los tumores son la causa más frecuente de muerte entre los varones en España (responsables de 65.014 fallecimientos), por delante de las enfermedades cardiovasculares, que ocasionaron 52.907 fallecimientos y las enfermedades respiratorias (24.798 fallecimientos) en 2014. Los tumores suponen, sin embargo, la segunda causa de muerte en mujeres en España (41.020 fallecimientos), por detrás de las enfermedades cardiovasculares, responsables de 63.546 muertes. La tercera causa de muerte en mujeres en España son las enfermedades respiratorias (18.881 fallecimientos).

Así, de acuerdo con los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), en el año 2015, una de cada tres muertes en varones y una de cada cinco en mujeres en España, se debieron a tumores malignos; es decir más de una de cada 4 muertes en España se debieron a distintos tipos de cáncer. Sin embargo, de acuerdo con los datos del INE, la principal causa de muertes en los hospitales españoles fueron los tumores (24,2%). Por otra parte, según el Instituto Nacional de Epidemiología, entre los años 2003-2012 la mortalidad por tumores se redujo un 1,32% al año, pese a que se experimentó un aumento global de la incidencia. Estas tendencias, reflejan las mejoras en la supervivencia de los pacientes con tumores debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz y a los avances terapéuticos. Otro de los cambios observados ha sido el aumento de cáncer de pulmón, atribuible a la contaminación. Hay que mencionar el caso del aumento del consumo de tabaco en las mujeres que ha conducido a que -entre 2003 y 2012-, prácticamente se duplicase el número de defunciones por cáncer de pulmón (de 7,6 a 11,6 por 100.000 mujeres) de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Epidemiología.

La supervivencia de los pacientes con cáncer en nuestro país es similar a la del resto de países de nuestro entorno situándose en España en un 53 % a los 5 años. Se calcula que la supervivencia se ha duplicado en los últimos 40 años en países como Reino Unido, y que alcanza un 50 % a los 10 años, si bien a expensas del aumento de la supervivencia de algunos tumores como mama o colon, mientras que las de otros tumores continúa siendo similar.

Se calcula que la mortalidad por cáncer para el año 2014 en España fue de 106.039 fallecimientos (65.019 casos en varones y 41.020 en mujeres).

Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en 2014 en España en la población general fueron el cáncer de pulmón (21.220 muertes) y el cáncer colorrectal (15.449 muertes), seguidos a una gran distancia del cáncer de páncreas (6.278 casos), cáncer de mama (6.213 muertes) y de próstata (5.855 muertes).

De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Epidemiología, entre los hombres, el tumor que causó el mayor número de fallecimientos en España en 2014 fue

el cáncer de pulmón, responsable de 17.173 fallecimientos; por delante del cáncer de colon (responsable de 6.951 muertes), próstata (5.855 muertes), vejiga (3.894), hígado (3.389 muertes), estómago (3.328 muertes) y páncreas (3.193 fallecimientos). Los tumores responsables del mayor número de muertes en varones no se han modificado de forma sustancial en los últimos años.

De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Epidemiología, entre las mujeres, el tumor que causó un mayor número de fallecimientos en España en el año 2014 fue el cáncer de mama (6.213 fallecimientos), por delante del cáncer de colon (4.827 casos), pulmón (4.047 casos), páncreas (3.085 casos), estómago (2.194), útero (2.185) y ovario (2.152). Los tumores responsables del mayor número de muertes en mujeres no se han modificado de forma sustancial en los últimos años.

Por tanto, a nivel global el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo, con aproximadamente 8,2 millones de muertes relacionadas con tumores en el año 2012 de acuerdo con los datos proporcionados por la OMS. Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos a nivel mundial fueron el cáncer de pulmón (1,59 millones de muertes), el cáncer de hígado (745.000 fallecimientos), el cáncer gástrico (723.000 fallecimientos), el colorrectal (694.000 muertes), de mama (521.000 muertes) y de esófago (400.000 muertes).

En números absolutos, España es uno de los países europeos en los se diagnostican más tumores y en los que fallecen un mayor número de personas por cáncer. Sin embargo, puesto que contamos con una de las mayores esperanzas de vida del mundo, si comparamos la incidencia y mortalidad ajustadas por edad, la incidencia y la mortalidad en Europa se homogenizan. De hecho, de acuerdo con los datos de la OMS, España no se encontraría entre los 20 países europeos con una incidencia y mortalidad ajustada por edad más elevada de Europa.

Sin embargo, y pese a que las cifras de mortalidad son muy elevadas, los estudios indican que la supervivencia de los pacientes con cáncer ha aumentado de forma continua en los últimos años en todos los países europeos, especialmente para el linfoma no Hodgkin y el cáncer de recto (es probable que esté relacionado con los

avances en el tratamiento), y para el cáncer de próstata (es probable que esté relacionado con el diagnóstico precoz). Países de nuestro entorno, como Reino Unido y Europa del Este, presentan aún resultados inferiores en cuanto a supervivencia por algunos tipos de tumores (EUROCARE-5).

De acuerdo con los datos publicados por la OMS en su Informe Mundial del Cáncer 2014, alrededor de 1/3 de las muertes por cáncer son debidas a causas evitables, incluyendo el tabaco (responsable de hasta un 33% de los tumores a nivel global), las infecciones (responsables de un 18% de los tumores fundamentalmente en los países en vías de desarrollo) y el alcohol (responsable de hasta un 12% de los tumores en el mundo) como factores de riesgo más importantes.

En el caso del cáncer colorrectal, la mortalidad es sustancialmente menor que la incidencia, con un estimado de 694.000 muertes en 2012 (8,5% de todas las muertes por cáncer ese año). Más muertes por cáncer colorrectal (52% en 2012) ocurren en las regiones menos desarrolladas del mundo, lo que refleja una peor supervivencia en estas regiones. En el caso de España, se sitúa en valores del 14% (figura 1.4)

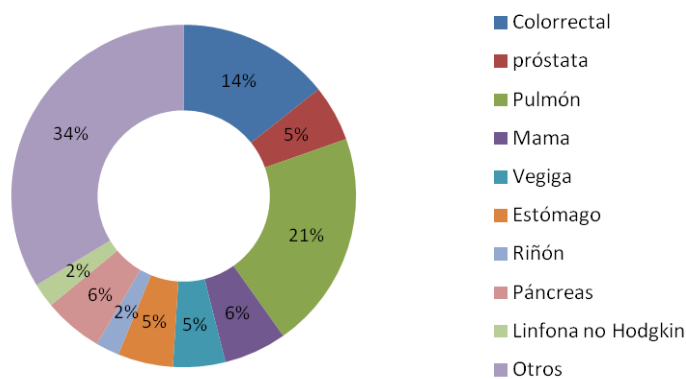


Figura 1.4. Mortalidad por cánceres en España en 2014 (Ferlay y cols., 2014).

1.1.2. TERMINOLOGÍA DEL CANCER

En la literatura científica hay un consenso en la terminología para que llegue a ser internacional el manejo de diferentes modelos, consiguiendo así información útil, precisa y estandarizada, estableciendo uniformidad en los procesos de diagnóstico y de estadificación.

Se conoce como neoplasia a la proliferación celular autónoma. La línea celular en la que se origina la célula neoplásica divide a las neoplasias en epiteliales (epitelio escamoso, glandular, neuroendocrino), mesenquimales, melanocíticas y linfoides.

Neoplasia epitelial es la originada en el epitelio superficial de la mucosa, formado por células maduras epiteliales escamosas, las células aplanadas dispuestas en capas sobre una membrana basal, sólo una capa está en contacto con la membrana, las otras capas están unidas entre sí para mantener la integridad. Neoplasia epitelial glandular es la originada a nivel ganglionar.

La neoplasia neuroendocrina es un cuadro de cierta controversia (Villalonga R y cols., 2008). Se cree que se desarrolla en las células neuroendocrinas del propio epitelio después de haberse producido el daño en una célula precursora, otros se decantan por decir que han sido originados en el propio tejido APUD (sistema hormonal paralelo al sistema endocrino); se piensa que en estos tumores se estimula su crecimiento a través de la secreción de sustancias neuroendocrinas. Es poco frecuente,-según los datos del Instituto Nacional de cáncer Americano, en el cáncer colorrectal, sólo un 0.3% desarrolla este patrón-, pero de los tipos de cáncer, es de los más agresivos con diseminación rápida y pronóstico más desfavorable.

Las neoplasias mesenquimatosas se designan añadiendo –oma al nombre de la célula que la originó en el caso de benigno y –sarcoma en el caso de maligno. Nacen en los tejidos mesenquimales (células multipotenciales originadas de la capa germinal mesodermal).

Neoplasia melanocítica es la originada en los melanocitos y la linfoide la originada en las células del sistema inmunitario, en diferentes etapas de diferenciación dando lugar a una gran variedad de procesos.

Estas neoplasias serán a su vez benignas, de malignidad incierta o malignas. Neoplasia benigna se conoce si la proliferación celular autónoma es no metastatizante. El adenoma es una neoplasia benigna del epitelio glandular, neoplasia maligna es la proliferación celular autónoma si metastatizante, cuya historia natural puede llevar a la muerte. El carcinoma se entiende como la neoplasia maligna epitelial y el adenocarcinoma como la neoplasia maligna del epitelio glandular. Se habla de neoplasia (tumor) maligna indiferenciada de la proliferación celular autónoma maligna en la que ópticamente no se tiene certeza de si se trata de un carcinoma, linfoma, tumor neuroendocrino maligno, melanoma o sarcoma. El estudio inmunohistoquímico y de microscopía electrónica puede ser de utilidad en estos casos para determinar la estirpe celular del tumor.

1.2. CANCER COLORRECTAL

En cuanto a la fisiología, el colon o intestino grueso es el último tramo del tubo digestivo, con una longitud aproximada de 1.5m. Se extiende desde el final de intestino delgado hasta el ano. La primera porción del intestino grueso está situada en la parte inferior derecha del abdomen, es donde desemboca el intestino delgado y se llama ciego; desde ahí el colon asciende hasta llegar a la zona del hígado (colon ascendente) y atraviesa el abdomen (colon transverso) y se dirige posteriormente hacia abajo (colon descendente); llega a una zona denominada sigma que desemboca en el recto y finalmente en el ano, que se abre al exterior por el esfínter anal. La función específica del colon ascendente y transverso es absorber agua y electrolitos (sodio, potasio,...) mientras que la función del colon es almacenar materia fecal hasta su posterior expulsión.

A nivel anatómico consta de tres capas (figura 1.5.):

1. **Mucosa:** bastante gruesa, con pliegues longitudinales y transversales. Se pueden distinguir unos espolones en la unión de los relieves, que corresponden a las tenias (fibras musculares longitudinales que siguen el eje mayor del intestino y desaparecen en el recto), unos pliegues semilunares y las haustras, que son dilataciones de la pared en forma de saco e interpuestas entre las tenias; las haustras son más numerosas en el colon transverso y son observadas en la cara externa, que no tiene pliegues circulares ni vellosidades. Aquí encontramos células calciformes y glándulas que segregan esencialmente mucus.
2. **Muscular:** una capa longitudinal externa, agrupada en tres tenias y una capa circular interna, cuyos engrosamientos producen los pliegues semilunares del colon. La capa es frágil y delgada.
3. **Serosa:** Es la pared que rodea el lumen del tracto gastrointestinal. Está formada por varios tipos de tejidos superpuestos en capas concéntricas. La pared actúa como barrera mecánica, biológica y funcional entre el contenido de la luz del intestino y nuestro medio.

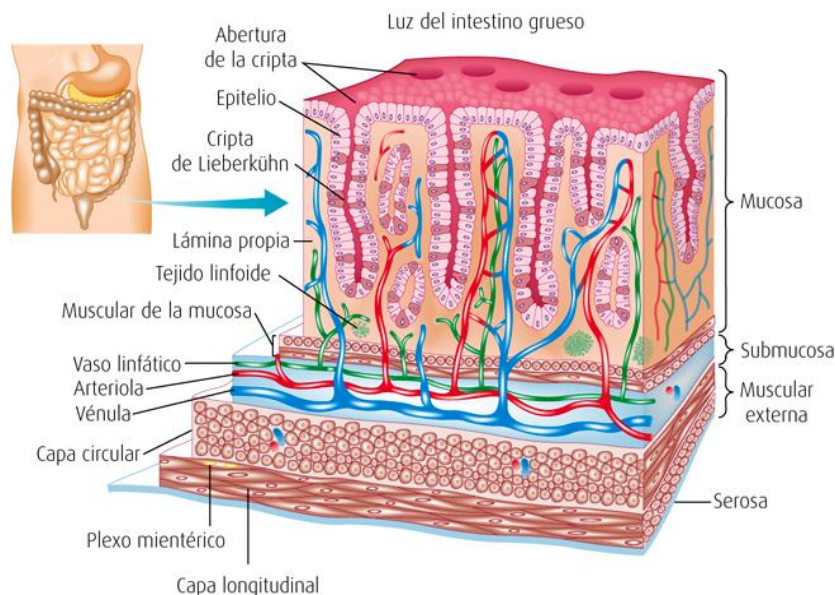


Figura 1.5.- Esquema de las capas del colon. Fuente: Julio Sepulveda Saavedra. Texto Atlas de Histología. Biología celular y Tisular. McGraw-Hill Education.

Las células que forman estos órganos nacen, crecen, se dividen y mueren bajo una estricta vigilancia del material hereditario, el ADN. Unas células regulan la multiplicación de otras para asegurarse que los órganos crezcan en un equilibrio y mantengan así su total funcionalidad.

La reproducción celular está supervisada por determinados sistemas de control extremadamente rigurosos, jugando un papel importante numerosas proteínas, enzimas, genes que activan y desactivan. Son las señales reguladoras de crecimiento, que deciden si deben continuar o no su ciclo de vida. Un mínimo fallo en este sistema de control puede provocar una afuncionalidad con serias consecuencias.

Las células tumorales descienden de un fallo en el sistema de control, originando una célula maligna de división inadecuada por la mutación de uno de sus genes.

Se conocen dos tipos de genes implicados:

1. Protooncogenes
2. Genes supresores

Los protooncogenes dirigen la producción de ciclinas, que son factores de crecimiento y actúan estimulando la multiplicación celular. En el caso de que un protooncogén muta, pasa a ser un oncogén, provocando un crecimiento desmedido en las células.

Los genes supresores son los que controlan la proliferación celular en un organismo sano. Podríamos decir que son reguladores negativos de crecimiento. Si sufren una mutación, las células adquieren una capacidad proliferativa, común de las células tumorales. Estudios moleculares de genes supresores han llegado a identificar más de 17 en tumores de cánceres humanos. Ellos codifican una serie de proteínas localizadas en el citoplasma o en el núcleo de la célula. De los genes mejor caracterizados se sabe que codifican las proteínas p53 y RB11.

Genes supresores de tumores a nivel de citoplasma involucrados en el cáncer de colon y estómago codifican a proteínas en el citoplasma como la APC (Poliposis adenomatosa del colon), genes supresores cuya misión es la regulación negativa de señales que promueven el crecimiento. A nivel de núcleo podemos nombrar al gen supresor MTS1 que codifica la proteína p16, importante para regular el ciclo celular y está implicada en numerosos tipos de cánceres, al igual que el p53. El gen p53 está considerado por muchos autores como el “guardián del genoma” pues a partir de él se sintetiza la proteína que lleva el mismo nombre y se activa cuando la célula se divide regulando su correcta traducción. En el caso de haber alguna anomalía, la p53 detiene la división, activando una apoptosis. En el caso en que el gen p53 sufra una mutación, no puede reparar los daños del ADN dando lugar a procesos tumorales. Podríamos decir que este gen está mutado en más de un 50% de los cánceres humanos (Symons y cols., 1994).

Otros mecanismos pueden hacer que la célula pierda el control, la presencia de ciertos virus como el papilomavirus humano, que sintetiza una proteína, la E6, la cual se une a la p53 y provoca su degradación mediada por la ubiquitina (Sheffner M y cols., 1995).

En la actualidad se están desarrollando técnicas para la determinación de alteraciones moleculares en los genes supresores de tumores.

1.2.1. ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CÁNCER COLORRECTAL.

Aproximadamente más del 85% de los tumores malignos son adenocarcinomas, es decir, producidos por las células glandulares de la mucosa colónica a partir de células productoras de hormonas del intestino. Otro tipo, menos frecuente, son los tumores carcinoideos y los estromales gastrointestinales, que se desarrollan en el tejido conectivo y en las capas musculares de la pared del colon y recto (Pallarés, 2011). Los adenocarcinomas destacan crecimientos vegetantes, con crecimiento hacia el interior

de la luz, las formas infiltrantes -que al ocupar la pared producen estenosis y retracciones-, y las formas ulcerantes.

El tumor neuroendocrino se desarrolla en las células neuroendocrinas del propio epitelio digestivo, después de haberse producido el daño. Los de alto grado en la neoplasia se debe a que se originan en el propio tejido APUD, segregando sustancias tipo aminas o péptidos favoreciendo el crecimiento del epitelio intestinal. Puede encontrarse una variedad rara dónde hay focos del tumor neuroendocrino y carcinoma de células escamosas.

La producción de mucina es una característica histopatológica común en los adenocarcinomas colorrectales, pero cuando llega a ser abundante, dichos tumores se consideran diferentes, pudiendo calificarse como carcinomas colorrectales mucinosos o carcinomas en anillo de sello según a localización de la mucina, sea extra o intracelular (Segarra MA y cols., 2002).

1.2.2. CÁNCER ESPORÁDICO FRENTE CÁNCER FAMILIAR

En el cáncer de colon influyen causas genéticas y ambientales. La mayoría son de tipo esporádico, es decir que no poseen ninguna carga genética heredada. Se estiman valores entre un 70 a 80% (Gatalicia y cols., 2008); el 30% restante podrían tener un componente familiar hereditario en primer o segundo grado (figura 1.6.).

En el intervalo hereditario, entre un 5-6% desarrollan tumores con síndromes hereditarios autosómicos dominantes, como el Síndrome de la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) y el síndrome de Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPPC).

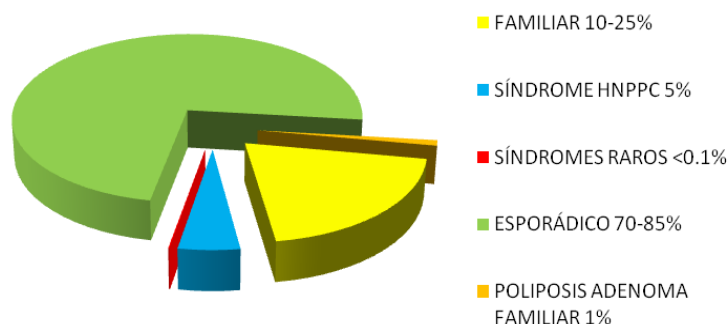


Figura 1.6.- Distribución de los subtipos de cáncer colorrectal en la población, adaptado según Romera (Romera L., 2010).

Los factores de riesgo no genéticos son muy significativos (tabla 1.1.). Los principales se clasifican como de tipo ambiental y están asociados a comportamientos de estilos de vida occidental. Parece incidir sobre el alto consumo de dietas ricas en carnes rojas, elevado consumo de alcohol o la obesidad. Dietas ricas en fibra, calcio, vitamina D, ácido fólico o selenio podrían paliar y proteger al desarrollo de dichos tumores. Otros factores de riesgo más conocidos, también implantados en la vida occidental, son el tabaquismo, el sedentarismo, edad tardía del primer embarazo; y enfermedades asociadas al intestino grueso como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

Factores de Riesgo asociados al Cáncer colorrectal en tumores esporádicos	
Colectectomía • Anastomosis ureterocólica • Colitis Ulcerosa • Enfermedad de Crohn • Diabetes melitus • Obesidad •	
• Dieta rica en carnes y grasa • Estilo de vida sedentario • Dieta baja en fibra, folato y calcio • Tabaquismo • Elevado consumo de alcohol • Tabajos peligrosos para la salud: exposición a asbestos • Irradiación previa •	
• Edad avanzada • Sexo masculino •	
F. hormonales: edad tardía del primer embarazo, multipara, menopausia temprana.	

Tabla 1.2.- Factores de riesgo asociados al cáncer colorrectal en tumores esporádicos.

El Síndrome de la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos en el tubo digestivo, con una afección preferente del colon y el recto. Se trata de una enfermedad hereditaria autosómica dominante con una prevalencia de aproximadamente 1 de cada 10.000-20.000 individuos. La característica fundamental de la PAF es la aparición de más de 100 pólipos adenomatosos en el colon y el recto (pueden llegar a ser miles), iniciándose a una edad muy joven y con un riesgo de cáncer colorrectal cercano al 100% si el paciente no recibe tratamiento de forma precoz. De todos los diagnósticos de cáncer colorrectal, los pacientes con PAF suponen únicamente menos de un 0,5%, pero la posibilidad de diagnóstico precoz y posterior tratamiento ha situado esta enfermedad en un punto de máximo interés científico. Además, al tratarse de un trastorno o enfermedad hereditaria compleja, junto a la enfermedad colorrectal, pueden asociarse una gran cantidad de alteraciones en otros órganos que es preciso investigar antes del tratamiento y durante el seguimiento, o incluso pueden servir para el diagnóstico de PAF (Parés y cols., 2016). Hay una forma atenuada de PAF que se presenta con un número menor de pólipos (menos de 100) que tienen tendencia a desarrollarse en el colon derecho, y cuya presentación, tanto por lo que respecta a los pólipos como al cáncer, suele retrasarse unos 15 años en relación con la PAF clásica. Habitualmente estos pacientes con poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA) tienen una limitada expresión de manifestaciones extracolónicas.

Se considera que más del 90% de las familias afectadas de PAF «clásica» presentan mutaciones en el gen *APC* en la línea germinal (Weitz J y cols., 2005). Es muy importante entender en qué medida la mutación en el gen *APC* confirma el diagnóstico de PAF. El gen codifica a la proteína APC, de tipo polipéptido. Dicha proteína es una parte integral de la vía de transmisión de distintas señales celulares pero también desempeña un papel en la adhesión celular, en la estabilidad del citoesqueleto microtubular, en la regulación del ciclo celular y posiblemente también en fenómenos de apoptosis.

El Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP) es un síndrome de herencia autosómica dominante, caracterizado por presentar un elevado riesgo de presentar cáncer colorrectal (el riesgo acumulado a lo largo de la vida del 70% al 85%), y otras neoplasias extracolónicas asociadas. El CCHNP se caracteriza por la presencia de cáncer colorrectal que afecta a varios miembros y a múltiples generaciones de una familia. La edad media de presentación del cáncer colorrectal es aproximadamente a los 45 años, significativamente más joven respecto a la edad media en casos esporádicos, y con un predominio de afectación en el colon derecho (aproximadamente un 70% son proximales al ángulo esplénico). Un 35% de los pacientes presentan neoplasia colorrectal múltiple sincrónica o metacrónica. Se entiende por neoplasia sincrónica la diagnosticada por seguimiento colonoscópico postoperatorio hasta conseguir lo más precozmente posible una colonoscopia óptima total, momento a partir del cual a las neoplasias nuevas diagnosticadas de nuevo se consideran metacrónicas (Cuquerella, 2000).

Otras enfermedades inflamatorias intestinales se estiman dignas de estudio epidemiológico para establecer los factores de riesgo o factores protectores. Desarrollo de Colitis ulcerosa (CU) o de la Enfermedad de Crohn (EC) con un patrón inflamatorio extenso (pancolitis) y con dificultad de control suelen ser las características que se les asocia significativamente al cáncer de colon. Se les asocia con tumores mucinosos, tipo de cáncer que comienza en las células que revisten la mucosa y producen mucina. En ambos casos presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, debido a la inflamación mantenida (Sicilia B, y cols., 2009).

1.2.3. ESTADIOS

Pueden diferenciarse diferentes clasificaciones, por estadios (figura 1.6.):

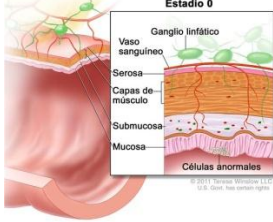
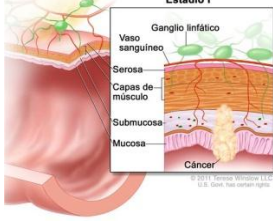
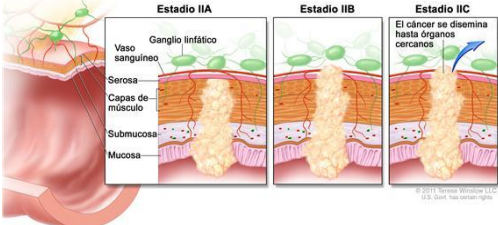
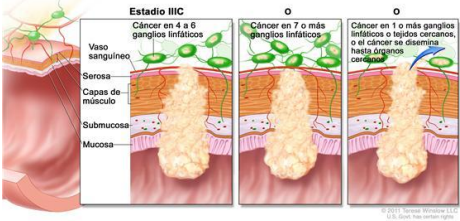

	<p>Estadio 0 o carcinoma <i>in situ</i>: células anormales en la mucosa de la pared del colon</p>
	<p>Estadio I: se disemina de la mucosa a la capa del músculo</p>
	<p>Estadio II: se disemina desde la capa del músculo hasta órganos cercanos</p>
	<p>Estadio III: se disemina a los ganglios linfáticos cercanos.</p>
	<p>Estadio IV: se disemina por todo el organismo</p>

Figura 1.7. Estadiaje del cáncer colorrectal.

Otros autores establecen tres parámetros: es la clasificación TNM.

- **T: Extensión**, indica el grado de infiltración tumoral en la pared del intestino grueso.
 - Tis: es el tumor “in situ”, confinado a la mucosa, que no traspasa las capas de la misma.
 - T1: tumor que invade la submucosa.
 - T2: tumor que invade la musculatura propia.
 - T3: tumor que llega hasta la subserosa o los tejidos grasos perirectales.
 - T4: tumor que invade tejidos de órganos adyacentes.

- **N: Ganglios afectados**, indica si el tumor se ha extendido a ganglios situados en las proximidades del tumor. Actualmente es necesario el estudio anatomopatológico de un mínimo de 12 ganglios linfáticos de la zona que rodea el tumor para realizar la correcta clasificación del paciente.
 - N0: ausencia de afectación ganglionar.
 - N1: presencia de afectación tumoral en 1 a 3 ganglios linfáticos perirectales.
 - N2: metástasis o afectación de 4 o más ganglios linfáticos.

- **M: Metástasis**, indica si ha existido invasión de otros órganos por parte del tumor
 - M0: ausencia de metástasis.
 - M1: presencia de metástasis a distancia.

Combinando la clasificación TNM con los por estadios resulta la siguiente tabla (tabla 1.3.):

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1-2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4	N0	M0
Estadio IIIA	T1-2	N1	M0
Estadio IIIB	T3-4	N1	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N2	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 1.3: Clasificación TNM por estadios.

Clasificación de Dukes Astler y Coller: en esta clasificación se utilizan las letras que van desde la A hasta la D.

- **Estadio A:** lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar.
- **Estadio B1:** el tumor afecta a parte de la pared del colon o recto, sin atravesarla ni afectar ganglios.
- **Estadio B2:** afecta a toda la pared sin invasión ganglionar.
- **Estadio C:** la enfermedad puede afectar a parte o a toda la pared, con afectación ganglionar.
- **Estadio D:** existe afectación de otros órganos alejados

1.2.4. MICORENTORNO EN LA PROLIFERACIÓN TUMORAL

En el desarrollo del cáncer, las células sanas adquieren características que les llevan a convertirse en células tumorales. Éstas tienen que aprender a sobrevivir en un ambiente inicialmente inhóspito -que limita su supervivencia-, y que posteriormente pasa a ser exitoso a través de cambios metabólicos, genéticos y epigenéticos. Es interesante detenerse en explicar la importancia de la interacción entre el tumor y su microambiente, sobre el cual se producirá progresivo crecimiento y la metástasis (Hannagon B y cols., 2013).

Se entiende por microentorno o microambiente al estroma circundante, es decir, al conjunto de fibroblastos, leucocitos, células del sistema inmune, células dendríticas, macrófagos, mastocitos y neutrófilos, células de los vasos sanguíneos y matriz fibrilar que rodean a las células tumorales (Lorusso G y cols., 2008). Se estima que el 85% de los cánceres son carcinomas, es decir, cánceres que se originan en el tejido epitelial y donde el componente clave es el tejido conjuntivo que le nutre, protege y da soporte.

El microambiente tumoral y las interacciones dinámicas y recíprocas entre células tumorales y células sanas está emergiendo como objetivo de estudio para diseñar estrategias terapéuticas y poder predecir la progresión agresiva o no del tumor (Lorusso y cols., 2008).

1.2.4.1.-CELULAS DEL SISTEMA INMUNE

Estudios llevados a cabo en tumores colorrectales hablan de que se produce una respuesta adaptativa en la región tumoral capaz de inhibir el tumor. Sin embargo, durante la progresión tumoral, las células tumorales son capaces de desarrollar algunos mecanismos que evaden la actuación del sistema inmunitario y continuar la progresión del tumor. Así logran evitar el ser detectados y destruidos por el sistema inmunitario, bloqueando la inmunovigilancia.

El microambiente proporciona señales esenciales para el mantenimiento de células madre cancerígenas (células cancerosas iniciadoras) y para promover la siembra de células cancerosas en sitios metastásicos. Además, junto a las células inflamatorias,

los mediadores inmunomoduladores presentes en el microambiente tumoral polarizan la respuesta inmune del huésped hacia la progresión del tumor (Francuz y cols, 2016).

Un número creciente de estudios demuestran una correlación positiva entre la angiogénesis, los fibroblastos asociados a carcinoma y las células inflamatorias. La inmunoterapia se perfila como un camino esperanzador para el tratamiento de este tipo de tumores.

1.2.4.2.- FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son las células más comunes y menos especializadas del tejido conjuntivo y se encargan de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular; son células de abundante retículo endoplasmático rugoso y aparato de golgi, por ser su principal misión el mantenimiento y crecimiento.

Se ha demostrado que los fibroblastos estromales asociados a tumores adoptan un fenotipo diferente. Este fenotipo les dota de una capacidad proliferativa elevada y de una secreción de proteínas a la matriz extracelular, factores de crecimiento y proteasas (Tyan y cols., 2011); es decir son fibroblastos diferentes a los de un tejido no tumoral. (Allien y cols., 2004; Casey y cols., 2009; Trimis y cols., 2009).

Aquí el estroma ya no tiene una misión meramente estructural y pasiva en la proliferación tumoral sino que hay una interacción con las células tumorales pues éstas reclutan fibroblastos para crear su ambiente idóneo (Sloane y cols., 2005).

Por otra parte se ha demostrado que los fibroblastos del espacio tumoral realizan un trabajo inmunocompetente, afectando al crecimiento, diferenciación e invasión de células epiteliales normales (Bhowmick y cols., 2004; Elenbaas y cols., 2001, Holliday y cols., 2007; Kunz-Schughart y cols., 2002).

Posteriores estudios explican que el estroma y sus productos pueden ser oncogénicos transformando cambios fenotípicos en células adyacentes (Tlsty y cols. 2001).

1.2.4.3.- INFLAMACIÓN

En términos generales, una célula puede ser eliminada en cualquier momento de su ciclo celular. La eliminación puede ser a través de mecanismos intercelulares o por agentes externos. La apoptosis es un proceso por el cual una célula entra en degeneración y termina con su eliminación por un mecanismo intracelular; se conoce como suicidio celular. La necrosis es el resultado de la muerte celular por la acción de un agente externo. Aunque la necrosis y la apoptosis tengan un final común, tienen un desencadenante diferente, pues la necrosis genera una serie de reacciones locales que conducen a respuestas de tipo inflamatorio.

En un microambiente tumoral, las células inflamatorias pueden ser las promotoras de tumores, dado que son capaces de fomentar la angiogénesis, de colaborar con la proliferación de células cancerígenas e incluso de la misma invasividad. Se explica porque las células necróticas al morir, liberan factores reguladores activos, que estimulan a las células vecinas viables a proliferar facilitando un crecimiento neoplásico (Grivenkiv y cols., 2010). Se comprueba cómo vuelven a aparecer núcleos tumorales tras un tratamiento que haya provocado la muerte de células malignas por necrosis tumoral.

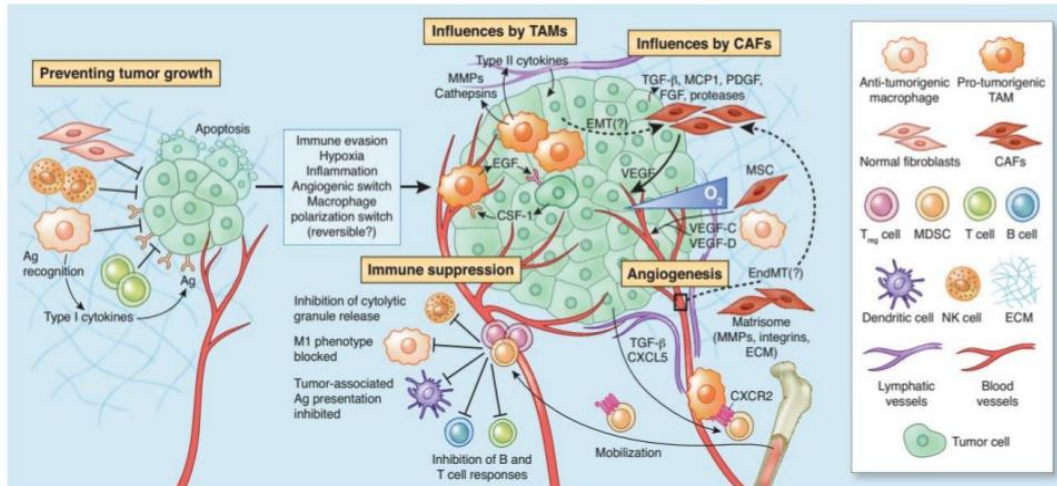
1.2.4.4.- MATRIZ EXTRACELULAR Y MEMBRANA BASAL

La matriz extracelular es un entramado extenso de colágeno, elastina y otras moléculas que dan soporte a la extensa red celular (figura 1.8.).

Las células cancerígenas se comunican con su entorno de forma paracrina (forma de señalización celular en la cual una célula produce una señal que induce a cambios en las células cercanas alterando su comportamiento). Se puede incluso decir que la membrana basal es el soporte del tumor y el que le ayuda a su proliferación.

La población creciente de células tumorales promueve la angiogénesis, es decir, la formación de vasos sanguíneos para proveerse de nutrientes de forma continua. Sufren también cambios metabólicos para poder crecer con poco oxígeno (hipoxia).

Otra función es que llegan a remodelar la matriz extracelular permitiendo la migración del tumor primario a otras zonas, promocionando una invasión y una metástasis.



TAM: Macrófagos asociados al tumor

CAFS: Fibroblastos asociados al cancer

MDSC: Células supresoras de origen mieloide

Figura.1.8.- Soporte del microentorno tumoral (Fredy RS y cols., 2015)

1.2.4.5.- HIPOXIA

El aporte suficiente de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función y fisiología de las células. Los organismos aeróbicos consumen continuamente oxígeno, cuántas más células estén presentes en un tejido más oxígeno necesitan, cuando una célula se divide y origina dos células, el consumo de oxígeno se dobla.

Las células en hipoxia intentan adaptarse pero cuando las condiciones se vuelven extremas, buscan otras tácticas. La deficiencia de oxígeno activa una cascada de señales que induce o reprime una multitud de genes que producen angiogénesis, metabolismo de glucosa, supervivencia o muerte celular, etc.

Se induce entonces la expresión del gen HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) como mantenimiento homeostático del oxígeno. Las células responden al medio hipóxico elevando la expresión de transportadores de glucosa (GLUT1) y enzimas de la glucolisis, donde transformarán el piruvato en lactato y obtener así energía.

1.2.3.6.- ANGIOGÉNESIS

Es el mecanismo utilizado para responder a las necesidades metabólicas del crecimiento de un tumor. Es un proceso capital desde que el núcleo tumoral alcanza solamente unos milímetros de diámetro. Necesita mayor aporte de nutrientes y oxígeno por lo que las células endoteliales generan nuevos vasos sanguíneos y deben proliferar con ayuda del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

El proceso de angiogénesis involucra tres funciones celulares bien definidas: Motilidad, Proteólisis y Proliferación.

Un “encendedor de la angiogénesis” es la hipoxia y otra serie de factores solubles, receptores y moléculas de la matriz extracelular se implican en la morfología de la red vascular. Hay un conjunto de genes inducidos por la respuesta a la hipoxia, que regulan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Se activa el factor HIF-1 el cual hace posible proveer el O₂ necesario a las células cancerosas y mantener el equilibrio homeostático en un medio hipóxico. Otro encendedor de la angiogénesis es la activación del gen RAS, que induce la expresión del VEGF e inhibe la tromboespondina (glicoproteína adhesiva que se secreta a la matriz extracelular de diversas células, interactúan con factores de coagulación sanguínea, factores anticoagulantes)

Una vez que se ha producido la angiogénesis, las células endoteliales cambian su fenotipo pasando de forma plana a forma redondeada, lo cual hace que liberen proteasas que les permiten disolver su capa basal. Posteriormente se implican también en procesos de migración y formación de lumen vascular (Kalas W y cols., 2005).

La nueva vasculatura está formada por pequeños capilares muy porosos, lo que permite la penetración de células tumorales con más facilidad que en los vasos maduros

1.2.4.7.-METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS TUMORALES

Es de interés centrarse en el metabolismo de la célula tumoral para conocer la contribución, tanto a nivel de progresión como en la potencial eficacia terapéutica. Los

cambios metabólicos retroalimentan los principales rasgos del tumor (Santandreu Jaume M, 2013).

Glucolisis y fosforilación oxidativa son las dos rutas metabólicas que suministran energía requerida para la proliferación celular. La glucosa es el sustrato energético preferente frente a la fosforilación oxidativa. Por tanto la proliferación sólo es factible cuando no hay restricción en el aporte de glucosa. La glucolisis proporciona los precursores necesarios para la biosíntesis de moléculas, que está estrictamente regulada por el ciclo celular. La síntesis de componentes celulares se da en la G1 (fase oxidativa del ciclo celular), con actividad funcional de la mitocondria. La progresión a través de las fases de síntesis se da en la S y G2/M, las fases reductivas del ciclo celular que se vincula con la represión de la función mitocondrial y estimula el metabolismo glucolítico, con la producción de especies reactivas de oxígeno. En la fase S se garantiza una menor producción de especies reactivas de oxígeno pues el ADN es vulnerable al daño oxidativo.

La glucosa es captada por la célula y una vez en el citoplasma, se oxida en la glucólisis dando piruvato, ATP y NADH. En aerobiosis el piruvato entra en la mitocondria y se oxida obteniendo CO₂. En hipoxia el piruvato pasa a lactato, para regenerar el NAD⁺, los protones generados en la oxidación se transfieren a la cadena respiratoria y producen un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana interna mitocondrial; el uso de este gradiente de H⁺ por la H⁺-ATP sintasa en la fosforilación oxidativa produce la mayor parte del ATP celular.

La demanda de glucosa en células proliferativas es mayor, se produce un cambio metabólico debido a un aumento de la actividad glucolítica y una alteración de la actividad mitocodrial (Semenza G L y cols., 2001).

1.2.4.8. METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CÉLULAS TUMORALES

Las mitocondrias están involucradas directa e indirectamente en las alteraciones metabólicas observadas en las células tumorales que podrían estar relacionadas con la dependencia que tienen por la glucosa y contribuyen así, a su malignidad. Se ha descrito que los tumores tienen una tasa respiratoria menor, lo cual estaría de acuerdo con un menor número y tamaño de sus mitocondrias en comparación con células normales. Los niveles y actividad de los enzimas involucrados en la cadena respiratoria mitocondrial tales como la citocromo C oxidasa y adenosina trifosfato–ATP-sintetasa se encuentran disminuidos en diferentes tipos de tumores humanos en comparación con el tejido normal. Además, se ha descrito que el potencial de membrana mitocondrial es más elevado en las células tumorales que en las células epiteliales sanas.

La mayoría de tumores humanos presentan mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial. Aunque estas mutaciones pueden surgir como resultado de la progresión tumoral, algunas podrían participar activamente en ésta a través de la estimulación cooperativa de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la glucólisis aerobia y el crecimiento tumoral. Las disfunciones mitocondriales primarias tienen una repercusión directa sobre el metabolismo y la proliferación de las células cancerosas, así, se ha visto que las alteraciones genéticas en la enzima fumarato hidratasa (proteína localizada en la matriz mitocondrial) y en la enzima succinato deshidrogenasa (proteína presente en la membrana interna mitocondrial) podrían tener una implicación causal en el desarrollo del tumor.

La falta de oxígeno determina la forma por la que se genera la energía metabólica, es decir, la preferencia de la glucosa frente a otros sustratos, asociado a una disminución de la respiración tumoral. Ocasiona una pérdida neta de carbono que podría usarse para las reacciones anabólicas, lo cual es compensado en las células tumorales incrementando mucho el consumo de glucosa respecto a una célula sana.

Es de reciente interés el estudio del estrés oxidativo. Múltiples estudios muestran la relación de las especies reactivas de oxígeno con la proliferación de la célula tumoral, inducción de la apoptosis y la eficacia de fármacos antitumorales (Santandreu, 2013).

Las especies reactivas de oxígeno son subproductos del metabolismo celular y se producen mayoritariamente en las mitocondrias debido a la transferencia incompleta de electrones al oxígeno durante el proceso de fosforilación oxidativa. Aunque en un primer momento las especies reactivas de oxígeno se consideraron agentes que causaban daño oxidativo aleatorio sobre macromoléculas celulares, hoy se sabe que actúan como mensajeros en la señalización celular que modula, entre otros procesos, la proliferación en el cáncer (Martindale JL y cols., 2002). La aparente complejidad del estudio de las especies reactivas de oxígeno en el cáncer se simplifica al entender que determinados niveles o concentraciones celulares de especies reactivas de oxígeno son normales y compatibles con un adecuado funcionamiento celular y propio de la quiescencia de las células diferenciadas. Niveles por encima de los habituales provocarían la muerte celular. La estimulación farmacológica de la producción de especies oxidativas y/o depleción de metabolitos protectores, como el glutatión y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), pueden conducir a una situación de estrés oxidativo y a la inducción de apoptosis en las células tumorales (Engel RH, 2006).

1.2.4.9.-EFECTO WARBURG

Otto Von Warburg descubrió en el año 1931 que las células cancerosas realizaban una glicolisis aeróbica, por la que producen grandes cantidades de lactato, como consecuencia originan gran cantidad de protones (recuérdese que en el sexto paso de la glicólisis, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) al fosforilar el gliceraldeído 3-fosfato (G3P) produce 2 protones por cada molécula de G3P). Tantos protones en el medio extracelular provocan que se acidifique el medio, perjudicando la actividad enzimática y alterando el metabolismo. Ensayos *in-vitro* han demostrado que las células tumorales poseen un control del balance ácido-base desregulado en comparación con células normales. Las células tumorales poseen un pH más ácido estimando valores de 6.2 a 6.9 mientras que en las células normales se estiman valores

de entre 7.3-7.4. La diferencia entre los valores de pH intra y extracelular crea un gradiente de pH a través de la membrana plasmática y éste es capaz de alterar el funcionamiento y metabolismo normal de la célula (Ghesquière B, 2014; Pavlova NN y cols., 2016).

Este aumento en la glicolisis aeróbica, conocido como el efecto Warburg, se ha observado en muchos tipos de cáncer incluyendo el colorrectal (Ward PS, 2012).

1.2.4.10.- POTENCIAL DE MEMBRANA

El potencial de membrana (V_m), es el voltaje a través de la membrana plasmática que surge por la presencia de diferentes canales y/o transportadores de iones con selectividad y permeabilidad específicas. El potencial de membrana es una señal biofísica clave en células pues modula importantes actividades celulares, como la proliferación y diferenciación.

En una célula sana, en la membrana plasmática tiene varios canales iónicos y transportadores con una permeabilidad diferente según los iones, tales como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , la distribución desigual de estos iones provoca una diferencia de carga entre el citoplasma y el microambiente extracelular (potencial de membrana, V_m) y se expresa en relación con el entorno extracelular.

Una célula se despolariza cuando la V_m es menos negativa, mientras que una célula hiperpolarizada cuando es más negativa. V_m cambia debido a alteraciones en el transporte de uno o más tipos de iones.

La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz muestra que el V_m depende de:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{p_K [\text{K}^+]_o + p_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_o + p_{\text{Cl}} [\text{Cl}^-]_i}{p_K [\text{K}^+]_i + p_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_i + p_{\text{Cl}} [\text{Cl}^-]_o} \right)$$

(P): Permeabilidad de las concentraciones intracelulares y extracelulares de los iones

(R): Constante de los gases

(T): Temperatura

(F): Constante de Faraday

Se experimenta una despolarización significativa en el potencial de membrana durante la transformación maligna de células normales (Tokuoka y Morioka, 1957, Johnstone, 1959). Las comparaciones directas *in vitro* e *in vivo* de los niveles de potencial de membrana entre las células mamarias normales y cancerosas (Marino y cols., 1994), hepatocitos y células de carcinoma hepatocelular (Binggeli y Cameron, 1980, Stevenson y cols., 1989), los tejidos adrenocorticales normales y neoplásicos (Lymangrover y cols., 1975), fibroblastos embrionarios normales y fibrosarcoma (Binggeli y Weinstein, 1985), células cutáneas benignas y cancerosas (Melczer y Kiss, 1957, Woodrough y cols., 1975) mostraron que las células tumorales tienden a ser más despolarizadas que sus homólogas sanas, es decir, menos negativas. El nivel de Na^+ intracelular es marcadamente más alto en los tumores en comparación con los tejidos no cancerosos, mientras que el nivel de K^+ permanece más estable (Smith y cols., 1978, Camarón y cols., 1980, Sparks y cols., 1983). En tejidos humanos se ha experimentado que las células tumorales que proliferan rápidamente, mostraron un potencial de membrana despolarizada, mientras que las células somáticas no proliferantes, como las células musculares y las neuronas, se caracterizan por su potencial hiperpolarizado (Binggeli y Weinstein 1986).

En 1986 R. Bingelli y C. Weinstein establecieron la siguiente clasificación:

- Potencial de la membrana de la célula: desde -100mV hasta 0mV
- Células sanas no proliferantes: entre -100 y -75mV
- Células alteradas pero benignas: entre -75 y -35mV
- Células tumorales cancerosas: entre -35 y -5mV

La evidencia *in vivo* demuestra que la propia despolarización de la membrana, independientemente de los tipos de iones y las proteínas del canal iónico/transportador, es capaz de provocar un aumento de la proliferación con un cambio de morfología y angiogénesis anormal en embriones. Recientes estudios concluyen que las células cancerosas poseen propiedades bioeléctricas distintas. Un potencial de membrana despolarizado favorece la proliferación celular, activando el ciclo celular (figura 1.9.) (Ming Yang y cols., 2013).

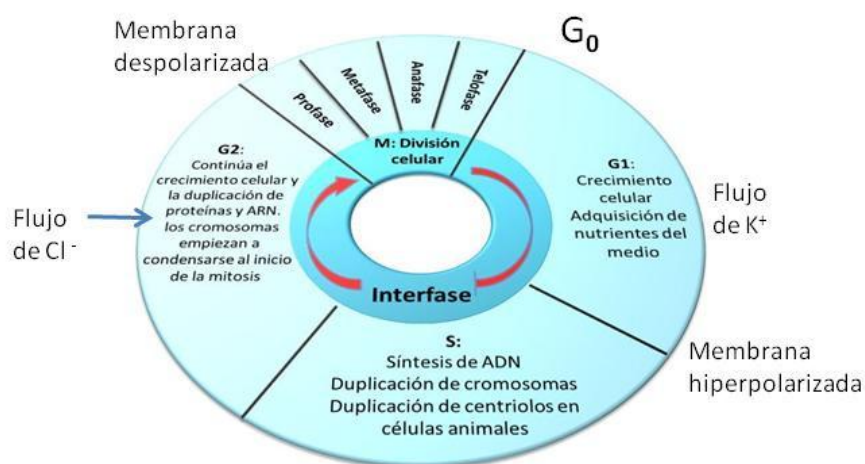


Figura 1.9: Diagrama del ciclo celular con polarización de membrana

En general, tanto en las células tumorales altamente proliferativas como en las no tumorales, se cree que la despolarización sirve como una señal que podría iniciar la mitosis y la síntesis del ADN (Orr y cols., 1972; Binggeli y Weinstein, 1986). La alteración artificial de V_m alterando el ambiente iónico extracelular o aplicando el inhibidor de Na^+/K^+ -ATPasa reveló resultados interesantes: primero, las células CHO (células derivadas del ovario de hámster chino) hiperpolarizantes a -45 mV comenzaron a inducir detención mitótica y la división celular se bloqueó completamente a -75 mV. El ciclo celular se reanudó despolarizando las células hasta -10 mV (Cone, 1971). En segundo lugar, las neuronas de médula espinal inactivas (G_0) maduras de pollo mostraron actividad mitótica después de la despolarización (Cone y Cone, 1976). Por lo tanto, el V_m despolarizado en células cancerosas podría considerarse como una "señal proliferativa de soporte" que induce a las células a avanzar rápidamente en su ciclo celular.

El ciclo de duplicación de las células tumorales sigue el esquema de las 5 fases: G_0 , G_1 , S, G_2 y M, al igual que las demás células sanas. El tiempo total de duplicación supera al de las células normales por tanto, junto al desequilibrio en el crecimiento y la no pérdida de células tumorales inducen al origen progresivo del tumor.

Otro efecto importante a nombrar sobre el potencial de membrana en células tumorales es que la hiperpolarización es necesaria para la diferenciación de las células

madre. Por ejemplo, tanto la osteogénesis como la adipogénesis se obstaculizan en células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) en condiciones de despolarización. Por lo tanto, en el ambiente tumoral, la despolarización de la membrana podría ser importante para la aparición y el mantenimiento de células madre de cáncer (CSC), dando lugar a un crecimiento sostenido del tumor.

La señal bioeléctrica en las células tumorales puede ser clave, podría ser un marcador clínico valioso para la detección de tumores con valor pronóstico, e incluso podría ser modificado artificialmente con el fin de inhibir el crecimiento tumoral y metástasis.

Lo anteriormente expuesto ocurre en el microambiente tumoral y habría que considerarlo en la administración de los fármacos terapéuticos dirigidos al ambiente intracelular y extracelular, o incluso que se dirijan a los canales iónicos, para que se les pueda dar el enfoque terapéutico idóneo.

1.2.4.11-ALTERACIÓN EN LA ADHESION CÉLULAR

La morfología celular, la organización y la disposición en células sanas viene facilitada por unas moléculas llamadas moléculas de adhesión celular (CAM). El conocimiento de la función de las proteínas de adhesión determina, en gran parte el comportamiento patológico de las células tumorales (Zúñiga C y cols., 2014). Es conocido que el ensamblaje de los tejidos orgánicos está determinado por interacciones moleculares a nivel celular y esto no puede ser posible sin la expresión regulada de las CAM. Consiguen el ensamblaje célula-célula y el ensamblaje célula-matriz celular, éstas últimas conocidas como integrinas (Lafrenie R y cols., 2007). Las células cancerosas muestran disminuida la adhesividad célula-célula consiguiendo escapar del tumor primario y difundir así a tumores secundarios en lugares anatómicamente diferentes: con la acción de la proteína que degrada la matriz extracelular, provocando la metástasis. Pueden usar vías diversas, aprovechando cavidades o superficies corporales, o bien otras rutas vía linfática o vía hematológica.

Moléculas como E-cadherina disminuyen su expresión favoreciendo el no ensamblaje célula-célula y por tanto la migración y la invasión celular, son calcio dependientes.

La metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos e intervienen en la rotura de la matriz extracelular. Son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, capaces de degradar componentes esenciales de la matriz. La degradación de la matriz extracelular es crucial para el crecimiento del tumor (Cascales Angosto M y cols., 2010).

Por tanto, el proceso de invasión de las células malignas se podría esquematizar según el siguiente esquema (Zúñiga C y cols., 2014):

1. Cambios que alteran la adhesión celular
2. Disminución de la expresión de las moléculas de adhesión
3. Evasión de las vías apoptóticas
4. Sobreexpresión de genes que permiten la proliferación celular
5. Degeneración proteolítica de la matriz extracelular
6. Metástasis

1.2.4.12- METÁSTASIS

Los procesos que dictan la malignidad de un tumor son la capacidad de invadir e infiltrar los tejidos adyacentes y el poder migrar hacia tejidos más distantes. No son procesos que ocurren de manera casual sino que ocurren por una serie de cambios genéticos en el tumor, una expresión de proteínas que permiten la separación de células, romper la membrana basal y viajar por el torrente sanguíneo.

Un ejemplo es el caso del melanoma, un tamaño inicial de 0.76 mm es avascular pero si supera los 0.9 mm ya presenta neo-vasculatura y el porcentaje de metastatizar es muy alto. Otros tumores como el de vejiga, riñón y cuello de útero suelen permanecer avasculares varios años. El aumento de tamaño determina la invasión local y la metástasis.

La proliferación de células tumorales en un nuevo órgano depende de:

- La vascularización del nuevo órgano a invadir
- Presencia de factores de crecimiento tisulares sintetizados *in situ*.

Se van generando diferentes clones de células tumorales y se van adaptando a los nuevos microambientes, así que no todos los clones malignos son iguales, hay mucha inestabilidad genética aunque tengan el mismo origen. La mayor información se encuentra en el estudio de la primera angiogénesis (Kerbek, 2008).

El cáncer de colon suele hacer metástasis en el hígado y con menor frecuencia, en los ganglios linfáticos abdominales, hígado, pulmón, peritoneo, ovario, glándulas suprarrenales, pleura, huesos y cerebro (Kemeny N, 2015), entre otros.

Los pacientes con mejor pronóstico son los que presentan metástasis única, de tamaño menor a 5 cm, sin ganglios positivos en el tumor primario y con un nivel de antígeno carcinoembrionario en sangre menos del 200mg/ml (Butte B y cols., 2007). El factor ganglionar es la variable más significativa.

Las metástasis hepáticas son la causa más frecuente de muerte en el cáncer colorrectal. El desarrollo del estudio en la anatomía del hígado y la mejora de cualificación en la cirugía hepática para la resección, junto con las opciones quimioterápicas, están haciendo que pueda llegar a ser el pronóstico más eficaz y esperanzador, empieza a haber rescates de pacientes que hace unos años no tenían opción terapéutica. Aún así, el pronóstico suele ser de alto riesgo de recidiva local o sistémica (Butte B y cols., 2007).

La afectación ganglionar influye en el pronóstico de los pacientes y en la elección del tratamiento. Para llevar a cabo este estudio podría ayudar a la determinación del ganglio centinela. Su concepto surge a partir de que la diseminación linfática de las células tumorales es un proceso cuya migración inicial se produce en un foco ganglionar inicial (ganglio centinela) antes de afectar al resto. Conocer el ganglio centinela ayudará a identificar en un margen pequeño de ganglios, el estadiaje más preciso en el paciente.

El trayecto a seguir, dictado por las estaciones ganglionares es: ganglios paracólicos, ganglios intermedios, ganglios principales y ganglios lateroaórticos y preaórticos.

1.2.5.-DIAGNÓSTICO DEL CANCER COLORRECTAL

Los síntomas del cáncer de colon suelen ser diversos. Los más frecuentes son: sangre en la materia fecal, cambios en los hábitos de la defecación, diarrea, estreñimiento, sensación de que el intestino no se vacía completamente, heces más delgadas de lo normal, dolor frecuente ocasionado por gases, flatulencia, saciedad o calambres, pérdida de peso sin razón aparente, cansancio e incluso vómitos.

Para diagnosticar el cáncer de colon se utilizan pruebas como:

- Examen físico y antecedentes médicos de otras enfermedades.
- Examen digital del tracto rectal.
- Prueba de sangre oculta en la materia fecal.
- Enema de bario.
- Sigmoidoscopia.
- Colonoscopia.
- Biopsia.

Después de obtener un primer diagnóstico del cáncer de colon y que éste dé indicios de alta probabilidad, se realizan pruebas para determinar si las células cancerosas se han diseminado dentro del colon hasta otras partes del cuerpo (estadificación): exploración por TAC (Tomografía Axial Computarizada), imágenes por resonancia magnética (IRM), exploración por tomografía por emisión de positrones (TEP), radiografía de tórax, biopsia de ganglios linfáticos, recuento sanguíneo completo (PSC) y prueba del antígeno carcinoembrionario (ACE), entre otras.

Otra forma de diagnóstico es a través de los marcadores tumorales. Las guías oncológicas sólo recomiendan una minoría de marcadores tumorales para su utilización rutinaria, para identificar a las personas susceptibles de cáncer colorrectal hereditario

no polipósico y la mutación de APC en el diagnóstico de la poliposis adenomatosa familiar (Menéndez-Sánchez y cols., 2013).

La ausencia de sensibilidad como de especificidad en las fases precoces de la enfermedad neoplásica limita estrictamente la utilización sistemática de la mayoría de los marcadores en el cribado de pacientes asintomáticos. El estadiaje de la enfermedad en el momento de su diagnóstico -determinado por el tamaño tumoral-, el grado de diferenciación citológica y la afectación ganglionar- constituye el indicador pronóstico más utilizado en pacientes con cáncer colorrectal. El valor pronóstico de los marcadores tumorales radicarán en la relación que se establece con el tamaño tumoral o con la presencia de metástasis.

1.2.6.-TRATAMIENTO

El tratamiento establecido se pronostica en función de la extensión del mismo, aunque también pueden ser decisivos otros factores.

La cirugía suele ser el tratamiento principal en pacientes de escasa o nula metástasis. Se utiliza a su vez, el tratamiento quimioterápico.

Si hacemos un análisis por etapas:

Tratamiento en la **ESTADIO 0**: el cáncer no ha crecido más que el revestimiento interno del colon, se usa la cirugía con la extirpación del pólipo (polipectomía) por medio de un colonoscopio. Si es demasiado grande, se procede a una colectomía parcial

Tratamiento en la **ESTADIO I**: el cáncer ha alcanzado las capas de la pared del colon sin invadir ganglios. Si se procede a cirugía y se extrae completamente, no es necesario otro tratamiento, si se ven células cancerosas en los bordes, se procede a la colectomía parcial sin más tratamiento.

Tratamiento en la **ESTADIO II**: ya han crecido por la pared del colon y posiblemente a tejidos periféricos, sin acceso a ganglios linfáticos. Se recomienda ya, aunque con ciertas discrepancias, el uso de quimioterápicos además de la colectomía parcial. La quimioterapia de elección es el 5-Fluorouracilo y Leucovorin o capecitabina, (se puede incluir alguna variable). Si no hay certeza de una extirpación total, se puede recomendar radioterapia.

Tratamiento en el **ESTADIO III**: hay propagación hacia los ganglios linfáticos cercanos, sin llegar a otras partes del cuerpo. Se procede a cirugía con la extirpación de la zona de colon invadida y ganglios, seguida de quimioterapia.

Para la quimioterapia, el régimen FOLFOX (5-FU, leucovorín, y oxaliplatino) o el CapeOx (capecitabina y oxaliplatino) se usan con más frecuencia, aunque algunos pacientes pueden recibir 5-FU con leucovorín o capecitabina sola según la edad y sus necesidades de salud. Se puede aplicar también radioterapia.

Tratamiento en el **ESTADIO IV**: se han propagado desde el colon hasta órganos y tejidos distantes. Con más frecuencia el cáncer de colon se propaga al hígado, aunque también se puede propagar a otros lugares, tal como a los pulmones, el peritoneo (la membrana que reviste la cavidad abdominal) o a los ganglios linfáticos distantes.

Es poco probable que la cirugía cure estos cánceres. Sin embargo, en el caso de haber pocas y pequeñas áreas de propagación (metástasis) en el hígado o los pulmones y se pueden extraer junto con el cáncer de colon, se puede afirmar que la cirugía puede ayudar. Se realiza una colectomía parcial para eliminar la sección del colon que contiene el cáncer junto con los ganglios linfáticos cercanos, además de la cirugía para eliminar las áreas de propagación del cáncer. Se administra quimioterapia. Si las metástasis no se pueden extirpar debido a que son muy grandes o hay demasiadas, se puede administrar quimioterapia antes de cualquier cirugía (quimio neoadyuvante).

Los regímenes son:

- FOLFOX: leucovorín, 5-FU, y oxaliplatino
- FOLFIRI: leucovorín, 5-FU, e irinotecán
- CapeOX: capecitabina y oxaliplatino
- FOLFOXIRI: leucovorín, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán
- 5-FU y leucovorín por sí solos o junto con un medicamento de terapia dirigida

La combinación con varios quimioterápicos eleva la tasa de éxito hasta un 45%. Desafortunadamente, los agentes quimioterapéuticos utilizados, a menudo tienen

efectos secundarios no deseados, limitando sus aplicaciones en tratamientos oncológicos clínicos.

Para paliar esto, en las últimas décadas han surgido dos estrategias:

1. Diseño y desarrollo de nuevos derivados quimioterápicos con mejores propiedades físicoquímicas y farmacológicas, de manera que puedan ser utilizados para modular los procesos moleculares y las vías relacionadas con la progresión del tumor.
2. Desarrollo de la nanomedicina en la administración de fármacos para mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios de la quimioterapia existente.

1.3.- 5-FLUORURACILO

El 5-fluorouracilo (5-FU) (figura 1.10.), uno de los agentes quimioterapéuticos más importantes y ampliamente utilizados para el cáncer colorrectal. Se introdujo por primera vez como anti-metabolito en el año 1957 (Jhansi Rani V y cols., 2012).

Se emplea principalmente para el tratamiento de determinados adenocarcinomas del tubo digestivo (colon, páncreas y estómago), pero también tiene un efecto positivo en los tratamientos de cáncer de mama, con menos eficacia en carcinomas de ovario, próstata, cuello uterino, vejiga urinaria y orofaringe.

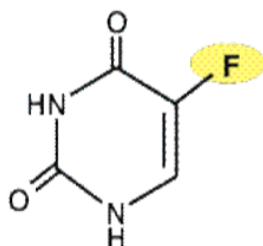


Figura 1.10. Fórmula química del 5-FU.

Antes del año 2000, el 5-FU fue la única quimioterapia citotóxica disponible en el entorno adyuvante para pacientes con cáncer de colon en estadio III. Muchos de los primeros estudios aleatorizados de 5-FU en el entorno adyuvante no consiguieron una mejoría significativa (Sasako y cols., 2014). En estos ensayos se utilizó 5-FU sólo o 5-FU con Semustina (metilo-CCNU). Actualmente se utiliza en combinación con otros

quimioterápicos, lo que eleva la tasa de éxito hasta un 45%. Algunos productos comerciales que contienen 5-FU son Xeloda[®], Carac[®], Efudex[®], Fluoroplex[®] y Aducril[®].

1.3.1.- MECANISMO DE ACCIÓN

El 5-FU es un agente antineoplásico perteneciente al grupo de los antimetabolitos, los cuales actúan en la fase de síntesis del ciclo celular al interferir en la síntesis de ARN (ácido ribonucleico) y ADN (ácido desoxirribonucleico) a nivel de la timidilato sintasa (TS).

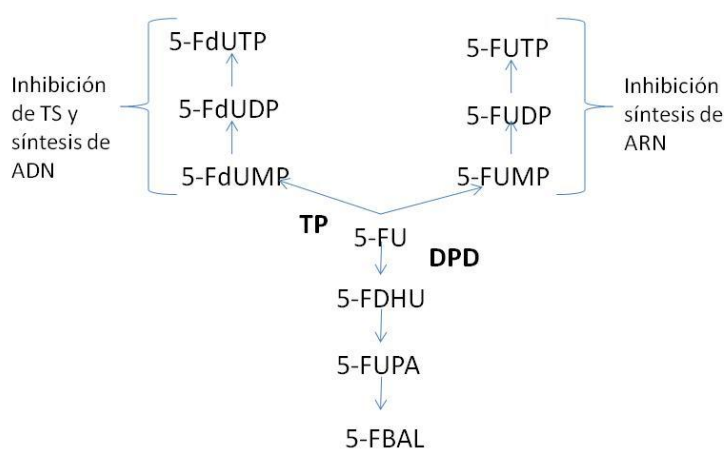


Figura 1.11. Esquema del mecanismo de acción del 5-Fluorouracilo.

Para que actúe el 5-FU sobre el ARN, éste debe transformarse en monofosfato de fluorouracilo, lo que puede hacer de 2 formas:

- Por transferencia directa de una ribosa desde el fosforribosilpirofosfato al 5-FU, catalizada por ácido-fosforribosiltransferasa.
- Unión de una ribosa al 5-FU mediante una uridina-fosforilasa para tomar la fluorouridina. Así la molécula experimenta una fosforilación con uridinaquinasa originando el monofosfato de fluorouracilo, y éste experimenta dos fosforilaciones a través de la pirimidina monofosfato quinasa y pirimidina difosfato quinasa, respectivamente. Entonces así es incorporado al ARN bloqueando la actividad del ADN y su síntesis.

A nivel del ADN, el 5-FU es transformado por varias enzimas en fluorodeoxiuridilo monofosfato (5-FdUMP), (figura 1.12.) y fluorodeoxiuridilo difosfato (5-FdUDP), que se incorporan a nivel de la ADN polimerasa en vez de la timidina trifosfato, produciendo un ADN aberrante.

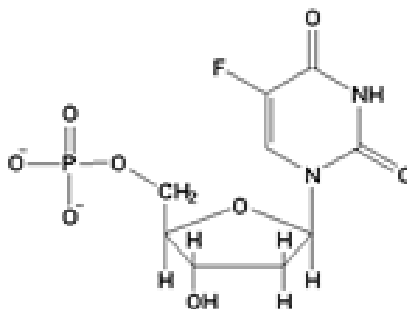


Figura 1.12.: Fórmula química del 5-FdUMP.

1.3.2.- CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad durante las primeras 24 h de la exposición de la célula al 5-FU se observa en la fase S del ciclo celular, probablemente ocasionada por los efectos del fármaco sobre el ADN. A su vez, a las 24 h se observa también una citotoxicidad en la fase G1, probablemente consecuencia de la incorporación del 5-FU al ARN.

La selectividad del 5-FU hacia las células en división rápida se debe a que las concentraciones de timidilato sintasa son 20 veces mayores en las células en división que en las células no proliferantes (Landis y cols., 1999).

Reciente bibliografía científica ha conocido que los fármacos anticancerosos como el cisplatino y el 5-fluorouracilo, a dosis clínicamente relevantes, ocasionan un impacto significativo sobre la estructura y función mitocondrial de las células de cáncer de colon (Santandreu 2013). Resultados demuestran que la eficacia de agentes antitumorales que actúan por diferentes mecanismos de acción, dependen a su vez de la rapidez con la que provocan toxicidad oxidativa mitocondrial y desequilibran los sistemas de defensa antioxidante en las células de cáncer de colon.

1.3.3. QUIMIORRESISTENCIA

La resistencia del 5-FU desarrollada por las células malignas puede deberse a diversos mecanismos, como reducción o desaparición de la actividad de enzimas activantes, reducción de la biodisponibilidad de cofactores, competición por algunos sustratos, aumento de la selectividad de enzimas asociadas al catabolismo del fármaco, principalmente.

Según estudios sobre la quimioresistencia de células de cáncer de colon y 5-FU, se sabe que hay una interacción dinámica produciéndose una reparación del ADN (BER), una reparación con una escisión de la base (Khoei S y cols., 2017). Consiste en eliminar el ADN dañado y por tanto, anular el efecto citotóxico. Hay varias vías de reparación del ADN dañado implicadas en el reconocimiento de 5-FU genómico. Las principales etapas del BER implican:

1. Eliminación de la base modificada o inapropiada, tal como el uracilo, por una ADN glicosilasa
2. Escisión del esqueleto fosfodiéster en el sitio AP resultante por una endonucleasa o liasa
3. Limpieza del extremo terminal 3' ó 5'
4. Sustitución del nucleótido extirpado por una polimerasa
5. Sellado del corte final del ADN por una ligasa.

Sin embargo, el agente químico methoxyamine (Mx) puede interferir en esta vía de reparación (Hughes LL, 1992), puede prevenir la reparación y potenciar la citotoxicidad del 5-FU. Mayor concentración de 5-FU y Mx disminuye el porcentaje de supervivencia y proliferación tumoral, aumentando por tanto la toxicidad (Khoei y cols., 2017)

Otros estudios para evitar la quimioresistencia al 5-FU versan sobre el silenciamiento del ID1 (inhibidor de las proteínas de unión del ADN), (Przybyła T y cols., 2017). La ID se sobreexpresa en los cánceres, pues promueven la progresión del ciclo celular, retrasan la senescencia y ayudan a la migración celular. Son buenos blancos para terapias de cáncer sistémico sin inhibir el funcionamiento de la mayoría de las células normales, porque prácticamente no se encuentran muy presentes en células adultas

diferenciadas. Silenciar el ID1 reduce significativamente el nivel de ARNm de timidina fosforilasa, uridina-citidina quinasa 2 y dihydropirimidina deshidrogenasa. La supresión de ID1 en células HCT-116 dio como resultado un aumento del nivel de ARNm para timidina fosforilasa, timidina quinasa y uridina-citidina quinasa 2 con caída simultánea de dihidropirimidina deshidrogenasa y niveles de ARNm de timidilato sintetasa. En conclusión, la expresión de ID1 afecta la sensibilidad de las células de cáncer de colon a 5-FU y puede ser considerado como un potencial marcador predictivo en el tratamiento.

1.3.4.- EFICACIA

Como se ha indicado anteriormente, en el cáncer colorrectal, después de la resección completa, la supervivencia global a los 5 años varía en función de la etapa inicial. La quimioterapia adyuvante está indicada en pacientes con cáncer de colon en el estadio de alto riesgo II, estadio III y después de la resección completa de la metástasis.

Se sabe que en las primeras etapas del cáncer, las células tumorales son más sensibles a la quimioterapia que las células normales, pero, conforme progresa la enfermedad, las células cancerosas pierden su sensibilidad preferencial a los mismos tratamientos (Santandreu M, 2013).

Administrar de forma pautada el 5-FU, sólo o modulado con Levamisol o Leucovorina (LV), fluoropirimidinas orales, Raltitrexed, Irinotecan y Oxaliplatino ha sido eficaz como terapia adyuvante para el cáncer de colon.

Hoy en día, los regímenes de administración basados en oxaliplatino, FOLFOX o FLOX, son considerados como una interesante quimioterapia adyuvante estándar. FOFLOX es el acrónimo de una combinación quimioterápica compuesta por los siguientes fármacos neoplásicos: 1) FOL (ácido fólico, o Leucovorina: vitamina B que potencia la eficacia del 5-FU, 2) F: 5-FU, y 3) OX: Oxiplatino, derivado del platino cuyo mecanismo de acción provoca la muerte de células cancerosas a nivel de ADN. En el caso en que existieran contraindicaciones para el OX, las mejores alternativas son Capecitabina o infusión continua de 5-FU/LV. El papel de los anticuerpos monoclonales, Cetuximab y Bevacizumab, en combinación con quimioterapia adyuvante basada en

fluoropirimidinas-OX está bajo investigación clínica (Barrera y cols., 2008). (Barrera y cols., 2008).

Por tanto, puede afirmarse que el 5-FU ha sido una piedra angular en el tratamiento del cáncer colorrectal en los últimos decenios. Al poder convertirse en nucleótidos citotóxicos, que, o bien inhiben la timidilato sintasa o bien, se incorporan en el ARN y el ADN. Como es bien conocido el 5-FU, se metaboliza a su forma inactiva, 5,6-dihidro-5-FU, por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD). La DPD es la enzima limitante de la velocidad del catabolismo de las pirimidinas, tales como uracilo y timidina, y la síntesis de β -alanina. Hay que tener en cuenta que la disminución de la actividad de la DPYD puede conducir a la acumulación de 5-FU en el organismo (Yong y cols., 2006).

El gen DPYD codifica la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), una enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad en el metabolismo del fluorouracilo. Los individuos que llevan al menos una copia de variantes DPYD sin función, como DPYD*2A, pueden no ser capaces de metabolizar el fluorouracilo a ritmos normales y corren el riesgo de toxicidad potencialmente mortal para el fluorouracil, como la supresión de la médula ósea y la neurotoxicidad (Dean L, 2012) La etiqueta de fármaco aprobada por la FDA para fluorouracil afirma que "rara vez, severa toxicidad (por ejemplo, estomatitis, diarrea, neutropenia y neurotoxicidad) asociado con 5-fluorouracilo, atribuido a la deficiencia de actividad de la dipirimidina deshidrogenasa". Se han publicado recomendaciones de dosificación para fluoropirimidinas (capecitabina, fluorouracilo y tegafur) basadas en el genotipo DPYD, recomendando el uso de un fármaco alternativo para este tipo de pacientes.

1.3.5.-FARMACOCINÉTICA

Si hablamos de la farmacocinética del 5-FU, se puede administrar por vía tópica y parenteral. No se administra por vía oral debido a que su absorción digestiva es muy baja y variable. Después de su administración tópica (generalmente dosis de 1 g en la piel), se absorbe aproximadamente el 6% de la dosis. Una vez en el organismo, el

fármaco se distribuye ampliamente, atravesando la barrera hematoencefálica y alcanzando concentraciones significativas en el líquido cefalorraquídeo, manteniéndose aquí incluso varias horas; también accede al líquido pleural y ascítico.

Tras su administración intravenosa se observa una farmacocinética no lineal. A medida que aumentan las dosis intravenosas, disminuye la captación hepática, aumenta su biodisponibilidad, aumentando el área bajo la curva y reduciéndose el aclaramiento plasmático. Este fenómeno puede deberse a procesos de saturación en la metabolización del fármaco (Longley y cols., 2003; Turkington y cols., 2014).

Se conoce que una parte de la dosis administrada de 5-FU se transforma en metabolitos activos: fluorouridina trifosfato y fluorodesoxiuridina mono y difosfato en los distintos tejidos a los que accede. El resto, un 85% es catabolizado por una enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) a una dihidropirimidina. Dicha enzima está presente en todo el organismo de forma variable, lo que hace que los niveles de 5-FU sean impredecibles. Por lo tanto es importante conocer los niveles en el individuo de esta enzima, pues niveles muy bajos, hace que el 5-FU sea muy tóxico.

En general, se prefiere una administración por infusión continua (6-8 horas) que da mejores resultados antitumorales y produce menores efectos hematológicos tóxicos que la administración en bolo (2-3 minutos) a igual dosis. Después de la administración intravenosa de 5-FU, la semivida plasmática de este principio activo es de unos 16 minutos (entre 8 y 20 minutos), y es dosis dependiente, al contrario que sus metabolitos que tienen una semivida plasmática muy prolongada (Florez, 2008). El 5-FU se puede administrar también por vía intraarterial mediante infusión en la vena hepática. Entonces se produce una primera metabolización del 19-52%, llegando a generarse niveles del 12 al 52% de lo administrado por vía intravenosa con la misma dosis por vía intravenosa. La administración intraarterial se reserva para el tratamiento de las metástasis hepáticas de carcinoma de colon. Finalmente con la administración por vía intraperitoneal se consigue que el fármaco llegue a la circulación portal, pasando por el hígado antes que a la circulación sistémica.

Los pacientes con insuficiencia renal y actividad normal de la dihidropirimidina no requieren ajuste de dosis, pacientes con insuficiencia hepática puede ser conveniente reducir la dosis, sobre todo si los niveles séricos de bilirrubina son $>5\text{mg/dL}$. (según Vademecum).

El 5-Fluorouracilo sin alterar y sus metabolitos son eliminados primariamente a través de la bilis y la orina.

Numerosas investigaciones han procurado la mejora de la actividad terapéutica del 5-FU. Por ejemplo: *a)* mediante la combinación con otros antitumorales, aunque de forma general no se ha obtenido una mayor tasa de respuesta; *b)* el uso simultáneo con agentes modificadores biológicos como el ácido fólico y el metotrexato, los cuales interactúan con los mecanismos de acción del 5-FU; y, *c)* la infusión continua para incrementar el porcentaje de células tumorales afectadas.

1.3.6.- ADMINISTRACIÓN Y POSOLOGÍA

Según el *Vademecum*, para el tratamiento del cáncer colorrectal, la administración intravenosa de adultos es en forma de bolo entre 300 y $500\text{ mg/m}^2/\text{día}$ durante 4 o 5 días cada 4 semanas; o 600 a $1500\text{ mg/m}^2/\text{día}$ i.v. una vez a la semana en semanas alternas. En estudio, en pacientes con cáncer colorrectal avanzado, el tratamiento con una combinación de 5-FU, Doxorubicina y mitomicina, ocasiona una respuesta completa en un 26% y parcial en un 37% de los pacientes con metástasis hepática. Las dosis de 5-FU administradas fueron de 600mg/m^2 los días 1, 8, 29 y 36 de 8 semanas.

Administración intravenosa de infusión continua en adultos a dosis de 300 y $1000\text{ mg/m}^2/\text{día}$ durante 4-5 días en forma de infusión continua cada 4 semanas o $300\text{mg/m}^2/\text{día}$ indefinidamente. Se ha llegado a administrar dosis de hasta 3000 - 4000mg/m^2 en 24-72h si se vieron importantes síntomas de neurotoxicidad y leucopenia.

Como adyuvante en el tratamiento del cáncer colorrectal en el Estadío III en combinación con levamisol, se da una administración intravenosa en bolo para adultos a dosis de 450 mg/m²/día de 5-Fu y 50 mg de levamisol, durante 5 días a los 21-35 días de la cirugía. Posteriormente se pautan dosis de mantenimiento durante 48 semanas.

Como adyuvante en el tratamiento del cáncer colorrectal en el Estadío III en combinación con leucovorina, se da una administración intravenosa en bolo para adultos 370mg/m²/día después de la leucovorina que se da 450 mg/m²/día durante 5 días. Este régimen se repite cada 4-5 semanas hasta remitir la progresión del tumor.

Como adyuvante en el tratamiento de cáncer colorrectal en el Estadío III con radioterapia, una administración intravenosa de 500mg/m²/día en forma de bolo durante 5 días los días 1 y 36 comenzando el tratamiento 22 a 70 días después de la cirugía. Radioterapia de 6 semanas de duración iniciándolo el día 64 tras iniciar el tratamiento con 5-FU.

Tratamiento de cáncer hepatocelular y de las metástasis hepáticas del cáncer de colon, con una administración intraarterial en adultos con 20-30 mg/kg/día durante 4 días en forma de infusión intraarterial en la vena hepática seguida de 15mg/kg/día durante 17 días en forma de infusión en la misma.

Otros tratamientos con 5-FU están igualmente pautados en el *Vademécum*, para el cáncer de estómago, pancreático, de mama, de cabeza y cuello, de ovario, de queratosis actínica (queratosis solar), carcinoma superficial de células basales, entre otros, que aquí no se desarrollan por exceder de dicho estudio.

1.3.7.- TOXICIDAD

El 5-FU produce reacciones adversas a nivel gastrointestinal y de médula ósea (mielosupresión), provocando leucopenia, trombocitopenia y anemia. Náuseas, vómitos, diarrea (incluso enterocolitis), anorexia, estomatitis, ulceraciones del tubo digestivo, llegando a producir hemorragias gástricas e intestinales, alopecia, conjuntivitis,

fotosensibilización, reacciones eritematosas. También provoca otros efectos como somnolencia, parestesias, ataxia cerebelosa, dolor torácico, alteraciones en el electrocardiograma y número de enzimas cardíacas (Florez, 2008). Algunos casos presentan pancitopenia y agranulocitosis.

En la administración intraarterial puede producir hepatitis, ictericia colestásica, esclerosis biliar, mucositis y diarrea (Longley y cols., 2003, Morse LG y cols., 2003).

El 5-FU tampoco está exento de interacciones significativas con otros medicamentos (metronidazol, cimetidina, alopurinol, entre otros) e incluso con alimentos. La administración de alimentos por vía oral con 5-FU ralentiza la absorción de 5-FU, aunque finalmente esto no afecta a su biodisponibilidad (Jiménez y Torres y cols., 2009).

El 5-FU se clasifica en la *categoría D* de riesgo de embarazo, aunque no se han realizado estudios controlados es teratogénico en animales de laboratorio. Por vía tópica está contraindicado durante el embarazo, clasificándose en la categoría X. Se desconoce si se excreta en la leche materna, pero debido a los conocidos efectos adversos, se debe evitar la lactancia durante los tratamientos con 5-FU.

Según *Vademecum*, el 5-FU está contraindicado en pacientes que muestren grave supresión medular. Los que tengan alguna infección deberán esperar a que ésta remita antes de iniciar el tratamiento o bien, si ya esta iniciado, debe reducirse la dosis. Los pacientes con enfermedades cardíacas tienen mayor riesgo de experimentar reacciones adversas cardíacas inducidas por el mismo 5-FU. Se debe evitar la vacunación mientras el tratamiento con 5-FU, al menos hasta 3 meses de haber finalizado éste. Se recomienda posponer las intervenciones dentales hasta recuperar los valores hematológicos.

Todos estos inconvenientes limitan sus aplicaciones en tratamientos oncológicos clínicos.

1.4.- NANOSISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

En la actualidad son muy diversos los sistemas transportadores que se pueden utilizar en el campo de la Tecnología Farmacéutica: micelas, liposomas, nanocristales, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas metálicas, por citar algunos ejemplos (Yazbeck y cols., 2015). Dentro de los sistemas coloidales destacan los nanocompuestos de tipo polimérico (Arias y cols., 2007b, 2010a, 2010b, 2010d; Pérez-Artacho y cols., 2012; Sáez-Fernández y cols., 2009) y de tipo lipídico (Arias cols., 2011a; Clares y cols., 2013; Pradhan y cols., 2007; Schröder y cols., 2009; Zhu y cols., 2009) para conseguir el transporte eficaz de cualquier agente antitumoral a la masa de células malignas (Arias, 2011; Arias y cols., 2011a; Cho y cols., 2008).

El término micro o nanopartícula engloba a las cápsulas y las esferas. Las micro o nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso. Las micro o nanoesferas, en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar en el interior de la matriz de la partícula.

Los tamaños de los vectores a desarrollar pueden ser de 0.1 a 100 μm en el caso de las micropartículas, o bien de 0.1 a 100 nm en el caso de las nanopartículas. Entre otras, una de las diferencias es la superficie de contacto que presenta el sistema, generando un comportamiento diferente en su entorno biológico y fisiológico. Hablamos de la relación área/volumen o densidad; el área es inversamente proporcional al radio de la partícula, es decir, partículas de radio menor (nanopartículas) poseen mayor relación área volumen y tienen mayor superficie de contacto con el medio. En cambio, las partículas de radio mayor (micropartículas), presentan una relación de área volumen menor y tienen menor superficie de contacto con el medio, a través de la superficie (Kohane, 2007, Kumari y cols., 2010).

Estos y otros sistemas transportadores de fármacos de tipo coloidal pueden tener una naturaleza química muy variable (orgánica o inorgánica). Sin embargo, deben ser siempre biodegradables y biocompatibles, y además deben presentar una excelente

capacidad para la vehiculización de fármacos (Arias 2008, 2011; Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005).

1.4.1.-BENEFICIOS TERAPÉUTICOS DE LOS NANOSISTEMAS

La mayoría de los vectores de fármacos son coloides y su diseño y formulación pretende la consecución de los siguientes beneficios terapéuticos (Arias, 2008, 2011; Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005; Reddy y Couvreur, 2008):

- Protección de la sustancia activa contra procesos de inactivación (química, enzimática o inmunológica), desde el lugar de administración hasta la biofase. También contra procesos de degradación que puedan ocurrir durante el almacenamiento previo a la utilización del medicamento.
- Máxima acumulación de la dosis de fármaco en la región diana, independientemente de la localización de ésta en el organismo.
- Aumento de la especificidad de acción y eficacia a nivel celular, permitiendo que el principio activo venza incluso fenómenos de resistencia a su acción.
- Incremento de la semivida plasmática del fármaco al retrasar los fenómenos de aclaramiento plasmático y eliminación.
- Mejora de las propiedades fisicoquímicas desfavorables del agente terapéutico, como una baja hidrosolubilidad, que puedan condicionar su destino biológico.
- Minimización de la toxicidad e inmunogenicidad de la molécula activa.

A continuación se esquematizan las ventajas que ofrece el uso de Nanoplateformas biomédicas (figura 1.13.)

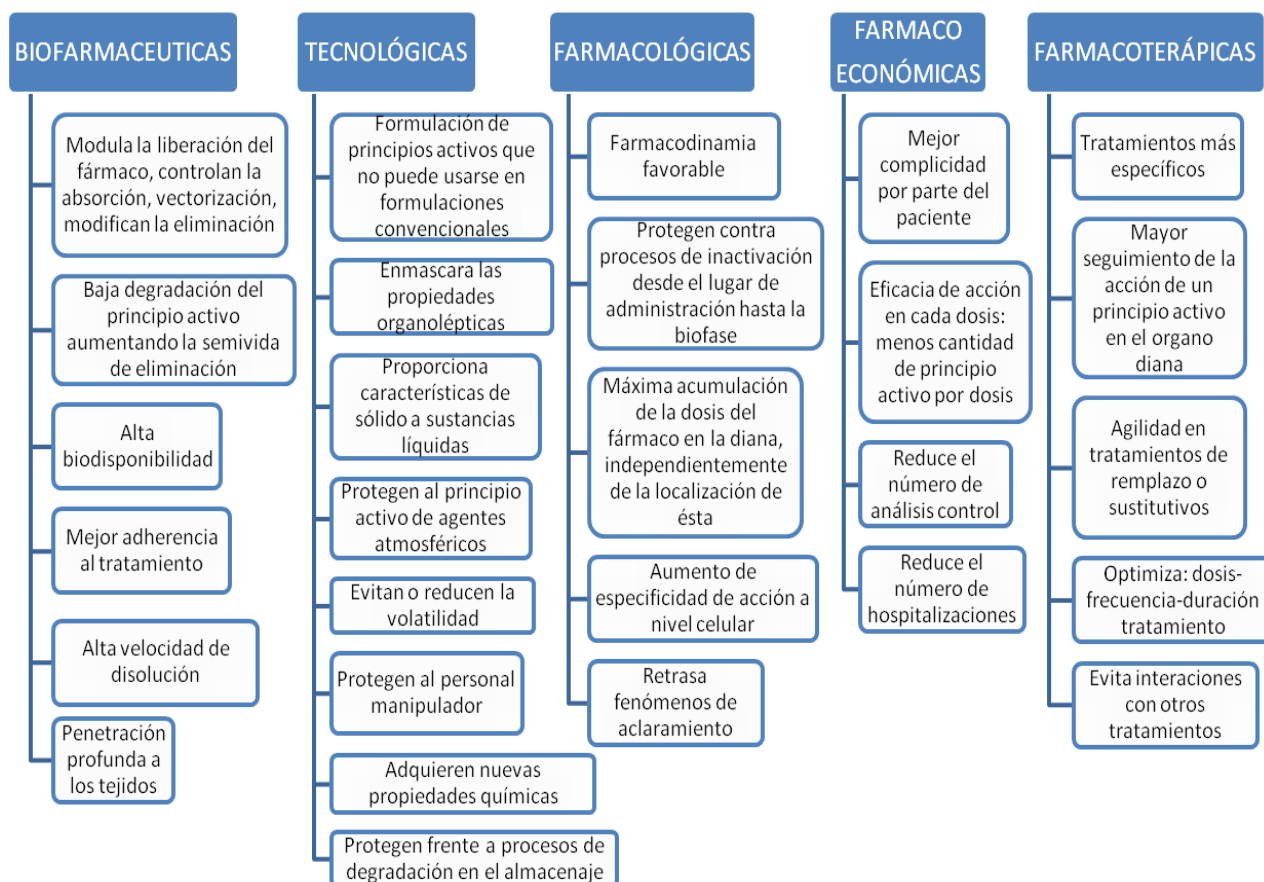


Figura 1.13.-Ventajas farmacéuticas de los Nanosistemas con aplicación médica

La liberación controlada de principios activos desde sistemas transportadores ofrecen la ventaja de alcanzar el efecto terapéutico deseado con menor número de dosis y frecuencia de administración, reduciendo por tanto, el número de efectos secundarios (Vilos y cols., 2014).

Desde la aprobación de Doxil® (doxorubicina encapsulada en liposomas) el primer nano-fármaco aprobado por la FDA (1995), (Yechezkel B, 2012) y el Abraxane® (formulación nanoparticular de paclitaxel unido a albúmina) han sido ampliamente estudiadas las nanopartículas biomédicas para la administración de fármacos. La utilización de vehículos farmacéuticos nanométricos con objeto de incrementar la

eficacia *in vivo* de numerosos fármacos, fundamentalmente antineoplásicos, sigue siendo muy investigada desde finales de los años noventa tanto a nivel farmacéutico como clínico; tal es así que ya han sido comercializados más nanoformulaciones y otras se encuentran en fase de desarrollo clínico (Arias y cols, 2012).

1.4.2.-SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Se entiende por liberación controlada sostenida a cualquier forma de dosificación que permite liberar el fármaco durante un periodo de tiempo. Se le califica como constante, prolongada, cronoliberación, liberación pulsática, entre otros, según variables. Hablamos de liberación controlada a la que implica un sistema capaz de proporcionar algún tipo de control terapéutico que pueda ser temporal, espacial o ambos a la vez. (Figura 1.14)

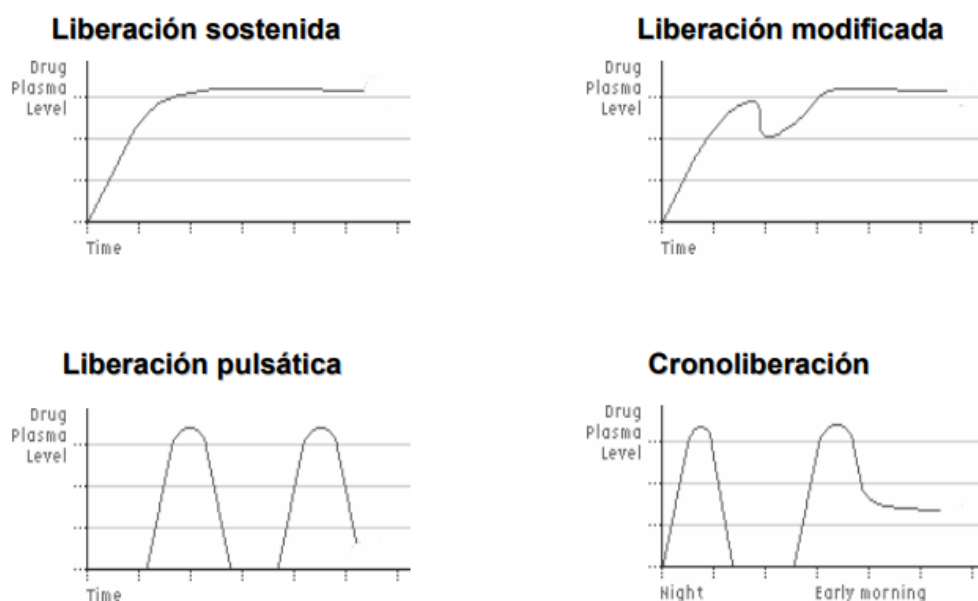


Figura 1.14: Esquema de diferentes modelos de liberación del principio activo en niveles de plasma (Fernández Arévalo, 2007)

Un sistema de liberación controlada libera al fármaco a una velocidad y/o en una localización determinada en función de las necesidades del organismo, durante un periodo de tiempo específico.

La liberación temporal se refiere a controlar la velocidad de liberación del fármaco (figura 1.15); la velocidad puede ser sostenida, constante y predeterminada.

La liberación espacial se refiere a llevar un control sobre el lugar de liberación del fármaco, también llamado órgano o tejido diana; bien liberando el principio activo en una zona cercana a un órgano o tejido, o bien en un tipo específico de célula de forma dispersa. Se pueden combinar los dos aspectos y el resultado son los vectores nanoparticulados.

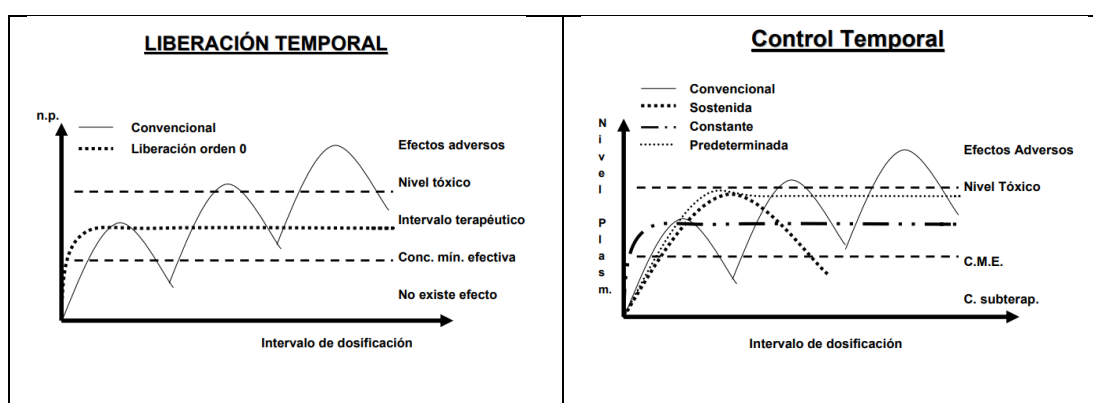


Figura 1.15.: Esquema del modelo de liberación temporal y control temporal del principio activo en niveles de plasma (Fernández Arévalo, 2007)

Son múltiples las ventajas de los sistemas de liberación controlada, entre otras se pueden enumerar:

- Mejor complicidad por parte del paciente
 - Se amplía el intervalo de dosificación
 - Tratamiento menos invasivo
- Reducción de la dosis total del fármaco, optimizando el tratamiento:
 - Paliando los efectos secundarios locales y sistémicos
 - Disminuye la potenciación de la actividad de un fármaco de uso crónico.
 - Disminuye la acumulación en el organismo del fármaco de uso crónico
- Mejora la eficacia del tratamiento:
 - Mejor control terapéutico por reducción de fluctuaciones plasmáticas
 - Puede mejorar la biodisponibilidad

- Ventajas económicas
 - Abarata costes de fármacos
 - Reduce en número de hospitalizaciones
 - Reduce el número de análisis control.

1.4.3. ESTRATEGIAS DE DISEÑO

La primera generación de fármacos contra el cáncer basados en la nanomedicina, se centró en la preparación de vehículos con una metodología para dirigir el tratamiento al tumor primario, sobre la base del fenómeno de permeabilidad y retención aumentada en la masa tumoral (*enhanced permeability and retention effect EPR effect*). El efecto *EPR* se refiere a la acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral facilitada por la alta permeabilidad (vascularización mayor) del tumor y mal drenaje linfático del fluido intersticial circundante.

Para conseguir una actividad farmacológica eficaz y segura, es necesaria una mínima o nula distribución del fármaco entre los tejidos y órganos sanos. La investigación sobre los transportadores de fármacos, en concreto su vectorización, trata de dirigir y modular el recorrido de un fármaco en el organismo hasta el lugar de acción específico, con el objetivo de concentrar toda la dosis del fármaco administrado en la célula diana y minimizar la distribución de éste por todo el organismo. Por ejemplo la seguridad de un fármaco vehiculizado en un copolímero suele ser mayor que él mismo administrado libremente en solución intravenosa (De Jong y Borm, 2008), sólo así se conseguirá un óptimo efecto farmacológico (Arias, 2008).

De esta manera se puede hablar de diferentes estrategias a la hora de planificar el diseño de nanotransportadores de fármacos:

- Diseño para un transporte pasivo.
- Diseño para un transporte activo.

1.4.3.1- TRANSPORTE PASIVO

El perfil de seguridad de un fármaco vehiculizado en un sistema coloidal suele ser mayor que el correspondiente a su administración en solución intravenosa (Haley y Frenkel, 2008). No obstante, el sistema coloidal también es susceptible de ser atacado por el sistema retículoendotelial (SRE) dando lugar a una retirada de éste de la circulación sanguínea. Por tanto, en el caso del cáncer estos sistemas transportadores son eficaces para el tratamiento de tumores localizados en órganos del SRE (Brannon-Peppas y cols., 2004; Brigger y cols., 2002). Así pues el coloide presentaría una semivida plasmática demasiado corta y no es posible su acceso a tumores localizados en zonas del organismo no relacionadas con el SRE. Por este motivo, las nanoplateformas para la vehiculización de agentes antitumorales deberán ser capaces de escapar a los procesos de reconocimiento llevados a cabo por el SRE, los cuales implican reacciones de opsonización y captación por macrófagos

A este respecto, los sistemas transportadores que poseen buenas características de tamaño e hidrofilia, presentan mayor semivida plasmática que les permite seguir un proceso de extravasación selectivo o específico en zonas del organismo afectadas por la inflamación, una infección o un fenómeno de crecimiento tumoral (figura 1.16.). De esta forma podrían dirigirse las moléculas de fármaco transportadas por el coloide hasta tumores localizados fuera de las regiones del SRE. Precisamente, estos defectos en la anatomía y anomalías funcionales se traducen en una mayor permeabilidad de los componentes del plasma (y las moléculas que viajan por el torrente sanguíneo) hacia el tejido tumoral.

Cuando la masa tumoral alcanza un tamaño de 2-3 mm comienza a formarse una vasculatura para poder satisfacer la demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento. Como resultado se obtiene una neovasculatura diferente de los tejidos sanos, caracterizada principalmente por la abundancia de poros o canales entre 100 nm y 2 μ m, según el tumor (Maeda y cols., 2009) y un drenaje linfático deficiente. Las células endoteliales están desorganizadas, presentando grandes oquedades. También, las células perivasculares y la membrana basal o la capa del músculo liso, presentan

anomalías o incluso están ausentes. La luz de los vasos tumorales es más ancha. Esta anatomía defectuosa junto con las anomalías funcionales, es lo que produce la mayor permeabilidad a los componentes del plasma sanguíneo (Heldin y cols., 2004). Por otra parte, el lento retorno venoso y el pobre aclaramiento linfático hacen que las macromoléculas sean retenidas en el tumor, mientras la extravasación en el intersticio tumoral prosigue (figura 1.16.). Este fenómeno denominado Efecto de Permeabilidad y Retención aumentada (efecto “EPR”) es la base para el transporte selectivo de fármacos hasta el tumor (Maeda y cols., 2009). Un escaso aclaramiento linfático que produce una mayor retención de la nanopartícula en el espacio intersticial, y un lento retorno venoso que origina una mayor acumulación del coloide (Krasnici y cols., 2003). Entre las biomacromoléculas que provocan el desarrollo del efecto “EPR”, podemos destacar: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las bradiquininas y las prostaglandinas.

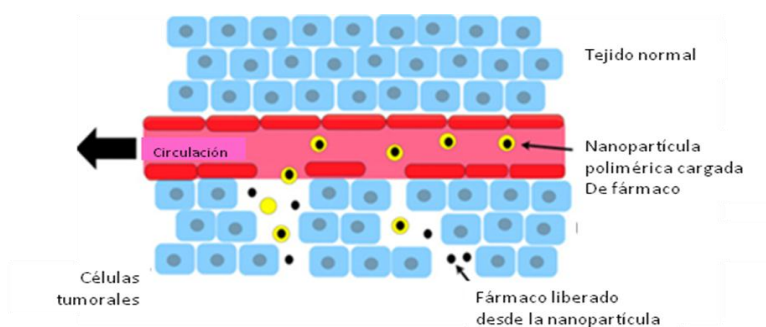


Figura 1.16.-Ilustración esquemática de permeabilidad y retención de nanopartículas (Rong, 2010).

Para aprovechar el efecto *EPR*, el nanosistema transportador de agentes antitumorales debe tener un tamaño lo suficientemente grande para que no haya extravasación en capilares sanos, pero lo suficientemente pequeño para que escape del SRE permitiendo así que llegue al intersticio tumoral. Además, la carga eléctrica superficial tiene que ser mínima (independientemente de su signo) y su superficie lo más hidrófila posible para retrasar su reconocimiento por el SRE (Maeda y cols., 2009). La superficie del nanosistema se puede hacer hidrófila recubriéndola con cadenas de polímeros o copolímeros hidrófilos (mediante adsorción física o conjugación química)

como los poloxámeros, las poloxaminas, los polisacáridos o, muy habitualmente, los polietilénóxidos (por ejemplo, el polietilenglicol, PEG).

Polietilenglicol (PEG): es uno de los polímeros más utilizados para mejorar la direccionalidad del fármaco hacia su lugar de acción reduciendo al mínimo la opsonización de las NPs y prolongando su circulación in vivo. Es hidrofílico, no iónico y presenta una excelente biocompatibilidad. El PEG puede modificar la carga superficial de las NPs, reduciendo el potencial zeta negativo y provocando así un aumento en la estabilidad del sistema (García-Corvillo, 2016).

1.4.3.2.- TRANSPORTE ACTIVO.

A pesar de que el transporte pasivo contribuye en gran medida a la acumulación de los fármacos en el lugar de acción, el desarrollo de estrategias de transporte activo y su combinación con las estrategias de transporte pasivo puede mejorar todavía más la interacción fármaco antitumoral – célula cancerosa (Arias, 2011).

El targeting activo hace referencia a la orientación activa del nanomedicamento, una acumulación en los tejidos tumorales, motivada por su marcada especificidad hacia las células diana.

Varias son las técnicas empleadas en el desarrollo de nanomedicinas dotadas de una orientación específica, todas ellas relacionadas con características bioquímicas y fisiológicas particulares del tumor y con la sobre-expresión de receptores, condiciones del microambiente tumoral, etc.

Entre las estrategias de transporte activo se encuentran las basadas en interacciones ligando-receptor. El nanotransportador se diseña tal que incorpore moléculas en su superficie que posteriormente se unirán a los receptores superficiales de la célula diana, produciendo una liberación selectiva del fármaco en el lugar deseado (Arias, 2011). En el caso de células tumorales, se eligen ligandos que se expresen en la vasculatura tumoral o en la superficie de las células malignas, y no en las células sanas.

A modo de ejemplo, recientemente se han desarrollado nanopartículas de PEG conjugado con ácido hialurónico, cuya administración sistémica asegura una

acumulación selectiva en el tejido tumoral, gracias al efecto *EPR* y una intensa unión a los receptores tumorales mediante anticuerpos CD44 que se encuentran en la superficie de la nanopartícula (Choi y cols., 2012; Son y cols., 2014).

El ácido fólico presenta una elevada especificidad a tejidos tumorales ya que las células cancerígenas presentan un elevado número de receptores tipo folato superior al de las células sanas (Vert, 1986). Esta especificidad convierte al ácido fólico en un ligando de afinidad del sistema de liberación controlada de fármacos, entre los que destacan los de naturaleza polimérica. Es de fácil incorporación a través de los grupos carboxílicos a través de un acoplamiento de dicho ligando por la formación de un grupo amida mediante un ataque de grupo amino de sustrato amino derivado a través de una sustitución nucleofílica. Un estudio con radiomarcadores mostró que la unión del ácido fólico a células tumorales aumento 20 veces más que en células sanas (Cho y cols. 2008). Se han usado para el transporte de paclitaxel en nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) modificados superficialmente con folato y ha permitido una mayor acumulación *in vivo* en la masa tumoral (Park y cols. 2005)

Otra vectorización también usada es la que pretende no solo permear la membrana celular, si no también hacerlo en otras barreras como la hematoencefálica, que debe ser atravesada en los procesos de transporte de fármacos que se dirigen al cerebro (Costantino y cols. 2005). Muchos de los fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar al cerebro en concentraciones suficientes para ejercer su efecto terapéutico. La opción de desarrollar nanopartículas poliméricas para ser administradas por vía nasal, mejoraría la utilidad clínica del fármaco y se conseguiría reducir la dosis y la frecuencia de dosificación a la vez que se reducen los efectos secundarios (García-Corvillo, 2016).

Otro tipo de diseño para transporte activo para el nanosistema portador del fármaco hasta el lugar diana es el diseño de coloides sensibles a estímulos externos, los cuales, si son localizados en el intersticio tumoral aseguran que la degradación de la

nanopartícula ocurra ahí, liberándose el fármaco en íntimo contacto con las células diana (figura 1.17.) (Arias, 2011).

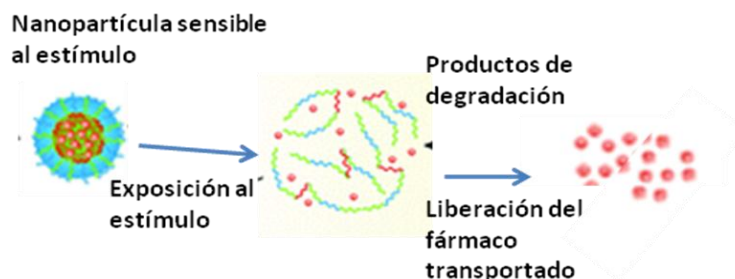


Figura 1.17. Liberación de un fármaco antitumoral activado por la exposición de la nanopartícula a un estímulo externo. La destrucción de la nanopartícula facilita la cesión de la dosis del fármaco en la zona tumoral.

Estos estímulos pueden ser:

- Cambios de pH
- Cambios de temperatura
- Un gradiente magnético
- La luz
- Ultrasonidos
- Sistemas enzimáticos.

- **1.4.3.2.1-Cambios de pH**

Una de las estrategias más prometedoras para el transporte de fármacos es el uso de materiales sensibles a pequeños cambios de pH con respecto al torrente sanguíneo. Un organismo sano tiene un pH extracelular en tejidos y sangre en torno a 7.4, mientras que en tejidos de comportamiento tumoral ronda el valor de 6.6-6.9. Las variaciones de pH se deben a las alteraciones del flujo sanguíneo por la escasa organización muscular de la zona tumoral dando descenso de la presión sanguínea e hipoxia local, con alteraciones metabólicas que provocan acumulación de metabolitos ácidos.

El sistema transportador en esta situación encuentra un entorno ácido al que es sensible y se descompone liberando el principio activo atrapado. Cabe esperar que éste tipo de nanotransportadores se distribuyen extensamente por el organismo y sólo

donde alcancen la región de pH ácido al que son sensibles, se destruyen liberando el fármaco (Hilgenbrink y Low, 2005; Jeong y cols. 2003; Lo y cols. 2005).

Recientes estudios hablan de nanopartículas de poli (lactida-co-glicolida) (PLGA) sensibles al pH para la administración oral de insulina, con el fin de mejorar la biodisponibilidad de insulina entregando la insulina a regiones gastrointestinales específicas (figura 1.19.). En primer lugar, se preparó el oleato de insulina y luego se encapsuló en nanopartículas de PLGA mediante el método de difusión y emulsión con disolvente. Según la figura 1.16 sobre los estudios de liberación de fármaco *in vitro* revelaron que la liberación del fármaco era dependiente del pH, y los resultados *in vivo* demostraron que la formulación de nanocápsulas compuestas de PLGA eran un candidato eficaz para la administración oral de insulina (Shaoping Sun y cols. 2015)

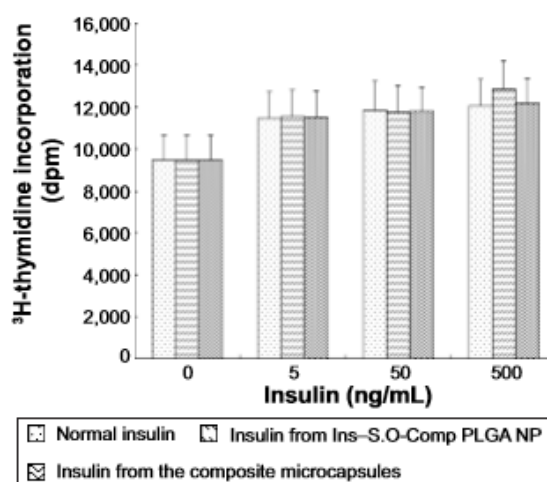


Figura 1.18: Actividad biológica de la insulina normal, insulina extraída de Np PLGA e insulina extraída de las microcápsulas compuestas PLGA. Los datos son la media \pm S.D. (N = 6). (Shaoping Sun y cols. 2015)

- **1.4.3.2.2.-Cambios de temperatura**

Los coloides elaborados con materiales termosensibles se caracterizan por sufrir un proceso de desestabilización/destrucción ante ligeros cambios de temperatura.

Hay una formulación patentada de liposomas termosensibles (US20130230457A1) que comprenden un tensioactivo y fosfolípidos en bicapa, maximizan la potencia del producto y liberan su contenido a temperaturas moderadamente hipertérmicas (figura

1.19.). El tamaño ronda alrededor de 50 a 150nm; la preparación liposomal contiene doxorubicina. Los liposomas también comprenden un agente para la formación de imágenes o un agente de diagnóstico.

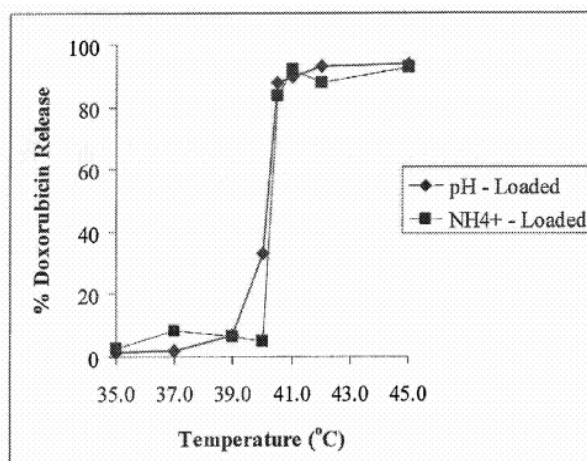


Figura 1.19: Gráfica de liberación de doxorubicina en liposomas termosensibles.

- **1.4.3.2.3.- Un gradiente magnético**

Los Nanosistemas magnéticos son capaces de llevar al principio activo al lugar de acción de forma específica siempre que el gradiente magnético aplicado se localice en la zona tumoral. (Sáez-Fernández E y cols., 2010) Se puede incluso lograr que el nanosistema se mantenga en la masa tumoral durante el tiempo preciso para que el fármaco vehiculado se libere a la velocidad deseada (Ciofani G y cols., 2009). Al principio se pensaba que la formulación de un sistema transportador magnético sólo se basaba en la utilización de nanopartículas magnéticas (generalmente óxidos de hierro como la magnetita o la maghemita). Sin embargo, este tipo de materiales se caracteriza por una deficiente capacidad para la vehiculización de principios activos, junto con una liberación excesivamente rápida de éstos (Durán JDG, y cols., 2008). Por el contrario, los polímeros biodegradables y los liposomas tienen una notable capacidad para el transporte de fármacos: gran eficiencia de vehiculización, junto con una liberación lenta, sostenida o controlable del agente antitumoral transportado. Por lo tanto, desde la década de 1980 se comenzó el desarrollo de sistemas coloidales mixtos. Estos sistemas transportadores están constituidos por un núcleo magnético que asegura la

acumulación del coloide en el lugar diana bajo la influencia de un gradiente magnético, y un material de recubrimiento (polimérico o liposómico, principalmente) que mejora la biodegradabilidad y biocompatibilidad de la nanoplateforma, y la capacidad de transporte de principios activos (Závišová V, y cols., 2009) Dado que el gradiente magnético disminuye con la distancia, la principal limitación de esta estrategia de transporte activo de fármacos es la intensidad del campo magnético necesaria para controlar la permanencia del coloide magnético en el lugar diana, o para activar la liberación del fármaco. Para solucionar estos posibles problemas y, por lo tanto, asegurar la acumulación selectiva del coloide magnético en estructuras internas del organismo, se investiga la implantación de pequeños imanes magnéticos en el interior o las proximidades del lugar diana mediante cirugía menor. Es más, se ha descrito que el uso de implantes magnéticos junto con un campo magnético externo puede acrecentar aún más la acumulación de las nanoplateformas magnéticas cargadas de fármaco anticanceroso en la zona tumoral (Fernández-Pacheco R, 2007).

Finalmente, se ha descrito que la combinación de este tipo de estrategia de transporte activo con estrategias de transporte basadas en las interacciones ligando-receptor permite prolongar la permanencia y conseguir una mayor acumulación del coloide magnético en la región diana. Para ello, lo que se realiza es modificar la superficie de estas nanoplateformas magnéticas con moléculas específicas (p. ej., folato y derivados, anticuerpos monoclonales, transferrina, etc.) de los receptores que se sobre expresan en la superficie de las células tumorales o en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos que irrigan el tumor (Lin JJ, y cols. 2009). Así, esta estrategia incluso puede llegar a aumentar la selectividad de las nanopartículas magnéticas por la neovasculatura tumoral (Tietze R, y cols. 2009).

- **1.4.3.2.4.-La luz**

Los puntos cuánticos son nanocristales coloidales semiconductores que tienen un diámetro de 2 a 10 nm. Pueden ser sintetizados a partir de diversos tipos de materiales semiconductores a través de la síntesis coloidal o por síntesis electroquímica. Los puntos cuánticos más utilizados son el seleniuro de cadmio (CdSe), el telurio de cadmio (CdTe),

el fosforo de indio (InP), y el arseniuro de indio (InAs). En las imágenes de tejidos biológicos, estas partículas sirven de agentes de contraste, proporcionando una resolución mucho mayor que los actuales tintes fluorescentes. Los puntos cuánticos pueden absorber la luz blanca y volver a emitirla en cuestión de nanosegundos con diferentes bandas prohibidas de energías que corresponden a diferentes combinaciones de partículas. Al igual que las nanopartículas, los puntos cuánticos pueden ser modificados a través de la conjugación de la superficie con varias moléculas para la vectorizar y entregar en el lugar específico. También proporcionan la superficie suficiente para sujetar agentes terapéuticos, la administración de fármacos, la obtención de imágenes *in vivo* (Oropesa Nuñez y cols. 2012).

- **1.4.3.2.5.-Ultrasonidos**

Se basa en exponer la zona tumoral a ultrasonidos. Conseguimos dirigir el nanotransportador en la región alterada y liberar totalmente el fármaco en el espacio intersticial (Rapaport, 2004). Es una estrategia no invasiva dado que los ultrasonidos tienen una adecuada capacidad de penetración. Podemos localizar la acción controlando parámetros (frecuencia, potencia, tipo de aplicación,...). Al aplicar los ultrasonidos en la región tumoral se consigue aumentar la permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan la zona, generando energía térmica. La nanopartícula logra llegar al lugar por transporte pasivo y al alcanzar la zona el coloide es alterado y degradado gracias a los ultrasonidos, liberando el principio activo.

- **1.4.3.2.6.-Sistemas enzimáticos.**

Otra estrategia es usar como estímulo biológico enzimas. Consiste en hacer una nanopartícula que pueda ser degradada por enzimas tipo lipasas, proteasas, oxidasas y gliosidasas. Estan dotadas de una alta especificidad (De la Rica y cols., 2012).

Las enzimas son componentes clave en la bio-nanotecnología, pues otorgan capacidades excepcionales de vectorización y catalización. Cuando se combinan con las propiedades físicas de los nanomateriales, las nanopartículas sensibles a las enzimas pueden diseñarse para realizar funciones de manera eficiente y con alta especificidad

para el estímulo. Se ha aplicado con éxito en la administración de fármacos en los que en el tejido diana se vuelca la carga por la acción biocatalítica de una enzima.

Por otra parte, la transformación química de la enzima al vector también puede generar moléculas terapéuticas, por lo tanto se podría hacer un diseño de nanopartícula con efecto sinérgico.

Otra aplicación sería fabricar sensores ultrasensibles para diagnosticar enfermedades. Las nanopartículas pueden ser polímeros, liposomas, nanopartículas de oro y puntos cuánticos (de la Rica y cols., 2012).

1.4.4.- INTERNALIZACIÓN DEL SISTEMA TRANSPORTADOR EN LA CÉLULA

Con el nuevo diseño de vectorización, la actividad farmacológica del sistema depende, además del mecanismo de acción del principio activo, del mecanismo de liberación y penetración al órgano diana.

Cuando el blanco farmacológico se encuentra a nivel intracelular, hay diferentes formas por las que se presume que una nanopartícula cargada entra en la célula a través de la membrana. Para ello debe difundir a través membrana plasmática, acceder al citoplasma y liberar el principio activo. La internalización viene influenciada por las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

Podemos encontrar diferentes formas para que el nanosistema se internalice en la célula, como se muestra en la figura 1.20.:

1. Penetración
2. Endocitosis/Semi-endocitosis
3. Adhesión

1.-La penetración se da cuando la nanopartícula es lo suficientemente pequeña y puede deslizarse a través de la membrana para entrar en la célula.

2.-La endocitosis ocurre cuando la membrana cubre lentamente a la nanopartícula hasta que queda totalmente introducida en la célula, formando una

vesícula. La semiendocitosis se produce cuando la nanopartícula no está totalmente dentro de la célula, sino que parte permanece en la superficie.

Se estima que al llegar una nanopartícula a la superficie de la célula, se invagina la membrana y entra en el citoplasma a través del endosoma, que normalmente se fusiona con lisosomas generando un ambiente hostil que hace degradar a la nanopartícula, liberando su carga. (Mukherjee 1997).

Hay diversos tipos de endocitosis dependiendo de diversos factores, como son el tamaño de la nanopartícula, la naturaleza de material a incorporar y el mecanismo de formación de la vesícula. Se pueden agrupar como:

- Endocitosis mediada por clatrina
- Endocitosis mediada por caveolas
- Endocitosis mediada por partículas no recubiertas

La Endocitosis mediada por clatrina introduce vesículas inferiores a 156nm, forma vesículas de unos 120nm. La Endocitosis mediada por caveolas es a través de invaginaciones arbitrada por una proteína llamada caveolina, que parece ser que tiene una función análoga a la clatrina. La última mención de endocitosis no se conoce todavía su sistema de regulación.

3.-La adhesión se da cuando la membrana celular se curva y permite que la nanopartícula sea envuelta. El tamaño debe ser inferior a 80nm y se internaliza en el citosol sin intervención de enzimas. Esta forma es más ventajosa para moléculas especialmente sensibles, como péptidos o ácidos nucleicos ya que evitan la degradación lisosomal (Hillaireau y cols., 2009).

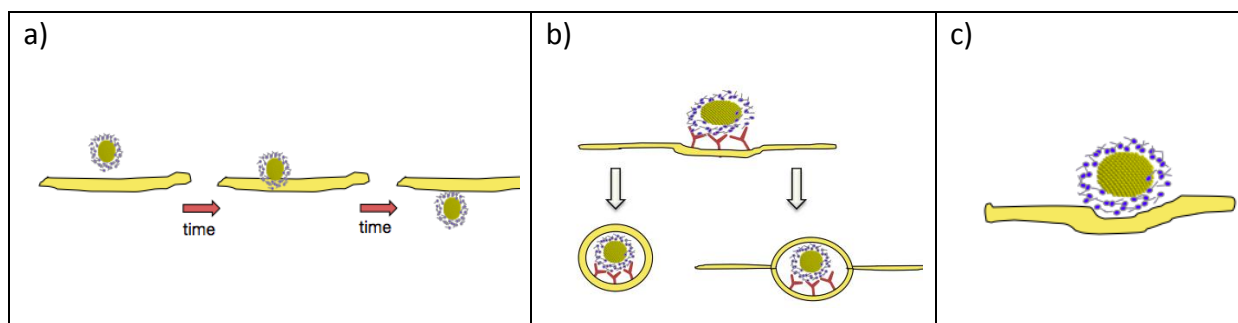


Figura 1.20.: Entrada de Nanopartículas a la célula, a) Penetración, b) Endocitosis/Semi-endocitosis, c) Adhesión. Adaptado según el blog *by the Center for Sustainable Nanotechnology*

Los últimos estudios hablan de que las Nanopartículas poliméricas utilizan la ruta de Endocitosis clatrina dependiente (García-Corvillo, 2016).

1.4.5. PROGRESOS EN EL DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS POLIMERICAS

De las primeras nanopartículas poliméricas (PLA, polímero del ácido láctico), fueron administradas por vía intravenosa y se observó una adsorción de inmunoglobulinas y otras proteínas plasmáticas produciendo una posterior captura por fagocitos del hígado y bazo (Leroux 1998). Ésta primera generación de nanosistemas fue considerada entonces como ideal para vectorizar fármacos hacia el hígado en caso de patologías a este nivel, como hepatocarcinomas.

Como Nanopartículas poliméricas de segunda generación se les recubrió de polímeros hidrófilos para evitar la captura hepática y favorecer la circulación por más tiempo y llegar así a alcanzar el órgano diana; polímeros tipo Propilenglicol (PEG) entre otros (Peracchia y cols., 1999)

Actualmente están siendo evaluadas nanopartículas de la tercera generación, las cuales se les incorpora ligandos en su superficie capaces de reconocer receptores sobreexpresados en células cancerosas y fijarse a ellos (Russell-Jones y cols., 2004, Turley y cols., 2002). Son sistemas muy complejos a nivel fisicoquímico a la hora de su formación.

1.5.- MATERIALES POLIMERICOS

Los polímeros han resultado ser de los materiales más promisorios para la fabricación de los nanotransportadores, en parte gracias a la gran variedad y versatilidad que presentan estas macromoléculas (Gil y cols., 2004). Centenares de estructuras químicas desde su síntesis, propiedades como biodegradabilidad y biocompatibilidad, los hacen grandes candidatos como materia prima en la producción de nanotransportadores.

1.5.1. BIOCMPATIBILIDAD

Una de las características más importante de los biomateriales es la biocompatibilidad, es decir, que el agente externo no sea rechazado por el organismo y que sea capaz de desencadenar una interacción nanosistema-organismo predecible y controlada (Fournier y cols, 2003).

En el campo de la medicina, los biomateriales empleados difieren en cuanto a su composición química, grado y condiciones de polimerización, peso molecular, presencia de aditivos e impurezas; forma, estructura, textura, rigidez o flexibilidad.

Una vez que se introduce el nanosistema en el organismo se produce una interacción, se le conoce como interacción nanosistema-organismo, pudiendo ser de tipo:

- proceso inflamatorio
- formación de cápsulas fibrosas
- producir un cuadro infeccioso

La inflamación es la respuesta del organismo a la agresión de un agente extraño. Se observan cambios en la permeabilidad vascular de la zona afectada, promueve el transporte de fluido inflamatorio, rico en proteínas. Los leucocitos, por unos factores de estimulación, tienden a adherirse al endotelio de los vasos sanguíneos para atravesar sus paredes y rodear al agente externo. La intensidad y duración de la respuesta depende del tamaño y naturaleza del material introducido. Una reacción a nivel celular

suele ser breve y de poca intensidad, así que sería un buen síntoma de compatibilidad con el tejido de contacto con el agente externo (Babéense y cols, 1998; Rihová, 1996; Rihová 2000). En circunstancias favorables, el proceso inflamatorio remite en varios días, produciendo una regeneración de la zona afectada.

Otro efecto puede ser la respuesta formando una cápsula fibrótica, -de mayor o menor tamaño-, y características como densidad capilar, población celular, tardando incluso meses en estabilizarse.

1.5.2.- BIODEGRADABILIDAD

Los polímeros biodegradables deben cumplir la condición de ser estables y de poseer enlaces químicos potencialmente degradables en el organismo. Pueden ser de origen natural o sintético. Los enlaces serán de tipo acetales, ésteres, orto-ésteres, amidas y enlaces glicosídicos. Entre los polímeros biodegradables encontramos Poli(alquicianoacrilato), Poli (D,L-lactida), Poli(glicolida), Poli(D,L-Lactida-co-glicolida), Poli(etilenamina), Polietilenglicol, alginato, dextrano, poli(vinilalcohol) Poli(metildenmalonato), gelatina, chitosan, goma guar, Poli(acrilamida), Poli(glutaraldehído), Poli(-caprolactona), poliácido Láctico (PLA), Poli (éter de divinil-co-maleinanhídrido), poli(estireno-altmono-n-butilmaleinato), Poli(1-vinil-2-pirrolidona), Poli(1-vinil-2-pirrolidona-co-maleinanhídrido), Poli[(N-acriloil)morfolina], Poli(N,Ndimetilacrilamida), entre otros (Putnam y Kopeček 1995, YangY Kopeček 2014).

1.5.3. TIPOS DE POLIMÉROS NANOTRANSPORTADORES

Los polímeros pueden ser de origen natural o sintético.

Los de origen natural presentan alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, sin embargo pueden variar sus propiedades por lo que se prefiere el uso de los sintéticos. Los sintéticos están libres de aditivos, impurezas, químicamente inertes, obtenidos generalmente por procesos de polimerización a partir del monómero o a través de un polímero preformado; se pueden estandarizar con mayor facilidad pues es de vital importancia la evaluación de sus propiedades biológicas.

Según su estructura física, en estado sólido pueden ser amorfos o cristalinos, según si sus regiones están o no ordenadas. Los polímeros varían enormemente sus propiedades en función de su estructura física. Polímeros con capacidad de cristalizar son aquellos cuyas moléculas son química y geoméricamente regulares en su estructura; irregularidades ocasionales, como ramificaciones de la cadena o la copolimerización (se hablará en posteriores epígrafes) pueden limitar el alcance de la cristalización.

1.5.4. TIPOS DE SISTEMAS TRANSPORTADORES POLIMÉRICOS

Los sistemas transportadores de tipo polimérico se pueden clasificar según cómo sea la forma de incorporar al principio activo. Puede ser bien de forma física o bien, química (Ringsdorf 1975). En función de cómo sea, variará la liberación del principio activo y por tanto, su dosificación (López Gascó, 2011).

Dosificación controlada por medios físicos:

La unión del nanosistema con el principio activo es de forma *física*. Los más frecuentes son los sistemas controlados por difusión de tipo reservorio, matriz, o bien los controlados por hinchamiento (Laurencin y cols, 1987; Peppas y cols, 2000).

Los *sistemas depósito o reservorio* constan de un núcleo donde permanece el principio activo rodeado de una membrana delgada, homogénea y no porosa (Korsner y Peppas, 1981). Es el polímero el que controla la velocidad de salida del principio activo, la liberación del principio activo tiene lugar mediante la disolución del soluto en la fase soluto-polímero. La posterior difusión del principio activo tiene lugar a través del gradiente de concentración. La velocidad de liberación puede describirse por la primera *ley de Fick* (López Gascó, 2011); esta ley habla de que cuando en un sistema termodinámico multicomponente hay un gradiente de concentraciones, se origina un flujo irreversible de materia, desde las altas concentraciones a las bajas y a este flujo se le llama difusión. La difusión tiende al estado de equilibrio a una concentración constante. La *ley de Fick* dice que el flujo difusivo que atraviesa una superficie para un

sistema discontinuo (membrana que separa dos cámaras) es directamente proporcional al gradiente de concentración según la ecuación:

$$J = D \cdot \frac{\Delta c}{\delta} \quad (1.1)$$

J: flujo difusivo ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)

D: coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

Δc : diferencia de concentraciones molares

δ : espesor de la membrana

Por tanto, la salida del principio activo puede controlarse ajustando la geometría del sistema empleado, el espesor de la membrana, la diferencia de concentración a través de la membrana, las características termodinámicas del sistema (coeficiente de partición) y la estructura del polímero (coeficiente de difusión del polímero).

Los *sistemas matriciales* son en los que el principio activo está engarzado en un soporte polimérico sólido, bien disuelto o bien disperso en el caso de no ser soluble en el medio polimérico o estar a una concentración más elevada de lo que permite su solubilidad. En ambos casos, la salida del principio activo se produce por difusión molecular a través del soporte o por los microporos existentes en la matriz. La solubilidad del soluto en el polímero es un factor importante en el control de liberación del principio activo (Peppas y Gurny, 1983), pudiéndose encuadrar en la *segunda ley de Fick*, que se usa en la difusión no constante, es decir, cuando la difusión es en estado estacionario, donde el coeficiente de difusión es independiente del tiempo. Establece que la velocidad de cambio de la composición es igual al coeficiente de difusión por la velocidad de cambio de gradiente de concentración:

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{d}{dx} \left(D \frac{dC_x}{dx} \right) \quad (1.2)$$

C_x : Concentración del principio activo a distancia x de la superficie en el tiempo t

x : distancia desde la superficie

D : coeficiente de difusión del elemento que difunde

T : tiempo

Sistemas controlados por hinchamiento son los que el principio activo se encuentra disuelto-disperso en un polímero hidrófilo, entrecruzado o no, el cual se hincha al entrar en contacto con un medio acuoso liberando el principio activo al medio. Implica un proceso de absorción de agua y de forma simultánea otro de desorción del principio activo por difusión controlado por el hinchamiento del polímero. Inicialmente el polímero está en estado vítreo y al entrar el agua se hincha alcanzando valores próximos a la T_g del medio que le rodea pasando a un estado más elástico, donde el principio activo difunde hacia el medio externo (Peppas y cols., 2000).

Dosificación controlada por medios químicos:

Son el grupo que incluye la liberación del fármaco con la degradación del nanosistema polímero-fármaco. El polímero va unido covalentemente al principio activo a través de unos enlaces débiles que pueden romperse por hidrólisis o de forma enzimática (Elvira y San Román 1997; Liso y cols., 1995). Los enlaces se producen a través de los grupos funcionales fácilmente degradables en el medio fisiológico. Con un estudio de este tipo de enlaces se establecería el control de liberación del principio activo al medio externo (Parejo y cols., 1996)

Los *sistemas bioerosionables* se encuentran en un estado intermedio entre unión física y química. La degradación de polímero libera el principio activo de forma controlada conforme se va erosionando el polímero que lo rodea. La principal ventaja es que los polímeros erosionables y biodegradables son gradualmente reabsorbidos por el

organismo; asegurándose de que son productos no tóxicos, ni inmunogénicos ni cancerígenos.

De forma genérica, la degradación de un nanosistema es (Sanz y cols., 2004):

- *heterogénea*: ocurre en la superficie del material que está en contacto con el medio fisiológico; la velocidad de degradación es constante y el material no degradado mantiene su integridad química durante el proceso. Lógicamente, aquellos materiales que poseen alta relación superficie/volumen se degradarán más rápido que sus equivalentes con una relación menor.

- *Homogénea*: es un deterioro aleatorio en toda la masa de la matriz polimérica. Cuando el peso molecular del polímero va decreciendo de forma continua, el material puede mantener su forma original y retener masa hasta que el polímero haya experimentado una considerable degradación, aproximadamente más del 90% de su masa.

A modo de ejemplo, se muestran algunas de las múltiples investigaciones recientes sobre encapsulación de principios activos en nanoplateformas poliméricas indicando sus diferentes vías de administración (Tabla 1.4):

Polímero	Macromolécula	Modelo Animal	Parámetro investigado	Referencia
Administración Pulmonar				
PLGA Air, Alkemes)	Insulina	Rata	Descenso de Glucemia y biodisponibilidad	Eduards DA y cols., 1997
PLGA	Insulina	Rata	Descenso de Glucemia	Kawashima Y y cols., 1999
PLGA	Insulina	Rata	Descenso de glucemia y otros parámetros	Aguilar MMG, y cols., 2004
PEG-Fosfato cálcico	Insulina	Rata	Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos	García-Contreras L y cols., 2003

Ac Hialurónico	Insulina	Perro de raza Beagle	Parámetros farmacocinéticos	Surendrakumar K y cols., 2003
Quitosano	Insulina	Rata	Descenso de glucemia	Carrion-Recio D,
Administración vía nasal				
PLA	VIH-2	Ratón	Respuesta inmune	Stieneker, 1991
PLA	Ovoalbúmina	Ratón	Respuesta inmune	Somavarapu, 1998
PLA-PEG	Toxoide tetánico	Cobayas	Respuesta inmune	Almeida 1991
PLA-PEG	Toxoide tetánico y ADN plasmático	Rata	Absorción y biodistribución	Tobío, 1998
PLA y PEG-PLA	Toxoide Tetánico	Ratón y rata	Biodistribución y respuesta inmune	Vila A, 2002
PLG	Antígeno Toxoplasmosis	Oveja	Respuesta inmune	Starley A, 2006
Poly-ε-caprolactona	Toxoide diftérico	Ratón	Respuesta inmune	Singh J, 2006
PLGA-polaxamero y PLGA-Poloxamina	Adn Plasmídico	Ratón	Respuesta inmune	Casaba 2006
Quitosano	Insulina	Conejo	Descenso de glucemia	Fernández-Urrusuno, 19999
Quitosano	Toxoide tetánico	Ratón	Respuesta inmune	Vila 2004
Quitosano	Ovoalbúmina y toxina colérica	Rata	Respuesta inmune	Nagamoto T, 2004
Quitosano	Toxoide Tat	Ratón	Respuesta inmune	Le Buanec H, 2001
Quitosano y Quitosano-PEG	Adn Plasmídico	Ratón	Transfección-respuesta inmune	Csaba, 2009
N-Trimetil-Quitosano	Antígeno gripe	Ratón	Respuesta inmune	Amidi M, 2007
Maltodextrina	Antígeno Hepatitis B y B-galactosidasa	Ratón	Respuesta inmune	Debinm 2002.
Via Parenteral				

PLGA	Bacitracina	Ratón	Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y respuesta inmune	Hong 2017
------	-------------	-------	---	-----------

Tabla 1.4: Algunas de las múltiples investigaciones recientes sobre encapsulación de principios activos en nanoplateformas poliméricas y vías de administración.

1.6.- POLI (D,L-LACTIDA-CO-GLICOLIDA)

La administración parenteral de fármacos encapsulados en nanopartículas de PLGA, ya ha sido aprobada por la Administración Sanitaria de EE.UU. (FDA), con fines de diagnóstico y tratamiento de diversas patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, metabólicas, cáncer y en la ingeniería de tejidos (Mert y cols., 2012). El PLGA está formado por poli-(D,L-lactida) y poli (glicolida) (PGA) (figura 1.21.).

Los poliésteres, solos o en combinación con otros polímeros, han demostrado grandes posibilidades en este sentido. Entre ellos, la poli-(D,L-lactida-co-glicolida), PLGA, es ampliamente conocida por su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Esto significa que no causan ninguna respuesta adversa significativa en el medio fisiológico que dañe el biomaterial tras la interacción con los tejidos y fluidos corporales y que se biodegradan en componentes no tóxicos, tanto química, físicamente o por una combinación de ambas.

A nivel químico, el PLGA son unos copolímeros lineales de D,L-ácido láctico y glicólico, (D,L-PLA y PGA respectivamente), que se encuentran en proporciones monoméricas variables.

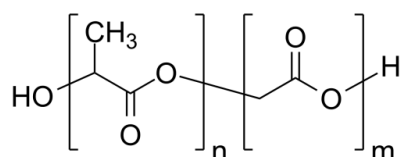


Figura 1.21: Estructura química del PLGA, *n* es el número de unidades de PLA y *m* indica el número de unidades de PGA que componen la molécula de PLGA.

Las moléculas de PLGA pueden sintetizarse mediante polimerización por condensación del PLA a temperatura no inferior a 120 °C, o por debajo de ésta temperatura, con el uso de catalizadores. Por este método se obtienen polímeros de bajo peso molecular ($M_w < 10000$ Da). Para obtener los copolímeros de elevado peso molecular es necesario partir de los dímeros cíclicos de PLA y PGA en presencia de catalizadores y bajo condiciones controladas de presión y temperatura.

Cuando en la reacción de polimerización no existen reacciones secundarias, se producen polímeros lineales; bajo condiciones especiales se pueden obtener con ramificaciones cortas o largas (figura 1.22) Se emplea el término lineal aunque los ángulos de enlace son próximos a 109° como consecuencia de la configuración tetraédrica de los átomos de carbono de la cadena principal.

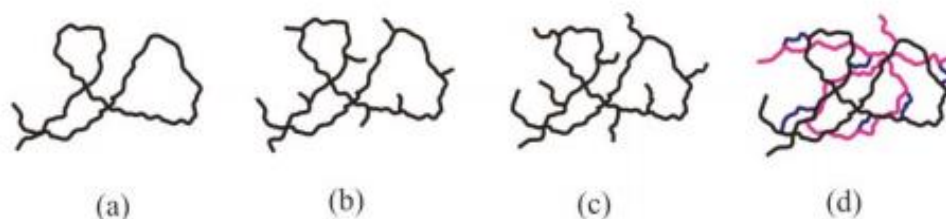


Figura 1.22: (a) polímero lineal sin ramificaciones, (b) con ramificaciones cortas (c) con ramificaciones largas (d) copolímero entrecruzado

Las ramificaciones producen volumen libre y aumentan la separación entre las cadenas, de ahí la densidad del polímero. Los polímeros lineales y ramificados son solubles en ciertos disolventes. Cuando unas cadenas se unen a otras de igual o diferente naturaleza, forman redes tridimensionales y el polímero se hace insoluble. Las redes entrecruzadas se logran cuando existen muchos puntos de unión con la cadena principal, de modo que los polímeros entrecruzados se consideren como una sola molécula de tamaño infinito.

Durante la polimerización, las unidades monoméricas sucesivas (de PLA o PGA) están unidas entre sí por enlaces tipo éster, obteniéndose de este modo un producto amorfo (poliéster alifático lineal). Las formas de PLGA se identifican generalmente por la proporción de PLA y PGA que contienen. Por ejemplo, para PLGA 40:60, un 40% del

copolímero es PLA y un 60% es PGA. El que se utiliza con mayor frecuencia en Nanotecnología Farmacéutica es el PLGA 50:50, 50% de ácido láctico y 50% de ácido glicólico (Tong y cols., 2012). El grado de cristalinidad del copolímero de PLGA también dependerá de la proporción molar PLA:PGA (Coco y cols., 2013).

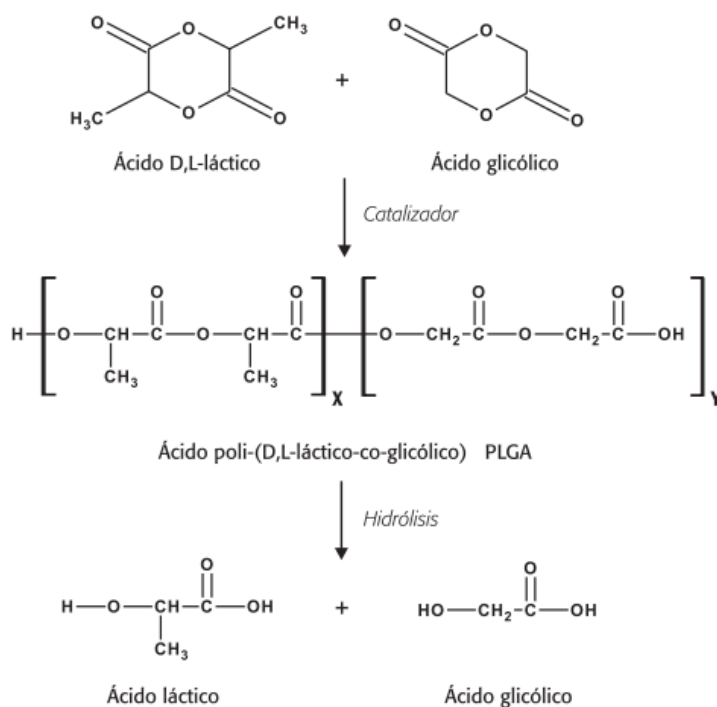


Figura 1.23: Síntesis e hidrólisis del copolímero poli(D,L-Láctico-co-glicólico, PLGA (Rosas y cols, 2007).

En cuanto a la biodegradación de PLGA se produce por varias formas que desarrollaremos posteriormente; de forma genérica ocurre una bioerosión y una bioabsorción, la liberación del fármaco incorporado depende de la velocidad de degradación del material polimérico. Diferentes estudios indican que el PLGA, tiene una degradación compleja y heterogénea. (Vert y cols., 1994).

La estructura química del PLGA formada por enlaces de tipo éster, permite una degradación mediante hidrólisis del ácido poli-glicólico (PGA), que pasa a metil poli-láctico (PLA). El PGA es un polímero hidrofílico con una tasa de degradación

relativamente rápida, en cambio el PLA tiene un grupo metilo que le confiere propiedades más estables. El PLGA ofrece mejor control en la degradación que los polímeros de PLA y PGA en forma individual y se puede variar la proporción entre PLA y PGA para aumentar o reducir el tiempo de reabsorción. Así mismo, el PLGA puede ser hidrolizado por enzimas tales como hidrolasas, proteasas, glicosidasas y fosfatasas (Virilan y cols., 2015).

Existe cierta controversia en si hay o no hidrólisis enzimática en la degradación de dicho polímero, autores que hablan de que la bioerosión se da sin implicación enzimática y autores que hablan de que las enzimas desempeñan un papel importante, basándose en que son diferentes los modelos *in vivo* e *in vitro*. Holland y sus colaboradores (Holland y cols., 1986) concluyeron en que se espera una implicación enzimática cuando el polímero está en estado gomoso (Lewis 1990).

Los productos resultantes de la biodegradación del PLGA son monómeros de lactida y glicolida, que son inocuos para la salud. Estos productos de degradación son eliminados por el ciclo de Krebs como dióxido de carbono y eliminados por la orina (Ma y cols., 2012).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han probado la ausencia de toxicidad y la biocompatibilidad de las nanopartículas de PLGA (Swami y cols., 2014).

1.6.1.- LIBERACION DEL PRINCIPIO ACTIVO

La liberación de principio activo desde las nanopartículas de PLGA generalmente ocurre por difusión a través de la matriz y por los poros de la estructura del polímero. Sin embargo la biodegradación de la matriz del polímero degradado continuamente cambia la geometría de la nanopartícula y la textura de la matriz del polímero, por tanto la degradación es una combinación de difusión y degradación.

La degradación del polímero implica la erosión de la masa, para esto, la nanopartícula toma agua para su disolución y así generar la degradación de la matriz.

Tras la hidratación del polímero, la molécula del principio activo encapsulado comienza a disolverse en el medio acuoso y difunde fuera de la matriz del polímero.

Se pueden distinguir, de forma genérica, tres etapas:

1. Una liberación inicial del principio activo adsorbido en la superficie de la nanopartícula.
2. Una liberación del principio activo por difusión a través de los poros durante la degradación de la matriz del polímero.
3. Una liberación del principio activo por la erosión y desintegración de la matriz del polímero.

El ácido láctico y/o el ácido glicólico son materiales higroscópicos y sufren una degradación en solución acuosa. Esta degradación se conoce como biodegradación por producirse con frecuencia en organismos vivos. Se cree que se produce en 4 etapas consecutivas (Wu XS, 2001):

1. Hidratación
2. Degradación inicial
3. Degradación adicional
4. Solubilización

La degradación del PLGA en un medio acuoso es también la velocidad de penetración o hidratación del medio al polímero. En la hidratación, el medio acuoso entra en la matriz polimérica y va distendiendo el polímero, a la vez que disminuye su Temperatura de transición vítrea (Tg). Empieza la degradación a través de los enlaces tipo éster. La hidrólisis va rompiendo el esqueleto polimérico y por tanto, disminuyendo el peso molecular del polímero. Como influye el peso molecular en las propiedades mecánicas, va enlenteciendo su degradación pero no su integridad. En la etapa de degradación adicional, el polímero sigue degradándose hasta el punto de no poder mantener su integridad.

1.6.2.-VARIABLES EN LA LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Como variables en la liberación del principio activo en nanopartículas de PLGA se estudian:

- Composición del polímero
- Configuración del polímero
- Solubilidad
- Masa molecular y viscosidad intrínseca
- Temperatura de transición vítrea (Tg)
- PH
- Absorción del agua

La cinética de degradación del polímero es de vital importancia para conseguir la eficacia terapéutica, por tanto, en la fabricación de Nanoplateformas, la forma en que el principio activo se libera en el organismo es tan importante como el fármaco en sí.

Efecto de la composición sobre la biodegradabilidad del PLGA

La composición del PLGA varía al variar las proporciones de PLA y PGA. La composición del PLGA influye en la hidrofobicidad y humectabilidad y esto se mantiene durante todo el proceso de la degradación. El rendimiento de la degradación de PLGA de peso molecular similar pero de composición diferente (diferentes % PLA/PGA), varía claramente. Se experimenta que un mayor contenido en ácido láctico se degradan más despacio que los de contenido en ácido láctico menor (Wu XS, 2001). Polímeros con mayor proporción de ácido láctico son menos susceptibles a la hidrólisis pues el grupo metilo impide estéricamente el ataque de moléculas de agua, por tanto, también enlentece la humectabilidad y la hidrofobicidad.

De forma genérica, parece ser que la degradabilidad sigue una cinética de primer orden, aunque las composiciones de PLA/PGA sean diferentes.

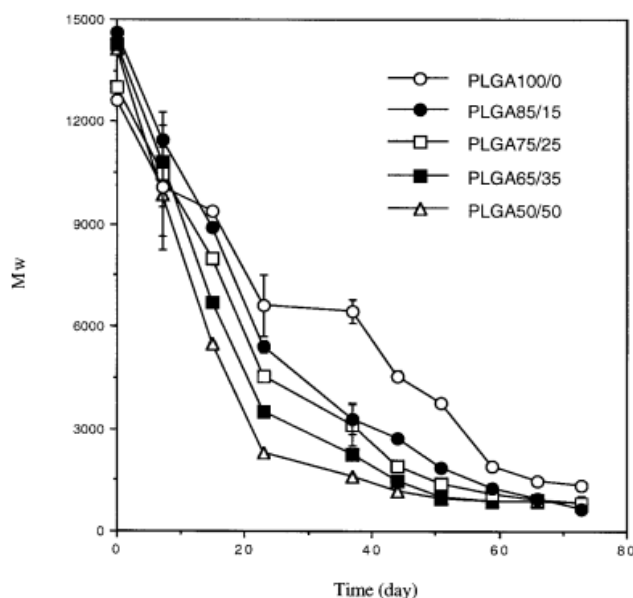


Figura 1.24: Gráfica de la biodegradación del PLGA de diferente composición PLA/PGA. Se evalúa el peso molecular promedio (M_w) en función del tiempo (días) (Xue SW, 2001).

En valor absoluto, la velocidad de la degradación aumenta con la proporción de PGA en los polímeros. El periodo inicial de la degradación PLA/PGA consiste en la ruptura de la cadena de forma constante, pero la mayor o menor velocidad de ruptura depende de la composición del PLGA. Esto está en acuerdo con la teoría de que la hidrólisis de polímero está determinada por la hidratación de los enlaces tipo éster de la cadena polimeral a diferentes velocidades.

Muestra	PLGA 100/0	PLGA 85/15	PLGA 75/25	PLGA 65/35	PLGA 50/50
Constante de biodegradación	0.0222	0.0422	0.0428	0.0521	0.0544

Tabla 1.5.: Valores de la constante de biodegradación (días^{-1}) al ir variando la composición PLA/PGA (Xue SW, 2001).

Efecto de la configuración del polímero sobre la biodegradabilidad del PLGA

La configuración es la ordenación en el espacio de los sustituyentes de un átomo de carbono particular.

En el PLGA, el PLA es un polímero termoplástico (polímero lineal no entrecruzado que puede ser fluido por calentamiento y toma una forma determinada manteniéndola en frío), amorfo o semicristalino. Ampliamente aplicable para la liberación de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes (Kohn J y cols., 1996). Contiene una unidad ópticamente activa al tratarse de una molécula quiral, existe como isómero L-PLA o como forma racémica *D,L*-PLA. Tanto el ácido láctico *D* como el *L* son física y químicamente idénticos en todos los aspectos excepto en que cada uno rota en dirección opuesta. Los polímeros semicristalinos tienen las cadenas dobladas, formando regiones ordenadas y densas llamadas dominios cristalinos, haciendo una especie de enlaces cruzados que confieren al polímero una resistencia y atracción mayor dándole más rigidez en comparación con el polímero amorfo. Los derivados poliméricos *D* y *L* son semicristalinos mientras que el *D,L*-PLA (mezcla racémica) es siempre amorfo. Una de las características más importantes de todo esto es que le confieren propiedades mecánicas diferentes, entre ellas el tiempo de degradación del polímero. Los copolímeros de PLGA generalmente contienen la forma racémica de ácido láctico.

El criterio de selección de PLA dependerá del resultado que se quiera obtener. Para tratamientos que requieran una degradación a largo plazo, la forma *L*-PLA será la indicada, mientras que lo más importante sea la absorción en espacio de tiempo corto, la forma amorfa será la más indicada (*D,L*-PLA). Se pueden graduar estas propiedades utilizando polímeros de *L/DL*-PLA (Mooney DJ, 1995).

Efecto de la solubilidad sobre la biodegradabilidad del PLGA

Estos biopolímeros son solubles en gran número de solventes orgánicos e insolubles en soluciones acuosas. En un medio acuoso tienen la capacidad de absorber

agua e hincharse, lo cual es una de las propiedades características, según el peso molecular y la composición monomérica a tener en cuenta en su biodegradabilidad (Lewis, 1990; Xue SW 2000).

Efecto de la masa molecular y viscosidad en la biodegradabilidad del PLGA

La adición de copolímeros de PLGA a un solvente hace que aumente considerablemente la viscosidad. Este parámetro está proporcionalmente relacionado con su masa molecular, pues está definida por el grado de polimerización. Los biopolímeros comúnmente utilizados para la elaboración de nanopartículas de la liberación controlada tienen un peso molecular de entre 12.000 y 200.000. Existen biopolímeros de menor peso molecular, pero sus propiedades no son las más adecuadas para este objetivo. Biopolímeros con peso molecular demasiado alto dificultan la preparación de estos nanosistemas (Lewis, 1990).

Por tanto, polímeros de diferentes pesos moleculares se degradan a diferentes velocidades. La literatura afirma que los polímeros de alto peso molecular inicial pierden su resistencia mecánica de forma más lenta que los de menor peso molecular. Esta afirmación no significa que los polímeros de mayor peso molecular tengan menor degradabilidad, de hecho se puede ver en la siguiente gráfica modelos similares.

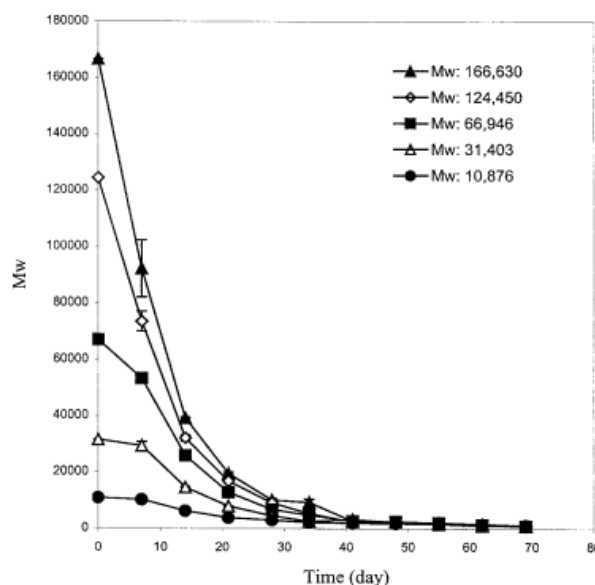


Figura 1.25: Biodegradación del PLGA, peso molecular (M_w) en función del tiempo (días). PLGA (Xue SW, 2001)

Muestra (Masa molecular)	166630	241450	66946	31403	10876
Constante de biodegradación	0.0969	0.0961	0.0834	0.0681	0.0472

Tabla 1.6: Valores de la constante de biodegradación (días^{-1}) según el peso molecular (Xue SW, 2001)

Con diferentes pesos moleculares, polímeros de igual composición se degradan siguiendo tres fases (Xue SW, 2001).

1. Biodegradación lenta, debida a la lenta hidratación de polímero. Los polímeros deben ser hidratados para ser degradados
2. Degradación más rápida
3. Disminuye la velocidad de degradación que se puede atribuir al bajo peso molecular de los polímeros restantes.

Degradación La degradación de PLA/PLGA ocurre por hidrólisis no enzimática. A pesar de que existen numerosos estudios sobre la degradación de estos poliésteres, los datos obtenidos de polímero nativo en polvo o de muestras procesadas tales como películas, implantes o suturas quirúrgicas no son necesariamente representativos del

mecanismo de degradación de las microesferas. Por tanto, se han realizado estudios específicos con microesferas elaboradas con diferentes PLA y PLGA (Tomasin C, 1996). Los resultados mostraron que las microesferas de PLGA 50:50 de bajo peso molecular, el más hidrofílico, se degradaban in vitro aproximadamente en un mes, mientras que (Rosas y Pedraz, 2007) las microesferas elaboradas con el polímero más hidrofóbico, D,L-PLA de gran peso molecular, requerían 12 a 16 meses para su hidrólisis completa.

Respecto a la proporción de PLA/PGA, un valor más bajo provocó una degradación más rápida debido a la mayor hidrofiliidad. En sentido contrario, un valor más alto retrasa la degradación por tener mayor hidrofobicidad.

Temperatura de transición vítrea (Tg)

Se define como la temperatura necesaria para alcanzar el estado vítreo (rígido y frágil) de los biopolímeros. En estado líquido o fundido, las moléculas de polímero se encuentran ovilladas o enmarañadas, a no ser que hay una fuerza externa que las obligue a orientarse en una dirección. Si la energía disponible es suficiente, las moléculas podrán moverse y los átomos de las cadenas podrán rotar alrededor de los ángulos de enlace, produciéndose cambios de conformación. En esta situación, el volumen no ocupado es alto pero la capacidad de rotación está más o menos limitada por impedimento estérico. En la figura 1. podemos ver la variación del volumen específico de dos polímeros con la temperatura, temperaturas elevadas se encuentran en estado líquido o fundido. La disminución del volumen específico se produce de forma gradual con la temperatura. La temperatura de transición vítrea es a partir de la cual el polímero sufre un marcado cambio de propiedades. A temperaturas por encima de la Tg modifican su conformación por poder moverse con más libertad; temperaturas por debajo de Tg hace que los movimientos quedan muy disminuidos. Por debajo de la Tg los polímeros amorfos tienen propiedades de vítreos, incluida la fragilidad, rigidez y transparencia, mientras que por encima de la Tg los polímeros se comportan como elastómeros.

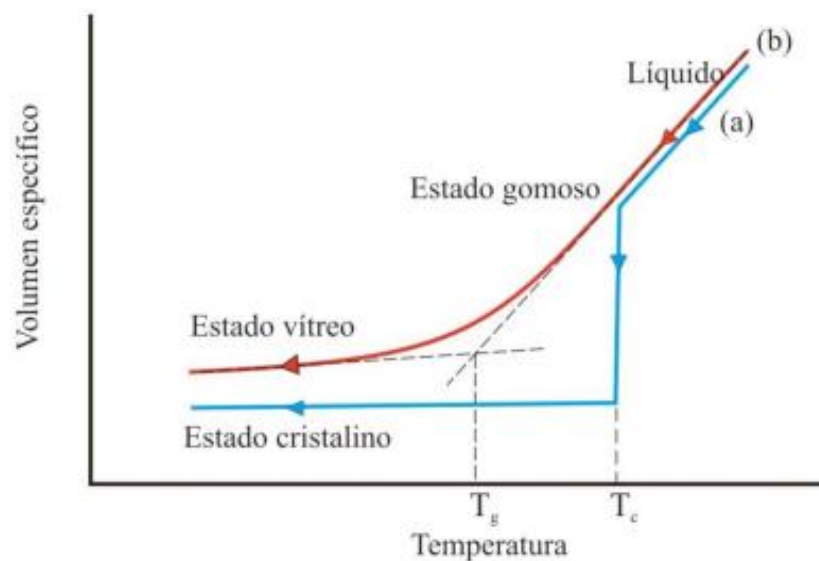


Figura 1.26: Variación del volumen específico en función de la temperatura en un polímero cristalino (a) y en un polímero amorfo (b).

En el caso de del PLGA, debido al PLA, tanto las zonas amorfas del *D* y el *L* como el *D,L*-PLA presentan una T_g por debajo de la cual el polímero se presenta como un sólido vítreo y por encima de la cual presenta comportamiento elástico y gomoso. Un polímero con una T_g cercana a la temperatura corporal será más dúctil al ser implantado que a la temperatura ambiente, por lo que la T_g es un parámetro que influye en el comportamiento final del PLGA. Es la T_g una propiedad muy importante que se ha de tener en cuenta en la preparación de las nanopartículas y esencial para la evaluación de la estabilidad morfológica, propiedades de difusión y velocidad de biodegradación.

<i>Polímero</i>	<i>Viscosidad Intrínseca (dL/g)</i>	<i>Temperatura de transición vítreo, T_g</i>	<i>Degradación (meses)</i>
PLGA 50:50	0.55-0.75	45-50	1-2
PLGA 65:35	0.55-0.75	45-50	3-4
PLGA 75:25	0.55-0.75	50-55	4-6
PLGA 85:15	0.55-0.75	50-55	5-6

DL-PLA	0.55-0.75	55-60	12-16
L-PLA	0.90-1.2	60-65	>24
PGA	1.4-1.8	35-40	6-12

Tabla 1.7: Relación del tiempo de degradación del PLGA con algunas propiedades físicas y químicas.

La Tg tiene relación directa con el peso molecular del biopolímero. La presencia de solventes orgánicos residuales o humedad en estos sistemas puede alterar la Tg en varios grados centígrados y llegar a un valor cercano a la temperatura corporal, lo cual podría afectar la velocidad de degradación de las nanopartículas y por consiguiente al perfil de liberación del principio activo (Lewis, 2000; Xue WS, 2001). Además, podría verse disminuida a una temperatura equivalente a la de almacenamiento y causar alteraciones morfológicas y aglomeración de nanopartículas.

Para las técnicas de esterilización de los nanosistemas de PLGA también juegan un papel importante pues no puede ser esterilizado en autoclave ya que el vapor de agua desprendido durante el proceso degradaría el material. Las técnicas más usadas para su esterilización son la radiación γ o la irradiación con un haz de electrones (usadas con precaución).

Efecto del pH en la biodegradación de PLGA

La velocidad de biodegradación disminuye en un medio básico, alrededor de 9. Aumenta, por tanto en un medio ácido, valores sobre 5. Valores de 7.4 alcanzan meseta de biodegradabilidad. Estos resultados se interpretan como que el PLGA en un medio básico puede hidrolizarse/degradarse más lentamente que en un medio ácido. En la primera fase de degradación rápida del polímero, la matriz se mantiene íntegra, como se explicó anteriormente, es decir que mantiene los grupos hidronios (H_3O^+) y por tanto, todavía no ha perdido peso molecular; la degradación/hidrólisis no puede difundir libremente fuera de la matriz polimérica y los iones hidróxido (OH^-) del medio no

pueden difundir en la matriz del polímero. Este retraso en la difusión hace que no se produzca la neutralización de los grupos carboxilo y por tanto no se da la escisión de la cadena polimérica. Después de unas semanas, se pierde la integridad de la matriz.

En un medio de degradación de PLGA de agua destilada no tamponado, se observa una primera fase donde el pH sufre una bajada lenta debida a los grupos hidronio, que en la mayoría permanecen atrapados en la matriz. En la segunda fase el pH disminuye drásticamente y se le puede atribuir a la pérdida de la integridad de la matriz polimérica. En la tercera fase, el pH disminuye hacia valores muy bajos probablemente a la desintegración total (Lewis 2000, XUE WS, 2001).

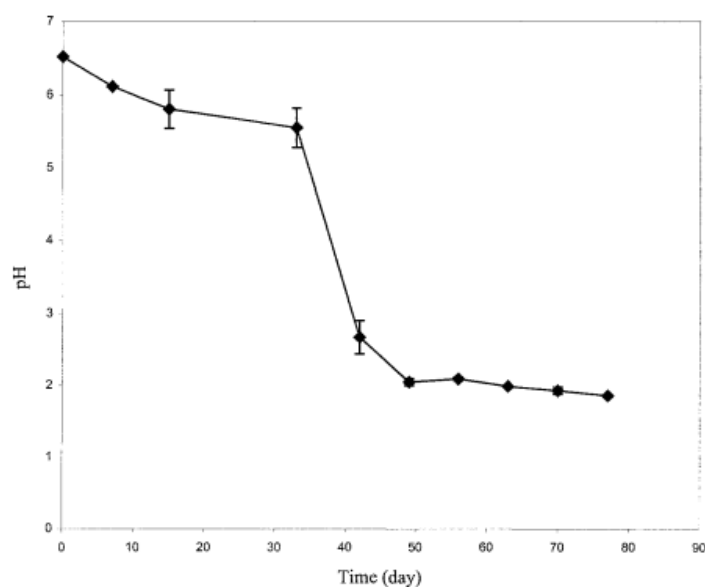


Figura 1.27: cambios de pH en la degradación del PLGA 75/25, M_w : 31.403, en un medio no tamponado (XUE WS, 2001)

2.- OBJETIVOS, CONTRIBUCIÓN Y PLAN DE TRABAJO

2.1.- OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo de investigación ha sido el diseño y caracterización de nanoplateformas biomédicas para el tratamiento del cáncer de colon. Como polímero formador de las nanoplateformas se ha utilizado el PLGA.

Debe tenerse en cuenta que el sistema nanotecnológico y el principio activo, forman una unidad funcional, por lo que ésta debe ser diseñada y perfectamente caracterizada para garantizar la seguridad en su administración. Para conseguir este fin, se realizará un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de PLGA, junto con una extensa caracterización geométrica, reológica y electroforética.

La capacidad de vehiculización de 5-FU (carga y liberación controlada) se estudiará también con profundidad mediante técnicas de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis). En este sentido, se prestará especial atención a la influencia que tienen las condiciones y metodología de preparación de las nanopartículas de PLGA en la incorporación (y posterior cinética de liberación de 5-FU).

Otro aspecto importante de este trabajo de investigación es la estimación de la citotoxicidad de las nanoplateformas desarrolladas. Para ello, se llevarán a cabo estudios de proliferación *in vitro* en fibroblastos de colon humano CCD-18 y en las líneas celulares de carcinoma de colon humano T-84, HT-29, HCT-15 y MC-38. Este estudio es posible gracias a la colaboración del grupo de investigación “Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación Cardiovascular” (CTS-107) de la Junta de Andalucía.

Finalmente se procederá a evaluar la estabilidad de los nanosistemas desarrollados tanto desde el punto de vista físico-químico como biológico, con objeto de conocer los posibles fenómenos de desestabilización y su eficacia.

Este trabajo de investigación ha contado con la financiación de FEDER, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + i), Instituto de Salud Carlos III (FIS, España), proyectos PI11 / 01862 y PI11 / 02571; y por el proyecto PE-2012 de la Junta de Andalucía (España). FQM-694

2.2.- CONTRIBUCIÓN

Dentro de la investigación y desarrollo de la Nanotecnología Farmacéutica, la principal aportación de éste trabajo es la optimización de una síntesis de nanopartículas de PLGA que resultan apropiadas como sistemas transportadores de 5-FU. Su óptima formulación permitirá una mejora para el tratamiento del cáncer de colon, vehiculizando y protegiendo al fármaco antineoplásico hasta el tejido u órgano diana. Cabe esperar, que la utilización de este nanosistema logre reducir las reacciones adversas derivadas de la extensa biodistribución del 5-FU y de la poca especificidad de este principio activo por las células tumorales. Así, se necesitarán dosis inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Por lo tanto, este trabajo podría contribuir en:

- Diseño de una metodología reproducible para la preparación de nanopartículas PLGA adecuadas como sistemas transportadores de fármacos de administración parenteral.
- Aplicación de técnicas experimentales de tipo físico, químico y fisicoquímico que permitan una adecuada caracterización de la nanoplataforma polimérica. Los resultados obtenidos facilitarán la puesta a punto de la metodología óptima de formulación.
- Definición de las condiciones para la vehiculización de una dosis apropiada del fármaco antineoplásico 5-FU. El análisis de los resultados alcanzados permitirá estimar la aplicabilidad de la nanoplataforma como sistema transportador del 5-FU hasta el lugar de acción.
- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de las nanoplataformas de 5-FU. La información obtenida puede ser útil en la valoración de la aplicabilidad clínica de estos coloides, ya que se obtendrá una valoración preliminar de la toxicidad per se

de las nanopartículas de PLGA en una línea de células sanas (CCD-18) y de la capacidad antitumoral de las nanoplateformas de 5-FU en cuatro líneas de células de cáncer de colon. Se han escogido: una línea de carcinoma de colon humano (T-84), una línea de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) y una de adenocarcinoma de colon murino (MC-38). Además se han utilizado una línea de adenocarcinoma de colon humano resistente (HCT-15).

- Definición de la estabilidad de las nanopartículas desarrolladas. La evaluación de los datos obtenidos permitirán fijar las condiciones más idóneas de conservación, así como establecer el periodo de eficacia.

2.3.- PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo seguido consta de las siguientes etapas:

1. Normalización del método de preparación de nanopartículas de PLGA, mediante los métodos de emulsión y evaporación del disolvente y el método de desplazamiento del solvente o nanoprecipitación. Estudio comparativo de las metodologías de formulación propuestas y análisis de las variables implicadas.
2. Caracterización geométrica (tamaño y forma) y reológica de los diferentes nanosistemas obtenidos.
3. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los nanosistemas sintetizados, mediante electroforesis. Estimación de la carga eléctrica superficial de las nanopartículas en función del pH y de la fuerza iónica (control de ésta mediante la composición del medio de dispersión).
4. Evaluación de la capacidad de vehiculización de 5-FU mediante espectrofotometría UV-Vis.
5. Estudio *in vitro* del proceso de liberación del agente antitumoral bajo condiciones fisiológicas estándar mediante espectrofotometría UV-Visible.
6. Análisis *in vitro* de la citotoxicidad de los nanosistemas cargados o no con el agente antitumoral en las líneas celulares CCD-18, T-84, HT-29, HCT-15 y MC-38.
7. Evaluación de la estabilidad de los nanosistemas cargados con respecto a la pérdida de principio activo (mediante espectrofotometría UV-Vis), fenómenos de desestabilización física (mediante multiple light scattering) y capacidad citotóxica.

3.- FORMULACIÓN

En este capítulo se desarrollan las condiciones experimentales más adecuadas para la formulación de forma reproducible de nanopartículas de PLGA cargadas con 5-FU. Para ello se analizan y comparan diferentes procedimientos de preparación y las variables implicadas. La posterior caracterización de estos nanosistemas contribuye a definir la metodología de preparación más idónea para obtener nanopartículas cargadas con 5-FU, útiles por vía parenteral para el abordaje terapéutico del cáncer colorrectal.

3.1.- METODOLOGÍA DE FORMULACIÓN

En las últimas décadas se han logrado grandes avances en el proceso de síntesis de nanopartículas poliméricas. Independientemente de la metodología empleada las investigaciones tienen tres objetivos:

- 1) búsqueda de componentes menos tóxicos
- 2) simplificación del proceso para fabricación a nivel industrial
- 3) optimización de las técnicas en cuanto a rendimiento, características fisicoquímicas y, eficacia de encapsulación y terapéutica (Hans y cols., 2002).

Aunque son muchos los métodos desarrollados para la preparación de nanopartículas, estos métodos se pueden clasificar en dos grandes categorías en función de si la formulación requiere una reacción de polimerización o si se consigue directamente desde una macromolécula o polímero preformado (Couvreur y cols., 1995).

Los métodos de polimerización se pueden clasificar en emulsión y polimerización interfacial; hay dos tipos de polimerización mediante emulsión: orgánica y acuosa, dependiendo de la fase continua. Adicionalmente también se habla de un método de condensación interfacial.

Por otro lado, las nanopartículas se pueden preparar directamente a partir de polímeros sintéticos, -como en el caso de este trabajo de investigación-, y por

desolvatación de macromoléculas. Recientemente, estos sistemas poliméricos también han sido preparados por técnicas de nebulización.

3.1.1.- POLIMERIZACIÓN DEL MONÓMERO

3.1.1.1.- POLIMERIZACIÓN MEDIANTE EMULSIÓN

La polimerización en emulsión es uno de los métodos más rápidos para la preparación de nanopartículas y fácilmente escalable (Kreuter y cols., 1990). El método se clasifica en dos categorías, dependiendo de la naturaleza acuosa u orgánica de la fase continua.

- En el caso de que la fase continua sea orgánica (fase O), la metodología implica la dispersión del monómero en una emulsión o microemulsión inversa, o en un material en el que el monómero no es soluble. Con el paso de los años este método ha ido perdiendo interés, ya que requiere disolventes orgánicos tóxicos, agentes tensioactivos, monómeros y un agente iniciador. Estos motivos, así como la naturaleza no biodegradable del polímero y dificultad inherente del proceso, han propiciado otras alternativas mucho más interesantes.
- Cuando la solución de monómero es disuelta en una fase continua acuosa (fase A), no son necesarios ni agentes tensioactivos ni emulsionantes.

El proceso de polimerización puede ser iniciado por diferentes mecanismos. Dicha iniciación ocurre cuando una molécula de monómero disuelto en la fase continua choca con un iniciador que podría ser un ión o un radical libre. Alternativamente, la molécula de monómero se puede transformar en el propio radical iniciador mediante energía de alta radiación, como γ -radiación, ultravioleta o luz visible.

3.1.1.2.- POLIMERIZACIÓN INTERFACIAL

En esta técnica el principal inconveniente es el uso de disolventes orgánicos para la fase externa. El lavado de estos disolventes representa un laborioso proceso (Allémann y cols., 1993). A pesar de esto se trata de un método con elevada eficacia de encapsulación. Además la ventaja de obtención de nanocápsulas mediante este

método se basa en la formación del polímero in situ, permitiendo que la membrana polimérica pueda seguir el contorno de la fase interna tanto de emulsiones O/A, como A/O.

3.1.1.3.- POLICONDESACIÓN INTERFACIAL

Las nanopartículas poliméricas también pueden ser preparadas mediante policondensación interfacial a partir de un monómero lipófilo, como ftaloildicloruro o a partir de un monómero hidrófilo, dietilentriamina, en presencia y ausencia del agente tensioactivo (Montasser y cols., 2002). Estas nanopartículas presentan tamaños menores a 500 nm. Otros polímeros como poliuretano y poliéter uretano, han sido utilizados con éxito con una modificación de este mismo método (Bouchemal y cols., 2004).

Entre estos métodos encontramos diferentes limitaciones como el uso de calor o sonicación, elevados volúmenes de disolventes orgánicos o aceites, y agentes químicos reticulantes que presentan toxicidad. Además la incertidumbre sobre la pureza de las macromoléculas y el potencial antigénico que presentan restringen el uso de este tipo de nanopartículas (Hans y cols., 2002). La mayoría de los monómeros presentan lenta o ninguna biodegradación de los polímeros. Además, las moléculas residuales en el medio de polimerización (monómero, oligómero, tensioactivo, etc.) puede ser más o menos tóxicas, y requerir una purificación meticulosa. De ahí que, tanto las nanopartículas formadas a partir de esos monómeros como sus residuos puedan resultar tóxicos. Por otro lado, si se emplea radiación para inducir la polimerización, pueden tener lugar reacciones de entrecruzamiento entre el polímero y el principio activo o degradación de los componentes de la nanopartícula (Pinto Reis y cols., 2006), disminuyendo así la actividad del sistema. Para evitar estas limitaciones, se han propuesto métodos que utilizan polímeros preformados en lugar de monómeros.

3.1.2.- OBTENCIÓN A PARTIR DE POLÍMEROS PREFORMADOS

3.1.2.1.- EMULSIFICACIÓN/EVAPORACIÓN DEL SOLVENTE

Este método se basa en la emulsificación de una solución orgánica que contiene el polímero en una solución acuosa de un agente tensioactivo o estabilizante seguida de la evaporación del disolvente orgánico (figura 3.1.). El polímero se disuelve en un disolvente apropiado (por ej. acetato de etilo, cloroformo, diclorometano). La mayoría de disolventes empleados en esta técnica son organoclorados, principalmente diclorometano y cloroformo, por su inmiscibilidad en agua, fácil emulsificación, propiedades de solubilización y bajo punto de ebullición. La fase interna de la emulsión se añade sobre la fase externa acuosa, en la que se disuelve un agente tensioactivo que proporciona estabilidad a la emulsión. La emulsificación tiene lugar mediante agitación por cizalladura para reducir el tamaño de la gotícula de la emulsión. A este proceso de emulsificación le sigue la evaporación del disolvente orgánico, que provoca la precipitación del polímero y la formación de las nanopartículas (Mundargui y cols., 2008). Como paso final, la suspensión de las nanopartículas formadas se somete a una serie de lavados con agua purificada para eliminar el exceso de agente estabilizante.



Figura 3.1.: Método de emulsificación/evaporación del disolvente.

Las emulsiones formadas pueden ser:

- Fase orgánica en fase acuosa, (O/A).
- Fase acuosa en fase orgánica (A/O).
- Emulsiones múltiples (A/O/A).

Pueden emplearse para incluir principios activos de distintas características. La emulsión O/A suele emplearse para la encapsulación de principios activos hidrófobos o agentes de contraste (Pasani y cols., 2006), mientras que la emulsión múltiple A/O/A es más usada para la encapsulación de principios activos hidrófilos.

Es una formulación inicialmente sencilla pero hay muchas variables que pueden influir en las características de las nanoesferas obtenidas (Jalil R, y cols., 1990; Thies C y cols., 1984).

Estas variables son:

- Solvente orgánico.
- Naturaleza y cantidad de emulsificante.
- Naturaleza y solubilidad del principio activo.
- Temperatura de evaporación del solvente.
- Relación de volumen de las fases orgánica y acuosa.
- Relación principio activo y polímero.
- Estructura y masa molecular del polímero.
- Tipo y velocidad de agitación.

Solventes: Cuando se usa el proceso de evaporación del solvente, el solvente para los polímeros de ácido láctico/glicólico debe ser inmisible o sólo ligeramente soluble en el medio de suspensión (acuoso u oleoso). *Bodmeier y Mcginity* evaluaron el efecto de diferentes solventes en la formación de nanoesferas de ácido poli (DL-láctico) (Bodmeier R y cols., 1988; Morlock y cols., 1997; Garcia L y cols., 1997; Salmore MD y cols., 1997; Refler G, 1997). Ellos encontraron que los solventes miscibles en agua, como la acetona y el dimetilsulfóxido, no conducen a la formación de nanoesferas durante la emulsificación. Por el contrario, se forman aglomerados irregulares debido

al rápido intercambio del solvente. Sin embargo, *Kawashina* y *Yamamoto* utilizan solventes como la acetona para realizar mezclas que contribuyen a mejorar el proceso de evaporación del solvente y así reducir el tiempo de formación de las nanoesferas. Adicionalmente, el punto de ebullición del solvente debe ser más bajo que el del medio de suspensión si el solvente es eliminado por evaporación. Los solventes más comúnmente utilizados son el acetato de etilo y el diclorometano, por su baja toxicidad, su fácil eliminación y su excelente habilidad para disolver polímeros. Otros solventes que se han usado son el cloroformo y el acetonitrilo. Si se desea la disolución del principio activo en la solución del polímero, se necesita tener también en consideración la habilidad del disolvente para disolver el principio activo. También se han utilizado mezclas de solventes para disolver el polímero y el principio activo (Herrmann, 1993), por ejemplo, diclorometano (inmiscible en agua) más metanol, etanol o propilenglicol (miscibles en agua). El uso de estos 3 últimos permite una rápida eliminación del solvente y una rápida precipitación del polímero.

Emulsificantes. Los emulsificantes proporcionan una lámina fina protectora alrededor de las gotículas de aceite, polímero y principio activo, y de esta forma disminuyen la coalescencia y la coagulación y estabilizan el sistema. Frecuentemente, la dificultad inicial encontrada en el desarrollo de un procedimiento de nano encapsulación es la aglomeración de las gotículas de aceite durante el proceso de fabricación. Cuando se está eliminando el solvente, el emulsificante continúa manteniendo las gotículas de aceite en su configuración esférica y las previene de la agregación hasta que el solvente es eliminado completamente y las nanoesferas son endurecidas como partículas (Xue XS, 1995).

Los emulsificantes más comúnmente empleados en el proceso de evaporación del solvente son los coloides poliméricos hidrofílicos y los surfactantes aniónicos o no iónicos. Ejemplos de ellos son el alcohol polivinílico, (Beck LR, 1980; Wang HT y cols., 1991), la poli-vinilpirrolidona, los alginatos (Arshady R y cols., 1990) la gelatina (Wakiyama N y cols., 1992), la metilcelulosa (Spencehaver y cols., 1986), la hidroxialquilcelulosa, el polisorbato (Spencehaver y cols., 1986; Badmeier R, 1987) el span, la lecitina, etc. El emulsificante más comúnmente empleado en el método o/w es

el alcohol polivinílico. La concentración requerida y la efectividad de cada emulsificante es diferente, y el mejor emulsificante para una aplicación en particular es determinado experimentalmente.

Las propiedades físico-químicas, las propiedades estructurales y la concentración del emulsificante influyen en las características de las nanopartículas (Spence y cols., 1986; Badmeier R, 1987). Generalmente se dice que para un emulsificante dado, a mayor concentración se obtienen nanopartículas más pequeñas. Sin embargo, han aparecido concentraciones limitantes, por encima de las cuales el emulsificante no aumenta su efecto. Esto se debe probablemente a que se haya alcanzado la concentración óptima de empaquetamiento de la emulsión.

Principios activos. Debido a que el método o/w involucra una emulsión acuosa, este se limita a encapsular en las nanopartículas aquellos principios activos que presentan una baja solubilidad en agua, ya que si el principio activo es soluble en agua se repartirá desde la fase orgánica hacia la fase acuosa. Esta pérdida del principio activo traerá como resultado una pobre eficiencia de encapsulación (Spence y cols., 1986.) Por el contrario, los principios activos liposolubles como los esteroides, pueden ser encapsulados exitosamente en micro o nanoesferas usando este método o/w (Bodmeier, 1987).

Para minimizar la pérdida de principios activos ionizables hacia la fase acuosa durante el proceso de encapsulación o/w, el pH de la fase acuosa puede ajustarse para suprimir la ionización del principio activo y consecuentemente reducir la solubilidad de este en dicha fase. Este resultado negativo puede también reducirse por la previa saturación de la fase acuosa con el mismo principio activo. *Wakiyam* y otros observaron que al presaturar la fase acuosa de una emulsión con el principio activo (tetracaína) a encapsular, aumentaba el contenido de este en las partículas formadas (Ramos y cols., 2001)

Si el principio activo va a ser incorporado en las nanopartículas es insoluble en el solvente usado para disolver el polímero, este puede ser pulverizado o micronizado para proporcionar una distribución homogénea en la emulsión y la partícula

resultante. Si el principio activo no es completamente soluble en el solvente orgánico empleado, este puede cristalizar dentro de la nanopartículas a ciertas concentraciones. En este sentido los cristales deben concentrarse en algunas regiones, como en la superficie, dando una distribución heterogénea del principio activo que alterará su perfil de liberación (Spelenhauer G, 1988).

Estructura y masa molecular: La naturaleza del polímero, la secuencia de los monómeros y de ahí su masa molecular permiten ajustar la liberación del fármaco al tiempo en que se alcanzan las concentraciones terapéuticas en sangre. Los polímeros de diferentes masas moleculares varían en sus viscosidades intrínsecas, parámetro que determina en la eficiencia del proceso de obtención de las nanopartículas y en sus propiedades.

El resto de los parámetros influyen en el proceso de optimización del método de obtención y están íntimamente relacionados con el solvente, el polímero, el emulsificante y el principio activo.

3.1.2.2.- DESPLAZAMIENTO DEL SOLVENTE (NANOPRECIPITACIÓN) Y DEPOSICIÓN INTERFACIAL.

El desplazamiento del disolvente y la deposición interfacial son métodos similares basados en la emulsión espontánea de una fase interna orgánica que contiene el polímero disuelto en una fase externa acuosa. Sin embargo, el desplazamiento del disolvente forma nanoesferas o nanocápsulas, mientras que la deposición interfacial sólo nanocápsulas.

La técnica de desplazamiento del disolvente, también llamada nanoprecipitación o “sustitución del disolvente” implica la precipitación de un polímero preformado a partir de una solución orgánica y la difusión del disolvente orgánico en el medio acuoso en la presencia o ausencia de un agente tensioactivo (Figura 3.2.) (Barichelo y cols., 1999; Fessi y cols., 1989, Galindo-Rodriguez y cols., 2004). El polímero, se disuelve en un disolvente miscible en agua de polaridad intermedia, dando lugar a la precipitación de nanoesferas. Concretamente el polímero,

el fármaco, y, de manera opcional, un estabilizante lipofílico se disuelven en un disolvente polar miscible en agua, como acetona o etanol (Mundargi y cols., 2008).



Figura 3.2.: Método de desplazamiento del solvente y deposición interfacial.

Esta solución se adiciona sobre un no-solvente bajo agitación magnética, entendiéndose por “no-solvente” aquel disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble. A medida que se adiciona el no-solvente se provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita. Generalmente, el no solvente está constituido por una solución acuosa que contiene un agente estabilizante, por ejemplo, poli(vinil alcohol) (PVA) (Murakami y cols., 1999) o poloxamer 188. Las nanopartículas se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso, que se elimina posteriormente de la suspensión sometiendo a presión reducida. El mecanismo de formación de las partículas por este método se explica por las turbulencias interfaciales que se generan durante la sustitución del disolvente. Se trata de una difusión violenta debida a la miscibilidad de los disolventes. Las gotículas de disolvente, de tamaño nanométrico, son eliminadas de la interfase (Galindo-Rodríguez y cols., 2004). Estas gotículas se estabilizan rápidamente por el agente tensioactivo, hasta que se da la completa difusión del disolvente y, por tanto, la precipitación del polímero.

La utilidad de esta técnica está limitada a disolventes miscibles en agua, en los cuales el ritmo de difusión es lo suficientemente rápido como para producir la emulsificación espontánea. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la dificultad de elección del sistema fármaco/polímero/disolvente/no-solvente en el cual se formen las nanopartículas. Además, esta técnica únicamente es útil para principios activos solubles en este tipo de disolventes como pueden ser la indometacina, ciclosporina A o 5-FU (Molpeceres y cols., 2000).

El tamaño de las partículas y el rendimiento de fabricación se ven afectados por la concentración del polímero debido al incremento en la viscosidad de la fase orgánica (Mei y cols., 2008, Jimenez y cols., 2004).

Paralelamente, se ha demostrado que el diámetro medio de las nanopartículas de PLGA aumenta al incrementar la concentración de PVA (Van Der Ende y cols., 2008). Este efecto se relaciona con las elevadas concentraciones de PVA (2-6%, p/v), que aumentan la viscosidad del medio acuoso, disminuyendo así la velocidad de difusión del disolvente. El peso molecular del PVA también influye de manera decisiva en el tamaño de partícula, rendimiento de la formulación y redispersión de las partículas liofilizadas (Astete y cols., 2006). Así, el PVA de alto peso molecular es útil para aumentar el rendimiento del proceso, así como para obtener una homogeneidad en tamaño y una mejor redispersión de las partículas liofilizadas, a diferencia del PVA de bajo peso molecular (Murakami y cols., 1997).

Con respecto al método de evaporación del disolvente, la nanoprecipitación presenta la ventaja de que, además de ser un método apropiado para encapsular principios activos hidrofóbicos, se consume menor energía durante el proceso de formación de las nanopartículas, ya que únicamente requiere una agitación leve en lugar de sonicación o microfluidización (Astete y cols., 2006). Por otro lado, presenta una serie de desventajas como son:

1. El requerimiento de elevadas cantidades de agua para la formación de las nanopartículas.
2. Tiempos prolongados de agitación.
3. El tamaño es sensible a la concentración de polímero si no se utiliza una elevada agitación por cizalladura para la reducción del mismo
4. Baja eficacia de encapsulación de principios activos hidrófilos, por la elevada tendencia a la difusión del activo a la fase acuosa (Astete y cols., 2006).

Sin embargo, recientemente este método ha sido modificado para lograr encapsular principios activos hidrófilos, combinando la técnica de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión doble con la técnica de la difusión del disolvente (Cohen-Sela y cols., 2009, Bilati y cols., 2005).

La deposición interfacial es un proceso utilizado para la producción de nanocápsulas. En este caso se añadiría un pequeño volumen de aceite no tóxico a la fase orgánica (Quintanar-Guerrero y cols., 1998). Hay que tener en cuenta dos aspectos importantes en la selección del aceite: 1) no debe degradar el polímero y 2) debe ser un buen solvente para el fármaco de manera que no favorezca una rápida liberación y reduzca la cristalización espontánea del fármaco durante su preparación.

La principal diferencia es que los polímeros tales como PLA se disuelven junto con el fármaco en una mezcla de disolventes (por ejemplo, bencilo benzoato, acetona, y fosfolípidos) (Seijo y cols., 1990). Esta mezcla es inyectada lentamente en un medio acuoso bajo agitación, dando como resultado la deposición del polímero en forma de nanopartículas de unos 230 nm de tamaño (Ammoury y cols., 1991, Fessi y cols., 1989). La deposición del polímero se produce en la interfaz entre las nanogotas de aceite finamente dispersadas en la fase acuosa, formando las nanocápsulas (Ammoury y cols., 1991).

3.1.2.3.- EMULSIFICACIÓN/DIFUSIÓN DEL SOLVENTE

Consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua como propilen carbonato, alcohol bencílico y el acetato de etilo, que previamente se satura con agua para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos (Arbós y cols., 2002, Vargas y cols., 2004). El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua, y esta fase orgánica se emulsifica, bajo agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante (Figura 3.3.). Los más empleados son el dodecil sulfato sódico (SDS), el PVA y el bromuro de didodecilmetilamonio (DMAB). La posterior adición de agua al sistema provoca la difusión del disolvente a la fase externa, formándose así las nanopartículas. Dependiendo del punto de ebullición del disolvente, éste puede eliminarse por destilación o por filtración de flujo transversal.

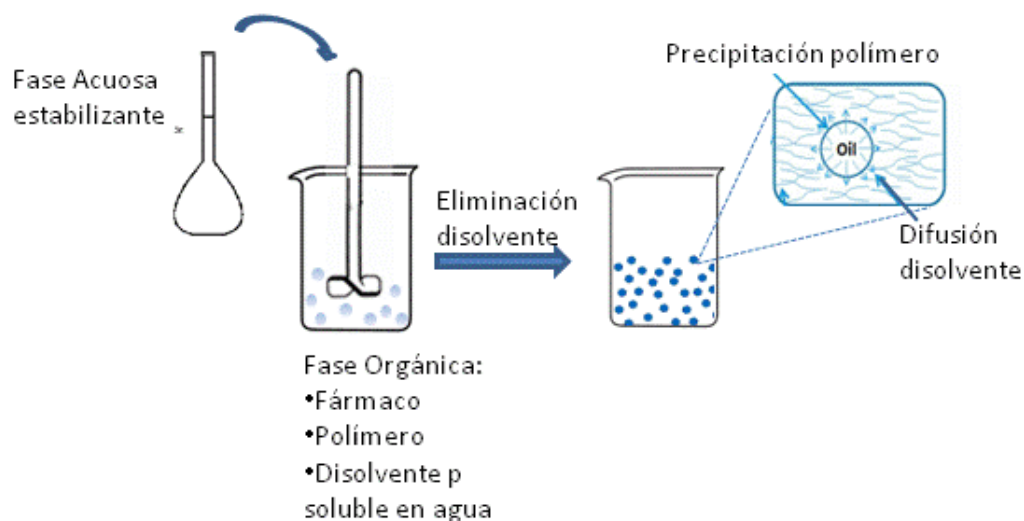


Figura 3.3.: Método de emulsificación/difusión del disolvente.

Esta técnica presenta varias ventajas, como alta eficiencias de encapsulación (generalmente del 70%), no necesita homogeneización, alta reproducibilidad de lote a lote, sencillez, y distribución de tamaños estrecha. En cuanto a las desventajas se encuentran los grandes volúmenes de agua que deben ser eliminados de la suspensión y la fuga de fármaco soluble en agua en la fase externa saturada acuosa durante la emulsificación, reduciendo la eficiencia de encapsulación. Al igual que con algunas de las otras técnicas, éste método es eficiente para la encapsulación de fármacos lipófilos.

3.1.2.4.- *SALTING OUT*

Este método se basa en la separación de un disolvente hidromiscible de una solución acuosa rica en electrolitos (Figura 3.4.) (Ma y cols, 2005). Esta técnica puede ser considerada como una modificación de la técnica de emulsificación con difusión del disolvente. En primer lugar el polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente como la acetona, esta solución se emulsiona en una solución acuosa que contiene el agente de *salting-out* (electrolitos, como cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y magnesio acetato, o tales como la sacarosa) y un agente estabilizante como polivinilpirrolidona o hidroxietilcelulosa. Esta emulsión O/A se diluye con suficiente volumen de agua o solución acuosa para mejorar la difusión de acetona en la fase acuosa, induciendo así la formación de nanoesferas. La selección del agente *salting-out* es importante, ya que puede desempeñar un papel decisivo en la eficiencia de encapsulación del fármaco. Tanto el disolvente y el agente de *salting-out* se eliminan por filtración (Quintanar-Guerrero y cols., 1998).

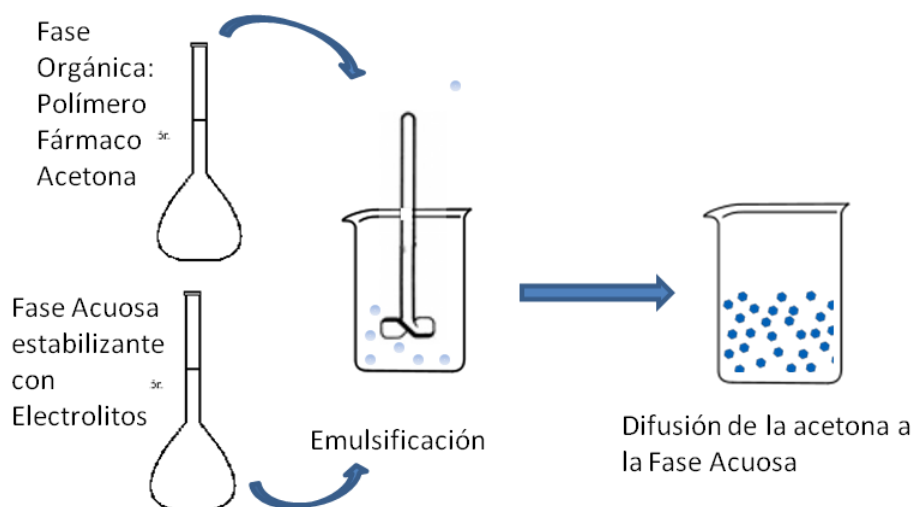


Figura 3.4.: Esquema del método de “*salting-out*”.

Esta técnica no requiere un aumento de la temperatura y, por lo tanto, puede ser útil con fármacos termosensibles (Lambert y cols., 2001). Las principales desventajas se deben a su aplicación exclusiva para drogas lipófilas y al largo proceso de lavado de las nanopartículas (Couvreur y cols., 1995).

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control racional del tamaño y forma, entre otras características de los nanosistemas transportadores de fármacos; y provee los medios para adaptar las propiedades de los materiales a una aplicación específica. Entre los factores a tener en cuenta o que pueden verse influenciados en el desarrollo de estos sistemas de liberación controlada se encuentran: tipo de material, tamaño de las partículas, cantidad de fármaco incorporado, fármaco liberado (*in vivo* e *in vitro*), estabilidad del fármaco, estabilidad del nanosistema, efecto del almacenamiento, propiedades de la superficie, antigenicidad y toxicidad del sistema de liberación.

3.2.- FORMULACIÓN EXPERIMENTAL

El estudio y optimización de los procesos de síntesis podría controlar los parámetros estructurales que gobiernan las características del nanosistema y la vehiculización de los principios activos en las nanopartículas objeto de estudio, lo que permitiría adaptar las propiedades de estos nanosistemas de acuerdo con su uso específico. Con el objetivo de estudiar la versatilidad de diferentes métodos de síntesis y su adecuación a la posterior caracterización y citotoxicidad *in vitro* se abordaron 2 técnicas y cinco metodologías de síntesis: [A (1 y 2)], [B (1 y 2)] y [C]. La tabla 3.1. presenta las condiciones finales seleccionadas para cada método.

<i>Metodología de preparación</i>	<i>Velocidad agitación (r.p.m.)/tiempo</i>	<i>Fase acuosa</i>	<i>Fase orgánica</i>	<i>Evaporación disolventes</i>
A 1 <i>emulsificación/ evaporación del solvente</i> emulsión simple	19.500/30min	PVA (0.6%, p/v)	Etil acetato + 125 mg PLGA	24 h agitación magnética, 25°C (100 r.p.m.)
A2 <i>emulsificación/ evaporación del solvente</i> emulsión simple	2.000/30min	PVA (2%, p/v)	Cloroformo + 100 mg PLGA	24 h agitación magnética, 25°C (100 r.p.m.)
	8.000/30min			
	16.000/30min			
	Sonicador/4min			
B <i>emulsificación/ evaporación del solvente</i> doble emulsión	2.000/30min	B1: Metanol/ agua (3:1.5v/v)	Cloroformo + 125 mg PLGA	Rotavapor (30°C)
	8.000/30min			
	16.000/30min	B2: Pluronic F-68 (0.5%, p/v)		
	Sonicador/4min			
C <i>desplazamiento del solvente o nanoprecipitación</i>	900/30min	Pluronic F-68 (1%, p/v)	Acetona + 90 mg PLGA	Rotavapor (30°C)

Tabla 3.1. Condiciones generales investigadas para la formulación de nanopartículas de PLGA.

Se realizó una optimización de las técnicas empleadas en la elaboración de las nanopartículas, evaluando la posible influencia de factores tecnológicos y de formulación tales como tensioactivo, disolvente orgánico, velocidad de agitación, modo y temperatura de evaporación de disolventes.

Las suspensiones de nanopartículas resultantes fueron sometidas a un procedimiento de limpieza que consistió en su centrifugación (Centrifuge 5804. Eppendorf) a 8.000 r.p.m. para la síntesis A y 10.700 r.p.m. para las síntesis B y C, en todos los casos durante 30 minutos; y posterior resuspensión en agua bidestilada MiliQ. En el caso de utilizar la sonda ultrasónicos, es necesario un segundo ciclo de centrifugación; al igual que las Np C, que también requirieron un segundo ciclo de centrifugación.

El sedimento resultante se redispersa -con ayuda de ultrasónicos- en agua bidestilada y se almacena a 4°C para su posterior utilización.

La capacidad de cada una de las metodologías de síntesis utilizadas para la obtención de nanopartículas PLGA-(5-FU) se evalúa a través del rendimiento del proceso así como de las características fisicoquímicas y biológicas de las mismas.

4.- CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS NANOSISTEMAS

4.1.-ESTUDIO GEOMÉTRICO

4.1.1. FORMA

Se utilizaron dos metodologías diferentes para definir la geometría de las partículas de PLGA obtenidas. Por un lado, se estudiaron tamaño y forma mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM, microscopio electrónico STEM Philips CM20, Holanda) y microscopía electrónica de barrido (SEM, microscopio electrónico Zeiss DSM 950, Alemania). Para la obtención de las microfotografías HRTEM, se sonicó durante 5 minutos una suspensión acuosa diluida de nanopartículas (aproximadamente 0.02%, p/v) para a continuación realizar una tinción negativa con acetato de uranilo, depositando unas microgotas de ésta sobre una rejilla de cobre con película formvar. Por último, estas rejillas se secaron a $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en un horno de convección.

En el caso del análisis SEM, se realizó en un microscopio de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) (FEI, Quanta 400, EE.UU). Para el proceso de preparación de la muestra se depositó una gota de la suspensión en un soporte de acero inoxidable. A continuación se realizó un ciclo de purgado (de 3.5 a 9.5 torr y de 9.5 a 3.5 torr, realizado 5 veces) para alcanzar un estado de equilibrio en el sistema. Dicha condición se mantiene con una presión de 4.4 torr, una temperatura de 2°C y una humedad relativa de un 40%.

La figura 4.1. muestra diferentes microfotografías correspondientes a las nanopartículas obtenidas por el método de emulsificación/evaporación del solvente mediante emulsión simple, denominadas nanopartículas A (Np A), con PVA como tensioactivo y etilacetato (A1) o cloroformo (A2), respectivamente, como disolventes orgánicos.

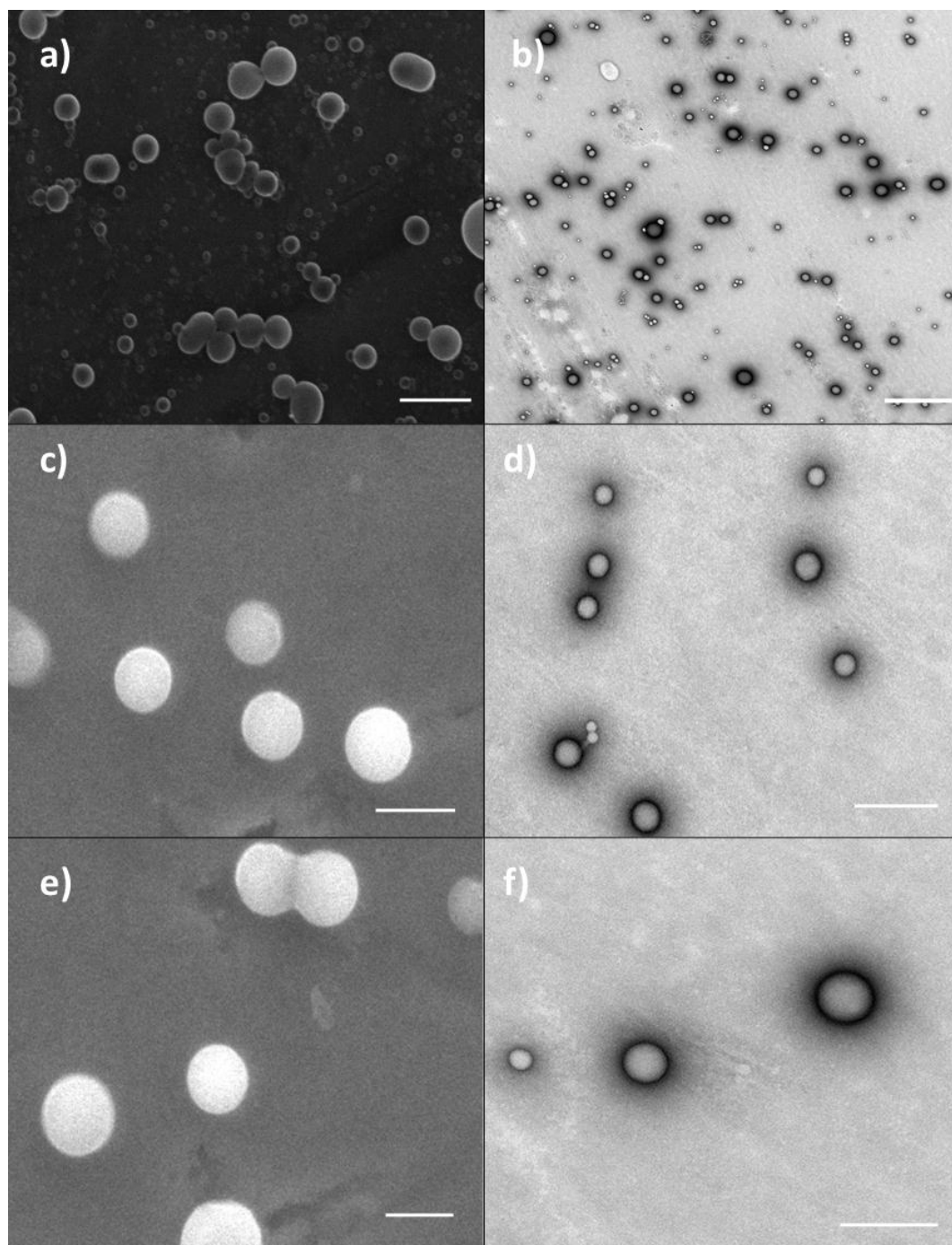


Figura 4.1.: Microfotografías ESEM de las nanopartículas de PLGA a la izquierda, y HRTEM a la derecha. (a) y (b) nanopartículas A1, longitud de la barra 500 nm y 1 μ m, respectivamente; c) y d) nanopartículas A2, longitud de la barra 150 y 200 nm, respectivamente, (e) y (f) nanopartículas A2 cargadas con fármaco, longitud de la barra 150 y 200 nm, respectivamente.

La figura 4.2. muestra diferentes microfotografías correspondientes a las nanopartículas obtenidas por el método de emulsificación/evaporación del solvente mediante doble emulsión, denominadas nanopartículas B, con Pluronic® F-68 como tensioactivo y cloroformo como disolvente orgánico. En el caso de las nanopartículas B-in, el fármaco se incorpora en la fase acuosa interna, B1 (tabla 3.1). En el caso de las nanopartículas B-ex, el fármaco se incorpora en la fase acuosa externa, B2 (tabla 3.1).

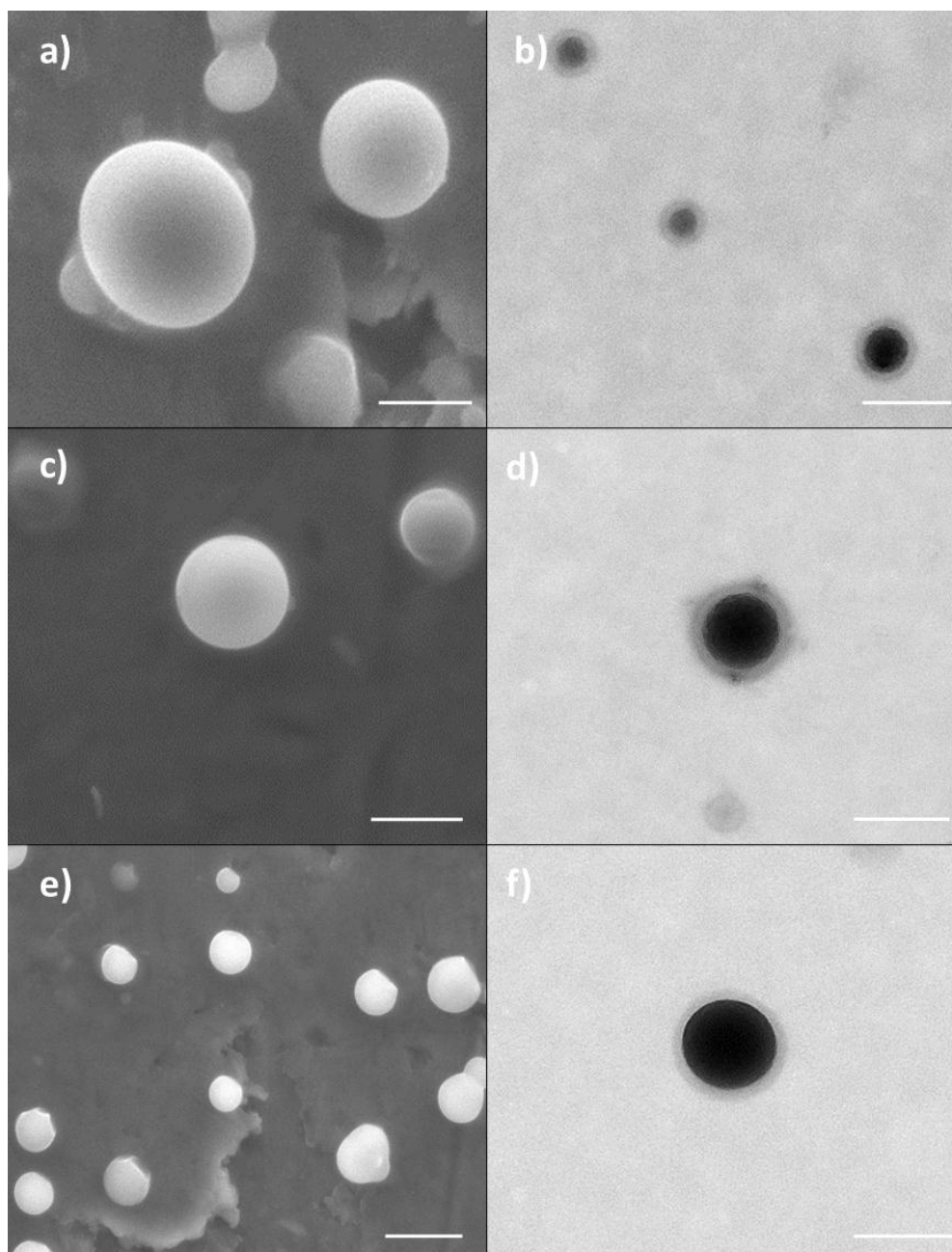


Figura 4.2.: Microfotografías ESEM de las nanopartículas PLGA, a la izquierda y HRTEM a la derecha; (a) y (b) nanopartículas B, longitud de la barra 100 nm y 200 nm, respectivamente; (c) y (d) nanopartículas B-in, longitud de la barra

200 nm (e) y (f) nanopartículas B-ex, longitud de la barra 200 y 100 nm, respectivamente.

La figura 4.3. muestra diferentes microfotografías correspondientes a la síntesis de nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento del solvente o nanoprecipitación, llamadas C, con Pluronic® F-68 como tensioactivo y acetona como disolvente orgánico.

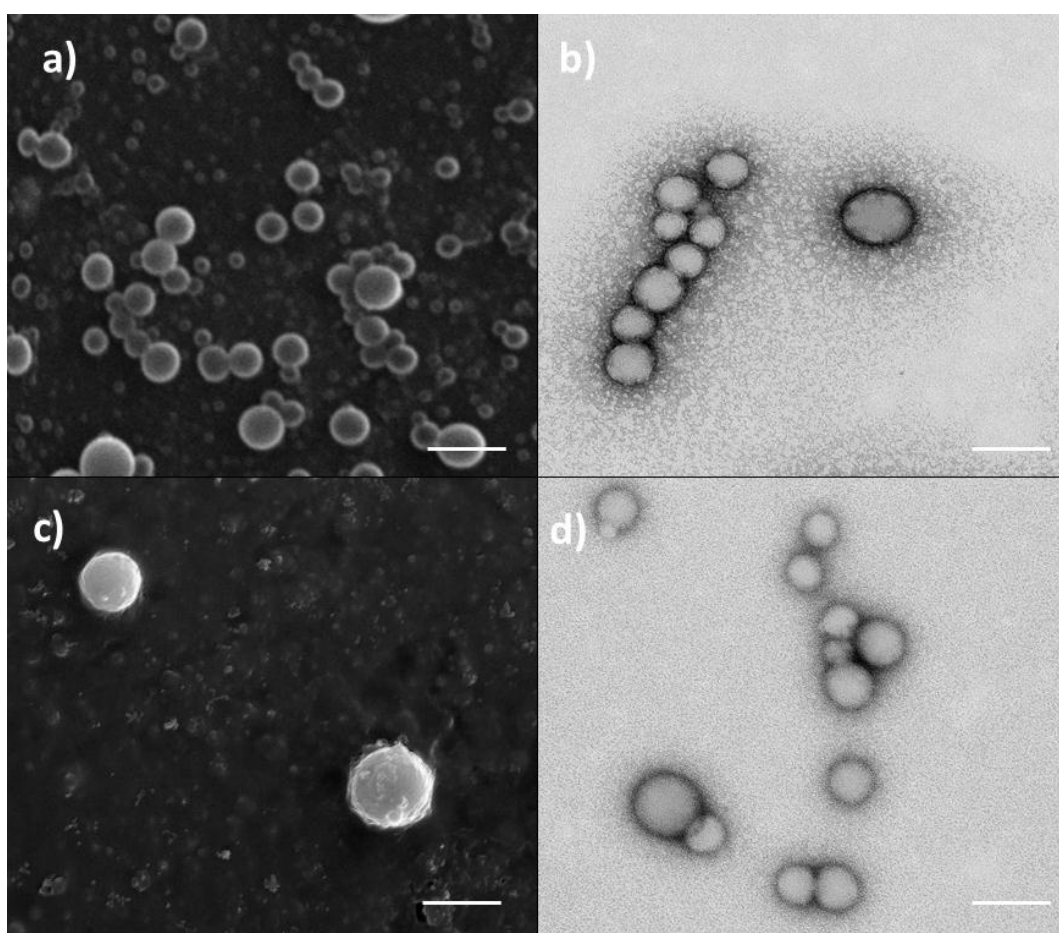


Figura 4.3.: Microfotografías ESEM de PLGA a la izquierda y HTEM a la derecha; (a) y (b) nanopartículas C, longitud de la barra 100 nm c) y d) nanopartículas C cargadas de fármaco, longitud de la barra 100 y 200 nm, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante los estudios HRTEM y ESEM permiten afirmar de forma preliminar que la metodología desarrollada para la síntesis de nanopartículas poliméricas de PLGA ha resultado ser eficaz.

El análisis de las microfotografías de las suspensiones acuosas de las nanopartículas, permitió identificar su morfología esférica en todas las condiciones de formulación ensayadas.

La observación microscópica mediante ESEM de las nanoesferas cargadas con 5-FU y preparadas por los métodos A y B muestra la existencia de partículas esféricas con superficie lisa (figura 4.1 y 4.2). Sin embargo al analizar las nanoesferas preparadas por el método C, éstas presentan pequeñas protuberancias y una superficie más heterogénea (figura 4.3). Cuando se utiliza la menor concentración de polímero, se producen gotas de fase polimérica menos viscosas y en consecuencia, la formación de una estructura más irregular.

4.1.2.- TAMAÑO

Se utilizó la espectroscopia de correlación de fotones (PCS, Malvern 4700 analyzer, Malver Instruments, Inglaterra), técnica con la que confirmar el tamaño del coloide y el grado de polidispersión. El ángulo de scattering utilizado fue de 60° y se analizaron suspensiones acuosas diluidas de nanopartículas (aproximadamente 0.02%, p/v). El índice de polidispersión es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños. Los tamaños e índice de polidispersión de las diferentes síntesis en función del tiempo se recogen en las tablas 4.1, 4.2. y 4.3.

	Disolvente utilizado	Velocidad de agitación r.p.m.	Tiempo						
			0 días		2 meses		6 meses		
			d (nm)	IP	d (nm)	IP	d (nm)	IP	
A-1	Etil acetato	19.000	190±37	0.74	-	-	-	-	
A-2	Cloroformo	2000	348±63	0.98	-	-	-	-	
		8000	424±14	0.38	-	-	-	-	
		16000	860±75	0.72	-	-	-	-	
		Sonicador	178±3	0.18	222±2	0.21	230 ±12	0.23	
	Concentraciones de 5-FU (M)	Sonicador cargadas con fármaco							
		10 ⁻⁵	152 ± 6	0.06	168 ± 5	0.02	208.3±3.4	0.06	
		5·10 ⁻⁵	142 ± 12	0.06	155 ± 2	0.03	154.7±1.8	0.06	
		10 ⁻⁴	157 ± 1	0.05	160 ± 4	0.1	161.6±2.4	0.04	
		5·10 ⁻⁴	162 ± 1	0.04	159 ± 6	0.09	166.5±3.1	0.04	
		10 ⁻³	148 ± 1	0.05	150 ± 1	0.07	150.2±2.1	0.06	
		5·10 ⁻³	163 ± 1	0.07	168 ± 4	0.04	169.2±3.0	0.08	
		10 ⁻²	152 ± 1	0.06	160 ± 2	0.01	156.6±4.1	0.07	

Tabla 4.1.: Diámetro (d, nm) ± desviación estándar e índice de polidispersión (IP) de las nanopartículas obtenidas por el método de emulsificación/evaporación del solvente mediante emulsión simple (nanopartículas A).

	Velocidad de agitación r.p.m.	Tiempo					
		0 días		2 meses		6 meses	
		d (nm)	IP	d (nm)	IP	d (nm)	IP
	2000	277 ± 9	0.32	-	-	-	-
	8000	287 ± 5	0.30	-	-	-	-
	16000	271 ± 4	0.27	-	-	-	-
	Sonicador	108 ± 3	0,21	123±5	0.31	130±2	0.06
B-in Sonicador cargadas con fármaco							
Concentraciones de 5-FU (M)	10^{-5}	121 ± 7	0.21	135 ± 1	0.21	157±1	0.07
	$5 \cdot 10^{-5}$	119 ± 1	0.08	123 ± 9	0.15	165±3	0.11
	10^{-4}	116 ± 5	0.24	148 ± 2	0.28	156±16	0.51
	$5 \cdot 10^{-4}$	125 ± 2	0.21	152 ± 2	0.21	193±6	0.01
	10^{-3}	113 ± 10	0.21	115 ± 8	0.30	126±5	0.02
	$5 \cdot 10^{-3}$	128 ± 10	0.25	153 ± 12	0.21	183±14	0.28
	10^{-2}	131 ± 3	0.24	150 ± 16	0.10	163±1	0.11
B-ex Sonicador cargadas con fármaco							
Concentraciones de 5-FU (M)	10^{-5}	125 ± 1	0.19	135±1	0.21	149 ± 1	0.02
	$5 \cdot 10^{-5}$	119 ± 14	0.39	133±9	0.15	154 ± 2	0.09
	10^{-4}	116 ± 1	0.24	135±2	0.28	186 ± 6	0.41
	$5 \cdot 10^{-4}$	125 ± 2	0.21	142±3	0.21	173 ± 5	0.21
	10^{-3}	131 ± 10	0.21	155±10	0.30	186 ± 4	0.22
	$5 \cdot 10^{-3}$	141 ± 1	0.25	163±4	0.21	191 ± 4	0.21
	10^{-2}	138 ± 1	0.20	159±4	0.01	173 ± 1	0.15

Tabla 4.2.: Diámetro (d, nm) ± desviación estándar e índice de polidispersión (IP) de las nanopartículas obtenidas por el método de emulsificación/evaporación del solvente mediante doble emulsión (nanopartículas B).

Velocidad de agitación r.p.m.		Tiempo					
		0 días		2 meses		6 meses	
		d (nm)	IP	d (nm)	IP	d (nm)	IP
900		74 ± 3	0.18	95 ± 3	0.2	113 ± 1	0,13
cargadas con fármaco, a 900 rpm							
Concentraciones de 5-FU (M)	10 ⁻⁵	131 ± 1	0.18	128 ± 2	0.08	133 ± 1	0.09
	5·10 ⁻⁵	115 ± 3	0.21	110 ± 1	0.11	114 ± 2	0.09
	10 ⁻⁴	125 ± 1	0.32	119 ± 1	0.09	122 ± 1	0.08
	5·10 ⁻⁴	130 ± 2	0.13	137 ± 3	0.16	134 ± 1	0.12
	10 ⁻³	100 ± 1	0.13	108 ± 2	0.21	106 ± 2	0.18
	5·10 ⁻³	100 ± 1	0.13	115 ± 2	0.24	119 ± 1	0.14
	10 ⁻²	84 ± 2	0.10	121 ± 1	0.11	122 ± 1	0.11

Tabla 4.3.: Diámetro (d, nm) ± desviación estándar e índice de polidispersión (IP) de las nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento del solvente o nanoprecipitación (nanopartículas C).

A primera vista es fácil identificar diferencias entre las diferentes metodologías investigadas. El tamaño e índice de polidispersión, se ven condicionados por el método de síntesis y factores, como la cantidad de polímero, el tipo de disolvente orgánico y tensioactivo utilizados durante el proceso de elaboración (tabla 3.1.).

Teniendo en cuenta la cantidad de polímero utilizada para la elaboración de cada una de las síntesis y el volumen de fase oleosa se pueden apreciar diferencias en la viscosidad de la fase polimérica. Estudios realizados por otros autores (Sharma y cols., 2015) indicaron que una elevada concentración de polímero originaría una mayor viscosidad de la fase dispersa; de esta manera se obtendría un mayor tamaño de partícula. De ahí que las nanopartículas A presenten mayor tamaño que las nanopartículas B y estas que C.

Por el contrario, se observa que la velocidad de agitación es un factor despreciable en el tamaño de partícula. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la agitación mecánica y la sonicación, con tamaños medios entre 180 nm y 110 nm en nanopartículas preparadas siguiendo las síntesis A-2 y B, respectivamente.

Tras la incorporación del 5 FU, se apreciaron cambios significativos en el tamaño de las partículas blanco, con lo que se produce un ligero descenso en las nanopartículas tipo A y un aumento en las nanopartículas B y C, probablemente debido a la mayor eficacia de encapsulación de estas últimas. Como se puede apreciar todas las nanopartículas aumentan de tamaño con el tiempo probablemente debido a la entrada de agua a la nanopartícula.

El estudio geométrico muestra resultados alentadores, con índices de polidispersión muy próximos a 0 en todas las síntesis estudiadas, excepto para la síntesis A1. A la vista de estos resultados fue seleccionada la fórmula A-2 (en adelante se denominará fórmula o síntesis A) con un tamaño de partícula de 178 nm y un índice de polidispersión de 0.18; la fórmula B, con un tamaño de partícula de 108 nm y un índice de polidispersión de 0.21 y las nanopartículas obtenidas por el método C, con un tamaño de partícula de 74 nm e índice de polidispersión de 0.18.

Estos valores están en completa concordancia con la fisiología de cualquier tumor y por tanto con los factores condicionantes para su administración parenteral. De hecho ya existen otros estudios que han reportado el potencial de nanoesferas de PLGA cargadas con 5-FU, sin embargo limitaciones asociadas con su tamaño limitan su eficacia en la terapia del cáncer.

Diferentes estudios demuestran como sistemas coloidales con un tamaño alrededor de 400 nm se acumulan por filtración y son absorbidos por macrófagos esplénicos. Todo lo contrario ocurre con aquellos sistemas con un tamaño entre 60 y 200 nm. En este caso pueden evitar la rápida absorción por el RES y permanecer en la

circulación sanguínea durante un período relativamente largo de tiempo (Ishida et al., 1999). Por lo tanto, tienen más oportunidades de extravasar a través de los capilares discontinuos que rodean al tumor.

A la vista de la Bibliografía actual se puede concluir que tamaños pequeños no sólo atraviesan en mayor medida el endotelio fenestrado de los vasos sanguíneos que rodean las células tumorales (Dinarvand et al., 2011) sino que están asociados a un aclaramiento plasmático retardado, lo que representaría una ventaja en la administración de fármacos vehiculizados en nanotransportadores desde su entrada al torrente sanguíneo hasta su llegada a la biofase (Pretel y cols., 2017).

4.2. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

4.2.1. FUNDAMENTO DE FTIR

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona de la radiación visible y la zona de la radiación de microondas. Un gran número de moléculas orgánicas de interés farmacéutico absorben la radiación infrarroja en el intervalo de números de onda entre 4000 y 450 cm^{-1} en energía de vibración molecular. Esta absorción es cuantificable y el espectro aparece en forma de bandas, ya que un cambio simple de energía vibracional es acompañado por diversos cambios de energía rotacional. Las posiciones de las bandas en el espectro de infrarrojos se suelen presentar en función del número de onda (κ), mientras que las intensidades de las bandas pueden expresarse como transmitancia (T) o como absorbancia (A).

Hay dos tipos de vibraciones moleculares (Silverstein y Webster, 1998) la vibración de elongación y la vibración de flexión. Sólo aquellas vibraciones que provocan un cambio rítmico en el momento bipolar de la molécula se observan en el infrarrojo. Esto es debido a que la alternancia del campo eléctrico, producido por el cambio en distribución de cargas que acompaña a una vibración, acopla la vibración de la molécula con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética. En general, los grupos funcionales que tienen un dipolo intenso generan absorciones

fuertes en el infrarrojo. El conjunto de vibraciones fundamentales (frecuencias de absorción) raramente se observa debido a la existencia de factores que aumentan el número de bandas (la presencia de armónicos y los tonos de combinación) y de factores que reducen el número de bandas (frecuencias fundamentales fuera de la región de 400 a 4000 cm^{-1} , bandas fundamentales demasiado débiles para ser observadas, ausencia de un cambio en el momento dipolar, etc.).

Se pretenden analizar mediante esta técnica los tres tipos de nanopartículas sintetizadas con diferentes formulaciones, para así obtener una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis. Más concretamente, las nanopartículas deben presentar un espectro de infrarrojos en el que aparezcan las bandas características de poli(D,L-lactida-co-glicolida). De ser esto así, quedará demostrado que las nanopartículas formadas están constituidos efectivamente por la misma estructura del PLGA. Este estudio no pretende una caracterización exhaustiva de la estructura molecular de los materiales estudiados, ya que para ello sería necesario utilizar esta técnica analítica junto con la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear.

4.2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para la preparación de las muestras a analizar, se sometieron a desecación las dispersiones acuosas de las nanopartículas a 25.0 ± 0.5 °C en un horno de desecación por convección (Digitronic, J.P. Selecta S.A., España). A continuación, se tomó una pequeña cantidad de material sólido (0.5 - 1.0 mg), se colocó en un mortero de ágata y fue prensada a 10000 - 15000 kPa para obtener un disco transparente. A pesar de que en este tratamiento de las muestras sea de esperar la aparición de bandas en el espectro de infrarrojos en torno a 3450 cm^{-1} y a 1640 cm^{-1} debido a la humedad ambiental captada, el avanzado y patentado algoritmo de compensación atmosférica elimina las interferencias espectrales debidas al vapor de agua y al CO_2 aumentando la reproducibilidad de los datos espectrales y reduciendo al mínimo las exigencias de purga (Giri y cols., 2005; Silverstein y Webster, 1998). Para la obtención del

interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos (PerKin Elmer Spectrum Versión 10.03.09), con una resolución de 2 cm^{-1} . La técnica implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso: $4000\text{ a }450\text{ cm}^{-1}$) en dos rayos (Silverstein y Webster, 1998). Uno tiene un camino óptico fijo y el otro variable (mediante un espejo móvil). La superposición de los rayos genera un patrón de interferencias que por transformada de Fourier se convierte en un punto en el dominio de la frecuencia. La transformada de Fourier a sucesivos puntos a lo largo de esta variación da lugar a un espectro de infrarrojos completo cuando la radiación pasa a través de la muestra, lo que hace que el material analizado quede expuesto a una banda amplia de energías. En cuanto a la interpretación de un espectro de infrarrojos, no hay reglas establecidas para ello. Sin embargo, sí existen ciertos requisitos previos (Silverstein y Webster, 1998):

1. el espectro debe tener una resolución y una intensidad adecuadas, debe ser el de un compuesto razonablemente puro
2. el espectrofotómetro debe estar calibrado
3. el método de manipulación de la muestra debe estar perfectamente definido.

La frecuencia o la longitud de onda de absorción dependen de las masas relativas de los átomos de la molécula, de las constantes de fuerza de los enlaces entre éstos, de la geometría de los átomos y del entorno molecular. Una molécula por simple que sea puede generar un espectro extremadamente complejo, que es característico de la molécula entera (excepto en el caso de los compuestos enantiómeros). Entraña una gran dificultad la realización y caracterización fisicoquímica de un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja. Por este motivo, el espectro de infrarrojos debe interpretarse a partir de la comparación empírica y la extrapolación a estudios de moléculas sencillas, ya que determinados grupos de átomos generan bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. La persistencia de estas bandas características permite la obtención de información estructural, mediante simple inspección y comparación con tablas de referencias que recogen la absorción característica de grupos funcionales. No

obstante, toda conclusión alcanzada tras examinar una banda debe confirmarse cuando sea posible mediante el examen de otras zonas del espectro. De forma general, en un espectro de infrarrojo se distinguen tres zonas características (Silverstein y Webster, 1998):

– La región de los grupos funcionales de la molécula (de 4000 a 1300 cm^{-1}). Generalmente, si no hay absorción en esta zona puede considerarse que la molécula problema carece de grupos funcionales.

– La zona de la huella dactilar (de 1300 a 900 cm^{-1}). La absorción en esta región es única y característica para cada especie molecular.

– La región entre 900 y 650 cm^{-1} . La ausencia de absorción en esta zona generalmente indica una estructura no aromática.

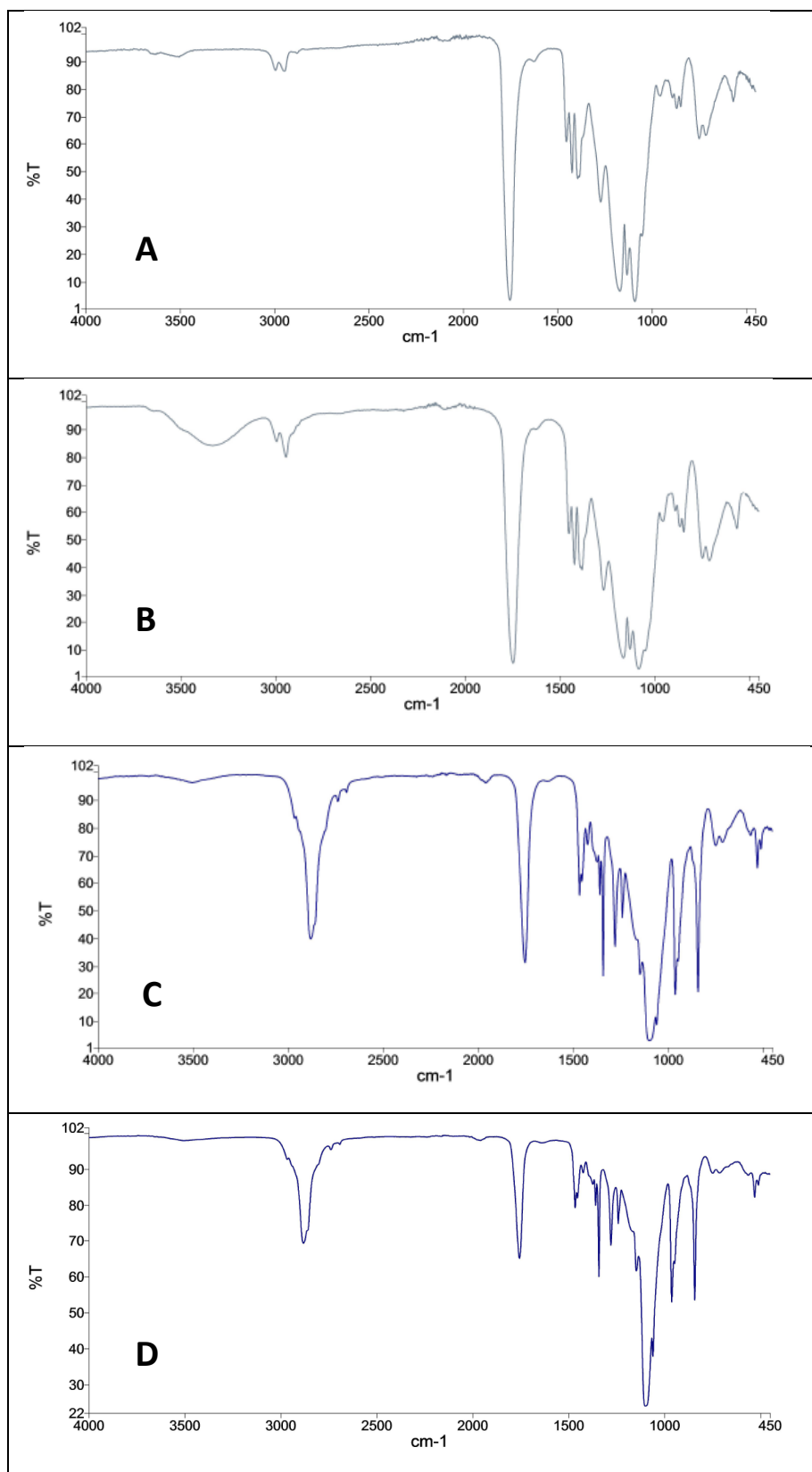


Figura 4.4.: Espectros FTIR de (A) PLGA comercial; (B) Nps A, (C) Nps B; (D) Nps C.

Como se aprecia en la figura 4.4., la estructura de PLGA se mantiene tras someter al polímero a cada uno de los procedimientos de la formulación de Nps (figura 4.4 A, B, C y D). Gracias a que esta estructura se mantiene tras la aplicación de éstas metodologías de fabricación, puede predecirse que queda asegurada la capacidad que el PLGA 50:50 tiene para desarrollar una liberación sostenida en el tiempo del fármaco vehiculizado.

4.3.- PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES

A través de éste estudio se pretende caracterizar la carga eléctrica superficial de las nanoplateformas y su dependencia de la composición del medio de dispersión (pH y fuerza iónica). De esta manera se estaría en condiciones de prevenir fenómenos de agregación y sedimentación en el coloide formulado. Además, la electroforesis debería ser una técnica experimental para definir, al menos cualitativamente, el tipo de vehículo de las moléculas de 5-FU en las nanoplateformas de PLGA. Es decir, si el fármaco se incorpora en superficie (adhesión superficial) o en matriz (absorción), bajo las condiciones de preparación desarrolladas

4.3.1.- INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS

Si consideramos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro, su superficie S y su volumen V son $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ y $5.24 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$, respectivamente, y la relación superficie/volumen es $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$. La división de la partícula en N partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original, sin embargo, provocará que la superficie sea de 15.7 m^2 y la relación $S/V \approx 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$. Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas N partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfases de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante: si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática repulsiva entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es

$F^{EL} \approx 2.12 \cdot 10^{-12}$ N. Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será $F^G \approx 6.3 \cdot 10^{-15}$ N, si su densidad es 10^3Kg/m^3 ; y la atracción de van der Waals $F^{LW} \approx 8 \cdot 10^{-13}$ N, utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker (van Oss, 2006). Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

4.3.2.-PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LA INTERFASE

Los fenómenos electrocinéticos y las técnicas asociadas a ellos demuestran su importancia pues son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y de aquí que merezcan atención por sí mismas. Además, son una fuente de información importante (única, en muchos casos) de estas propiedades eléctricas, por poder ser determinadas experimentalmente.

4.3.2.1.- DESCRIPCIÓN DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

La mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Las causas de estas cargas son diversas y se evidencian por diferentes procesos: adsorción/desorción de iones de la red, disociación o ionización de grupos superficiales o sustitución isomórfica.

Cualquiera que sea el electrolito, la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula, de modo que se mantenga la electronegatividad del sistema. La carga superficial y la contracarga compensatoria forman una doble capa eléctrica (DCE). Aunque se llame doble capa, puede llegar a ser muy compleja a lo largo de la distancia de la superficie del sólido.

Numerosos estudios han intentado explicar lo que ocurre en la interfase (figura 4.5.). La distribución de las cargas en la disolución cerca de la partícula fue estudiada por Helmholtz desde 1879, posteriormente Chapman en 1904 y Stern en 1924.

El modelo de Helmholtz es el más simple, en su teoría considera que la doble capa es como un condensador de placas paralelas donde ψ_0 es el máximo potencial eléctrico existente y que varía linealmente con la distancia a la superficie de la partícula; el exceso de iones en el lado de la solución de la doble capa se encuentra ubicado en el plano de Helmholtz, muy cercano a la superficie del electrodo. En el plano externo de Helmholtz se encuentran los iones solvatados y en el plano interno de Helmholtz se encuentran iones que hayan perdido su capa de solvatación y por tanto pueden aproximarse a la superficie del electrodo. Este modelo de Helmholtz sólo tiene validez cuando la carga total superficial es pequeña en magnitud absoluta o cuando la concentración del electrolito inerte es grande.

El modelo de Chapman o también conocido como de Gouy-Chapman habla de una capa de cargas en una superficie sólida y una capa difusa de iones con distribución estadística en la solución.

El modelo de Stern habla de una capa de cargas en una superficie sólida y una capa de cargas constituida por dos subcapas, una subcapa de cargas absorbida en forma rígida y una subcapa difusa de iones en solución (Jorge NL, 2015).

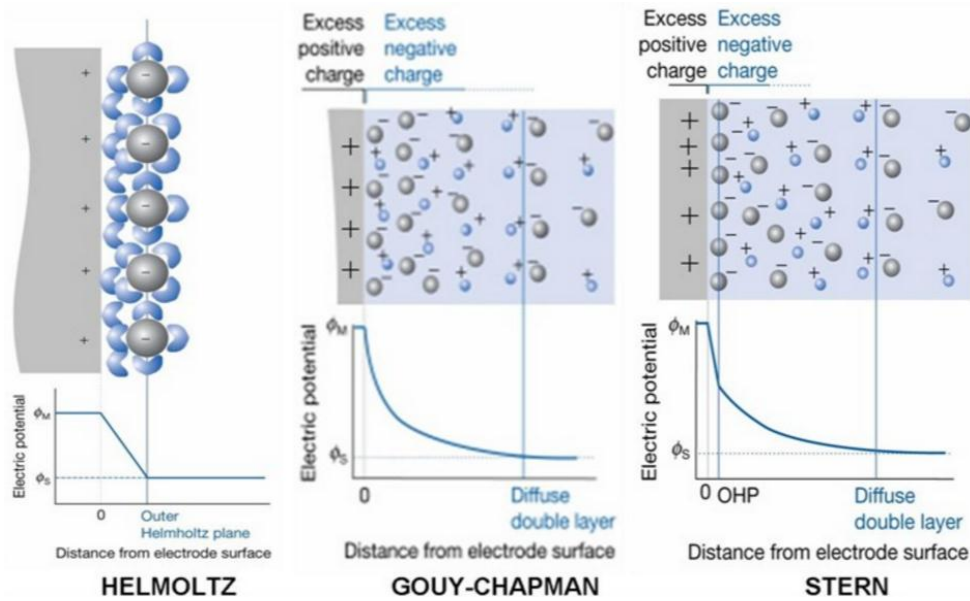


Figura 4.5: Doble capa de iones según diferentes autores (Jorge NL, 2015)

La carga neta de la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones y a la región circundante interfacial, resultando un aumento de concentración de iones, de carga opuesta a la de la partícula. En la capa líquida que rodea la partícula se pueden distinguir 2 partes, una región anterior, la capa *Stern*, la cual tiene iones fuertemente ligados y la exterior, región difusa en la que están unidos más débilmente (figura 4.6.). Así la doble capa eléctrica está alrededor de cada partícula. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico con iones en las partículas de forma estable (Delgado y cols., 2007).

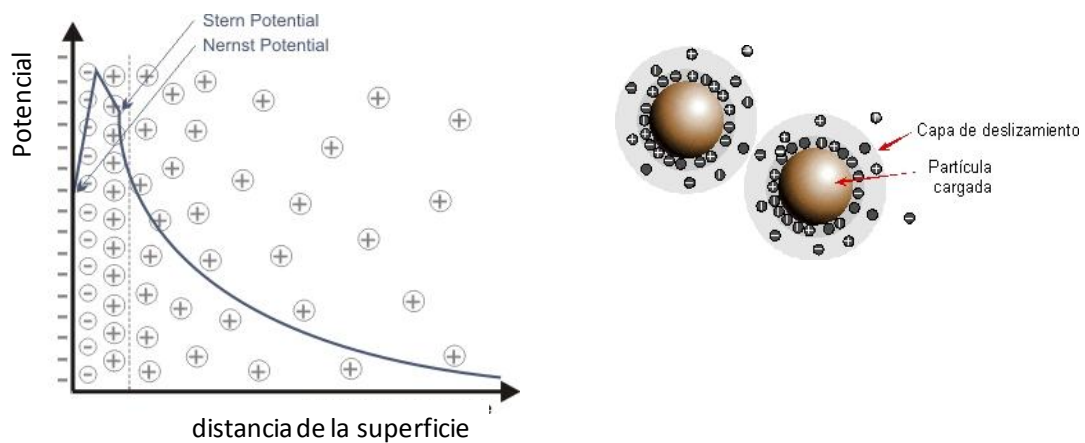


Figura 4.6.: Representación de la carga eléctrica superficial de un sólido cuando se dispersan en un disolvente polar

Cerca de la superficie del sólido o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial (densidad superficial, σ_0). En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será el orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos σ_1 a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia β_i desde el sólido (figura 4.7.). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana y que χ , es la distancia externa normal a ésta, podríamos decir que la región entre $\chi = 0$ y $\chi = \beta_i$ está libre de carga y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano β_i . Si C_i es su capacidad específica (por unidad de área):

$$\psi_0 - \psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (4.1)$$

Donde ψ_0 es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables del ψ_i no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie, sino que, a menudo, superarán la repulsión eléctrica y son capaces, por ejemplo, de aumentar la carga positiva de una superficie de carácter ya positivo. Es habitual decir que las interacciones desconocidas son de naturaleza química, a pesar de no ser este siempre el caso. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van del Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc (Lyklema, 1987). Debido a la ausencia habitual de información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento no está exento de hipótesis menos reales.

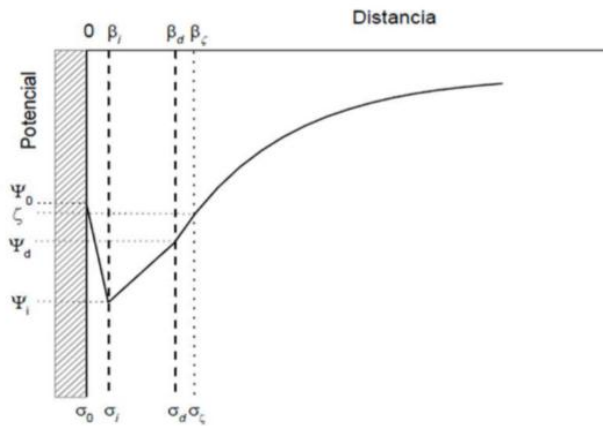


Figura 4.7.: Distribución del potencial en una interfase sólido líquido cargada negativamente.

A partir del plano $x = \beta_d$ se localizan los iones que sólo poseen interacciones electrostáticas con la superficie y además están sujetos a colisiones con las moléculas del disolvente. Estos iones están distribuidos en un cierto volumen cuya densidad de carga es $\rho(x)$, aunque en la práctica se introduce una densidad superficial de carga difusa (σ_d), localizada en $x = \beta_d$ de acuerdo con la expresión:

Para una interfase plana:

$$\sigma_d = \int_{\beta_d}^{\infty} \rho(x) dx \quad (4.2)$$

Para una fase esférica:

$$\sigma_d = \frac{1}{(a + \beta_d)} \int_{\beta_d}^{\infty} r^2 \rho(r) dr \quad (4.3)$$

Para una fase esférica donde en radio es a , siendo r la coordenada radial con origen en el centro de la partícula.

Debido a la electroneutralidad se cumplirá:

$$\sigma_0 = \sigma_i - \sigma_d \quad (4.4)$$

Con respecto a la descripción de la doble capa eléctrica, de forma general se acepta la siguiente nomenclatura:

- La distribución volumétrica de la carga que se extiende desde $x = \beta_d$ se denomina capa difusa de la doble capa
- La región entre $x = 0$ y $x = \beta_d$ se denomina capa de *Stern*, parte interna de la doble capa o parte densa de la doble capa.
- El plano $x = \beta_i$ es el plano interior de *Helmholtz* (PIH) y a $x = \beta_d$ se le llama plano exterior de *Helmholtz* (PEH). El PEH identifica el comienzo de la capa difusa.

Hay diversos modelos matemáticos para explicar fenómenos de este tipo. A distancias mayores en la capa difusa, las interacciones específicas son despreciables, por lo que la estructura de esta capa se obtiene considerando la fuerza ejercida por el campo medio y las fuerzas difusivas que tienden a restituir a una concentración uniforme.

El modelo más sencillo es el llamado *Gouy-Chapman* donde se considera a la disolución ideal. En condiciones de equilibrio, la concentración iónica sigue la distribución de Boltzman (Delgado y cols., 2002). Nos permiten conocer el perfil del potencial eléctrico y por tanto, la concentración iónica. Facilita el estudio de sistemas biológicos complejos.

Existen modelos más realistas para estudiar la doble capa eléctrica en equilibrio, donde se considera que los iones de la capa difusa están hidratados y por tanto ocupan cierto volumen, la repulsión estérica puede ser tenida en cuenta añadiendo al modelo anterior un potencial químico en exceso. Las correcciones al modelo de Poisson-Boltzman son importantes en el caso de concentraciones iónicas para las que la distancia media entre iones es de orden del tamaño iónico (Adamczyk y cols., 1996, Borukhov, 2004, López-García y cols., 2014)

Por tanto, un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern, o también llamada fija. Este potencial, conocido como potencial zeta (ζ), es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial ζ puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

Cuando se mueve, por ejemplo por acción de la gravedad, los iones de dentro de los límites se mueven, pero no más allá del límite pues éstos viajan con la partícula. Éste límite se llama superficie hidrodinámica de deslizamiento plano "*slipping plane*". El potencial que existe en este límite es el potencial ζ .

4.3.3.- POTENCIAL Z

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución y que la superficie sólida está fija en el sistema de coordenadas. De lo expuesto anteriormente que el líquido adyacente al sólido se sabe que tiene una carga eléctrica neta, opuesta a la de la superficie de éste. De forma general, parte de los iones de este líquido están unidos fuertemente a la superficie por medio de fuerzas atractivas de corto alcance y pueden considerarse inmóviles. Sin embargo esto es sólo una aproximación ya que tales iones pueden ser móviles y en ese caso no es raro que su movilidad tenga un valor próximo a la del núcleo de la disolución. En las condiciones generales, los iones y el líquido externo pueden ser desplazados por el campo externo. De hecho, la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (principalmente contraiones) y arrastrará líquido en su movimiento. De ésta manera se producirá el fenómeno electrocinético.

El potencial existente en el límite entre la fase móvil e inmóvil es el potencial electrocinético o potencial zeta (ζ). La localización exacta (distancia β_ζ) del también llamado plano de cizalladura o deslizamiento es un aspecto altamente estudiado. De hecho, se dice que es una abstracción la existencia del plano de cizalladura y el potencial zeta (Lyklema, 1977), ya que se basan en la aceptación de que la viscosidad

del medio líquido varía continuamente desde el finito en la capa de *Stern* a un valor infinito en la atmósfera difusa. Una posible forma de salvar dicha incertidumbre, al menos formalmente, es suponer una variación gradual de la viscosidad η desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa (Dukhin, 1974, López-García y cols., 1996, Lyklema 1977), aunque la verificación experimental cuantitativa de tal variación no es accesible. Como los tratamientos del fenómeno electrocinético se basan en la existencia del potencial zeta, admitiremos el modelo de la variación de la viscosidad como razonable y aceptable. Esto significa que las técnicas electrocinéticas nos darán información sobre el potencial zeta, allá donde quiera que esté localizado. Tratar de obtener más información es dificultoso y muy dependiente del modelo de la doble capa elegido (Dukhin, 1974).

El potencial ζ es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión. Cuando partículas con carga se aproximan entre ellas, el equilibrio entre las fuerzas de atracción experimentadas en todos los cuerpos y de las fuerzas de repulsión determinadas por la magnitud del potencial en la capa de deslizamiento es lo que determina el comportamiento de que se repelan o se atraigan. Las partículas interactúan de acuerdo al potencial de esa capa.

La adsorción de surfactantes iónicos permite producir un efecto antiestático. Si el balance de cargas adsorbidas no alcanza la neutralidad, las superficies tienden a repelerse, lo cual constituye un mecanismo de estabilización de sistemas dispersos. El impedimento estérico producido por moléculas de surfactante adsorbidas puede ser también responsable de la estabilización de muchos sistemas dispersos. La adsorción de surfactantes en las interfases puede modificar los equilibrios trifásicos sólido-fluido-fluido y conducir a la extensión en forma de una monocapa o al cambio de mojabilidad de una superficie.

4.3.3.1.- POTENCIAL ζ Y PH

El potencial ζ es determinado por la naturaleza de la superficie de la partícula y del medio de dispersión. El pH es un parámetro importante al alterar la concentración

de cargas en el medio. En la gráfica se muestra el efecto del pH (figura 4.8.). La curva pasa a través del potencial ζ en cero, en el eje de X y en ese punto se le llama el punto isoeléctrico, significa que las partículas no experimentan repulsión por lo que puede estimarse que produzca una aglomeración.

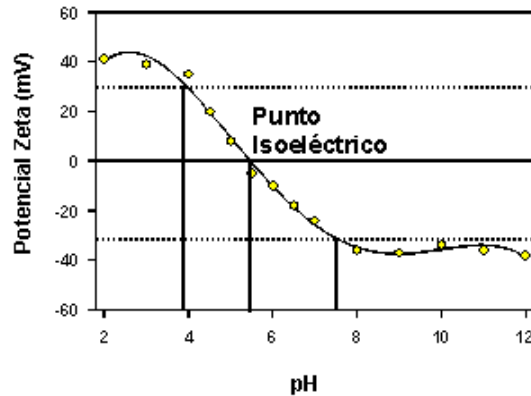


Figura 4.8: Gráfica del potencial ζ en función del pH.

De hecho, puede existir cierta atracción cerca de esos valores, como regla general, si se quiere asegurar que existirá repulsión entre las partículas debemos asegurarnos que el valor del potencial ζ es mayor a +30mV e inferior a -30mV.

La figura 4.9 muestra la región de inestabilidad en cuanto al pH, en este caso, entre pH 4 y pH 7.5. Fuera de este intervalo de pH, se estima que la dispersión es estable.

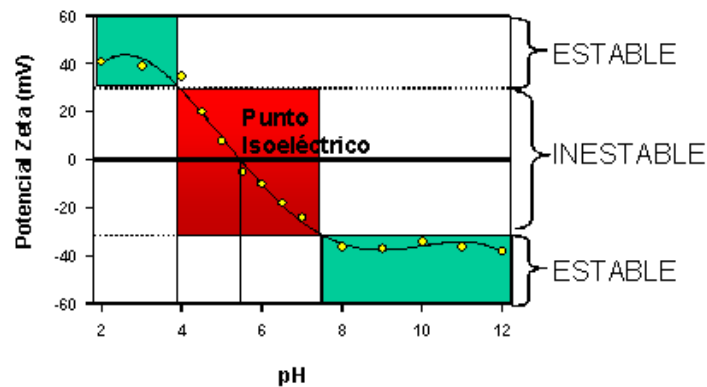


Figura 4.9: La zona roja presenta la inestabilidad del sistema, la zona verde regiones de estabilidad del sistema

4.3.3.2.- POTENCIAL ζ Y FUERZA DE LA GRAVEDAD

Las partículas que forman el coloide se pueden unir formando agregados y, al alcanzar cierto tamaño pueden llegar a sedimentar por acción de la gravedad (floculación) el efecto final podría ser una separación completa de las fases, haciendo al coloide inestable. Es necesario evaluar el efecto de la gravedad pues en la mayoría de las formulaciones la fase dispersa tiene densidad diferente al medio, por lo que tiende a sedimentar. Para esto, estudiar las dos fuerzas competitivas, la de repulsión y la de atracción.

Según la figura 4.10 se muestra la energía de interacción ($-KT$) que indica repulsión y ($+KT$) atracción, R es la distancia entre las partículas. En la zona izquierda de la misma, las partículas se están tocando. La *curva verde* es la fuerza de repulsión entre dos partículas y representa partículas con un potencial ζ alto. A grandes separaciones existe una pequeña interacción. A medida que las partículas se aproximan, la energía de repulsión aumenta. Si las partículas pueden ser aproximadas entre ellas, lo más cerca posible para vencer la barrera de la energía, las fuerzas de atracción dominarían y causarían que las partículas se junten. Una vez en este punto de mínima energía, se requeriría mucha energía para separar a las partículas.

La *curva roja* representa únicamente las fuerzas de atracción y representaría en el caso en donde no existe ningún mecanismo de estabilización. No importando el lugar de las partículas en la dispersión, se irán agregando y caerán en la mínima energía. La velocidad a la que esto pasa dependerá de la concentración de la muestra y de la velocidad de difusión de la partícula, será acelerada con la agitación.

La *curva verde* es la suma de las fuerzas de atracción y repulsión; se observa que las fuerzas de repulsión actúan a una distancia más grande que la de las fuerzas de atracción. Esto es importante ya que si reducimos la fuerza de repulsión, reducimos el potencial eléctrico y obtenemos un resultado no deseado.

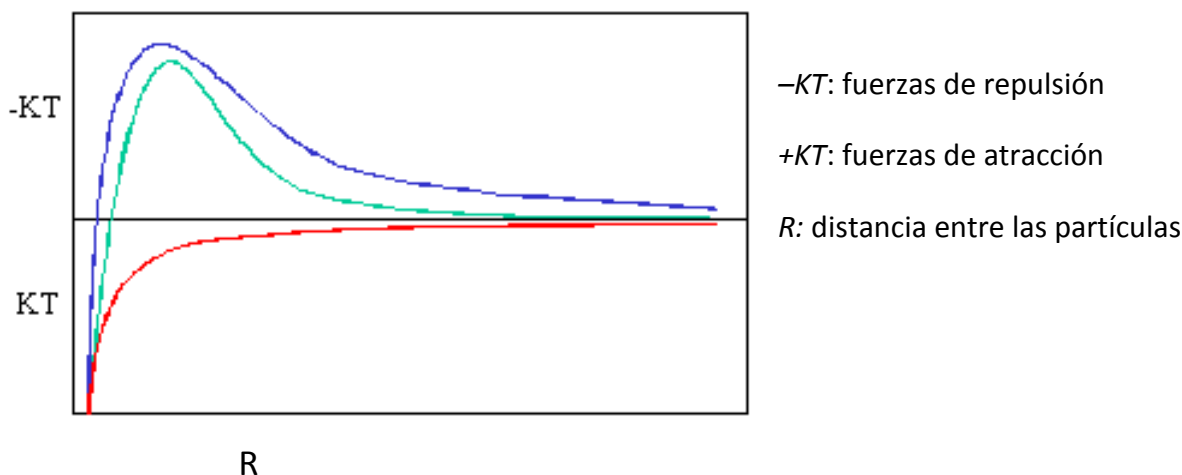


Figura 4.10.: Gráfica de la energía de interacción partícula-partícula.

El potencial ζ es un índice de la estabilidad del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen alto nivel de cargas positivas o negativas, el valor de ζ es alto y no tienden a flocular, sin embargo si los valores son bajos, no hay la suficiente fuerza para repelerse y tienden a unirse. Así se puede decir que la magnitud de ζ da una indicación de la estabilidad potencial del sistema coloidal.

4.3.3.3.- POTENCIAL ζ Y FUERZA IÓNICA:

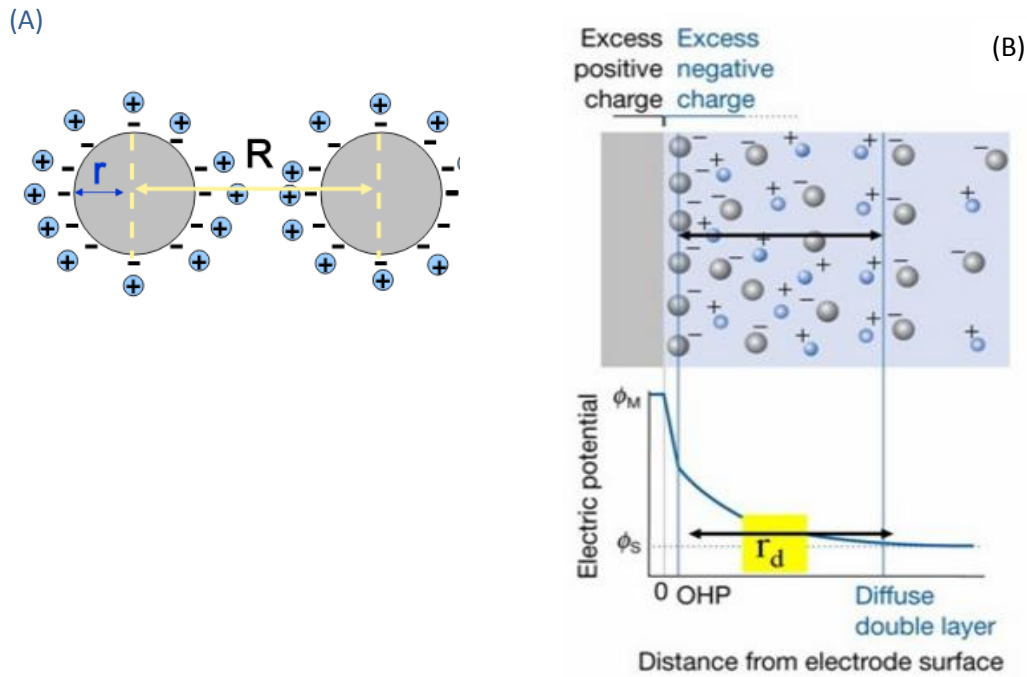
El concepto de fuerza iónica fue introducido por Lewis y Randall, también conocido como intensidad iónica (I). Es una medida de la intensidad de campo eléctrico debido a los iones existentes en la disolución, definido como la mitad de la suma de los términos que se obtienen de multiplicar la concentración de cada especie iónica presente en la disolución por el cuadrado de su valencia.

Observaron que disoluciones diluidas suelen tener la misma fuerza iónica. Por ejemplo en una disolución 0.01 M de NaCl, la fuerza iónica es igual a la concentración ($I=c$).

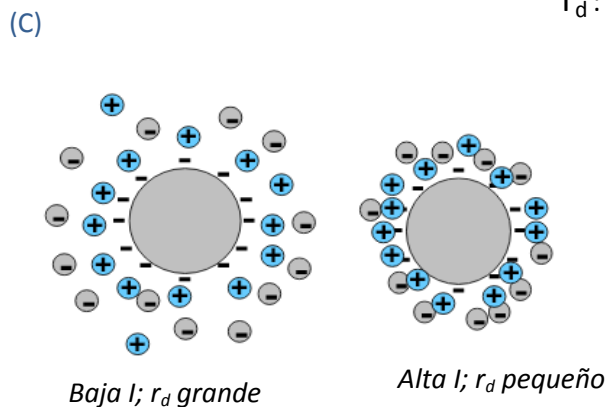
Debye Huckel ratificó lo anterior añadiendo que la fuerza iónica es una excelente medida de la no idealidad provocada por los iones de una disolución, sobre los iones producidos por un electrolito en disolución (Carrión FJ, 1997). La fuerza

iónica se considera una propiedad de cada disolución y no una propiedad de los iones en disolución.

Si las partículas están cargadas, surgen fuerzas electrostáticas repulsivas como se evidencia en la figura 4.11 (A):



r_d : espesor de la doble capa de iones



Electrolito (M)	Espesor (nm)
0.00001	100
0.001	10
0.1	1

Figura 4.11.: (A) medida de las distancias y radio entre dos partículas cargadas, (B) potencial ζ en función de la distancia de la carga superficial, (C) espesor de la doble capa en función de la fuerza iónica, a diferentes concentraciones, según Gouy-Chapman (adaptado por Jorge NL, 2015).

El r_d es el espesor de la doble capa de iones, se calcula a través de la teoría de Debye-Huckel, depende de forma inversa a la fuerza iónica.

Como vemos en la figura 4.11(C) el espesor de la doble capa se contrae a medida que aumenta la fuerza iónica.

4.3.4.- ELECTROFORESIS:

El potencial ζ también expresa la movilidad electroforética de los coloides. Una carga eléctrica inmersa en un campo eléctrico experimenta fuerzas de atracción y de repulsión, según describe la ley de Coulomb. La carga se desplaza en el medio hacia el polo que posee la carga opuesta como consecuencia de la atracción eléctrica. Si el campo eléctrico es homogéneo, el módulo de la fuerza depende sólo de la intensidad del campo y del valor de la carga. Cuando la partícula está inmersa en un fluido aparece una fuerza de rozamiento ya que el fluido en el que se mueve la partícula se opone a su movimiento. La fuerza de rozamiento o de fricción es proporcional a la velocidad de la partícula, de igual dirección pero de sentido contrario. Aquí se debe introducir una constante que incluya las variaciones que produzca la viscosidad del medio, el tamaño y a forma de la partícula. Apenas la partícula empieza a moverse, la fuerza neta será la resultante entre la fuerza eléctrica y la de rozamiento, siendo evidentemente la diferencia de éstas. Debido a que va aumentando la fuerza de rozamiento por un aumento de la viscosidad, llega un momento en que la partícula adquiere velocidad constante.

La movilidad de una partícula cargada que se mueve por un campo eléctrico se define como el cociente entre la velocidad de la misma y el campo eléctrico aplicado, es decir, la velocidad que adquiere por unidad de campo eléctrico.

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (4.5)$$

En situación de equilibrio:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{K} \quad (4.6)$$

Es decir, que la movilidad electroforética depende de la carga de la partícula y del coeficiente de fricción. Éste dependía de la forma y tamaño de la partícula y de la viscosidad del medio. También se vio que la velocidad no depende del campo eléctrico aplicado. Podemos decir que la movilidad es una constante física para cada sustancia si se mantienen constantes el medio (pH, fuerza iónica y viscosidad) y la temperatura. Así que puede usarse como una propiedad de criterio de identificación.

La electroforesis es probablemente el método de más amplia aplicación del potencial ζ , consiste en el paso de una corriente eléctrica a través de la dispersión, puesta en una célula adecuada (célula BURTON), las partículas cargadas emigran al electrodo de la carga opuesta y, de acuerdo con la dirección y velocidad de la migración se puede determinar el signo y la magnitud del potencial. Al producir un campo eléctrico paralelo, a la interfase en esa región, se produce una fuerza sobre el fluido de la doble capa. Inversamente, si se fuerza un movimiento del fluido de la doble capa, la deslocalización de carga resultante induce el campo eléctrico del fenómeno llamado potencial de flujo. Los fenómenos electrocinéticos corresponden a una interfase estacionaria cerca de la cual puede moverse el fluido, por ejemplo en un medio poroso o un tubo capilar. Ya que con un movimiento interfase-fluido es relativo, existen dos otros casos que corresponden a un fluido estacionario y a una interfase susceptible de desplazarse. Como por ejemplo la de una partícula de tamaño coloidal o de una microgota de un fluido inmiscible. Al aplicar un campo eléctrico a una suspensión coloidal, se produce un movimiento de las partículas llamado ELECTROFORESIS. Al desplazarse partículas cargadas en un campo de fuerzas (gravedad natural o artificial), se genera un campo eléctrico correspondiente al POTENCIAL DE SEDIMENTACION. En los cuatro casos, la escala del movimiento relativo

del fluido y del sólido es considerablemente mayor que el espesor de la doble capa eléctrica.

4.3.5.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La electroforesis (al igual que los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase. En este trabajo hemos investigado el potencial ζ de los diferentes tipos de nanopartículas de PLGA obtenidas mediante emulsificación/evaporación del solvente y nanoprecipitación, como método de evaluación de la calidad y eficiencia de encapsulación del principio activo 5-FU.

La determinación de los ζ de las distintas suspensiones de nanopartículas de PLGA, 0.1% (p/v), se llevaron a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra), basado en el análisis de autocorrelación de la luz láser dispersada por las partículas en movimiento. Este dispositivo permite determinar ζ con errores $\leq 5\%$. La temperatura de medida ($25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$) se mantuvo constante (hasta $\pm 0.5^\circ\text{C}$). En las Tablas 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7. se incluyen los valores de las nanopartículas A, B y C de ζ en el medio de disolución natural.

<i>Síntesis A-2</i>	<i>Velocidad de agitación (r.p.m.)</i>	ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
nanopartículas sin carga	2.000	-31.6 ± 3.1	-
	8.000	-37.6 ± 2.5	-
	16.000	-30.1 ± 1.1	-
	Sonicador	-28.1 ± 0.7	-21.2 ± 0.41
Nanopartículas con carga			
Concentración 5-FU (M)		ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
10^{-5}		-12.6 ± 2.1	-5.2 ± 0.4
$5 \cdot 10^{-5}$		-9.9 ± 0.8	-3.2 ± 0.5
10^{-4}		-10.5 ± 0.5	-2.7 ± 0.2
$5 \cdot 10^{-4}$		-6.1 ± 0.6	-2.9 ± 0.2
10^{-3}		-11.4 ± 0.6	-3.3 ± 0.34
$5 \cdot 10^{-3}$		-8.5 ± 0.8	-3.9 ± 0.4
10^{-2}		-6.9 ± 0.5	-3.2 ± 0.4

Tabla 4.4.: Valores de ζ (mV) de nanopartículas de PLGA tipo A-2 obtenidas mediante emulsión simple en el medio de disolución natural (agua bidestilada); pH \approx 6 (t=0) y pH \approx 4 (t=6 meses).

	<i>Velocidad de agitación (r.p.m.)</i>	ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
Síntesis B-in Nanopartículas sin carga	2.000	-43.1 ± 0.1	-
	8.000	-46.1 ± 1.7	-
	16.000	-47.9 ± 1.8	-
	Sonicador	-37.8 ± 1.4	-39.8 ± 4.1
	Nanopartículas cargadas		
<i>Concentraciones 5-FU (M)</i>		ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
10^{-5}		-30.2 ± 1.2	-34.2 ± 5.1
$5 \cdot 10^{-5}$		-31.9 ± 2.6	-32.8 ± 4.7
10^{-4}		-31.1 ± 5.7	-33.8 ± 9.2
$5 \cdot 10^{-4}$		-32.1 ± 4.9	-33.1 ± 8.1
10^{-3}		-30.5 ± 4.1	-33.8 ± 5.1
$5 \cdot 10^{-3}$		31.9 ± 2.6	-35.1 ± 7.2
10^{-2}		30.2 ± 1.2	-33.4 ± 9.1

Tabla 4.5.: Valores de ζ (mV) de de nanopartículas PLGA tipo B-in obtenidas mediante doble emulsión en el medio de disolución natural (agua bidestilada), pH≈6 (t=0) y pH≈4 (t=6 meses).

B-ex nanopartículas sin carga	Velocidad de agitación (r.p.m.)	ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
	2000	-43.1 ± 0.1	-
	8000	-46.1 ± 1.7	-
	16000	-47.9 ± 1.8	-
	Sonicador	-37.8 ± 1.4	-39.8 ± 4
nanopartículas cargadas			
Concentraciones 5-FU (M)		ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
10^{-5}		-25.4 ± 2.5	-20.1 ± 0.6
$5 \cdot 10^{-5}$		-29.3 ± 0.9	-26.9 ± 1.7
10^{-4}		-32.8 ± 0.5	-23.1 ± 0.8
$5 \cdot 10^{-4}$		-25.9 ± 1.3	-11.4 ± 5.7
10^{-3}		-32.8 ± 0.5	-17.9 ± 1.2
$5 \cdot 10^{-3}$		-31.6 ± 4.2	-34.5 ± 1.4
10^{-2}		-25.9 ± 1.2	-28.7 ± 1.3

Tabla 4.6.: Valores de ζ (mV) de nanopartículas PLGA tipo B-ex obtenidas mediante doble emulsión en el medio de disolución natural (agua bidestilada), pH \approx 6 (t=0) y pH \approx 4 (t=6 meses).

C nanopartículas sin carga	Velocidad de agitación (r.p.m.)	ζ (mV) a los 0 días	ζ (mV) a los 6 meses
		900	-43.7 \pm 1.42
nanopartículas cargadas			
Concentraciones 5-FU (M)			
10^{-5}		-32.5 \pm 0.6	-13.4 \pm 0.5
5×10^{-5}		-32.8 \pm 3.6	-12.9 \pm 0.4
10^{-4}		-31.2 \pm 2.5	-13.8 \pm 0.3
5×10^{-4}		-32.2 \pm 1.6	-17.9 \pm 0.9
10^{-3}		-33.8 \pm 1.2	-16.1 \pm 0.9
5×10^{-3}		-32.8 \pm 3.6	-21.1 \pm 1.6
10^{-2}		-32.5 \pm 0.6	-18.7 \pm 0.5

Tabla 4.7.: Valores de ζ de nanopartículas de PLGA tipo C obtenidas por el método de desplazamiento del solvente, en el medio de disolución natural (agua bidestilada), pH \approx 6 (t=0) y pH \approx 4 (t=6 meses).

Como puede apreciarse, los valores absolutos de ζ de todas las nanopartículas de la formulación A son ligeramente inferiores a -30mV; en el caso de las nanopartículas B y C son claramente superiores. Esta carga eléctrica superficial debería impedir la agregación de las partículas B y C en suspensión, asegurándose así la estabilidad de la formulación en las condiciones experimentales estudiadas, como así lo demuestran otras investigaciones (Delgado y cols., 2007) en las que valores de potenciales ζ fuera del intervalo -30 a + 30mV aseguraran las repulsiones y por tanto estabilidad del sistema coloidal (Clares B y cols., 2014).

La extrema sensibilidad de la técnica de electroforesis debe permitir la identificación de cambios en las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas, consecuencia de la adsorción de moléculas de fármaco durante su

incorporación (Clares y cols., 2013; Reddy y cols., 2013). La metodología experimental seguida es igual a la descrita anteriormente, aunque en este caso las nanopartículas contenían una determinada concentración molar de fármaco (10^{-5} a 10^{-2} M). Las medidas se realizaron tras 24 horas de conservación de las dispersiones a $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, protegidas de la luz ambiental (con papel de aluminio). Los datos presentados son el promedio de 9 determinaciones, cambiando la muestra cada tres. Las tablas 5.1. a 5.4. muestran la evolución de los valores de ζ en función de la concentración molar de 5-FU encapsulado para los distintos tipos de nanopartículas.

En general, la adsorción electrostática puede verse favorecida por la interacción entre las cargas negativas de la superficie de las nanopartículas, debidas a los grupos carboxílicos del PLGA, y las cargas positivas del fármaco generadas, fruto de la protonación de sus grupos $-\text{NH}$; esto indica una mayor compactación de la doble capa fija alrededor de las nanopartículas. Se observa una tendencia general del ζ a reducirse, o hacerse más positivo, tras la incorporación de fármaco. Precisamente el pKa del 5-FU es 8 y por tanto, es de esperar que en disoluciones con un pH ácido se encuentre ionizado y positivamente cargado; esto nos ayuda a interpretar que parte del 5-FU se encuentra adsorbido en la superficie de la matriz polimérica.

Esta reducción es considerable para las nanopartículas A (estos resultados coinciden con la menor encapsulación de 5-FU respecto a los otros tipos de nanopartículas) y algo menor para las nanopartículas B y C. Para estas últimas (nanopartículas B y C) la mayoría de las concentraciones molares ensayadas se aproximan al rango de estabilidad, en el caso de nanopartículas A no es así, pudiendo llegar a flocular con facilidad como así lo confirman microfotografías SEM transcurridos tres meses desde su elaboración (figura 4.12.).

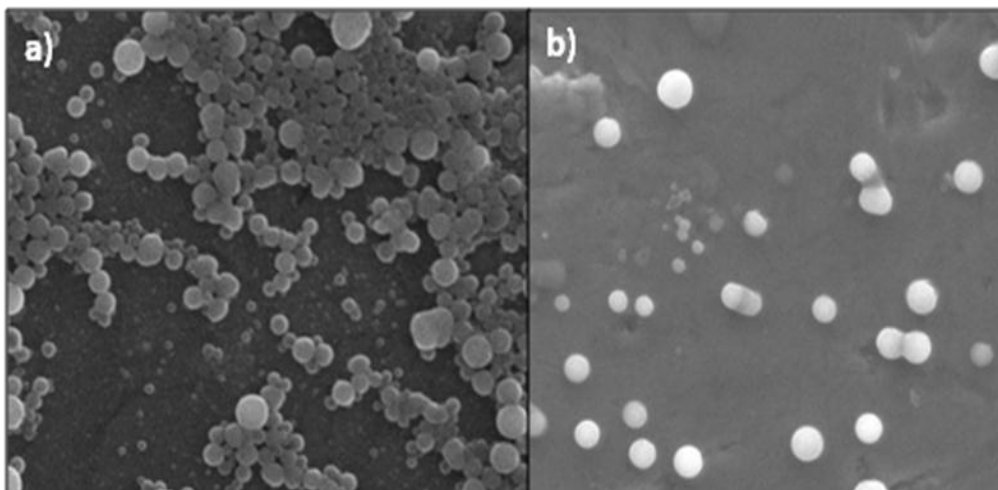


Figura 4.12.: Microfotografías ESEM de PLGA; (a) nanopartículas A (5-FU: 10^{-3} M) (b) nanopartículas B-in (5-FU: 10^{-3} M).

Además, dada la sensibilidad de la electroforesis a las características de la interfase, esta técnica puede ser útil para analizar el proceso de degradación de la estructura polimérica. De esta forma, se analizará la evolución temporal de la movilidad electroforética de las nanopartículas.

Para el estudio de estabilidad las nanopartículas se conservaron a 4°C y protegidas de la luz dispersadas en agua bidestilada. Cuando se estudia la influencia del tiempo sobre las nanopartículas cargadas de fármaco es notable el descenso del ζ hasta, en algunos casos, la mitad del valor original. Paralelamente se observó un descenso en el pH, desde un valor de 6 hasta 4, lo que refleja la degradación del polímero a lo largo del tiempo. De modo que esta disminución en el ζ corrobora tanto la erosión del polímero como la exposición del fármaco.

Transcurridos 6 meses desde la elaboración, las nanopartículas que más cambios experimentaron fueron las de tipo C probablemente debidos al menor grosor en la pared polimérica.

4.3.5.1.- EFECTO DEL PH Y DE LA FUERZA IÓNICA

Dada la posible sensibilidad de los coloides a las variaciones de pH y fuerza iónica, analizaremos el efecto de estos sobre el ζ .

Para la determinación experimental de la influencia sobre la variación del pH, se procedió a preparar una suspensión que contenía una concentración al 0.1% (p/v) de nanopartículas en agua bidestilada, sobre una batería de pHs desde 3 hasta 9, ambos incluidos. Para el estudio del pH, la suspensión coloidal se fijó a una concentración de electrolito de KNO_3 de 10^{-3} M. Antes de añadir las nanopartículas se ajustaron los pH, el motivo es que se requiere gran laboriosidad hasta que se estabiliza el pH; conseguimos así evitar el riesgo de inestabilidad de las nanopartículas en relación a las propiedades eléctricas superficiales (fenómenos de degradación) (Plaza y cols., 2002). Las medidas se realizaron tras 24 horas de contacto de las partículas con el medio de dispersión a $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y bajo agitación mecánica a 50 r.p.m. Antes de medir se comprobó y reajustó el pH y fuerza iónica, en caso de que fuera necesario (con ayuda de KOH y HNO_3 según proceda). Dada la preselección de los ensayos anteriores, solo se muestran las nanopartículas A-2 y B elaboradas mediante sonicador y nanopartículas C.

Las nanopartículas presentan en general valores de ζ negativos debido a la naturaleza de los grupos del polímero responsables de su carga eléctrica superficial (figura 4.13.). En concreto, los grupos carboxilo del entramado polimérico se encuentran neutralizados a pH ácido (por los hidrogeniones del medio de dispersión). Por el contrario, conforme el valor del pH crece, es decir, conforme aumenta la concentración de grupos hidroxilos en el medio, cada vez un mayor número de grupos carboxilo superficiales estarán disociados. Esto determina el aumento de la carga eléctrica superficial de estas partículas (Plaza y cols., 2002).

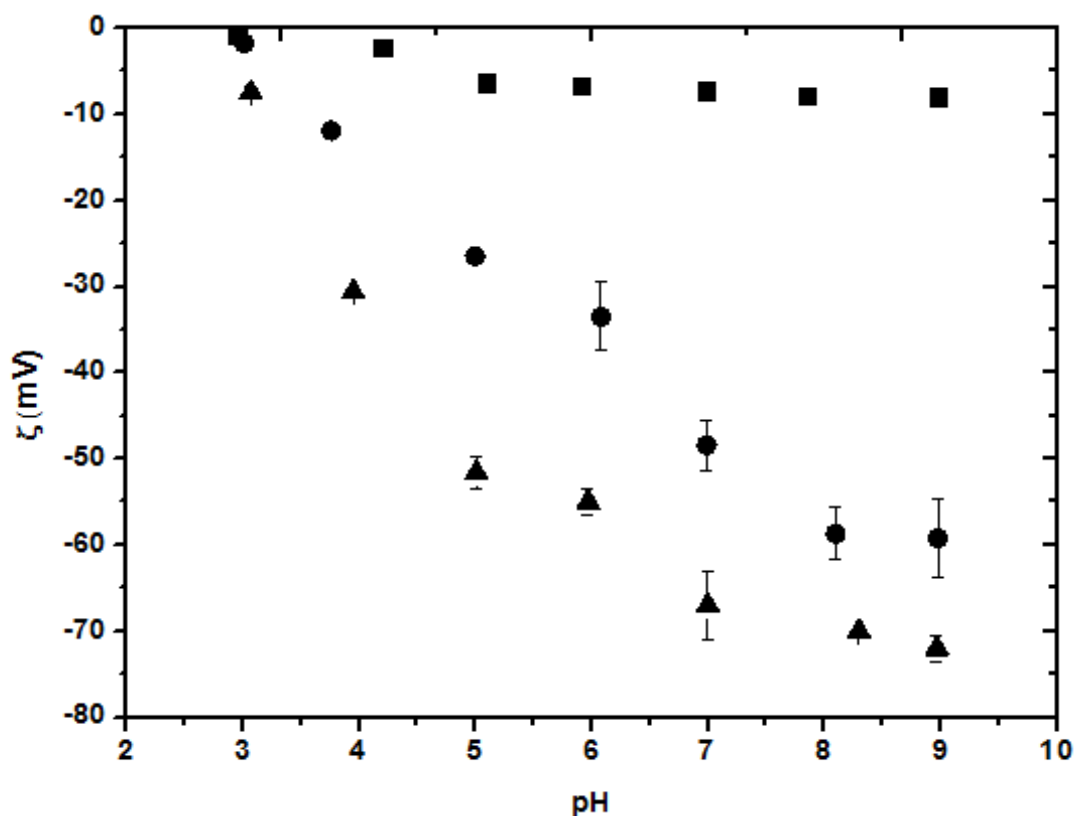


Figura 4.13.: ζ (mV) de las nanopartículas de PLGA -no cargadas de 5-FU- en función del pH, en presencia de KNO_3 10^{-3} M. Nanopartículas A (■), nanopartículas B (▲), nanopartículas C (●).

Cabe destacar los valores de ζ y su invariabilidad en las nanopartículas A en función del pH, lo que nuevamente lleva a tener en cuenta el grosor y compacidad de esta síntesis debido a la mayor concentración de polímero. A diferencia de las nanopartículas A, las nanopartículas B y C presentan valores próximos al rango de estabilidad para valores similares al de pH fisiológico (7.4) o propio del ambiente tumoral (5-6).

En general los biocomponentes, incluyendo proteínas plasmáticas tienen una carga ligeramente negativa. De modo que nanopartículas con escasa electronegatividad, como las tipo A podrían interactuar con ellos. Por otro lado nanopartículas con cargas muy negativas podrían inducir reacciones inmunológicas

(Faisant y cols., 2006). De aquí que el comportamiento electrocinético de las nanopartículas tipo B y C sea el más adecuado.

Para confirmar estos resultados, evaluamos las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas en función de la concentración de KNO_3 (fuerza iónica) a pH 6.0, siguiendo la misma metodología. Se procede a estudiar una batería de soluciones con distinta fuerza iónica, de 10^{-1} a 10^{-5} M de KNO_3 . (figura 4.14.).

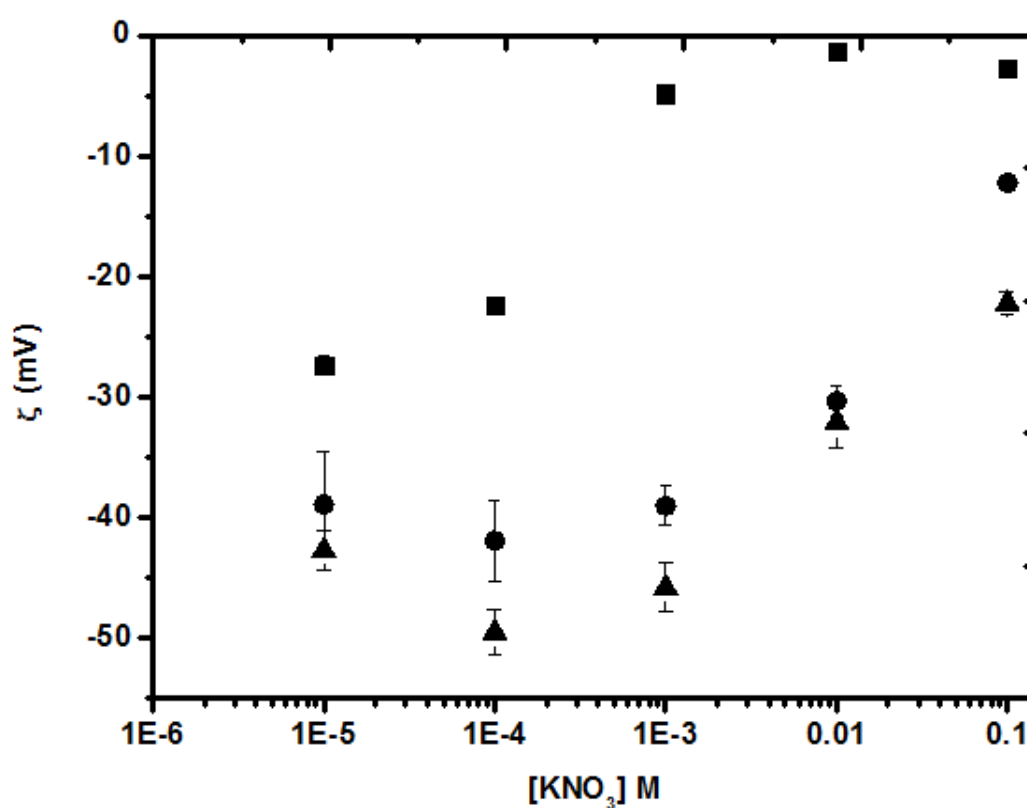


Figura 4.14.: ζ (mV) de las nanopartículas de PLGA no cargadas de 5-FU en función de la fuerza iónica, a pH 6. Nanopartículas A (■), nanopartículas B (▲), nanopartículas C (●).

Los resultados de este análisis presentan una evidente electrosimilitud entre las nanopartículas B y C presentando ambos nanosistemas una carga más negativa en todo el intervalo de concentración de KNO_3 que las nanopartículas A.

El comportamiento de las nanopartículas una vez cargado el principio activo fue similar a las nanopartículas sin carga de fármaco para todas las síntesis (figuras 4.15. y 4.16.).

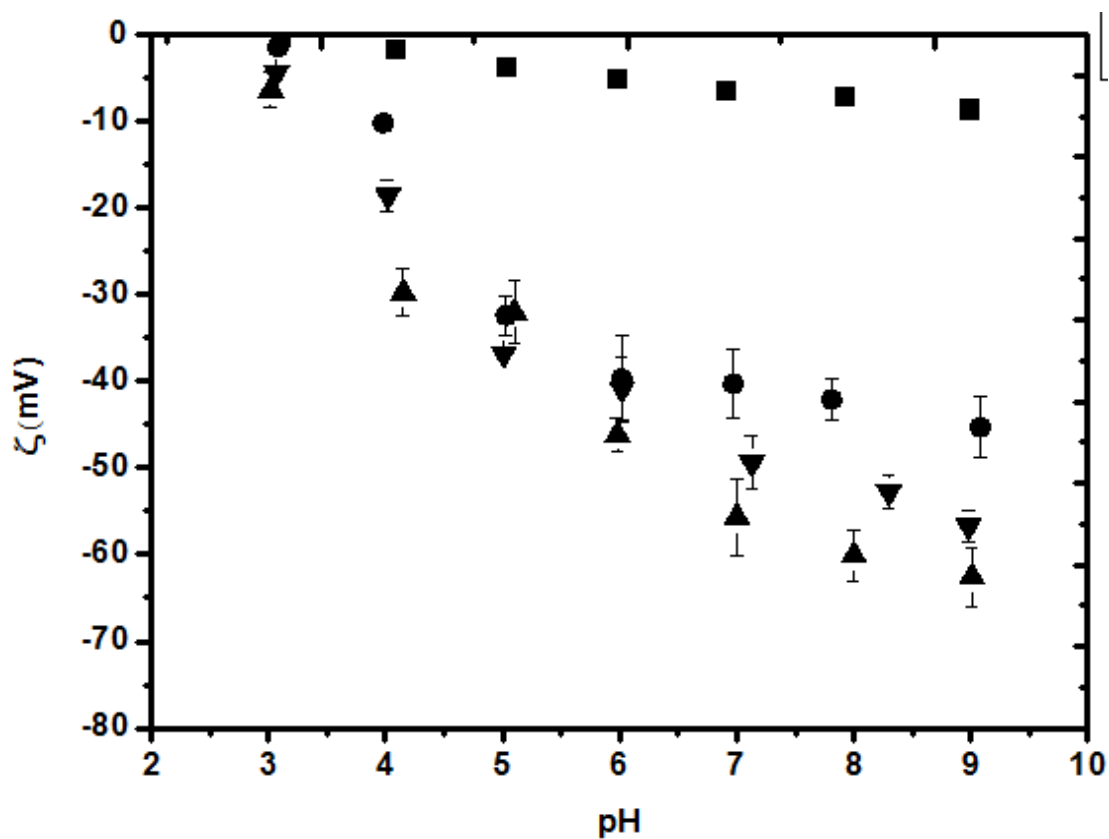


Figura 4.15.: ζ de las nanopartículas cargadas con 5-FU (10^{-3} M) en función del pH, en presencia de KNO_3 10^{-3} M. Nanopartículas A (■), nanopartículas B-in (▲), nanopartículas B-ex (▼), nanopartículas C (●).

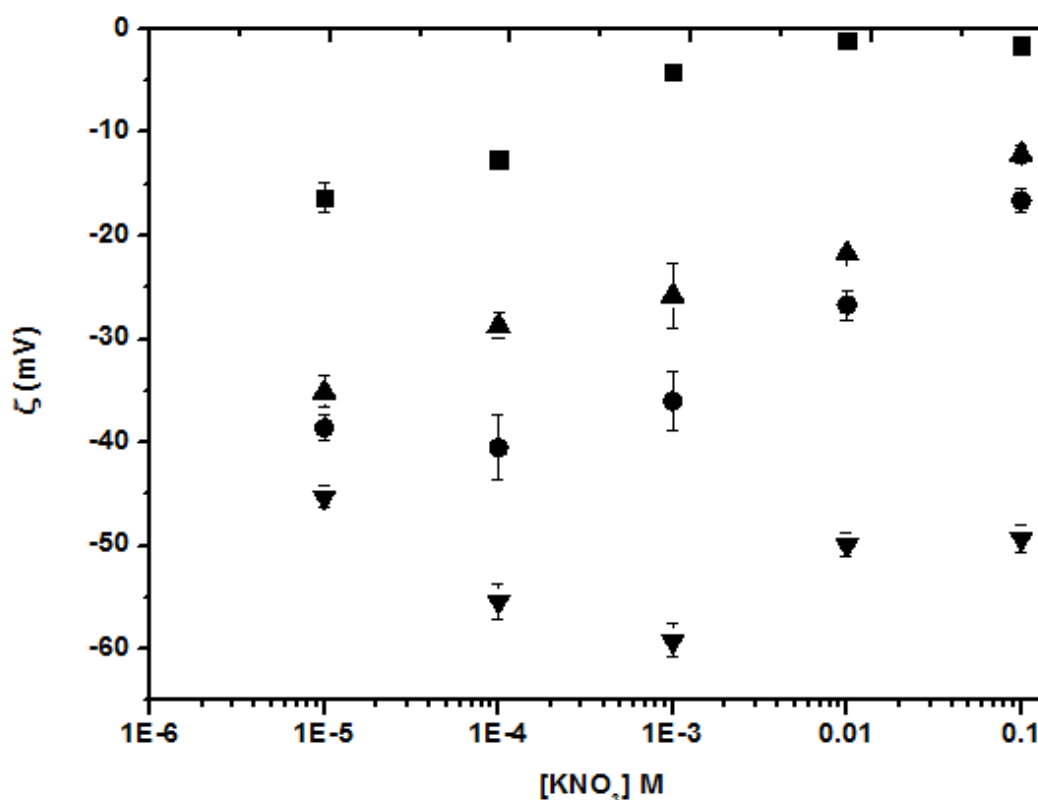


Figura 4.16. ζ (mV) de las nanopartículas de PLGA cargadas con 5-FU 10^{-3} M en función de la fuerza iónica, en presencia de pH 6. Nanopartículas A (■), nanopartículas B-in (▲), nanopartículas B-ex (▼), nanopartículas C (●).

Es interesante destacar que la carga eléctrica superficial de las nanopartículas A no es tan negativa como la de nanopartículas B y C; esto podría ser debido a la menor porosidad de las nanopartículas A lo que reduce la entrada del medio de dispersión y por tanto el incremento de la carga eléctrica superficial negativa global del resto de nanosistemas.

Para las nanopartículas B y C, concentraciones superiores a 10^{-2} M de KNO_3 dan lugar a una disminución de la electronegatividad haciendo a las nanopartículas más inestables. A mayor concentración del electrolito, la doble capa se compacta más y las nanopartículas pierden movilidad, al hacerse más grandes.

Los resultados obtenidos apuntan hacia una mayor estabilidad de nanopartículas B y C, respecto a nanopartículas A, tanto *in vitro*, durante el almacenamiento, como *in vivo*.

4.4 ESTUDIO REOLÓGICO

La reología permite obtener información útil acerca de las propiedades mecánicas de las soluciones y conocer mejor las condiciones para su administración, distribución (Rodríguez R, 2002) y conservación (Meyvist T, 1999).

El análisis de suspensiones poliméricas biodegradables utilizadas en la cesión de principios activos (Dorta MJ, 2002) permiten conocer posibles alteraciones estructurales en formulaciones parenterales durante la manipulación o la administración, es decir, el llenado de la jeringa o de la inyección (Blasi P y cols., 2013), pues estudia la física de los medios continuos sobre el flujo de la materia y su deformación; la relación entre esfuerzo y deformación en unas condiciones de presión y temperatura .

Los estudios realizados con PLGA dan valores de viscosidad constante en los intervalos de fuerzas de cizalla más frecuentes (0-1500 s^{-1}). El análisis detallado de los perfiles de flujo indican que su comportamiento es prácticamente newtoniano en un amplio intervalo de fuerzas y velocidad de cizalla (Fariña y cols., 2003)

Aquellos fluidos donde el esfuerzo cortante es directamente proporcional a la rapidez de deformación se denominan fluidos Newtonianos. Los fluidos No Newtonianos son aquellos en que el esfuerzo cortante no es directamente proporcional a la deformación (figura 4.17).

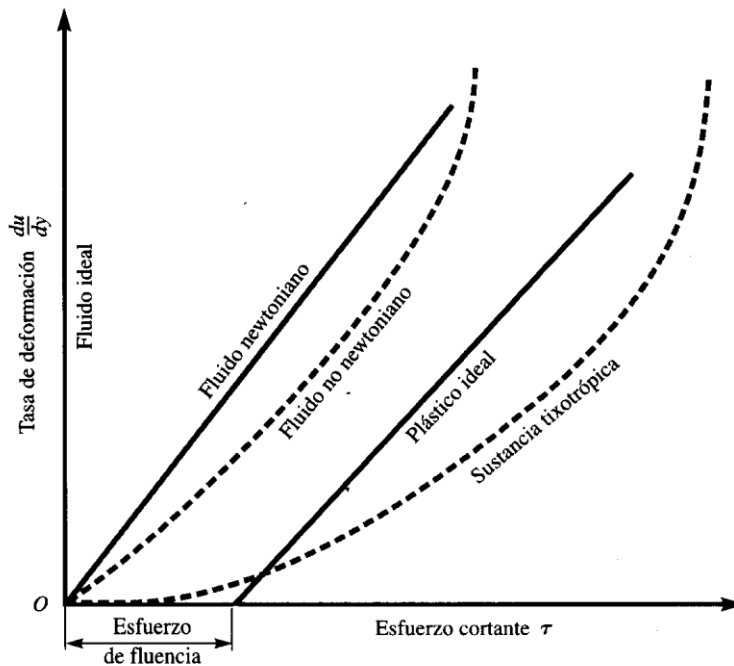


Figura 4.17.: Esfuerzo cortante según la tasa de deformación en diferentes fluidos.

4.4.1.-METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La caracterización reológica de las formulaciones se realizó a 25 °C usando un reómetro rotacional HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania) con una configuración de geometría de placa paralela, con una placa inferior fija y una placa superior móvil (Haake PP60 Ti, 6 cm de diámetro). Se probaron diferentes espacios entre placas hasta seleccionar una separación de 0,106 mm.

El dispositivo consta de los siguientes elementos: Viscosímetro Haake VT500 y baño termostático con sistema de recirculación de agua (Haake C25P). El Reómetro se encuentra conectado a un ordenador provisto del software HAAKE RheoWin® Job Manager V. 3.3 para llevar a cabo la prueba y RheoWin® Data Manager V 3.3 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania) para llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos.

Las curvas de viscosidad y de flujo se registraron durante 3 min durante el periodo de aceleración o ascenso de 0 a 100 s⁻¹, 1 min a 100 s⁻¹ (periodo de velocidad

constante) y finalmente 3 min durante el período de descenso de 100 a 0 s⁻¹. Los valores de viscosidad a 100 s⁻¹ se determinaron a t₀ y hasta un máximo de t₁₈₀ días para las muestras almacenadas a 4 °C por triplicado.

La tabla 4.8. presenta los valores medios de viscosidad (mPa·s) de las muestras a 100 s⁻¹, a tiempo 0 y transcurridos 3 meses.

Muestras	0 días	180 días
Muestra A	<i>0.4952±0.004</i>	<i>0.4029±0.033</i>
Muestra B-in	<i>0.8198±0.032</i>	<i>0.8721±0.012</i>
Muestra B-ex	<i>0.8593±0.021</i>	<i>0.8745±0.022</i>
Muestra C	<i>0.9187±0.007</i>	<i>0.9499±0.015</i>

Tabla 4.8.: Valores de estabilidad en la viscosidad de las nanopartículas A, B-in, B-ex y C.

No se encontraron diferencias relevantes en función de la metodología de síntesis o composición de la formulación. Todos los valores están por debajo de la viscosidad del plasma (1,2 mPa·s a 37°C). Estos resultados son de importancia dadas sus implicaciones en la administración intravenosa mediante la prevención y limitación de la aparición de inflamación, dolor o flebitis en el lugar de inyección (Gálvez-Martín y cols., 2014).

Tampoco se observaron diferencias en función del tiempo de conservación, lo que en un principio garantizaría la idoneidad de la formulación por la vía intravenosa, al menos durante 6 meses.

Además del tiempo o la temperatura, la viscosidad puede verse afectada por variables como el gradiente de velocidad de deformación y la presión, entre otros, siendo éstas las más importantes.

La variación que sufren las muestras con el gradiente de velocidad permite clasificar los diferentes tipos de fluidos que se pueden encontrar desde el punto de vista reológico.

Así la caracterización reológica sirvió no solamente para evaluar la estabilidad de las formulaciones sino también para conocer el comportamiento de flujo del sistema final.

El comportamiento de las formulaciones es uno de los criterios esenciales en el desarrollo de medicamentos, ya que interviene en las propiedades funcionales del producto final durante la administración (comportamiento mecánico), el control de calidad, el diseño de operaciones básicas como bombeo, mezclado, envasado, almacenamiento y estabilidad física.

Las siguientes figuras (figura 4.18 y 4.19.) muestran las *Curvas de Viscosidad* (en azul) y *Flujo* (en rojo) de las formulaciones estudiadas. En la *Curva de Fluidez* se representa el esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación (τ vs D), mientras que en la *Curva de Viscosidad* se representa la viscosidad en función de la velocidad de deformación (μ vs D). Como se puede observar todas las formulaciones presentan un comportamiento newtoniano, la *Curva de Flujo* es una línea recta que comienza en el origen, es decir, existe una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. Además se observa en la *Curva de Viscosidad* que la viscosidad es prácticamente constante para cualquier velocidad de deformación aplicada. Este comportamiento se sigue manteniendo a lo largo del tiempo de estudio, 6 meses.

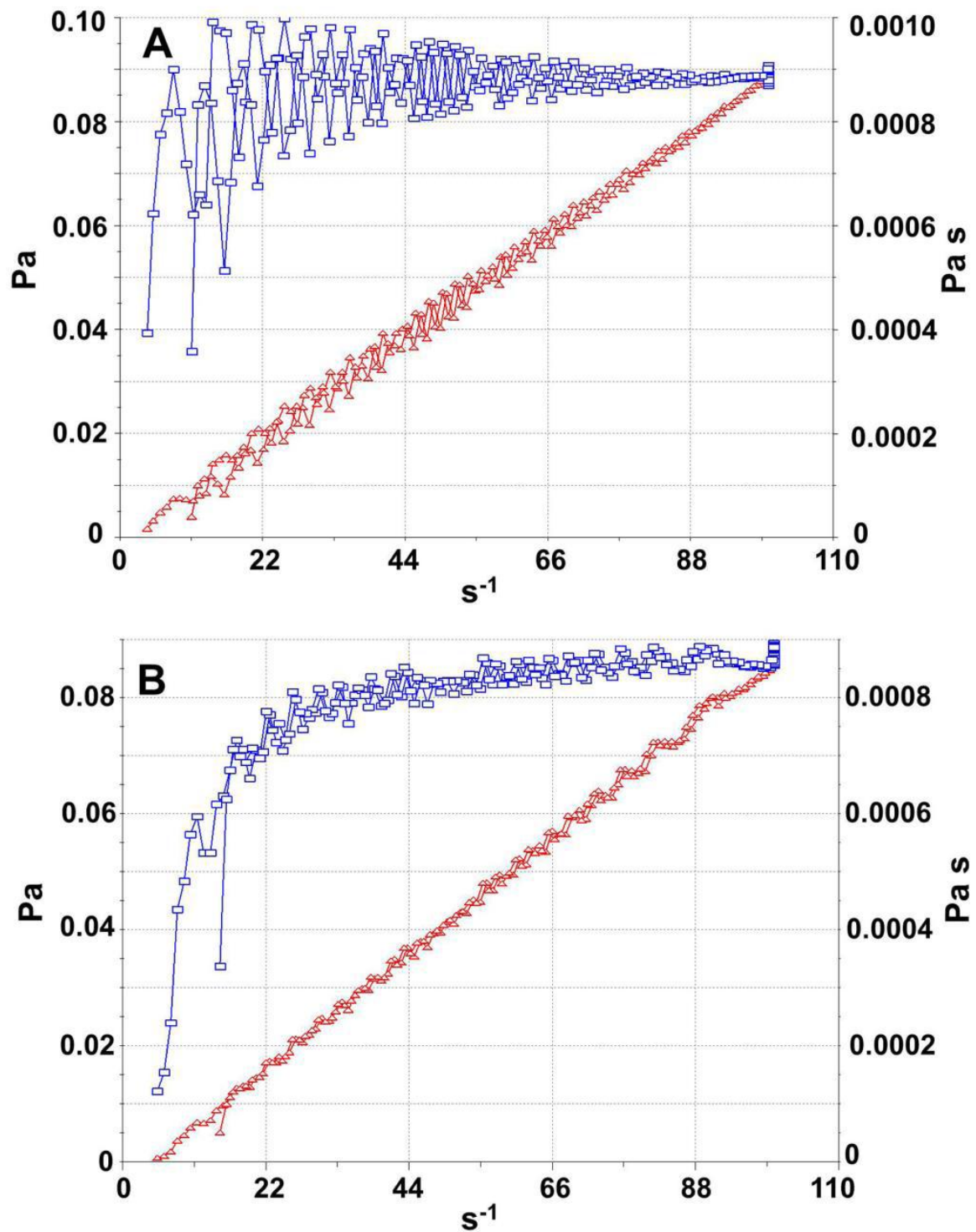


Figura 4.18.: Curvas de Viscosidad y Flujo de las nanopartículas estudiadas. A (Panel A).
B-in (Panel B).

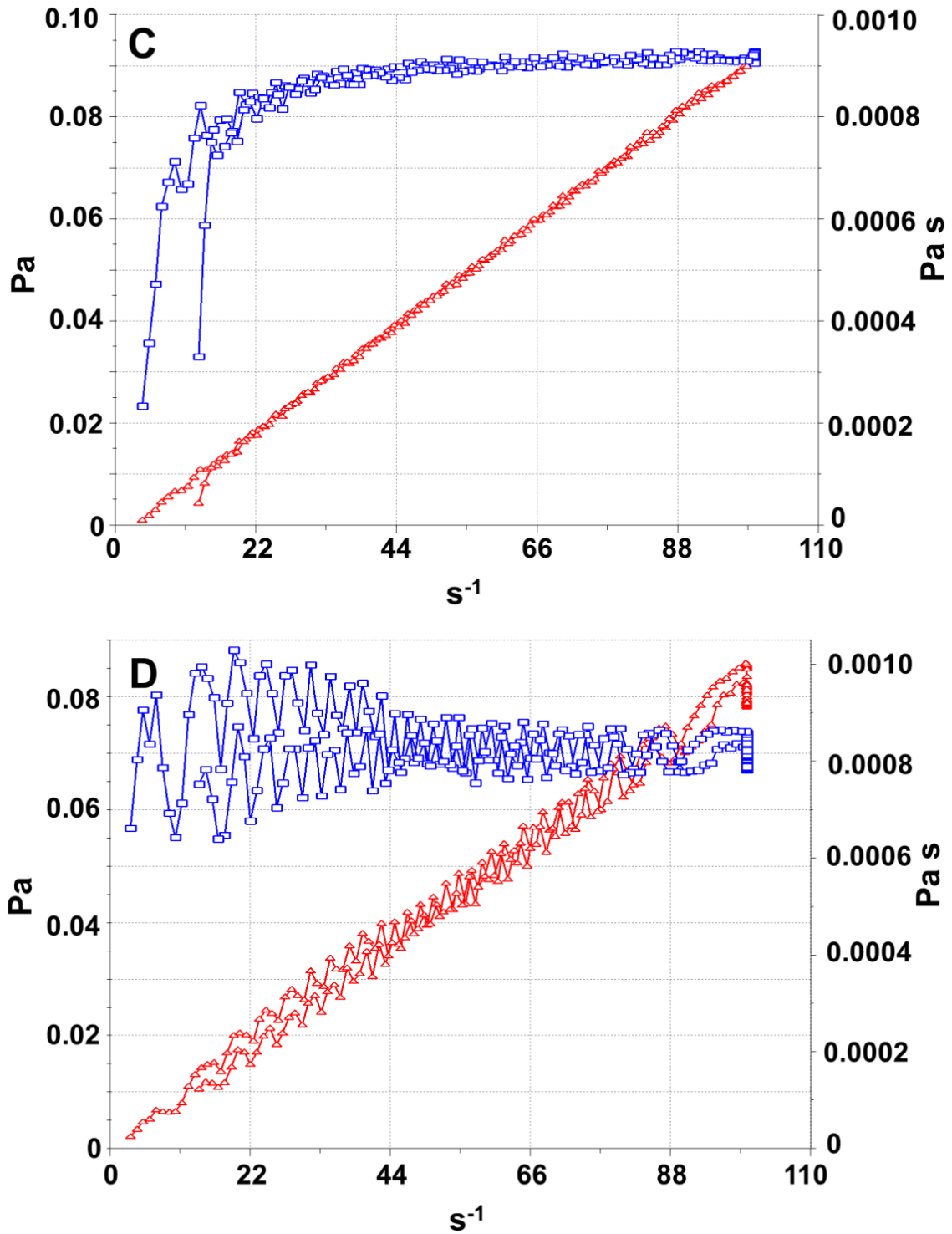


Figura 4.19: Curvas de Viscosidad y Flujo de las nanopartículas estudiadas. B-ex (Panel C) C (Panel D).

4.5 CARACTERIZACIÓN ÓPTICA MEDIANTE MÚLTIPLE LIGHT SCATTERING.

Con el objetivo de predecir la estabilidad a largo plazo, las formulaciones se evaluaron mediante dispersión de luz múltiple (multiple light scattering), utilizando el dispositivo Turbiscan® Lab (Formulacion Co., L'Union, Francia).

El equipo Turbiscan® Classic MA 2000 permite analizar la estabilidad de dispersiones coloidales. El analizador óptico Turbiscan®, desarrollado a mediados de los noventa (Meunier, 1994), es un instrumento que puede utilizarse para monitorizar en tiempo real las dispersiones coloidales (Kim et al., 2008). Se fundamenta en el análisis multivariable de dispersión de la luz, y puede detectar cambios de tamaño o localización en el seno de las muestras como *Sedimentación, Floculación, Coalescencia, Separación de fases, Flotación, etc*, sin necesidad de diluir la muestra original. Otra ventaja importante es la capacidad de detectar fenómenos de desestabilización mucho antes que el ojo humano, sin que exista separación visible de fases, pudiendo detectar la desestabilización de la fórmula antes que los métodos clásicos de estabilidad. Además permite calcular las variables cinéticas asociadas a los mecanismos de desestabilización de forma que predice la estabilidad a largo plazo.

4.5.1. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL TURBISCAN

El Turbiscan® es un instrumento óptico capaz de analizar la estabilidad de sistemas coloidales y dispersiones concentradas mediante la medición de la transmitancia y la retrodispersión de un sistema. Presenta una fuente de luz la cual se compone de un diodo electro luminiscente en el infrarrojo cercano ($\lambda = 880\text{nm}$), este pulso de luz incide sobre el tubo que contiene la muestra. Dos sensores ópticos móviles y sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida y retrodispersada; el de transmitancia, ubicado en un ángulo de 180° con respecto a la muestra, que recibe la luz que atraviesa la muestra y el de retrodispersión (o backscattering) ubicado a 135° , que recibe la luz dispersada por la muestra, contenida en una celda cilíndrica (figura 4.20.).

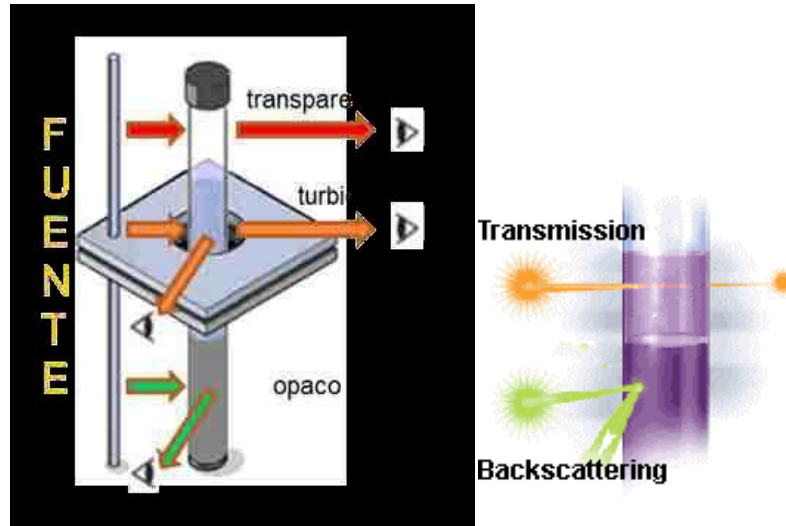


Figura 4.20.: Principio de funcionamiento del Turbiscan Classic

Este equipo trabaja en modo de escaneo (scanning): la cabeza de lectura óptica escanea a lo largo del tubo (el cual contiene la muestra) hasta 70 mm, adquiriendo los datos de transmisión y retrodispersión cada 40 μm . Las curvas correspondientes proporcionan el flujo de luz transmitida y retrodispersada en porcentaje como una función de la longitud de la muestra (en mm).

El análisis de estabilidad se lleva a cabo mediante el estudio de la variación en los perfiles de retrodispersión o backscattering (BS) y transmitancia (T), aplicando las siguientes fórmulas:

$$BS \approx \frac{1}{\sqrt{\lambda^*}} \quad (4.7)$$

$$T(\lambda, r_i) = T_0 e^{-\frac{2\eta}{\lambda}} \quad (4.8)$$

$$\lambda^*(\phi, d) = \frac{2d}{3\phi(1-g)Q_s} \quad (4.9)$$

Donde λ^* es el camino libre medio de transporte de fotones de la muestra, ϕ es la fracción de volumen de partículas, d es su diámetro medio, $2r_i$ es el paso óptico, y g y Q_s son los parámetros ópticos dados por la teoría de Mie (que supone que no existe absorción de luz por parte de las partículas) (Kang et al., 2012).

4.5.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Las mediciones se realizaron transcurridas 24 horas desde la síntesis de las nanopartículas, a 22.5°C. Para ello, se colocó una alícuota de cada formulación en una celda de Turbiscan y se registró la retrodispersión y la transmitancia cada 40 μm a lo largo de la celda durante 24 horas. El tratamiento de datos se realizó con el software del equipo.

4.5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS DISPERSIONES COLOIDALES Y ANÁLISIS DE ESTABILIDAD A TRAVÉS DE *TURBISCAN*

Las figuras 4.21, 4.22 y 4.23 muestran los perfiles de transmisión y backscattering (%) en función de la altura (mm) de la muestra de las formulaciones ensayadas.

Para poder interpretarlos se ha de tener en cuenta que el lado izquierdo de las curvas corresponde a la parte inferior del vial, mientras que el lado derecho corresponde a la parte superior.

Cuando la muestra es transparente el detector de transmitancia recibe gran parte de la luz, mientras que al aumentar la turbidez de la muestra el haz se dispersa y atraviesa la muestra cada vez en menor proporción hasta que (en el caso de muestras opacas), prácticamente nada de luz llega al detector de transmisión. El detector de retrodispersión, por el contrario, recibe gran cantidad de luz cuando la muestra es opaca.

Si el valor de retrodispersión se mantiene constante a lo largo del tubo se puede considerar que la muestra es estable (Panel B). Realizando sucesivos barridos a lo largo del tiempo es posible registrar cambios en el perfil (Paneles A, C y D) que permiten la evaluación del o de los mecanismos de desestabilización que prevalecen, la cinética de los mismos y el grado de desestabilización de una formulación (Buron y cols., 2004).

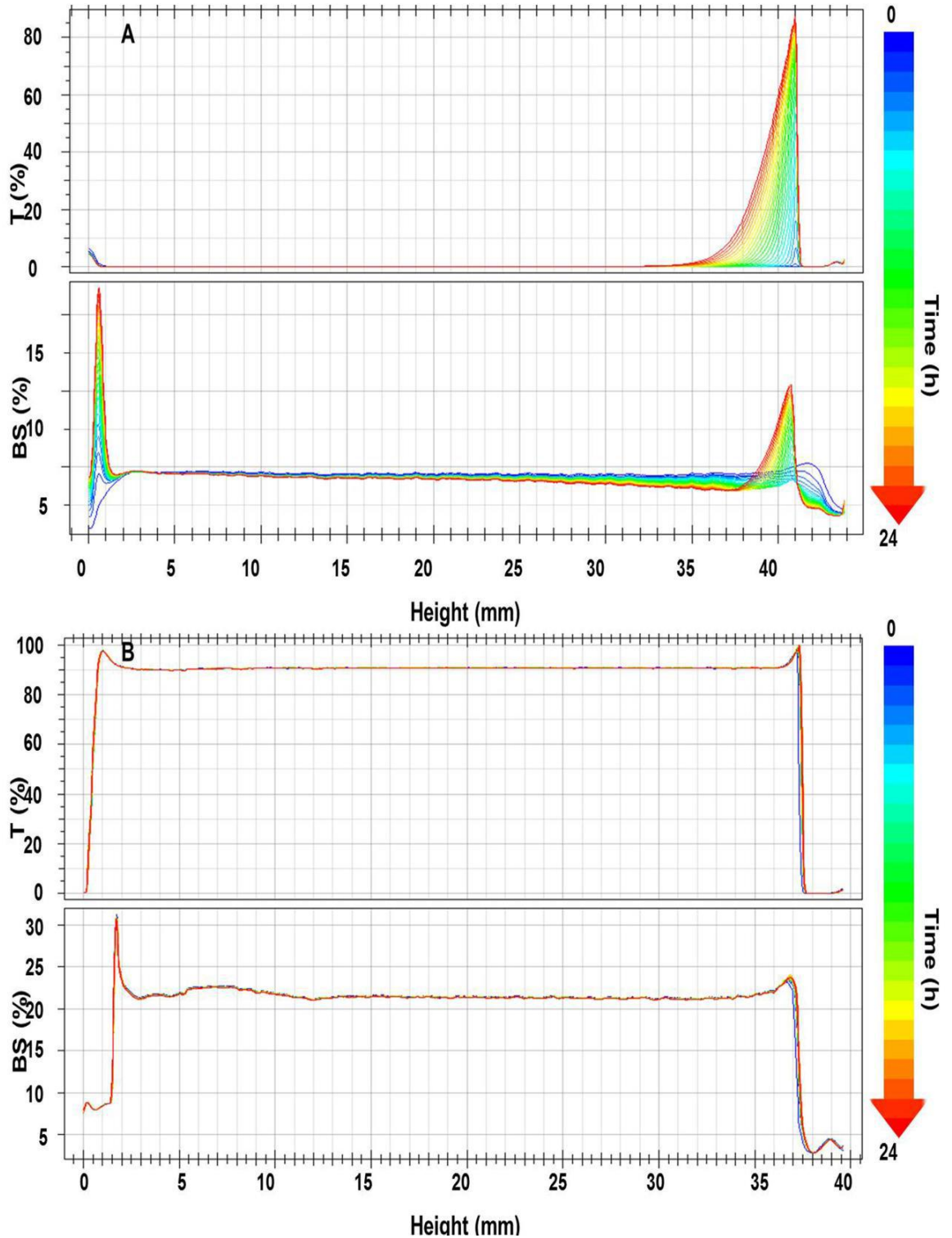
Cuando se produce un fenómeno de sedimentación la señal de reflexión aumenta en el tiempo, en la parte baja del vial. Cuando la muestra sufre un fenómeno de creaming, se produce un aumento en la parte superior del vial. En casos de desestabilización, aparece una zona de clarificación –que al principio no existe- y la luz comienza a atravesar la muestra, con lo que disminuye significativamente la cantidad de señal en el detector de retrodispersión. Cuando la muestra es transparente la luz no llega al detector colocado a 135° sino al detector de transmitancia.

Los perfiles de transmisión de las nanopartículas A reflejan la migración de las nanopartículas desde la parte superior hacia fondo, generando una disminución progresiva de la concentración de partículas dispersas en la superficie de la celda (clarificación) y consecuentemente un aumento en la retrodispersión. Según esto, las nanopartículas A sufren un claro proceso de sedimentación. Este hecho no hace más que confirmar el elevado tamaño y alto grado de polidispersión de esta síntesis.

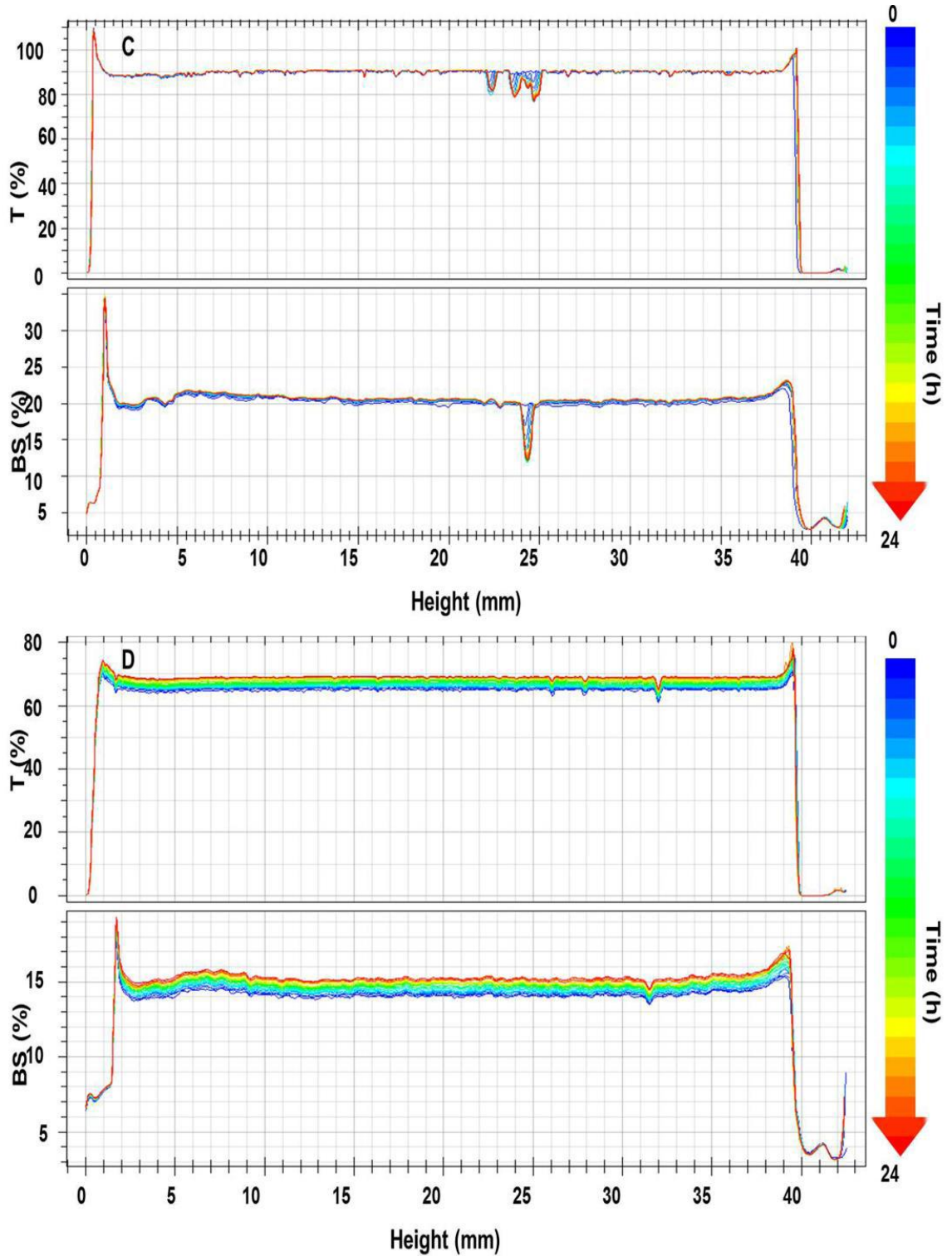
Lo contrario se observa en la parte superior de la muestra, donde se concentran las partículas y aumenta levemente la retrodispersión. Este tipo de perfiles se corresponden con fenómenos de cremado o de flotación.

En el caso de formulaciones que se desestabilizan por floculación o coalescencia, los perfiles obtenidos con el Turbiscan revelan una disminución del valor de retrodispersión en la parte central del tubo (intervalo 20-50 mm) en el tiempo. Precisamente el comportamiento de la formulación C (Panel D) implica cambios en el tamaño de las nanopartículas, ya que se aprecia un aumento en las señales de BS. El BS cambia al cambiar el diámetro de las partículas. Como demuestra la ecuación 4.7 el BS disminuye cuando crece el tamaño de partícula (cuando d es mayor que la longitud de onda de la luz incidente, $\lambda = 850$ nm) o aumenta con el tamaño de partícula si d es menor que λ de la luz incidente. No obstante la señal de transmisión presenta una desviación $\leq \pm 2\%$, y por tanto, puede considerarse que no habrá diferencias significativas del tamaño de partícula. En cambio variaciones de un $\pm 10\%$ indican inestabilidad de las formulaciones, tal como se observa en el panel C.

Finalmente, la superposición de la señal de transmisión y/o reflexión de las horas 0 a 24 de las nanopartículas B-in muestra la estabilidad de las formulaciones, indicando ausencia de procesos de desestabilización. Las NPs B-ex también muestran una línea constante de sus perfiles pero con algunos picos alrededor de los 25 mm de altura, siendo estos más pronunciados para el perfil de BS, lo que sugiere la formación de algún agregado de carácter aislado.

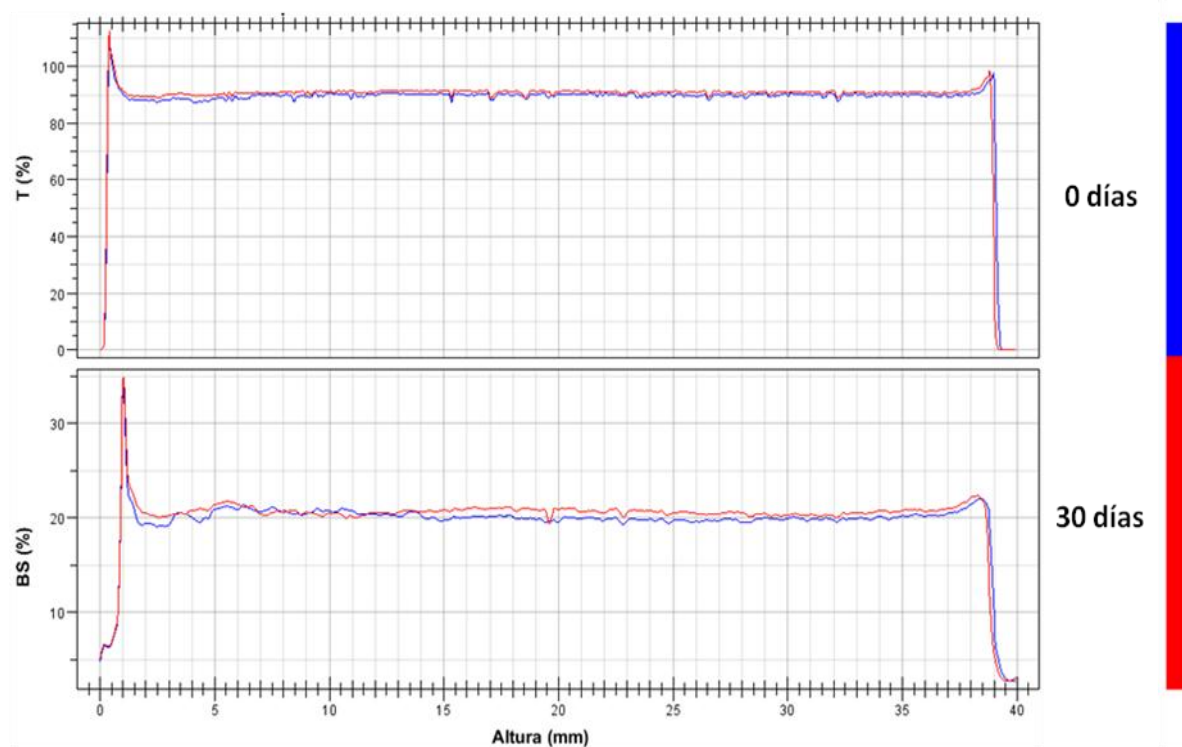


4.21.: Estabilidad óptica. Perfiles de Transmisión (T) y back-scattering (BS) de las nanopartículas de 5-FU. Los perfiles se expresan como % en función de la altura (mm). A-2s (Panel A). B-in (Panel B).



4.22.: Estabilidad óptica. Perfiles de Transmisión (T) y back-scattering (BS) de las nanopartículas de 5-FU. Los perfiles se expresan como % en función de la altura (mm). B-ex (Panel C). C (Panel D).

Con el objeto de estudiar la estabilidad de las nanopartículas B-ex, los perfiles de transmisión y retrodispersión fueron analizados transcurridos 30 días de almacenamiento.



4.23.: Estabilidad óptica. Perfiles de Transmisión (T) y back-scattering (BS) de las nanopartículas de 5-FU B-ex transcurridos 30 días. Los perfiles se expresan como % en función de la altura (mm).

A la vista de los resultados se podría concluir que las formulaciones B-in y B-ex constituye un sistema coloidal homogéneo y estable en el tiempo. Al contrario que el resto de formulaciones, con las que previsiblemente no se podrían realizar estudios in vivo ya que muy probablemente producirían embolia en los animales utilizados.

5.- CAPACIDAD DE VEHICULIZACIÓN DE 5-FLUOROURACILO

Para que un fármaco ejerza su acción es indispensable que llegue y acceda en cantidad suficiente a todas las células diana sensibles a él. En el caso de los fármacos antitumorales, el objetivo es asegurar la máxima acumulación de estos principios en el lugar diana para tratar de aumentar su eficacia terapéutica. En este sentido, el objetivo principal en este capítulo es lograr la aplicación de las nanopartículas sintetizadas en el transporte del fármaco antitumoral 5-FU. Según lo expuesto en la Introducción de esta memoria, puede esperarse que la utilización de estas nanopartículas biodegradables permita el transporte controlado de dosis de fármaco vehiculizado hasta el tejido u órgano diana. De esta manera, a los principales beneficios comentados sobre el uso de este tipo de nanoplateformas, en el caso del 5-FU serían mejorados sus problemas de estabilidad (cardiotoxicidad de los productos de degradación generados *in vitro* y/o *in vivo*) y de su perfil farmacocinético (rápida metabolización: semivida plasmática de 10 minutos) (Flórez, 2008; Li y cols., 2008), pudiéndose incluso llegar a vencer los fenómenos de resistencia que las células cancerosas lograran desarrollar (Martin-Banderas y cols., 2013).

En primer lugar se procede a la valoración del principio activo, para ello utilizamos el método espectrofotométrico. Se determinará la longitud de onda de máxima Absorbancia y el Coeficiente de Absortividad molar, construyendo la recta de regresión para así comprobar que es un método lineal, preciso y exacto. Estos datos nos servirán para determinar la capacidad de vehiculización del principio activo sobre las nanopartículas preparadas.

Se realizará posteriormente un estudio cuantitativo mediante espectrofotometría UV-Vis para conocer la capacidad de carga de las nanopartículas y por último la caracterización *in vitro* del proceso de liberación del fármaco desde las nanopartículas.

El fármaco seleccionado exige unas condiciones de trabajo definidas por el carácter fotosensible y por la formación de cristales en disolución acuosa a

concentraciones superiores a 10^{-2} M. Tanto la preparación como la manipulación y conservación de las disoluciones acuosas de 5-FU se realizaron a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz ambiental (envases recubiertos por papel de aluminio) y no se prepararon disoluciones de concentración $> 10^{-2}$ M.

Se sabe de la influencia del pH sobre la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-FU, de forma que existe una clara alteración de los valores de absorbancia a 266 nm cuando el fármaco se expone a un pH ligeramente básico (Arias y cols., 2005). Esto es lógico si recordamos que bajo estas condiciones se encuentra favorecida la transformación (degradación) del agente antitumoral en las sustancias cardiotóxicas fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico (Sánchez-Muñoz y cols., 2003). Para definir este fenómeno se estudiaron una batería de disoluciones acuosas a pH natural y pH fisiológico.

Con estas premisas, se procedió a la preparación de dos curvas de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración del fármaco a estudiar en los diferentes medios.

5.1.- ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Las medidas de absorción de la radiación UV-Vis encuentran una enorme aplicación en la identificación y determinación cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. La espectroscopia de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones depositadas en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente está relacionada con la absorbancia como se muestra en la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (5.1.)$$

Donde A es la absorbancia, T es la transmitancia, P y P_0 son las intensidades transmitida e incidente, respectivamente, ϵ es la absortividad molar, b es el

camino óptico que tiene que recorrer la radiación y c es la concentración de analito absorbente. Esta Ecuación es una representación matemática de la ley de Beer.

La *ley de Beer* también se puede aplicar a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes. La absorbancia total de una disolución es igual a la suma de las absorbancias que presentan los componentes individuales. Esta relación hace posible la determinación cuantitativa de los constituyentes individuales de una mezcla, incluso si sus correspondientes espectros se solapan (Skoog y cols., 2001). Siempre que se cumpla la ley de Beer y las distintas especies se comporten de forma independiente unas respecto de otras, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por:

$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 + \dots + \varepsilon_n bc_n \quad (5.2.)$$

Donde los subíndices se refieren a los componentes absorbentes 1,2,..., n . La mayor exactitud de un análisis de este tipo se alcanza cuando se seleccionan longitudes de onda en las que las diferencias entre las absorptividades molares sean grandes.

Se han definido pocas excepciones a la generalización de que la absorbancia está relacionada linealmente con el camino óptico. Por otra parte, con frecuencia se han encontrado desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de absorbancia y la concentración cuando b es constante (Skoog y cols., 2001). En algunas ocasiones estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley y representan limitaciones propias de la misma. Otras veces surgen como consecuencia de la forma en que se realizan las medidas de absorbancia (desviaciones instrumentales) o como resultado de cambios químicos asociados con cambios de concentración (desviaciones químicas).

Hay que recordar que la ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene una concentración de

analito relativamente baja. A concentraciones altas, generalmente superiores a 10^{-2} M, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 10^{-2} M, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones.

La absorción UV-Vis resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace y, como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. La espectroscopía de absorción molecular es, por tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula. Sin embargo, más importantes son sus aplicaciones en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

El espectrofotómetro ultravioleta-visible utilizado (Pekin Elmer Lambda 40, Spectrometer UV-Vis, EE.UU.) está equipado con una lámpara de deuterio que produce un espectro continuo útil para la región comprendida entre 180 y 375 nm, y otra de wolframio, útil para la región comprendida entre 350 y 1100nm. Así que, nos permite obtener un espectro desde los 180 nm a 1100 nm. La cubeta utilizada es de cuarzo transparente y con un camino óptico de 1 cm. Su mantenimiento es crítico para la calidad de las medidas, por lo que la limpieza continua es fundamental en el proceso, se hace con acetona y agua destilada.

El análisis espectrofotométrico necesita previamente unas condiciones de trabajo y la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración del fármaco investigado. Las medidas de absorbancia

espectrofotométricas se hacen normalmente a la longitud de onda correspondiente a un pico de máxima absorción, ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto, lográndose así una máxima sensibilidad y obteniendo un mejor acuerdo con la ley de Beer, ya que las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento (Skoog y cols., 2001). El 5-FU utilizado (Sigma-Aldrich, Alemania) es un polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro y estable en aire. Su fórmula química es $C_4H_3FN_2O_2$ y su peso molecular es 130.08 g/mol. Su punto de fusión se encuentra entre 280 y 284 °C, y es soluble en DMSO, bastante soluble en agua (1:80), poco soluble en alcohol (1:170) e insoluble en cloroformo, benceno y éter (Rudy y Senkowski, 1973). Si bien no es termosensible, sí es muy fotosensible.

Por lo tanto, antes de abordar la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de fármaco, hay que indicar que la preparación y manipulación de las disoluciones acuosas de 5-FU se realizó a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz ambiental (cubiertas por papel de aluminio) debido a su carácter fotosensible, a pH natural (5-5.5) y pH fisiológico (7.4) y en un rango de concentración comprendido de 10^{-5} hasta 10^{-2} M. Para la disolución de los cristales de 5-FU se precisó la utilización de ultrasonidos. Su intensidad y la duración de la aplicación fue menor para las disoluciones preparadas a pH 7.4. No se observó ningún tipo de alteración macroscópica en las disoluciones de este agente quimioterápico tras el período de conservación de 24 horas. Sin embargo, se ha descrito que en disoluciones con una concentración superior a 10^{-2} M ocurre espontáneamente la cristalización de este fármaco en solución (Arias y cols., 2005; Barberi-Heyob y cols., 1995).

La curva de calibrado de las disoluciones de 5-FU se realizó utilizando las concentraciones molares 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8.5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} M. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones según la metodología ya descrita para el 5-FU.

La figura 5.1. recoge los resultados del análisis espectrofotométrico de una batería de disoluciones acuosas de 5-FU, realizado como paso previo a la preparación de una curva de calibrado del fármaco. Los resultados de este estudio muestran cómo sólo se observa señal por debajo de 325 nm y se aprecia cómo la magnitud de la absorción es directamente proporcional a la concentración de fármaco en el medio. Son claros los dos picos en el espectro de las disoluciones de 5-FU, si bien el único que presenta una longitud de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el que aparece a 266 nm. Por lo tanto, descartamos el pico que se genera a menor longitud de onda y los espectros obtenidos a concentraciones superiores a $3 \cdot 10^{-4}$ M, ya que a partir de esta concentración es patente la tendencia de los dos picos a fundirse en uno, hecho que se produce a una concentración $3 \cdot 10^{-3}$ M. Además, se aprecia un espectro irregular a estas altas concentraciones que hace imposible plantear cualquier tipo de medida, si no es mediante la realización de una adecuada dilución de la muestra. Se observa también que a estas altas concentraciones la longitud de onda de máxima absorbancia decrece de forma muy acusada al aumentar la cantidad de fármaco en el medio, por lo que pierde validez en la determinación del coeficiente de absortividad molar. Esta desviación manifiesta de la *ley de Beer* podría justificarse por el hecho de que aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 10^{-2} M, el 5-FU puede pertenecer al grupo de moléculas orgánicas donde aparecen algunas excepciones (Arias y cols., 2005).

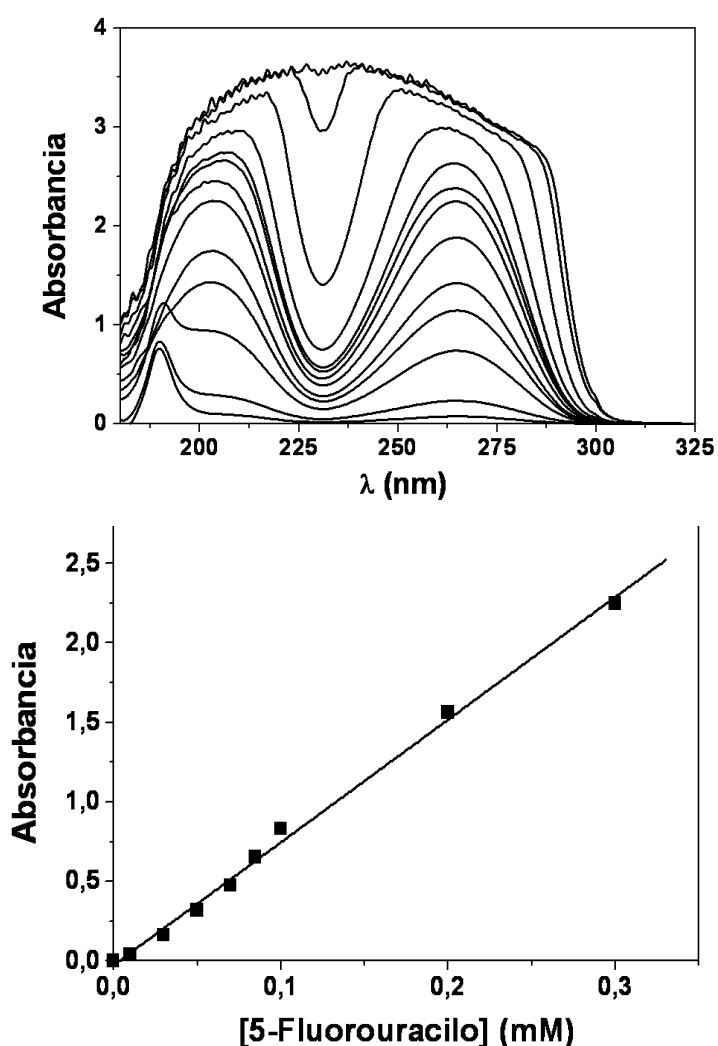


Figura 5.1. La gráfica superior corresponde a los espectros de absorción UV-Vis de las disoluciones acuosas de 5-FU. Las concentraciones molares en orden creciente de absorbancia seleccionadas son: 10^{-5} M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-5}$ M, $7 \cdot 10^{-5}$ M, $8.5 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M, $2 \cdot 10^{-4}$ M, $3 \cdot 10^{-4}$ M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, $7 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-3} M, $5 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-2} M. La gráfica inferior refleja la determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones acuosas de 5-FU para la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).

La determinación del coeficiente de absorción molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y de concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 7720 \pm 180 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a pH natural (4.7)

En la parte inferior de la figura se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones, obtenidos para la longitud de onda de máxima absorbancia cumplen la ley de Beer. La pérdida de la linealidad absorbancia – concentración se produce cuando los picos del espectro tienden a fusionarse en uno, a concentraciones de 5-FU superiores a $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

En el caso del efecto del pH sobre la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-FU, existe una clara alteración de los valores de absorbancia a 266 nm cuando el fármaco se expone a un pH ligeramente básico (Arias y cols., 2005). Esto es lógico si recordamos que bajo estas condiciones se encuentra favorecida la transformación (degradación) del agente antitumoral en las sustancias cardiotóxicas fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico (Bertolini y cols., 1999; Lemaire y cols., 1994). Por definir este fenómeno se preparó una curva de calibrado con una batería de disoluciones acuosas a pH 7.4.

La figura 5.2. muestra la aparición de dos máximos por debajo de 325 nm, cuya absorbancia crece al aumentar la concentración de principio activo en el medio. El primero de ellos ($\lambda = 266 \text{ nm}$, como ocurre a pH 4.9) será el que utilizemos en la cuantificación de la liberación de fármaco desde los diferentes tipos de nanopartículas desarrolladas. Por encima de $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, los máximos tienden a fusionarse en uno (lo que ocurre cuando la concentración es superior a 10^{-3} M), por lo que no pueden realizarse medidas por encima de esta concentración. Se recogen los datos experimentales utilizados y la recta de ajuste obtenida en la determinación del coeficiente de absorción molar: $\epsilon = 5977 \pm 150 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $r = 0.995$.

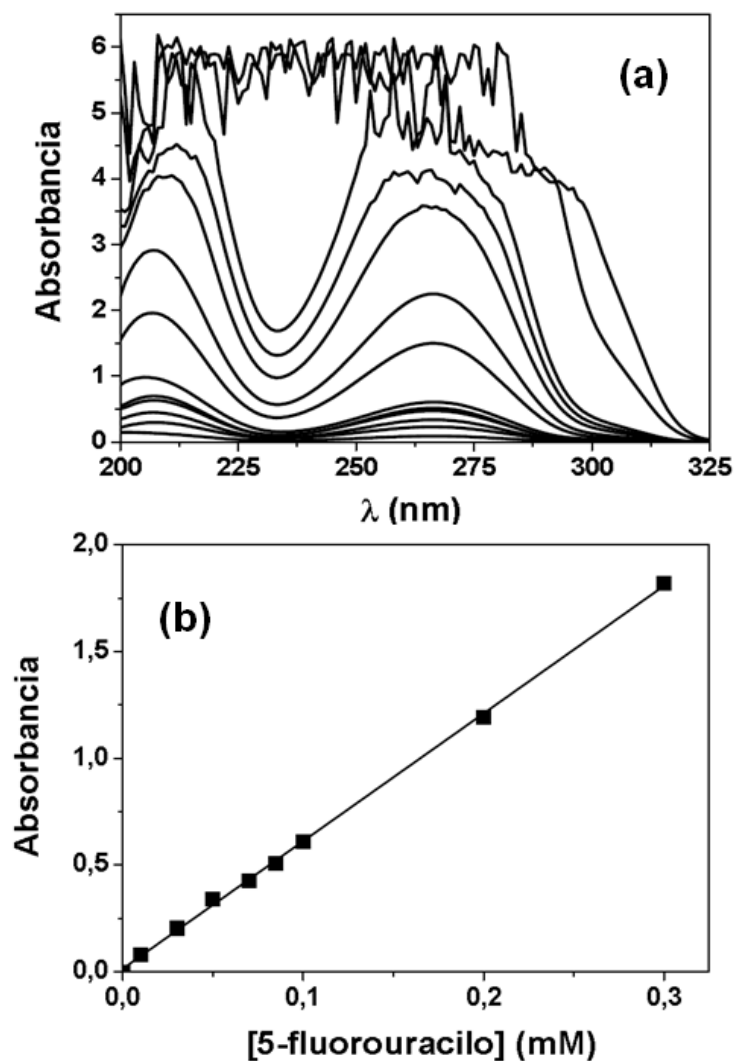


Figura 5.2. (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones de 5-FU preparadas utilizando un tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-5}$ M, $7 \cdot 10^{-5}$ M, $8.5 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M, $2 \cdot 10^{-4}$ M, $3 \cdot 10^{-4}$ M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, $7 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-3} M, $5 \cdot 10^{-3}$ M y 10^{-2} M. (b) Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de 5-FU a pH 7.4 ± 0.1 y para la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm) (b).

El método espectrofotométrico UV-Vis utilizado para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado por las nanopartículas debe ser validado previamente para verificar su exactitud, precisión o linealidad.

La linealidad de un método analítico se define como la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones de producto utilizadas para las cuáles el método es satisfactorio. Los ajustes lineales se han hecho por el método de los mínimos cuadrados, de acuerdo con el cuál obtenemos rectas de la forma $y = a + bx$.

La exactitud es el error sistemático e indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor real. Se calcula a partir del error relativo y del coeficiente de variación para cada una de las concentraciones de las rectas. Se acepta un error de un orden de magnitud menor y un coeficiente de variación entre un 5 y un 10%.

La precisión es la medida del grado de reproducibilidad de un método analítico o bien, el grado de dispersión de los datos de los distintos replicados. Por consiguiente, se puede considerar como el error aleatorio y se determina a partir del coeficiente de variación de cada una de las concentraciones de las rectas de calibrado, valores no superiores a un 5-10%.

En la tabla 5.1. se recogen los valores de absorbancia de las soluciones acuosas de 5-FU en función de su concentración. Mostramos los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (C.V.). Los bajos valores de los coeficientes de variación (< 5 %, en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) es adecuada $[A = (0.03 \pm 0.02) + (7720 \pm 180) \cdot C]$, con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9%.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-5}	0.076 ± 0.002	1.96
$3 \cdot 10^{-5}$	0.233 ± 0.005	2.15
$5 \cdot 10^{-5}$	0.391 ± 0.011	2.81
$7 \cdot 10^{-5}$	0.543 ± 0.017	3.13
$8.5 \cdot 10^{-5}$	0.661 ± 0.012	1.82
10^{-4}	0.773 ± 0.018	2.33
$2 \cdot 10^{-4}$	1.553 ± 0.039	2.51
$3 \cdot 10^{-4}$	2.259 ± 0.025	1.11
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	0.783 ± 0.016	2.04
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	0.797 ± 0.014	1.76
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	0.769 ± 0.012	1.56
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	0.771 ± 0.015	1.94
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	0.811 ± 0.029	3.58

Tabla 5.1. Absorbancia (media \pm D.E.) de las soluciones acuosas de 5-FU para cada una de las concentraciones indicadas. Las concentraciones por encima de $3 \cdot 10^{-4}$ M fueron diluidas hasta 10^{-4} M antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Con el propósito de comprobar la exactitud del método analítico, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la tabla 5.1. para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas en la tabla 5.2. como estimadas. Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(9.89 \pm 0.22) \cdot 10^{-6}$	1.11	2.22
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.02 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	0.66	0.33
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.06 \pm 0.14) \cdot 10^{-5}$	1.18	2.77
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.03 \pm 0.09) \cdot 10^{-5}$	0.43	1.28
$8.5 \cdot 10^{-5}$	$(8.56 \pm 0.13) \cdot 10^{-5}$	0.71	1.52
10^{-4}	$(1.01 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	0.99	1.98
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.02 \pm 0.08) \cdot 10^{-4}$	0.99	3.96
$3 \cdot 10^{-4}$	$(2.93 \pm 0.11) \cdot 10^{-4}$	2.39	3.75
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.01 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	0.99	2.97
$7 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.03 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	2.91	3.88
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.96 \pm 0.19) \cdot 10^{-5}$	0.41	1.91
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.99 \pm 0.23) \cdot 10^{-5}$	0.11	2.31
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	4.76	1.91

Tabla 5.2. Comparación de las concentraciones actuales de 5-FU en solución acuosa con las concentraciones estimadas deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de $3 \cdot 10^{-4}$ M fueron diluidas hasta 10^{-4} M antes de realizar la medida. Los valores *estimados* son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente $[(estimado - actual)/estimado]$, también se muestran los C.V

5.2.-DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE FÁRMACO.

La determinación cuantitativa de la incorporación del antineoplásico 5-FU en las nanopartículas de PLGA diseñadas se basa en la metodología establecida por otros autores para la cuantificación de la vehiculización de fármacos en diferentes tipos de sistemas coloidales (Fawaz y cols., 1997; Müller y cols., 1991; Sullivan y Birkinshaw, 2004). Esta metodología ha sido puesta a punto por nuestro grupo de investigación (Arias y cols., 2009, 2010). En concreto, la técnica se basa en la aplicación de la ley de

Beer a un medio que contenga más de un tipo de sustancias absorbentes. La absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies, siempre que no exista interacción entre éstas. De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio de dispersión/preparación de las nanopartículas a la absorbancia total del sistema.

Respecto al proceso de vehiculización del 5-FU, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total el propio principio activo no incorporado por las nanopartículas, los residuos de la síntesis (y degradación) de estas partículas y los restos de otros componentes del medio. Por lo tanto, puede estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido incorporado por estos sistemas restando a la absorción total del sistema la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la síntesis de las partículas y restos de otros componentes del medio). Por diferencia entre la concentración inicial y final de fármaco en el medio de contacto/síntesis determinaremos la cantidad total de fármaco vehiculizada por los sistemas transportadores (Arias y cols; 2008d; 2010a; 2011b).

La cantidad de 5-FU no incorporada en las nanopartículas se separó mediante centrifugación a 8000 r.p.m. (Centrifuga 5804. Eppendorf) durante 30 minutos.

5.2.1.- INCORPORACIÓN DE FÁRMACO EN MATRIZ.

Como ya se describió en el apartado de síntesis de las nanopartículas, el 5-FU se incorporó en la fase acuosa. Se predice una incorporación más óptima que si se incubaran las nanopartículas formadas en un medio con 5-FU (Pérez-Artacho Santos 2012). Una vez sintetizadas las nanopartículas analizaremos el factor que más críticamente debe contribuir a la incorporación del citostático, es decir, la concentración de este. Para ello se estudian una batería de disoluciones de 5-FU con diferente concentración molar: 10^{-2} M 10^{-3} M, $5 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-5} M, $5 \cdot 10^{-5}$ M. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco.

El análisis de la influencia de la concentración del principio activo sobre la incorporación en la matriz polimérica se realiza por determinación espectrofotométrica descrito y justificado anteriormente.

La determinación de la absorción de fármaco en la matriz de las nanopartículas fue mediante comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de sintetizar las nanopartículas) con los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de las suspensiones de las nanopartículas formadas, una vez eliminada la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos de la síntesis. (Arias y cols., 2010b).

La cantidad de fármaco vehiculizada en las partículas se expresa en términos de Eficacia de encapsulación (*EE%*) y de carga del fármaco (*DL%*) cuyas fórmulas son (5.3 y 5.4):

$$EE\% = \frac{\text{fármaco vehiculizado}(mg)}{\text{cantidad total de fármaco utilizada}(mg)} \times 100 \quad (5.3)$$

$$DL\% = \frac{\text{Fármaco vehiculizado}(mg)}{\text{masa total del sistema transportador}(mg)} \times 100 \quad (5.4)$$

5.2.2.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

La tabla 5.3 recoge los valores obtenidos de vehiculización de 5-fluorouracilo por las distintas nanopartículas. Puede observarse como la absorción de fármaco aumenta al aumentar la concentración de fármaco lo que indica un efecto positivo de dicha concentración sobre la eficacia de vehiculización. Este efecto ya se ha descrito ampliamente en diferentes trabajos de investigación sobre sistemas transportadores de fármacos (Arias y cols., 2011b, c, d; Clares y cols., 2013).

Cabe destacar cómo los valores obtenidos en las síntesis B-in, superiores al 80% con cualquiera de las concentraciones molares ensayadas, y C son superiores al resto de síntesis, probablemente debido a un mejor o más fácil atrapamiento mecánico, evidenciando la influencia de la metodología de síntesis. Por un lado, las nanopartículas denominadas B-in, fueron obtenidas mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente a partir de una doble emulsión; en este caso el principio activo se incorporó en la fase acuosa interna, y por tanto es de esperar una mayor encapsulación. Por otro lado, la baja viscosidad de la fase polimérica en la síntesis C, podría dar lugar a una estructura más delgada y menos compacta, que facilita una mayor encapsulación de 5 FU.

Concentración 5-FU (M)	EE (%)	DL (%)	5-FU cargado (mg)
Nanopartículas A-2			
1·10⁻²	76.88 ± 2.34	7.82 ± 0.21	6.42
5·10⁻³	53.47 ± 1.99	2.72 ± 0.08	2.20
1·10⁻³	55.50 ± 2.01	0.56 ± 0.10	0.75
5·10⁻⁴	52.51 ± 4.78	0.27 ± 0.02	0.44
1·10⁻⁴	50.36 ± 2.13	0.05 ± 0.00	0.18
Nanopartículas B-in			
1·10⁻²	96.34 ± 0.60	3.55 ± 0.02	1.76
5·10⁻³	97.19 ± 0.33	1.79 ± 0.01	0.99
1·10⁻³	97.05 ± 0.82	0.36 ± 0.01	0.19
5·10⁻⁴	98.72 ± 0.28	0.18 ± 0.00	00
1·10⁻⁴	80.07 ± 6.25	0.03 ± 0.00	0.11
Nanopartículas B-ex			
1·10⁻²	39.87 ± 0.98	1.47 ± 0.04	31.01
5·10⁻³	33.87 ± 2.70	0.12 ± 0.1	12.93
1·10⁻³	30.40 ± 2.15	0.11 ± 0.01	4.03
5·10⁻⁴	21.50 ± 1.66	0.04 ± 0.00	1.41
1·10⁻⁴	17.20 ± 1.07	0.01 ± 0.00	0.09
Nanopartículas C			
1·10⁻²	54.66 ± 1.30	1.70 ± 0.02	36.75
5·10⁻³	56.23 ± 0.87	0.87 ± 0.03	19.21
1·10⁻³	50.14 ± 4.61	0.16 ± 0.01	4.58
5·10⁻⁴	53.65 ± 2.11	0.08 ± 0.01	3.05
1·10⁻⁴	37.20 ± 5.69	0.01 ± 0.01	0.24

Tabla 5.3. Eficacia de incorporación (EE%), carga de fármaco (DL%) y cantidad de fármaco en miligramos de las nanopartículas ensayadas en función de la concentración de 5-FU.

Finalmente se podría decir que el tipo de incorporación del fármaco en los nanosistemas, (adsorción superficial del fármaco frente a atrapamiento del fármaco en la matriz) se elucidó mediante electroforesis. Las pequeñas diferencias en los valores de potencial ζ antes y después de la incorporación del fármaco pone de manifiesto la eficiente incorporación de fármaco en el interior de la matriz.

Como cabría esperar las NPs B-in presentaron las menores diferencias en ZP (desde -43 a -32 mV) con una EE % superior al 80 %, seguidas de las NPs C con valores de ZP desde -37 a -25 mV, indicativos de una vehiculización de 5-FU mediada tanto por adsorción como absorción. En el caso de las NPs A-2 se registró la mayor diferencia de potenciales Z, desde -28 a -8mV, lo que evidenció una elevada adsorción superficial del fármaco.

5.3.- ESTABILIDAD DEL 5-FU VEHICULIZADO

Una vez evaluada la vehiculización de 5-fluorouracilo en las diferentes síntesis se realizó un estudio preliminar de la estabilidad de estas formulaciones en función del tiempo y concentración inicial de fármaco utilizado para su elaboración. En concreto, se investigó la capacidad de retención del 5-fluorouracilo por parte de las nanoplateformas diseñadas durante un período de conservación de 6 meses. Para ello las nanopartículas se dispersaron en agua destilada y se conservaron a $4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se realizaron medidas puntuales transcurridos 1, 3 y 6 meses desde la elaboración de las formulaciones.

Las figuras 5.3 y 5.4 recogen los valores de EE% y DL%, respectivamente, en función del tiempo. Es evidente como las NPs B mostraron los valores de EE% más altos después de 1, 3 y 6 meses, pero también las mayores pérdidas en el tiempo, con valores próximos al 30 %. Todo lo contrario ocurre para las NPs B-ex, las cuales presentan los valores de EE% más pequeños, aunque se mantienen constantes a lo largo del periodo de estudio.

Por regla general, los valores de EE% se redujeron drásticamente para la menor concentración de fármaco (10^{-4} M) en todos los tipos de NPs y períodos de almacenamiento.

En cuanto a los valores de DL %, estos presentaron un rango de variación mucho más estrecho a lo largo del tiempo, con una clara disminución de 5-FU en el intervalo de concentraciones 10^{-2} a 10^{-3} M.

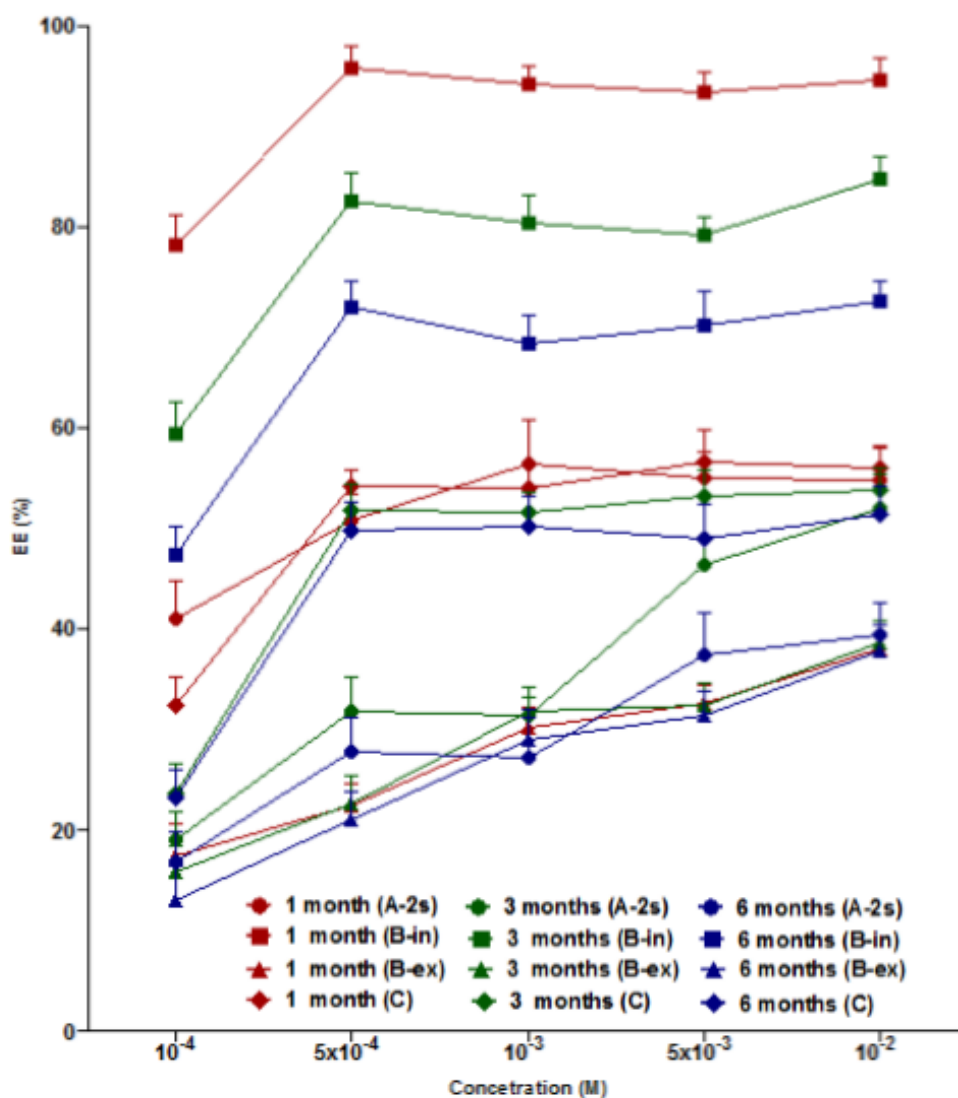


Figura 5.3.: Efiacia de encapsulación de Nps en función del tiempo desde su síntesis (meses). Los colores se refieren al tiempo de almacenamiento (rojo: 1 mes, verde: 3 meses y azul 6 meses); y los símbolos el tipo de Np: Nps A (■); Nps B-in, (▲); Nps B-ex, y (◆) Nps C.

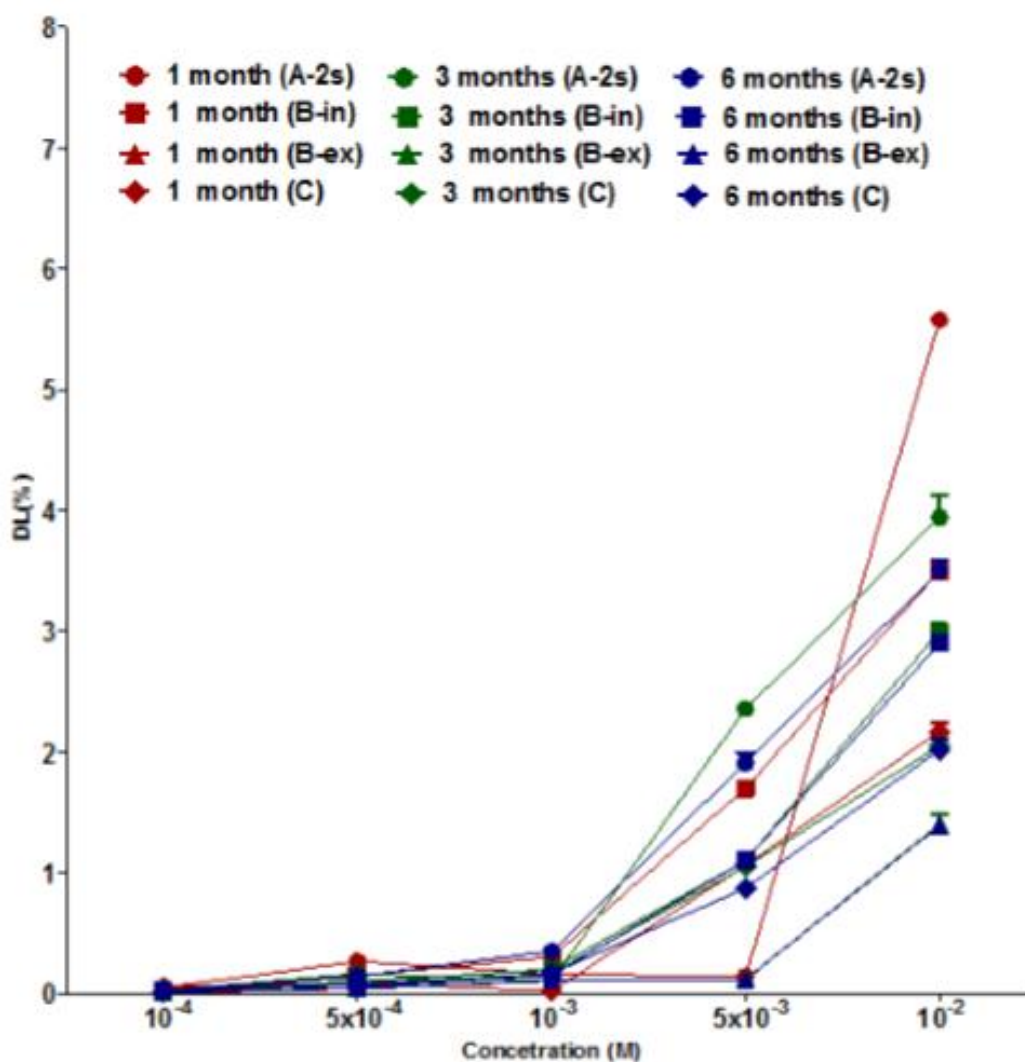


Figura 5.4.: Capacidad de carga (%) de Nps en función del tiempo desde su síntesis (meses). Los colores se refieren al tiempo de almacenamiento (rojo: 1 mes, verde: 3 meses y azul 6 meses); y los símbolos el tipo de Np: Nps A (■); Nps B-in, (▲); Nps B-ex, y (◆) Nps C

**6.-LIBERACIÓN Y CINÉTICA DEL 5-FLUOROURACILO DESDE LOS
NANOSISTEMAS**

6.-LIBERACIÓN Y CINÉTICA DEL 5-FLUOROURACILO DESDE LOS NANOSISTEMAS

6.1.-SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

La eficacia de un fármaco, dependerá de la concentración plasmática, no sólo alcanzada sino mantenida durante un periodo de tiempo más o menos prolongado. Los sistemas convencionales pueden dar lugar a periodos de ineficacia o de toxicidad debido a fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas tras la administración de la dosis. Este hecho es particularmente peligroso en el caso de fármacos con estrecho margen terapéutico poniendo en entredicho la efectividad del tratamiento y la salud del paciente.

Frente a las limitaciones de la terapéutica convencional surgen los sistemas de liberación controlada, concretamente los nanosistemas a base de polímeros biodegradables, que idealmente, liberarán el fármaco de forma continua y a concentraciones terapéuticas, pudiendo establecerse un patrón de liberación durante determinados periodos de tiempo, lo que permite que los efectos no deseados y tóxicos producidos por la administración convencional, de algunos fármacos, sean reducidos (Minko y cols., 2000).

El perfil de liberación *“in vitro”* de un principio activo a partir de una matriz polimérica es una característica fundamental, ya que al determinar la cantidad de fármaco liberada en función del tiempo es posible ajustar la dosis administrada. La cinética de liberación obtenida (% liberado versus tiempo), permitirá comprender los mecanismos involucrados en la liberación de la molécula encapsulada.

La liberación de un fármaco a partir de un sistema coloidal puede venir condicionada por numerosos procesos como mencionamos anteriormente, entre los que cabe destacar la distribución del fármaco en el polímero o el tamaño y porosidad del vehículo (Wise LM y cols., 1995; Wu XS y cols., 2001).

Las variables en el proceso de síntesis (velocidad de homogenización y tiempo de evaporación) y formulación (ratio fase acuosa/orgánica, concentración de surfactante,

tipo de polímero, masa molecular del polímero y el contenido de principio activo) también juegan un papel importante en los perfiles de liberación desde nanopartículas de PLGA. En este sentido, se ha observado una relación directa cuando se utilizan elevadas velocidades de homogenización e inversa para tiempos cortos de evaporación de la fase orgánica. Ambas variables determinarán el tamaño de partícula. A elevadas velocidades de homogenización se consigue un reducido tamaño de partícula y por ende una rápida liberación. Cuando la evaporación se realiza en cortos periodos, la difusión del solvente orgánico hasta el exterior de las gotas puede que no se complete antes de que estas se endurezcan, formándose partículas de gran tamaño. Cuando el solvente orgánico es evaporado lentamente, el grado de difusión del solvente orgánico al exterior es mayor y las gotas obtenidas son más pequeñas. Como resultado se consigue una rápida liberación.

Diferentes grupos de investigadores han observado como a medida que aumenta la relación fase acuosa/fase orgánica se produce una precipitación más rápida del polímero dando lugar a una superficie más suave y menos porosa, con la consiguiente menor liberación del principio activo (Choi HS y cols., 2002, Mao S y cols., 2008, Yang Q y cols., 2000).

Además se ha demostrado una relación inversa entre la liberación de fármacos y la solubilidad de estas en el polímero. El porcentaje de liberación es mayor cuanto menor es la solubilidad del fármaco en el polímero. La estructura cristalina de los polímeros como el PLA, también contribuye a una menor liberación del fármaco, frente a la estructura amorfa del PLGA. Así mismo el contenido en glicólico determina la hidrofilia y degradación del polímero, y por ello, la mayor o menor liberación (Kranz H y cols., 2000, Krishnamachari Y y cols., 2007).

Siguiendo con los factores que dependen del polímero, se ha comprobado como al aumentar su concentración manteniendo un volumen constante de fase orgánica se incrementa la viscosidad de esta fase y por lo tanto, se forman gotitas de aceite más grandes, con una reducción en la liberación de fármaco (Zweers ML y cols., 2003).

6.2.- MECANISMOS DE LIBERACIÓN

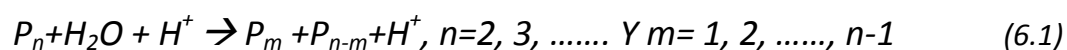
La administración de fármacos a partir de sistemas poliméricos puede clasificarse en tres mecanismos

- sistemas controlados por *difusión* (difusión a partir de polímeros no degradables)
- sistemas controlados por *hinchamiento* (difusión de polímeros que se hinchan en medios acuosos)
- sistemas controlados por *erosión* (liberación como resultado de la degradación y erosión de polímeros)

Para los poliésteres biodegradables, como el PLGA, la liberación del fármaco ocurre a través de la combinación de varios mecanismos, degradación y erosión del polímero, y transporte de fármacos. Aunque en términos generales se clasifica como mecanismo controlado por erosión. A continuación se describen estos mecanismos.

6.2.1. DEGRADACIÓN

El PLGA es un poli (α -hidroxi-éster) que se despolimeriza en presencia de agua por hidrólisis de los enlaces de sus cadenas poliméricas. La reacción de hidrólisis puede ser catalizada por ácidos o bases, aunque los datos experimentales muestran que sólo un pH local ácido es relevante en esta catálisis. (Fu k y cols., 2000; Shenderova y cols, 2004).



Donde P_n , P_m y P_{n-m} denotan cadenas poliméricas con grados de polimerización n , m y $n - m$, respectivamente, y H^+ es el catalizador ácido.

La fuente del catalizador ácido puede ser externa a partir del ácido fuerte en el medio, o interna de los grupos terminales ácido carboxílico de las cadenas poliméricas (reacción autocatalítica). En la autocatálisis:



Donde A es agua y B las cadenas de polímero ácido producidas durante la degradación de PLGA.

6.2.2. EROSIÓN

La principal consecuencia tras la erosión es la pérdida de masa debido a la difusión de pequeños oligómeros y monómeros solubles en agua fuera de la matriz polimérica.

La erosión del polímero puede ser una erosión superficial o erosión matricial (también conocida “en masa”), (Alexis F 2005).

En los polímeros de erosión superficial, la velocidad de degradación del polímero en la superficie es más rápida que la tasa de penetración de agua o de los fluidos *in vivo* en el interior de la matriz. En este caso la erosión se produce de fuera hacia dentro. En cambio, los polímeros de erosión en masa presentan una velocidad de penetración de agua más rápida que la de degradación del polímero. La degradación y la erosión en los polímeros que se erosionan en masa se produce en toda la matriz. El PLGA es un polímero que se erosiona matricialmente, con un tiempo de hidratación de minutos en comparación con semanas o meses para la degradación (Lyu S, 2009, Siepmann J, 2001).

Las matrices de PLGA pueden exhibir a veces un comportamiento heterogéneo de la erosión donde el interior se degrada más rápidamente que la superficie del polímero. Este fenómeno es tamaño dependiente: nanopartículas más grandes y gruesas experimentan una erosión más rápida en sus centros que nanopartículas más pequeñas y delgadas (Grayson ACR, 2005, Grizzi I, 1995)

6.2.3.-TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Este mecanismo se manifiesta en primer lugar como un “efecto burst”, que se produce en la fase inicial del proceso de liberación. Este efecto ha sido descrito en diversas formulaciones tanto de PLGA como de otros polímeros. Esta elevada y rápida liberación del fármaco podría ser disminuída o eliminada modificando la técnica de fabricación de las nanopartículas. (Allison SD, 2008)

Porteriormente el fármaco se libera por alguna combinación de difusión a través de la matriz polimérica, difusión y disolución a través de poros acuosos, coincidente con la disolución del polímero (Fredenberg S y cols., 2011).

La difusión a través de una matriz de polímero densa es posible, pero se limita a pequeñas moléculas hidrofóbicas gracias a la naturaleza hidrofóbica de la matriz de PLGA. (Raman C y cols., 2005). Para fármacos muy solubles en agua y macromoleculares, como proteínas y péptidos, la difusión se produce prevalentemente a través de los poros acuosos (Fredenberg S y cols., 2011), de modo que la difusión del fármaco aumenta a medida que se desarrolla la red de poros y que el tamaño de esta es superior al de las moléculas de fármaco.

La disolución de la matriz polimérica para liberar el fármaco sin transporte de masa es típica de los polímeros que erosionan en superficie en lugar de los polimeros que erosionan en masa. En cuanto a la disolución de las drogas será necesario considerarlo para aquellos compuestos con baja solubilidad en agua (Long C y cols., 2006, Perale G y cols., 2009, Zhang L y cols., 2006)

6.2.4.-COMBINACIÓN DE LOS MECANISMOS PARA LA LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

El mecanismo combinado para la degradación y erosión del PLGA consiste en tres etapas (Lyu S y cols., 2009). En la primera etapa, el polímero es hidratado, y la degradación se produce predominantemente por hidrólisis no catalítica homogénea a lo largo de la masa de polímero, mientras que la concentración de ácidos en las cadenas de polímero es baja. En la segunda etapa cuando la concentración del

catalizador es significativa, se produce una hidrólisis autocatalítica. La tercera etapa implica la disolución de oligómeros y monómeros pequeños en el medio acuoso. Cuantos más oligómeros se solubilizan en los poros y son transportados a través de la red porosa más significativa es la pérdida de masa polimérica.

En presencia de productos de degradación ácida las velocidades de liberación del fármaco están controladas por difusión. Bajo estas condiciones las nanopartículas más pequeñas liberan el fármaco más rápidamente que las nanopartículas más grandes, pues las vías de difusión son más cortas, y mayores los gradientes de concentración. Todo lo contrario ocurre cuando la degradación del polímero se produce por degradación autocatalítica, aquí la liberación del fármaco está controlada por degradación y erosión, haciendo que las nanopartículas más grandes liberen el fármaco más rápidamente que las más pequeñas (Berkland C, 2007).

El tamaño del vehículo polimérico desempeña un papel importante en la combinación entre la degradación, la erosión y el transporte de drogas, y los efectos de la autocatálisis.

En los puntos cercanos a las superficie externa del nanosistema las longitudes de difusión son lo suficientemente pequeñas como para que los subproductos oligómeros ácidos de la hidrólisis difundan fuera del vehículo sin reaccionar con el polímero; sin embargo los fragmentos de polímero ácido que permanecen en el interior tienen dificultad para moverse en regiones más alejadas a la superficie, donde el transporte está limitado por mayores longitudes de difusión. Esto conduce a una acumulación de subproductos de degradación ácida en el interior de las nanoesferas más grandes, lo que da lugar a una disminución del pH del microambiente. Los grupos terminales ácidos catalizan adicionalmente la reacción de hidrólisis que conduce a una degradación acelerada sobre todo en el interior de nanoesferas grandes. Con el tiempo, los efectos autocatalíticos se vuelven más pronunciados, y estas nanoesferas presentarán huecos y un interior bastante heterogéneo (Klose D y cols., 2008). En

cambio las nanoesferas más pequeñas son menos susceptibles a la acumulación ácida y a la degradación heterogénea, de ahí que erosionen homogéneamente.

6.3.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El siguiente paso en este trabajo de investigación fue caracterizar el proceso de liberación *in vitro* del fármaco desde las nanopartículas. El perfil de liberación es un parámetro de gran importancia en el diseño de nanoplataformas con fines terapéuticos. Generalmente el estudio *in vitro* ofrece una idea de la potencialidad del sistema obtenido para la liberación controlada del citostático. Para los ensayos se utilizaron aquellas nanopartículas con máxima cantidad de fármaco vehiculado.

Además, se analizará la influencia de la temperatura y pH del medio, ya que es fundamental conocer el medio en el cual se obtenga una respuesta óptima, y una liberación prolongada en el organismo.

Los medios ensayados fueron:

1. Agua bidestilada a 25 ± 0.5 °C.
2. Tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH=7.4±0.1) a 37.0 ± 0.5 °C.
3. Ácido clorhídrico hasta pH=5.5±0.1 a 37.0 ± 0.5 °C.

Para la realización del ensayo se usa el método de diálisis. Las bolsas de diálisis se mantuvieron sumergidas en agua bidestilada 12 horas antes de comenzar el ensayo. Las bolsas de diálisis (Spectrum[®] Spectra/Por[®] 6, EE.UU.) utilizadas se caracterizan por un tamaño de poro de 2000 Da, siendo capaces de retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. Brevemente, se centrifugaron las dispersiones acuosas de nanopartículas cargadas con 5-fluorouracilo a 8000 r.p.m. durante 30 minutos, para así eliminar el principio activo no incorporado. Se introdujo 1 ml de suspensión de nanopartículas en las bolsas de diálisis, cerrando los extremos de las mismas con unas pinzas. A continuación se sumerge la bolsa en 100 ml del medio. Se simula el movimiento mediante agitación magnética (200 r.p.m.); la temperatura se mantiene estable a

través de un baño termostatzado. Estas condiciones se mantienen constantes durante todo el ensayo.

Las muestras (1 mL) se recogieron a intervalos de tiempo prefijado (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 y 24 h, y una vez al día mientras siga liberando fármaco de forma creciente. Un volumen igual de medio (mantenido a la misma temperatura) se añadió tras cada toma de muestra con el objetivo de mantener las condiciones “*sink*”. El mismo procedimiento analítico utilizado en la determinación de la vehiculización de fármaco, se aplicó a los ensayos de liberación *in vitro* del fármaco.

De forma paralela se estudia la liberación de nanopartículas sin fármaco para eliminar la absorbancia con la que pudieran contribuir los residuos debidos a la desintegración de las nanopartículas.

6.4.- RESULTADOS

Las figuras 6.1, 6.2 y 6.3 muestran la liberación de 5-FU en función del tiempo y el medio de dispersión desde las nanopartículas. La parte superior de cada gráfica muestra la liberación durante las primeras 24 horas (figura 6.1(a), 6.2(a) y 6.3(a)). Como se puede observar las nanopartículas presentan una liberación en dos fases y sostenida en el tiempo. La primera fase de liberación (primeras 24 horas) probablemente corresponda a la pérdida del fármaco asociado a la superficie de las nanoesferas o débilmente atrapado en éstas, así como a la difusión de este.

En esta fase es evidente la rápida liberación de las moléculas de fármaco desde la formulación B-ex, en medio básico, con respecto al resto de formulaciones, probablemente debido a una mayor cantidad de fármaco adsorbido en la superficie de las nanopartículas o al propio método de síntesis. Sin embargo cuando el pH del medio de liberación fue 5.5 son las formulaciones A-2 y B-in las que presentaron mayores tasas de liberación.

Durante la segunda fase del proceso, la liberación de 5-FU se hace sostenida liberándose el resto de 5-FU a lo largo de 15 días. Esta última etapa de liberación es consecuencia del proceso de degradación del polímero y debida a la hidrólisis de sus

enlaces éster por contacto con los fluidos biológicos o artificiales. Dicha degradación ocurre en dos etapas. La primera comprende la escisión hidrolítica de los enlaces éster, llamada degradación, y en la cual se generan oligómeros y monómeros, con la consiguiente disminución de la masa molecular del polímero original. En la segunda etapa, llamada erosión, ocurre la pérdida de masa de la matriz, y la velocidad de escisión de los enlaces puede aumentar debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida (Göpferich, 1986). En esta fase destaca la lenta liberación del fármaco desde las nanoformulaciones B-in en PBS, con respecto a las nanopartículas B-ex. En este sentido se ha de recordar que aunque ambas nanopartículas se obtuvieron mediante el método de emulsión/evaporación del disolvente, el fármaco se incorpora en la fase acuosa interna en las nanopartículas B-in y en la fase acuosa externa en las nanopartículas B-ex. Como resultado, el fármaco de las nanopartículas B-in debe atravesar un mayor recorrido, lo que ralentiza el proceso de cesión.

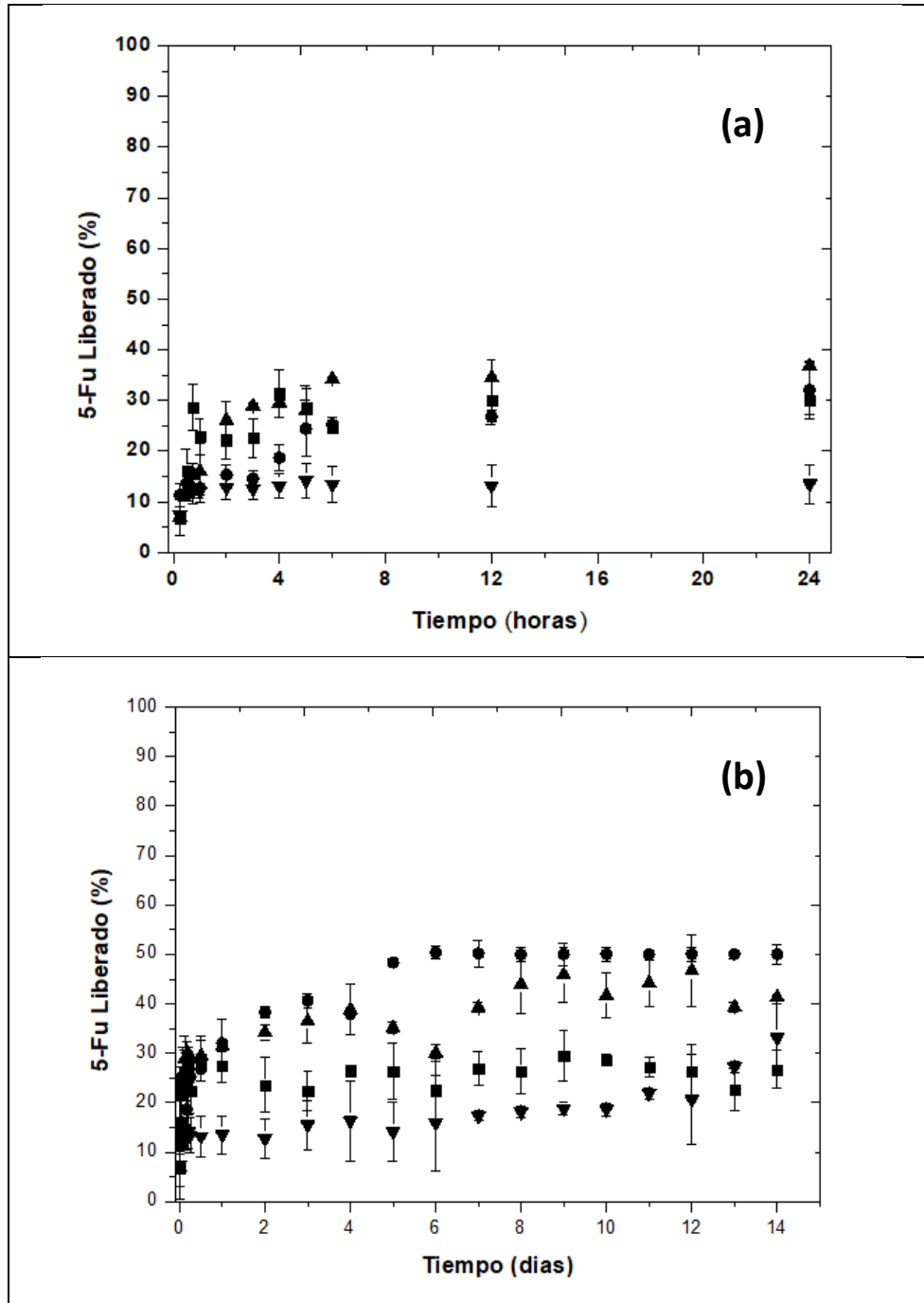


Figura 6.3. Liberación de 5-FU (%) desde las nanopartículas en función del tiempo de incubación **(a)** en horas y **(b)** en días; en el medio natural a 25 ± 0.5 °C. Nps A (■), Nps B-in (▲), Nps B-ex (▼), Nps C (●).

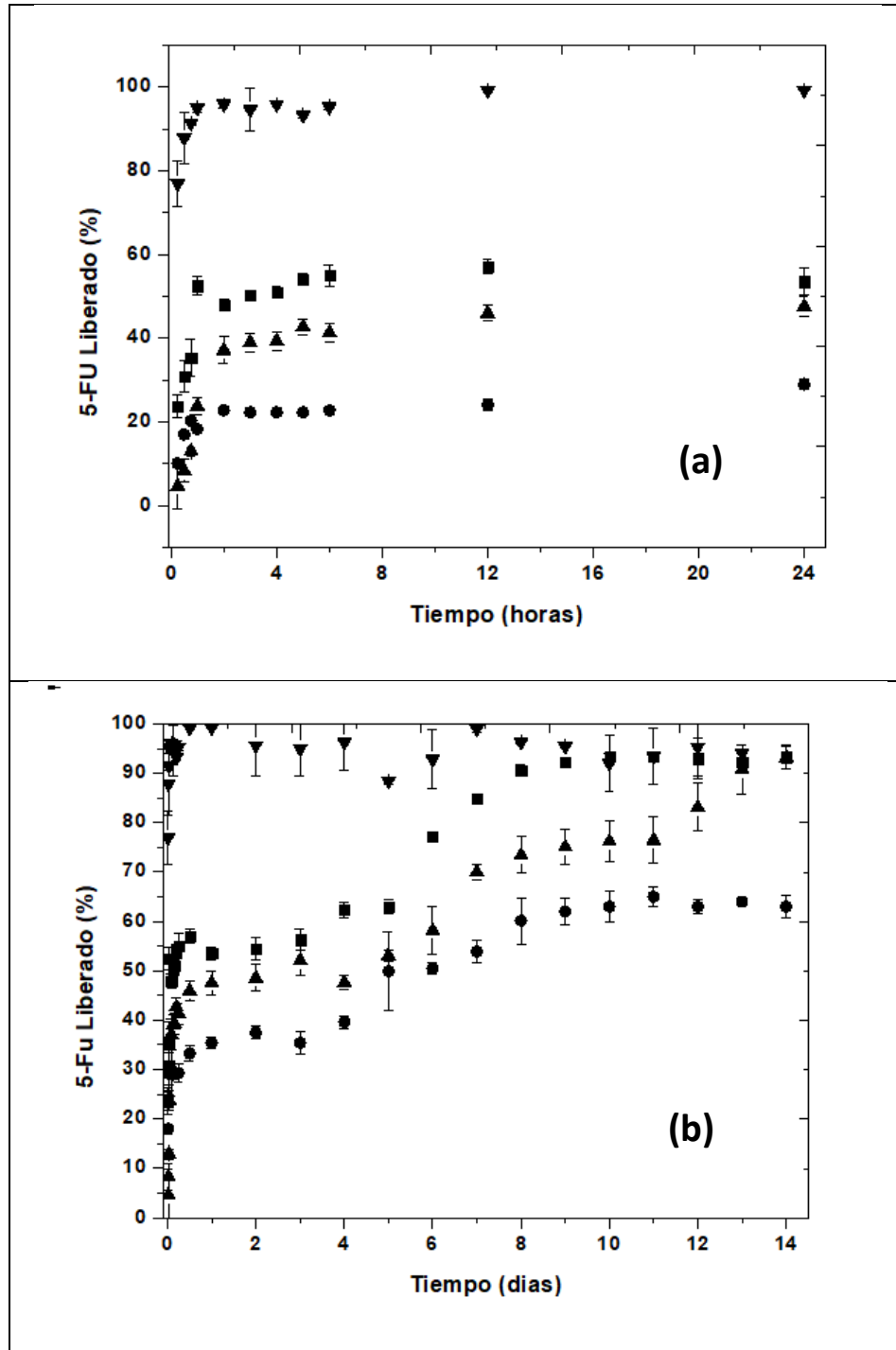


Figura 6.4. Liberación de 5-FU (%) desde las nanopartículas en función del tiempo de incubación **(a)** en horas y **(b)** en días, en una solución a pH 7.4 ± 0.1 a 37 ± 0.5 °C. Nps A (■), Nps B-in (▲), Nps B-ex (▼), Nps C (●).

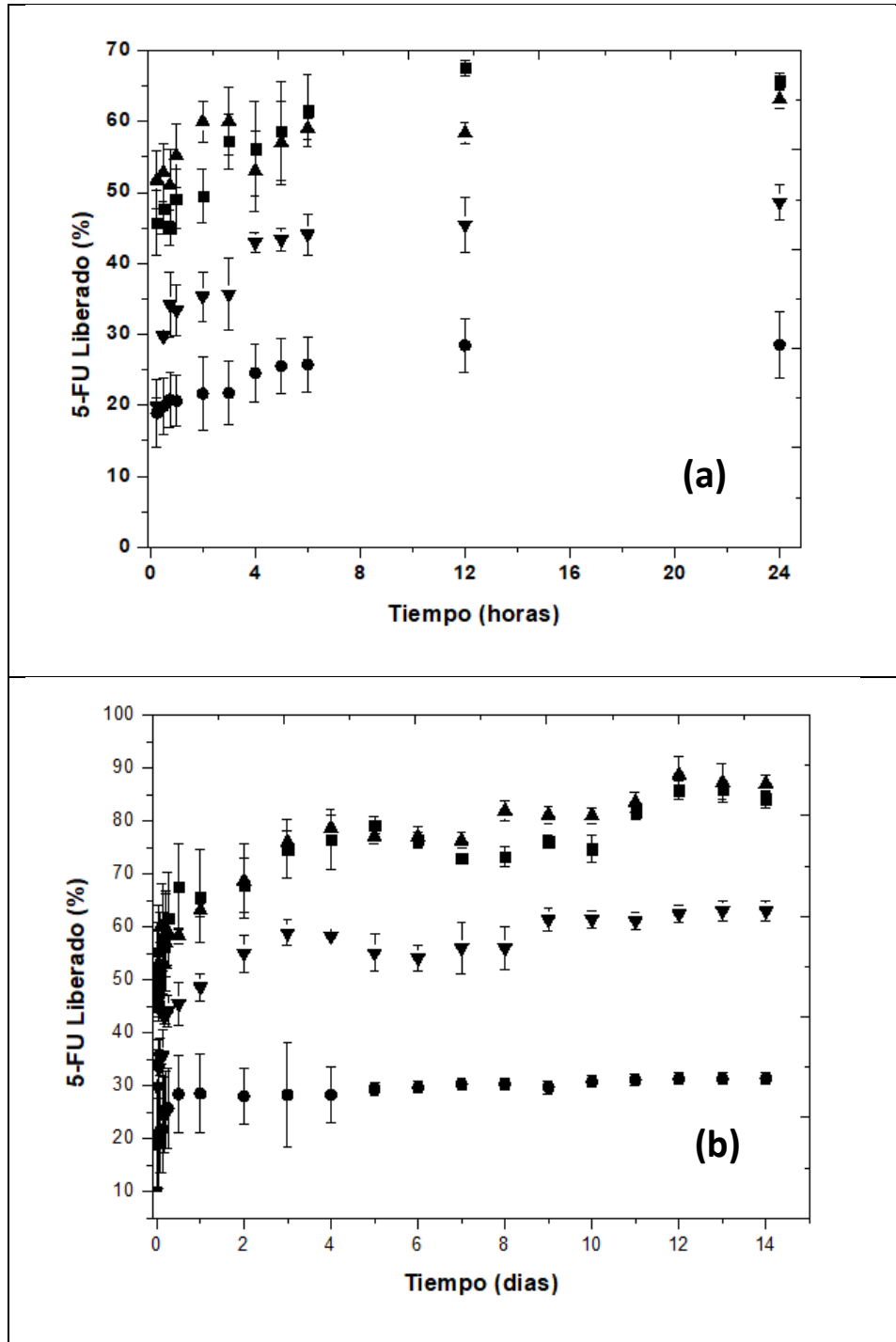


Figura 6.5. Liberación de 5-FU (%) desde las Nps en función del tiempo de incubación **(a)** en horas y **(b)** en días; en una solución ácida a $\text{pH } 5.5 \pm 0.1$ a 37 ± 0.5 °C. Nps A (■), Nps B-in (▲), Nps B-ex (▼) y Nps C (●).

Indistintamente a las condiciones de liberación las nanopartículas C presentaron los perfiles de liberación más lentos. Estas incluían en su formulación un surfactante diferente al de las nanopartículas A y el mismo aunque en mayor concentración que las nanopartículas B. Concretamente el poloxamer F-68. Se trata de un polímero tribloque compuesto por óxido de polipropileno y óxido de polietileno. Recuérdese que durante la degradación del PLGA se suceden varios procesos hidrolíticos que conducen a la formación de oligómeros y monómeros responsables del microambiente ácido, lo que facilita la degradación del polímero y consecuente liberación del fármaco. En este microambiente los poloxamer podrían retardar el proceso de degradación mediante la neutralización de la acidez generada durante el proceso de degradación (Sharm N y cols, 2016).

Además de las características de las nanopartículas que determinan el perfil de liberación, existen otros factores relacionados con las condiciones en que se realizan estos estudios, que también pueden afectar la liberación, como la composición y el volumen del medio de incubación, la temperatura, el dispositivo que se emplee para estudiar el perfil, la forma y la velocidad de agitación, y el modo de recambiar el medio de incubación (parcial o completo) (Blanco-Prieto y cols., 1999; Yang y cols., 1997).

En base a los datos aportados por los diferentes medios y temperaturas, las nanopartículas ensayadas en PBS (figura 6.4.) experimentan, de forma general, una mayor liberación. Este aumento en el porcentaje liberado de 5-FU se ha constatado en todos los tipos de nanopartículas. En cambio cuando los ensayos se realizan a pH 5.5 (Figura 6.5.) y pese a ser este pH más idóneo para la degradación de PLGA, los valores de liberación se ven disminuidos. Precisamente la acidez del medio es uno de los factores limitantes en la liberación del 5-FU, a partir de la cual, la molécula de 5-FU se encuentra en su forma ionizada (cargada positivamente) y por tanto, entrarán en juego mayores interacciones electrostáticas.

La liberación sostenida en general de nuestras formulaciones podría suponer una prometedora herramienta en la mejora de la eficacia del 5-FU. De hecho este perfil de liberación podría apoyar los datos de la literatura (Kishimoto y cols., 2005), donde se afirma que una infusión continua de dosis bajas es una excelente pauta para inducir la muerte celular de manera más efectiva que una sola exposición a dosis altas.

6.5. CINÉTICA DE LIBERACIÓN

Los modelos matemáticos pretenden describir los fenómenos que contribuyen a la cinética general de liberación de fármacos, estos pueden reducir el número de experimentos necesarios para investigar diferentes condiciones y diseños, o profundizar en la comprensión de los mecanismos físicos y químicos de los fármacos y sus transportadores.

Sin embargo su interpretación es difícil debido a la gran variedad de variables físico-químicas que se han de tener en cuenta (Sierra y cols., 2013). En el caso que nos ocupa destacan factores como degradación química del polímero por hidrólisis autocatalítica de los ésteres, erosión de polímeros, evolución de la porosidad como resultado de la erosión masiva, y el transporte difusivo del fármaco a través de la matriz polimérica y la estructura de poro acuosa, etc. De ahí que los perfiles de liberación de fármacos puedan exhibir diferentes formas, tales como perfiles monofásicos, bifásicos y trifásicos, dependiendo de la dinámica del efecto burst, difusión a través de la matriz polimérica y poros, y las etapas de degradación y erosión (Fredenberg S y cols., 2011).

Los parámetros utilizados con mayor frecuencia para determinar cuál es la cinética que explica mejor la liberación de los fármacos, se clasifican en:

a) Ecuaciones empíricas o parámetros puntuales empíricos; que hacen referencia a las magnitudes medidas o calculadas directamente a partir de los datos experimentales. Son un indicativo del proceso global de velocidad de liberación de un fármaco y son independientes de la función matemática que explica el proceso. Su capacidad predictiva está muy limitada fuera de las condiciones específicas del ensayo

(Siepmann J y cols. 2008). Estas ecuaciones, en determinados casos, también permiten dilucidar el mecanismo del proceso, un ejemplo de ella es la ecuación de Weibull.

b) Ecuaciones deducidas con fundamentos teóricos o parámetros funcionales; que a diferencia de los parámetros empíricos ofrecen una descripción más exacta y completa del proceso de liberación, siendo aplicables en una amplia gama de condiciones. En este caso, los modelos matemáticos se ajustan a los datos experimentales y por esta razón la estimación de estos parámetros requiere de una función que describa con suficiente fiabilidad la cantidad de fármaco liberado en cualquier momento (tiempo) del estudio.

Para completar el estudio de la liberación del fármaco desde las nanopartículas, se realizó el ajuste cinético de los perfiles de liberación utilizando para ello el criterio de información de Akaike conocido como valor AIC, por su acrónimo del inglés Akaike's Information Criterion (Costa P y cols., 2001), cuya ecuación, es la siguiente:

$$AIC = n \cdot \ln(SSQ) + 2p \quad (6.3)$$

Donde: n es el número de pares de valores experimentales, SSQ es la suma de los cuadrados residuales y p es el número de los parámetros de la función de ajustado. Así, el modelo matemático que presente el menor valor de AIC será aquel que estadísticamente explica mejor el proceso de liberación del fármaco a partir de la formulación en estudio. Para ello se realizó una regresión no lineal de mínimos cuadrados usando el software Prism[®], V. 3.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Se han ensayado diferentes modelos matemáticos con la finalidad de elegir el que con mayor fiabilidad sea capaz de explicar el mecanismo de liberación de 5-fluorouracilo:

$$\text{Orden uno: } \%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-k \times t} \quad (6.4)$$

$$\text{Higuchi: } \%R_t/\%R_\infty = k \times t^{1/2} + P \quad (6.5)$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas: } \%R_t/\%R_\infty = k \times t^n \quad (6.6)$$

$$\text{Hyperbola simple: } \%R_t/\%R_\infty = R_\infty \times \frac{t}{(k + t)} \quad (6.7)$$

$$\text{Doble Hyperbola: } \%R_t/\%R_\infty = R_\infty \times \frac{t}{(k + t)} + R_\infty \times \frac{t}{(k + t)} \quad (6.8)$$

Donde $\%R_t/\%R_\infty$ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t , $\%R_\infty$ es el porcentaje total de fármaco liberado, $\%R_t$ es porcentaje de fármaco liberado a un tiempo t , k es la constante de liberación y n es el exponente de liberación. Para las ecuaciones hiperbólicas K representa el tiempo al cual se alcanza la mitad del porcentaje máximo liberado. P es la ordenada en el origen.

En la tabla 6.1 se recogen los valores de r^2 y AIC correspondientes a los ajustes cinéticos de la liberación de 5-fluorouracilo desde las nanopartículas.

Formulación		Orden uno	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hipérbola simple	Doble Hipérbola
A	Básico	169,4	133,2	133,0	162,0	120,8
	Ácido	196,2	144,0	132,0	180,2	132,1
B-in	Básico	160,2	142,0	138,2	154,2	112,6
	Ácido	228,2	133,2	141,0	216,2	124,4
B-ex	Básico	79,8	108,1	104,5	82,6	-
	Ácido	168,4	144,2	108,9	148,2	100,4
C	Básico	158,5	97,5	116,5	151,1	91,7
	Ácido	173,8	122,2	130,2	123,9	-

Tabla 6.1.: Valores del coeficiente de determinación r^2 y AIC obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas en % de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde las nanopartículas.

Tras la aplicación de los cinco modelos matemáticos, se pudo verificar que cuando el medio de liberación era PBS, las ecuaciones hiperbólicas (simple y doble) eran los modelos que mejor ajustaban con los menores valores de AIC. Concretamente, las formulaciones A, B-in y C mostraron un perfil característico de una doble hipérbola, revelando un patrón de liberación trifásico con un efecto "burst" seguido de una fase constante, más una liberación rápida final de fármaco. En el caso de la formulación a base de nanopartículas B-ex, el mejor ajustado reveló una hipérbola simple, que se manifiesta con un efecto "burst" inicial y una fase de liberación prácticamente constante.

Por tanto, el proceso de liberación en PBS puede considerarse dividido en dos o tres fases: la primera, se corresponde con una rápida liberación del fármaco mas superficial; la segunda, una liberación bastante lenta influenciada por la baja solubilidad del fármaco en medio acuoso, que enlentece su difusión desde zonas más internas de la NPs, y la última fase que se correspondería con la degradación de la zona más interna de las NPs, acompañada de una erosión de las mismas (Wang y cols, 1996).

Similares cinéticas hiperbólicas han sido descritas para la liberación de bupivacaína desde microesferas de poly(1-caprolactone) en PBS (Blanco MD y cols., 2003) o del docetaxel desde nanoesferas y nanocápsulas (Gallego-Yerga L y cols., 2017)

Del mismo modo se ha encontrado una buena correlación para esta función en la liberación de gentamicina y cefalixina desde nanocompuestos (Hesaraki S y cols., 2009)

Cuando las condiciones ensayadas fueron ácidas, la liberación desde las nanopartículas siguió ajustándose a la ecuación de doble hipérbola, excepto en el caso de las nanopartículas C que se ajustan al modelo de Higuchi, frecuentemente utilizado para describir la liberación cinética de fármacos a partir de materiales porosos (Wang y cols., 2011). Se puede decir que las liberación es directamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (tiempo $1/2$) y existe un proceso de difusión en todas las NPs obtenidas, pero no implica que sea éste el único mecanismo de liberación.

	Parámetros	A	B-in	B-ex	Parámetros	C
Básico	$R_{\infty 1}$	52,62±3.009	44,470±3.413	95,62±0.615		30,01±1.471
	K_1 (h)	0,01056±0.003	0,039±0.0116	0,001±0.0001		0,003±0.0018
	$R_{\infty 2}$	194,90±21.300	100.00±15.51	-		92,170±31.13
	K_2 (h)	44,58±6.270	30.730±4.70	-		20,470±11.04
Ácido	$R_{\infty 1}$	57,53±2,116	56,710±1,260	42,700±1,752	K ($h^{-1/2}$)	3,337±0,253
	K_1 (h)	0,004±0,0013	0,001±0,001	0,010±0,002	P	21,550±0,755
	$R_{\infty 2}$	34,48±3,486	44,640±2,659	24,180±1,966		
	K_2 (h)	4,395±1,821	6,115±1,326	3,017±1,175		

Tabla 6.2.: Parámetros cinéticos de liberación in vitro de 5-FU desde las NPs. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar (n=6).

La tabla 6.2 incluye los parámetros de los modelos que mejor se ajustan a la liberación de 5-FU desde las nanopartículas en función del medio de liberación.

En general las nanopartículas presentan un perfil de liberación similar, en el cual las moléculas adsorbidas en la superficie son rápidamente liberadas mientras que las moléculas de fármaco en el interior de la matriz lo hacen lentamente. Este comportamiento de liberación podría adecuarse para conseguir una alta dosis inicial seguida de una liberación sostenida. En este sentido, las NPs que proporcionan una liberación sostenida del fármaco ofrecen una manera prometedora de mejorar la eficacia del tratamiento con 5-FU. De hecho, se ha informado que la exposición continua mediante una formulación de liberación controlada de un fármaco anticanceroso incluso a la concentración que por sí sola no tiene actividad es más eficaz que a una concentración superior a una dosis única (Kishimoto et al., 2005). Por tanto, se puede concluir que las nooesferas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) aquí enayadas constituyen una alternativa a los regímenes de terapia farmacológica convencional, al liberar el fármaco de manera controlada durante períodos prolongados de tiempo a partir de una única administración. Ello contribuirá a

disminuir los efectos secundarios causados por concentraciones extremas o por repetidas administraciones, y mejorar la conformidad del paciente.

7.- ESTUDIOS *IN VITRO* DE PROLIFERACIÓN

Esta fase de la investigación resulta especialmente interesante ya que aportará luz sobre las características de toxicidad y actividad antitumoral de las nanoformulaciones diseñadas.

En primer lugar, el ensayo de las nanopartículas de PLGA (no cargadas con 5-FU) en la línea CCD-18 de fibroblastos de colon humano debe definir a priori si las nanopartículas son tóxicas por sí mismas y su seguridad. Posteriormente, se procedió al ensayo de la capacidad antitumoral de las nanoplataformas de 5-FU en cuatro líneas de células de cáncer de colon.

Concretamente, una línea de carcinoma de colon humano (T-84), una línea de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) y una de adenocarcinoma de colon murino (MC-38). Además se han utilizado una línea de adenocarcinoma de colon humano resistente (HCT-15).

7.1.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se investigaron las capacidades citotóxicas de las nanopartículas obtenidas mediante los métodos de emulsificación/evaporación del solvente (doble emulsión, nanopartículas B-in y B-ex), así como las nanopartículas obtenidas por el método de emulsificación/difusión del solvente, (nanopartículas C) en fibroblastos de colon humano CCD-18, una línea de adenocarcinoma de colon humano (HT-29), una de adenocarcinoma de colon murino (MC-38) y una línea de adenocarcinoma de colon humano resistente (HCT-15), caracterizada por presentar resistencia intrínseca mediada por gp-P, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, España y en líneas celulares de carcinoma de colon humano T-84 (*American Type Culture Collection*, EE.UU.).

Debido a las inadecuadas propiedades geométricas y de carga eléctrica superficial de las nanopartículas A, éstas no fueron incluidas en esta fase de la investigación.

Las células se sembraron en cultivos monocapa en placas de 96 pocillos (8×10^3 células / pocillo para T-84 y MC-38 y 10×10^3 células / pocillo para HT-29, HCT-15 y CCD-18). El crecimiento se realizó utilizando 300 μ l de un medio de Eagle modificado de Dulbecco de DMEM (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10% de riqueza), una solución 15 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), una solución 14 mM de bicarbonato sódico, una solución 2 mM de L-glutamina, una solución 40 μ g/mL de gentamicina y una solución 500 μ g/mL de ampicilina (Antibióticos S.A., España). Tras 24 h de incubación las células fueron expuestas a cantidades conocidas de NPs cargadas de 5-FU (equivalente a concentraciones de fármaco que varían de 0,05 a 10 μ g / ml). Las células se mantuvieron durante 72 horas a 37.0 ± 0.5 °C en una atmósfera de aire controlada con un 5% de riqueza en CO₂ (Incubador de CO₂ con camisa de agua AutoFlow UN-4750; NuAire, EE.UU.).

Transcurridos los tiempos de tratamiento, las células fueron fijadas con 300 μ l de ácido tricloroacético al 10% (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) durante 20 min a 4 ± 0.5 °C. Posteriormente, se añadieron 300 μ l de una solución al 0.4% de sulforodamina B (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) que se mantuvo durante 20 min. Finalmente las células se lavaron tres veces con ácido acético al 1% (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), añadiéndoles una solución de Trizma® (Hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano)(Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) 10 mM y pH 10,5. La lectura fue realizada mediante colorímetro (Titertek multicristal, Flow Laboratories, EE.UU.) a 492 nm.

El porcentaje de células vivas se calculó utilizando la relación entre las densidades ópticas de las células tratadas y la densidad óptica de las células no tratadas (control), multiplicadas por 100. La citotoxicidad de NPs se evaluó teniendo en cuenta las células no tratadas como control, y se expresó como % de proliferación relativa (RP,%) y el porcentaje de inhibición relativa (RI,%).

7.2. RESULTADOS

La figura 7.1. muestra la citotoxicidad de las nanopartículas de PLGA (no cargadas con 5-FU) correspondientes a las formulaciones B-in (B1), B-ex (B2) y C. Puede apreciarse, si se compara con el control, cómo todas estas formulaciones carecen de toxicidad significativa ya que no condicionan la viabilidad celular en el rango de concentraciones ensayado. Estos resultados sugieren a priori la seguridad de las nanoformulaciones ensayadas.

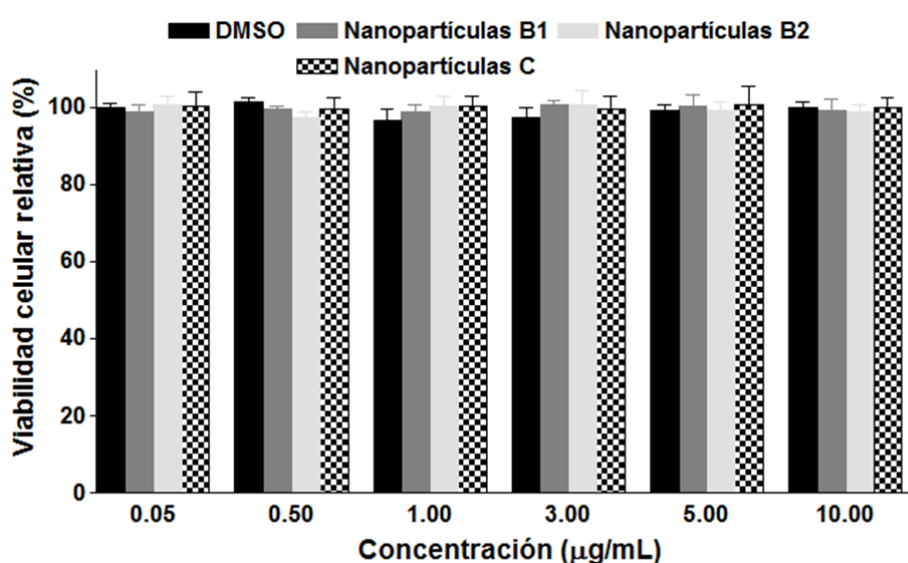


Figura 7.1. Citotoxicidad *in vitro* del control (barra negra), nanopartículas B-in (B1, barra gris oscuro), nanopartículas B-ex (B2, barra gris claro) y nanopartículas C (barra cuadriculada) sobre la línea celular CCD-18 tras 72 horas de incubación. Los valores representados corresponden a la media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

Del mismo modo que en el caso anterior ninguna de las nanopartículas ensayadas mostró citotoxicidad en la línea celular T-84 de carcinoma de colon humano (Figura 7.2.). Independientemente del tipo y concentración de nanopartícula, los resultados del ensayo revelan la ausencia de diferencias significativas entre las

absorbancias correspondientes a los controles y las absorbancias correspondientes a los pocillos de células tratados con los nanosistemas de PLGA no cargados con 5-FU.

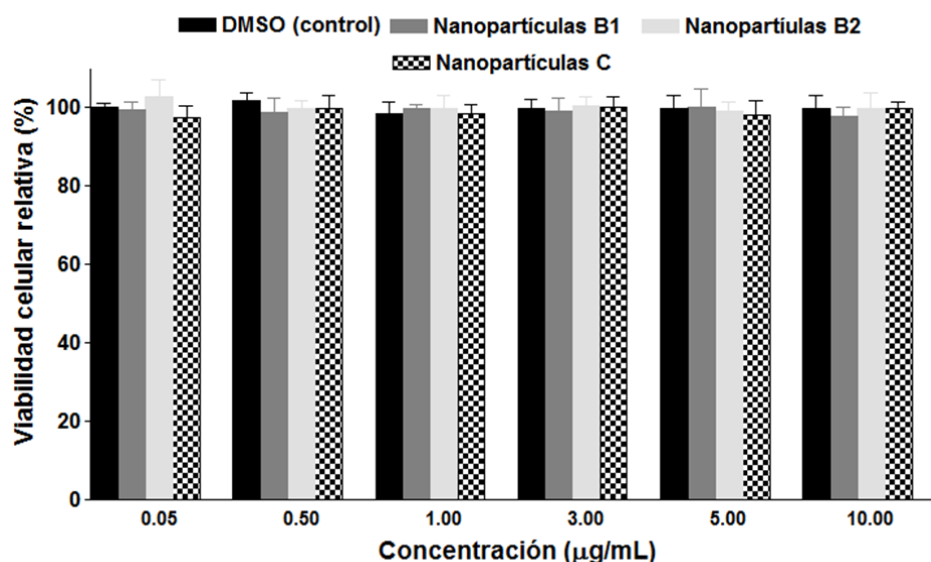


Figura 7.2. Citotoxicidad *in vitro* del control (barra negra), nanopartículas B-in (B1, barra gris oscura), nanopartículas B-ex, (B2, barra gris clara) y nanopartículas C (barra cuadriculada) sobre la línea celular T-84, tras 72 horas de incubación. Los valores representados corresponden a la media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

Puede asumirse, por tanto, que las nanopartículas de PLGA carecen de actividad antitumoral por sí mismas. De esta manera, si las formulaciones de PLGA cargadas con 5-FU son citotóxicas para estas líneas celulares ensayadas, esta capacidad antitumoral debe atribuirse a la actividad de las moléculas de 5-FU que transportan.

La figura 7.3 recoge la información sobre la capacidad citotóxica *in vitro* de las nanoformulaciones cargadas con 5-FU que han sido diseñadas sobre la línea celular T-84, tras 72 horas de incubación. Conviene resaltar que se ensayan concentraciones equivalentes de 5-FU en todos los casos, por lo que las nanoformulaciones se utilizaron

en cantidades adecuadas para lograr las mismas concentraciones de antitumoral que en las soluciones acuosas de 5-FU. Como era de esperar, la actividad citotóxica antitumoral tenía una relación directamente proporcional a la concentración de 5-FU utilizada, independientemente del tipo de formulación.

Destaca la elevada actividad citotóxica de las nanopartículas de PLGA cargadas con 5-FU B-ex a bajas concentraciones ($< 1 \mu\text{g/mL}$). A concentraciones moderadas (3 y $5 \mu\text{g/mL}$) de 5-FU, sigue siendo la formulación B-ex la que mantiene una mayor actividad antitumoral en comparación con las disoluciones acuosas de 5-FU, que resulta también ligeramente superior a la mayor concentración ensayada ($10 \mu\text{g/mL}$). Quizás esta más intensa actividad antitumoral respecto al fármaco libre se deba a una mayor captación del 5-FU por las células T-84 cuando éste está incorporado en el interior de la nanopartícula de PLGA, combinado con una velocidad de liberación de las moléculas de fármaco superior al resto de nanoformulaciones (como se ha comprobado capítulos anteriores de esta tesis doctoral).

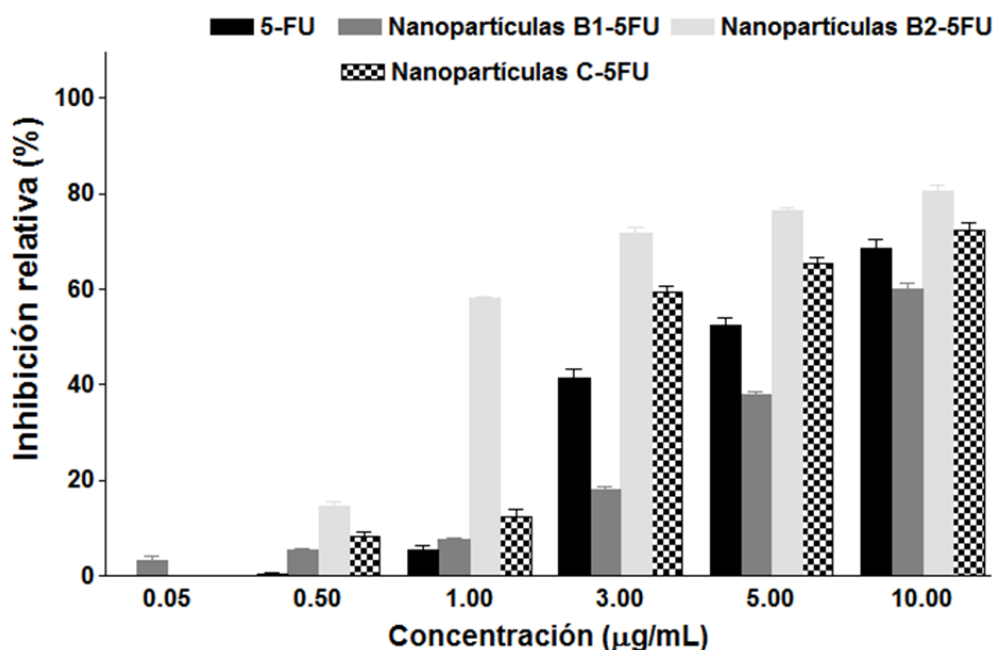


Figura 7.3.: Citotoxicidad *in vitro* de 5-FU (barra negra) y nanopartículas cargadas con 5-FU, B-in (B1, barra gris oscura), B-ex, (B2, barra gris clara) y C (barra cuadriculada) sobre la línea celular T-84, tras 72 horas de incubación. Concentraciones equivalentes de 5-FU: 0.05-10 µg/mL. Los valores representados corresponden a la media ± desviación estándar de tres determinaciones.

Con el objetivo de definir si las nanopartículas cargadas con 5-FU (que desarrollaban la mejor actividad antitumoral, formulación B-ex) mantenían ésta en el tiempo, bajo condiciones de conservación estándar y así elaborar un estudio de estabilidad en el tiempo, (4 °C y protegidas de la luz), se realizó un nuevo ensayo de citotoxicidad en la línea T-84, transcurridos 30 días desde su preparación. Los resultados se recogen en la figura 7.4.

Puede apreciarse como la actividad antiproliferativa se mantiene significativamente mayor en comparación que con el control (soluciones acuosas de 5-FU recién preparadas), a pesar de que la nanoformulación ha sido conservada durante 30 días. Este hecho es muy marcado a concentraciones bajas (< 1 µg/mL), pero también es claro a concentraciones moderadas de fármaco (3 y 5 µg/mL). De esta

manera, se confirma la excelente capacidad antitumoral de la formulación B-ex (B-2) de nanopartículas de PLGA cargadas con 5-FU y su mantenimiento en el tiempo.

Estos resultados son muy interesantes, a falta de un estudio *in vitro* e *in vivo* más completo, si se piensa en el diseño final de un medicamento basado en este nanosistema. Si bien, cabe decir también que las nanoformulaciones B-ex tienen una actividad antitumoral ligeramente menor transcurrido este tiempo de conservación, posiblemente, porque durante este tiempo las nanopartículas han perdido algo de la dosis de 5-FU vehiculizada.

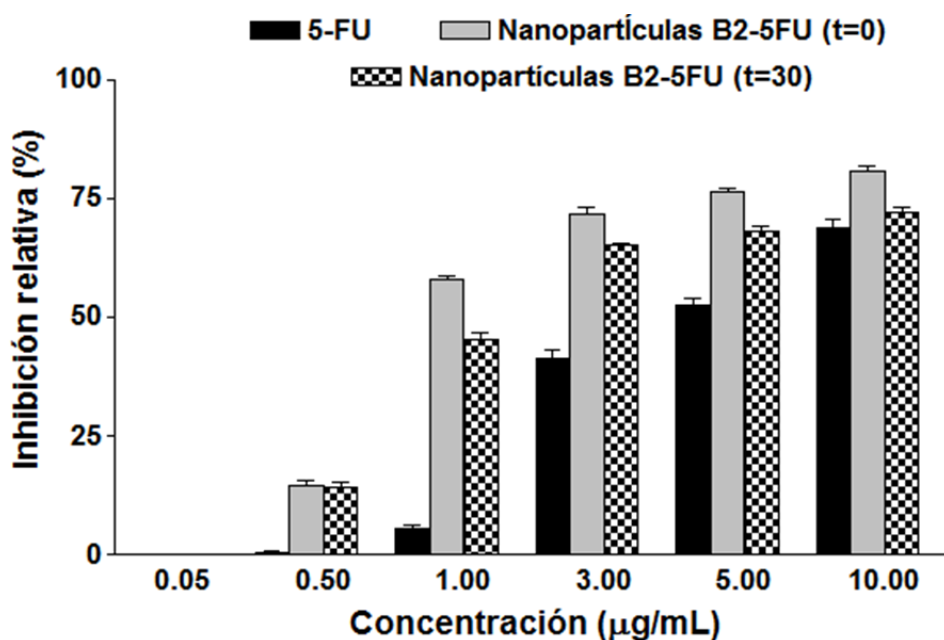


Figura 7.4.: Citotoxicidad *in vitro* de 5-FU (barra negra) y nanopartículas B-ex, (B2 cargadas con 5-FU a tiempo 0 (barra gris clara) y a transcurridos 30 días desde su elaboración (barra cuadriculada) en la línea celular T-84, tras 72 horas de incubación. Concentraciones equivalentes de 5-FU: 0.05 - 10 µg/mL. Los valores representados corresponden a la media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

Dado que la formulación B-ex mostró el mejor efecto antiproliferativo respecto al resto de formulaciones, se decidió investigar su actividad sobre otras líneas celulares de carcinoma de colon. Resultados similares fueron obtenidos cuando se usaron células HT-29, HCT-15 y MC-38 (figura 7.5).

A bajas y moderadas concentraciones de 5-FU (0,5 a 3 $\mu\text{g} / \text{mL}$), las Nps B-ex presentaron una marcada actividad antiproliferativa, mejorada significativamente en comparación con el fármaco libre. Curiosamente, esta nanoformulación demostró una importante actividad antitumoral incluso frente a células HCT-15 quimioresistentes.

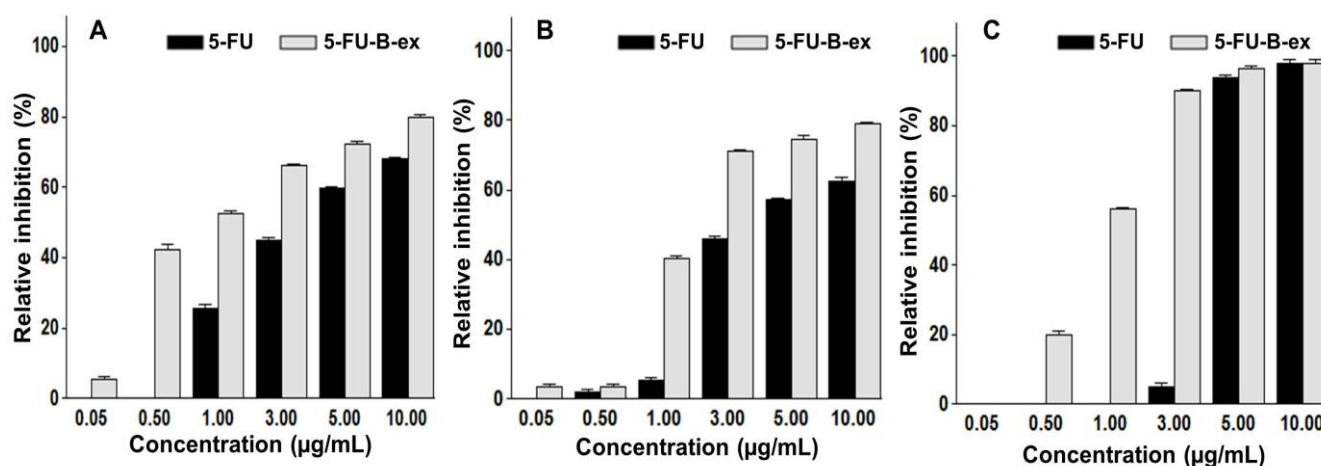


Figura 7.5.: Citotoxicidad *in vitro* de 5-Fu (fármaco libre, no encapsulado) y encapsulado en Nps B-ex (24 h tras su elaboración) en la línea celular de carcinoma de colon HT-29 tras 72 h de incubación (A), en la línea celular de carcinoma humano HCT-15 (B) y en MC-38 (C). Los valores representados corresponden a la media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

A concentraciones mayores (5 a 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) el aumento del efecto anticancerígeno fue menos pronunciado, excepto en el caso de las células MC-38 (Figura 7.5 C), en el que fue similar.

Probablemente la gran capacidad antitumoral presentada por la formulación B-ex se deba a la suma de varios factores, por un lado al mayor contacto fármaco-célula

propio de la nanoestructura y por otro a la adecuada liberación sostenida del citostático en el tiempo. Este último aspecto corrobora las experiencias de otros autores como Kishimoto y cols., 2005, donde se afirma que una infusión continua de dosis bajas de citostático es una excelente pauta para inducir la muerte celular de manera más efectiva que una sola exposición a dosis altas.

8-. CONCLUSIONES

El trabajo de investigación realizado en la presente Tesis Doctoral ha establecido las bases para el diseño de una formulación basada en nanopartículas de PLGA cargadas con 5-FU que demuestra una gran eficacia antitumoral *in vitro* y una nula toxicidad, a falta de una más detallada investigación en este sentido. A continuación se recogen las conclusiones secundarias que pueden extraerse de este trabajo de investigación:

- Se han desarrollado diferentes metodologías de formulación de nanopartículas de PLGA cargadas con 5-FU, analizando las variables implicadas para así optimizar su preparación.
- La caracterización geométrica realizada confirma la eficacia y reproducibilidad de las metodologías de formulación propuestas y permite la definición de las condiciones que conducen a la obtención de nanopartículas para la vía de administración parenteral.
- La estructura de PLGA se mantiene tras someter al polímero a cada uno de los procedimientos de la formulación de nanopartículas. Gracias a que esta estructura se mantiene tras la aplicación de éstas metodologías de fabricación, se puede predecir que queda asegurada la capacidad que el PLGA 50:50 tiene para desarrollar una liberación sostenida en el tiempo del fármaco vehiculizado.
- La caracterización electrocinética de los sistemas coloidales permite definir la influencia que la composición del medio de dispersión tiene sobre la carga eléctrica superficial y así sobre la estabilidad de los sistemas diseñados frente a fenómenos de agregación y sedimentación. Este estudio también constituye una técnica adecuada para definir el tipo de vehiculización del fármaco en las nanopartículas (absorbido en matriz).

- Las formulaciones presentan un comportamiento newtoniano, la viscosidad es prácticamente constante para cualquier velocidad de deformación aplicada. Este comportamiento se sigue manteniendo a lo largo del tiempo de estudio.
- En cuanto a la vehiculización del 5-FU en las nanopartículas de PLGA, se han definido las condiciones óptimas para su evaluación y se ha puesto a punto un método de espectrofotometría UV-Vis reproducible y validado para ello. Se ha comprobado como las condiciones de formulación permiten una adecuada absorción de 5-FU, y cómo también permiten una liberación controlada o sostenida en el tiempo de interés para fines terapéuticos (prolongación de la exposición de las células tumorales a las moléculas de fármaco). En general este proceso se desarrolla en dos o tres fases ajustándose a cinéticas hiperbólicas
- En el estudio de estabilidad de los nanosistemas en función del tiempo y de la concentración inicial de fármaco, -una vez evaluada la vehiculización de 5-fluorouracilo en las diferentes síntesis- se evidenció que las NPs B-in mostraron los valores de EE% más altos después de 1, 3 y 6 meses, pero también fueron las que mostraron las mayores pérdidas en el tiempo; a diferencia de las NPs B-ex, que presentaron valores de EE% más pequeños, aunque se mantuvieron constantes a lo largo del periodo de estudio. Ambas formulaciones presentaron los mejores perfiles de multiple light scattering, lo que a priori garantizará la estabilidad del sistema.
- En cuanto a la actividad antitumoral *in vitro* de las formulaciones desarrolladas, los experimentos realizados en la línea celular CCD-18 de fibroblastos de colon humano, y líneas celulares T-84, HT-29, MC-38 y HCT-15 de carcinoma de colon, revelan la ausencia de toxicidad de todas las nanoformulaciones desarrolladas. Entre todas ellas la formulación B-ex revela una actividad antiproliferativa mucho más eficaz que la formulación de referencia

(solución acuosa de 5-FU) que perdura transcurridos 1 mes desde su elaboración y eficaz, también, frente a células quimioresistentes.

9.- REFERENCIAS

Afrem G, Crăițoiu S, Mărgăritescu C, Mogoantă SS. The study of p53 and CA19-9 pronostic molecular markers in colorectal carcinomas. *Rom J Monophol Embryol* 2010; 51(3): 473-481.

Aguilar MMG, Rodríguez JM, Silva CA. Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in PLGA microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery, *J. Microencapsul.* 2004; 21:553-564.

Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)], *Polym. Int.* 2005; 54: 36–46.

Allemann E, Gurny R, Doekler E. Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1993; 39: 173-191.

Allien M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lathi-Domenici J, Huang H. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*; 2004; 6:17-32.

Allison SD. Analysis of initial burst in PLGA microparticles, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2008; 5: 615–628.

Almeida AJ, Alpar HO, Brown MRW. Immune response to nasal delivery of antigenically intact tetanus toxoid associated with poly(L-lactic acid) microspheres in rats, rabbits and guinea pigs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1993; 45:198-203.

Alpar HO, Almeida AJ, Identification of some of the physico-chemical characteristics of microspheres which influence the induction of the immune response following mucosal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1994; 40: 198-202.

Ammoury N, Fessi H, Devissaguet J-P, Puisieux F, Benita S. In vitro release pattern of indometacin from PLA nanocapsules. *J. Pharm. Sci.* 1990; 79: 763-767.

Ammoury N, Fessi H, Devissaguet J-P, Dubrasquet M, Benita S. Jejunal absorption, pharmacological, activity, and pharmacokinetic evaluation of indometacin-loadel poly(D-L Lactide-co-glycolide)nanocapsuled in rats. *Pharm. Res.* 1991; 8: 101-105.

Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release* 2001; 77: 309-321.

Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Delgado AV. Loading of 5-fluorouracil to poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005; 1: 632-634.

Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2006; 299: 599-607.

Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 2007a; 339: 237-245.

Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(buthylcyanoacrylate) nanospheres. *Int. J. Pharm.* 2007b; 337: 282-290.

Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules* 2008; 13: 2340-2369.

Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008a; 69: 54-63.

Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2008b; 62: 64-70.

Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magnetoresponse squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir.* 2008c; 24: 7512-7519.

Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008d; 33: 252-261.

Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release* 2008e; 125: 50-58.

Arias JL, López-Viota M, López-Viota J, Delgado AV. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 2009a; 382: 270-276.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 2009b; 27: 586-598.

Arias JL, López-Viota M, Delgado AV, Ruiz MA. Iron/ethylcellulose (core/shell) nanoplatform loaded with 5-fluorouracil for cancer targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010a; 77: 111-116.

Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2010b; 75: 204-208.

Arias JL, López-Viota M, Gallardo V, Adolfinia Ruiz M. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010c; 36: 744-750.

Arias JL, Martínez-Soler GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010d; 7: 70-78.

Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini Rev. Med. Chem.* 2011; 11: 1-17.

Arias JL, Clares B, Morales ME, Gallardo, V, Ruiz MA. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment. *Curr. Drug Targets* 2011; 12: 1151-1165.

Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Delgado AV. Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent fluorouracil. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 2011b; 384: 157-163.

Arias JL, Reddy LH, Othman M, Gillet B, Desmaële D, Zouhiri F, Dosio F, Gref R, Couvreur P. Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano*. 2011c; 5: 1513-1521.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 2011d; 12: 97-104.

Arias JL, Sáez-Fernández E, López-Viota M, Biedma-Ortiz RA, Ruiz MA. Synthesis of a biodegradable magnetic nanomedicine based on the antitumor molecule tegafur. *Med. Chem.* 2012; 8:516-523.

Arshady R. Biodegradable microcapsular drug delivery systems: Manufacturing methodology, release control and targeting prospect. *J Bioact Compatible Polym* 1990; (5):315-34.

Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci Polym.* 2006; 17:247-289.

Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, Mikos AG. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 1998 33:111-139.

Barberi-Heyob M, Watelet M, Merlin JL, Bleyer C, Schroeder B. Stability of newlyformulated 5-fluorouracil solutions. *Bull. Cancer* 1995; 82: 1025-1031.

Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nigai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drug in PLGA nanoparticles, by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999;. 25: 471-476.

Barrera A, Contreras J, Soto D, Melo C. Effects of adjuvant chemotherapy on relapse and survival of patients operated for colon cancer. *Rev. Chil Cir.* 2008; 60: 403-409.

Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, Cosgrove RJ, Riddle CT, Lowry SL. A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Am Fertil Soc*; 1979 (31):545-51.

Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH. Systemic and local delivery of contraceptive steroids using biodegradable microcapsules. En: Hafez ESE. *Progress in contraceptive delivery systems*. Lancaster: MTP Press, 1980:63-81.

Berkland C, Pollauf E, Raman C, Silverman R, Kim K, Pack DW. Macromolecule release from monodisperse PLG microspheres: control of release rates and investigation of release mechanism. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96: 1176–1191.

Bertolini A, Fiumanò M, Muffatti A, Pedroncelli S, Doria A, Codazi G, Giustiani S, Scarinci A, Redaelli G. Acute cardibotoxicity due to 5-fluorouracil: an underestimated toxicity. *Minerva Cardioangiol.* 1999; 47: 269-273.

Best L, Simmonds P, Baughan R, Davis C, Fentiman I, George S, Gosney M, Northover J, Willians C, *Quimioterapia paliativa para el cáncer colorrectal metastásico o avanzado, revisión*. En la Biblioteca Cochrane Plus 2008, 2

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer incitation and progression *Nature* 2004; 432:332-337

Bilati U, Alleman E, y Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci* 2005; 24: 67-75.

Blanco MD, Bernardo DV, Sastre RL, Olmo R, Muniz E, Teijón JM. Preparation of bupivacaine-loaded poly(1-caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003; (55): 229-236.

Blanco-Prieto J, Besseghir K, Orsolini P, Heimgartner F, Deuschel C, Merkle HP *Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres*. *Int. J. Pharm.* 1999; 184: 243-250.

Blasi P, Schoubben A, Romano GV, Giovagnoli S, Di Michele A, Ricci M. Lipid nanoparticles for brain targeting II. Technological characterization. *Colloids Surf B*. 2013; 110:130–7.

Bodmeier R, McGinity JW. Poly (lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by solvent evaporation technique. II. Some process parameter influencing the preparation and properties of microspheres. *J Microencapsulation* 1987(4):289-97

Bodmeier R, McGinity W. Solvent selection in the preparation of poly (DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Intern J Pharm* 1988 (43):179-6.

Bower, C, Washington C, Purewal TS. The effect of Surfactant and Solid Phase Concentration on Drug Aggregates in Model Aerosol Propellents. *J. of Pharma. Pharmacol*; 1996, 48:342-346.

Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1649-1659.

Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631-651.

Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lacombe MJ, Desmaële D, d'Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with steath® nanospheres-encapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control. Release* 2004; 100: 29-40.

Buron H, Mengual O, Meunier G, Cayré I, Snabre P. Optical characterization of concentrated dispersions: applications to laboratory analyses and on-line process monitoring and control. *Polymer International* 2004; 53(9) 1205-1209.

Butte B, Jarufe C, Bellolio A, Zúñiga D, López K, Pinedo M, Ibáñez A, Guzman B, Martínez C,. Factores pronósticos de pacientes con metástasis hepáticas de cáncer de colon y recto. *Revista Chilena de cirugía* 2007; 59:293-298.

Carrión FJ, Maza A, Parra JL, La influencia de la fuerza iónica y la carga de la bicapa lipídica en la estabilidad de los liposomas. *Journal of Colloid and Interface Science* 1994; 164:78-87.

Carrión-Recio D, Taboada-Montero C, Vila-Jato JL, Remuñán-López C, Enhancement of protein lung absorption using chitosan microspheres, (sometida a evaluación).

Cascales Angosto M, Álvarez-Gómez JA. Mataloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. Revisión. *An R. Ac. Nac. Farm.* 2012, 76(1):59-84.

Casey T, Bond J, Tighe S, Hunter T, Lintault L, Patel O. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114:47-62.

Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1310-1316.

Choi HS, Seo SA, Khang G. Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres: in vitro release profiles. *Int J Pharm* 2002; 234:195–203.

Choi KY, Jeon EJ, Yoon HY, Lee BS, Na JH, Min KH, Kim SY, Myung SJ, Lee S, Chen X, Kwon IC, Choi K, Jeong SY, Kim K, Park JH. Theranostic nanoparticles based on PEGylated hyaluronic acid for the diagnosis, therapy and monitoring of colon cancer. *Biomaterials* 2012; 33(26): 6186-6193.

Ciofani G, Riggio C, Raffa V, Mencassi A, Cuschieri A. A bi-modal approach against. cancer: Magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. *Med. Hypotheses* 2009; 73: 80-2.

Clares, B, Calpena, AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fanguero JF, Souto EB. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *Int. J. Pharm.* 2004: 473 (1–2), 591–598.

Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, Ortiz R, Arias JL. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 85(3):329-38.

Coco R, Plapied L, Pourcelle V, Jérôme C, Brayden DJ, Schneider Y-J, Preat V. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: comparison of different strategies. *Int J Pharm* 2013; 440: 3-12.

Cohen-Sela E, Chorny M, Kokoukhov N, Danenberg HD, Golomb G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control Release* 2009; 133: 90-95.

Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP, American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference: colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88(7): 1739-1757.

Costa P, Sousa JM. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13:123–133.

Costantino L. Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *Journal of controlled release* 2005, 108(1):84-96.

Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995; 41:2-13.

Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417-1450.

Csaba N., Sánchez A., Alonso M.J., PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J. Control. Rel* 2006; 113:164-172.

Cubo T, Padilla D, de la Osa G, Palomino T, García M, Pardo R. Serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and its prognostic significance. *Med Clin Barc* 2004; 122(6):201-204.

Cuquerella J, Ortí E, Canelles P, Quilles F, Pamos S, Andreu J, Medina E. Cancer colorrectal, concepto de neoplasias sincrónicas y metacrónicas. *Nious Neoplasms Rev. Sdad. Valenciana Patol. Dig* 2000; 19(2):57-60.

Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Prétat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 2012; 161:505-522.

De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 2008; 3: 133-149.

De la Rica R, Aili D, Stevens MM, Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Elsevier* 2012; 64(11): 967-978.

Delgado AV, Arroyo FJ. Electrokinetic phenomena and their experimental determination: an overview. *Interfacial Electrokinetics and electrophoresis* 2002; 106: 1-54.

Delgado AV, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* 2007; 309: 194-224.

Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006; 94(12):1823-1832.

Dorta MJ, Santoveña A, Llabrés M, Fariña JB, Potential applications of PLGA film implants in modulating in vitro drug release. *Int J. Pharm* 2002; 248(1-2):149-56.

Duffy MJ. Evidence for the clinical use of tumour markers. *Ann Clin Biochem* 2004;41(5): 370-377.

Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43(9):1348-1360.

Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97:2948-83.

Edwards DA, Hanes ., Caponetti G, Hikach J, Ben-Jebria A, Eskew ML, Mintzes J, Deaver D, Lotan N, Langer R. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 1997; 276: 1868-1871.

Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumoe cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Ex Cell Res* 2001; 264:163-184.

Engel RH, Evens AM. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci.* 2006; 11:300-12.

Evesque L, Benezery K, Follana P, Tuan Falk A, Doyen J, Reure J, Cavaglione G, François E. Multimodal Therapy os Squamous cell carcinoma of the anus with distant metastasis: A single-Institution experience. *Dis Colon Rectum* 2017; 60(8): 785-791.

Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory. *Int. J. Pharm.* 2006; 314: 189-97.

Fariña JB, Santoveña C, Álvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Llabrés M, Caracterización reológica de dispersiones de copolímeros biodegradables de Poli(D,L-lactida-co-glicolida). Ed. Comares, 2003 S.L. ISBN. 84-699-9328-3, 9.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC, 2012.

Fernández-Pacheco R, Marquina C, Valdivia JG, Gutiérrez M, Romero MS, Cornudella R, Laborda A, Viloría A, Higuera T, García A, García de Jalón JA, Ibarra MR. Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. *J. Magn. Magn. Mater* 2007; 311: 318-22.

Fernández-Urrusuno R, Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ, Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999; 16: 1576-1581.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J-P, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int J. Pharm.* 1989; 55:R1-R4.

Flórez J. *Farmacología Humana*, 5ª Ed., Barcelona: Elsevier-Maason S.A. 2008.

Ford Versypt AN, Pack DW, Braatz RD, Mathematical Modeling of Drug Delivery from Autocatalytically Degradable PLGA Microspheres- A Review. *Journal of Controlled Release* 2013; 165 (1):29–37.

Fournier E, Passirani C, Montero-Menei C y Benoit J. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials.* 2003; 24:3311-3331.

Francuz T, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, Wojnar J. The role of inflammation in colon cancer pathogenesis. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016; 70(27):360-6.

Fredenberg S, Jönsson M, Laakso T, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. Development of mass transport resistance in poly(lactide-co-glycolic acid) films and particles a mechanistic study. 2011--, 16(409, 1-2): 194-202.

Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems — a review, *Int. J. Pharm.* 2011; 415:34–52.

Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery) systems — a review. *Int.J. Pharm.* 2011; 415:34–52.

Fu k, D.W. Pack, A.M. Klibanov, R. Langer. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm. Res.* 2000; 17: 100–106.

Galindo-Rodríguez S, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-difusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* 2004; 21:1428-1439.

Gallego-Yerga L, Posadas I, De la Torre C, Ruiz-Almansa J, Sansone F, Ortiz Mellet C, Casnati A, García Fernández JM, Ceña V. Docetaxel-Loaded Nanoparticles Assembled from β -Cyclodextrin/Calixarene Giant Surfactants: Physicochemical Properties and Cytotoxic Effect in Prostate Cancer and Glioblastoma Cells. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 249

Gálvez-Martín P, Hmadcha A, Soria B, Calpena-Campmany AC, Clares Naveros B. Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014; 86, 459–468.

Ganachaud F, Katz JL. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. *ChemPhys Chem* 2005; 6: 209-216.

García L, Abu-Izza K, Lu DR. Biodegradable cisplatin microsphere for direct brain injection preparation and characterization. *Pharm Dev Technol* 1997; 2:53-5.

García-Contreras L, Morcol T, Bell SJ, Hickey AJ. Evaluation of novel particles as pulmonary delivery systems for insulin in rats. *AAPS Pharm. Sci.* 2003; 1-11.

Gatalica Z, Torlakovic E. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer* 2008; 7:15-26.

Ghesquière B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* 2014; 511: 167-176.

González Garrido MA. Fenómenos Electrocinéticos en suspensiones de partículas planas. Tesis Doctoral. 2016.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996; 17:103-114.

Grayson ACR, Cima MJ, Langer R. Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials* 2005; 26: 2137–2145.

Grivennikov, SI, Greten, FR, Karin M. Immunity, inflammation, and Cancer. *Cell* , 2010; 140: 883–899.

Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M, Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence, *Biomaterials* 1995; 16:; 305–311.

Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 2008; 26(1): 57-64.

Hannagon B N, Ding W Q, Intercellular Communication by Exosome Derived microRNA in Cancer. *J Mol Sci*, 2013; 14:14240-14269

Hans ML, Louman AM. Biodegradable nanopartivles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State and Mater. Sci.*, 2002; 6: 319-327.

Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 806-813.

Herrmann J, Bodmeier R. Peptide-containing biodegradable microspheres prepared by modified solvent evaporation methods. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* 1993; 20:258-9.

Hesaraki S, Moztarzadeh F, Nemati R, Nezafati N. Preparation and characterization of calcium sulfate–biomimetic apatite nanocomposites for controlled release of antibiotics S Hesaraki, - *Journal of Biomedical Materials Research* 2009; 91B: 651-661.

Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to Drug delivery. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(17): 2873-96.

Hoffman, R. Factors Affecting the Viscosity of Unimodal and Multimodal Colloidal Dispersions. *J. of Rheology*, 1992; 36(5):947-965.

Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices, I. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Control. Rel.* 1986, i, 155.

Holliday DL, Huges S, Shaw JA, Walker RA, Jones JL. Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5^a/5^a genotype enhances breast cancer cells invasion. *Breast Cancer Res* 2007; 9(5):R67

Hughes LL, Luengas J, Rich TA, Murray D. Radiosensitization of cultured human colon adenocarcinoma cells by 5-fluorouracil: effects on cell survival, DNA repair, and cell recovery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992; 23(5): 983-991.

Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine* 2006; 1:297-315.

Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly (DL-lactic acid). IV. Release properties of microcapsule containing phenobarbitone. *J Microencapsulation* 1990 (7):53-6.

Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). I. Effect of preparative variables on the microcapsule characteristic and release kinetic. *J Microencapsulation* 1990; (7):229-44.

Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). II. Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *J Microencapsulation* 1990; (7):245-4.

Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). III. Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *J Microencapsulation* 1990(7):41-52

Jhansi Rani V, Raghavendra A, Kishore P, Nanda Kumar Y, Hema Kumar K. Synthesis and biological activity evaluation of cytidine-5'-deoxy-5-fluoro- N-[(alkoxy/aryloxy)] carbonyl-cyclic 2',3'-carbonates. *Eur J Med Chem* 2012; 54:690–696.

Jiménez MM, Pelletier J, Bobin MF, Martini MC, Fessi H. Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Pharm. Dev. Technol.* 2004; 9:329-339.

Jiménez Torres NV, Romero Crespo I, Ballester Solaz M, Marí A, Jiménez Arenas V. Interacción de los antineoplásicos orales con los alimentos: revisión sistemática. *Nutr Hosp.* 2009; 24: 260-272.

Jorge NL, Fenómenos de superficie, disponible en <http://slideplayer.es/slide/5516208/>, última visita realizada el 08/09/2017.

Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Hungerer KD, Hundt E, Kissel T. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinylalcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice, *Pharm. Res.* 2001; 18: 352-360.

Kalas W, Yu JL, Milsom C. Oncogenes and angiogenesis: down-regulation of thrombospondin-1 in normal fibroblast exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Res* 2005; 65: 8878-8886

Kang W, Guo L, Fan H, Meng L, Li Y. Flocculation, coalescence and migration of dispersed phase droplets and oil-water separation in heavy oil emulsion. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 2012; 81 177-181.

Kanjickal DG, Lopina ST. Modeling of drug release from polymeric delivery systems — a review, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2004; 21:345–386.

Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Fujioka S, Hino T. Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect, *J. Control. Rel.* 1999; 62:279-287.

Kemeny N, Snyder A, Shamseddine A, Al-Olayan A, Ei-Merhi F, Kelsen DP, Jamali F, Sidani M, Mukherji D, Ei-Naghy M, O'Reilly EM, Saltz LB, Abou-Alfa GK, Liver-Directed conversion therapy in metastatic colon cancer. *J. Gastrointest Oncol* 2015 6(3):322-8.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *J. N Engl Med* 2008; 358:2039-2049.

Khoei S, Poorabdollahi R, Mostaar A, Faeghi F, Metoxyamine enhances 5-Fluorouracil-Induced Radiosensitization in Colon cancer Cell Line HT29. *Cell J.* 2017; 19(2): 283-291.

Kim H S, Park W I, Kang M, Jin H J. Multiple light scattering measurement and stability analysis of aqueous carbon nanotube dispersions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2008; 69(5) 1209-1212.

Kishimoto S, Kawazoe Y, Ikeno M, Fukushima S, Takeuchi Y. Continuous exposure to low-dose cisplatin and apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28, 1954–1957.

Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Siepmann J. PLGA-based drug delivery systems: importance of the type of drug and device geometry, *Int. J. Pharm.* 2008; 354:95–103.

Kohane DS, Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotech. Bioeng.* 2007; 96(2):203-9.

Kranz H, Ubrich N, Maincent P, et al. Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J Pharm Sci* 2000; 89:1558–1566.

Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int. J. Cancer* 2003; 105: 561-567.

Kreuter J. Large-scale production problems and manufacturing of nanoparticles En: Tyle P (Ed.). *Specialized Drug Delivery System*. New York: Marcel Dekker. 1990, 257-266.

Krishnamachari Y, Madan P, Lin S. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. *Int J Pharm* 2007; 338:238–247.

Kumari A, Yadav S K, Yadav S C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B, Biointerfaces*. 2010; 75(1):1-18.

Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumo-associated fibroblasts: functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol*; 2002; 17:623-637.

Lafreine RM, Buckner CA, Bewick AM, Cell adhesion and cancer: is there potential for therapeutic intervention? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2007; 11:727-731.

Landis DM, Gerlach JL, Adman ET, Loeb L. Tolerance of 5-fluorodeoxyuridine resistant human thymidylate synthases to alterations in active site residues. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27: 3702-2711.

Laurencin CT, Langer R. Polymeric controlled release systems: new methods for drug delivery. *Clinical Laboratory Medicine*. 1987; 7:301-323.

Lemaire L, Arellano M, Malet-Martino MC, Martino R, De Forni M. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: a question of formulation. *Bull. Cancer* 1994; 81: 1057-1059.

Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: Chasin M., Langer R., editors, *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, Marcel Dekker New York, 1990; 1-41.

Li S, Wang A, Jiang W, Guan Z. Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-Fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer* 2008; 8: 103.

Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL, Wang LF. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials* 2009; 30: 5114-24.

Longley D, Harkin y Patric G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3:330-338.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. 2003; 3: 330-338.

Lopez Gascó, P. Preparación, caracterización y evaluación biológica de Nanopartículas poliméricas para la liberación controlada de paclitaxel. Tesis Doctoral 2011. ISBN: 978-84-695-0752-0.

Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008; (b) 130:1091-103.

Lyklema J, Fleer GJ, Colloids and surfaces. *Physicochemical and engineering Aspects*. 1987. (25):101-412.

Lyu S, Untereker D. Degradability of polymers for implantable biomedical devices, *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10:4033–4065.

Ma X, Oyamada S, Wu T, Robich MP, Wu H, Buchholz B, McCarthy S, Bianchi CF, Sellke FW, Laham R. In vitro and in vivo degradation PLGA amorphous calcium phosphate copolymer coated on metal stents. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2012; 96: 632-638.

Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 71: 409-419.

Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65: 71-79.

Mao S, Shi Y, Li L. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68:214–223.

Martín-Banderas L, Sáez-Fernández E, Holgado MÁ, Durán-Lobato MM, Prados JC, Melguizo C, Arias JL. Biocompatible gemcitabine-based nanomedicine engineered by Flow Focusing for efficient antitumor activity. *Int. J. Pharm.* 2013; 443: 103–109.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1):1-15.

Mei L, Sun H, Song C. Local delivery of modified paclitaxel-loaded poly(epsilon-caprolactone)/pluronic F68 nanoparticles for long-term inhibition of hyperplasia. *J. Pharm. Sci.* 2009; 98: 2040-2050.

Menéndez-Sánchez P, Villarejo-Campos P, Padilla-Valverde D, Menéndez-Rubio JM, Rodríguez-Montes JA. Marcadores tumorales en el cáncer colorrectal. *Cir Cir* 2013; 169-175.

Mert O, Lai SK, Ensign L, Yang M, Wang Y-Y, Wood J, hanes J. A poly(ethylene glycol)-based surfactant for formulation of drug-loaded mucus penetrating particles. *J. Control. Release* 2012; 157: 455-460.

Meunier G. le Turbiscan: un nouvel instrument de mesure de phénomènesnaissants de démixtiondans les émulsions et les suspensions = Turbiscan : a new instrument to measure nascent demixtion phenomena in emulsions and suspensions. *Spectra 2000 analyse* 1994; 23(179) 53-58.

Ming Yang, Brackenbury JW. Membrane potential and cancer progression. *J Frontiers in Physiology* 2013; 4(185):1-10.

Minko T, Kuan C, Shyu S, Chang S. The study of gelation kinetics and chainrelaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers.* 2000; 41:389-396.

Mitra S, Gaur U, Gosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release* 2001; 74: 317-323.

Molpeceres J, Aberturas MR, Guzman M. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *J. Microencapsul.* 2000; 17:599-614.

Montasser I, Fessi H, Coleman AW, Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002; 54:281-4.

Mooney DJ, Park S, Kaufman PM, Sano K, McNamara K, Vacanti JP, Langer R. Biodegradable sponges hepatocyte transplantation. *Journal of Biomedical Materials research* 1995; 29:959-965.

Morlock M, Winter G, Kissel T. Microencapsulation of rh-erythropoietin using biodegradable Poly(DL-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; (43):29-6.

Morse LG, Kendrick C, Hooper D, Ward H, Parry E. Treatment of squamous cell carcinoma with intralesional 5-Fluorouracil. *Dermatol Surg.* 2003; 29(11):1150-3.

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev.* 1997; 77(3):7559-803.

Müller RH, Lherm C, Herbolt J, Couvreur P. Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: labelling conditions and loading capacity. *Polymer Science* 1991; 269: 147-152

Mundargi, R.C. Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. 2008; Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control Release* 2014; 125: 193-209.

Murakami H, Kawashima Y, Niwa T, Hino T, Takeuchi H, Kobayashi M. Influence of the Degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *Int J. Pharm.* 1997; 149:43-49.

Oropesa-Nuñez R, Jauregui-Haza U. Las nanopartículas como portadoras de fármacos: características y perspectivas. *CENIC Ciencias Biológicas.* 2012; 43(3).

Otsu, Y.; Prud'homme, R.K. *Rheologica Acta*, 1994; 33(1):29.

Parésa M, Perea S, Pascual M, Blanco I. Poliposis adenomatosa familiar. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29:625-35.

Pavlova NN, Thompson CB, The Emerging Hallmarks of Cancer metabolism, *Cell Metab* 2016; 12, 23(1):27-47.

Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2000; 2:9-29.

Perale G, Arosio P, Moscatelli D, Barri V, Müller M, Maccagnan M, Masi M. A new model of resorbable device degradation and drug release: transient 1-dimension diffusional model, *J. Control. Release*. 2009; 136:196–205.

Pfutzner A, Mann AE, Steiner S, Technosphere™/insulin- a new approach for effective delivery of human insulin via the pulmonary route, *Diabetes Tech. Ther.* 2002; 4:589-594.

Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5(4):447-51.

Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2006; 2: 8-21.

Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging Effects in the Electrokinetics of colloidal iron oxides. *J Colloid Interface Sci* 2002; 245: 86-90.

Pradhan P, Giri J, Banerjee R, Bellare J, Bahadur D. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *J. Magn. Mater.* 2007: 311; 208-215.

Pratt V, McLeod H, Dean L, Malheiro A. Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype. National center for Biotechnology Information, editors. *Medical Genetics Summaries*. 2012.

Pretel E, Arias JL, Cabeza L, Melguizo C, Prados J, Mallandrich M, Suñer J, Clares B. Development of biomedical 5-Fluorouracil nanoplateforms for colon cancer

chemotherapy: influence of process and formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017; 15; 530(1-2): 155-164.

Przybyła T, Sakowicz-Burkiewicz M, Maciejewska I, Bielarczyk H, Pawełczyk T. Suppression of ID1 expression in colon cancer cell increases sensitivity to 5-Fluorouracil. *Acta Biochim Pol*, 2017 64(2):315:322.

Putnam D, Kopecek J. Polymer conjugates with anticancer activity. *J Avances in polymer Science*. 1995; 55-123.

Quintanar-Guerrero D, Alléman E, Fessi H, Doelker E, Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998; 24:1113-1128.

Rafler G, Johmann M. Controlled release systems of biodegradable polymers. Part 5: microparticles preparation by a salting-out process. *Pharm Ind Germany* 1997(59):622-4.

Raman C, Berkland C, Kim K, Pack DW. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution, *J. Control. Release* 2005; 103: 149–158.

Ramos D, Gómez M, Fernández D, Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Rev. Cubana* 2001; 35(2):126-35.

Reddy LH. Drug delivery to tumors: recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 1231-1242.

Reed Robert A. Thermosensitive nanoparticle formulations and method of making the same. US20130230457A1. Cl A61K 9/127 15Feb2013, Appl nº 13/768,840.

Ríhová B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996 21:157-176.

Ríhová B. Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000, 42:65-80.

Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*; 1975, 51:135-153.

Rodríguez R, Álcarez-Lorenzo C, Concheiro A, Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH-ion sensitive Drug delivery systems. *J. Controlled release*. 2003, 86(2-3): 235-65.

Romera López, A, Análisis de la expresión génica global en pacientes con cancer colorectal: clasificación, significado biológico, y relevancia clínica. Tesis doctoral. 2010.

Rosas EJ, Pedraz, JL. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica, revisión, *Rev Colomb Cienc Quim Farm* 36(2), 134-153.2007.

Rubio ED. Nuevas dianas terapéuticas contra el cáncer. *Nuevas Dianas Terapéuticas contra el Cancer Colorrectal Metastásico*. Madrid, 2006; 287–312.

Rudy BC, Senkowski BZ. *Analytical profiles of drug substances*, Vol. 2. New York and London: Academic Press, 1973.

Russell-Jones G, McTavish K, McEwan J, Rice J, Nowotnik D. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase Drug uptake by tumours. *J Inorg. Biochem*. 2004; 98(10): 1625-33.

Saez V., Hernáez E., Sanz Angulo L. Liberación controlada de fármacos. *Micropartículas*. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2004; 5(2): 87-101.

Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Arias JL. Drug delivery systems based on poly(ϵ -caprolactone) for cancer treatment. *Ars Pharm*. 2009; 50: 83-96.

Sáez-Fernández E, Ruiz MA, López-Ruiz A, Arias JL. Review of the “state of the art” and possibilities of the most significant approaches to the specific delivery of chemotherapy agents to tumor cells. *Asr Pharmaceutica* 2010; 51(3):121-135.

Salmore MD, Hernández PJ, Cerezo A. Encapsulation study of 6-methylprednisolone in lipid microsphere. *Drug Dev Ind Pharm* 1997(23):133-6.

Sánchez-Muñoz A, Hitt R, Robles L, García A, Pérez J. Isquemia miocárdica por 5-fluoruracilo y capecitabina: una toxicidad poco frecuente pero potencialmente grave. *Rev. Oncol.* 2003; 5: 419–421.

Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, Shinichi S, Hitoshi K, Takeshi S, Hiroshi I. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer* 2015; 18: 538-548.

Schröeder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J. Control. Release* 2009; 137: 63-68.

Segarra MA, Pellicer V, Gamón R, Bayón AM, Canales M, Torner A, Adell R, Marcote E. Is mucinous colorectal adenocarcinoma a distinct entity? *Gastroenterol Hepatol* 2001; 25:534-40.

Seijo B, Fattal E, Roblot-Treupel L, Crouvreur P. Desing of nanoparticles of less than 5nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int J. Pharm* 1990; 62:1-7.

Semenza G L, Artemov D, Bedi A, Bhujwalla Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P y Zhong H. The metabolism of tumours: 70 years later. *Novartis Found Symp* 2001; 240, 251-260.

Shaoping S, Na L, Hiromitsu Y, Yoshiaki K, Fude C, Pengfei Y. pH-sensitive poly(lactida-co-glycolide) nanoparticle composite microcapsules for oral delivery of insulin. *Inernational Journal of Medicine* 2015; 10:3489-3498.

Sharm N, Madan P, Lin S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 11: 404–416.

Sharma N, Madan P, Lin S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: a co-surfactant study. *Asian J. Pharm. Sci.* 2015.

Sheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 1995; 373:81-3.

Shenderova A, A.G. Ding, S.P. Schwendeman. Potentiometric method for determination of microclimate pH in poly(lactic-co-glycolic acid) films, *Macromolecules* 2004; 37: 10052–10058.

Sicilia B, Vicente R, Gomollón F. Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa: discusión de la epidemiología clásica. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2009; 39:135-145.

Siepmann J, Göpferich A, Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 48: 229–247.

Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug delivery, *Int. J. Pharm* 2008; 364: 328–343.

Sierra, A.F., Ramírez, M.L., Campmany, A.C., Martínez, A.R., Naveros, B.C., 2013. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion 600 combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 69, 202–214.

Silverstein R, Webster FX. Spectrometry identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons Inc., 1998.

Singh J, Pandit S, Bramwell VW, Alpar HO. Diptheria toxoid loaded poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems, *Methods* 2006; 38:96-105.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. Madrid: Mc Graw Hill, 2001.

Sloane BF, Yan S, Podgorski I, Linebaugh BE, Cher ML, Mai J. Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Bio* 2005; 15:149-157.

Somavarapu S, Alpar HO, Song CYS. Biodegradable nanoparticles in nasal vaccine delivery: effect of particle size and loading, *Proceed. Inter. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*1998; 25:451-452.

Son GM, Kim HY, Ryu JH, Chu CW, Kang DH, Park SB, Jeong Y. Self-assembled polymeric micelles based on hyaluronic acid-g-poly(d,l-lactide-co-glycolide) copolymer for tumor targeting. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: 16057-16068.

Soppimath KS, Aminabhavi TH, Kulkarni AR, Rudzinski EE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release* 2001; 70:1-20.

Spenlehauer G, Benoit JP, Veillard M. Formation and characterization of poly (DL-lactide) microspheres for chemoemobilization. *J Pharm Sci* 1986(75):750-55.

Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep, *Vaccine* 2004; 22:3929-3941.

Steiner S, Pfutzner A, Harzer O, Heineman L, Rave K, Technosphere™/insulin- Proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2002; 110:17-21.

Stieneker F, Kreuter J, Löwer J. High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvants for HIV vaccines, *AIDS* 1991; 5:431-435.

Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clin Chem* 2008; 54(12):11-79.

Surendrakumar K, Martín GP, Hodgers ECM, Jansen M, Blair JA. Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based dry powder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs. *J. Control. Rel.* 2003; 93:385-394.

Swami A, Reagan MR, Basto P, Mishima Y, Kamaly N, Glavey S. Engineered nanomedicine for myeloma and bone microenvironment targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111:10287-10292.

Symonds H, Krall C, Remington L. Dependent apoptosis supresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; 78:703.

Thies C, Bissery C. Biodegradable microspheres for parenteral administration. En: Lim F, *Biomedical applications of microencapsulation*. Boca Raton: CRC Press, 1984:53-74.

Thomasin C., Corradin G., Men Y, Merkle HP, Gander B. Tetanus toxoid and a synthetic malaria antigen in PLA/PLGA microspheres: Importance of polymer degradation and antigen release for immunological response, *J Control Release*. 1996; 41,131.

Tietze R, Jurgons R, Lyer S, Schreiber E, Wiekhorst F, Eberbeck D, Richter H, Steinhoff U, Trahms L, Alexiou C. Quantification of drug-loaded magnetic nanoparticles in rabbit liver and tumor after in vivo administration. *J. Magn. Mater.* 2009; 321: 1465-8.

Tobío M., Gref R., Sánchez A., Langer R., Alonso M.J., Stealth PLA-PEG nanoparticles as nasal protein delivery systems, *Pharm. Res.* 1998; 15:274-279.

Tong R, Gabrielson NP, Fan TM, Cheng J. Polymeric nanomedicines based on poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide). *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2012; 16: 323-332.

Torrado JJ., Cadórniga R., Nuevos sistemas de administración de medicamentos. *Vectorización*. 1989b; CIF, 8:242-248.

Trimis G, Chatzistamou I, Politi K, Kiaris H, Papavassiliou AG. Expression of p21waf1/Cip1 in stromal fibroblasts of primary breast tumors. *Hum Mol Genet* 2001; 17:3596-3600.

Turkington RC, Longley DB, Allen WL, Stevenson L, McLaughlin K, Dunne PD, Blayney JK, Salto-Tellez M, Van Schaeybroeck S, Johnston PG. Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4): a targetable regulator of drug resistance in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5:1046.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem*; 2002 15; 277(7):4589-92.

Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, y cols. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PloS One* 2011; 6:15313.

Van Egmond, J.W. Shear-thickening in Suspensions, Associating Polymers, Worm-like Micelles, and poor Polymer Solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 1998; 3:385-390.

Vernier-Julienne MC, Benoit JP. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.* 1996; 71: 121-128.

Vert M. *Rev The Drug Carrier system*.CRC 1986; 291.

Vila A, Sánchez A, Évora C, Soriano I, Vila-Jato JL, Alonso MJ. PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery, *Journal of Aerosol Medicine* 2004; 17:174-185.

Vila A., Sánchez A., Janes K., Behrens I., Kissel T., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*2004 57:123-131.

Vila A., Sánchez A., Pérez C., Alonso M.J. PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA, *Polym. Adv. Technol.*2002; 13: 51-858.

Vila A., Sánchez A., Tobío M., Calvo P., Alonso M. J., Design of biodegradable particles for protein delivery, *J. Control. Rel.*2002; 78:15-24.

Villalonga R, Espín Basany E, López Cano M, Landolfi S, Armengol Carrasco M. Carcinomas neuroendocrinos de colon y recto: experiencia de una unidad en seis años. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2008; 100(1):11-16.

Vilos C, Constandil L, Rodas P I, Cantin M, Zepeda K, Herrera N, Velasquez L A. Evaluation of ceftiofur–PHBV microparticles in rats. *J Drug Des Devel Ther* 2014; 8:651-666.

Virlan M J R, Miricescu D, Totan A, Greabu M, Tanase C, Sabliov C M, Caruntu C, Calenic B. Current uses of poly-(lactic-co-glycolic acid) in the dental field: A comprehensive review. *J. of Chemistry*, 2015, ID: 525832. 12.

Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation *in vitro* and *in vivo* of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chem Pharm Bull* 1982(30):3719-27.

Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Flanagan Dr, Schmitt E. Controlled release of protein and vaccines from poly (ester) microspheres *in vitro*. En: Gebelein CD et al, eds. *Cosmetic and pharmaceutical applications of polymers*. New York: Plenum, 1991:239-53.

Wang, XF, Liu, P, Tian, Y. Ordered mesoporous carbons for ibuprofen drug loading and release behavior. *Micropor. Mesopor. Mater.*2011; 142, 334–340.

Wang XF, Huang WF, Nie J, Zhou Y, Tan DW, Jiang JH. Toxicity of chemotherapy Regimens in Avanced and Metastatic Pancreatic Cancer therapy: a Network mata-analysis. *J Cell Biochen* 2017; 10.1002/jcb.26266.

Wang YM, Sato H, Adachi I, Horikoshi I. Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere for targeted delivery of a novel anticancer agent, Taxol. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1996; 44:1935-1940.

Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*. 2012; 21: 297-308.

Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; (365)153-65.

Wise LM, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz, eds. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. New York: Marcel Dekker 1995; 1151:200.

Xue SW. Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. En: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER, eds. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. New York: Marcel Dekker, 1995:1151-60.

Xue SW. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. *J Biomater Sci Polymer* 2001; 12(1): 21-34.

Yadav KS, Sawant KK. Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 2010; 11: 1456-1465.

Yamashita K, Watanabe M, Clinical significance of tumor markers and emerging perspective on colorectal cancer. *Cancer Sci* 2009; 100(2):195-199.

Yang J, Cleland JL. Factors affecting the in vitro release of recombinant human interferon-g (rhIFN-g) from PLGA microspheres. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 908-914.

Yang Q, Owusu-Ababio G. Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26:61-70.

Yang Y, Kopeck J. Macromolecular therapeutics. *J. Controlled release* 2014; 155-160.

Yazbeck R, Lindsay R, Abbott CA, Benkendorff K, Howarth GS. Combined Effects of muricid extract and 5-fluorouracil on intestinal toxicity in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015; 8: 1-9

Yechezkel B, Doxil® The first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *Journal of Controlled Release* 2012; 160: 117-134.

Yong WP, Innocenti F, Ratain MJ. The role of pharmacogenetics in cancer therapeutics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2006; 62: 35-46.

Zao J, Gou M, Dai M, Li X, Cao M, Huang M, Wen Y, Kan B, Qian Z, Wei Y. Preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity study of cationic PCL-Pluronic-PCL (PCFC) nanoparticles for gene delivery *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009; 90: 506-513.

Závišová V, Koneracká M, Múčková M, Kopčanský P, Tomašovičová N, Lancz G, Timko M, Pätoprstá B, Bartoš P, Fabián M. Synthesis and characterization of polymeric nanospheres with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1613-6.

Zhang L, Long C, Pan J, Qian Y, A dissolution-diffusion model and quantitative analysis of drug controlled release from biodegradable polymer microspheres, *Can. J. Chem. Eng.* 2006; 84: 558–566.

Zhu L, Huo Z, Wang L, Tong X, Xiao Y, Ni K. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 370: 136-143.

Zhu L, Torchilin VP. Stimulus-responsive nanopreparations for tumor targeting. *Integr. Biol.* 2013; 5: 96-107.

Zúñiga C, Freyre Bernal L, Navia CA, Saavedra JS. Adhesión celular: el ensamblaje de la vía al cáncer. *J Morfolia* 2014; 6(2) 3-20.

Zweers ML, Grijpma DW, Engbers GH, et al. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003; 66:559–566.